



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation⁵ : C07K 7/10, A61K 37/02</p>	A2	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/15109</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 5. August 1993 (05.08.93)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP93/00259</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 4. Februar 1993 (04.02.93)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 42 03 040.4 4. Februar 1992 (04.02.92) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhoferstraße 116, D-6800 Mannheim 31 (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : DUVOS, Christian [US/DE]; Bremervörderstraße 39, D-2160 Stade (DE). MAYER, Hubert [DE/DE]; Großer Zimmerhof 10, D-3340 Wolfenbüttel (DE). MUELLER-BECKMANN, Bernd [DE/DE]; Hochgewanne 46, D-6718 Grünstadt (DE). STREIN, Klaus [DE/DE]; Eichenstraße 45, D-6944 Hemsbach (DE). WINGENDER, Edgar [DE/DE]; Kleine Breite 16, D-3340 Wolfenbüttel (DE).</p>		<p>(74) Anwälte: MINK, Reinhold usw. ; Boehringer Mannheim GmbH, Sandhoferstraße 116, D-6800 Mannheim 31 (DE).</p> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, BG, BR, CA, CZ, FI, HU, JP, KR, NO, NZ, PL, RO, RU, SK, UA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>
<p>(54) Title: PARATHYROID HORMONE FRAGMENTS, THEIR PREPARATION AND MEDICAMENTS CONTAINING THE SAME</p> <p>(54) Bezeichnung: PARATHORMONFRAGMENTE, DEREN HERSTELLUNG UND DIESE ENTHALTENDE ARZNEIMITTEL</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Parathyroid hormone (PTH) fragments comprising the aminoacid range of the natural parathyroid hormone from +3 to +35 and their physiologically tolerable derivatives are disclosed. Also disclosed are a process for preparing said fragments by solid phase and liquid phase synthesis from partially blocked aminoacids contained in the fragments that are coupled to each other in a sequence that corresponds to the aminoacid sequence in the fragment to be produced, as well as medicaments containing at least one of said fragments and having in particular a calcium regulating activity in the body.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft Parathormon-(PTH)-Fragmente umfassend den Aminosäurebereich des natürlichen Parathormons von +3 bis +35 und deren physiologisch verträgliche Derivate, ein Verfahren zur Herstellung der genannten Fragmente nach der Festphasen- und Flüssigphasensynthese aus teilweise blockierten, in den Fragmenten enthaltenen Aminosäuren, die in der Reihenfolge aneinander gekoppelt werden, welche der Aminosäuresequenz im herzustellenden Fragment entspricht, und mindestens eines der genannten Fragmente enthaltende Arzneimittel, insbesondere mit calciumregulierender Wirkung im Körper.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfhögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU	Australien	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BE	Belgien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NZ	Neuseeland
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	PL	Polen
BJ	Benin	IE	Irland	PT	Portugal
BR	Brasilien	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SD	Sudan
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KZ	Kasachstan	SK	Slowakische Republik
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SU	Sowjet Union
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CZ	Tschechische Republik	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	UA	Ukraine
DK	Dänemark	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
ES	Spanien	MN	Mongolei	VN	Vietnam
FI	Finnland				

Neue Parathormonfragmente, deren Herstellung und diese
enthaltende Arzneimittel

Die Erfindung betrifft neue Parathyroidhormon (PTH)-Fragmente, sowie ihre pharmakologisch verträglichen Derivate, die Herstellung dieser Fragmente und ihrer Derivate auf chemischem Weg und diese enthaltende Arzneimittel.

Das Parathyroidhormon (PTH), ein Hormon der Nebenschilddrüsen, ist ein wichtiger Regulator unter anderem zur Aufrechterhaltung des Calciumspiegels im Körper. PTH kann die Knochenbildung oder Knochenresorption stimulieren. Es wirkt dabei als regulatorisches Hormon auf eine Reihe von Enzymen, unter anderem die Ornithindecarboxylase und Adenylatcyclase (cAMP-Synthese). PTH mobilisiert bei Calciummangel Calcium aus den Knochen, verringert die Calciumausscheidung der Nieren und verbessert gleichzeitig die Resorption von Calcium aus dem Darm durch eine erhöhte Synthese von $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$. Durch die Wirkung auf diese Zielorgane wird eine Normalisierung des Calciumspiegels erreicht. Umgekehrt wird bei erhöhtem Calciumspiegel der Einbau von Calcium in die Knochen stimuliert. Ferner zeigt PTH einen mitogenen Effekt, insbesondere eine Stimulation von Osteoblasten und Chondrocyten.

Aus der DE-OS 37 25 319 ist ferner bekannt, daß die oben genannten Effekte durch einen speziellen Bereich des PTH bewirkt wird und daß es möglich ist, durch Gabe von PTH-Fragmenten, welche diesem Bereich entsprechen, die gleiche Wirkung zu erzielen (siehe auch Sömjen et al., Biochem. J. (1990) 272, 781-785; Shurtz-Swirski et al., Acta Endocrinol. (1990) 122, 217-226 und Potts et al, Advances in Protein

- 2 -

Chemistry (1982) 35, 323-396). Dieser Literatur ist auch zu entnehmen, wie solche PTH-Fragmente hergestellt und variiert werden können, wobei sowohl eine Spaltung des natürlich vorkommenden PTH als auch chemisch synthetische oder gentechnologische Verfahren möglich sind. Ein chemisch synthetisches Verfahren zur Herstellung des hPTH (1-37) ist beschrieben in der internationalen Anmeldung WO 91/06564. Diese bekannte Festphasen- und Flüssigphasensynthese hat jedoch den Nachteil, daß die Ausbeuten bei der Herstellung relativ gering sind.

PTH-Fragmente sind insbesondere für die Behandlung von Osteoporose interessant. Allerdings hat sich herausgestellt, daß die Fragmente unterschiedlich wirksam sind und daß in einigen Fällen, z.B. bei der Anwendung des hPTH(1-34) die Wirkung bei einigen Patienten positiv ist, bei anderen aber eine Verschlechterung der Calciumretention eintrat und die Gesamtknochenmasse während der Behandlung zurückging.

~~Es ist deshalb die Aufgabe der Erfindung, neue PTH-Fragmente zur Verfügung zu stellen, die eine verbesserte therapeutische Wirkung, insbesondere bei der Regulierung des Calciumspiegel im Körper und beim Einbau von Calcium in die Knochen haben. Außerdem sollten sich diese Fragmente mit einem relativ geringen Aufwand in guter Ausbeute herstellen lassen.~~

Diese Aufgabe wird mit PTH-Fragmenten gelöst, die die Aminosäuresequenzen von bPTH(3-35), pPTH(3-35) oder hPTH(3-35) umfassen, wobei das C-terminale Ende dieser Sequenzen um eine Aminosäure oder das N-terminale Ende um eine oder zwei Aminosäuren verlängert sein kann. Insbesondere kommen im Sinne der Erfindung die PTH-Fragmente (1-35) und (1-36) in Frage. Im Sequenzprotokoll sind die Aminosäuresequenzen der folgenden Fragmente enthalten:

ERSATZBLATT

- 3 -

- SEQ ID No. 1 : Kernfragment hPTH(3-35)
SEQ ID No. 2 : hPTH(3-36)
SEQ ID No. 3 : hPTH(1-35)
SEQ ID No. 4 : hPTH(1-36)

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Herstellung dieser Fragmente, indem man die genannten Fragmente oder Teilfragmente davon mittels Flüssigphasen-Synthese aus geschützten Aminosäuren herstellt, die in der Reihenfolge aneinander gekoppelt werden, so daß die gewünschte Aminosäuresequenz des jeweiligen Fragmentes entsteht. Gegenstand der Erfindung sind auch Arzneimittel, die ein erfindungsgemäßes PTH-Fragment als aktiven Wirkstoff neben üblichen Hilfs- und Zusatzstoffen enthalten.

Die Aminosäuresequenzen von hPTH, bPTH und pPTH (h=human, b=bovine, p=porcine) sind bekannt aus Potts et al., Adv. in Protein Chem. (1982), 323-396; z.B. hPTH(1-34) mit der Aminosäuresequenz 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.

Die erfindungsgemäßen PTH-Fragmente mit dem Aminosäurebereich von PTH(3-35), die ausgehend von der Aminosäureposition +3 am N-Terminus um eine oder zwei Aminosäuren verlängert sein können, sind insbesondere solche Fragmente, die in Position +2 die Aminosäure D- oder L-Val besitzen. Fragmente, die um zwei Aminosäuren am N-Terminus verlängert sind, besitzen in Position +2 die Aminosäure D- oder L-Val und in Position +1 die Aminosäure D- oder L-Ser.

Fragmente, die am C-Terminus ausgehend von der Aminosäureposition +35 (Val) um eine Aminosäure verlängert sind, stellen insbesondere solche Fragmente dar, die in Position +36 die Aminosäure D- oder L-Ala aufweisen.

- 4 -

Bevorzugt kommen die Fragmente PTH(1-35) mit der Aminosäuresequenz 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-Val und PTH(1-36) mit der Aminosäuresequenz 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-Val-Ala in Frage.

Die Carboxylgruppe der Aminosäure am C-terminalen Ende kann in freier Form oder in Form eines physiologisch verträglichen Alkali- oder Erdalkalisalzes, wie z.B. des Natrium-, Kalium- oder Calciumsalzes vorliegen. Die Carboxylgruppe kann auch amidiert sein mit primären oder sekundären Aminen, wie z.B. Ammoniak, C₁-C₆-Alkylamin oder Di-C₁-C₆-Alkylaminen, insbesondere Methylamin oder Dimethylamin, d.h. -CONR¹R², mit R¹ = Wasserstoff, C₁-C₆-Alkyl und R²=Wasserstoff, C₁-C₆-Alkyl, wobei die Alkylgruppen beispielsweise Methyl, Ethyl, n-Propyl, i-Propyl, Butyl, etc. bedeuten können).

Bevorzugt kommen in diesem Sinne die Fragmente PTH(2-35), PTH(2-35)-Z, PTH(1-35), PTH(1-35)-Z, PTH(2-36), PTH(2-36)-Z, PTH(1-36) oder PTH(1-36)-Z in Frage, insbesondere die entsprechenden hPTH-Fragmente, wobei Z die oben angegebene amidierete Carboxylgruppe -CONR¹R² bedeutet. Insbesondere bedeutet R¹ ein Wasserstoffatom und R² eine Methyl-, Ethyl- oder Isopropylgruppe.

Die erfindungsgemäßen PTH-Fragmente besitzen vorteilhafte therapeutische Eigenschaften. Insbesondere läßt sich mit ihnen nicht nur der Calciumspiegel im Körper regulieren, sondern auch der Einbau von Calcium in die Knochen gezielt fördern, weshalb sie den Verlauf der Osteoporose günstig beeinflussen bzw. diese zum Stillstand bringen können. Diese Wirkung ist überraschend, weil diese PTH-Fragmente, anders als die bekannten Fragmente hPTH(1-37) oder hPTH(1-34), nicht

- 5 -

zu den biologisch aktiven hPTH-Fragmenten gehören, welche durch primäre Spaltung des hPTH(1-84) im menschlichen Körper entstehen. Als weiterer Vorteil der erfindungsgemäßen PTH-Fragmente kommt hinzu, daß sie sich in besserer Ausbeute als die Fragmente mit längerer Aminosäuresequenz herstellen lassen.

Gegenüber den bekannten Fragmenten hPTH(1-n) mit $n=34$, 37 oder 38 besitzen die erfindungsgemäßen PTH-Fragmente eine überraschend höhere Wirksamkeit in verschiedenen Testsystemen, so daß sie für eine therapeutische Anwendung besser geeignet sind als die bisher bekannten Fragmente. Die Vorteile der neuen Fragmente sind insbesondere die folgenden: stärkere Mitogenität und DNA-Syntheseleistung; geringere katabole, calciummobilisierende Wirkung; geringere cAMP-Aktivierung; Steigerung der Calciumretention und verstärkter Calciumeinbau in die Knochen. Diese Effekte bewirken insgesamt eine deutlich überlegene anabole Wirkung der neuen PTH-Fragmente im Vergleich zu bisher bekannten PTH-Fragmenten.

Die Festphasen- und Flüssigphasensynthese ist ein übliches, auch schon für die Synthese von hPTH-Fragmenten angewandtes Verfahren (siehe WO 91/06564). Nachteilig bei diesem Verfahren ist jedoch, daß auch viele Verunreinigungen erzeugt werden, welche nicht nur die Reindarstellung erschweren, sondern auch die Ausbeute erniedrigen.

Um das Verfahren für die Herstellung eines bestimmten Produktes im Hinblick auf die Reinheit des Rohproduktes und die Ausbeute zu optimieren, ist es erforderlich, die Prozeßparameter und die verwendeten Materialien, beispielsweise die Materialien für das Blockieren der Gruppen, welche nicht reagieren sollen, oder die Reagenzien, welche blockierende Materialien abspalten, an das herzustellende Produkt, an die herzustellenden Zwischenprodukte bzw. Ausgangsmaterialien

- 6 -

anzupassen. Diese Anpassung ist angesichts der Interdependenz der vielen Verfahrensparameter nicht einfach. Bei der Herstellung der erfindungsgemäßen PTH-Modifikationen wirkt es sich vorteilhaft aus, wenn das für die Abtrennung des synthetisierten Peptids von der Festphase und der Seitengruppenblockierungen verwendete "Reagens K" als Bestandteil Dithiothreitol (DTT) statt Ethandithiol enthält.

Es hat sich gezeigt, daß auch das aus dem Artikel "Simultaneous Multiple Peptide Synthesis under Continuous Flow Conditions on Cellulose Paper Discs as Segmental Solid Supports" von R. Frank i. a., veröffentlicht in Tetrahedron Vol. 44, No. 19, pp 603-604 (1988), bekannte Filterverfahren prinzipiell für die Herstellung von beispielsweise hPTH(1-35) und hPTH(1-36) geeignet ist, jedoch PTH-Fragmente mit Aminosäuresequenzen, die über die Zahl 36 hinausgehen mit dieser Methode - offenbar aufgrund der Bildung von großen Mengen von Verunreinigungen - nur mit deutlich reduzierter Ausbeute in reiner Form erzeugt werden können.

Arzneimittel, welche die erfindungsgemäßen Fragmente einzeln oder zusammen als aktiven Wirkstoff neben üblichen Hilfs- und Zusatzstoffen enthalten, wurden vorzugsweise parenteral verabreicht. Das Arzneimittel hat eine calciumregulierende Wirkung und fördert dabei in vorteilhafter Weise den Einbau von Calcium in die Knochen. Vorteilhaft für die Anwendung des Arzneimittels ist es, wenn es den Wirkstoff in Mengen von 300 Mikrogramm bis 30 Milligramm pro Dosis Einheit enthält. Eine gute Wirkung wird insbesondere dann erzielt, wenn die Dosis Einheit an erfindungsgemäßem Fragment 100 bis 1.000 Einheiten bzw. einer wirksamen Konzentration von 10^{-8} - 10^{-7} M/l Körperflüssigkeit entspricht.

Die erfindungsgemäßen PTH-Fragmente werden vorzugsweise als sterile Lyophilisate gelagert und vor der Applikation mit

- 7 -

einer geeigneten isotonischen Lösung vermischt. In dieser Form können die Fragmente dann injiziert, infundiert oder gegebenenfalls auch durch die Schleimhäute absorbiert werden. Als Lösungsmittel können die üblichen, für die Injektion oder Infusion geeigneten isotonischen, wässrigen Systeme verwendet werden. Physiologische Kochsalzlösung oder gegebenenfalls durch Puffer isotonisch gestellte Lösungen werden in diesem Fall bevorzugt.

Die zu verabreichende Tagesdosis hängt von der Indikation ab. Bei der Therapie der Osteoporose durch i.v./i.m. Injektion liegt sie im Bereich von 100 bis 1.200 Einheiten (μg)/Tag, bei täglicher subcutaner Injektion vorzugsweise bei 300 - 2.400 Einheiten (μg)/Tag. Die Bestimmung der biologischen Aktivität basiert auf Messungen gegen internationale Referenzpräparationen für hPTH-Fragmente in einem gebräuchlichen biologischen Testverfahren für hPTH-Fragmente.

Die erfindungsgemäßen PTH-Fragmente können nach dem Filtersynthese-Verfahren oder dem konventionellen Protokoll über einen kommerziellen Synthesizer hergestellt werden.

Beispiel 1

Chemische Synthese von hPTH(1-35) und hPTH(1-36)

Bei der Herstellung nach dem erfindungsgemäßen Verfahren (chemische Synthese) wurde in vorteilhafter Weise ein Milligen 9050 Peptid-Synthesizer verwendet. Es wurden Pentafluorophenylester der Aminosäuren eingesetzt, in Kombination mit Hydroxy-benzotriazol (HOBt) zur Verhinderung von Razemisierung während der Kopplungsreaktion. N-alpha-Aminofunktionen waren durch die Fluorenylmethoxycarbonylgruppe (Fmoc) geschützt. Aminosäure-Seitenketten waren durch t-Boc

- 8 -

(Histidin und Lysin), t-But (Asparaginsäure, Glutaminsäure und Serin) und Pmc (2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl) (Arginin) geschützt. Bevorzugt wurden als Harze verwendet: Fmoc-Val-NovaSyn-PA 500 (Novabiochem), Substitutionsgrad 0,37 mMol/g für hPTH (1-35) und Fmoc-Ala-NovaSyn-PA 500 (Novabiochem), Substitutionsgrad 0,35 mMol/g für hPTH (1-36). Die Abspaltung der Peptide vom Harz und die Schutzgruppenabspaltung wurde mit einer Mischung aus Trifluoressigsäure (TFA), Phenol, Wasser, Thioanisol und Dithiothreitol (DTT) vorgenommen. Bevorzugt ließ man dabei für jeweils etwa zwei Stunden eine Mischung aus 82,5 % TFA, 5 % Phenol, 5 % Wasser, 5 % Thioanisol und 2,5 % DTT und modifiziertes Reagens K (s. King et al., Int. J. Peptide Protein Res. 36, 255-266, 1990) einwirken. Die Fmoc-Gruppe wurde mittels einer Lösung von Piperidin in Dimethylformamid (DMF) abgespalten. Bevorzugt war die Lösung 20 %ig. Die Rohpeptide wurden mit t-Butylmethylether gefällt, in Wasser/Acetonitril - bevorzugt - 9:1 gelöst, - bevorzugt - über C-18 Kartuschen (J. T. Baker Chemical Co.) vorgereinigt und lyophilisiert.

Die Ausbeute betrug bei Herstellung unter den bevorzugten Bedingungen 71 % für hPTH (1-35) und 67 % für hPTH (1-36). Die Rohpeptide wurden durch präparative HPLC - bevorzugt - auf reversed phase-C4 (RP-4)-Material mit einem Wasser-Acetonitril Gradienten gereinigt. Die Ausbeute beträgt 10-15 %, bezogen auf die Rohpeptide.

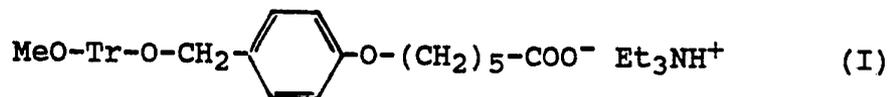
Beispiel 2

Herstellung von hPTH(1-35) und hPTH(1-36) nach der Filtermethode

Die Synthese bei Anwendung der Filtermethode erfolgte nach der Fmoc/t-Butyl (tBu)-Methode unter Verwendung der 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT)/Diisopropylcarbodiimid (DICD)-Kopplung. Als spezielle Seitenkettenschutzgruppen wurden Pmc für Arg, Trimethoxybenzyl (Tmob) für Asn und Gln und Butoxycarbonyl (Boc) für His eingesetzt.

Bei der Herstellung der erfindungsgemäßen PTH-Fragmente nach der Filtermethode wurden je Sequenz zwei Filter mit einer Beladung von je 5 μ Mol C-terminalem Aminosäurederivat beladen. Jede Sequenz wurde also im Maßstab 10 μ Mol hergestellt.

Vor Beginn der Synthese wurden zunächst die Cellulosefilter für die Aufnahme der Aminosäuren vorbereitet. Dazu wurde das Filterpapier durch eine schonende Säurebehandlung z. B. mit einer 10 %igen Lösung von TFA in Dichlormethan zum Quellen gebracht und anschließend mit einer "Ankopplungsverbindung" umgesetzt. Bevorzugt wurde eine Kopplung vom Benzylester-Typ, um die erste Aminosäure an dem Träger zu verankern. Besonders günstig als "Ankopplungsverbindung" - auch im Hinblick auf die spätere Abtrennung - war ein p-Alkoxybenzylderivat mit der Formel I,



welches eine 4-Methoxytritylether-Gruppe als schützende Gruppe aufweist, die leicht mit Dichloressigsäure in Dichlormethan abgespalten werden kann. Herstellen läßt sich die

- 10 -

Verbindung durch selektive Tritylierung von 4-Hydroxyphenol mit 4-Methoxytritylchlorid. Die Methoxytritylgruppe wird als Schutzgruppe bei der Veresterung der Cellulose-Hydroxylgruppen mit dem Alkoxybenzylderivat benötigt.

Die Anbringung der ersten Fmoc-Aminosäure wurde wie bei anderen mit Benzylalkohol substituierten Trägern durchgeführt, indem ein dreifacher Überschuß über die Filterbeladung an voraktivierten Aminosäurederivaten unter Verwendung von Dimethylaminopyridin (DMAP) als Katalysator mit der umgesetzten Unterlage zur Reaktion gebracht wurde. Die Voraktivierung wurde erreicht, indem die Fmoc-geschützten Aminosäurederivate mit 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) und Diisopropylcarbodiimid (DICD) zum HOBT-Ester umgesetzt wurden. Bevorzugt wurden die Aminosäurederivate in DMF mit 1,5 Äquivalent HOBT und 1,2 Äquivalent DICD 45 Minuten lang umgesetzt. Die voraktivierten Aminosäurederivate wurden in situ auf die Filterpapiere gegeben, wo die Aminosäure mit dem Säureende angekoppelt wurde. Zur Vorbereitung der Ankopplung der zweiten und der weiteren Aminosäuren wurde die Fmoc-Gruppe der letzten angekoppelten Aminosäure mit einer - bevorzugt - 20 %igen Lösung von Piperidin in DMF abgespalten. Anschließend erfolgte dann die Ankopplung der nächsten Fmoc-geschützten Aminosäure, die Amidbildung wurde durch den Bromphenolblau-Indikator (s. V. Krchnak i. a. Collect. Czech. Chem. Commun., 53, 2542 (1988)) überprüft und war nach 0,5 bis 2 Stunden vollständig.

Nach dem Abschluß der Peptid-Synthese erfolgte die TFA-geförderte Abtrennung des Peptids von dem Alkoxybenzylalkohol-Derivat. Dabei wurden auch die t-But-Gruppen für den Seitengruppenschutz abgetrennt. Bevorzugt wurde hierfür ein TFA/Anisol/Dichlormethan-Gemisch verwendet, dessen optimale Zusammensetzung 55 Volum-% TFA, 5 Volum-% Anisol und 40 Volum-% Dichlormethan war.

ERSATZBLATT

- 11 -

Die abgespaltenen Rohpeptide wurden mit Ether extrahiert und anschließend lyophilisiert. Die Ausbeute betrug 43 mg für hPTH(1-35) und 34 mg für hPTH(1-36). Das so hergestellte Rohpeptid wurde durch präparative RP-Chromatographie - bevorzugt - an C4-Kieselgel gereinigt.

Beispiel 3

Bestimmung der Wirkung verschiedener PTH-Fragmente auf die Ca-Retention bei Ratten

Die Messung der Ca-Bilanz bei wachsenden Ratten ist ein geeignetes Modell, die Wirksamkeit einer systemisch verabreichten Substanz auf den Knochenstoffwechsel in vivo zu testen. Bei der Ca-Bilanz werden die Ca-Ströme in und aus dem Körper gemessen und daraus die Ca-Retention (Bilanz) berechnet. Dabei wird berücksichtigt, daß der Knochen ca. 99 % des Körpercalciums speichert, während der Plasmacalciumspiegel konstant bleibt. Die aus der Nahrung im Körper zurückbehaltende Calciummenge kann daher als proportional zum Zuwachs an Knochenmasse angesehen werden.

Als Versuchstiere für die Untersuchungen dienten männliche CD-Ratten, die zu Versuchsbeginn 10 Wochen alt waren und 250 - 300 g wogen. Die Versuchstiere wurden in handelsüblichen Stoffwechselkäfigen einzeln gehalten. In den Stoffwechselkäfigen erfolgte eine automatische Trennung von Fäzes und Urin. Beide Fraktionen wurden in Auffangbehältern quantitativ gesammelt und konnten getrennt voneinander analysiert werden.

Als Futter diente eine Standarddiät für Ratten von mehlförmiger Konsistenz, das mit Aqua dest. im Verhältnis 1:1

- 12 -

(W/W) angeteigt wurde. Die täglich verabreichte Futtermenge wurde im Sinne eines sogenannten "group feedings" dem Futterbedarf der Tiere so angepaßt, daß sie von allen Tieren vollständig gefressen wurden. Die tägliche Futterrationsration betrug 20 g (Naßfutter). Aqua dest. wurde den Tieren ad libitum angeboten.

Alle Testsubstanzen wurden täglich in äquimolaren Dosen (entsprechend $40 \text{ g hPTH (1-34)} \times \text{kg}^{-1} \times \text{Tag}^{-1}$) subkutan über 10 Tage injiziert. Davon dienten die ersten 7 Tage zur Adaptation der Tiere, während die Messung der Ca-Bilanz während der letzten 3 Tage stattfand.

Der Ca-Intake wurde über die Menge aufgenommenen Futters und dem experimentell bestimmten Ca-Gehalt des Futters berechnet. Dazu wurde von der Futtercharge eines jeden Tages ein Aliquot bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und aus dem Vergleich von Naß- und Trockengewicht der Wassergehalt bestimmt. Anschließend wurden 2 x 500 mg des getrockneten Futters mit einem Labormikrowellengerät in konz. Säuren wie folgt aufgeschlossen: Zu 500 mg getrocknetem Futter wurden nacheinander 3 ml HNO_3 (konz.), 1 ml HCl (konz.) und 1 ml H_2O_2 (30 %) pipettiert. Nach dem Abklingen der spontanen Oxidationsreaktion (Aufschäumen) erfolgt der Aufschluß druckgesteuert in abgeschlossenen Aufschlußbehältern aus Teflon PFA. Dabei wurden nacheinander folgende Druck-/Zeitstufen durchlaufen: 40 psi (276 kPa), 5 min; 80 psi (552 kPa), 5 min; 150 psi (1.035 kPa); 10 min. Dem abgekühlten Aufschluß wurden nochmals 2 ml H_2O_2 (30 %) zugegeben, um die Vollständigkeit der Aufschlußreaktion zu überprüfen (kein Aufschäumen mehr). Der Aufschluß wurde mit einer 1 %igen Lanthannitratlösung (V/V in 0,3 %iger HCl) ad 100 ml aufgefüllt. Zur Messung des Ca-Gehaltes am Flammen-Atomabsorptionsspektrometer (AAS) wurden die Proben nochmals 1:100 mit 1 %iger Lanthannitratlösung verdünnt werden. Aus der aufgenommenen Futtermenge und dem

- 13 -

gemessenen Wasser- und Ca-Gehalt wurde dann der Ca-Intake berechnet.

Der Ca-Verlust über die Fäzes wurde analog zum Ca-Intake ermittelt: Bestimmung des Wassergehaltes, saurer Aufschluß im Mikrowellengerät unter gleichen Bedingungen und anschließende Messung des Ca-Gehaltes am AAS.

Im Sammelbehälter für den Urin wurde 2 ml 10 %ige HCl vorgelegt, um einer Ausfällung von Urat vorzubeugen. Nach Versuchsende wurde das Urinvolumen durch Wägung bestimmt und anschließend ein Aliquot davon mit 1 %iger Lanthannitrat Lösung (V/V in 0,3 %iger HCl) im Verhältnis 1:100 verdünnt. Die Bestimmung des Ca-Gehaltes der Proben erfolgte am AAS.

Ergebnis:

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben:

Tab. 1: Ca-Retention (mg pro Tag)

Substanz	Mittelwert	+/- SD	% Zunahme
Kontrolle	49,5	5,32	0
hPTH (1-34)	91,8	10,25	85
hPTH (1-35)	108,6	9,21	119
hPTH (1-36)	110,5	11,44	123
hPTH (1-37)	96,0	7,69	94
hPTH (1-38)	91,8	9,68	85

Bewertung:

Überraschenderweise wurde gefunden, daß die Parathormonfragmente mit einer Kettenlänge von 35 oder 36 Aminosäuren - entsprechend den Peptidsequenzen PTH (1-35) und PTH (1-36) zu

- 14 -

einer höheren Ca-Retention und deutlicher ausgeprägten Einbauraten von Calcium in den Knochen führen, als die aus dem Stand der Technik bekannten Peptide hPTH (1-n) mit n=34,37,38. Eine gesteigerte Ca-Retention wurde auch gefunden, wenn die Peptide N-terminal um eine Aminosäure verkürzt waren.

Beispiel 4

Mitogenität an Sterna-Organkulturen

In Organkulturen aus Sterna wurde die Mitogenität der neuen Fragmente geprüft und festgestellt, daß diese Aktivität stärker ausgeprägt ist als bei den bekannten Fragmenten hPTH(1-34) und hPTH(1-38) (vgl. Tab. 2).

Tab. 2: Mitogenität an Sterna-Organkulturen

	n	E/C +/- SEM
Kontrolle	4	1.00 +/- 0.13
hPTH(1-34)	4	2.94 +/- 0.38
hPTH(1-35)	4	3.13 +/- 0.57
hPTH(1-36)	4	3.37 +/- 0.58
hPTH(1-38)	4	2.96 +/- 0.30

Beispiel 4

DNA-Syntheseleistung an ROS 17/2.8-Zellen

An ROS 17/2.8-Zellen wurde die DNA-Syntheseleistung gemessen. Überraschend wurde die Syntheseleistung durch das Fragment PTH(1-35) stärker gesteigert als durch andere Fragmente (vgl. Tab. 3).

Tab. 3: DNA-Synthese hPTH(1-X), 100 nM, ROS/2.8 Zellen

X	n	[³ H]Thymidin-Einbau (cpm)	E/C
(Basalwert)	4	663 ± 49	1.0 ± 0.07
34	5	2.148 ± 289	3.2 ± 0.44
35	6	2.686 ± 282	4.1 ± 0.43
36	6	2.136 ± 246	3.2 ± 0.37
37	6	2.021 ± 251	3.1 ± 0.38

Die Induktion durch hPTH(1-35), hPTH(1-36) und hPTH(1-37) mit p<0.001 gegenüber der Basalrate erhöht, 1-34 mit p<0.01.

Beispiel 5

cAMP-Stimulation

In Organkulturen aus *Sterna* sowie an Membranfraktionen aus Schwienenieren wurde die Induktion der cAMP-Bildung durch verschiedene PTH-Peptide gemessen. Überraschend nimmt diese Aktivität für die Fragmente PTH(1-35) und PTH(1-36) ab verglichen mit PTH(1-34) (vgl. Tab. 4 und Tab. 5). Dies ist von Bedeutung, da die katabolen, d.h. calciummobilisierenden Eigenschaften des PTH bekanntermaßen mit einer Steigerung des cAMP einhergehen (Schlüter et al. (1989), J.Biol.Chem. 264,19:11087-11092; Löwik et al., (1988), Calcif Tissue Int. 43:7-18). Diese Befunde sind plausibel und stützen deshalb die o.g. Befunde, die eine Zunahme der anabolen Eigenschaften des Peptids bei einer Kettelänge zwischen 35 und 36 Aminosäuren zeigen.

Tab. 4: cAMP-Stimulation an Sterna-Organkulturen
100 nM Induktor

	n	pMol cAMP
Kontrolle	4	4.7
1-34	4	25.8
1-35	4	18.2
1-36	4	17.6

Tab. 5: cAMP-Stimulation an Schweinenierenmembran

	pMol cAMP/mg Protein \pm SEM
Basalsynthese	20.6 \pm 1.2
hPTH(1-34)	86.6 \pm 1.0
hPTH(1-35)	82.4 \pm 0.4
hPTH(1-36)	44.6 \pm 1.8
mit jeweils n=3 und p<0.001.	

Beispiel 6

DNA-Syntheseleistung an PTH-(3-X)-Fragmenten

Eine gesteigerte DNA-Syntheseleistung wurde an UMR 106 Zellen auch mit Fragmenten beobachtet, deren N-Terminus um zwei Aminosäuren verkürzt war. Ein Wirkungsmaximum lag wiederum vor, wenn die Kettenlänge zwischen 34 und 36 Aminosäuren lag (vgl. Tab. 6). Dieser Befund ist überraschend, da bekannt ist, daß eine Deletion der Aminosäuren +1 oder +1 und +2 zum Verlust der cAMP-Induktion führt, verbunden mit dem Verlust der calciummobilisierenden Eigenschaften des PTH. Eine anabole (mitogene) Aktivität von N-terminal verkürzten PTH-Fragmente ist bisher nicht beschrieben worden.

Tab. 6a: DNA-Synthese PTH(3-X), 100 nM, UMR 106 Zellen

X	n	[³ H]Thymidin-Einbau (cpm)	E/C
Basalwert	5	925 ± 48	1.0 ± 0.04
34	5	1.748 ± 150	1.9 ± 0.12
35	4	2.591 ± 115	2.8 ± 0.1
36	5	2.230 ± 172	2.4 ± 0.14
37	5	2.161 ± 74	2.3 ± 0.06
38	5	1.905 ± 159	2.1 ± 0.13

Alle Induktionen mit p<0.001 gegenüber der Basalrate erhöht.

Tab. 6b: DNA-Synthese PTH(3-X), 300 nM, UMR 106 Zellen

X	n	[³ H]Thymidin-Einbau	E/C
Basalwert	4	972 ± 32	1.0 ± 0.03
34	5	3.516 ± 297	3.6 ± 0.31
35	5	4.158 ± 213	4.3 ± 0.22
36	5	4.950 ± 401	5.1 ± 0.41
37	5	3.962 ± 268	4.1 ± 0.28
38	5	3.701 ± 414	3.8 ± 0.43

Alle Induktionen mit p<0.001 gegenüber der Basalrate erhöht.

Beispiel 7Synthese von PTH (1-35), PTH (1-35)-Z mit Z = NH₂, NH(C₂C₅)

Die Synthese der Peptide wurde nach der Festphasenmethode durchgeführt und zwar mit folgenden Schutzgruppen:

Schutzgruppen:

-Aminogruppen:	Fmoc
His (Im):	Trityl
Asp (COOH):	OtBu
Glu (COOH):	OtBu
Lys (-NH ₂):	BOC
Ser (OH):	tBu
Arg (Gua):	Pmc

Die Amid-Funktionen von Asn und Gln bleiben ungeschützt.

Beladung des Harzes:

25 g p-Benzyloxybenzylalkohol-Harz ("Alkoxy-Harz", Nova-biochem) wurden mit 13,5 g Fmoc-ValOH und 8,5 g DCC (41 mMol) in DMF/Dichlormethan (3:7) unter Zugabe von 0,5 g (3,9 mMol) 4-Dimethylaminopyridin beladen.

Nach Blockierung der überschüssigen freien OH-Gruppen am Harz mittels Benzoylchlorid/Pyridin und Waschen mit DMF, Isopropanol und Diisopropylether (2 Cyclen) und Trocknen erhielt man 32 g Fmoc-Val-Harz.

Nach Abspaltung der Schutzgruppe mit 20 % Piperidin in DMF ergab sich eine Beladung von 0,66 mMol/g (indirekte Bestimmung durch UV-Messung bei 300 nm in der Waschflüssigkeit über

die Abspaltungsprodukte [J. Maienhofer, C.D. Chang Int. J. Pept. Prot. Res 11, 246 (1978)].

Wasch- und Synthese-Cyclen:

1. DMF	2x5 Min.
2. Fmoc-Abspaltung 20 % Piperidin in DMF	10 Min.
3. Fmoc-Abspaltung 20 % Piperidin in DMF	20 Min.
4. Waschen DMF	4x5 Min.
5. Waschen 2-Propanol	2x5 Min.
6. Waschen DMF	2x5 Min.
7. Kupplung (Aminosäure und HOBt 2 eq)	5 Min.
8. Kupplung (DCC 2 eq)	60 Min.

Nach Schritt 5 wird die gesammelte Waschlösung jeweils zur Bestimmung der Beladung benutzt.

Der Kupplungserfolg wird qualitativ über den Ninhydrin-Test (Kaiser-Test) nach Entnahme einer kleinen Harzmenge getestet [E. Kaiser et al Anal. Biochem. 34, 595 (1970)]. Eine evtl. Kupplungswiederholung war bei der durchgeführten Synthese nicht nötig.

Abspaltung der Schutzgruppen und Abspaltung vom Harz

Am Ende der Synthese wurde der Ansatz in 3 Teile geteilt und diese gesondert aufgearbeitet.

a) hPTH (1-35), (Säure: PTH (1-35)-Z mit Z = COOH)

Die Abspaltung der Schutzgruppen und die Abspaltung vom Harz erfolgte in einem Schritt mittels Trifluoressigsäure/Phenol/Wasser/Thioanisol/Ethandithiol (16,5:1:1:1:0,5).

- 20 -

b) hPTH (1-35)-Amid, (PTH (1-35)-Z mit Z = CONH₂)

Dieses wurde durch Behandlung des Peptidharzes mit NH₃ in DMF (1:1) und anschließender Schutzgruppenabspaltung wie oben erhalten.

c) hPTH (1-35)-Ethylamid (PTH(1-35)-Z mit Z = CONH C₂C₅)

Dieses wurde durch Behandlung des Peptidharzes mit 70 %igem wässrigem Ethylamin und anschließender Schutzgruppenabspaltung wie oben erhalten.

Nach Einengen im Vakuum wurde jeweils mit absolutem Ether gefällt. Die Roh-Peptide zeigten bei der HPLC-Analyse einen Gehalt an Endprodukt von 35 % (Säure und Ethylamid) bzw. 30 % (Amid) (Flächenprozent).

Analyse der Fragmente a) - c):

HPLC-System: Gradient aus A (Wasser, 0,1 % an TFA) und B (Wasser 35/Acetonitril 65, 0,1 %ig an TFA). Start mit 100 % A linear in 40 Min auf 100 % B. Säule Hypersil ODS 5 250 x 4,6 mm.

Die präparative Aufreinigung erfolgte unter analogen Bedingungen mittels präparativer HPLC (Nova-Prep, Merck).

Man erhielt 2,7 g hPTH (1-35) Säure, 2,6 g hPTH (1-35)-Ethylamid und 2,1 g hPTH (1-35)-Amid. Reinheit lt. HPLC >95%.

Patentansprüche

1. bPTH-, pPTH- oder hPTH-Modifikation, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Peptidsequenz von bPTH(3-35), pPTH(3-35) oder hPTH(3-35) umfassen und am C-terminalen Ende gegebenenfalls um eine Aminosäure und am N-terminalen Ende gegebenenfalls um eine oder zwei Aminosäuren verlängert sind.
2. PTH-Modifikationen gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptidsequenz eine Gesamtlänge von 33 bis 36 Aminosäuren besitzt.
3. PTH-Modifikation gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das N-terminale Ende um eine Aminosäure, insbesondere Val, verlängert ist.
4. PTH-Modifikationen gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das N-terminale Ende um zwei Aminosäuren, insbesondere Ser(+1)-Val(+2), verlängert ist.
5. PTH-Modifikationen gemäß den Ansprüchen 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß das C-terminale Ende um eine Aminosäure, insbesondere Ala(+36), verlängert ist.
6. PTH-Modifikation gemäß den Ansprüchen 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß die C-terminale Carboxygruppe amidiert ist und eine Gruppe der Formel $-\text{CONR}^1\text{R}^2$ darstellt, wobei R^1 und R^2 gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine C_1 - C_6 -Alkylgruppe bedeuten.

- 22 -

7. PTH-Modifikation gemäß einem der Ansprüche 1-6, gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz

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-Val-Z

mit $Z = -\text{CONR}^1\text{R}^2$, wobei R^1 und R^2 gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine C_1 - C_6 -Alkylgruppe bedeuten können.

8. PTH-Modifikation gemäß einem der Ansprüche 1-6, gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz

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-Val-Ala-Z

mit $Z = -\text{CONR}^1\text{R}^2$, wobei R^1 und R^2 gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine C_1 - C_6 -Alkylgruppe bedeuten können.

9. PTH-Modifikationen gemäß den Ansprüchen 1-6 ausgewählt aus der Gruppe umfassend die Peptidsequenzen PTH(3-35), PTH(3-36), PTH(2-35), PTH(2-36), PTH(1-35) und PTH(1-36), sowie deren am C-terminalen Ende modifizierte Carboxygruppe

$-\text{CONR}^1\text{R}^2$, wobei R^1 und R^2 gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine C_1 - C_6 -Alkylgruppe bedeuten können, sowie deren physiologisch verträglichen Salze#

10. PTH-Modifikationen gemäß den Ansprüchen 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß es hPTH-Modifikationen sind.

11. Verfahren zur Herstellung von PTH-Modifikationen gemäß den Ansprüchen 1-10, dadurch gekennzeichnet, daß man die Fragmente nach der Festphasen- und Flüssigphasen-Synthese aus teilweise blockierten, in den Fragmenten enthaltenden Aminosäuren herstellt, die in den Reihenfolgen aneinander gekoppelt werden, welche den Aminosäuresequenzen in den Fragmenten entsprechen.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die synthetisierten PTH-Fragmente mit an sich bekannten Chromatographieverfahren gereinigt werden.
13. Arzneimittel enthaltend PTH-Modifikationen gemäß den Ansprüchen 1-10 als aktiven Wirkstoff neben üblichen Hilfs- und Zusatzstoffen.
14. Arzneimittel gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff in Mengen von 300 Mikrogramm bis zu 30 Milligramm pro Therapie-Einheit enthalten ist.
15. Arzneimittel gemäß Anspruch 13 oder 14 mit calciumregulierender Wirkung.
16. Arzneimittel gemäß Anspruch 13 oder 14, das den Einbau von Calcium in die Knochen fördert.