

(19)



(10)

LT 4638 B

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

- (11) Patento numeris: **4638** (51) Int. Cl.⁷ **C07K 14/635**
- (21) Paraiškos numeris: **99-010**
- (22) Paraiškos padavimo data: **1999 02 02**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **1999 12 27**
- (45) Patento paskelbimo data: **2000 03 27**
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/CA97/00547**
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1997 08 01**
- (85) Nacionalinės procedūros pradžia: **1999 02 02**
- (31, 32, 33) Prioritetas: **691647, 1996 08 02, US**
040560, 1997 03 14, US
- (72) Išradėjas:
Jean-Rene Barbier, CA
Paul Morley, CA
Witold Neugebauer, CA
James Whitfield, CA
Gordon, E. Willick, CA
- (73) Patento savininkas:
NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA, Intellectual Property
Services Office, Building M-58, EG-12, Montreal Road, Ottawa,
Ontario K1A 0R6, CA
- (74) Patentinis patikėtinis:
Reda Žabolienė, 7, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:
Paratiroidinio hormono analogai osteoporozės gydymui

(57) Referatas:

Šiame išradime aprašomi žmogaus paratiroidinio hormono analogai, kurie turi padidintą kaulų atstatymo aktyvumą ir padidintą bioprieinamumą. Aprašyti peptidai yra hPTH-(1-31) dariniai, kurie yra ciklinti, pavyzdžiui, sudarant laktamus arba tarp Glu²² ir Lys²⁶, arba tarp Lys²⁶ ir Asp³⁰. Be to, gamtinis Lys²⁷ gali būti pakeistas arba Leu, arba kitomis hidrofobinėmis liekanomis, kaip antai Ile, norleucinu, Met, Val, Ala, Trp arba Phe.

Paprastai tokie analogai turi padidintą adenilciklazės stimuliavimo gebą žiurkių osteosarkomos ląstelėse ir turi padidintą kaulų atstatymo aktyvumą, naudojant žiurkių, kurioms pašalintos kiaušidės, modelį. Šie analogai turi padidintą aktyvumą ir bioprieinamumą, kuris matomas iš jų hipotenzinio poveikio žiurkėms. Taip pat aprašytas bandymas, kuriame koreliuojamas hipotenzinis aktyvumas su osteogeniniu aktyvumu.

Išradimo sritis

Šis išradimas yra susijęs su žmogaus paratiroidinio hormono analogais, kurie buvo rasti tinkamais osteoporozės gydymui.

Išradimo kilmė

Osteoporozė yra vyraujanti pagyvenusių žmonių, ypač pagyvenusių moterų, invalidumo priežastis. Neseniai buvo nustatyta, kad žmogaus paratiroidinis hormonas (hPTH) ir tam tikri jo analogai yra kaulų augimo stimulatoriai, ir jie tinka osteoporozės gydymui. Osteoporozė yra progresuojanti liga, kuri pasireiškia bendros kaulų masės sumažėjimu ir padidintu kaulų trapumu. Tai dažniausiai sukelia spontaniškus atraminių kaulų lūžius ir fizinį bei psichinį pablogėjimą, būdingą pažeidimams, susijusiems su nejudrumu. Pomenopauzinę osteoporozę sukelia išnykimas estrogenų, kurie reguliuoja dešimtmečių trukmės kaulų akseleracijos kaitą, didėjant neatitikimui tarp seno kaulo rezorbcijos ir naujo kaulo susidarymo. Tai sukelia suplonėjimą, poringumo padidėjimą ir atraminių kaulų trabekulių sunykimą. Osteoporozė taip pat yra susijusi su hipertireoze, hiperparatiroidizmu, Kušingo sindromu ir tam tikrų steroidinių vaistų vartojimu. Istorškai susiklostęs gydymas apima kalcio kiekio didinimą maiste, estrogeninę terapiją ir padidintas vitamino D dozes, bet pagrindiniai yra susiję su agentais, tokiais kaip antirezorbciniai vaistai, kurie inhibuoja osteoklastų sukliamą kaulo rezorbciją.

Paratiroidinį hormoną (PTH) gamina priešskydinė liauka, ir jis yra pagrindinis kalcio kiekio kraujyje reguliatorius. PTH yra polipeptidas; galima pagaminti sintetinius peptidus metodais, kuriuos aprašė Erickson ir Merrifield, *The Proteins*, Neurath et al., Eds., Academic Press, New York, 1976, p. 257, ir Hodges et al. (1988) *Peptide Research* 1, 19 arba Atherton, E. and Sheppard,

R.C. *Solid Phase Peptide Synthesis*, IRL Press, Oxford, 1989 modifikuotu metodu.

Kai kalcio kiekis serume yra sumažintas žemiau normalaus lygio, priešskydinė liauka išskiria PTH, ir kalcio kiekis yra padidinamas dėl kalcio rezorbcijos iš kaulų, dėl padidintos kalcio rezorbcijos iš žarnyno ir dėl padidintos inkstų kalcio reabsorbcijos iš susidariusio šlapimo inkstų kanalėliuose. Nors pastoviai leidžiami nedideli PTH kiekiai gali pašalinti kalcį iš kaulų, tos pačios nedidelės dozės, kai jos leidžiamos protarpiais, gali faktiškai skatinti kaulų augimą.

Tregear US patente 4,086,196 aprašo žmogaus PTH analogus ir teigia, kad pirmosios 27-34 aminorūgštys yra efektyviausios adenililciklazės stimuliavimo požiūriu *in vitro* bandymuose su ląstelėmis. Rosenblatt US patente 4,771,124 aprašo hPTH analogų, kuriuose Trp²³ yra pakeistas aminorūgštimis fenilalaninu, leucinu, norleucinu, valinu, tirozinu, β -naftilalaninu arba α -naftilalaninu, savybę būti PTH antagonistais. Šie modifikuoti hPTH analogai taip pat turi pašalintas 2 ir 6 galines aminorūgštis, ir tai sukelia didelės dalies agonistinio aktyvumo praradimą, naudojant juos osteoporozės gydymui. Šie analogai buvo ketinami panaudoti kaip PTH ir giminingo PTH peptido inhibitoriai. Buvo teigiama, kad šie analogai gali būti naudingi hiperkalcemijos, susijusios su kai kuriais augliais, gydymui.

Pang et al, WO93/06845, publikuotame 1993 m. balandžio 15 d., aprašo hPTH analogus, kuriuose Arg²⁵, Lys²⁶, Lys²⁷ pakeisti įvairiausiomis aminorūgštimis, įskaitant alaniną, asparaginą, asparto rūgštį, cisteiną, glutaminą, glutamo rūgštį, gliciną, histidiną, izoleuciną, leuciną, metioniną, fenilalaniną, proliną, seriną, treoniną, triptofaną, tiroziną arba valiną. Teigiama, kad jie yra efektyvūs gydant osteoporozę, ir turi minimalų poveikį kraujo spaudimui ir lygiesiems raumenims, tačiau jokių patvirtinančių šį teiginį duomenų bandymuose su gyvūnais arba žmonėmis nepateikiama.

PTH veikia per dviejų antrinių mesendžerinių sistemų aktyvaciją - G_s-baltymo aktyvuotą adenililciklazę (AC) ir G_q-baltymo aktyvuotą fosfolipazę C_β. Pastaroji stimuliuoja surištos su membrana proteinkinazės Cs (PKC) aktyvumą. Buvo parodyta, kad šiam PKC aktyvumui reikia PTH 29-32 liekanų

(Jouishomme et al (1994) *J. Bone Mineral Res.* **9**, (1179-1189)). Nustatyta, kad kaulų augimo padidėjimas, t.y. toks efektas, kuris yra naudingas gydant osteoporozę, yra susijęs su peptido sekos sugebėjimu padidinti AC aktyvumą. Buvo parodyta, kad natyvaus PTH seka pasižymi visais tokiais aktyvumais. hPTH-(1-34) seka paprastai vaizduojama kaip (A):

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His
Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu
Gln Asp Val His Asn Phe-OH

A

Toliau duodamas linijinis analogas (hPTH-(1-31)-NH₂), kurio duomenys įtraukti į žemiau duodamą 1 lentelę, pasižymi tik AC-stimuliuojančiu aktyvumu, ir buvo parodyta, kad jis yra labai aktyvus kaulų nykimo atstatymo požiūriu bandymuose su žiurkėmis, kurioms pašalintos kiaušidės (Rixon, R. H. et al (1994) *J. Bone Miner. Res.* **9**, 1179-1189; Whitfield et al. (1996), *Calcified Tissue Int.* **58**, 81-87; Willick et al, US patentas No. 5,556,940, publikuotas 1996 m. rugsėjo 17 d.):

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His
Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu
Gln Asp Val-NH₂

B

Aukščiau pavaizduota molekulė (B) gali turėti laisvą karboksilo galą vietoj parodyto amidinio galo.

Šio išradimo tikslas yra pagaminti naujus PTH analogus, kurie turėtų didesnę metabolinę stabilumą, padidintą kaulų atstatymo aktyvumą, padidintą AC aktyvumą ir minimalius pašalinius klinikinius efektus.

Išradimo santrauka

Pagal vieną šio išradimo aspektą pateikiamas žmogaus paratiroidinis hormonas hPTH, turintis tokią aminorūgščių seką:

R-NH-R¹-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-R²-His-Asn-Leu-Gly-Lys-R³-R⁴-R⁵-R⁶-R⁷-Glu-Arg-Val-R⁸--Trp-Leu-R⁹--R¹⁰--R¹¹-Leu-R¹²-Asp--Y,

kurioje

R = vandenilis arba bet kokios linijinės arba šakotosios grandinės alkilas, acilas arba arilo grupė,

R¹ = Ser, Ala arba Aib,

R² = Met arba gamtinė hidrofobinė aminorūgštis,

R³ = His arba tirpi vandenyje aminorūgštis,

R⁴ = Leu arba tirpi vandenyje aminorūgštis,

R⁵ = Asn arba tirpi vandenyje aminorūgštis,

R⁶ = Ser arba tirpi vandenyje aminorūgštis,

R⁷ = Met arba gamtinė hidrofobinė aminorūgštis,

R⁸ = Glu, Lys arba Asp,

R⁹ = Cys, Glu arba Orn,

R¹⁰ = Arg, Lys, Orn, Gln, Glu arba Asp,

R¹¹ = gamtinė hidrofobinė arba polinė aminorūgštis,

R¹² = Gln, Arg, Glu, Asp, Lys arba Orn,

X = OH, NH₂ ir

Y = X, Val-X, Val-His-X, Val-His-Asn-X, Val-His-Asn-Phe-X, Val-His-Asn-Phe-Val-X, Val-His-Asn-Phe-Val-Ala-X ir Val-His-Asn-Phe-Val-Ala-Leu-X,

ciklizuotas tarp vienos arba dviejų aminorūgščių porų 22 ir 26, 26 ir 30, 27 ir 30 ir 25 ir 29, kai R³ ir R⁶ yra Lys, Orn, Glu arba Asp, išskyrus ciklo(Lys²⁶-Asp³⁰)[Leu²⁷]-hPTH-(1-34)-NH₂, ciklo(Lys²⁷-Asp³⁰)-hPTH-(1-34)-NH₂ ir ciklo(Lys²⁶-Asp³⁰)[Leu²⁷]-hPTH-(1-34)-OH, ir jo farmaciškai tinkamos druskos.

Druskų pavyzdžiais yra neorganinių rūgščių druskos, organinių rūgščių, kaip antai skruzdžių rūgštis, acto rūgštis, vyno rūgštis ir citrinos rūgštis druskos, neorganinių bazių druskos, kaip antai natrio ir amonio

druskos ir organinių bazių, kaip antai trietilamino, etilamino ir metilamino druskos.

Pagal kitą šio išradimo ypatybę, atlikta ciklizacija susidarant laktamams, kuriuose kopuliuotos pasirinktų aminorūgščių porų, tokių kaip gamtinių liekanų 22 ir 26 arba 26 ir 30, šoninės grandinės. Taip pat aptariami ir kitokie ciklizacijos tipai, kaip antai disulfido tiltelio sudarymas, pvz. tarp Cys turinčių analogų Cys²²-Cys²⁶ ir Cys²⁶-Cys³⁰.

Taip pat buvo rasta, kad yra efektyvūs kai kurie aminorūgščių pakeitimai. Lys²⁷ gali būti pakeistas Leu arba įvairiomis kitomis gamtinėmis hidrofobinėmis arba polinėmis liekanomis. Kitas faktorius yra liekanos atitikimas receptoriui. Ala nėra toks hidrofobinis kaip Leu. Lys ir Tyr paprastai yra laikomi poliniais, bet nei vienas iš jų neturi hidrofobinių sąveikų su receptoriumi. Pavyzdžiui, Lys gali sudaryti tokią konformaciją, kad hidrofobinės dalys sąveikautų su kitomis receptoriaus hidrofobinėmis liekanomis, o NH₂ būtų prieinamas tirpikliui. Tokie pakeitimai apima ornitiną, citruliną, α -aminosviesto rūgštį, alaniną, norleuciną, izoleuciną ir tiroziną arba bet kokią linijinę arba šakotą alifatinę α -aminorūgštį, turinčią 2-10 anglies atomų šoninėje grandinėje, bet kokį tokį analogą, turintį polinę arba krūvį turinčią grupę alifatinės grandinės gale. Polinių ir krūvį turinčių grupių pavyzdžiais yra: amino-, karboksi-, acetamido-, guanidino- ir ureidogrupės. Nors atrodo, kad geriausias pakeitimas yra Leu²⁷, pasirodo, kad daug kitų tokių 27-padėtyje pakeistų peptidų beveik visiškai išlaiko aktyvumą ir taip pat gali turėti pageidautinas savybes, tokias kaip padidintas proteolitinis stabilumas arba tirpumas vandenyje; tikimasi, kad aktyviausi bus Ile, norleucinas, Met ir ornitinas.

Šis pakeitimas stabilizuoja α -spiralę hormono surišimo srityje. Tai buvo patvirtinta tiriant laktaminių analogų apskritiminio dichroizmo (CD) spektrus, lyginant su linijinės molekulės - [Leu²⁷]-hPTH-(1-31)-NH₂ - apskritiminio dichroizmo spektrais. Apskritiminio dichroizmo spektrai yra labai jautrūs α -spiralinės antrinės struktūros buvimui, ir ši metodika buvo naudojama parodyti, kad hPTH fragmentuose yra α -spiralinė struktūra (Neugebauer et al (1991) *Biochemistry* **31**, 2056-2063). Be to, buvo parodyta α -spiralės

stabilizacija sudarant aukščiau minėtus laktamus hPTH-(20-34)-NH₂ molekulėje (Neugebauer et al (1994) *Int. J. Peptide Res.* **43**, 555-562). Yra galimybė susidaryti amfifilinei α -spiralei tarp hPTH-(1-31)-NH₂ 21 ir 31 liekanų, ir buvo pateikti duomenys, kurie rodo, kad šios spirālės hidrofobinė pusė sąveikauja su PTH receptoriais (Neugebauer, W. et al (1995) *Biochemistry* **34**, 8835-8842; Gardella, T. J. et al (1993), *Endocrinology* **132**, 2024-2030).

Buvo rasta, kad efektyviausia ciklizacija yra laktamo sudarymas, pavyzdžiui, arba tarp Glu²² ir Lys²⁶, arba tarp Lys²⁷ ir Asp³⁰ liekanų. Galimos ir kitokios ciklizacijos, kaip antai tarp Lys²⁷ ir Asp³⁰, tačiau buvo rasta, kad toks laktamas turi tam tikrą destabilizuojantį poveikį α -spiralei.

Konkrečiau kalbant, PTH fragmentų receptoriaus surišimo tyrimai parodė pagrindinę surišimo sritį 14-34 liekanų srityje [1]. Mes pasiūlėme, kad α -spirālės 17-29 liekanos rišasi su PTH receptoriais, ir kad šios α -spirālės amfifilinė dalis rišasi su receptoriais savo hidrofobine puse [2]. Šis modelis atitinka receptoriaus surišimo srities analogų tyrimų rezultatus.

BMR tyrimai parodė, kad nors pagal CD duomenis modelinis peptidas yra labai spiralinis, taip pat yra daug ir nespiralinių konformacijų. Taigi, receptoriaus surišto peptidinio hormono, tokio kaip PTH, struktūra negali būti patikimai nustatyta iš jo laisvosios struktūros tirpale. Konformacinių būsenų, kurias gali sudaryti šis peptidas, skaičiui apriboti buvo panaudoti peptidinio hormono suvaržyti analogai [8]. hPTH sekos tyrimas rodo, kad yra galimi 3 druskų tilteliai 17-29 liekanose, kurie gali arba stabilizuoti, arba destabilizuoti α -spirale. Šie tilteliai yra tarp Glu²² ir Lys²⁶ ir Lys²⁶ ir Asp³⁰ (laukiama, kad abu jie stabilizuos α -spirale) ir tarp Lys²⁷ ir Asp³⁰ (laukiama, kad jis destabilizuos α -spirale) [4]. Laktamo sudarymas tarp šių liekanų porų apribos konformacijas, kurias gali sudaryti hPTH šioje spiralinėje srityje. Be to, du iš šių laktamų - Glu²²-Lys²⁶ ir Lys²⁶-Asp³⁰ - kurie, kaip manoma, stabilizuos α -spiralinę struktūrą, yra polinėje α -spirālės amfifilinės dalies pusėje. Laukiama, kad trečiasis laktamas - Lys²⁷-Asp³⁰ - bent jau dalinai destabilizuos α -spirale, ir jame yra liekana (Lys²⁷), kuri yra šios amfifilinės spirālės hidrofobinėje pusėje. Taip pat gali būti ciklizacija tarp 25 ir 29 padėties, jeigu Lys arba Orn pakeičia Arg 25 padėtyje ir jeigu Gln²⁹ yra pakeistas Glu arba Asp.

Lys²⁷ pakeitimas Leu duoda hidrofobiškesnę liekaną šios amfifilinės spiralės hidrofobinėje pusėje. Tai pasireiškia padidintu adenililcikazės stimuliavimo aktyvumu ROS ląstelių linijoje. Patyrę šios srities specialistai supras, kad tokie aukščiau aptarti pakeitimai taip pat turėtų duoti analogus, turinčius tokį patį arba padidintą aktyvumą.

Laukiama, kad jungtinis pakeitimo ir taip pat laktamo sudarymo efektas stabilizuos α -spiralę ir padidins bioaktyvumą bei apsaugos šią molekulės dalį nuo proteolitinės degradacijos. Pageidautina, kad C-gale būtų amidas ta prasme, kad jis dar labiau turėtų apsaugoti peptidą nuo egzoproteolitinės degradacijos, nors kai kurios peptidazės ir gali juos hidrolizuoti (Leslie, F. M, and Goldstein, A. (1982) *Neuropeptides* **2**, 185-196).

Taip pat buvo rasta, kad gali būti padaryti kiti naudingi aminorūgščių pakeitimai. Konkrečiau kalbant, mes pakeitėme oksidacijai jautrią Met liekaną 8, 18 padėtyse gamtine hidrofobine liekana (Nle), kaip ir Japonijos patento publikacijoje 61-24598. Taip pat galima tikėtis, kad bus naudingos kitos tokios hidrofobinės liekanos kaip, pavyzdžiui, Leu, Ile, Val, Phe ir Trp, kaip ir Nakagawa et al. USP 5,393,869.

Aptariami taip pat ir atvirkštiniai laktamai. Pavyzdžiui, mes parodėme Lys²²-Glu²⁶ sujungimo efektyvumą. Todėl galima laukti, kad gali būti padaryti panašūs naudingi sujungimai, pavyzdžiui, tarp 26-30 ir 27-30 laktamų.

Apart minėto Cys-Cys pakeitimo, buvo atliktas kitas pakeitimas pageidautino 22-26 laktamo vietoje, t.y. Asp²²-Orn²⁶, norint pailiuoti, kad gali būti naudingos įvairios ciklizacijos ir žiedų dydžiai.

Nakagawa et al. USP 5,393,869 ir Fukuda et al. USP 5,434,246 buvo aprašyta, kad kai kurie pakeisti hPTH analogai turi žymų AC aktyvumą ir jie gali turėti padidintą stabilumą proteolitinei atakai, būtent

1. Ser-1 pakeistas Aib (α -aminoizosviesto rūgštimi);
2. Lys-27 pakeistas Gln (skelbiama, kad turi 2,5 x AC aktyvumą);
3. 14, 15, 16, 17 liekanos pakeistos Lys pilnai arba dalinai (skelbiama, kad aktyvumas labai padidėja - iki 8 x. Tai gali būti dėl didesnio tirpumo vandenyje. Manoma, kad *in vivo* jie bus labilesni panašioms į tripsiną fermentams). Jie teigia, kad šiame tetrapeptide (14-17 liekanos imtinai) yra

bent viena vandenyje tirpi aminorūgštis. Pavyzdžiui, His-14 arba Lys-14; Leu-15, Lys-15 arba Arg-15; Asn-16; Orn-16, Hci (homocitrulinas)-16, Asp-16, Arg-16, Lys-16, DLys-16, Ser-16 arba Gly-16; ir 17-Ser, 17-Lys, 17-Asp arba 17-Arg. Pavyzdžiui, taip pat gali būti Glu;

4. Arg-25 pakeistas His, norint sumažinto proteazės ataką. Kadangi mūsų laktamai, ypatingai su Leu arba kita hidrofobine aminorūgštimi 27-padėtyje, gali pasidaryti šiek tiek netirpūs ir juos bus sunku ištirpinti, galima tikėtis, kad tokie patys pakeitimai turėtų būti naudingi ir mūsų laktamams.

Patyrę specialistai taip pat supras, kad nors pirmenybė gali būti teikiama cikliniams 1-31 h-PTH, iš čia pateiktų duomenų galima laukti, kad cikliniai fragmentai nuo 1-30 iki 1-37 ribose taip pat bus efektyvūs. Literatūroje nėra duomenų, kad papildomos aminorūgšties iki 37 padėties buvimas veikia šio hormono biologines savybes; čia įtraukti konkretūs tai patvirtinantys duomenys apie 1-34.

Šio išradimo laktamai gali būti pagaminami pagal žinomas žemiau aprašytas metodikas ir gali būti naudojami kaulų augimo stimuliavimui, kaulų atstatymui ir kaulo gijimo skatinimui įvairiose aplinkybėse, tokiose kaip osteoporozės ir normalių lūžių gydymas.

Trumpas brėžinių aprašymas

Fig.1 parodyta žmogaus gamtinio PTH struktūra, 1-31 liekanos (SEQ ID NO:1);

Fig.2 parodyta $[\text{Leu}^{27}]$ ciklo(Glu^{22} - Lys^{26})-hPH-(1-31)- NH_2 (SEQ ID NO:3);

Fig.3 parodyta $[\text{Leu}^{27}]$ ciklo(Lys^{26} - Asp^{30})-hPH-(1-31)- NH_2 (SEQ ID NO:4);

Fig.4 parodyta šio išradimo analogų ROS 17/2 ląstelių adenililciklazės stimuliavimo aktyvumai.

Fig.5 duoti būdingi kaulų histologiniai pjūviai, paruošti praėjus 8 savaitėms po OVX, rodantys skirtingas hPTH-(1-31) NH_2 ir jo laktaminių

darinių gebas apsaugoti nuo kaulo nykimo ir sugebėjimą stimuliuoti kaulo augimą Sprague-Dawley žiurkėse, kurioms pašalintos kiaušidės (OVX).

Fig.6 parodyta kontrolinių žiurkių ir hPTH analogu gydytų žiurkių, kurioms iš pradžių buvo sukeltas žymus kaulo sunykinimas, trabekulinio kaulo tūris. Gyvuliukai pradėti gydyti praėjus 9 savaitėms po OVX. [Leu²⁷]ciklo[Glu²²-Lys²⁶]hPTH-(1-31)-NH₂ yra pats efektyviausias iš fragmentų, atstatantis kaulus iki kontrolinių žiurkių normalių reikšmių; ir

Fig. 7 parodyta normalių žiurkių, žiurkių, kurioms pašalintos kiaušidės (OVX), kontrole gydytų žiurkių bei hPTH-(1-31)-NH₂, [Leu²⁷]ciklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ ir [Leu²⁷]ciklo(Lys²⁶-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂ gydytų žiurkių šlaunikaulių trabekulių storis.

Fig. 8 parodytas maksimalus kraujo spaudimo kritimas ir laikas iki maksimalaus kraujo spaudimo kritimo, imant 0,8 nmol/100 g hPTH-(1-31)-NH₂, [Leu²⁷]ciklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ arba [Leu²⁷]ciklo(Lys²⁶-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂ dozę. Peptidai buvo leidžiami arba po oda (balti stulpeliai) arba į veną (brūkšniuoti stulpeliai).

Fig.9 parodyta [Leu²⁷]-hPTH-(1-31)-NH₂ struktūra (SEQ ID NO:5).

Fig.10 parodyta ciklo(Lys²⁷-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂ struktūra (SEQ ID NO:6).

Fig.11 parodyta [Leu²⁷]ciklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-30)-NH₂ struktūra (SEQ ID NO:7).

Fig.12 parodyta įvairių šio išradimo analogų adenililciklazės stimuliavimo aktyvumai.

Fig.13 parodyta hPTH(1-31)NH₂ ir hPTH(1-30)NH₂ bei jų ciklinių analogų hipotenziniai poveikiai.

Fig.14 yra grafikas, iliustruojantis įvairių linijinio hPTH(1-31)-NH₂ dozių efektą į kaulų augimą.

Fig.15 parodyta [Leu²⁷]ciklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-OH struktūra (SEQ ID NO:8).

Fig.16 parodyta [Leu²⁷]ciklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-34)-NH₂ struktūra (SEQ ID NO:9).

Fig.17 parodyta [Leu²⁷]ciklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-34)-OH struktūra (SEQ ID NO:10).

Fig.18 parodyta [Ala²⁷]ciklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ struktūra (SEQ ID NO:11).

Fig.19 parodyta [Nle²⁷]ciklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ struktūra (SEQ ID NO:12).

Fig.20 parodyta [Nle^{8,18};Leu²⁷]ciklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ struktūra (SEQ ID NO:13).

Fig.21 parodyta ciklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ struktūra (SEQ ID NO:14).

Fig.22 parodyta [Ile²⁷]ciklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ struktūra (SEQ ID NO:15).

Fig.23 parodyta [Tyr²⁷]ciklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ struktūra (SEQ ID NO:16).

Fig.24 parodyta α -acetil-[Leu²⁷]ciklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ struktūra (SEQ ID NO:17).

Fig.25 parodyta [Leu²⁷]ciklo(Lys²²-Glu²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ struktūra (SEQ ID NO:18).

Fig.26 parodyta [Leu²⁷]ciklo(Asp²²-Orn²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ struktūra (SEQ ID NO:19).

Fig.27 parodyta [Cys²²;Cys²⁶;Leu²⁷]ciklo(Cys²²-Cys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ struktūra (SEQ ID NO:20).

Fig.28 parodyta [Cys²⁶;Cys³⁰;Leu²⁷]ciklo(Cys²⁶-Cys³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂ struktūra (SEQ ID NO:21).

Hormono analogų gavimas

Kietafazės peptidų sintezės metodika, kurią išstobulino R.B. Merrifield ("Solid-Phase Peptide Synthesis", Advances in Enzymology 32, 221-296, 1969) (duodamas čia kaip literatūros šaltinis) yra plačiai ir sėkmingai naudojama polipeptidų, tokių kaip paratiroidinis hormonas, sintezei. Jos strategija paremta tuo, kad peptido aminorūgšties karboksi-galas yra

prijungiamas prie kieto pagrindo. Tada didelėmis išeigomis laipsniškai prijungiamos aminorūgštys. N-galinė α -aminogrupė blokuojama taip, kad šią grupę būtų galima atskelti neatskeliant peptido nuo kieto pagrindo. Čia naudojami cheminiai virsmai apima pradinio Merrifield metodo, vadinamo Fmoc metodu, modifikaciją. Fmoc (fluorenilmetoksikarbonilo) grupę galima atskelti švelniai šarminėse sąlygose, kurios palieka nepalietas šarmams stabilias šoninės grandinės apsaugines grupes ir jungtį su pagrindu. Šią metodiką aprašė E. Atherton and R. C. Sheppard, "Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach", IRL Press, New York, N.Y. (čia duodamas kaip literatūros šaltinis).

1 pavyzdys

Linijinio hPTH-(1-31)-amido analogų sintezė ir gryninimas

Kopuliavimo metu aminorūgšties α -aminogrupė blokuojama 9-fluorenilmetoksikarbonilu (Fmoc). Kopuliavimo reakcijos vykdomos su hidroksibenzotriazolo (HOBt), 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluorborato (TBTU) ir diizopropiletilamino (DIPEA) mišiniu. Prijungiant Asn, Gln, His, Val ir Ile liekanas, dvigubai kopuliacijai naudojamas aktyvuotų aminorūgščių keturgubas perteklius. Prijungiant Arg ir Gly, kopuliavimo laikai pailginami nuo 30 iki 60 minučių. Pirmosios liekanos (Val³¹) kopuliacija prie pagrindo (Tentagel* R, Rapp Polymere, Tubingen, Vokietija) atliekama rankiniu būdu. Visos kitos stadijos atliekamos PerSeptive Biosystems* Model 9050 Plus automatinio peptidų sintezatoriumi. Šoninės grupės blokuojamos taip: Arg (2,2,5,7,8-pentametilchroman-6-sulfonilu); Glu, Asp ir Ser (t-butilu); His, Gln ir Asn (tritolu); Trp (t-butiloksikarbonilu).

Atskėlus Fmoc nuo N-galinio Ser, derva su peptidu plaunama DCM, po to vykdomas atskėlimas nuo dervos, plakant su 7,5 ml reagento K (6,19 ml TFA, po 0,38 ml vandens, 90 % fenolio vandenyje ir tioanizolo ir 0,19 ml 1,2-etanditolio) 4 val. 20 °C temperatūroje. Atskeltas peptidų mišinys nufiltruojamas ir nusodinamas, pridedant t-butil-metilo eterio. Nuosėdos

nucentrifuguojamos, plaunamos 2x t-butilmetilo eteriu, po to džiovinamos vakuuminio centrifugavimo būdu.

Negrynintas produktas ištirpinamas 14 ml 15 % acetonitrilo tirpalo vandenyje su 0,1 % TFA ir chromatografuojamas per Vydac* C₁₈-kolonėlę (10 μ, 1 x 25 cm). Produktas eliuuojamas 1%/min acetonitrilo (14-40 %) 0,1 % TFA vandenyje gradientu. Galutinio produkto grynumas nustatomas analitinės HPLC per Vydac* C₁₈-kolonėlę (10 μ, 0,4 x 25 cm) metodu ir pagal molekulinę masę, nustatomą elektronų srauto masių spektrometru (VG Quattro). Taip gauto hPTH-(1-31)-NH₂ duomenys pateikti žemiau duodamoje 1 lentelėje.

2 pavyzdys

Ciklinių analogų sintezė ir gryninimas

[Leu²⁷]ciklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂. Šis peptidas, turintis atitinkamai 26 ir 22 padėtyse Lys-Alloc ir Glu-OAll, buvo sintezuotas pagal 1 pavyzdyje aprašytą metodiką. Prijungus Fmoc-Ser¹⁷, derva su peptidu perkeliama iš kolonėlės į reakcijos indą (Minivial*, Applied Science), suspenduojama 1,7 ml tetrakis(trifenilfosfin)paladžio(0) (0,24 mmol), 5 % acto rūgšties ir 2,5 % N-metilmorfolino (NMM) tirpalo dichlormetane (DCM) argono amosferoje, po to purtoma 20 °C temperatūroje 6 val., norint atskelti alilo ir alloc apsaugines grupes (Sole, N.A. et al. (1993) in *Peptides: Chemistry, Structure, and Biology*, Smith, J. and Hodges, R. (Eds), ESCOM pp. 93-94) (duodamas kaip literatūros šaltinis). Po to derva su peptidu plaunama 0,5 % dietilditiokarbamatu (DEDT), 0,5 % NMM DMF (50 ml), po to DMF (50 ml) ir DCM (50 ml). Peptidas (0,06 mmol) ciklizuojamas purtant su 0,06 mmol 1-hidroksi-7-azabenzotriazolo (HOAt)/0,12 mmol NMM 2 ml DMF 14 val. 20 °C temperatūroje (Carpino, L. A. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115, 4397-4398). Derva su peptidu nufiltruojama, perplaunama vieną kartą DMF, sudedama į kolonėlę ir plaunama DMF, kol iš suspensijos pašalinami burbuliukai. Toliau sintezė vykdoma taip, kaip aprašyta 1 pavyzdyje, išskyrus tai, kad neatskeliama N-galinė Fmoc grupė. Fmoc-peptidas atskeliamas nuo dervos

reagentu K taip, kaip aprašyta aukščiau. HPLC vykdoma kaip ir 1 pavyzdyje, prieš galutinę HPLC atskėlus Fmoc grupę.

[Leu²⁷]ciklo(Lys²⁶-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂ analogas buvo pagamintas pagal analogišką metodiką.

3 pavyzdys

Adenililciklazės testai

hPTH analogų geba susirišti su receptoriais ir aktyvuoti susijusį su adenililciklaze signalinį mechanizmą buvo nustatoma, panaudojant galinčią diferencijuotis, panašią į osteoblastus ROS 17/2 žiurkių osteosarkomos (ROS) ląstelių liniją. Yra žinoma, kad šis aktyvumas yra tampriai susijęs su analogo geba atstatyti kaulų masę žiurkėms, kurioms buvo pašalintos kiaušidės. Adenililciklazės stimuliavimo aktyvumas buvo įvertintas iš pradžių pažymint ląstelinio ATP sandėliavimą [³H]-adeninu, po to matuojant kiekį [³H]-ciklinio AMP, susidariusio iš [³H]-ATP per pirmąsias 10 min. sąlyčio su konkrečiu analogu. Šis testas paremtas Whitfield et al, *J. Cellular Physiology* 150, 299-303, 1992 aprašyta metodika (duodamas kaip literatūros šaltinis).

Adenililciklazės rezultatai parodyti toliau duodamoje 2 lentelėje, kaip koncentracija, kurios reikia, kad būtų gaunama pusė AC aktyvumo padidėjimo maksimalios reikšmės. Duomenys taip parodyti fig.4. Fig.4 užtušuoti apskritimai rodo hPTH-(1-31)-NH₂ adenililciklazės stimuliavimo aktyvumą, o [Leu²⁷]ciklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ ir [Leu²⁷]ciklo(Lys²⁶-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂ aktyvumai parodyti atitinkamai neužtušuotais ir užtušuotais trikampiais.

4 pavyzdys

hPTH analogų anabolinių aktyvumų nustatymas, panaudojant žiurkių, kurioms pašalintos kiaušidės, modelį

Dozavimas:

Dozės buvo paremtos hPTH(1-31)-NH₂ dozės-atsako duomenimis. hPTH(1-31)-NH₂ kaulų augimo potencija buvo tiriama, panaudojant keletą dozių (0,8, 0,6, 0,4 ir 0,2 nmol/100 g kūno masės), ir labiau regeneracinį arba gydymo gebos, negu prevencinį, modelį [11]. Prieš pradedant 6 savaičių trukmės kasdienes injekcijas, trijų mėnesių amžiaus žiurkės, kurioms buvo pašalintos kiaušidės, buvo laikomos 9 savaites, kad didžioji dalis neplokštelinio šlaunikaulio trabekulinio kaulo būtų gerokai sunykusi. Devintos savaitės pabaigoje jos prarado apie 75 % šlaunikaulio trabekulinio kaulo masės. Fig.14 parodyta priklausantis nuo dozės vidutinio plokštelinio nusėdimo sukeltas trabekulinio storio padidėjimas, kurį davė šio fragmento 4 skirtingų dozių 36 injekcijos. Šis fragmentas taip pat gali stimuliuoti trabekulinio kaulo augimą ir daug senesnėms žiurkėms. Pavyzdžiui, 36 vidutinio dozių intervalo (0,6 nmol/100 g kūno masės) hPTH-(1-31)-NH₂ injekcijos gali žymiai padidinti vidutinį trabekulinį storį virš normalių pradinių reikšmių prieš tai sunykusio (9 savaitės po OVX) šlaunikaulio trabekulinio kaulo storį 1 metų amžiaus žiurkėms, ir jos veikia taip pat efektyviai, kaip ir hPTH-(1-84) injekcijos. Tuo būdu, kitiems testams buvo pasirinktos 0,6 nmol/100 g kūno masės dozės.

Pilną metodikos aprašymą davė Rixon et al, *J. Bone & Mineral Research* 9, 1179-1189, 1994 ir Whitfield et al, *Clasif. Tissue Int.* 58, 81-87, 1996 (duodami kaip literatūros šaltiniai). Normalios, apgaulingai-OVX (pašalintos kiaušidės) ir OVX Sprague-Dawley žiurkės (3 mėn. amžiaus; 255-260 g) buvo gautos iš Charles River Laboratories (St. Constant, QC). Žiurkės buvo atsitiktinai paskirstytos grupėmis po 8 gyvuliukus ir gavo Purina žiurkių maistą ir vandenį *ad libitum*. Neplanuotų mirčių nebuvo. Gyvuliukai gavo 6 (vieną kartą per dieną) injekcijas į savaitę, pradedant nuo antros savaitės galo po OVX ir baigiant aštuntos savaitės gale po OVX (t.y. 36 injekcijas). Aštuonios apgaulingai-OVX ir 8 OVX kontrolinės žiurkės gavo 36 skiediklio injekcijas (0,15 M NaCl, turintis 0,001 N HCl), o 8 OVX žiurkės gavo 0,6 nmol fragmento skiediklyje 100-ui g kūno masės injekcijas. Aštuntos savaitės gale po OVX, šlaunikauliai buvo išimti, nuvalyti, perpjauti per pusę diafizės viduryje ir arčiau kūno esanti pusė buvo išmesta. Pašalinus ilgojo kaulo galą,

kiekviena šlaunikaulio pusė buvo perskelta išilgai į dvi dalis ir išimti kaulų čiulpai.

Fragmentų geba atauginti kaulus buvo įvertinama iš skirtingai gydytų gyvuliukų nutolusios nuo kūno vidurio šlaunikaulio pusės trabekulės vidutinio storio (plotas/perimetras). Norint išmatuoti vidutinį trabekulės storį, kiekvienos žiurkės dvi demineralizuotos šlaunikaulio pusės buvo dehidratuotos ir įtvirtintos parafine. Iš kiekvieno kaulo vidurio plokštumos buvo atpjauti išilginiai 10 μ m pjūviai ir nudažyti Sanderson'o greitaisiais kaulų dažais (Surgipath Medical Industries, Inc., Winnipeg, MB, Canada). Vidutinis trabekulės storis išmatuotas naudojant M4 vaizdo sistemą ir kaulų morfometrijos programą iš Imaging Research Inc., (St. Catherines, ON, Canada).

Būdingi kaulų histologiniai pjūviai, paruošti aštuntos savaitės gale po OVX, parodyti fig.5. Šie rezultatai taip pat pateikti stulpelinės diagramos pavidalu fig.7. Stulpeliai rodo normalių žiurkių, žiurkių, kurioms pašalintos kiaušidės (OVX), apgaulingai-OVX žiurkių ir hPTH-(1-31)-NH₂, [Leu²⁷]ciklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ bei [Leu²⁷]ciklo(Lys²⁶-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂ gydytų žiurkių trabekulių storius. [Leu²⁷]ciklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ rodo ypatingai daug didesnę aktyvumą lyginant su linijiniu analogu hPTH-(1-31)-NH₂. Buvo parodyta, kad šis linijinis analogas yra pilnai aktyvus kaulų atstatymo požiūriu, bet jis naudoja tik vieną ląstelių signalų perdavimo (AC-aktyvacija) kelią. Taigi, galima laukti, kad šie cikliniai analogai, kaip ir jų linijinis analogas, turės mažiau nepageidautinų klinikinių pašalinių efektų nei jų ilgesni atitikmenys, tokie kaip hPTH-(1-34) arba hPTH-(1-84), kurie aktyvuoja abu ląstelių signalų perdavimo mechanizmus.

5 pavyzdys

Žiurkių su žymiai sunykusiais trabekuliniais kaulais kaulų atstatymas hPTH analogais

Šiame antrame kaulų atstatymo pavyzdyje lyginamas laktaminių fragmentų sugebėjimas atstatyti žymiai sunykusius trabekulinius kaulus.

Šiame eksperimente 6 savaičių trukmės programa, kurioje jaunoms seksualiai subrendusioms žiurkėms vieną kartą per dieną leidžiamos 0,6 nmol peptido/100 g kūno masės injekcijos, buvo pratęsta iki devintos savaitės galo po OVX. Per šį laikotarpį buvo prarasta 75 % jų trabekulinio kaulo. Kaip galima matyti iš fig.6, efektyviausias iš fragmentų yra $[\text{Leu}^{27}]\text{ciklo}[\text{Glu}^{22}\text{-Lys}^{26}]\text{-hPTH-(1-31)-NH}_2$. Jis atstatė trabekulinio kaulo tūrį iki normalios kontrolinių žiurkių reikšmės.

6 pavyzdys

hPTH analogų hipotenziniai efektai

Sprague-Dawley žiurkių patelės (sveriančios daugiau nei 290 g) buvo anestezuotos intraperitoniškai suleidžiant natrio pentobarbitalį (65 mg/kg kūno masės). Rektalinė temperatūra buvo kontroliuojama YSI402 termistoriumi (Yellow Springs Instrument Co., Inc. Yellow Springs, OH) ir per visą eksperimentą palaikoma tarp 36,0 ir 38,5 °C. Taip pat kontroliuojama ausies kaušelio temperatūra, naudojant YSI dengtą termistorių. Buvo apnuoginta uodegos arterija ir į ją įleista kaniulė su Jelco-25g/V kateteriu (Johnson and Johnson Medical Inc., Arlington, TX), kuri sujungiama su Statham slėgio davikliu, ir jo signalai registruojami skaitmeniniu būdu Biopac Systems MP100 monitoriumi (Harvard Instruments, Saint Laurent, QC, Canada). PTH arba vieno iš jo fragmentų intraveninėms injekcijoms buvo apnuoginta šlaunies vena. Po operacijos žiurkei leidžiama stabilizuotis 8 min., po to į šlaunies veną arba po pilvo oda suleidžiamas PTH arba vienas iš jo fragmentų (ištirpintas parūgštintame fiziologiniame tirpale, turinčiame 0,001 N HCl). Duomenys renkami 12 min. po intraveninės injekcijos arba 22 min. po poodinės injekcijos. Fig.8 parodytas maksimalus kraujo spaudimo kritimas ir laikas iki maksimalaus kritimo, suleidus 0,8 nmol/100 g $[\text{Leu}^{27}]\text{ciklo}[\text{Glu}^{22}\text{-Lys}^{26}]\text{-hPTH-(1-31)-NH}_2$ arba $[\text{Leu}^{27}]\text{ciklo}[\text{Lys}^{26}\text{-Asp}^{30}]\text{-hPTH-(1-31)-NH}_2$ dozę arba poodiniu (balti stulpeliai), arba intraveniniu (brūkšniuoti stulpeliai) būdu. $[\text{Leu}^{27}]\text{ciklo}[\text{Glu}^{22}\text{-Lys}^{26}]\text{-hPTH-(1-31)-NH}_2$ analogas rodo didesnį bioprieinamumą, lyginant su $[\text{Leu}^{27}]\text{ciklo}[\text{Lys}^{26}\text{-Asp}^{30}]\text{-hPTH-(1-31)-NH}_2$. Tai

seka iš daug trumpesnio laiko, kurio reikia, kad kraujo spaudimas nukristų iki minimumo po poodinės injekcijos. Abu cikliniai analogai po poodinio suleidimo rodo sustiprintus hipotenzinius efektus, lyginant su hPTH-(1-31)-NH₂. Taigi, galima tikėtis, kad abu cikliniai analogai, leidžiant juos po oda, turės tinkamesnes savybes nei jų linijinis atitikmuo. Šios savybės yra: didesni bioprieinamumai, atsirandantys dėl padidinto atsparumo proteazėms, ir/arba padidintos gebos būti transportuojamiems iš lipidinės aplinkos. Pastaroji savybė gali būti susijusi su amfifilinės spiralės ties hormono C-galu stabilizacija.

Kiti rezultatai:

Šiems rezultatams peptidai buvo pažymėti taip:

h-PTH-(1-31)-NH₂ (1); [Leu²⁷]-hPTH-(1-31)-NH₂ (2) (Fig.9); [Leu²⁷]ciklo[Glu²²-Lys²⁶]-hPTH-(1-31)-NH₂ (3) (Fig.2); [Leu²⁷]ciklo[Lys²⁶-Asp³⁰]-hPTH-(1-31)-NH₂ (4); ciklo[Lys²⁷-Asp³⁰]-hPTH-(1-31)-NH₂ (5) (Fig.10); hPTH-(1-30)-NH₂ (6); [Leu²⁷]-h-PTH-(1-30)-NH₂ (7); [Leu²⁷]ciklo[Glu²²-Lys²⁶]-hPTH-(1-30)-NH₂ (8).

Adenililciklazės aktyvumai. Mes anksčiau aprašėme, kad [Leu²⁷]-hPTH-(1-34)-NH₂ yra aktyvesnis stimuliuojant AC aktyvumą ROS ląstelių linijoje už hPTH-(1-34)-NH₂ [5]. Mes taip pat nustatėme, kad peptidas 2 (EC₅₀, 11,5±5,2 nM) yra aktyvesnis už natyvią seką 1 (EC₅₀, 19,9±3,9 nM) (Fig.12). Peptidai parodyti simboliais: 1 (•); 2 (○); 3 (◊); 4 (▲); 5 (○). Laktamo tarp Glu²² ir Lys²⁶ sudarymas (3) indukuoja dar didesnį AC stimuliavimo aktyvumą, ir EC₅₀ reikšmės yra 3,3±0,3 nM (Fig.12). Taigi, vien tik ciklizacijos ir Lys²⁷ pakeitimo Leu efektas yra aktyvumo padidėjimas 6 kartus. Priešingai, laktamo sudarymas arba tarp Lys²⁶ ir Asp³⁰ (4) arba tarp Lys²⁷ ir Asp³⁰ (5) sumažina adenililciklazės stimuliavimą, lyginant su pradine linijine seka. Tokiu būdu 26-30 laktamas (4) turi šiek tiek mažesnį aktyvumą nei jo linijinė forma (2) (EC₅₀ = 17,0±3,3 nM lyginant su 11,5±5,2 nM). 27-30 laktamas (5) daug labiau sumažina pradinio linijinio peptido (1) aktyvumą (EC₅₀ = 40,3±34,4 nM lyginant su 19±3,9 nM).

Anksčiau paskelbėme, kad hPTH-(1-30)-NH₂ (**6**) turi AC stimuliavimo aktyvumą (EC₅₀ = 20 nM) artimą analogo **1** aktyvumui. Dabar mes nustatėme, kad [Leu²⁷]-hPTH-(1-30)-NH₂ (**7**) ir ciklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-30)-NH₂ (**8**) (Fig.11) turi panašius kaip ir peptido **6** AC stimuliavimo aktyvumus.

Hipotenziniai efektai. Fig.13 parodyta linijinių (**6** ir **7**) ir ciklinių laktaminių analogų (**3** ir **8**) hipotenzinis poveikis. Parodyti maksimalūs kraujo spaudimo kritimai (viršuje), gauti suleidus žiurkei 0,8 nmol/100 g kūno masės analogo dozę, ir laikas, per kurį pasiekiamas maksimalus kraujo spaudimo kritimas (apačioje). Analogai (iš kairės į dešinę peptidai **8**, **7**, **6**, **3**) buvo suleisti arba intraveniniu būdu (brūkšniuotas stulpelis), arba poodiniu būdu (baltas stulpelis). Val³¹ pašalinimas visuose **6**, **7** ir **8** analoguose pasireiškė žymiai sumažintais ($p < 0,05$) suleistų po oda peptidų transporto į kraujagyslių sistemą greičiais (fig.13). Tikras bendras kraujo spaudimo kritimas peptidų **6** ir **8** atveju vis dėlto labai nesiskyrė ($p > 0,05$) nuo kitų analogų, nepriklausomai nuo to, ar jie buvo suleisti intraveniniu ar poodiniu būdu, išskyrus peptidą **5**.

Hipotenzinio efekto koreliacijos su osteogeniniu aktyvumu testas

Kaip aprašyta 6 pavyzdyje ir parodyta fig.8, greitas hipotenzinis efektas, stebimas po poodinės hPTH analogų injekcijos, turi savitarpio ryšį su osteogeniniu aktyvumu. Tokiu būdu šis testas yra naudingas kandidatinių hPTH analogų, kurie galėtų turėti osteogeninį aktyvumą, atrinkimui ir leistų atmesti nehipotenzinius darinius, nenužudant laboratorinių gyvuliukų.

Kaip foną mes naudojome unikalų rinkinį osteogeninių ir neosteogeninių AC, AC/PLC arba PLC aktyvuojančių PTH fragmentų, norėdami tiksliai įrodyti, kad būtent AC stimuliavimas mažina kraujo spaudimą, ir palyginti šių fragmentų hipotenzinius poveikius, leidžiant juos poodiniu arba intraveniniu būdu žiurkių patelėms. Mes parodėme, kad hipotenzinį atsaką sukelia tik AC arba AC/PLC stimuliuojantys fragmentai, ir kad yra palyginus mažas hipotenzinis atsakas į poodinę injekciją ir ne kuo didesnis atsakas į intraveninę injekciją, kuris koreliuojasi su hPTH-(1-31)NH₂.

hPTH-(1-34) ir hPTH-(1-84) osteogeniniais aktyvumais bandymuose su OVX-žiurkėmis, bet nėra koreliacijos hPTH-(1-30)NH₂ atveju, kuris stimuliuoja AC ir mažina kraujo spaudimą, bet nestimuliuoja kaulų formavimosi.

Konkrečiai imant, hPTH-(1-84) ir jo hPTH-(1-34), hPTH-(1-31)NH₂ ir hPTH-(1-30)NH₂ fragmentai sumažino anestezuotų Sprague-Dawley žiurkių uodegos arterijos spaudimą 42,4-61,7 % per maždaug 1 min. po injekcijos į šlaunies veną, bet sumažino spaudimą tik 8,5-36,2 % per 2-19 min. po poodinės injekcijos. hPTH-(1-84) ir hPTH-(1-34) stimuliuoja ir adenililciklazę, ir fosfolipazę-C jų tikslinėse ląstelėse, bet hipotenzinis poveikis turėtų būti stimuliuojamas būtent adenililciklazės aktyvavimo, nes hPTH-(1-30)NH₂ ir hPTH-(1-31)NH₂, kurie gali stimuliuoti tik adenililciklazę, turėjo labai stiprų hipotenzinį poveikį, suleidus juos į veną, tuo tarpu kai hPTH-(7-84), kuris gali stimuliuoti tik fosfolipazę-C, turėjo silpną hipotenzinį poveikį, suleidus jį į veną. Kadangi PTH'ų osteogeninis veikimas taip pat yra surištas su adenililciklazės stimuliavimu, galima laukti, kad hipotenzinis atsakas galėtų būti panaudotas naujų PTH darinių, kurie gali pasižymėti osteogeniškumu, atrinkimui. Iš tikrųjų, po oda suleistų hPTH-(1-31)NH₂, hPTH-(1-34) ir hPTH-(1-84) osteogeninis aktyvumas glaudžiai koreliuojasi su jų hipotenziniu aktyvumu, iš kurių hPTH-(1-34) turėjo didžiausią hipotenzinį poveikį ir daug didesnę nei kitų dviejų molekulių. hPTH-(1-31)NH₂ ir hPTH-(1-84) turėjo vienodą osteogeninį ir hipotenzinį poveikį. Tačiau ši koreliacija negalioja hPTH-(1-30)NH₂ atveju, kuris stimuliuoja AC beveik taip pat stipriai kaip ir hPTH-(1-31)NH₂ ir hPTH-(1-34) ir mažina kraujo spaudimą taip pat kaip ir hPTH-(1-31)NH₂, bet nestimuliuoja kaulų formavimosi. Vis dėlto, sugebėjimas žymiai sumažinti arterinį spaudimą yra bendra osteogeninių PTH ir PTH fragmentų savybė, ir todėl ji yra greitai nustatomas preliminarus PTH fragmentų bioaktyvumo *in vivo* indikatorius.

Kalbant dar konkrečiau, ir hPTH-(1-34) ir hPTH-(1-31)NH₂ turėjo maksimalų hipotenzinį poveikį, imant 0,8 nmol/100 g kūno masės dozes.

Šį hipotenzinį atsaką lydi trumpalaikis (20-30 min.) žiurkės ausų ir letenėlių paraudimas, kuris gali būti laikomas naudinga vizualiniu kokybiniu rodikliu.

Nors AC ir AC/PLC stimuliuojantys fragmentai buvo potencialiai hipotenziniai, kai jie suleidžiami į veną, hPTH-(7-84), kuris gali stimuliuoti tik PLC, 0,8 nmol/100 g kūno masės intraveninė injekcija labai lėtai ($9,8 \pm 2,0$ min) ir tik labai nedaug sumažino uodegos arterijos spaudimą $3,28 \pm 1,0$ mm Hg, lyginant su staigiu ($0,9 \pm 0,08$ min) $43,2 \pm 5,8$ mm Hg sumažinimu, kurį sukelia AC/PLC stimuliuojantis hPTH-(1-84) arba taip pat staigiu $51,6 \pm 3,3$ mm Hg kritimu, kurį sukelia AC stimuliuojantis hPTH-(1-31)NH₂.

Viena poodinė AC arba AC/PLC stimuliuojančio fragmento injekcija sukėlė daug lėtesnį ir mažesnį uodegos arterijos spaudimo sumažėjimą nei tos pačios dozės intraveninė injekcija. Pavyzdžiui, 0,8 nmol/100 g kūno masės hPTH-(1-34) dozė, suleista po oda, sumažino spaudimą tik $27,9 \pm 3,6$ mm Hg, lyginant su $50,9 \pm 5,6$ mm Hg, suleidus ją į veną. Ta pati hPTH-(1-31)NH₂ dozė suleista po oda, sumažino spaudimą tik $11,1 \pm 6,6$ mm Hg, lyginant su $51,6 \pm 53,3$ mm Hg, suleidus ją į veną.

Nėra didelių skirtumų tarp greitų ir didelių uodegos arterijos spaudimo sumažėjimų, kuriuos sukelia į veną suleisti hPTH-(1-84), hPTH-(1-34) ir hPTH-(1-31)NH₂, bet hPTH-(1-34) buvo bent jau dvigubai efektyvesnis ($p < 0,01$) nei kitos dvi molekulės, jeigu leidžiama po oda.

Vienas iš faktorių, kuris turi įtaką hipotenziniam poveikiui ir osteogeniškumui po oda suleistų PTH arba PTH fragmentų, yra jų geba keliauti, neprarandant aktyvumo, iš injekcijos vietos į jo tikslinę vietą, pirmiausia per kraujagyslių tinklą, o po to į kaulus. Šią gebą atspindi laikas, kurio reikia, kad po injekcijos uodegos arterijos spaudimas nukristų iki minimalios reikšmės. Sutrumpinus PTH molekulę iš C-galo nuo 84 iki 31 liekanos, eliminuojama geba stimuliuoti PLC, nesumažinant gebos stimuliuoti AC, ir tai devynis kartus sumažina laiką, kurio reikia, kad uodegos arterijos spaudimas pasiektų minimumą. Pašalinus dar vieną liekaną ir pagaminant hPTH-(1-30)NH₂, laikas, kurio reikia, kad kraujo spaudimas pasiektų minimumą, dramatiškai pailgėja nuo $2,0 \pm 0,31$ min. hPTH-(1-31)NH₂ atveju iki $13,8 \pm 2,3$ min. Tačiau svarbu pažymėti, kad hPTH-(1-31)NH₂ atveju kraujo spaudimo mažinimas užtrunka ne ilgiau, kaip hPTH-(1-84) atveju.

Panaudojimas šiame tyrime hPTH-(1-31)-NH₂ - pirmojo PTH darinio, kuris gali stimuliuoti AC taip pat stipriai, kaip ir hPTH-(1-34), neaktyvuodamas PLC ir nestimuliuodamas susijusių su membranomis PKC'ų aktyvumo - dabar duoda tiesioginį įrodymą, kad PTH'ų hipotenzinis veikimas yra vien tik dėl AC aktyvacijos. Tokiu būdu, nors intraveninės 0,8 nmol/100 g kūno masės hPTH-(7-84), kuris gali stimuliuoti tik PLC/PKC, injekcijos žymiai nekeičia uodegos arterijos spaudimo, tos pačios dozės hPTH-(1-31)-NH₂ intraveninės injekcijos mažina spaudimą taip pat kaip ir h-PTH-(1-34).

Kadangi AC taip pat tarpininkauja PTH sukeltame OVX-žiurkių kortikalinio ir trabekulinio kaulų susidarymo stimuliavime, atrodo, kad hipotenzinio atsako gavimas sveikoms žiurkių patelėms yra paprastas, greitai išmatuojamas PTH darinių galimo osteogeniškumo rodiklis. Antra vertus, negavus arterinio spaudimo sumažėjimo, reikėtų konkretaus fragmento daugiau nebetyrinėti, tokiu būdu išvengiant bereikalingo, brangaus ir ilgalaikio tyrimo su OVX-žiurkėmis. PTH'ų hipotenziniai atsakai į intraveninę injekciją nebuvo koreliuoti su osteogeniškumais. Tačiau daug mažesni hipotenziniai atsakai į suleistus po oda hPTH-(1-31)NH₂, hPTH-(1-34) ir hPTH-(1-84) eina lygiagrečiai su šių molekulių osteogeniškumais, kur hPTH-(1-34) turi stipriausią hipotenzinį ir osteogeninį poveikį, o kitos dvi molekulės yra vienodai veiksmingos, tačiau jos mažiau veikia į kraujo spaudimo sumažėjimą ir kaulų susidarymo stimuliavimą nei hPTH-(1-34). Tačiau ši koreliacija negalioja hPTH-(1-30)NH₂ atveju, kuris stimuliuoja AC beveik taip pat stipriai kaip ir hPTH-(1-31)NH₂ ir hPTH-(1-34) ir mažina kraujo spaudimą taip pat kaip ir hPTH-(1-31)NH₂, bet nestimuliuoja kaulų formavimosi [11]. Lieka neaišku, kodėl šiuo atveju nėra osteogeniškumo. Nepanašu, kad taip yra vien tik dėl to, kad po oda suleistam hPTH-(1-30)NH₂ reikia daugiau laiko kraujo spaudimui sumažinti, nes po oda suleistam hPTH-(1-84) reikia tiek pat laiko, kad sumažėtų kraujo spaudimas, tačiau jis yra labai osteogeninis. Aišku, kad osteogeninis atsakas priklauso nuo daugelio įvairių faktorių, kurių kombinacija apsprendžia pakankamai aktyvaus hormono arba hormono fragmento atkeliavimą iš injekcijos vietos į tikslinius PTH receptorius ekspresuojančius subrendusius osteoblastus. AC stimuliuojančio, kraujo

spaudimą mažinančio hPTH-(1-30)NH₂ nesugebėjimas stimuliuoti kaulų formavimosi gali būti dėl didesnio nestabilumo, šiek tiek didesnės AC stimuliacijos EC₅₀ reikšmės (t.y. 20 nM vietoj 16 nM hPTH-(1-31)NH₂ ir hPTH(1-34)) ir ilgesnio laiko, reikalingo patekti į cirkuliaciją iš injekcijos vietos.

Nežiūrint į tai, kad hPTH-(1-30)NH₂ nėra osteogeninis, geba žymiai sumažinti arterinį spaudimą vis tik yra bendra osteogeninių PTH'ų savybė, taigi tai yra greitai nustatomas galimo PTH fragmentų bioaktyvumo *in vivo* rodiklis. Iš to seka, kad hipotenzinis atsakas turėtų taip pat būti efektyvus osteogeninio PTH darinio sugebėjimo pasiekti taikinį, įvedus jį peroraliniu arba kitokiu neinjekciniu būdu, rodiklis.

Hipotenzinės reakcijos kiekvienai injekcijai diskomfortas ir kitokios galimos pasekmės galėtų mažinti osteoporozinių pacientų ryžtą ilgą laiką gydytis PTH arba PTH fragmentu. Laimei, dabartiniu metu kaulų formavimosi stimuliuojamui yra naudojamos kaitaliojamos PTH'ų injekcijos, ir šios molekulės turi daug mažesnę hipotenzinį poveikį, kai jos leidžiamos po oda, lyginant su intraveninėmis injekcijomis. Kaip anksčiau įrodėme [6,7], hPTH-(1-31)NH₂ turėtų turėti papildomą AC stimuliuojamą pranašumą, nestimuliuodamas PLC ir jis neturėtų sukelti pašalinių efektų, kuriuose potencialiai tarpininkauja Ca²⁺ ir PKC.

7 pavyzdys

Ciklo(Lys²⁷-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂ (5). Sintezė vykdoma taip pat kaip ir [Leu²⁷]-ciklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂. Nustatyta, kad produkto grynumas yra >95 %, o molekulinė masė 3700,64 (±0,38) (laukiama M+1 = 3700,14). Laktamo padėties patvirtinimui nustatyta peptido seka.

[Leu²⁷]-ciklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (8). Šis peptidas buvo sintetintas kaip ir peptidas 3, nenaudojant rankinio Val prijungimo prie pagrindo. Nustatyta, kad produkto grynumas yra >97 %, o molekulinė masė 3586,14 (±0,19) (laukiama M+1 = 3685,99).

Šio išradimo analogai gali būti skiriami šiltakraujams žinduoliams (jeigu to reikia), konkrečiai žmogui, parenteriniu, topiniu arba rektaliniu būdu, arba inhaliacijomis bei peroraliniu būdu. Gali būti patogiai pagaminama šių analogų parenterinė dozuota forma, kurioje yra maždaug 1-300 mg junginio dozuotame vienetė kartu su įprastu skiedikliu, pagalbine medžiaga, rišikliu, apsaugine medžiaga, stabilizatoriumi, nuspalvinančiu agentu ir pan., kaip reikalauja įprasta farmacinė praktika.

Vartojant parenteriniu būdu, ne dažniau kaip vieną kartą per dieną reikia padaryti 1-2 ml neskausmingą injekciją labai plona 30 mm švirkšto adata 1-2 metus (priklausomai nuo ligos aštrumo). Suleidžiamoje medžiagoje turėtų būti viena iš šio išradimo medžiagų vandeniniame izotoniniame steriliame tirpale arba suspensijoje (gali būti su apsaugine medžiaga, tokia kaip fenolis, arba su solubilizuojančiu agentu, tokiu kaip etilendiamino tetraacto rūgštis (EDTA)). Galimais vartoti skiedikiais ir tirpikliais yra vanduo, silpnai parūgštintas vanduo, Ringerio tirpalas ir izotoninis natrio chlorido tirpalas. Be to, kaip tirpikliai arba suspendavimo terpės paprastai yra vartojamos sterilios nelakios alyvos. Injekcijoms skirtų vaistinių formų gamyboje kaip nelakios alyvos randa pritaikymą sintetiniai monogliceridai, digliceridai, riebalų rūgštys (tokios kaip oleino rūgštis).

Rektaliniam vartojimui šio išradimo analogai gali būti paruošiami žvakučių forma, sumaišant juos su tinkama neerzinančia pagalbine medžiaga, tokia kaip kakavos sviestas arba poiletilenglikoliai.

Topiniam vartojimui šio išradimo analogai gali būti paruošiami tepalų, želė, tirpalų, suspensijų arba derminių pleistų forma.

Inhaliacijoms skirtos formos gali būti pagaminamos, pavyzdžiui, PCT publikuotoje paraiškoje nr. W094/07514 aprašytais būdais.

Dienos dozė neturėtų viršyti 0,05 mg/kg kūno masės arba maždaug 3,5 mg/70 kg žmogui priklausomai nuo konkretaus junginio aktyvumo, gydomo subjekto amžiaus, svorio, lyties ir būklės. Kaip turėtų būti gerai žinoma, veikliojo ingrediento kiekis, kuris turi būti sumaišomas su nešikliais gaminant atskirus dozuotus vienetus, keisis priklausomai nuo gydomo subjekto ir nuo konkretaus vartojimo būdo.

Toliau duodamose lentelėse pateikiamas sąrašas analogų, kurie buvo pagaminti pagal aukščiau aprašytas metodikas.

1 lentelė: PTH analogų molekulinės masės

SEQ ID	Analogas	Masė (nustatyta)	Masė (laukiama) (M+1)
1	hPTH-(1-31)-NH ₂	3717,77 (±0,13)	3717,14
3	[Leu ²⁷]ciklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3685,46 (±0,46)	3685,12
7	[Leu ²⁷]ciklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-30)-NH ₂	3586,14 (±0,19)	3585,99
4	[Leu ²⁷]ciklo(Lys ²⁶ -Asp ³⁰)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3685,61 (±0,36)	3685,12
6	ciklo(Lys ²⁷ -Asp ³⁰)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3700,64 (±0,38)	3700,14
8	[Leu ²⁷]ciklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-OH	3685,96 (±0,07)	3686,12
9	[Leu ²⁷]ciklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-34)-NH ₂	4083,62 (±0,33)	4083,52
10	[Leu ²⁷]ciklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-34)-OH	4084,14 (±0,87)	4084,52
11	[Ala ²⁷]ciklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3642,70 (±0,76)	3643,04
12	[Nle ²⁷]ciklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3684,57 (±0,99)	3685,12
13	[Nle ^{8,18} ,Leu ²⁷]ciklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3649,50 (±0,59)	3649,04
14	ciklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3699,66 (±0,49)	3700,14
15	[Ile ²⁷]ciklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3684,76 (±0,74)	3685,12

1 lentelė: PTH analogų molekulinės masės

SEQ ID	Analogas	Masė (nustatyta)	Masė (laukiama) (M+1)
16	[Tyr ²⁷]ciklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3734,47 (±0,80)	3735,14
17	α-acetil-[Leu ²⁷]ciklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3726,25 (±0,42)	3727,12
18	[Leu ²⁷]ciklo(Lys ²² -Glu ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3684,67 (±0,52)	3685,12
19	[Leu ²⁷]ciklo(Asp ²² -Orn ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3656,90 (±0,67)	3657,12
20	[Cys ²² ;Cys ²⁶ ;Leu ²⁷]ciklo(Cys ²² -Cys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3651,26 (±0,31)	3650,1
21	[Cys ²⁶ ;Cys ³⁰ ;Leu ²⁷]ciklo(Cys ²⁶ -Cys ³⁰)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3663,61 (±0,16)	3664,13

2 lentelė: Peptidinių analogų adenililciklazės (AC) aktyvumai

SEQ ID	Analogas	Adenililciklazė (EC ₅₀)
1	hPTH-(1-31)-NH ₂	20
3	[Leu ²⁷]ciklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3
7	[Leu ²⁷]ciklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-30)-NH ₂	20
4	[Leu ²⁷]ciklo(Lys ²⁶ -Asp ³⁰)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3*, 17*
6	ciklo(Lys ²⁷ -Asp ³⁰)-hPTH-(1-31)-NH ₂	40
8	[Leu ²⁷]ciklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-OH	7
9	[Leu ²⁷]ciklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-34)-NH ₂	8
10	[Leu ²⁷]ciklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-34)-OH	6
11	[Ala ²⁷]ciklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	9
12	[Nle ²⁷]ciklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	9
13	[Nle ^{8,18} ,Leu ²⁷]ciklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	6
14	ciklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	17
15	[Ile ²⁷]ciklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	9

2 lentelė: Peptidinių analogų adenililciklazės (AC) aktyvumai

SEQ ID	Analogas	Adenililciklazė (EC ₅₀)
16	[Tyr ²⁷]ciklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	9
17	α-acetil-[Leu ²⁷]ciklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	24
18	[Leu ²⁷]ciklo(Lys ²² -Glu ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	4
19	[Leu ²⁷]ciklo(Asp ²² -Orn ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	>200
20	[Cys ²² ;Cys ²⁶ ;Leu ²⁷]ciklo(Cys ²² -Cys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	16
21	[Cys ²⁶ ;Cys ³⁰ ;Leu ²⁷]ciklo(Cys ²⁶ -Cys ³⁰)-hPTH-(1-31)-NH ₂	24

LITERATŪRA

[išradimo aprašymą įtraukti šie literatūros šaltiniai:

- [1] Caulfield, M. P.; McKee, R. L.; Goldman, M. E.; Duong, L. T.; Fisher, J. E.; Gay, C. T.; DeHaven, P. A.; Levy, J. J.; Roubini, E.; Nutt, R. F.; Chorev, M.; Rosenblatt, M. The Bovine Renal Parathyroid Hormone (PTH) Receptor Has Equal Affinity for 2 Different Amino Acid Sequences - The Receptor Binding Domains of PTH and PTH-Related Protein Are Located Within the 14-34 Region. *Endocrinology* **1990**, *127*, 83-87.
- [2] Neugebauer, W.; Barbier, J.-R.; Sung, W. L.; Whitfield, J. F.; Willick, G. E. Solution Structure and Adenylyl Cyclase Stimulating Activities of C-Terminal Truncated Human Parathyroid Hormone Analogues. *Biochemistry* **1995**, *34*, 8835-8842.
- [3] Gardella, T. J.; Wilson, A. K.; Keutmann, H. T.; Oberstein, R.; Potts, J. T.; Kronenberg, H. M., and Nussbaum, S. R. Analysis of Parathyroid Hormone's Principal Receptor-Binding Region by Site-Directed Mutagenesis and Analog Design. *Endocrinology* **1993**, *132*, 2024-2030.
- [4] Marqusee, S.; Baldwin, R. L. Helix Stabilization by Glu...Lys⁺ Salt Bridges in Short Peptides *De Novo* Design. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, *84*, 8898-8902.
- [5] Surewicz, W. K.; Neugebauer, W.; Gagnon, L.; MacLean, S.; Whitfield, J. F.; Willick, G. E. Structure-Function Relationships in Human Parathyroid Hormone: The Essential Role of Amphiphilic-Helix. In *Peptides: Chemistry, Structure, and Biology 1993*; Smith, J.; Hodges, R., Eds.; ESCOM Leiden, The Netherlands, 1993, pp.556-558.
- [6] Whitfield, J. F.; Morley, P.; Willick, G. E.; Ross, V.; Barbier, J. R.; Isaacs, R. J.; Ohannessianbarry, L. Stimulation of the Growth of Femoral Trabecular Bone in Ovariectomized Rats by the Novel Parathyroid Hormone Fragment, hPTH-(1-31)NH₂ (Ostabolin). *Calcif. Tissue Int.* **1996**, *58*, 81-87.
- [7] Whitfield, J. F.; Morley, P. Small Bone-Building Fragments of Parathyroid Hormone: New Therapeutic Agents for Osteoporosis. *Trends Pharmacol. Sci.* **1995**, *16*, 382-386.

SEKŲ SĄRAŠAS

(1) BENDRA INFORMACIJA:

(i) Pareiškėjas:

- (A) Pavadinimas: National Research Council of Canada
- (B) Gatvė: Intellectual Property Services
Montreal Road, Bldg. M-58, Room EG-12
- (C) Miestas: Otava
- (D) Valstija: Ontario
- (E) Šalis: Kanada
- (F) ZIP: K1A 0R6

(ii) Išradimo pavadinimas: Paratiroidinio hormono analogai
osteoporozės gydymui

(iii) Sekų skaičius: 33

(iv) Kompiuteriu perskaitoma forma:

- (A) Informacijos laikmenos tipas: diskelis
- (B) Kompiuteris: IBM PC suderinamas
- (C) Operacinė sistema: PC-DOS/MS-DOS
- (D) Programinė įranga: PatentIn Release #1,0, Version #1.30

(v) Dabartinės paraiškos duomenys:

- (A) Paraiškos numeris: PCT/CA97/00547
- (B) Užpildymo data: 1997m. rugpjūčio mėn. 1 d.

(vi) Ankstesnės paraiškos duomenys:

- (A) Paraiškos numeris: 08/691,647
- (B) Užpildymo data: 1996m. rugpjūčio mėn. 2 d.

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:1:

(i) Sekos charakteristikos:

- (A) Ilgis: 31 aminorūgštis
- (B) Tipas: aminorūgščių
- (C) Vijiškumas:
- (D) Topologija: linijinė

(ii) Molekulės tipas: baltymas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:1:

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

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:2

(A) Ilgis: 31 aminorūgštis
(B) Tipas: aminorūgščių
(C) Vijiškumas:
(D) Topologija: linijinė

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:2:

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

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:3

(A) Ilgis: 31 aminorūgštis
(B) Tipas: aminorūgščių
(C) Vijiškumas:
(D) Topologija: cirkuliarinė

(ii) Molekulės tipas: baltymas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:3:

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

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:4:

(i) Sekos karakteristikos:

(A) Ilgis: 31 aminorūgštis
(B) Tipas: aminorūgščių
(C) Vijiškumas:
(D) Topologija: cirkuliarinė

(ii) Molekulės tipas: baltymas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:4:

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 Leu Leu Gln Asp Val
 20 25 30

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:5:

(i) Sekos charakteristikos:

- (A) Ilgis: 31 aminorūgštis
- (B) Tipas: aminorūgščių
- (C) Vijiškumas:
- (D) Topologija: linijinė

(ii) Molekulės tipas: baltymas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:5:

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 Leu Leu Gln Asp Val
 20 25 30

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:6:

(i) Sekos charakteristikos:

- (A) Ilgis: 31 aminorūgštis
- (B) Tipas: aminorūgščių
- (C) Vijiškumas:
- (D) Topologija: cirkuliarinė

(ii) Molekulės tipas: baltymas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:6:

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
 20 25 30

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:7:

(i) Sekos charakteristikos:

- (A) Ilgis: 30 aminorūgščių
- (B) Tipas: aminorūgščių
- (C) Vijiškumas:
- (D) Topologija: cirkuliarinė

(ii) Molekulės tipas: baltymas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:7:

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	Leu	Leu	Gln	Asp
			20					25					30

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:8:

(i) Sekos charakteristikos:

- (A) Ilgis: 31 aminorūgštis
- (B) Tipas: aminorūgščių
- (C) Vijiškumas:
- (D) Topologija: cirkuliarinė

(ii) Molekulės tipas: baltymas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:8:

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	Leu	Leu	Gln	Asp	Val
			20					25					30	

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:9:

(i) Sekos charakteristikos:

- (A) Ilgis: 34 aminorūgštys
- (B) Tipas: aminorūgščių
- (C) Vijiškumas:
- (D) Topologija: cirkuliarinė

(ii) Molekulės tipas: baltymas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:9:

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	Leu	Leu	Gln	Asp	Val	His
			20					25					30		

Asn Phe

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:10:

(i) Sekos charakteristikos:

- (A) Ilgis: 34 aminorūgštys
- (B) Tipas: aminorūgščių
- (C) Vijiškumas:

(D) Topologija: cirkuliarinė

(ii) Molekulės tipas: baltymas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:10:

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	Leu	Leu	Gln	Asp	Val	His
			20					25					30		
Asn	Phe														

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:11:

(i) Sekos charakteristikos:

- (A) Ilgis: 31 aminorūgštis
- (B) Tipas: aminorūgščių
- (C) Vijiškumas:
- (D) Topologija: cirkuliarinė

(ii) Molekulės tipas: baltymas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO: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	Ala	Leu	Gln	Asp	Val	
			20					25					30		

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:12:

(i) Sekos charakteristikos:

- (A) Ilgis: 31 aminorūgštis
- (B) Tipas: aminorūgščių
- (C) Vijiškumas:
- (D) Topologija: cirkuliarinė

(ii) Molekulės tipas: baltymas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO: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	Xaa	Leu	Gln	Asp	Val	
			20					25					30		

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:13:

(i) Sekos charakteristikos:

- (A) Ilgis: 31 aminorūgštis
- (B) Tipas: aminorūgščių
- (C) Vijiškumas:
- (D) Topologija: cirkuliarinė

(ii) Molekulės tipas: peptidas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:13:

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

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:14:

(i) Sekos charakteristikos:

- (A) Ilgis: 31 aminorūgštis
- (B) Tipas: aminorūgščių
- (C) Vijiškumas:
- (D) Topologija: cirkuliarinė

(ii) Molekulės tipas: baltymas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:14:

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	
			20					25					30		

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:15:

(i) Sekos charakteristikos:

- (A) Ilgis: 31 aminorūgštis
- (B) Tipas: aminorūgščių
- (C) Vijiškumas:
- (D) Topologija: cirkuliarinė

(ii) Molekulės tipas: baltymas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:15:

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	Ile	Leu	Gln	Asp	Val	
			20					25					30		

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:16:

(i) Sekos charakteristikos:

- (A) Ilgis: 31 aminorūgštis
- (B) Tipas: aminorūgščių
- (C) Vijiškumas:
- (D) Topologija: cirkuliarinė

(ii) Molekulės tipas: baltymas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:16:

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	Tyr	Leu	Gln	Asp	Val	
			20					25					30		

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:17:

(i) Sekos charakteristikos:

- (A) Ilgis: 31 aminorūgštis
- (B) Tipas: aminorūgščių
- (C) Vijiškumas:
- (D) Topologija: cirkuliarinė

(ii) Molekulės tipas: baltymas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:17:

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	Leu	Leu	Gln	Asp	Val	
			20					25					30		

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:18:

(i) Sekos charakteristikos:

- (A) Ilgis: 31 aminorūgštis
- (B) Tipas: aminorūgščių
- (C) Vijiškumas:
- (D) Topologija: linijinė

(ii) Molekulės tipas: baltymas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:18:

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	Lys	Trp	Leu	Arg	Glu	Leu	Leu	Gln	Asp	Val	

20

25

30

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:19:

(i) Sekos charakteristikos:

- (A) Ilgis: 31 aminorūgštis
- (B) Tipas: aminorūgščių
- (C) Vijiškumas:
- (D) Topologija: cirkuliarinė

(ii) Molekulės tipas: baltymas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:19:

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	Asp	Trp	Leu	Arg	Xaa	Lys	Leu	Gln	Asp	Val	
			20					25					30		

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:20:

(i) Sekos charakteristikos:

- (A) Ilgis: 31 aminorūgštis
- (B) Tipas: aminorūgščių
- (C) Vijiškumas:
- (D) Topologija: cirkuliarinė

(ii) Molekulės tipas: baltymas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:20:

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	Cys	Trp	Leu	Arg	Cys	Lys	Leu	Gln	Asp	Val	
			20					25					30		

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:21:

(i) Sekos charakteristikos:

- (A) Ilgis: 31 aminorūgštis
- (B) Tipas: aminorūgščių
- (C) Vijiškumas:
- (D) Topologija: cirkuliarinė

(ii) Molekulės tipas: baltymas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:21:

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	Cys	Lys	Leu	Gln	Cys	Val
			20					25					30	

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:22:

(i) Sekos charakteristikos:

- (A) Ilgis: 34 aminorūgštys
- (B) Tipas: aminorūgščių
- (C) Vijiškumas:
- (D) Topologija: linijinė

(ii) Molekulės tipas: peptidas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:22:

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

Asn Phe

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:23:

(i) Sekos charakteristikos:

- (A) Ilgis: 31 aminorūgštis
- (B) Tipas: aminorūgščių
- (C) Vijiškumas:
- (D) Topologija: linijinė

(ii) Molekulės tipas: baltymas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:23:

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

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:24:

(i) Sekos charakteristikos:

- (A) Ilgis: 4 aminorūgštys
- (B) Tipas: aminorūgščių
- (C) Vijiškumas:
- (D) Topologija: linijinė

(ii) Molekulės tipas: peptidas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:24:

Val His Asn Xaa

1

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:25:

(i) Sekos charakteristikos:

(A) Ilgis: 5 aminorūgštys

(B) Tipas: aminorūgščių

(C) Vijiškumas:

(D) Topologija: linijinė

(ii) Molekulės tipas: peptidas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:25:

Val His Asn Phe Xaa

1

5

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:26:

(i) Sekos charakteristikos:

(A) Ilgis: 6 aminorūgštys

(B) Tipas: aminorūgščių

(C) Vijiškumas:

(D) Topologija: linijinė

(ii) Molekulės tipas: peptidas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:26:

Val His Asn Phe Val Xaa

1

5

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:27:

(i) Sekos charakteristikos:

(A) Ilgis: 7 aminorūgštys

(B) Tipas: aminorūgščių

(C) Vijiškumas:

(D) Topologija: linijinė

(ii) Molekulės tipas: peptidas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:27:

Val His Asn Phe Val Ala Xaa

1

5

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:28:

(i) Sekos charakteristikos:

- (A) Ilgis: 8 aminorūgštys
- (B) Tipas: aminorūgščių
- (C) Vijiškumas:
- (D) Topologija: linijinė

(ii) Molekulės tipas: peptidas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:28:

Val His Asn Phe Val Ala Leu Xaa
1 5

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:29:

(i) Sekos charakteristikos:

- (A) Ilgis: 4 aminorūgštys
- (B) Tipas: aminorūgščių
- (C) Vijiškumas:
- (D) Topologija: linijinė

(ii) Molekulės tipas: peptidas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:29:

His Lys Lys Lys
1

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:30:

(i) Sekos charakteristikos:

- (A) Ilgis: 4 aminorūgštys
- (B) Tipas: aminorūgščių
- (C) Vijiškumas:
- (D) Topologija: linijinė

(ii) Molekulės tipas: peptidas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:30:

His Leu Lys Lys
1

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:31:

(i) Sekos charakteristikos:

- (A) Ilgis: 4 aminorūgštys

- (B) Tipas: aminorūgščių
- (C) Vijiškumas:
- (D) Topologija: linijinė

(ii) Molekulės tipas: peptidas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:31:

Lys Lys Lys Lys
1

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:32:

(i) Sekos charakteristikos:

- (A) Ilgis: 4 aminorūgštys
- (B) Tipas: aminorūgščių
- (C) Vijiškumas:
- (D) Topologija: linijinė

(ii) Molekulės tipas: peptidas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:32:

His Leu Lys Ser
1

(2) INFORMACIJA APIE SEQ ID NO:33:

(i) Sekos charakteristikos:

- (A) Ilgis: 5 aminorūgštys
- (B) Tipas: aminorūgščių
- (C) Vijiškumas:
- (D) Topologija: linijinė

(ii) Molekulės tipas: peptidas

(xi) Sekos aprašymas: SEQ ID NO:33:

Val Leu Asn Phe Xaa
1 5

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Žmogaus paratiroidinio hormono hPTH analogas, turintis tokią aminorūgščių seką:

$R-NH-R^1-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-R^2-His-Asn-Leu-Gly-Lys-R^3-R^4-R^5-R^6-R^7-Glu-$
 $Arg-Val-R^8-Trp-Leu-R^9-R^{10}-R^{11}-Leu-R^{12}-R^{13}-Y,$

kurioje

R = vandenilis arba bet kokios linijinės arba šakotosios grandinės alkilas, acilas arba arilo grupė,

R^1 = Ser, Ala arba Aib,

R^2 = Met arba gamtinė hidrofobinė aminorūgštis,

R^3 = His arba tirpi vandenyje aminorūgštis,

R^4 = Leu arba tirpi vandenyje aminorūgštis,

R^5 = Asn arba tirpi vandenyje aminorūgštis,

R^6 = Ser arba tirpi vandenyje aminorūgštis,

R^7 = Met arba gamtinė hidrofobinė aminorūgštis,

R^8 = Glu, Lys, Cys, Orn arba Asp,

R^9 = Arg, Lys, Orn, His, Cys arba Glu,

R^{10} = Lys, Orn, Cys, Glu arba Asp,

R^{11} = gamtinė hidrofobinė arba polinė aminorūgštis,

R^{12} = Cys, Glu, Asp, Lys arba Orn,

R^{13} = Asp, Cys arba Lys,

X = OH, NH_2 ir

Y = X, Val-X, Val-His-X, Val-His-Asn-X, Val-His-Asn-Phe-X, Val-His-Asn-Phe-Val-X, Val-His-Asn-Phe-Val-Ala-X ir Val-His-Asn-Phe-Val-Ala-Leu-X,

ciklizuojamas tarp vienos arba dviejų aminorūgščių porų 22 ir 26, 26 ir 30, 27 ir 30 ir 25 ir 29, kai R^9 yra Lys arba Orn, ir R^{12} yra Glu arba Asp, kuriame viena iš ciklizacijų yra tarp aminorūgščių 22 ir 26 arba tarp aminorūgščių 25 ir 29, ir jo farmaciškai tinkamos druskos.

2. Analogas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis yra ciklizuojamas laktamine forma tarp aminorūgščių porų 22/26, 26/30, 25/29, kai R^9 yra Lys arba Orn ir R^{12} yra Glu arba Asp, arba tarp aminorūgščių poros

27/30, kai R^{11} ir R^{13} yra Lys arba Asp; arba ciklizuotas disulfidinio tiltelio forma tarp Cys porų 22/26, 26/30 arba 25/29.

3. Analogas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad ciklizacija yra laktaminės formos arba disulfidinio tiltelio formos.

4. Analogas pagal bet kurį iš 1-3 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad laktamas yra 22-26 laktamas, Glu²²-Lys²⁶ laktamas arba 25-29 laktamas.

5. Analogas pagal bet kurį iš 1-4 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad R yra H, o X yra NH₂.

6. Analogas pagal bet kurį iš 1-5 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad R^{11} yra Lys arba Leu.

7. Analogas pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad R^2 ir R^7 yra Met arba Nle.

8. Analogas pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad R^1 yra Ser, R^2 yra Met, R^7 yra Met, R^8 yra Glu, R^9 yra Arg, R^{10} yra Lys, R^{12} yra Gln, o R^{13} yra Asp.

9. Analogas pagal 8 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad R^3 yra His arba Lys, R^4 yra Leu, Lys arba Arg, R^5 yra Asn, Orn, Hci, Asp, Arg, Lys, D-Lys, Ser arba Gly, o R^6 yra Ser, Lys, Asp arba Arg.

10. Analogas pagal 8 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad R^3 - R^6 yra His-Lys-Lys-Lys, His-Leu-Lys-Lys, Lys-Lys-Lys-Lys arba His-Leu-Lys-Ser.

11. Analogas pagal 8 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad $Y = X$, $Y = \text{Val-X}$ arba $Y = \text{Val-Leu-Asn-Phe-X}$.

12. Analogas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jo seka yra SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18 arba SEQ ID NO:19.

13. Analogas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad R^{11} yra Lys, Leu, Asp, Gln, Ala, Nle, Ile arba Tyr.

14. Žmogaus paratiroidinio hormono hPTH (1-31) analogas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jo 27 padėtyje yra Lys arba jis yra pakeistas tinkama hidrofobine liekana, ir jis yra ciklizuotas tarp Glu²² ir Lys²⁶, sudarant laktamą.

15. Analogas pagal 14 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad hidrofobinė liekana yra Leu, o analogas C-gale turi arba amidinę grupę, arba karboksigrupę.

16. Analogas pagal 14 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad hidrofobinę liekaną pasirenka iš grupės, susidedančios iš Ile, norleucino, Met ir α -aminosviesto rūgšties.

17. Analogas pagal 14 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jo seka yra SEQ ID NO:3.

18. Kompozicija skirta vartoti jos reikalingam šiltakraujui gyvūnui, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad joje yra žmogaus paratiroidinio hormono (hPTH)-(1-31) analogas pagal 14 punktą kartu su farmaciškai tinkamu nešikliu arba pagalbine medžiaga.

19. Kompozicija pagal 18 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad šiame analoge hidrofobinė liekana yra Leu.

20. Kompozicija pagal 18 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad šiame analoge hidrofobinę liekaną pasirenka iš grupės, susidedančios iš Ile, norleucino, Met ir α -aminosviesto rūgšties.

21. Kompozicija pagal 18 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad šio analogo seka yra SEQ ID NO:3.

22. Žmogaus paratiroidinio hormono hPTH (1-31) analogas pagal 14 punktą, skirtas panaudoti šiltakraujo gyvūno gydymui.

23. Analogas pagal 22 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad šiame analoge hidrofobinė liekana yra Leu.

24. Analogas pagal 22 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad šiame analoge hidrofobinę liekaną pasirenka iš grupės, susidedančios iš Ile, norleucino, Met ir α -aminosviesto rūgšties.

25. Analogas pagal 22 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad šio analogo seka yra SEQ ID NO:3.

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-
Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-COOH

Fig. 1

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-
Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-NH₂

Fig. 2

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-
Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-NH₂

Fig. 3

2/15

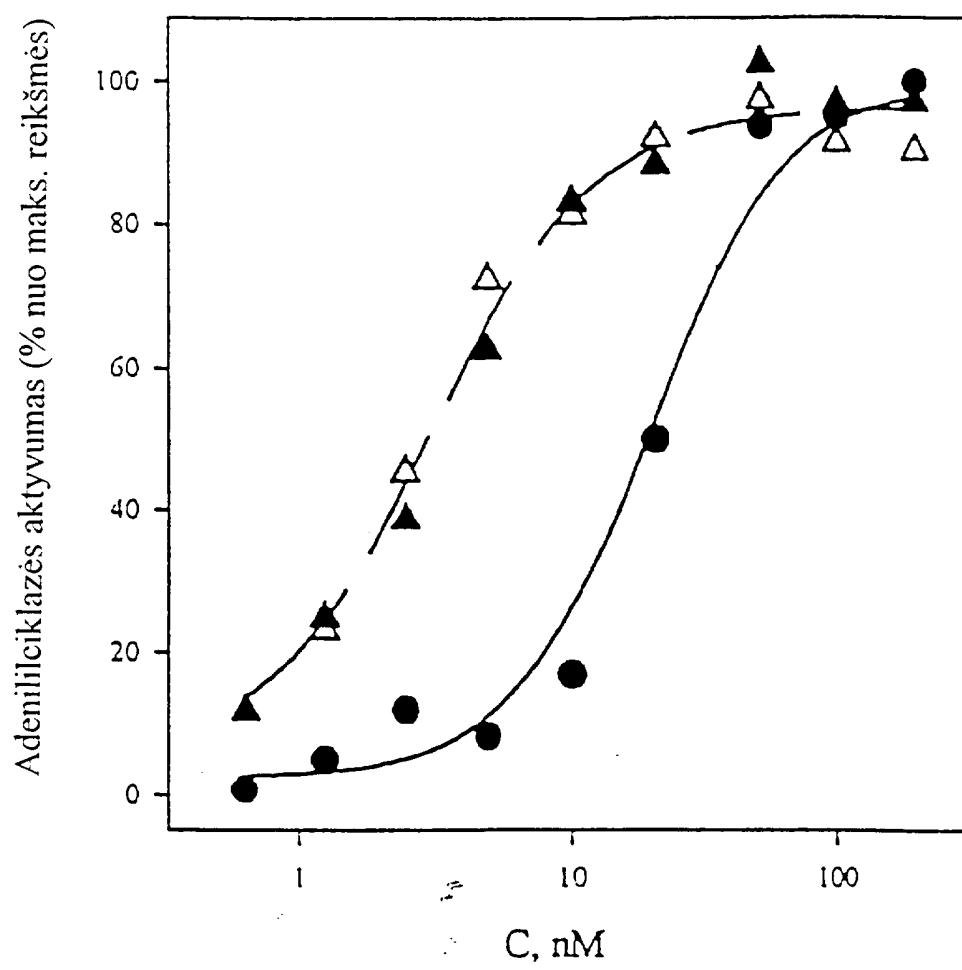


Fig. 4

3/15

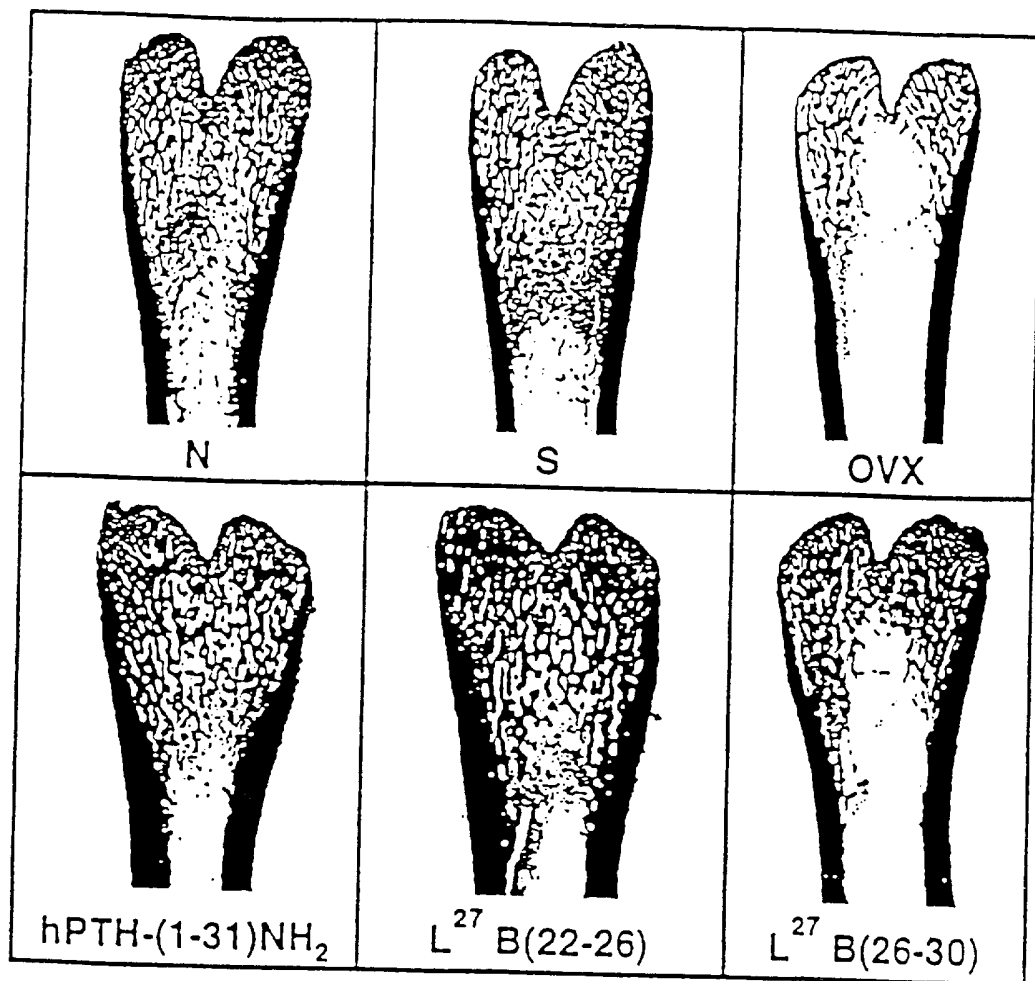


Fig. 5

4/15

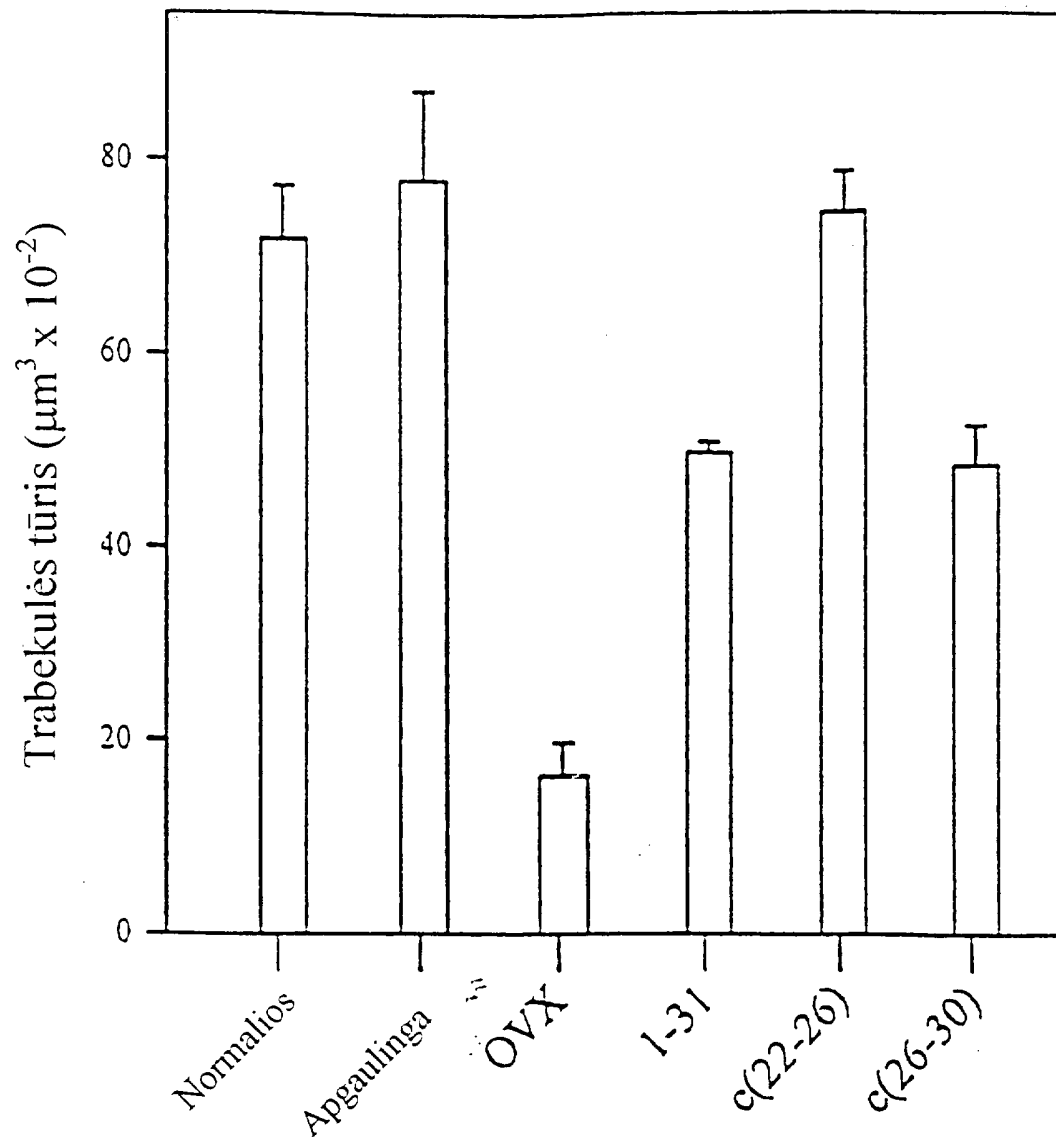


Fig. 6

5/15

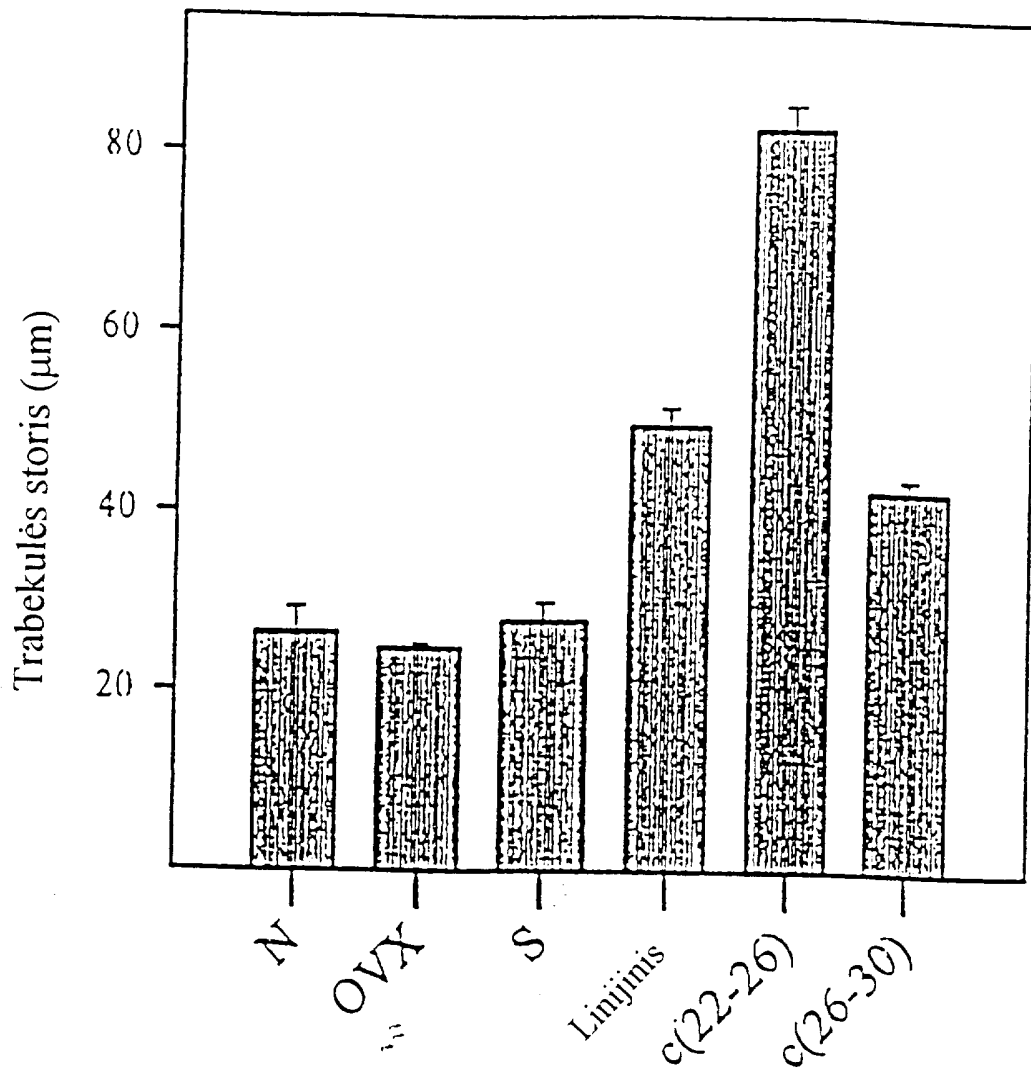


Fig. 7

6/15

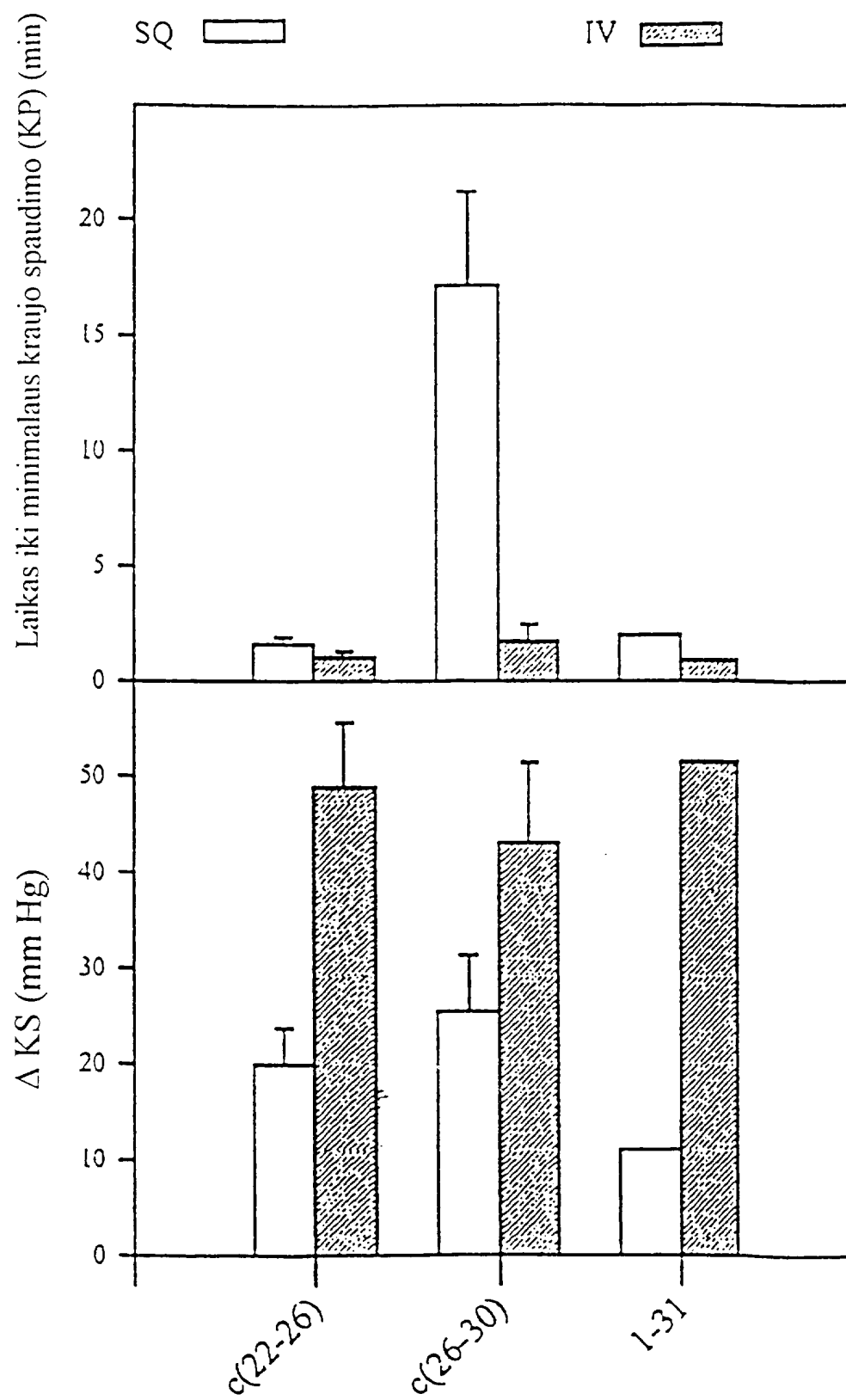


Fig. 8

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-
Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Val-NH₂

Fig. 9

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-
Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-NH₂

7/15

Fig. 10

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-
Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-NH₂

Fig. 11

8/15

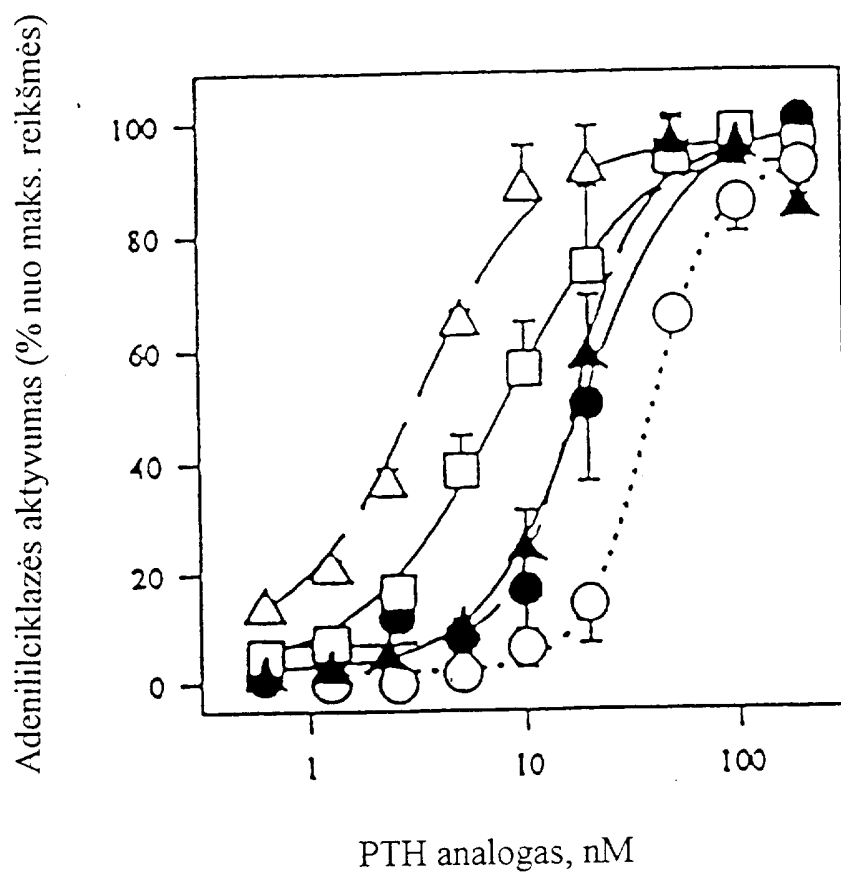


Fig. 12

9/15

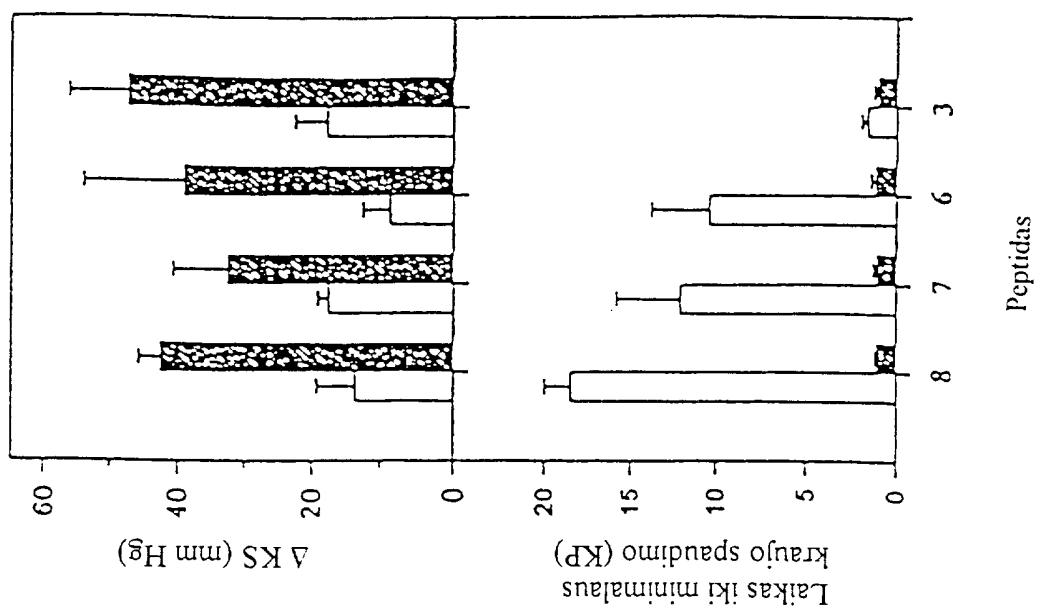
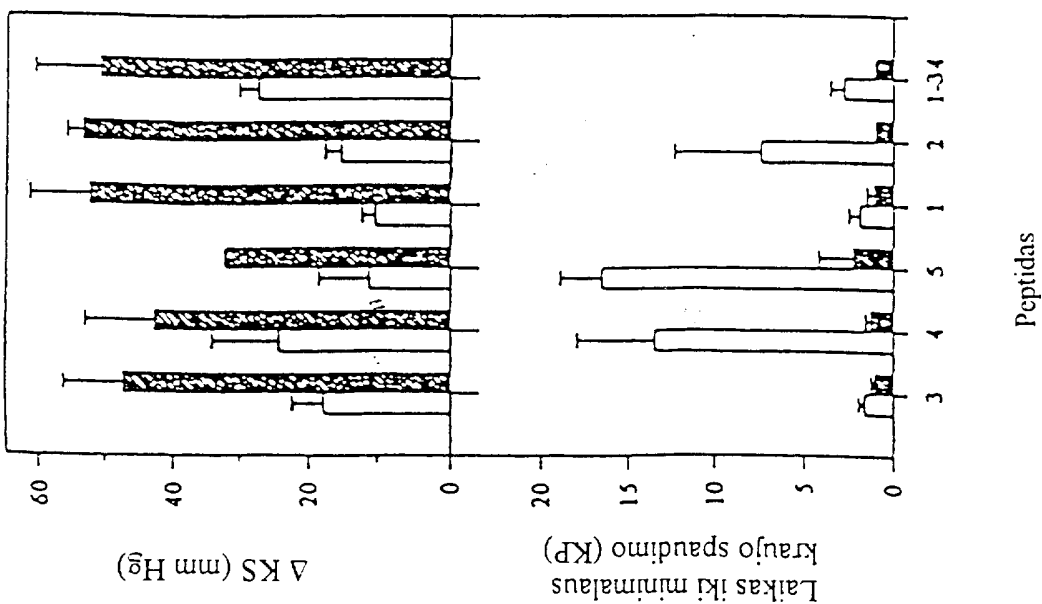


Fig. 13



10/15

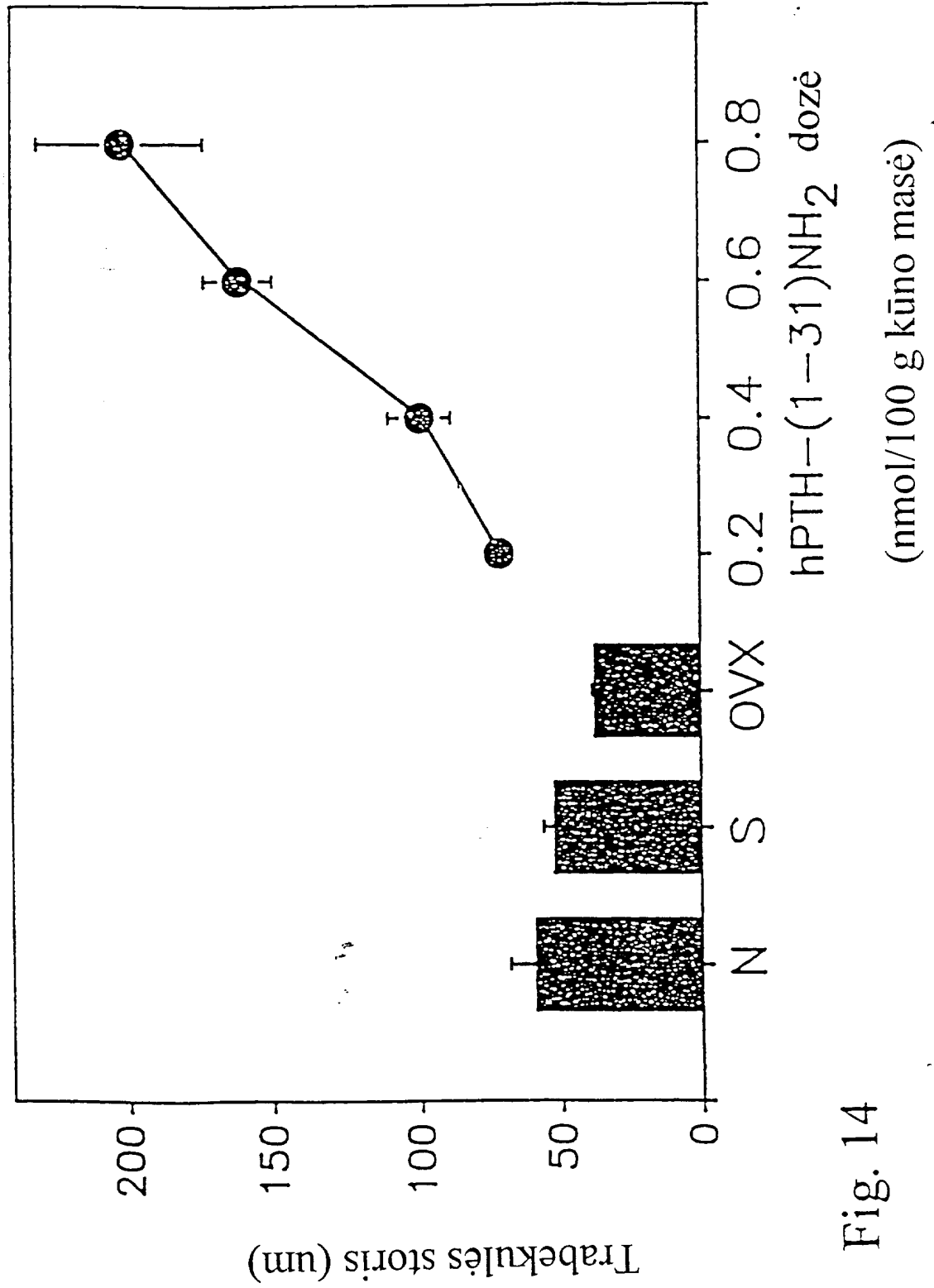


Fig. 14

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-
Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Val-OH

Fig. 15

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-
Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-NH₂

Fig. 16

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-
Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-OH

Fig. 17

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-
Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Gln-Asp-Val-NH₂

Fig. 18

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-
Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Nle-Leu-Gln-Asp-Val-NH₂

Fig. 19

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-ile-Gln-Leu-Nle-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Nle-Glu-Arg-
Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-NH₂

Fig. 20

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-
Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-NH₂

Fig. 21

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-
Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Ile-Leu-Gln-Asp-Val-NH₂

Fig. 22

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-ile-Gln-Leu-Nle-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Nle-Glu-Arg-
Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Tyr-Leu-Gln-Asp-Val-NH₂

Fig. 23

CH₃COHN-Ser-Val-Ser-Glu-ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-
Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Val-NH₂

Fig. 24

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-
Val-Lys-Trp-Leu-Arg-Glu-Leu-Leu-Gln-Asp-Val-NH₂

Fig. 25

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-ile-Gln-Leu-Nle-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Nle-Glu-Arg-
Val-Asp-Trp-Leu-Arg-Orn-Leu-Leu-Gln-Asp-Val-NH₂

Fig. 26

15/15

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-
Cys-Trp-Leu-Arg-Cys-Leu-Leu-Gln-Asp-Val-NH₂

Fig. 27

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-
Val-Lys-Trp-Leu-Arg-Cys-Leu-Leu-Gln-Cys-Val-NH₂

Fig. 28