



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETA' INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101982900001297
Data Deposito	22/12/1982
Data Pubblicazione	22/06/1984

Priorità	5763/81
Nazione Priorità	DK
Data Deposito Priorità	23-DEC-81

Titolo

USO DI PEPTIDI COME MEDICAMENTI

**DOCUMENTAZIONE
RILEGATA**

STAMPATI

1080 M DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:

"USO DI PEPTIDI COME MEDICAMENTI"

a nome: NOVO INDUSTRI A/S

a : Novo Allé

2880 BAGSVAERD (DANIMARCA)

Descrizione modificata
(art. 49 D.P.R. n. 338/1979)
istanza dep. il 5.1.1983



00035

di nazionalità danese ed elettivamente domiciliata a tutti gli

effetti di legge presso il mandatario Studio Consulenza Brevet

tuale - Via Senato n.24 - Milano

Inventore designato: Karin Damm Jørgensen

Depositata il 22 dicembre 1982 al no. 24915 A/82

RIASSUNTO

Alcuni derivati di glucagone, contenenti il frammento glucagone
nico His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-
Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp- connesso al gruppo idrossi o a
una delle catene peptidiche -Phe-Val-Gln-Trp-Leu o -Met-Asn-
Thr o una delle ultime due catene peptidiche, in cui uno o più
amino acidi sono stati omessi, hanno un effetto di rilascio
dell'insulina in condizioni di iperglicemia.

DESCRIZIONE

La presente invenzione si riferisce all'uso di peptidi della
formula generale



in cui R' rappresenta His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-

- Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-, e R" rappresenta OH, la catena peptidica -Phe-Val-Gln-Trp-Leu o -Met-Asn-Thr o una corrispondente catena peptidica o di amino acido, identica a una delle ultime due catene peptidiche menzionate, con l'eccezione che un amino acido o più amino acidi sono stati omessi, o sali di essi, come agenti rilascianti l'insulina.

Come esempi di "corrispondente catena peptidica o di amino acido, identica a una delle ultime due catene peptidiche menzionate, con l'eccezione che uno o più amino acidi sono stati omessi" di cui sopra, possono essere menzionate -Val-Trp e -Met-Asn.

Il glucagone, un ormone polipeptidico costituito da 29 amino acidi, è noto possedere molti effetti farmacologici quali un effetto spasmolitico sulla muscolatura liscia, un effetto inibitore sulla secrezione acida gastrica, ed effetti metabolici, per esempio un effetto rilasciante l'insulina.

E' noto che il glucagone rilascia insulina da pancreas di ratto isolato e perfuso. E' stato ora trovato che il glucagone(1-21) non ha tale effetto, quando viene infuso, alla stessa concentrazione del glucagone, a condizione che la concentrazione di glucosio del tampone sia 0,6 mg/ml, corrispondente a ipoglicemia. Inoltre, è stato ora trovato che il glucagone(1-21) - al contrario del glucagone - non provoca iperglicemia o rilascio di insulina in vivo in ratti normalmente alimentati. Tuttavia, è stato sorprendentemente trovato che il glucagone(1-21) possiede circa l'85% del-

l'effetto di rilascio della IRI (immunoreactive insulin, cioè inulina immunoreattiva) del glucagone, nel modello di pancreas di ratto perfuso, quando la concentrazione di glucosio del tampone è 2,0 mg/ml, corrispondente a iperglicemia, e il 60% circa dell'effetto di rilascio della IRI del glucagone quando la concentrazione di glucosio del tampone è 1,5 mg/ml, corrispondente a moderata iperglicemia. Studi su ratti e maiali caricati con glucosio, hanno ora mostrato che il glucagone(1-21), infuso per via endovenosa, aumenta la tolleranza al glucosio, vedi esperimenti da A a C più avanti. Poichè il glucagone(1-21) possiede l'effetto di rilascio della IRI del glucagone, in presenza di iperglicemia, sebbene al tempo stesso privo degli effetti glucogenolitici e gluconeogenetici del glucagone, esso può essere utilizzato nel trattamento di diabetici con residua funzione delle cellule beta. Un tale uso dovrebbe essere specialmente sicuro poichè durante il trattamento non si verifica ipoglicemia, a causa della mancanza dell'effetto di rilascio della IRI in presenza di ipoglicemia e di normoglicemia. Quando il glucagone(1-21) viene infuso in ratti e maiali con livelli di glucosio del plasma inferiori a 1,2 mg/ml, esso non rilascerà IRI nè influenzerà i livelli di glucosio nel plasma, vedi esperimento D più avanti.

In *Diabetes* 21 (1972), 843, è stato asserito nel sommario che la struttura necessaria per l'azione insulinogenica è localizzata entro la sequenza di amino acidi 24-29 nel glucagone. Al contrario è stato ora sorprendentemente trovato che la struttura per l'azione insulinogenica è nella sequenza di amino acidi 1-21, purchè sia presente

iperglicemia.

Inoltre, è stato sorprendentemente trovato che il glucagone(1-26) e il des(22-26)glucagone possiedono un effetto di rilascio dell'insulina nel modello di pancreas di ratto perfuso, quando la concentrazione di glucosio del tampone è 2,0 mg/ml.

Ci si dovrebbe aspettare che tutti i composti di formula I avessero un effetto di rilascio dell'insulina in caso di iperglicemia poichè il glucagone, il glucagone(1-26), il des(22-26)glucagone e il glucagone(1-21) hanno questo effetto. Tuttavia, contrariamente al glucagone(1-21), il glucagone ha anche un effetto di rilascio dell'insulina in presenza di normoglicemia e di ipoglicemia.

Nella domanda di brevetto danese No. 2885/81 è stato affermato che i composti di formula I possiedono effetto spasmolitico e un effetto inibitore sulla secrezione acida gastrica. Inoltre, è stato asserito che questi composti di formula I mostrano effetti metabolici minori e di secondaria importanza o addirittura nulli. L'asserzione in detta domanda di brevetto danese, che il glucagone(1-21) non rilascia insulina dal pancreas di ratto isolato e perfuso, può essere applicata se la concentrazione di glucosio del tampone è di 1,0 mg/ml, corrispondente a normoglicemia, o se al di sotto di questa concentrazione. In base a ciò, è sorprendente che i composti di formula I abbiano un effetto di rilascio dell'insulina su animali caricati con glucosio corrispondente a iperglicemia.

Gli effetti metabolici del glucagone(1-21), del glucagone(1-26) e del des(22-26)glucagone, come spiegati dal loro effetto lipoli



tico su cellule grasse libere di ratto, in vitro, e dal loro effetto sull'attivazione della adenilciclasi in vitro, sono di secondaria importanza paragonati agli effetti metabolici del glucagone. Non sono stati trovati effetti metabolici dopo somministrazione in vivo a ratti tenuti a digiuno o alimentati secondo le tecniche usuali.

Per cui, i composti di formula I o i loro sali possono essere utilizzati come agenti di rilascio di insulina. I composti di formula I o i loro sali sono quindi utili per il trattamento di diabetici, per esempio, di quelli con funzione residua di cellule beta. Il fatto che i composti di formula I mostrino anche effetto spasmolitico ed effetto inibitore sulla secrezione acida gastrica, non ne precluderà l'uso come agenti di rilascio dell'insulina in molti, se non in tutti i casi. Al contrario, la combinazione degli effetti potrà provocare un vantaggio, per esempio, nei diabetici di tipo 2.

Come esempi specifici possono essere menzionati i composti noti di formula I: glucagone(1-21), glucagone(1-23), glucagone(1-25), glucagone(1-26) e des(22-26)glucagone. I rimanenti composti di formula I e i loro sali possono essere preparati mediante metodi che, generalmente, sono noti nella sintesi peptidica, e in relazione a ciò si fa riferimento, per esempio, a: domanda di brevetto danese No. 2885/81; Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 362 (1981), 665 - 677; Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl), Ed.: Müller, Vol. XV/1 + 2, G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1974; The Pep

tides Ed.: Gross and Meienhofer, Vol. 1 - 4, Academic Press, 1981 and Appl.Biochem.Biotech. 7 (1982), 385 e seguenti.

I composti di formula I vengono convertiti in preparazioni farmaceutiche e somministrati, preferibilmente a esseri umani, in analogia con metodi noti.

I composti di formula I e loro sali possono essere somministrati per via endovenosa, intramuscolare o sottocutanea, a dosi nell'intervallo di circa 1-1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di peso corporeo, preferibilmente di circa 10-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di peso corporeo, sebbene possa essere somministrata una dose inferiore o superiore. Il dosaggio richiesto dipenderà dalla gravità delle condizioni del paziente e dal numero di somministrazioni giornaliere. Inoltre, i composti di formula I e i loro sali possono essere somministrati per via nasale o rettale. I composti di formula I devono essere possibilmente somministrati per via orale, per esempio mediante l'uso di speciali additivi. Allo scopo di somministrazione parenterale, i composti di formula I possono essere sciolti in acqua distillata e il valore del pH, se desiderato, può essere regolato con un tampone adatto, così da essere nell'intervallo tra circa 6 e 8. Inoltre, la soluzione può essere regolata all'isotonicità, per esempio mediante aggiunta di cloruro di sodio allo 0,9% circa. Per facilitare il procedimento di liofilizzazione che si risolve in un prodotto facilmente utilizzabile, alla soluzione può essere aggiunto, per esempio, il lattosio. Dopo di che, la soluzione può essere filtrata sterilmente e posta in fiale. Quindi, le soluzioni possono essere liofilizzate

e le fiale possono essere sigillate in condizioni asettiche.

Possono essere impiegati altri metodi farmaceutici per controllare la durata dell'azione. Preparazioni a rilascio controllato possono essere ottenute mediante l'uso di polimeri per complessare o adsorbire i composti di formula I. Il rilascio controllato può essere esercitato selezionando macromolecole appropriate (per esempio poliesteri, poliaminoacidi, polivinilpirrolidone, etilenvinilacetato, metilcellulosa, carbossimetilcellulosa e solfato di protamina) e la concentrazione di macromolecole come pure i metodi di incorporazione per controllare il rilascio del farmaco. Inoltre, mediante somministrazione parenterale di una sospensione dei composti in forma di cristalli o di aggregati, è possibile ottenere un'azione di durata più lunga di quella ottenuta con una soluzione acquosa, poichè i composti vengono sciolti in modo continuo, processo, questo, che può essere controllato da fattori ben noti (per esempio forma dei cristalli, tipo degli aggregati e area superficiale). Un altro metodo possibile per controllare la durata dell'azione mediante preparazioni a rilascio controllato, è di incorporare i composti di formula I in particelle di un materiale polimerico in forma di matrice o di sistemi bioerosibili, per esempio, il glucagone(1-21) in poliesteri, poliaminoacidi, idrogels, poli (acido lattico) o copolimero etilene-vinilacetato. Anzichè incorporare i composti in particelle polimeriche, è possibile intrappolare i composti di formula I in microcapsule preparate, per esempio, con tecniche di coacervazione o per polimerizzazione interfacciale, per esempio, mi-

microcapsule di idrossietilcellulosa o di gelatina e rispettivamente microcapsule di poli(metilmetacrilato), o in sistemi colloidali di alimentazione del farmaco, per esempio liposomi, microsfeere di albumina, microemulsioni, nanoparticelle e nanocapsule, o in macroemulsioni. Un altro meccanismo per ottenere preparazioni ritardate è attraverso l'uso di soluzioni oleose biologicamente accettabili

(per esempio olio di viscoleo e olio di arachide) in cui il rilascio del farmaco è controllato dalla ripartizione del farmaco al di fuori dell'olio nel mezzo acquoso circostante. Inoltre è possibile utilizzare una sospensione oleosa che combina i principi coinvolti in sospensioni acquose e soluzioni oleose.

Allo scopo di somministrazione nasale, viene utilizzata una soluzione in un dispositivo di spray nasale o in un nebulizzatore. I composti di formula I vengono sciolti in acqua distillata e il valore del pH viene regolato così da essere nell'intervallo tra circa 6 e 8, per esempio, con aggiunta di fosfato sodico e di acido citrico come tampone. Possono essere utilizzati cloruro sodico, sorbitolo e glicerolo per ottenere una soluzione isotonica con una viscosità adatta. La soluzione può essere somministrata mediante l'uso di un nebulizzatore adatto o di uno spray di plastica. La soluzione può essere conservata utilizzando conservanti noti, per esempio metil o propil p-idrossibenzoati. Per favorire l'efficacia possono servire come esempi di acceleratori di assorbimento un tensioattivo, per esempio esteri di poliossietilene, acidi grassi o derivati di enamina, per esempio N-(1-metil-2-etossicarbonilvinil)-



D-fenilglicina. Al fine della somministrazione nasale con l'uso di una dose spray aerosol, un composto di formula I viene miscelato con costituenti adatti e con una miscela di alogenocarboni, per esempio monofluorotriclorometano, difluorodichlorometano e tetrafluorodichloroetano, per ottenere una miscela con una pressione di vapore che produca una dose singola ben definita, quando la mi

scela viene somministrata per l'uso di una dose spray aerosol.

Per somministrazione nasale i composti di formula I sono usati preferibilmente in un intervallo di dosaggio tra circa 0,1 e 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di peso corporeo, preferibilmente tra 1 e 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di peso corporeo per dose singola. Questa dose potrà essere somministrata molte volte al giorno.

Al fine della somministrazione per via rettale, vengono prodotte supposte per miscelazione di un composto di formula I con un costituente inattivo, come burro di cacao, o con una base come Polisorbato 85, propilene glicol monostearato e cera bianca d'api. Tensioattivi e/o derivati di enamine possono servire come esempi di promotori d'assorbimento.

Una sottoclasse preferita di composti di formula I è costituita da composti in cui la sequenza amino acidica è identica a una parte continua della sequenza amino acidica del glucagone. Come esempi di composti specifici di formula I, possono essere menzionati i composti in cui R" è Phe, Val, Gln, Trp, Leu, Met, Asn o Thr. Un composto preferito di formula I è il glucagone(1-21) poichè mostra proprietà farmacologiche superiori e poichè può essere ottenuto fa

cilmente, per esempio, dal glucagone naturale. Come esempi di sali di composti di formula I possono essere citati i sali di sodio, potassio, magnesio, calcio e zinco e i sali di addizione con acidi organici o inorganici, come l'acido formico. Sali preferiti dei composti di formula I sono i sali fisiologicamente e farmaceuticamente accettabili.

La presente invenzione si riferisce anche a una composizione farmaceutica comprendente un composto di formula I o un sale di esso e uno o più veicoli farmaceuticamente accettabili, diluenti, preferibilmente acqua, e/o eccipienti, quando utilizzata come farmaco rilasciante insulina. Come esempi di tali veicoli convenzionali possono essere citati i conservanti, per esempio metil o propil p-idrosibenzoato, e cloruro di sodio.

Qualunque nuova caratteristica o combinazione di caratteristiche qui descritte è considerata essenziale.

Le abbreviazioni di tre lettere per gli amino acidi, qui utilizzate, sono stabilite in J. Biol. Chem. 243 (1968), 3558. Per brevità, il glucagone-(1-21)-eneicosapeptide qui è stato chiamato glucagone-(1-21), e analogamente, questo avviene per il glucagone(1-23), per il glucagone(1-25) e per il glucagone(1-26). Inoltre, il des-pentapeptide-(22-26)-glucagone è stato chiamato des(22-26)glucagone.

Il seguente esempio, che non viene tuttavia considerato limitativo, è presentato per illustrare l'invenzione.

ESEMPIO

Una preparazione per somministrazione parenterale, contenente 1

.mg di glucagone(1-21) per ml, può essere preparata come segue:
1 g di glucagone(1-21) e 99 g di lattosio sono sciolti in un litro d'acqua distillata e il valore del pH viene regolato a 7,0. La soluzione viene poi sottoposta a filtrazione sterilizzante. La soluzione sterile viene posta in 10 fiale in modo tale che ogni fiala contenga 1,0 ml della soluzione. Le soluzioni vengono poi

liofilizzate e le fiale vengono sigillate in condizioni aseptiche.

La preparazione in ciascuna delle fiale deve essere sciolta in 1,0 ml di acqua sterile prima della somministrazione.

Ulteriori esempi di preparazione di preparati contenenti glucagone-(1-21) sono descritti nella domanda di brevetto danese No. 2885/81. Preparazioni contenenti altri composti di formula I sono ottenute in modo analogo.

ESPERIMENTO A:

Effetto sul rilascio-IRI in ratti in vivo.

10 ratti maschi, ceppo Wistar, 150 g (+/- 5 g) furono anestetizzati con Pentobarbitale. Cateteri di polietilene furono inseriti nella arteria carotide destra per il campionamento del sangue, e nella vena giugulare sinistra per le infusioni. I ratti furono divisi in due gruppi di cinque animali per ciascun gruppo. Un gruppo fu sottoposto a infusione con glucosio (1,5 mg/min) per 0-60 minuti (placebo) e un gruppo fu sottoposto a infusione con glucosio (1,5 mg/min) + glucagone(1-21) (100 µg/kg/h) per 0-60 minuti. Il sangue fu campionato in provette su ghiaccio contenenti eparina (250 UI/ml) e aprotinina (600 KUI/ml) ai tempi 0, 1, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minuti. L'in-

Insulina fu determinata mediante radioimmuno assay (RIA) sul plasma. I risultati sono riportati nella Tabella I qui sotto.

TABELLA I

	IRI, μ U/ml.								
Placebo	7	20	32	40	40	40	34	36	
Glucagone (1-21)	18	43	48	62	56	56	60	55	
Tempo, min	0	1	10	20	30	40	50	60	

ESPERIMENTO B:

Effetto sui livelli di glucosio plasmatico in ratti in vivo.

1. Somministrazione endovenosa.

Ratti maschi Wistar furono preparati come descritto nell'Esperimento A. Un gruppo di 5 ratti aveva una infusione endovenosa di glucosio (2 mg/min) per 0-30 minuti seguita da infusione di soluzione fisiologica dello 0,9% con lo 0,1% di HSA (human serum albumin, albumina di siero umana). Un gruppo di 5 ratti aveva un'infusione endovenosa di glucosio (2 mg/min) per 0-30 minuti, seguita da un'infusione di 1 mg di glucagone (1-21) in soluzione fisiologica con HSA per 30-60 minuti. Vennero prelevati campioni di sangue dall'arteria carotide ai tempi 0, 2, 5, 10, 20, 25, 30, 40, 50, e 60 minuti e i valori di glucosio ematico furono determinati mediante il metodo della esochinasi in un autoanalizzatore. I valori di glucosio ematico sono riportati nella Tabella II di sotto.

==

==

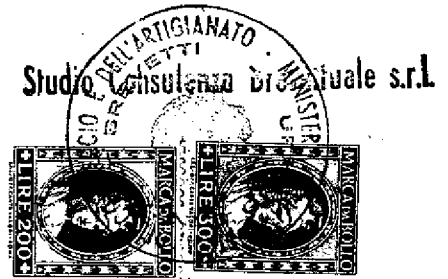


TABELLA II

	Glucosio ematico, mg/ml									
Placebo	0,9	1,1	1,3	1,4	1,7	1,8	1,8	1,5	1,3	1,2
Glucagone-(1-21)	1,0	1,2	1,4	1,5	1,7	1,9	1,9	1,3	1,0	0,8
Tempo, min	0	2	5	10	20	25	30	40	50	60

2. Somministrazione perorale di glucosio.

L'effetto del glucagone(1-21) fu studiato in ratti durante un test di tolleranza al glucosio orale. 20 ratti maschi Wistar furono divisi in 2 gruppi di 10 ratti e dosati come segue: entrambi i gruppi furono dosati con glucosio (5 g/kg, per via perorale) a 0 e 60 minuti. Il gruppo placebo fu dosato con 1 ml di soluzione fisiologica allo 0,9% con lo 0,1% di HSA, per via intraperitoneale, ai tempi 0, 30, 60 e 90 minuti. L'altro gruppo fu dosato con glucagone(1-21) (1 mg/kg) in soluzione fisiologica allo 0,9%, con HSA, ai tempi 0, 30, 60 e 90 minuti. Campioni di sangue furono prelevati dalle code ai tempi -5, 0, 15, 30, 45, 60, 90, e 120 minuti per la determinazione del glucosio ematico. I valori di glucosio ematico sono riportati nella Tabella III qui sotto.

TABELLA III

	Glucosio ematico, mg/ml								
Placebo	0,88	0,98	1,60	1,52	1,46	1,45	1,60	1,54	
Glucagone-(1-21)	0,89	0,96	1,32	1,35	1,23	1,36	1,37	1,37	
Tempo, min	-5	0	15	30	45	60	90	120	

ESPERIMENTO C:

Effetto sui livelli di glucosio ematico in maiali in vivo.

1. Somministrazione endovenosa.

L'effetto di glucagone(1-21) sui livelli di glucosio del plasma fu studiato durante una infusione endovenosa di glucosio. 4 maiali femmina (razza danese/Yorkshire) del peso di 30 kg (+/- 3 kg), furono dosati con glucosio (0,7 g/kg/h) sottoforma di infusione endovenosa, e con la stessa infusione di glucosio + infusione di glucagone(1-21) (100 µg/kg/h) per 0-120 minuti. L'esperimento venne effettuato come esperimento cross-over. I maiali furono sottoposti a infusione endovenosa con cateteri nell'orecchio, e vennero prelevati campioni di sangue dall'altro orecchio ai tempi 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 minuti. Il glucosio venne analizzato mediante il metodo della esochinasi e i valori di glucosio ematico sono riportati nella Tabella IV qui sotto.

TABELLA IV

	Glucosio del plasma, mg/ml									
Placebo	1,0	1,7	2,1	2,2	2,3	2,3	2,3	2,2	2,3	
Glucagone-(1-21) + glucosio	0,9	1,5	1,7	1,8	1,9	1,8	2,0	1,9	1,9	
Tempo, min	0	15	30	45	60	75	90	105	120	

2. Somministrazione perorale di glucosio.

L'effetto del glucagone(1-21) sui livelli di glucosio plasmatico, fu studiato durante una prova di tolleranza al glucosio orale in maiali. 4 maiali furono trattati in un esperimento cross-over, con glucosio

(5 g/kg) per via perorale a 0 e 60 minuti + placebo (soluzione fisiologica con HSA) o glucagone(1-21) (1 mg/kg/h) per 0-120 minuti, per via endovenosa. Campioni ematici furono prelevati da una vena dell'orecchio ai tempi -5, 10, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 105, e 120 minuti, il glucosio plasmatico fu saggiato mediante il metodo della esochinasi. I valori di glucosio plasmatico sono riportati nella

Tabella V qui sotto.

TABELLA V

	Glucosio plasmatico, mg/ml										
Placebo	0,8	1,3	1,8	2,2	2,5	2,5	2,7	2,8	2,7	2,4	
Glucagone-(1-21)	0,8	1,0	1,4	1,7	1,8	1,9	1,8	1,7	1,7	2,1	
Tempo, min	-5	10	20	30	45	60	75	90	105	120	

ESPERIMENTO D:

Studi dell'effetto del glucagone e del glucagone(1-21) sui livelli di glucosio plasmatico e di IRI plasmatica in ratti normoglicemici. Glucagone (1 mg/kg) e una dose equimolecolare di glucagone(1-21), cioè 0,77 mg/kg, furono iniettati per via endovenosa al tempo di partenza (tempo: 0 minuti) a ratti maschi Wistar normalmente alimentati, del peso di 150 g (+/- 5 g). Vennero presi campioni di sangue dal plesso orbitale ai tempi -5, 2, 5, 10, 15, 30, e 60 minuti. Il glucosio ematico fu saggiato in accordo con il metodo della esochinasi, e l'insulina plasmatica fu saggiata mediante RIA. Il glucagone aveva un effetto significativo di aumento sul glucosio ematico e sulla IRI plasmatica. Al contrario del glucagone, il glucagone(1-21)

. non ha effetto su questi parametri. Valori medi di glucosio ematico (N = 10) sono riportati nella Tabella VI qui sotto, e i valori medi di IRI plasmatica (N = 10) sono riportati nella Tabella VII più sotto.

TABELLA VI

	Glucosio ematico, mg/ml								
Glucagone	0,9	1,2	1,3	1,3	1,4	1,5	1,1		giorno-di-espe
Placebo	0,9	1,1	1,1	1,2	1,2	1,1	1,3		rimento 1
Glucagone(1-21)	1,0	1,1	1,1	1,2	1,3	1,3	1,3		giorno di espe
Placebo	1,0	1,2	1,2	1,3	1,3	1,3	1,3		rimento 2
Tempo, min	-5	2	5	10	15	30	60		

TABELLA VII

	IRI plasmatica μ U/ml								
Glucagone	19	95	98	82	67	53	17		giorno di espe
Placebo	17	25	28	23	20	22	25		rimento 1
Glucagone(1-21)	32	30	33	35	43	38	30		giorno di espe
Placebo	13	20	20	22	24	22	16		rimento 2
Tempo, min	-5	2	5	10	15	30	60		

ESPERIMENTO E:

Studio della tossicità acuta.

10 mg di glucagone(1-21), somministrati per via endovenosa come bolo a topolini NMRI del peso di circa 20 g (cioè una dose di circa 500 mg/kg di peso corporeo) non avevano effetti contrari. Non si verificarono morti.



RIVENDICAZIONI

1. Uso, come agente di rilascio dell'insulina, di composti di formula generale I



in cui R' rappresenta His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-, e R'' rappresenta idrossi

la catena peptidica ~~-Phe-Val-Gln-Trp-Leu o -Met-Asn-Thr o una corri-~~spondente catena peptidica o un amino acido, identica a una delle ultime due catene peptidiche menzionate, fatta eccezione che un amino acido o più amino acidi sono stati omessi, o sali di essi.

2. Uso secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che la sequenza amino acidica nel composto di formula I è identica alla sequenza in un frammento di glucagone.

3. Uso secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che R'' rappresenta Phe, Val, Gln, Trp, Leu, Met, Asn o Thr.

4. Uso secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che R'' rappresenta idrossi, -Phe-Val-Gln-Trp-Leu o -Met-Asn-Thr.

5. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1, 2, e 4, caratterizzato dal fatto che R'' rappresenta idrossi.

6. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che il composto di formula I è utilizzato per il trattamento di diabetici.

7. Uso secondo la rivendicazione 6, caratterizzato dal fatto che il composto di formula I viene utilizzato per il trattamento di diabetici con funzione residua delle cellule beta.

8. Uso secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, caratterizzato dal fatto che il composto di formula I è utilizzato in una quantità efficace.
9. Composizione farmaceutica che comprende una quantità efficace di un composto di formula I, in accordo con la rivendicazione 1, o un sale di esso, in associazione con un veicolo fisiologicamente accettabile adatto, con diluenti e/o eccipienti, quando utilizzato come farmaco di rilascio dell'insulina.
10. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 9, caratterizzata dal fatto che comprende tra 7,5 e 75.000 µg, preferibilmente tra 75 e 7500 µg, di un composto di formula I o di un sale di esso per unità di dosaggio.
11. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 9 o 10, caratterizzata dal fatto che contiene un composto di formula I, in cui la sequenza di amino acidi è identica alla sequenza in un frammento di glucagone.
12. Composizione farmaceutica secondo le rivendicazioni 9 o 10, caratterizzata dal fatto che contiene un composto di formula I, in cui R" rappresenta Phe, Val, Gln, Trp, Leu, Met, Asn, o Thr.
13. Composizione farmaceutica secondo le rivendicazioni 9 o 10, caratterizzata dal fatto che contiene un composto di formula I, in cui R" rappresenta idrossi, -Phe-Val-Gln-Trp-Leu o -Met-Asn-Thr.
14. Composizione farmaceutica secondo le rivendicazioni 9, 10 o 13, caratterizzata dal fatto che contiene un composto di formula I, in cui R" è idrossi.

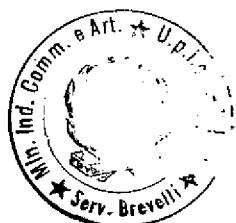
15. Uso di composti di formula I, specificati nella rivendicazione 1, preferibilmente dei composti utilizzati secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 2 a 5, o di un sale di essi, per la preparazione di farmaci aventi un effetto di rilascio dell'insulina.
16. Composto di formula I specificato nella rivendicazione 1, preferibilmente i composti utilizzati secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 2 a 5, per l'uso come agente rilasciante l'insulina.
17. Un agente di rilascio di insulina caratterizzato dal fatto che comprende un composto di formula I, specificato nella rivendicazione 1, preferibilmente i composti utilizzati in accordo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 2 a 5.
18. Uso di un composto di formula I, specificato nella rivendicazione 1, preferibilmente dei composti utilizzati in accordo con una qualsiasi delle rivendicazioni da 2 a 5, per il trattamento di persone aventi normalmente una produzione troppo bassa di insulina.
19. Metodo per il trattamento o per la prevenzione dell'iperglicemia, caratterizzato dal fatto che si somministra, allo scopo di rilasciare insulina, un composto di formula I stabilito nella rivendicazione 1, preferibilmente i composti utilizzati in accordo con una qualsiasi delle rivendicazioni da 2 a 5.
20. Qualunque nuova caratteristica o combinazione di caratteristiche che qui descritte.

Milano, 22 dicembre 1982

Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.

Marina Bianchetti

l'Ufficiale Rogante
(G. Russo)



[Handwritten signature]

RIASSUNTO

USO DI PEPTIDI COME MEDICAMENTI E CERTI NUOVI PEPTIDI

Certi peptidi contenenti la catena peptidica His-Ser-
-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-
-Arg-Ala-Gln-Asp hanno un effetto di rilascio dell'insulina.

NOVO

La presente invenzione si riferisce all'uso di peptidi

della formula generale



in cui R' rappresenta His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-
5 10

Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-, e R'' rappresenta
15 20

OH, la catena peptidica -Phe-Val-Gln-Trp-Leu o -Met-Asn-Thr o

una corrispondente catena peptidica o di aminoacido, identica alle
ultime due catene peptidiche menzionate, con l'eccezione che un amino-
acido o più amino acidi sono stati omessi, o sali di essi..

I composti di formula I mostrano un effetto
rilasciante l'insulina.

Il glucagone, un ormone polipetidico costituito da 29 amino aci
di, è noto possedere molti effetti farmacologici quali un effetto
spasmolitico sulla muscolatura liscia, un effetto inibitore sulla
secrezione acida gastrica, ed effetti metabolici, per esempio un
effetto rilasciante l'insulina.

E' stato dimostrato che il glucagone rilascia insulina da pan
creas di ratto isolato e perfuso, ma il glucagone¹⁻²¹ non ha tale

effetto, quando viene infuso, alla stessa concentrazione del glucagone, a condizione che la concentrazione di glucosio del tampone sia 0,6 mg/ml di glucosio. Inoltre, il glucagone 1-21, al contrario del glucagone, non provoca iperglicemia o rilascio di insulina in vivo in ratti normalmente tenuti a digiuno e alimentati. Tuttavia, è stato sorprendentemente trovato che il glucagone 1-21 possiede circa l'85% dell'effetto di rilascio della IRI (immunoreactive insulin, cioè insulina immunoreattiva) del glucagone, nel modelli di pancreas di ratto perfuso, quando la concentrazione di glucosio del tampone è 2,0 mg/ml e il 60% circa dell'effetto di rilascio della IRI del glucagone quando la concentrazione di glucosio del tampone è 1,5 mg/ml di glucosio. Studi preliminari su maiali caricati con glucosio, hanno mostrato 100 µg/kg/h di glucagone 1-21, infuso per via endovenosa, aumenta la tolleranza al glucosio 1-21. Poichè il glucagone 1-21 possiede l'effetto di rilascio della IRI del glucagone, in presenza di iperglicemia, così come il farmaco è privo di effetti glucogenolitici e gluconeogenetici del glucagone, il farmaco può essere utilizzato nel trattamento di diabetici con residua funzione delle cellule beta. Il farmaco dovrebbe essere specialmente sicuro poichè durante il trattamento non si verifica ipoglicemia, a causa della mancanza dell'effetto di rilasci odella IRI in presenza di ipoglicemia e di normoglicemia. Inoltre, è stato sorprendentemente trovato che il glucagone 1-26 e il des(22-26)glucagone possiedono un effetto di rilascio dell'insulina nel modello di pancreas di

- ratto perfuso, quando la concentrazione di glucosio del tampone è 2,0 mg/ml.

Gli effetti metabolici del glucagone 1-21, del glucagone 1-26 e del des(22-26)glucagone, come spiegati dal loro effetto lipolitico su cellule grasse libere di ratto, in vitro, e dal loro effetto sull'attivazione della adenilciclasi in

vitro, sono di secondaria importanza paragonati agli effetti metabolici del glucagone. Non sono stati trovati effetti metabolici dopo somministrazione in vivo a ratti tenuti a digiuno o alimentati secondo le tecniche usuali.

Per cui, i composti di formula I o i loro sali possono essere utilizzati come agenti di rilascio di insulina. I composti di formula I o i loro sali sono quindi utili per il trattamento di diabetici, per esempio, di quelli con funzione residua di cellule beta. I composti di formula I vengono convertiti in preparazioni farmaceutiche e somministrati, preferibilmente a esseri umani, in analogia con metodi noti.

I composti di formula I e loro sali possono essere somministrati per via endovenosa, intramuscolare o sottocutanea, a dosi nell'intervallo di circa 1-1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di peso corporeo, preferibilmente di circa 10-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di peso corporeo, sebbene possa essere somministrata una dose inferiore o superiore. Il dosaggio richiesto dipenderà dalla gravità delle condizioni del paziente e dal numero di somministrazioni giornaliere. Inoltre, i composti di formula I e i loro sali possono essere somministrati per via nasale o rettale.

I composti di formula I devono essere possibilmente somministrati per via orale, per esempio mediante l'uso di speciali additivi. Allo scopo di somministrazione parenterale, i composti di formula I possono essere sciolti in acqua distillata e il valore del pH, se desiderato, può essere regolato con un tampone adatto, così da essere nell'intervallo tra circa 6 e 8.

Per facilitare il procedimento di liofilizzazione che si risolve in un prodotto facilmente utilizzabile, alla soluzione può essere aggiunto, il lattosio. La soluzione viene filtrata sterilmente e posta in fiale. Quindi, le soluzioni possono essere liofilizzate e le fiale possono essere sigillate in condizioni aettiche.

Possono essere impiegati altri metodi farmaceutici per controllare la durata dell'azione e anche effetti collaterali. Preparati ritardo possono essere ottenuti mediante l'uso di polimeri per complessare o adsorbire i composti di formula I. Il rilascio controllato può essere esercitato selezionando macromolecola appropriate (per esempio polivinilpirrolidone, carbossimetilcellulosa e solfato di protamina) e la concentrazione di macromolecole per controllare l'associazione farmaco-macromolecola. Inoltre, mediante somministrazione parenterale di una sospensione dei composti è possibile ottenere un'azione di durata più lunga di quella ottenuta con una soluzione acquosa, poichè i composti vengono sciolti in modo continuo, processo, questo, che può essere controllato da fattori ben noti (per esempio forma di

cristalli e area superficiale). Un altro metodo possibile per controllare la durata dell'azione mediante preparati ritardo è di incorporare i composti di formula I in particelle di un materiale polimerico, per esempio, il glucagone 1-21 in copolimero etilene-vinilacetato o in una matrice polimerica biodegradabile, per esempio poli(acido lattico). Anzi-

chè incorporare i composti in particelle polimeriche, è possibile intrappolare i composti di formula I in microcapsule preparate, con tecniche di coacervazione o per polimerizzazione interfacciale, per esempio, microcapsule di idrossi-
etilcellulosa o di gelatina e rispettivamente microcapsule di poli(metilmetacrilato), o in sistemi colloidali di alimentazione del farmaco, per esempio liposomi, microsfe-
re di albumina, microemulsioni, nanoparticelle e nanocapsule, o in macroemulsioni. Un altro meccanismo per ottenere preparazioni ritardate è attraverso l'uso di soluzioni oleose biologicamente accettabili (per esempio olio di viscoleo e olio di arachide) in cui il rilascio del farmaco è controllato dalla ripartizione del farmaco al di fuori dell'olio nel mezzo acquoso circostante. Inoltre è possibile utilizzare una sospensione oleosa che combina i principi coinvolti in sospensioni acquose e soluzioni oleose.

Allo scopo di somministrazione nasale, viene utilizzata una soluzione in un dispositivo di spray nasale o in un nebulizzatore. I composti di formula I vengono sciolti in acqua distillata, il va

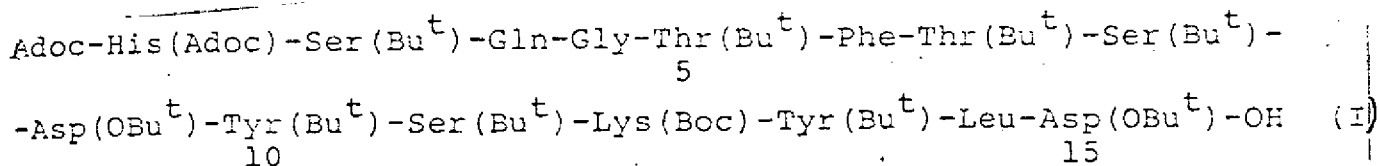
lore del pH viene regolato tra circa 6 e 8, con aggiunta di fosfato sodico e di acido citrico come tampone. Possono essere utilizzati cloruro sodico, sorbitolo e glicerolo per ottenere una soluzione isotonica con una viscosità adatta. La soluzione può essere somministrata mediante l'uso di un nebulizzatore adatto o di uno spray di plastica. La soluzione può essere conservata utilizzando conservanti noti e può essere aggiunto un tensioattivo noto. Al fine della somministrazione nasale con l'uso di una dose spray aerosol i peptidi sono miscelati con costituenti adatti e con una miscela di alogenocarboni, per esempio monofluorotriclorometano, difluorodichlorometano e tetrafluorodichloroetano, per ottenere una miscela con una pressione di vapore che produca una dose singola ben definita, quando la miscela viene somministrata per l'uso di una dose spray aerosol. I composti di formula I sono usati preferibilmente per somministrazione nasale, in un intervallo di dosaggio tra circa 0,1 e 100 µg/kg di peso corporeo per dose singola. Questa dose potrà essere somministrata molte volte al giorno. Al fine della somministrazione per via rettale, vengono prodotte supposte per miscelazione di composti di formula I con un costituente inattivo, come burro di cacao, o con una base come Polisorbato 85, propilene glicol monostearato e cera bianca d'api.

I composti di formula I e i loro sali possono essere prepa

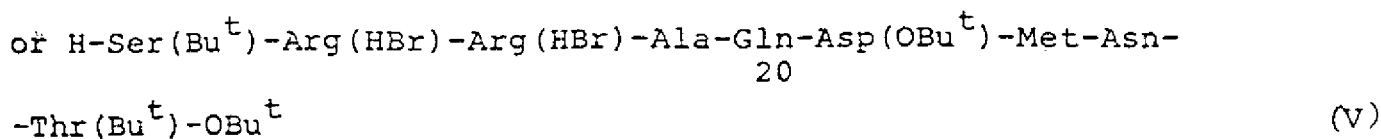
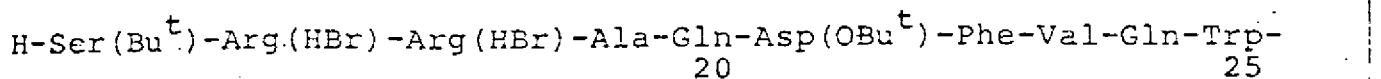
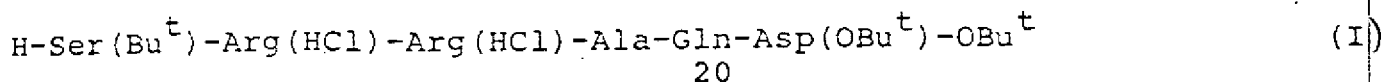
rati con metodi generalmente noti nella sintesi dipeptidica. Brevemente, i composti di formula I possono essere costruiti da un frammento di glucagone protetto, per esempio glucagone 1-15 protetto, e un peptide protetto contenente gli aminoacidi rimanenti del composto di formula I desiderato. La preparazione del glucagone 1-15 protetto è descritta in Res. Discl.

1979, 247. I peptidi contenenti più di 16-21 aminoacidi nel glucagone possono essere preparati da un frammento di glucagone protetto per esempio glucagone 1-16 protetto, e un peptide protetto contenente aminoacidi rimanenti. L'uso di gruppi protettori adatti all'attivazione durante la sintesi peptidica sono noti agli esperti della materia. E' desiderabile usare gruppi protettori che possono essere rimossi facilmente.

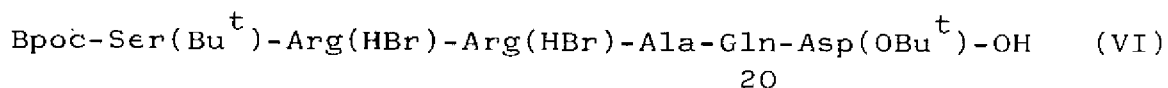
Così, glucagone 1-21, glucagone 1-26 e des(22-26)-glucagone possono essere preparati accoppiando il frammento di glucagone protetto :



con i frammenti di glucagone protetto:



- rispettivamente, con il metodo delle anidridi miste utilizzando isobutilcloroformiato. I peptidi completamente protetti così ottenuti possono essere deprotetti in condizioni acide, per esempio per trattamento con acido tricloroacetico contenente il 10% di 1,2-etanditiolo. I peptidi grezzi possono essere purificati per cromatografia a scambio ionico, per esempio QAE-Sephadex A-25, seguita da un procedimento di desalinizzazione, per esempio gel-filtrazione su Sephadex G-25. I peptidi purificati possono essere isolati per liofilizzazione. I frammenti glucagonici protetti intermedi IV e V possono essere preparati per accoppiamento, usando il metodo delle anidridi miste, del frammento di glucagone protetto:



con i frammenti di glucagone protetto:



rispettivamente, dopo di che il gruppo N-terminale Bpoc può essere rimosso selettivamente in condizioni debolmente acide, per esempio per trattamento con HCl (0,2 N) in metanolo/N,N-dimetilformamide.

I frammenti peptidici protetti III, VI, VII e VIII possono essere sintetizzati mediante allungamento della catena a stadi, applicando procedimenti convenzionali come i metodi dell'estere

- attivo delle anidridi miste dell'accoppiamento.

I peptidi di formula I, in cui R^2 rappresenta la catena peptidica -Phe-Val-Gln-Trp-Leu o -Met-Asn-Thr, in cui uno o più aminoacidi è/sono stati omessi, possono essere preparati in una maniera simile come sopra descritto, tranne che uno o più aminoacidi in questione è/sono stati omessi nei frammenti peptidici protetti VII e VIII.

Un procedimento per preparare il glucagone 1-21 è stato descritto in J. Biol. Chem. 247, 2133, per digestione di glucagone suino, bovino o ovino con carbosipeptidasi A. Il glucagone 1-26 è noto da Metabolism 25, Suppl. 1, 1315.

Una sottoclasse preferita di composti di formula I è costituita da composti in cui la sequenza amino acidica è identica a una parte continua della sequenza amino acidica del glucagone. Come esempio di composti specifici possono essere menzionati, in questa classe di composti, i composti in cui R^2 è Phe, Val, Gln, Trp, Leu, Met, Asn o Thr. Un composto preferito di formula I è il glucagone 1-21 poichè mostra proprietà farmacologiche superiori e poichè può essere ottenuto facilmente, per esempio, dal glucagone naturale. Inoltre, la presente invenzione si riferisce a nuovi composti di formula generale I,



dove R^1 è come sopra definito, e R'^2 ha lo stesso significato di R^2 , tranne che R'^2 non rappresenta -Phe-Val-Gln-Trp-Leu o OH, o un suo sale.

Brevemente, i composti di formula (I') possono essere preparati trattando un composto della formula generale



dove R^3 rappresenta Adoc-His(Adoc)-Ser(Bu^t)-Gln-Gly-Thr(Bu^t)-
5
-Phe-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Asp(OBu^t)-Tyr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Lys(Boc)-
10
-Tyr(Bu^t)-Leu-Asp(OBu^t)-Ser(Bu^t)-Arg(HX)-Arg(HX)-Ala-Gln-
15 20
Asp(OBu^t)-,

R^4 rappresenta il frammento peptidico -Phe-Val-Gln-Trp-Leu-
25

dal quale uno o più amino acidi sono stati omessi, il frammento peptidico -Met-Asn-Thr(Bu^t)- o i frammenti peptidici corrispondenti identici a detto frammento, a condizione che uno o più aminoacidi siano stati omessi, e X rappresenta cloro o bromo, con un acido come l'acido trifluoroacetico.

Come sempi di sali di composti di formula I possono essere citati per esempio i sali di sodio, di potassio, di magnesio, di calcio e di zinco e i sali di addizione con acidi organici o inorganici, come acido formico, acido metansolfonico, acido cloridrico e acido solforico. Sali preferiti dei composti di formula I sono i sali fisiologicamente e farmaceuticamente accettabili.

La presente invenzione si riferisce anche a una composizione farmaceutica comprendente un composto di formula I o un sale di esso e uno o più veicoli farmaceuticamente accettabili, diluenti, preferibilmente acqua, e/o eccipienti.

Come esempi di tali veicoli convenzionali posso essere citati i conservanti, per esempio metil o propil p-idrosibenzato, e cloruro di sodio.

Qualunque nuova caratteristica o combinazione di caratteristiche qui descritte è considerata essenziale.

La nomenclatura qui usata si accorda con quanto stabilito in

J. Biol. Chem. 247, 977, e Biochem. J. 104, 17. Comunque, per brevità, il glucagone-(1-21)-eneicosapeptide è stato qui chiamato glucagone 1-21, in glucagone-(1-26)-esacosapeptide è stato chiamato glucagone 1-26, e il des-pentapeptide-(22-26)-glucagone è stato chiamato des(22-26)-glucagone. Bpoc rappresenta 1-(bifenil-4-il)-1-metiletossi-carbonile, Adoc rappresenta 1-adamantilossicarbonile, Bu^t rappresenta butile terziario, e Boc rappresenta tert-butilossicarbonile.

I seguenti esempi, che non vengono tuttavia considerati limitativi, sono presentati per illustrare l'invenzione.

ESEMPIO 1

des(22-26)-glucaone

1 g di Adoc-His(Adoc)-Ser(Bu^t)-Gln-Gly-Thr(Bu^t)-Phe-Thr(Bu^t)-
-Ser(Bu^t)-Asp(OBu^t)-Tyr(Bu^t)-Ser(bu^t)-Lys(Boc)-Tyr(Bu^t)-Leu-
-Asp(OBu^t)-Ser(Bu^t)-Arg(HBr)-Arg(HBr)-Ala-Gln-Asp(OBu^t)-Met-Asn-Thr(
Bu^t)-OBu^t viene sciolto in 25 ml di acido trifluoracetico conte

nente 10% di 1,2-etanditiolo e la miscela di reazione è lasciata a 15°C per 3 ore. Dopo di che 200 ml di tetraidrofurano vengono

aggiunti lentamente e il precipitato viene isolato, lavato con tetraidrofurano ed essiccato in vacuo. Il prodotto risultante può essere purificato per cromatografia a scambio ionico su QAE-Sephadex A-25 e desalinizzato per gel-filtrazione su Sephadex G-25.

ESEMPIO 6

~~Una preparazione per somministrazione parenterale, contenente~~

1 mg di glucagone 1-21 per ml, può essere preparata come segue:

1 g di glucagone 1-21 e 99 g di lattosio sono sciolti in un litro d'acqua distillata e il valore del pH viene regolato a 7,0. La soluzione viene poi sottoposta a filtrazione sterilizzante. La soluzione sterile viene posta in 10 fiale in modo tale che ogni fiala contenga 1,0 ml della soluzione. Le soluzioni vengono poi liofilizzate e le fiale vengono sigillate in condizioni asettiche. La preparazione in ciascuna delle fiale deve essere sciolta in 1,0 ml di acqua sterile prima della somministrazione.

ESEMPIO 3

Una preparazione per somministrazione parenterale contenente 10 mg di glucagone 1-21 per ml può essere preparato come segue:

10 g di glucagone 1-21 e 90 g di lattosio sono sciolti in 1 litro di acqua distillata e la soluzione viene preparata analogamente al metodo descritto nell'esempio 2.

ESEMPIO 4

Supposte rettali sono preparate miscelando 1 mg di glucagone 1-21 con 4 g di burro di cacao.

ESEMPIO 5

Uno spray nasale di plastica può essere preparato come segue:

0,5 g di glucagone 1-21 sono sciolti in circa 95 ml di tampone fosfato 0,01 M (valore di pH : 7,4), reso isotnico per aggiunta di glicerolo. La soluzione è conservata per aggiunta di 0,01% di cloruro di benzalconio e 0,05% di EDTA, dopo di che viene aggiunto polioxisorbato allo 0,5%. Viene aggiunto un tampone fosfato isotnico per dare un volume risultante di 100 ml, e la soluzione viene filtrata sterilmente. 15 ml di detta soluzione sono posti in uno spray di plastica; dando 0,5 mg di glucagone 1-21, quando attivato.

Esperimento A:

Dieci ratti Wistar maschi del peso di 150 ± 5 g furono anestetizzati con Nembutal e un catetere di polietilene fu inserito in una vena giugulare per infusioni. UN altro catetere fu inserito in un'arteria carotide per campionamento di sangue. UN gruppo di 5 ratti ricevette un'infusione di glucosio, cioè 2 mg/min., per 60 minuti. UN altro gruppo di 5 ratti ricevette un'infusione di glucosio, cioè 2 mg/min., da 0 a 20 minuti e da 20 a 60 minuti venne effettuata infusione di glucosio, cioè 2 mg/min., più glucagone 1-21, cioè 100 microgrammi/min. L'analisi del glucosio plasmatico fu effettuata in accordo con il metodo della

- esochinasi con l'autoanalizzatore, utilizzando GLUCOQUANT^(R).

I valori di glucosio plasmatico medio (N = 5) sono riportati in tabella I.

TABELLA I

Tempo (min)	Glucosio plasmatico, mg 100/ml									
	0	2	5	10	20	25	30	40	50	60
Glucosio 2 mg/min 0-60 min	83	103	134	160	179	197	215	210	197	183
Glucosio 2 mg/min 0-60 min più glucagone ₁₋₂₁ 100 µg/min 20-60 min	81	99	125	149	160	167	152	140	125	109

Il gruppo che aveva ricevuto glucagone 1-21 aveva un livello di glucosio ematico significativamente inferiore, paragonato all'altro gruppo dopo l'aggiunta di glucagone 1-21 al fluido di infusione.

ESPERIMENTO B:

Glucagone 1 mg/kg e una dose equimolecolare di glucagone 1-21 cioè 0,77 mg/kg, furono iniettati per via endovenosa al tempo 0 a ratti maschi Wistar normalmente alimentati, del peso di 150 ± 5 g. Vennero presi campioni di sangue dal plesso orbitale ai tempi -5, 2, 5, 10, 15, 30, e 60 minuti. Il glucosio ematico fu saggiato in accordo con il metodo della esochinasi, e l'insulina plasmatica fu saggiata mediante RIA. Il glucagone aveva

un effetto significativo di aumento sul glucosio ematico e sulla IRI Plasmatica (insulina immunoreattiva). Al contrario del glucagone, il glucagone 1-21 non ha effetto su questi parametri. Valori medi di glucosio ematico (N = 10) sono riportati nella Tabella II qui sotto, e i valori medi di IRI plasmatica (N = 10) sono riportati nella Tabella III.

TABELLA II

	Glucosio ematico, mg/100 ml							
Tempo(min)	-5	2	5	10	15	30	60	
Glucagone 1 mg/kg	94	116	128	134	137	146	112	Giorno di esperimento 1
Placebo	89	107	112	117	115	108	125	
Glucagone ₁₋₂₁ 0,77 mg/kg	101	111	113	122	126	130	129	Giorno di esperimento 2
Placebo	102	115	119	126	125	127	126	

TABELLA III

	PLASMA IRI, μ U/ml							
Tempo (min)	-5	2	5	10	15	30	60	
Glucagone 1 mg/kg	19	95	98	82	67	53	17	Giorno di esperimento 1
Placebo	17	25	28	23	20	22	25	
Glucagone ₁₋₂₁ 0,77 mg/kg	32	30	33	35	43	38	30	Giorno di esperimento 2
Placebo	13	20	20	22	24	22	16	

ESPERIMENTO C:

Studio della tossicità acuta.

10 mg di glucagone(1-21), somministrati per via endovenosa come bolo a topolini NMRI del peso di circa 20 g (cioè una dose di circa 500 mg/kg di peso corporeo) non avevano effetti contrari.

~~Non-si-verificarono-morti.~~

RIVENDICAZIONI

1. Uso, come agente di rilascio dell'insulina, di composti di formula generale I



in cui R^1 rappresenta His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-
5
Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-, e R^2 rappre-
10 15 20
senta idrossi la catena peptidica -Phe-Val-Gln-Trp-Leu o -Met-
25

Asn-Thr o una corrispondente catena peptidica identica alle ulti
me due catene peptidiche menzionate, fatta eccezione che uno o
più amino acidi sono stati omessi, o sali di essi.

2. Uso secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto
che detti composti sono utilizzati per il trattamento di diabe-
tici.

3. Uso, secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni
in cui R^2 rappresenta una catena peptidica contenente amino aci-
di nella esatta stessa sequenza presente in un frammento di
glucagone.

4. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 o 2, caratterizzato dal fatto che R^2 rappresenta Phe, Val, Gln, Trp, Leu, Met, Asn o Thr.

5. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 o 2, caratterizzato dal fatto che R^2 rappresenta OH, -Phe-Val-Gln-Trp-Leu o
25

~~-Met-Asn-Thr.~~

6. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3 e 5, caratterizzato dal fatto che R^2 rappresenta OH.

7. Composizione farmaceutica che comprende una quantità efficace di un composto di formula I, in accordo con la rivendicazione 1, o un sale di esso, in associazione con un veicolo fisiologicamente accettabile adatto, con diluenti e/o eccipienti.

8. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 7, caratterizzata dal fatto che comprende tra 7,5 e 75.000 μg , preferibilmente tra 75 e 7500 μg , di un composto di formula I o di un sale di esso per unità di dosaggio.

9. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 7 o 8, caratterizzata dal fatto che contiene un composto di formula I, in cui R^2 rappresenta una catena peptidica contenente amino acidi esattamente nella stessa sequenza presente in un frammento di glucagone.

10. Composizione farmaceutica secondo le rivendicazioni 7 o 8, caratterizzata dal fatto che contiene un composto di formula I,

in cui R^2 rappresenta Phe, Val, Gln, Trp, Leu, Met, Asn, o Thr.

11. Composizione farmaceutica secondo le rivendicazioni 7 o 8, caratterizzata dal fatto che contiene un composto di formula I, in cui R^2 rappresenta OH, -Phe, Val-Gln-Trp-
25
Leu o -Met-Asn-Thr.

12. Composizione farmaceutica secondo le rivendicazioni 7 o 8 caratterizzata dal fatto che contiene un composto di formula I, in cui R^2 è OH.

13. Nuovi composti della formula generale I':



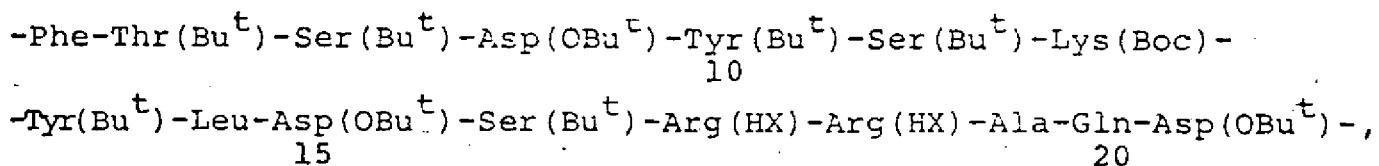
in cui R^1 è come sopra definito, e R'^2 ha lo stesso significato di R^2 , tranne che R'^2 non rappresenta -Phe-Val-gln-Trp-Leu o OH, o un sale di essi.

25
14. Procedimento per la preparazione di composti di formula I' o di sali di essi, caratterizzato dal fatto che essi sono preparati dagli L-aminoacidi parenti per uso di metodi generalmente noti nella sintesi peptidica, dopo di che un composto di formula (I') se desiderato, è convertito in un sale di essi, analogamente a metodi noti.

15. Procedimento per la preparazione di composti di formula I' o di sali di essi, caratterizzato dal fatto che un composto di formula generale



in cui R^3 rappresenta Adoc-His-(Adoc)-Ser(Bu^t)-Gln-Gly-Thr(Bu^t)-



R⁴ rappresenta il frammento peptidico -Phe-Val-Gln-Trp-Leu-
25
dal quale uno o più aminoacidi è/sono stati omessi, il frammento
peptidico -Met-Asn-Thr(Bu^t)- o frammenti peptidici corrispondenti,

identici a detto frammento, tranne che uno o più aminoacidi è/
sono stati omessi, e X rappresenta cloro o bromo, è trattato con
un acido quale acido trifluoroacetico, dopo di che il composto
risultante, se desiderato, è convertito in un suo sale.

16. Uso di composti di formula I, come specificati nella ri-
vendicazione 1 o di qualsiasi delle sottoclassi preferite di
composti stabiliti in una qualsiasi delle rivendicazioni da 3
a 6, o di un sale di essi, per la preparazione di farmaci aventi
un effetto di rilascio dell'insulina.

17. Composto di formula I come specificato nella rivendica-
zione 1, o di una qualsiasi delle sottoclassi preferite di
composti stabiliti in una qualsiasi delle rivendicazioni da
3 a 6, per l'uso come agente rilasciante l'insulina.

18. Un agente di rilascio dell'insulina caratterizzato dal
fatto che comprende un composto di formula I, come specificato
nella rivendicazione 1 o in una qualsiasi delle sottoclassi
preferite di composti stabiliti in una qualsiasi delle rivendi-
cazioni da 3 a 6.

19. Qualunque nuova caratteristica o combinazione di caratte-

- ristiche qui descritte.

Per traduzione conforme.

Milano, 21 aprile 1983

Per NOVO INDUSTRI A/S:

LEHMANN & REE (firma illeggibile)

Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.

Fabrizio Minga

ATTI

COPIA DI ORIGINARIO DEPOSITO

Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.

1080 M . DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:

"USO DI PEPTIDI COME MEDICAMENTI"

a nome: NOVO INDUSTRI A/S

a : Novo Allé

2880 BAGSVAERD (DANIMARCA)

COPIA DI ORIGINARIO DEPOSITO

di nazionalità danese ed elettivamente domiciliata a tutti gli

effetti di legge presso il mandatario Studio Consulenza Brevet

tuale - Via Senato n.24 - Milano

Inventore designato: Karin Damm Jørgensen

Depositata il 22 dicembre 1982

al no.

24915A/82

RIASSUNTO

Alcuni derivati di glucagone, contenenti il frammento glucagone-
nico His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-
Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp- connesso al gruppo idrossi o a
una delle catene peptidiche -Phe-Val-Gln-Trp-Leu o -Met-Asn-
Thr o una delle ultime due catene peptidiche, in cui uno o più
amino acidi sono stati omessi, hanno un effetto di rilascio
dell'insulina in condizioni di iperglicemia.

DESCRIZIONE

La presente invenzione si riferisce all'uso di peptidi della
formula generale

R'-R''

(I)

in cui R' rappresenta His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-

- Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-, e R" rappresenta OH, la catena peptidica -Phe-Val-Gln-Trp-Leu o -Met-Asn-Thr o una corrispondente catena peptidica o di amino acido, identica a una delle ultime due catene peptidiche menzionate, con l'eccezione che un amino acido o più amino acidi sono stati omessi, o sali di essi, come agenti rilascianti l'insulina.

Come esempi di "corrispondente catena peptidica o di amino acido, identica a una delle ultime due catene peptidiche menzionate, con l'eccezione che uno o più amino acidi sono stati omessi" di cui sopra, possono essere menzionate -Val-Trp e -Met-Asn.

Il glucagone, un ormone polipeptidico costituito da 29 amino acidi, è noto possedere molti effetti farmacologici quali un effetto spasmolitico sulla muscolatura liscia, un effetto inibitore sulla secrezione acida gastrica, ed effetti metabolici, per esempio un effetto rilasciante l'insulina.

E' noto che il glucagone rilascia insulina da pancreas di ratto isolato e perfuso. E' stato ora trovato che il glucagone(1-21) non ha tale effetto, quando viene infuso, alla stessa concentrazione del glucagone, a condizione che la concentrazione di glucosio del tampone sia 0,6 mg/ml, corrispondente a ipoglicemia. Inoltre, è stato ora trovato che il glucagone(1-21) - al contrario del glucagone - non provoca iperglicemia o rilascio di insulina in vivo in ratti normalmente alimentati. Tuttavia, è stato sorprendentemente trovato che il glucagone(1-21) possiede circa l'85% del-

l'effetto di rilascio della IRI (immunoreactive insulin, cioè inulina immunoreattiva) del glucagone, nel modello di pancreas di ratto perfuso, quando la concentrazione di glucosio del tampone è 2,0 mg/ml, corrispondente a iperglicemia, e il 60% circa dell'effetto di rilascio della IRI del glucagone quando la concentrazione di glucosio del tampone è 1,5 mg/ml, corrispondente a moderata iperglicemia. Studi su ratti e maiali caricati con glucosio, hanno ora mostrato che il glucagone(1-21), infuso per via endovenosa, aumenta la tolleranza al glucosio, vedi esperimenti da A a C più avanti. Poichè il glucagone(1-21) possiede l'effetto di rilascio della IRI del glucagone, in presenza di iperglicemia, sebbene al tempo stesso privo degli effetti glucogenolitici e gluconeogenetici del glucagone, esso può essere utilizzato nel trattamento di diabetici con residua funzione delle cellule beta. Un tale uso dovrebbe essere specialmente sicuro poichè durante il trattamento non si verifica ipoglicemia, a causa della mancanza dell'effetto di rilascio della IRI in presenza di ipoglicemia e di normoglicemia. Quando il glucagone(1-21) viene infuso in ratti e maiali con livelli di glucosio del plasma inferiori a 1,2 mg/ml, esso non rilascerà IRI nè influenzerà i livelli di glucosio nel plasma, vedi esperimento D più avanti.

In Diabetes 21 (1972), 843, è stato asserito nel sommario che la struttura necessaria per l'azione insulinogenica è localizzata entro la sequenza di amino acidi 24-29 nel glucagone. Al contrario è stato ora sorprendentemente trovato che la struttura per l'azione insulinogenica è nella sequenza di amino acidi 1-21, purchè sia presente

iperglicemia.

Inoltre, è stato sorprendentemente trovato che il glucagone(1-26) e il des(22-26)glucagone possiedono un effetto di rilascio dell'insulina nel modello di pancreas di ratto perfuso, quando la concentrazione di glucosio del tampone è 2,0 mg/ml.

Ci si dovrebbe aspettare che tutti i composti di formula I avessero

un effetto di rilascio dell'insulina in caso di iperglicemia poichè il glucagone, il glucagone(1-26), il des(22-26)glucagone e il glucagone(1-21) hanno questo effetto. Tuttavia, contrariamente al glucagone(1-21), il glucagone ha anche un effetto di rilascio dell'insulina in presenza di normoglicemia e di ipoglicemia.

Nella domanda di brevetto danese No. 2885/81 è stato affermato che i composti di formula I possiedono effetto spasmolitico e un effetto inibitore sulla secrezione acida gastrica. Inoltre, è stato asserito che questi composti di formula I mostrano effetti metabolici minori e di secondaria importanza o addirittura nulli. L'asserzione in detta domanda di brevetto danese, che il glucagone(1-21) non rilascia insulina dal pancreas di ratto isolato e perfuso, può essere applicata se la concentrazione di glucosio del tampone è di 1,0 mg/ml, corrispondente a normoglicemia, o se al di sotto di questa concentrazione. In base a ciò, è sorprendente che i composti di formula I abbiano un effetto di rilascio dell'insulina su animali caricati con glucosio corrispondente a iperglicemia.

Gli effetti metabolici del glucagone(1-21), del glucagone(1-26) e del des(22-26)glucagone, come spiegati dal loro effetto lipoli

tico su cellule grasse libere di ratto, in vitro, e dal loro effetto sull'attivazione della adenilciclasi in vitro, sono di secondaria importanza paragonati agli effetti metabolici del glucagone. Non sono stati trovati effetti metabolici dopo somministrazione in vivo a ratti tenuti a digiuno o alimentati secondo le tecniche usuali.

Per cui, i composti di formula I o i loro sali possono essere utilizzati come agenti di rilascio di insulina. I composti di formula I o i loro sali sono quindi utili per il trattamento di diabetici, per esempio, di quelli con funzione residua di cellule beta. Il fatto che i composti di formula I mostrino anche effetto spasmolitico ed effetto inibitore sulla secrezione acida gastrica, non ne precluderà l'uso come agenti di rilascio dell'insulina in molti, se non in tutti i casi. Al contrario, la combinazione degli effetti potrà provocare un vantaggio, per esempio, nei diabetici di tipo 2.

Come esempi specifici possono essere menzionati i composti noti di formula I: glucagone(1-21), glucagone(1-23), glucagone(1-25, glucagone(1-26) e des(22-26)glucagone. I rimanenti composti di formula I e i loro sali possono essere preparati mediante metodi che, generalmente, sono noti nella sintesi peptidica, e in relazione a ciò si fa riferimento, per esempio, a: domanda di brevetto danese No. 2885/81; Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 362 (1981), 665 - 677; Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl), Ed.: Müller, Vol. XV/1 + 2, G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1974; The Pep

tides Ed.: Gross and Meienhofer, Vol. 1 - 4, Academic Press, 1981 and Appl.Biochem.Biotech. 7. (1982), 385 e seguenti.

I composti di formula I vengono convertiti in preparazioni farmaceutiche e somministrati, preferibilmente a esseri umani, in analogia con metodi noti.

I composti di formula I e loro sali possono essere somministrati per via endovenosa, intramuscolare o sottocutanea, a dosi nell'intervallo di circa 1-1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di peso corporeo, preferibilmente di circa 10-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di peso corporeo, sebbene possa essere somministrata una dose inferiore o superiore. Il dosaggio richiesto dipenderà dalla gravità delle condizioni del paziente e dal numero di somministrazioni giornaliere. Inoltre, i composti di formula I e i loro sali possono essere somministrati per via nasale o rettale. I composti di formula I devono essere possibilmente somministrati per via orale, per esempio mediante l'uso di speciali additivi. Allo scopo di somministrazione parenterale, i composti di formula I possono essere sciolti in acqua distillata e il valore del pH, se desiderato, può essere regolato con un tampone adatto, così da essere nell'intervallo tra circa 6 e 8. Inoltre, la soluzione può essere regolata all'isotonicità, per esempio mediante aggiunta di cloruro di sodio allo 0,9% circa. Per facilitare il procedimento di liofilizzazione che si risolve in un prodotto facilmente utilizzabile, alla soluzione può essere aggiunto, per esempio, il lattosio. Dopo di che, la soluzione può essere filtrata sterilmente e posta in fiale. Quindi, le soluzioni possono essere liofilizzate

e le fiale possono essere sigillate in condizioni aseptiche.

Possono essere impiegati altri metodi farmaceutici per controllare la durata dell'azione. Preparazioni a rilascio controllato possono essere ottenute mediante l'uso di polimeri per complessare o adsorbire i composti di formula I. Il rilascio controllato può essere esercitato selezionando macromolecole appropriate (per esempio poliesteri, poliamino acidi, polivinilpirrolidone, etilenvinilacetato, metilcellulosa, carbossimetilcellulosa e solfato di protamina) e la concentrazione di macromolecole come pure i metodi di incorporazione per controllare il rilascio del farmaco. Inoltre, mediante somministrazione parenterale di una sospensione dei composti in forma di cristalli o di aggregati, è possibile ottenere un'azione di durata più lunga di quella ottenuta con una soluzione acquosa, poichè i composti vengono sciolti in modo continuo, processo, questo, che può essere controllato da fattori ben noti (per esempio forma dei cristalli, tipo degli aggregati e area superficiale). Un altro metodo possibile per controllare la durata dell'azione mediante preparazioni a rilascio controllato, è di incorporare i composti di formula I in particelle di un materiale polimerico in forma di matrice o di sistemi bioerosibili, per esempio, il glucagone(1-21) in poliesteri, poliamino acidi, idrogels, poli (acido lattico) o copolimero etilene-vinilacetato. Anzichè incorporare i composti in particelle polimeriche, è possibile intrappolare i composti di formula I in microcapsule preparate, per esempio, con tecniche di coacervazione o per polimerizzazione interfacciale, per esempio, mi-

microcapsule di idrossietilcellulosa o di gelatina e rispettivamente microcapsule di poli(metilmetacrilato), o in sistemi colloidali di alimentazione del farmaco, per esempio liposomi, microsfeere di albumina, microemulsioni, nanoparticelle e nanocapsule, o in macroemulsioni. Un altro meccanismo per ottenere preparazioni ritardate è attraverso l'uso di soluzioni oleose biologicamente accettabili

(per esempio olio di viscoleo e olio di arachide) in cui il rilascio del farmaco è controllato dalla ripartizione del farmaco al di fuori dell'olio nel mezzo acquoso circostante. Inoltre è possibile utilizzare una sospensione oleosa che combina i principi coinvolti in sospensioni acquose e soluzioni oleose.

Allo scopo di somministrazione nasale, viene utilizzata una soluzione in un dispositivo di spray nasale o in un nebulizzatore. I composti di formula I vengono sciolti in acqua distillata e il valore del pH viene regolato così da essere nell'intervallo tra circa 6 e 8, per esempio, con aggiunta di fosfato sodico e di acido citrico come tampone. Possono essere utilizzati cloruro sodico, sorbitolo e glicerolo per ottenere una soluzione isotonica con una viscosità adatta. La soluzione può essere somministrata mediante l'uso di un nebulizzatore adatto o di uno spray di plastica. La soluzione può essere conservata utilizzando conservanti noti, per esempio metil o propil p-idrossibenzoati. Per favorire l'efficacia possono servire come esempi di acceleratori di assorbimento un tensioattivo, per esempio esteri di poliossietilene, acidi grassi o derivati di enamina, per esempio N-(1-metil-2-etossicarbonilvinil)-

D-fenilglicina. Al fine della somministrazione nasale con l'uso di una dose spray aerosol, un composto di formula I viene miscelato con costituenti adatti e con una miscela di alogenocarboni, per esempio monofluorotriclorometano, difluorodichlorometano e tetrafluorodichloroetano, per ottenere una miscela con una pressione di vapore che produca una dose singola ben definita, quando la miscela viene somministrata per l'uso di una dose spray aerosol.

Per somministrazione nasale i composti di formula I sono usati preferibilmente in un intervallo di dosaggio tra circa 0,1 e 100 µg/kg di peso corporeo, preferibilmente tra 1 e 10 µg/kg di peso corporeo per dose singola. Questa dose potrà essere somministrata molte volte al giorno.

Al fine della somministrazione per via rettale, vengono prodotte supposte per miscelazione di un composto di formula I con un costituente inattivo, come burro di cacao, o con una base come Polisorbato 85, propilene glicol monostearato e cera bianca d'api. Tensioattivi e/o derivati di enammine possono servire come esempi di promotori d'assorbimento.

Una sottoclasse preferita di composti di formula I è costituita da composti in cui la sequenza amino acidica è identica a una parte continua della sequenza amino acidica del glucagone. Come esempi di composti specifici di formula I, possono essere menzionati i composti in cui R" è Phe, Val, Gln, Trp, Leu, Met, Asn o Thr. Un composto preferito di formula I è il glucagone(1-21) poichè mostra proprietà farmacologiche superiori e poichè può essere ottenuto fa

cilmente, per esempio, dal glucagone naturale. Come esempi di sali di composti di formula I possono essere citati i sali di sodio, potassio, magnesio, calcio e zinco e i sali di addizione con acidi organici o inorganici, come l'acido formico. Sali preferiti dei composti di formula I sono i sali fisiologicamente e farmaceuticamente accettabili.

La presente invenzione si riferisce anche a una composizione farmaceutica comprendente un composto di formula I o un sale di esso e uno o più veicoli farmaceuticamente accettabili, diluenti, preferibilmente acqua, e/o eccipienti, quando utilizzata come farmaco rilasciante insulina. Come esempi di tali veicoli convenzionali possono essere citati i conservanti, per esempio metil o propil p-idrosibenzoato, e cloruro di sodio.

Qualunque nuova caratteristica o combinazione di caratteristiche qui descritte è considerata essenziale.

Le abbreviazioni di tre lettere per gli amino acidi, qui utilizzate, sono stabilite in J. Biol. Chem. 243 (1968), 3558. Per brevità, il glucagone-(1-21)-eneicosapeptide qui è stato chiamato glucagone (1-21), e analogamente, questo avviene per il glucagone(1-23), per il glucagone(1-25) e per il glucagone(1-26). Inoltre, il des-pentapeptide-(22-26)-glucagone è stato chiamato des(22-26)glucagone.

Il seguente esempio, che non viene tuttavia considerato limitativo, è presentato per illustrare l'invenzione.

ESEMPIO

Una preparazione per somministrazione parenterale, contenente 1

.mg di glucagone(1-21) per ml, può essere preparata come segue:

1 g di glucagone(1-21) e 99 g di lattosio sono sciolti in un litro d'acqua distillata e il valore del pH viene regolato a 7,0. La soluzione viene poi sottoposta a filtrazione sterilizzante. La soluzione sterile viene posta in 10 fiale in modo tale che ogni fiala contenga 1,0 ml della soluzione. Le soluzioni vengono poi

liofilizzate e le fiale vengono sigillate in condizioni asettiche.

La preparazione in ciascuna delle fiale deve essere sciolta in 1,0 ml di acqua sterile prima della somministrazione.

Ulteriori esempi di preparazione di preparati contenenti glucagone (1-21) sono descritti nella domanda di brevetto danese No. 2885/81. Preparazioni contenenti altri composti di formula I sono ottenute in modo analogo.

ESPERIMENTO A:

Effetto sul rilascio-IRI in ratti in vivo.

10 ratti maschi, ceppo Wistar, 150 g (+/- 5 g) furono anestetizzati con Pentobarbitale. Cateteri di polietilene furono inseriti nella arteria carotide destra per il campionamento del sangue, e nella vena giugulare sinistra per le infusioni. I ratti furono divisi in due gruppi di cinque animali per ciascun gruppo. Un gruppo fu sottoposto a infusione con glucosio (1,5 mg/min) per 0-60 minuti (placebo) e un gruppo fu sottoposto a infusione con glucosio (1,5 mg/min) + glucagone(1-21) (100 µg/kg/h) per 0-60 minuti. Il sangue fu campionato in provette su ghiaccio contenenti eparina (250 UI/ml) e aprotinina (600 KUI/ml) ai tempi 0, 1, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minuti. L'in-

.sulina fu determinata mediante radioimmuno assay (RIA) sul plasma.

I risultati sono riportati nella Tabella I qui sotto.

TABELLA I

	IRI, μ U/ml.							
Placebo	7	20	32	40	40	40	34	36
Glucagone (1-21)	18	43	48	62	56	56	60	55
Tempo, min	0	1	10	20	30	40	50	60

ESPERIMENTO B:

Effetto sui livelli di glucosio plasmatico in ratti in vivo.

1. Somministrazione endovenosa.

Ratti maschi Wistar furono preparati come descritto nell'Esperimento A. Un gruppo di 5 ratti aveva una infusione endovenosa di glucosio (2 mg/min) per 0-30 minuti seguita da infusione di soluzione fisiologica dello 0,9% con lo 0,1% di HSA (human serum albumin, albumina di siero umana). Un gruppo di 5 ratti aveva un'infusione endovenosa di glucosio (2 mg/min) per 0-30 minuti, seguita da un'infusione di 1 mg di glucagone (1-21) in soluzione fisiologica con HSA per 30-60 minuti. Vennero prelevati campioni di sangue dall'arteria carotide ai tempi 0, 2, 5, 10, 20, 25, 30, 40, 50, e 60 minuti e i valori di glucosio ematico furono determinati mediante il metodo della esochinasi in un autoanalizzatore. I valori di glucosio ematico sono riportati nella Tabella II di sotto.

==

==

TABELLA II

	Glucosio ematico, mg/ml										
Placebo	0,9	1,1	1,3	1,4	1,7	1,8	1,8	1,5	1,3	1,2	
Glucagone-(1-21)	1,0	1,2	1,4	1,5	1,7	1,9	1,9	1,3	1,0	0,8	
Tempo, min	0	2	5	10	20	25	30	40	50	60	

2. Somministrazione perorale di glucosio.

L'effetto del glucagone(1-21) fu studiato in ratti durante un test di tolleranza al glucosio orale. 20 ratti maschi Wistar furono divisi in 2 gruppi di 10 ratti e dosati come segue: entrambi i gruppi furono dosati con glucosio (5 g/kg, per via perorale) a 0 e 60 minuti. Il gruppo placebo fu dosato con 1 ml di soluzione fisiologica allo 0,9% con lo 0,1% di HSA, per via intraperitoneale, ai tempi 0, 30, 60 e 90 minuti. L'altro gruppo fu dosato con glucagone(1-21) (1 mg/kg) in soluzione fisiologica allo 0,9%, con HSA, ai tempi 0, 30, 60 e 90 minuti. Campioni di sangue furono prelevati dalle code ai tempi -5, 0, 15, 30, 45, 60, 90, e 120 minuti per la determinazione del glucosio ematico. I valori di glucosio ematico sono riportati nella Tabella III qui sotto.

TABELLA III

	Glucosio ematico, mg/ml									
Placebo	0,88	0,98	1,60	1,52	1,46	1,45	1,60	1,54		
Glucagone-(1-21)	0,89	0,96	1,32	1,35	1,23	1,36	1,37	1,37		
Tempo, min	-5	0	15	30	45	60	90	120		

ESPERIMENTO C:

Effetto sui livelli di glucosio ematico in maiali in vivo.

1. Somministrazione endovenosa.

L'effetto di glucagone(1-21) sui livelli di glucosio del plasma fu studiato durante una infusione endovenosa di glucosio. 4 maiali femmina (razza danese/Yorkshire) del peso di 30 kg (+/- 3 kg), furono dosati con glucosio (0,7 g/kg/h) sottoforma di infusione endovenosa, e con la stessa infusione di glucosio + infusione di glucagone(1-21) (100 µg/kg/h) per 0-120 minuti. L'esperimento venne effettuato come esperimento cross-over. I maiali furono sottoposti a infusione endovenosa con cateteri nell'orecchio, e vennero prelevati campioni di sangue dall'altro orecchio ai tempi 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 minuti. Il glucosio venne analizzato mediante il metodo della esochinasi e i valori di glucosio ematico sono riportati nella Tabella IV qui sotto.

TABELLA IV

	Glucosio del plasma, mg/ml									
Placebo	1,0	1,7	2,1	2,2	2,3	2,3	2,3	2,2	2,3	
Glucagone-(1-21) + glucosio	0,9	1,5	1,7	1,8	1,9	1,8	2,0	1,9	1,9	
Tempo, min!	0	15	30	45	60	75	90	105	120	

2. Somministrazione perorale di glucosio.

L'effetto del glucagone(1-21) sui livelli di glucosio plasmatico, fu studiato durante una prova di tolleranza al glucosio orale in maiali. 4 maiali furono trattati in un esperimento cross-over, con glucosio

(5 g/kg) per via perorale a 0 e 60 minuti + placebo (soluzione fisiologica con HSA) o glucagone(1-21) (1 mg/kg/h) per 0-120 minuti, per via endovenosa. Campioni ematici furono prelevati da una vena dell'orecchio ai tempi -5, 10, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 105, e 120 minuti, il glucosio plasmatico fu saggiato mediante il metodo della esochinasi. I valori di glucosio plasmatico sono riportati nella Tabella V qui sotto.

TABELLA V

	Glucosio plasmatico, mg/ml										
Placebo	0,8	1,3	1,8	2,2	2,5	2,5	2,7	2,8	2,7	2,4	
Glucagone-(1-21)	0,8	1,0	1,4	1,7	1,8	1,9	1,8	1,7	1,7	2,1	
Tempo, min	-5	10	20	30	45	60	75	90	105	120	

ESPERIMENTO D:

Studi dell'effetto del glucagone e del glucagone(1-21) sui livelli di glucosio plasmatico e di IRI plasmatica in ratti normoglicemici. Glucagone (1 mg/kg) e una dose equimolecolare di glucagone(1-21), cioè 0,77 mg/kg, furono iniettati per via endovenosa al tempo di partenza (tempo: 0 minuti) a ratti maschi Wistar normalmente alimentati, del peso di 150 g (+/- 5 g). Vennero presi campioni di sangue dal plesso orbitale ai tempi -5, 2, 5, 10, 15, 30, e 60 minuti. Il glucosio ematico fu saggiato in accordo con il metodo della esochinasi, e l'insulina plasmatica fu saggiata mediante RIA. Il glucagone aveva un effetto significativo di aumento sul glucosio ematico e sulla IRI plasmatica. Al contrario del glucagone, il glucagone(1-21)

non ha effetto su questi parametri. Valori medi di glucosio ematico (N = 10) sono riportati nella Tabella VI qui sotto, e i valori medi di IRI plasmatica (N = 10) sono riportati nella Tabella VII più sotto.

TABELLA VI

	Glucosio ematico, mg/ml							
Glucagone	0,9	1,2	1,3	1,3	1,4	1,5	1,1	giorno di espe
Placebo	0,9	1,1	1,1	1,2	1,2	1,1	1,3	rimento 1
Glucagone(1-21)	1,0	1,1	1,1	1,2	1,3	1,3	1,3	giorno di espe
Placebo	1,0	1,2	1,2	1,3	1,3	1,3	1,3	rimento 2
Tempo, min	-5	2	5	10	15	30	60	

TABELLA VII

	IRI plasmatica μ U/ml							
Glucagone	19	95	98	82	67	53	17	giorno di espe
Placebo	17	25	28	23	20	22	25	rimento 1
Glucagone(1-21)	32	30	33	35	43	38	30	giorno di espe
Placebo	13	20	20	22	24	22	16	rimento 2
Tempo, min	-5	2	5	10	15	30	60	

ESPERIMENTO E:

Studio della tossicità acuta.

10 mg di glucagone(1-21), somministrati per via endovenosa come bolo a topolini NMRI del peso di circa 20 g (cioè una dose di circa 500 mg/kg di peso corporeo) non avevano effetti contrari. Non si verificarono morti.

RIVENDICAZIONI

1. Uso, come agente di rilascio dell'insulina, di composti di formula generale I



in cui R' rappresenta His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-, e R'' rappresenta idrossi

la catena peptidica -Phe-Val-Gln-Trp-Leu o -Met-Asn-Thr o una corrispondente catena peptidica o un amino acido, identica a una delle ultime due catene peptidiche menzionate, fatta eccezione che un amino acido o più amino acidi sono stati omessi, o sali di essi.

2. Uso secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che la sequenza amino acidica nel composto di formula I è identica alla sequenza in un frammento di glucagone.

3. Uso secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che R'' rappresenta Phe, Val, Gln, Trp, Leu, Met, Asn o Thr.

4. Uso secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che R'' rappresenta idrossi, -Phe-Val-Gln-Trp-Leu o -Met-Asn-Thr.

5. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1, 2, e 4, caratterizzato dal fatto che R'' rappresenta idrossi.

6. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che il composto di formula I è utilizzato per il trattamento di diabetici.

7. Uso secondo la rivendicazione 6, caratterizzato dal fatto che il composto di formula I viene utilizzato per il trattamento di diabetici con funzione residua delle cellule beta.

8. Uso secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, caratterizzato dal fatto che il composto di formula I è utilizzato in una quantità efficace.
9. Composizione farmaceutica che comprende una quantità efficace di un composto di formula I, in accordo con la rivendicazione 1, o un sale di esso, in associazione con un veicolo fisiologicamente accettabile adatto, con diluenti e/o eccipienti, quando utilizzato come farmaco di rilascio dell'insulina.
10. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 9, caratterizzata dal fatto che comprende tra 7,5 e 75.000 μg , preferibilmente tra 75 e 7500 μg , di un composto di formula I o di un sale di esso per unità di dosaggio.
11. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 9 o 10, caratterizzata dal fatto che contiene un composto di formula I, in cui la sequenza di aminoacidi è identica alla sequenza in un frammento di glucagone.
12. Composizione farmaceutica secondo le rivendicazioni 9 o 10, caratterizzata dal fatto che contiene un composto di formula I, in cui R" rappresenta Phe, Val, Gln, Trp, Leu, Met, Asn, o Thr.
13. Composizione farmaceutica secondo le rivendicazioni 9 o 10, caratterizzata dal fatto che contiene un composto di formula I, in cui R" rappresenta idrossi, -Phe-Val-Gln-Trp-Leu o -Met-Asn-Thr.
14. Composizione farmaceutica secondo le rivendicazioni 9, 10 o 13, caratterizzata dal fatto che contiene un composto di formula I, in cui R" è idrossi.

15. Uso di composti di formula I, specificati nella rivendicazione 1, preferibilmente dei composti utilizzati secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 2 a 5, o di un sale di essi, per la preparazione di farmaci aventi un effetto di rilascio dell'insulina.
16. Composto di formula I specificato nella rivendicazione 1, preferibilmente i composti utilizzati secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 2 a 5, per l'uso come agente rilasciante l'insulina.
17. Un agente di rilascio di insulina caratterizzato dal fatto che comprende un composto di formula I, specificato nella rivendicazione 1, preferibilmente i composti utilizzati in accordo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 2 a 5.
18. Uso di un composto di formula I, specificato nella rivendicazione 1, preferibilmente dei composti utilizzati in accordo con una qualsiasi delle rivendicazioni da 2 a 5, per il trattamento di persone aventi normalmente una produzione troppo bassa di insulina.
19. Metodo per il trattamento o per la prevenzione dell'iperglicemia, caratterizzato dal fatto che si somministra, allo scopo di rilasciare insulina, un composto di formula I stabilito nella rivendicazione 1, preferibilmente i composti utilizzati in accordo con una qualsiasi delle rivendicazioni da 2 a 5.
20. Qualunque nuova caratteristica o combinazione di caratteristiche qui descritte.

Milano, 22 dicembre 1982



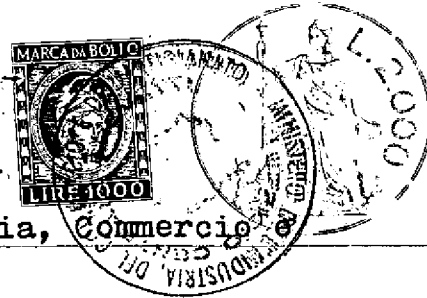
l'Ufficiale Rogante
(Adilia Russo)

[Signature]

Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.

Maria Bianchetti

COPIA DI ORIGINARIO DEPOSITO



1080 M

On.le Ministero dell'Industria, Commercio e

00035

Artigianato

Ufficio Centrale Brevetti

R O M A .

OGGETTO - Domanda di brevetto per invenzione industriale avente per titolo: "USO DI PEPTIDI COME MEDI

CAMENTI" depositata in data 22 dicembre 1982 al n. 24915 A/82 a nome: NOVO INDUSTRI A/S, Novo Allé, 2880 BAGSVAERD (Danimarca)

Con riferimento alla domanda di brevetto in oggetto si richiede che nel testo della descrizione vengano apportate le seguenti correzioni formali:

POSTILLA N. 1

A pagina n. 5, ottava riga dal basso, inserire una parentesi rotonda subito dopo il numero "25".

POSTILLA N. 2

A pagina n. 10, ottava riga dal basso, far seguire un trattino subito dopo l'ultima parola della riga, vale a dire "glucagone".

POSTILLA N. 3

A pagina n. 11, decima riga dall'alto, si effettui la stessa correzione indicata in postilla n. 2.

POSTILLA N. 4

A pagina n. 15, nell'ultima riga della tabella V,

sopprimere il punto esclamativo.

Le suddette correzioni vengono richieste a norma dell'art.49, D.P.R. 22/6/1979, n.338.

Con ossequi.

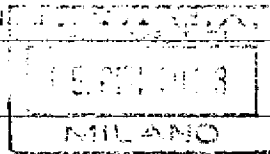
Milano, 5 gennaio 1983

Allegati:

- 1) 1 copia del testo contenente le rettifiche incorporate;
- 2) 2 copie delle pagine n. 5, 10, 11 e 15, errate;
- 3) 2 copie della pagina n. 20, contenente le postille.

✠

Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.
Teatina Bianchelli



l'Ufficiale Rogante
(Willie Russo)

[Handwritten signature]

• ALLEGATO A

Rettifiche alla domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo: "Uso di peptidi come medicinali" depositata in data 22 dicembre 1982 al n. 24915 A/82 a nome: NOVO INDUSTRI A/S, Novo Allé, 2880 BAGSVAERD (Danimarca), contenute in n. 4 postille richieste con istanza depositata il 5 gennaio 1983

POSTILLA N. 1

A pagina n. 5, ottava riga dal basso, inserire una parentesi rotonda subito dopo il numero "25".

POSTILLA N. 2

A pagina n. 10, ottava riga dal basso, far seguire un trattino subito dopo l'ultima parola della riga, vale a dire "glucagone".

POSTILLA N. 3

A pagina n. 11, decima riga dall'alto, si effettui la stessa correzione indicata in postilla n. 2.

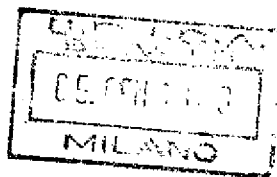
POSTILLA N. 4

A pagina n. 15, nell'ultima riga della tabella V, sopprimere il punto esclamativo.

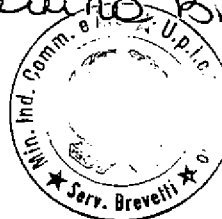
Per approvazione.

Milano, 5 gennaio 1983

Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.



Mauro Bianchetti



l'Ufficiale Delegato
(idillia E. ...)

[Signature]

tico su cellule grasse libere di ratto, in vitro, e dal loro effetto sull'attivazione della adenilciclasi in vitro, sono di secondaria importanza paragonati agli effetti metabolici del glucagone. Non sono stati trovati effetti metabolici dopo somministrazione in vivo a ratti tenuti a digiuno o alimentati secondo le tecniche usuali.

Per cui, i composti di formula I o i loro sali possono essere utilizzati come agenti di rilascio di insulina. I composti di formula I o i loro sali sono quindi utili per il trattamento di diabetici, per esempio, di quelli con funzione residua di cellule beta. Il fatto che i composti di formula I mostrino anche effetto spasmolitico ed effetto inibitore sulla secrezione acida gastrica, non ne precluderà l'uso come agenti di rilascio dell'insulina in molti, se non in tutti i casi. Al contrario, la combinazione degli effetti potrà provocare un vantaggio, per esempio, nei diabetici di tipo 2.

Come esempi specifici possono essere menzionati i composti noti di formula I: glucagone(1-21), glucagone(1-23), glucagone(1-25), glucagone(1-26) e des(22-26)glucagone. I rimanenti composti di formula I e i loro sali possono essere preparati mediante metodi che, generalmente, sono noti nella sintesi peptidica, e in relazione a ciò si fa riferimento, per esempio, a: domanda di brevetto danese No. 2885/81; Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 362 (1981), 665 - 677; Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl), Ed.: Müller, Vol. XV/1 + 2, G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1974; The Pep

cilmente, per esempio, dal glucagone naturale. Come esempi di sali di composti di formula I possono essere citati i sali di sodio, potassio, magnesio, calcio e zinco e i sali di addizione con acidi organici o inorganici, come l'acido formico. Sali preferiti dei composti di formula I sono i sali fisiologicamente e farmaceuticamente accettabili.

La presente invenzione si riferisce anche a una composizione farmaceutica comprendente un composto di formula I o un sale di esso e uno o più veicoli farmaceuticamente accettabili, diluenti, preferibilmente acqua, e/o eccipienti, quando utilizzata come farmaco rilasciante insulina. Come esempi di tali veicoli convenzionali possono essere citati i conservanti, per esempio metil o propil p-idrosibenzoato, e cloruro di sodio.

Qualunque nuova caratteristica o combinazione di caratteristiche qui descritte è considerata essenziale.

Le abbreviazioni di tre lettere per gli amino acidi, qui utilizzate, sono stabilite in J. Biol. Chem. 243 (1968), 3558. Per brevità, il glucagone-(1-21)-eneicosapeptide qui è stato chiamato glucagone ^{POSTULAN. 2} (1-21), e analogamente, questo avviene per il glucagone(1-23), per il glucagone(1-25) e per il glucagone(1-26). Inoltre, il des-pentapeptide-(22-26)-glucagone è stato chiamato des(22-26)glucagone.

Il seguente esempio, che non viene tuttavia considerato limitativo, è presentato per illustrare l'invenzione.

ESEMPIO

Una preparazione per somministrazione parenterale, contenente 1

.mg di glucagone(1-21) per ml, può essere preparata come segue:

1 g di glucagone(1-21) e 99 g di lattosio sono sciolti in un litro d'acqua distillata e il valore del pH viene regolato a 7,0.

La soluzione viene poi sottoposta a filtrazione sterilizzante. La soluzione sterile viene posta in 10 fiale in modo tale che ogni fiala contenga 1,0 ml della soluzione. Le soluzioni vengono poi

liofilizzate e le fiale vengono sigillate in condizioni asettiche.

La preparazione in ciascuna delle fiale deve essere sciolta in 1,0 ml di acqua sterile prima della somministrazione.

Ulteriori esempi di preparazione di preparati contenenti glucagone (1-21) sono descritti nella domanda di brevetto danese No. 2885/81.

Preparazioni contenenti altri composti di formula I sono ottenute in modo analogo.

ESPERIMENTO A:

Effetto sul rilascio-IRI in ratti in vivo.

10 ratti maschi, ceppo Wistar, 150 g (+/- 5 g) furono anestetizzati con Pentobarbitale. Cateteri di polietilene furono inseriti nella arteria carotide destra per il campionamento del sangue, e nella vena giugulare sinistra per le infusioni. I ratti furono divisi in due gruppi di cinque animali per ciascun gruppo. Un gruppo fu sottoposto a infusione con glucosio (1,5 mg/min) per 0-60 minuti (placebo) e un gruppo fu sottoposto a infusione con glucosio (1,5 mg/min) + glucagone(1-21) (100 µg/kg/h) per 0-60 minuti. Il sangue fu campionato in provette su ghiaccio contenenti eparina (250 UI/ml) e aprotinina (600 KUI/ml) ai tempi 0, 1, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minuti. L'in-

(5 g/kg) per via perorale a 0 e 60 minuti + placebo (soluzione fisiologica con HSA) o glucagone(1-21) (1 mg/kg/h) per 0-120 minuti, per via endovenosa. Campioni ematici furono prelevati da una vena dell'orecchio ai tempi -5, 10, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 105, e 120 minuti, il glucosio plasmatico fu saggiato mediante il metodo della esochinasi. I valori di glucosio plasmatico sono riportati nella Tabella V qui sotto.

TABELLA V

	Glucosio plasmatico, mg/ml										
Placebo	0,8	1,3	1,8	2,2	2,5	2,5	2,7	2,8	2,7	2,4	
Glucagone-(1-21)	0,8	1,0	1,4	1,7	1,8	1,9	1,8	1,7	1,7	2,1	
Tempo, min	(!)-5	10	20	30	45	60	75	90	105	120	

ESPERIMENTO D:

→ POSTILLA N. 4

Studi dell'effetto del glucagone e del glucagone(1-21) sui livelli di glucosio plasmatico e di IRI plasmatica in ratti normoglicemici. Glucagone (1 mg/kg) e una dose equimolecolare di glucagone(1-21), cioè 0,77 mg/kg, furono iniettati per via endovenosa al tempo di partenza (tempo: 0 minuti) a ratti maschi Wistar normalmente alimentati, del peso di 150 g (+/- 5 g). Vennero presi campioni di sangue dal plesso orbitale ai tempi -5, 2, 5, 10, 15, 30, e 60 minuti. Il glucosio ematico fu saggiato in accordo con il metodo della esochinasi, e l'insulina plasmatica fu saggiata mediante RIA. Il glucagone aveva un effetto significativo di aumento sul glucosio ematico e sulla IRI plasmatica. Al contrario del glucagone, il glucagone(1-21)