



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

UIBM

DOMANDA NUMERO	101996900530138
Data Deposito	08/07/1996
Data Pubblicazione	08/01/1998

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

DERIVATI SINTETICI E SEMISINTETICI DI SOMATOSTATINE UTILI NELLA STIMOLAZIONE DELLA CRESCITA CORPOREA, IN PARTICOLARE IN ASSOCIAZIONE CON L-AMINOACIDI O OLIGOPEPTIDI

DOX.019

Notarbartolo & Gervasi s.r.l.

Domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo:

"Derivati sintetici e semisintetici di somatostatine utili nella stimolazione della crescita corporea, in particolare in associazione con L-aminoacidi o oligopeptidi"

a nome: DOX-AL ITALIA S.p.A.

MI 96 A 1408

con sede in: CORREZZANA (MI)

inventori designati: VOLPATO Ivo, BIZZINI Bernard, GRABITZ Ernst
Bernhard

Depositata il

con il N.

28 LUG. 1996

** ** *

Campo dell'invenzione

La presente invenzione riguarda nuovi derivati sintetici o semisintetici della somatostatina la cui somministrazione, nell'uomo e nell'animale, è in grado di produrre un significativo incremento dell'indice e della velocità della crescita corporea, in sostanziale assenza di effetti collaterali di rilievo.

E' inoltre riportato che la somministrazione in associazione a dette somatostatine modificate chimicamente di L-aminoacidi, in particolare L-arginina, preferibilmente come piroglutammato, o di oligopeptidi, in particolare contenenti L-aminoacidi quali L-arginina ed almeno un residuo di acido piroglutammico, produce un effetto sinergico sulla crescita corporea.

L'interazione farmacologica con gli indici di crescita riveste considerevole importanza sia in campo umano, per correggere patologie connesse a ritardato o ridotto sviluppo, sia in campo

veterinario per accelerare, ad esempio, i cicli di crescita degli animali in allevamento.

Lo sviluppo corporeo è regolato principalmente dall'ormone della crescita (GH), sintetizzato in specifiche cellule acidofile, definite somatotrofi, che costituiscono buona parte dei pituiciti. Il controllo della sua secrezione, da parte del SNC, è mediato da due fattori ipotalamici: il fattore di rilascio (GHRH) ed il fattore di inibizione del rilascio (SRIF-somatostatina).

Gli effetti metabolici e di promozione della crescita da parte dell'ormone sono legati alla capacità dello stesso di stimolare la produzione di somatomedine e alla loro attività di mediatori dell'azione dell'ormone somatotropo (W.H. Daughaday, Clin. Endocrinol., Metab. (1977), 6, 117).

Vari composti, fra cui neurotrasmettitori, ormoni e metaboliti, sono in grado di alterare la secrezione di ormone agendo a livello ipotalamico ed influenzando la sintesi di GHRH o SRIF.

Inoltre, esercizio, stress, eccitamento emozionale, assunzione di pasti ricchi di proteine, rappresentano i normali stimoli in grado di incrementare la secrezione di ormone.

Tecnica anteriore

Sono noti diversi approcci farmacologici per conseguire stimolazione della crescita corporea attraverso meccanismi che coinvolgono la secrezione ed attivazione dell'ormone somatotropo endogeno. Un primo tipo di trattamento è rappresentato dalla somministrazione dello stesso ormone GH, estratto da materiale

umano, riprodotto in vitro da cellule pituitarie in coltura, oppure ottenuto con la tecnica da DNA ricombinante.

I derivati di ricombinazione attualmente noti, definiti sintetici, sono il metionil-GH (Somatrem), che risulta molto più antigenico del corrispondente naturale, ottenuto per estrazione, ed un analogo di ricombinazione a più basso potere immunogenico denominato somatotropina (Somatotropin).

L'assorbimento dell'ormone GH e dei suoi derivati avviene per via intramuscolare o sottocutanea e gli effetti dell'ormone risultano abbastanza prolungati nel tempo. Tuttavia, il trattamento con GH può essere associato con lo sviluppo di ipotiroidismo e, frequentemente, con produzione di anticorpi (D.R. Marshk, D.T. Liu eds., Banbury Report 29: Therapeutic Peptides and Proteins: Assessing the New Technologies, Cold Spring Harbor Lab., N.Y., 1988).

Un altro tipo di trattamento è rappresentato dalla immunizzazione nei confronti dello stesso ormone della crescita che, per un effetto di "feedback", può generare un aumento dell'attività somatotrofica endogena (D. Flint, AFRC News, 1989, July 4).

L'immunizzazione attiva di animali con peptidi corrispondenti ad epitopi del GH può indurre produzione di anticorpi in grado di incrementare l'attività somatotropa del GH endogeno [A. Holder, J. Ivany, R. Aston, Molec. Immunol., (1987), 24, 143].

E' possibile intervenire sull'ormone della crescita anche agendo direttamente su modulatori della sua biosintesi.

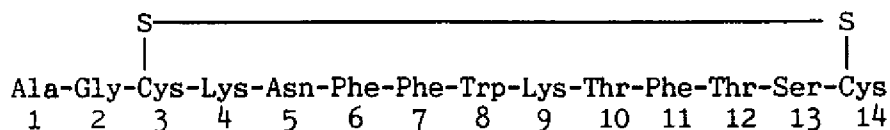
Recentemente sono stati sintetizzati analoghi strutturali dell'ormone di rilascio dell'ormone della crescita (GHRH) aventi 29 aminoacidi in grado di sviluppare la stessa attività dell'ormone naturale.

La somministrazione endovenosa dell'analogo sintetico del GHRH nell'uomo stimola rapidamente il rilascio di ormone della crescita. Tuttavia, nel trattamento a lungo termine, la secrezione di ormone della crescita rimane pulsatile, con contemporaneità di effetti inibitori.

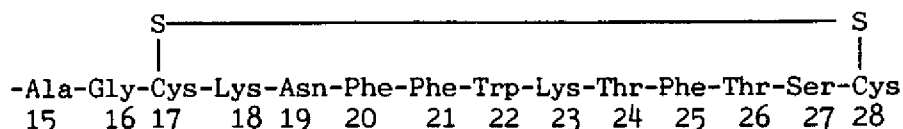
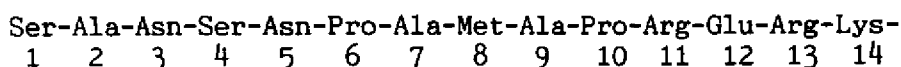
La somatostatina (Somatotropin Release Inhibiting Factor - SRIF) è prodotta dalle isole pancreatiche in risposta ai molti stimoli ed ormoni in grado di evocare la secrezione di insulina e di ormone della crescita. L'ormone inibisce anche numerose secrezioni gastrointestinali quali quella della gastrina, acido gastrico, secretina, CCK, peptide vasointestinale (VIP) ed enzimi digestivi, con la possibile conseguenza di provocare malassorbimento ed altri effetti collaterali.

La somatostatina viene biosintetizzata come precursore di 116 aminoacidi, che vengono proteoliticamente scissi a peptidi con 14 o 28 aminoacidi residui.

Sono di seguito riportate le struttura della somatostatina a 14 residui aminoacidici, o somatostatina 14 commercializzata ad esempio come Sigma^R S 9129, (cfr. Catalogo Biochemicals, ICN, 1992-1993, pagina 1009):



e quella della somatostatina a 28 aminoacidi, nota anche come prosomatostatina o somatostatina-28 (cfr. Catalogo Biochemicals, ICN, 1992-1993, pagina 1009).



Sono note somatostatine biologicamente attive, fisiologiche, sia di origine sintetica, che di origine estrattiva.

La somatostatina esercita i suoi effetti farmacologici legandosi a recettori specifici di superficie delle cellule target.

E' nota l'attività dell'arginina nell'influenzare i livelli cerebrali di glutamina e quella di antagonismo nei confronti di sostanze ad azione depressiva. Tali effetti risultano significativamente potenziali allorchè l'aminoacido viene somministrato come sale con acido D,L-piroglutammico (P.M. Provenzano, A. Brucato, S. Gianguzza, A. Coppola, G. Orzalesi, R. Selleri, F. Innocenti e I. Volpato, *Arzneim. Forsch./Drug Res.*, 1977, 27(II), 8, pag. 1533).

Problema tecnico

Gli inconvenienti riscontrabili con i trattamenti sopra illustrati possono essere così riepilogati:

- a. la correzione farmacologica della carenza di ormone della crescita GH, promossa con trattamento sostitutivo, può indurre un consistente rischio di produzione di anticorpi ed una serie di reazioni a cascata con conseguente inibizione della biosintesi endogena e contemporanea attivazione di quella degli inibitori;
- b. meccanismi simili si generano allorchè si somministrano i principali modulatori, attivatori ed inibitori, della biosintesi dell'ormone stesso, GHRH e SRIF;
- c. un ausilio farmacologico derivante da fattori nutritivi, allo stato attuale, risulta alquanto complesso in derivazione del fatto che famiglie simili di nutrienti possono influenzare contestualmente sia la biosintesi di ormone che del suo principale inibitore.

Sommario

Ora la Richiedente ha inaspettatamente trovato che alcune somatostatine modificate chimicamente sono in grado di stimolare la crescita corporea nell'animale e nell'uomo, ed inoltre che la somministrazione in associazione a dette somatostatine modificate chimicamente di L-aminoacidi, in particolare L-arginina, ed oligopeptidi, produce un effetto sinergico.

Le modifiche chimiche rispetto alla struttura delle somatostatine di sintesi sono state la sostituzione del residuo di lisina (Lys) in posizione 4 di somatostine 14 o in posizione 18 di somatostatine 28, con un residuo di acido glutammico (Glu); oppure la sostituzione con serina (Ser) del residuo di

fenilalanina (Phe) in posizione 6, 7, o entrambe della somatostatina 14, o in posizione 14, 20 o entrambe della somatostatina 28.

Le modifiche chimiche apportate a somatostatine estrattive a 14 o 28 aminoacidi sono state: la carbossimetilazione; la polimerizzazione in presenza di derivati aldeidici; coniugazione con poliaminoacidi o con residui di acidi grassi; alchilazione riduttiva, amidinazione, maleilazione, carbonilazione; carbetossilazione; nitratura; trattamento con formaldeide e fotossidazione.

Rappresentano pertanto oggetto della presente invenzione i seguenti derivati di somatostatine:

- a) derivato della somatostatina 14 di sintesi, avente un residuo Glu in posizione 4 (in sostituzione del residuo Lys);
- a') derivato della somatostatina 28 di sintesi, avente un residuo Glu in posizione 18 (in sostituzione del residuo Lys);
- b) derivato della somatostatina 14 di sintesi, avente un residuo Ser in posizione 6, in posizione 7, o in entrambe dette posizioni (in sostituzione del residuo Phe);
- b') derivato della somatostatina 28 di sintesi, avente in un residuo Ser in posizione 20, 21 o in entrambe dette posizioni (in sostituzione del residuo Phe);
- c) derivato di somatostatine, rappresentato dal prodotto di carbossimetilazione di somatostatine estrattive a 14 o a 28 aminoacidi;

- d) derivato di somatostatine, rappresentato dal prodotto di polimerizzazione di somatostatina estrattiva a 14 o 28 aminoacidi;
- e) derivato di somatostatine, rappresentato dal coniugato fra una somatostatina estrattiva a 14 o 28 aminoacidi ed un poliamminoacido;
- f) derivato di somatostatine estrattive, rappresentato dal coniugato fra somatostatina estrattiva a 14 o 28 aminoacidi ed almeno un acido grasso;
- g) derivato di somatostatine estrattive, rappresentato dal prodotto di alchilazione riduttiva di somatostatina estrattiva a 14 o a 28 aminoacidi;
- h) derivato di somatostatine estrattive, rappresentato dal prodotto di amidinazione di somatostatina estrattiva a 14 o a 28 aminoacidi;
- i) derivato di somatostatine estrattive, rappresentato dal prodotto di maleilazione di somatostatina estrattiva a 14 o a 28 aminoacidi;
- l) derivato di somatostatine estrattive, rappresentato dal prodotto di carbonilazione di somatostatina estrattiva a 14 o a 28 aminoacidi;
- m) derivato di somatostatine estrattive, rappresentato dal prodotto di carbetossilazione di somatostatina estrattiva a 14 o a 28 aminoacidi;
- n) derivato di somatostatine estrattive, rappresentato dal

prodotto di nitrurazione di somatostatina estrattiva a 14 o a 28 aminoacidi;

o) derivato di somatostatine estrattive, rappresentato dal prodotto di reazione di somatostatina estrattiva a 14 o a 28 aminoacidi con formaldeide;

p) derivato di somatostatine estrattive, rappresentato dal prodotto di fotoossidazione di somatostatina estrattiva a 14 o a 28 aminoacidi;

q) derivato di somatostatine estrattive, rappresentato dal prodotto di acetilazione di somatostatina estrattiva a 14 o a 28 aminoacidi.

Rappresentano inoltre oggetto della presente invenzione il procedimento di preparazione delle suddette somatostatine, le composizioni farmaceutiche che le contengono ed il loro impiego nell'uomo e nell'animale in tutte le situazioni, patologiche o non, in cui è desiderabile promuovere crescita e sviluppo corporeo, in particolare nel trattamento di patologie connesse a ritardato o ridotto sviluppo corporeo nell'animale e nell'uomo; in campo veterinario per accelerare, ad esempio, i cicli di crescita degli animali in allevamento.

In ulteriore aspetto della presente invenzione è rappresentato dall'impiego dei presenti derivati di somatostatine in associazione con almeno un composto scelto fra L-aminoacidi, oligopeptidi contenenti almeno un residuo di acido piroglutammico ed almeno un residuo di L-aminoacido, oligopeptidi contenenti

almeno un residuo di L-aminoacido basico, e relativi sali con acidi o basi farmaceuticamente accettabili, in tutte le situazioni come sopra definite. Ulteriori oggetti della presente invenzione risultano dal presente testo.

Descrizione dettagliata

Le modificazioni chimico-strutturali sono state apportate in genere nella regione 3-14 di somatostatine 14 o nella regione 17-28 di somatostatine 28, ottenute per sintesi o per via estrattiva.

Le abbreviazioni utilizzate nel presente testo per indicare gli aminoacidi e/o i residui aminoacidici presenti nelle sequenze aminoacidiche, sono quelli convenzionali, riportati ad esempio in testi di biochimica, quale Biochemistry, L. Stryer, W.H. Freedman and Company, 3rd edition, 1988, N.Y., pagine 20-22.

Salvo diversa indicazione, la configurazione degli aminoacidi e dei residui aminoacidici presenti nelle sequenze peptidiche delle somatostatine è quella L (per i poliaminoacidi può essere L o D).

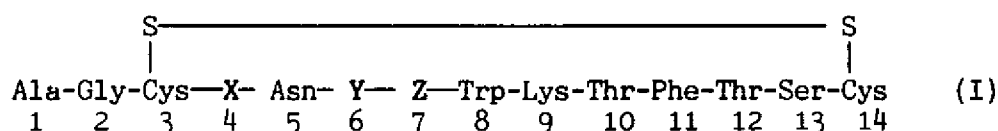
Le somatostatine aventi 14 o 28 aminoacidi sono per semplicità rispettivamente indicate come somatostatine 14 o 28.

Per somatostatine di sintesi o estrattive si intendono somatostatine biologicamente attive, dotate cioè dell'attività fisiologica propria della somatostatina endogena, ottenute rispettivamente per sintesi o per via estrattiva, distinte dai derivati secondo la presente invenzione, che hanno subito

modificazioni chimiche.

Si riportano di seguito alcuni esempi particolari di derivati somatostatinici secondo la presente invenzione :

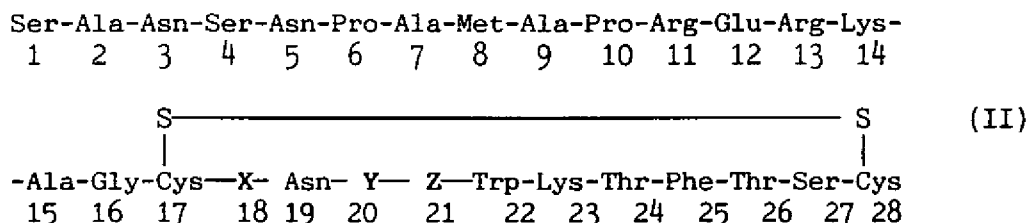
- derivato di somatostatina 14 di sintesi scelto fra i derivati di formula (I):



in cui :

- A) X è Glu; Y è Phe e Z è Phe;
- B) X è Lys; Y è Ser e Z è Ser;
- C) X è Lys; Y è Phe e Z è Ser;
- D) X è Lys; Y è Ser e Z è Phe;

- derivato di somatostatina 28 di sintesi scelto fra i derivati di formula (II):



in cui:

- A') X è Glu; Y è Phe e Z è Phe;
- B') X è Lys; Y è Ser e Z è Ser;
- C') X è Lys; Y è Phe e Z è Ser;
- D') X è Lys; Y è Ser e Z è Phe.

Fra i derivati delle somatostatine secondo la presente

invenzione, sono preferiti i derivati di somatostatine a 14 aminoacidi, sia quelli di sintesi, aventi 14 aminoacidi, come i derivati a) e b) come sopra definiti, e più in particolare i composti di formula (I) A), B), C) e D), sia i derivati semisintetici da c) a o), ottenuti modificando chimicamente somatostatine estrattive a 14 aminoacidi.

I derivati delle somatostatine di sintesi secondo la presente invenzione sono preparati per sintesi totale a partire dai singoli aminoacidi che le compongono, eventualmente in forma opportunamente protetta, seguendo metodologie convenzionali, ad esempio adattando opportunamente le sintesi già note per la preparazione di somatostatine sintetiche. Secondo una forma di realizzazione tipica della presente invenzione, le presenti somatostatine di sintesi sono preparate mediante sintesi peptidica automatizzata su fase solida, secondo il metodo di Merrifield B., Science, 232, 341-7 (1986) (si veda anche Biochemistry, L. Stryer, W.H. Freedman and Company, 3rd edition, 1988, N.Y., pag. 65-66).

Gli aminoacidi utilizzati per la sintesi sono noti, commercialmente disponibili e comunque si ottengono secondo metodologie note.

Le somatostatine di origine estrattiva utilizzate come materiali di partenza sono state ottenute come descritto da B.D. Noe, J. Spless, J.E. Rivier e W. Vale, Endocrinol., (1979), 105, pag. 1410, e comunque sono commercialmente disponibili.

I presenti derivati di somatostatine ottenuti per carbossimetilazione sono tipicamente preparati con un metodo riduttivo, facendo reagire una somatostatina estrattiva a 14 o a 28 aminoacidi, preferibilmente a 14 aminoacidi, con acido gliossilico in presenza di cianoboroidruro, seguendo tipicamente la metodologia riportata da T. Piao King, L. Kochoumian, L. M. Lichtenstein, in Arch. Biochem. Biophys. King, (1977), 178(2), 442-50.

I derivati di somatostatine così ottenuti contengono ad esempio residui di Cys carbossimetilati allo zolfo [indicato come Cys(SCOCH₃)], in posizione 3, 14 o in entrambe tali posizioni della somatostatina a 14 aminoacidi, oppure in posizione 17, 28 o in entrambe della somatostatina a 28 aminoacidi. Possono essere parzialmente o totalmente carbossimetilati anche i residui di lisina.

Riduzione e carbossimetilazione possono essere effettuate in presenza di G M GUA, sia in accordo a Crestfield et al., (Crestfield A.M., Moore S., Stein J.H.: The preparation and enzymatic hydrolysis of reduced and S-carboxymethylated proteins, J. Biol. Chem., 288, 622-627, 1969) con 2-MeOH, sia in accordo a Butler et al. (Butler P.J.G., Harris J. I., Hartely B.S., Leberman R.: The use of maleic anhydride for the reversible blocking of amino groups in polypeptide chain, Biochem. J., 112, 679-689 (1969)).

Secondo una forma di realizzazione tipica della presente

invenzione, i derivati di somatostatine polimerizzati sono ad esempio preparati per trattamento di una somatostatina estrattiva 14 o 28, preferibilmente a 14 aminoacidi, con un derivato aldeidico, ad esempio una dialdeide, quale glutaraldeide. Si può ad esempio seguire la metodologia riportata in S. Avrameas, Immunochimistry, Pergamon Press, 1969, 6, 43-52.

Ad esempio, si tratta la somatostatina estrattiva, in ambiente acquoso, con glutaraldeide, a pH generalmente compreso fra 6,0 e 8,0, preferibilmente a pH di circa 6,7-6,9 (ad esempio in tampone fosfato), ad una temperatura compresa fra circa +4°C e circa +40°C, tipicamente a temperatura ambiente (+20°C/+25°C). La reazione è completa in circa 0,5-5 ore, tipicamente 3 ore.

La glutaraldeide è tipicamente utilizzata in eccesso stechiometrico rispetto ai gruppi $-NH_2$ della somatostatina (tipicamente si utilizzano da 10^{-4} a 10^{-5} moli di glutaraldeide ogni $10^{-5}/10^{-6}$ gruppi $-NH_2$ della somatostatina), e a fine reazione il suo eccesso è neutralizzato per trattamento con lisina nelle stesse condizioni di reazione utilizzate per la polimerizzazione.

Il prodotto di polimerizzazione così ottenuto è preferibilmente purificato per dialisi, tipicamente su membrane aventi limite di esclusione molecolare compreso fra circa 500 e 1000 Daltons, preferibilmente contro tampone avente pH 6,0-8,0, ad esempio contro tampone avente pH 7,0-7,5, quale il PBS (soluzione fisiologica/tampone fosfato). La dialisi è preferibilmente

effettuata a freddo (ad esempio fra circa $+4^{\circ}\text{C}$ e circa $+10^{\circ}\text{C}$), e consente di purificare il prodotto finale dalla glutaraldeide.

Il prodotto così ottenuto ha un grado di polimerizzazione preferibilmente compreso fra circa 3 e circa 6-8 unità ripetitive.

I poliaminoacidi utili per la coniugazione con somatostatine secondo la presente invenzione contengono tipicamente da 2 a circa 8-10 aminoacidi, aventi qualunque configurazione (D, L o miscele), e possono essere sia omopolimeri, che eteropolimeri.

Secondo una forma di realizzazione tipica della presente invenzione, si coniugano le somatostatine con poliaminoacidi aventi uno o più gruppi basici liberi, uno o più gruppi acidi liberi, o loro miscele. Questi poliaminoacidi contengono cioè aminoacidi basici o acidi, contenenti cioè un ulteriore gruppo basico o acido oltre ai gruppi α -amminici o α -carbossilici. Gli ulteriori gruppi basici o acidi sono in forma libera, non impegnata nel legame peptidico, disponibile a reagire nella successiva coniugazione con somatostatine.

Esempi tipici di gruppi basici sono i gruppi $-\text{NH}_2$ liberi, quali quelli della lisina, ed esempi tipici di gruppi acidi sono i gruppi $-\text{COOH}$ liberi, quali quelli dell'acido glutammico.

Vari di questi poliaminoacidi sono disponibili commercialmente, e comunque possono essere ottenute con metodiche convenzionali. Esempi tipici sono l'acido Poli-L-glutammico, ad esempio come sale sodico, ad esempio con peso molecolare a circa 600; e la

Poli-L-lisina, ad esempio a peso molecolare di circa 1000-4000. Secondo una forma tipica di realizzazione della presente invenzione, si tratta una somatostatina estrattiva a 14 o a 28 aminoacidi, preferibilmente a 14 aminoacidi, con almeno un poliamminoacido contenente gruppi $-NH_2$ liberi, in presenza di una dialdeide, quale glutaraldeide.

Anche in questo caso, si può ad esempio seguire la metodologia riportata nel riferimento di S. Avrameas, sopra citato.

Ad esempio, si fanno reagire la somatostatina estrattiva, il poliamminoacido contenente gruppi NH_2 liberi e la glutaraldeide, in ambiente acquoso, a pH generalmente compreso fra 6,0 e 8,0, preferibilmente a pH di circa 6,7-6,9 (ad esempio in tampone fosfato), ad una temperatura compresa fra circa $+4^{\circ}C$ e circa $+40^{\circ}C$, ad esempio a temperatura ambiente ($+20^{\circ}C/+25^{\circ}C$). La reazione è completa in circa 0,5-5 ore, tipicamente 3 ore.

Tipicamente, ad una miscela di somatostatina estrattiva e di poliamminoacido avente gruppi $-NH_2$ liberi, in ambiente acquoso, si aggiunge la glutaraldeide. La glutaraldeide è tipicamente utilizzata in eccesso stechiometrico rispetto ai gruppi $-NH_2$ del poliamminoacido (tipicamente si utilizzano da 10^{-4} a 10^{-5} moli di glutaraldeide ogni $10^{-5}/10^{-6}$ gruppi $-NH_2$). A fine reazione, l'eccesso di glutaraldeide è neutralizzato per trattamento con lisina nelle stesse condizioni di reazione utilizzate per la coniugazione.

Il prodotto di coniugazione così ottenuto è preferibilmente

purificato per dialisi, nelle condizioni sopra specificate per le somatostatine polimerizzate.

Per le metodologie di polimerizzazione o di coniugazione con poliaminoacidi in presenza di glutaraldeide, si veda anche N. Zegers, K. Gerritse, C. Deen, W. Boersma e E. Claassen, J. Immunol. Meth. (1990), 130, pag. 195.

La coniugazione di somatostatine con composti aventi gruppi -COOH liberi, quali poliaminoacidi o acidi grassi, è ad esempio effettuata per trattamento di una somatostatina estrattiva a 14 o a 28 aminoacidi con almeno un poliaminoacido avente uno o più gruppi -COOH liberi, o con almeno un acido grasso, in presenza di una carbodiimide. La reazione di coniugazione è tipicamente effettuata in ambiente acquoso, a pH preferibilmente compreso fra circa 5 e circa 6 (ad esempio a pH 5,5, in tampone acetato), ad una temperatura generalmente compresa fra circa +30°C e circa +40°C, tipicamente a +37°C.

I gruppi -COOH del poliaminoacido o dell'acido grasso, attivati per reazione con la carbodiimide, reagiscono con i gruppi -NH₂ liberi della somatostatina, con formazione di legame ammidico.

Ad esempio, si tratta il poliaminoacido contenente gruppi -COOH liberi [o l'acido grasso] con una carbodiimide, in eccesso stechiometrico rispetto ai gruppi -COOH, in ambiente acquoso, a pH preferibilmente alcalino, ad esempio a pH circa 8-10, ad una temperatura tipicamente compresa fra circa +10°C e circa +40°C, ad esempio a +37°C), e si tratta il prodotto così ottenuto con la

somatostatina, in ambiente acquoso, a pH preferibilmente compreso fra circa 5 e circa 6 (ad esempio a pH 5,5, in tampone acetato), ad una temperatura generalmente compresa fra circa +30°C e circa +40°C, tipicamente a +37°C.

I coniugati così ottenuti vengono preferibilmente purificati per dialisi, a freddo (+4°/+10°C circa).

La carbodiimide è preferibilmente una carbodiimide farmaceuticamente accettabile, i cui prodotti di reazione sono pure farmaceuticamente accettabili, tipicamente la N-etil-N'(dimetilaminopropil)carbodiimide.

Un esempio tipico di procedura di coniugazione in presenza di carbodiimide è riportata in E.C. Beuvery, G.J.A. Speijers, G.J.A. Lutz B.I.G., D. Freundenthal, V. Kanhai, B. Hagmans e H.J.G.M. Derks, in IABS/WHO/UCSF, Symposium on Use and Standardization of Chemically Defined Antigenes, San Francisco U.S., 1985, Develop. Biol. Standard, S. Karger Ed., Basel, (1986), Vol. 63, p. 117-28. Gli acidi grassi utili per la preparazione dei derivati di somatostatine secondo la presente invenzione possono essere sia saturi che insaturi, quali ad esempio acido palmitico, oleico, stearico, linolenico.

Secondo un'altra forma di realizzazione tipica della presente invenzione, si tratta una somatostatina estrattiva 14 o 28, preferibilmente a 14 aminoacidi, con almeno un poliamminoacido contenenti uno o più gruppi -SH liberi, in presenza di un reattivo ditiobifunzionale, quale 3-(2-piridil-ditio)propionato

(SPDP). Tipicamente, si può seguire la metodologia descritta D.A. Gadkari, H.A. Fields, e J.E. Maynard, in J. Virolog. Meth., (1985), 10, pag. 215.

I gruppi -SH liberi, cioè disponibili per la successiva reazione con le somatostatine, sono tipicamente forniti da residui di cisteina.

Nella preparazione dei coniugati fra somatostatine e poliaminoacidi di qualunque tipo, si utilizzano rapporti molari somatostatine: poliaminoacidi preferibilmente compresi fra 1:2 e 1:5.

Nella preparazione dei coniugati fra somatostatine ed acidi grassi, si utilizzano rapporti molari somatostatine: acidi grassi preferibilmente compresi fra 1:2 e 1:5.

I presenti derivati di somatostatine ottenuti per alchilazione riduttiva, amidinazione o maleilazione di somatostatine estrattive a 14 o a 28 aminoacidi sono tipicamente ottenuti seguendo le metodologie descritte da Bizzini B., Turpin A., Carroger G., Raynaud M., in Immunochemistry of tetanus toxin: effects of the modification of lysyl residues of tetanus toxin on its toxic and immunological activities, Proceedings, IV International Conference on Tetanus, Dakar, 1975 (o 1976), p. 145, Foundation Mèrjeux, Lyon.

La carbonilazione di somatostatine estrattive a 14 o a 28 aminoacidi è tipicamente effettuata seguendo la metodologia descritta da Robinson J. P., Pickiesimer J.B., Puett D., in

Tetanus Toxin: the effect of chemical modifications on toxicity, immunogenicity and conformation, J. Biol. Chem., 250, 7435 (1975).

Alchilazione riduttiva, amidinazione, maleilazione e carbonilazione comportano in particolare modifiche di uno o più residui di lisina delle somatostatine.

La carbetossilazione di somatostatine estrattive a 14 o 28 aminoacidi è ad esempio effettuata seguendo la metodologia riportata da Stein P., Biel H. : Modification of tetanus toxin with selective chemical reagents, Z. Immunitätsforsch, 145, 418 (1973).

La nitratura di somatostatine estrattive è preferibilmente effettuata per trattamento di una somatostatina estrattiva a 14 o 28 aminoacidi con tetranitrometano, seguendo ad esempio la metodologia di Koshland's (Bizzini B., Turpin A., Raynaud M., Immunochemistry of tetanus toxin: the nitration of tyrosyl residues in tetanus toxin., Eur., J. Biochem., 39, 171 (1973).

La nitratura comporta in particolare modifiche chimiche a carico di uno o più residui di triptofano delle somatostatine.

Il trattamento con formaldeide di somatostatine estrattive a 14 o a 28 aminoacidi è tipicamente effettuato seguendo la metodologia di Bizzini H., Raynaud M., (1974) : La détoxification des toxines protéiques par le formel: mécanismes supposés et nouveaux développements, Biochimie, 56, 297 (1974).

La fotoossidazione di somatostatine estrattive a 14 o a 28

aminoacidi è tipicamente effettuata seguendo la metodologia riportata nel sopra citato riferimento di Stein P., Biel H. in Z. Immunitätforsch, 145, 418 (1973).

La acetilazione di somatostatine estrattive a 14 o a 28 aminoacidi è tipicamente effettuata seguendo la metodologia di Habermann B., Discrimination between binding to CNS, toxicity and immunoreactivity of derivatives of tetanus toxin, Med. Microbiol. Immunol., 159, 89 (1973).

I presenti derivati delle somatostatine trovano applicazione in particolare:

- a. nell'uomo, nella correzione dei difetti della crescita;
- b. in zootecnia, per l'accelerazione delle curve di crescita degli animali in allevamento.

Nei soggetti trattati, la somministrazione dei presenti derivati stimola la crescita corporea senza produrre effetti collaterali di evidente entità.

Negli animali in allevamento, non si hanno alterazioni della qualità della carne.

La via di somministrazione tipica dei derivati di somatostatine secondo la presente invenzione è la via parenterale, in particolare intramuscolare o sottocutanea.

Le presenti composizioni farmaceutiche si preparano secondo tecniche convenzionali, quali quelle riportate in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990. Esse comprendono almeno un derivato di somatostatine secondo la presente invenzione, in

quantità terapeuticamente efficace, in combinazione con uno o più eccipienti o diluenti farmaceuticamente accettabili, o loro miscele.

Sono preferite le preparazioni iniettabili, comprendenti almeno un derivato di somatostatina dell'invenzione, ed almeno un diluente in cui tale derivato viene disperso, disciolto o emulsionato, ad esempio acqua per preparazioni iniettabili, ed eventualmente altri eccipienti. Le presenti preparazioni iniettabili possono essere ad esempio in forma di vials per la preparazione estemporanea del liquido da iniettare, comprendenti ad esempio un primo vial contenente il derivato della somatostatina in forma solida, ed un secondo vial contenente il diluente, da aggiungere al primo vial momento della somministrazione.

Sono ulteriormente preferite le preparazioni iniettabili a rilascio ritardato, che possono essere preparate con metodi analoghi a quelli noti per la preparazione delle forme ritardo dell'insulina.

La Richiedente ha sorprendentemente trovato che la somministrazione di L-aminoacidi e degli oligopeptidi sopra menzionati in associazione ai presenti derivati di somatostatine è in grado di potenziarne l'effetto in modo sinergico. Inoltre, la loro somministrazione in forma salificata con acido piroglutamico (abbreviato nel presente testo come Pyr), produce un livello significativamente maggiore di attivazione della

crescita rispetto alla somministrazione degli aminoacidi come basi libere.

L'acido piroglutammico può essere in forma D, L o relative miscele; tipicamente, è in forma racema (D,L), abbreviata come D,L-Pyr.

Gli L-aminoacidi utili come stimolatori della crescita sono quelli naturali, e sono preferibilmente basici (aventi ulteriori gruppi basici oltre all' α -NH₂), quali L-arginina e L-lisina. Fra gli aminoacidi da associare alla somatostatine, è preferita la L-arginina, ed è ulteriormente preferito il sale della L-arginina con acido D,L-piroglutammico, di cui era già noto l'impiego come agente neurotrofo, ma non era stato descritto o suggerito l'uso come adiuvante nella stimolazione della crescita corporea (si veda il riferimento prima citato di P.M. Provenzano et al. su *Arzneim. Forsch./Drug. Res.*, del 1977).

Gli oligopeptidi sono preferibilmente dipeptidi, tripeptidi e tetrapeptidi, e contengono L-aminoacidi naturali. Essi contengono preferibilmente almeno un residuo scelto fra L-arginina, L-lisina e loro miscele.

Gli oligopeptidi contenenti almeno un aminoacido basico contengono in particolare oligopeptidi uno o più residui di L-arginina, L-lisina o loro miscele. Un esempio è Lys-Arg-Arg.

A conoscenza della Richiedente, gli oligopeptidi contenenti almeno un residuo di acido piroglutammico sono nuovi, e rappresentano un ulteriore oggetto della presente invenzione. Essi

sono ottenuti secondo tecniche convenzionali. Tali oligopeptidi contengono tipicamente un solo residuo di acido piroglutammico, posto all'inizio della sequenza aminoacidica. Esempi preferiti sono :

D,L-Pyr-Arg-Arg

D,L-Pyr-Arg-Arg-Arg.

I suddetti L-aminoacidi, oligopeptidi e relativi sali come sopra definiti sono preferibilmente somministrati per via orale, come tali, come composizioni farmaceutiche, oppure, preferibilmente, sono direttamente aggiunti alla dieta alimentare in forma di integratori, specie in campo zootecnico.

Le composizioni farmaceutiche contenenti i suddetti L-aminoacidi, oligopeptidi, o relativi sali, in associazione con uno o più eccipienti farmaceuticamente accettabili, preperate secondo tecniche convenzionali, rappresentano un ulteriore aspetto della presente invenzione.

I suddetti L-aminoacidi ed oligopeptidi possono essere somministrati anche per via iniettabile : in questo caso sono preferibilmente somministrati dopo i presenti derivati di somatostatine, in genere dopo circa 2-3 ore.

Tipicamente, si somministrano i presenti derivati di somatostatine per via parenterale, in associazione ai suddetti L-aminoacidi, oligopeptidi, o relativi sali, somministrati per via orale.

Si riportano di seguito schemi tipici di dosaggio dei derivati

somatostatinici secondo la presente invenzione, e dei suddetti L-aminoacidi ed oligopeptidi, e relativi sali, come sopra definiti.

A. Derivati somatostatinici:

a. Impiego in campo umano, per via parenterale (tipicamente per via sottocutanea o intramuscolare):

i dosaggi giornalieri in campo umano sono ad esempio corrispondenti a quelli utilizzati per la somministrazione di somatostatine nel trattamento del gigantismo;

il dosaggio giornaliero è preferibilmente ripartito in una o più somministrazioni.

b. Impiego in campo veterinario, per via parenterale (tipicamente per via sottocutanea):

da 20 a 100 nanogrammi per kg di peso corporeo al giorno, tipicamente una volta ogni uno/tre giorni.

E' preferita la somministrazione di una forma farmaceutica a rilascio lento (ad esempio analoga a quelle note per l'insulina).

B. L-aminoacidi e relativi sali, oligopeptidi come sopra definiti e relativi sali:

in campo umano e veterinario:

da 20 a 100 mg per kg di peso corporeo al giorno (/die) per via orale (oppure da 10 a 30 mg per Kg di peso corporeo al giorno per via intramuscolare).

C. Durata del trattamento : variabile a seconda la specie; in media da 15 giorni a 3 mesi, in relazione ai risultati osservati. Nell'uomo, il trattamento può essere ripetuto a cicli, ad esempio

annuali.

Parte sperimentale

Esempio 1. Preparazione del sale dell'acido D,L-pirolglutammico con L-arginina.

Si scioglie la L-arginina in minima quantità di acqua bollente e si aggiunge, sempre a caldo una soluzione acquosa concentrata di acido D,L-pirolglutammico (rapporto molare 1:1). La miscela è fatta bollire per alcuni minuti, quindi concentrata su evaporatore rotante a pressione ridotta fino a totale allentamento dell'acqua. Il residuo è ripreso tre volte con etanolo assoluto, filtrato e rievaporato ogni volta con il metodo predetto. Resa finale 84% del valore teorico.

B. Controllo sull'efficacia del trattamento:

Animali da laboratorio, di diverse specie, randomizzati in gruppi statisticamente significativi e sottoposti a trattamento con:

a - controlli: alimentati normalmente, non hanno ricevuto alcun trattamento;

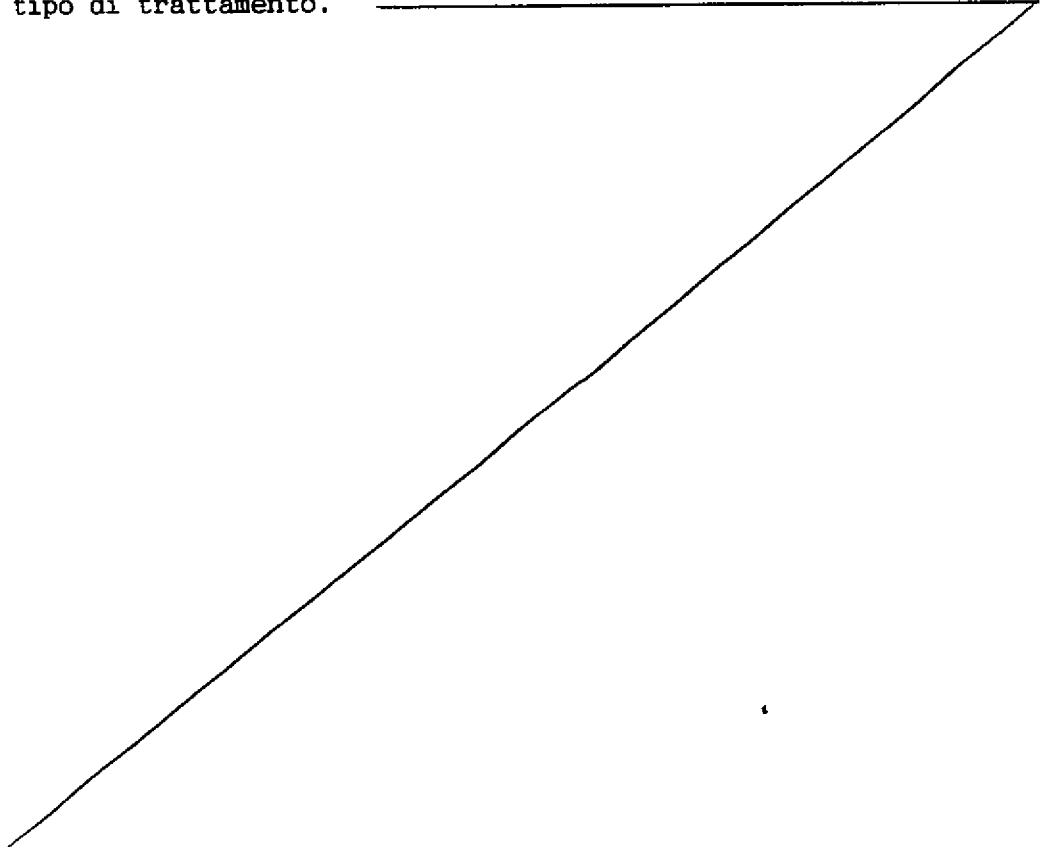
b - pirolglutammato di arginina ed altri integratori alimentari, per via orale, aggiunti agli alimenti, alla dose di 20-100 mg /Kg/die;

c - presenti derivati di somatostatine (da 20 a 100 nanogrammi)/Kg/die, per via sottocutanea, una volta ogni da 1 a 3 giorni;

d - presenti derivati di somatostatine, e regime di alimentazione integrata con sali poliaminoacidici (pirolglutammato di arginina).

RISULTATI

Gli animali trattati con i derivati somatostatinici secondo la presente invenzione hanno mostrato curve di crescita migliori sia rispetto ai gruppi di controllo, che non hanno ricevuto alcun tipo di trattamento, che rispetto ai gruppi trattati con solo piroglutammato di arginina. Gli animali trattati con i presenti derivati di somatostatine in associazione con piroglutammato di arginina hanno mostrato risultati migliori in termini di crescita corporea rispetto ai gruppi trattati con i soli derivati delle somatostatine, ed in misura ancora maggiore rispetto ai gruppi di controllo, che non hanno ricevuto alcun tipo di trattamento.



RIVENDICAZIONI

1. Derivato di somatostatina, scelto fra i seguenti:

a) derivato della somatostatina 14 di sintesi, avente un residuo Glu in posizione 4;

a') derivato della somatostatina 28 di sintesi, avente un residuo Glu in posizione 18;

b) derivato della somatostatina 14 di sintesi, avente un residuo Ser in posizione 6, in posizione 7, o in entrambe dette posizioni;

b') derivato della somatostatina 28 di sintesi, avente in un residuo Ser in posizione 20, 21 o in entrambe dette posizioni;

c) derivato di somatostatine, rappresentato dal prodotto di carbossimetilazione di somatostatine estrattive a 14 o 28 aminoacidi;

d) derivato di somatostatine, rappresentato dal prodotto di polimerizzazione di somatostatina estrattiva a 14 o 28 aminoacidi;

e) derivato di somatostatine, rappresentato dal coniugato fra una somatostatina estrattiva a 14 o 28 aminoacidi ed almeno un poliamminoacido;

f) derivato di somatostatine estrattive, rappresentato dal coniugato fra somatostatina estrattiva a 14 o 28 aminoacidi e almeno un acido grasso;

g) derivato di somatostatine estrattive, rappresentato dal prodotto di alchilazione riduttiva di somatostatina estrattiva a 14 o a 28 aminoacidi;