



MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

NUMERO DE PUBLICATION : 1007752A5

NUMERO DE DEPOT : 09200650

Classif. Internat. : A61K

Date de délivrance le : 17 Octobre 1995

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la Convention de Paris du 20 Mars 1883 pour la Protection de la propriété industrielle;

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d'invention, notamment l'article 22;

Vu l'arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d'invention, notamment l'article 28;

Vu le procès verbal dressé le 13 Juillet 1992 à 16H00 à l'Office de la Propriété Industrielle

ARRETE:

ARTICLE 1.- Il est délivré à : SANDOZ S.A.
Lichtstrasse 35, CH-4002 BALE(SUISSE)

représenté(e)(s) par : WYMANN Gérard, SANDOZ A.G. - Patent and Trademarks Division,
Lichtstrasse 35 - CH 4002 Bale SUISSE.

un brevet d' invention d' une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES DE PEPTIDES ET PROCEDES POUR LEUR PREPARATION.

PRIORITE(S) 15.07.91 GB GBA 9115202 14.01.92 GB GBA 9200748

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l'invention, sans garantie du mérite de l'invention ou de l'exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeurs(s).

Bruxelles, le 17 Octobre 1995
PAR DELEGATION SPECIALE :

WUYTS L
Directeur

Compositions pharmaceutiques de peptides et procédés pour
leur préparation

La présente invention concerne des peptides ayant un effet hypocalcémiant (calcitonines).

Comme c'est en général le cas pour les peptides, la mise au point de formulations appropriées et efficaces pour
5 l'administration de calcitonines s'est heurtée à de nombreux problèmes. Etant des peptides, les calcitonines sont aisément décomposées par les sucs gastriques, lors de l'administration orale. En outre, elles ne traversent qu'avec grande
10 difficulté et inefficacité les muqueuses dans l'organisme, que ce soit dans l'estomac, les intestins, la bouche, le nez ou le rectum (voies d'administration à travers les muqueuses).

La présente invention concerne des compositions pharmaceutiques comprenant une calcitonine en tant que substance
15 pharmacologiquement active, et ayant, après administration à travers les muqueuses, un effet hypocalcémiant accru dans le sang.

Sous un aspect, l'invention fournit une composition pharmaceutique comprenant de l'isocaproyl-[Ala⁷, Aib^{10,17},
20 Lys(For)^{11,18}, Lys(désoxyfructosyl)²⁴]-calcitonine de saumon-(5-32), qui, administrée par la voie d'administration à travers les muqueuses à un singe rhésus pesant 5-7 kg, produit des effets hypocalcémiants dans le sang d'au moins 9 %, par exemple -15, -21 ou -25 %. L'invention est basée sur les
25 résultats décrits dans les exemples ci-après.

Les effets sont plus marqués que ceux publiés jusqu'à présent pour des compositions de calcitonine administrées par les mêmes voies, et sont donc nouveaux. En tant que voies d'administration à travers les muqueuses, on préfère la voie orale, mais l'administration par la voie nasale et la voie rectale est également efficace.

La découverte des effets hypocalcémiants marqués rend possible l'administration de compositions contenant de la calcitonine par des voies d'administration à travers les muqueuses. En raison de la faible stabilité du composé chimique utilisé en tant que médicament et/ou de la faible capacité de résorption des compositions connues, cela n'était pas réalisable jusqu'à présent.

L'invention fournit en particulier des compositions pharmaceutiques comprenant de l'isocaproyl-[Ala⁷, Aib^{10,17}, Lys(For)^{11,18}, Lys(désoxyfructosyl)²⁴]-calcitonine de saumon-(5-32), qui, administrées par voie orale à un singe rhésus pesant 5-7 kg, en quantités de 0,1, 0,5, 1 ou 10 mg, ont des effets hypocalcémiants dans le sang d'au moins -9 %, par exemple de -15, -21 ou -25 %, respectivement.

Cette substance possède la formule N- α -isocaproyl-Ser-Thr-Ala-Val-Leu-Aib-Lys(For)-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-Aib-Lys(For)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Lys(1-désoxy-D-fructosyl)-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ (For= formyle). La formule isocaproyl-[Ala⁷, Aib^{10,17}, Lys(For)^{11,18}, Lys(désoxyfructosyl)²⁴]-calcitonine de saumon-(5-32) est la formule sous forme raccourcie, et le composé désigné ci-après par "composé A".

Le composé A est décrit, ainsi que ses propriétés, dans la demande de brevet britannique GB-A-2 218 102, dont le contenu est incorporé ici par référence. Sa préparation a été décrite dans l'exemple 11 de ladite demande. Le composé A est indiqué pour une utilisation dans le traitement de la maladie de Paget, de l'hypercalcémie et de l'ostéoporose.

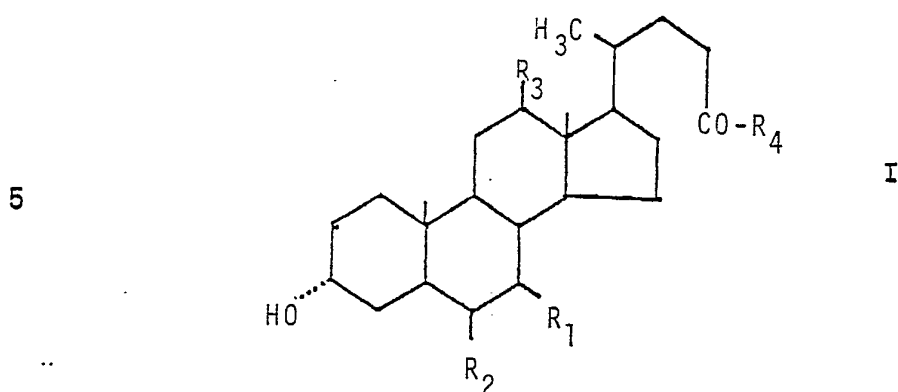
Le composé A, tel que défini plus haut pour utilisation dans l'invention, peut être sous forme libre ou sous forme de sel ou sous forme de complexe ou de produit de solvatation, pharmaceutiquement acceptable, par exemple sous
5 forme d'un sel d'addition avec un acide pharmaceutiquement acceptable. De tels sels et complexes sont connus et ont un degré équivalent d'activité à la forme libre et sont aussi bien tolérés que celle-ci. Les formes appropriées de sel
10 d'addition avec des acides, pour utilisation selon l'invention, comprennent par exemple les acétates.

Le composé A diffère du point de vue de la structure et des propriétés chimiques du composé connu qui est la calcitonine de saumon. Il est plus court de 4 résidus amino-
15 acide et est dépourvu de la structure disulfure cyclique, typique des calcitonines naturelles.

Le profil pharmacologique du composé A n'est pas exactement le même que celui de la calcitonine de saumon, mais les deux composés ont par exemple un effet hypocalcémiant lorsqu'ils sont injectés. Nous avons découvert à
20 présent que le composé A est suffisamment puissant pour être utilisé dans des compositions pharmaceutiques, par exemple pour administration nasale ou en plus, lorsqu'un activateur de résorption est présent, pour administration orale (gastrique) ou rectale.

Sous un autre aspect, la présente invention fournit des compositions pharmaceutiques comprenant de l'isocaproyl-
25 [Ala⁷, Aib^{10,17}, Lys(For)^{11,18}, Lys(désoxyfructosyl)²⁴]-calcitonine de saumon-(5-32) en association avec un acide biliaire ou un sel de celui-ci, par exemple avec un sel
30 métallique ou d'ammonium, par exemple, d'un aminoacide basique.

L'acide biliaire ou son sel a un effet d'activation de la résorption à travers les muqueuses. Les acides biliaires préférés sont ceux de formule I:



10 dans laquelle

R_1 est α - ou β -OH,

R_2 est H ou OH,

R_3 est H ou α -OH,

R_4 est OH ou NH-R_5 , R_5 étant $-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ou $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$.

15 Les acides biliaires sont connus dans la technique.

Les acides biliaires préférés sont ceux de formule I dans lesquels

$R_1 = \alpha\text{-OH}$,

$R_2 = \text{H}$,

20 $R_3 = \alpha\text{-OH}$,

$R_4 = \text{NHR}_5$ ou OH.

Lorsque R_5 est $-\text{CH}_2-\text{COOH}$, l'acide est l'acide glycocholique;

lorsque R_5 est $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$, l'acide est l'acide taurocholique.

25 D'autres acides biliaires préférés sont ceux dans lesquels

$R_1 = \alpha$ - ou β -OH,

$R_2 = \text{H}$,

$R_3 = \text{H}$,

30 $R_4 = \text{OH}$.

Lorsque $R_1 = 7\alpha\text{-OH}$, l'acide biliaire est l'acide chénodésoxycholique; lorsque $R_1 = 7\beta\text{-OH}$, l'acide biliaire est l'acide ursodésoxycholique.

Lorsque $R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \alpha\text{-OH}$ et $R_4 = \text{OH}$,

35 l'acide biliaire est l'acide cholique.

Les acides biliaires préférés sont l'acide chéno-désoxycholique et l'acide taurocholique. Les sels métalliques sont de préférence les sels alcalins, par exemple le sel de sodium.

5 Les aminoacides basiques sont de préférence l'arginine, l'ornithine, la lysine ou la δ -oxylysine. Les sels d'addition avec des acides préférés sont ceux de l'acide taurocholique ou de l'acide chénodésoxycholique avec la lysine (Tauro-Lys ou Chéno-Lys, respectivement).

10 L'un des sels particulièrement préféré est le lysinate d'acide taurocholique.

Nous avons découvert que, par exemple, le lysinate d'acide taurocholique est particulièrement utile en tant qu'activateur de l'effet hypocalcémiant du composé A.

15 Sur la base des découvertes décrites dans l'exemple 2 ci-après et accompagnant le tableau I, l'invention fournit une composition pharmaceutique comprenant de l'isocaproyl-[Ala⁷, Aib^{10,17}, Lys(For)^{11,18}, Lys(désoxyfructosyl)²⁴]-calcitonine de saumon-(5-32), en tant que composant actif, et un acide biliaire qui, administré par voie orale, en une
20 quantité correspondant à 3 mg de composant actif, à un singe rhésus pesant 5-7 kg, manifeste une bioactivité hypocalcémiant relative d'au moins 200 %, par rapport à la même composition ne contenant pas d'acide biliaire et ayant par
25 définition une bioactivité relative de 100 %, mesurée pendant 24 heures après l'administration.

L'activité hypocalcémiant relative est calculée par comparaison de l'aire au-dessous de la courbe (AAC) indiquant l'effet hypocalcémiant mesuré pendant 24 heures après
30 administration orale de la composition selon l'invention et de l'AAC d'une composition de référence ne contenant pas d'activateur de résorption, dans les mêmes conditions.

L'effet hypocalcémiant amélioré est dû par exemple à un taux plasmatique accru du composé A. On peut également
35 calculer les AAC des taux plasmatiques. Sur la base des

essais décrits dans l'exemple 2 et de leurs résultats figurant dans le tableau II ci-après, l'invention fournit également une composition pharmaceutique comprenant de l'isocaproyl-[Ala⁷, Aib^{10,17}, Lys(For)^{11,18}, Lys(désoxyfructosyl)²⁴]-calcitonine de saumon-(5-32), en tant que composant actif, et un acide biliaire, qui, administré par voie orale, en une quantité correspondant à 3 mg de composant actif, à un singe rhésus pesant 5-7 kg, manifeste une biodisponibilité relative d'au moins 200 % du composant actif par rapport à la même composition ne contenant pas de sel d'addition avec un acide et ayant par définition une biodisponibilité relative de 100 %, mesurée pendant 24 heures après l'administration.

Le taux plasmatique du composé A a été également mesuré dans l'exemple 4, à partir d'une composition contenant en plus un activateur de résorption, administrée par voie orale et comparée à la même composition ne contenant pas d'activateur de résorption et administrée par voie intraveineuse. Dans cet essai, on a pu calculer la biodisponibilité absolue.

Sur la base des résultats figurant dans le tableau III ci-après l'invention fournit une composition pharmaceutique comprenant de l'isocaproyl-[Ala⁷, Aib^{10,17}, Lys(For)^{11,18}, Lys(désoxyfructosyl)²⁴]-calcitonine de saumon-(5-32) et un activateur de résorption, laquelle composition, administrée par voie orale, en une quantité correspondant à 200 µg de composant actif, à un rat Wistar pesant 280-300 g, présente une biodisponibilité absolue d'au moins 1 500 %, en ng.h/ml, par rapport à la même composition ne contenant pas d'activateur de résorption et ayant par définition une biodisponibilité absolue de 100 %, mesurée pendant 5 heures après l'administration.

Sur la base des résultats décrits dans l'exemple 3, paragraphe 1, on arrive à la conclusion que le composé A peut être résorbé par voie nasale et sans activateur de

résorption, ainsi que résorbé par voie orale avec un activateur de résorption décrit dans l'exemple 1.

Sur la base des résultats de l'exemple 3, l'invention fournit en outre une composition pharmaceutique qui, administrée par voie nasale en une quantité correspondant à 80 µg d'isocaproyl-[Ala⁷, Aib^{10,17}, Lys(For)^{11,18}, Lys(désoxyfructosyl)²⁴]-calcitonine de saumon-(5-32) à un singe rhésus pesant 5-7 kg, manifeste une biodisponibilité relative d'au moins 200 % par rapport à une solution de référence comprenant de la calcitonine de saumon, en tant que composant actif, et ayant par définition une biodisponibilité relative de 100 %, mesurée pendant 8 heures après l'administration.

Dans la demande de brevet britannique GB-A-2 218 098, il a été révélé que des compositions pharmaceutiques contenant une calcitonine de saumon et du lysinate d'acide taurocholique manifestent une tolérance locale améliorée, lorsqu'elles sont administrées par voie nasale. Ces compositions avaient des biodisponibilités du même ordre de grandeur que celles obtenues par administration nasale de compositions contenant de la calcitonine de saumon et l'activateur de résorption taurocholate de sodium connu précédemment.

Toutefois, d'après cette publication de l'état de la technique, on ne pouvait pas s'attendre à pouvoir obtenir une composition présentant une activité hypocalcémiantе aussi bonne, une tolérance aussi bonne et aussi peu d'effet d'interaction avec les aliments que ceux obtenus avec une composition selon la présente invention.

En outre, on ne pouvait pas s'attendre à ce qu'avec le composé A, qui est chimiquement très différent de la calcitonine de saumon, il soit possible d'obtenir d'aussi bons résultats de pénétration à travers les muqueuses et de biodisponibilité.

Les compositions pharmaceutiques peuvent être produites de façon classique, au moyen de substances auxi-

liaires appropriées désirées pour la voie d'administration envisagée, par exemple orale, nasale ou rectale.

L'invention fournit également un procédé pour la préparation de compositions pharmaceutiques, comprenant le traitement de la calcitonine par des substances auxiliaires et, si l'on désire un effet d'amélioration de la résorption, par exemple pour emploi de la composition par voie orale, par un acide biliaire ou un sel de celui-ci, par exemple avec un métal ou un aminoacide basique.

De telles compositions peuvent être convenablement préparées par des techniques classiques, pour être présentées sous des formes classiques, par exemple des capsules, comprimés, suppositoires, poudres dispersables, sirops, élixirs, suspensions ou solutions, par exemple pour administration par voie entérique. Des diluants ou véhicules pharmaceutiques appropriés sont décrits dans les exemples ci-après. Il peut s'agir par exemple d'eau, de lactose ainsi que de conservateurs, agents de mise en suspension, agents mouillants, agents de granulation et désintégrants, liants, lubrifiants appropriés, afin de fournir une composition pharmaceutique présentable et de goût agréable.

Lorsqu'un véhicule liquide est présent dans la composition nasale de l'invention, c'est-à-dire dans la composition liquide de l'invention, il est de préférence aqueux mais peut également être choisi parmi les solvants non aqueux physiologiquement acceptables, appropriés à l'application sur la muqueuse nasale. Le véhicule liquide est de préférence l'eau, une solution salée aqueuse, par exemple le sérum physiologique, ou un tampon aqueux.

Lorsqu'un véhicule solide est présent, à savoir dans les compositions nasales solides de l'invention, il peut être par exemple insoluble dans l'eau, faiblement soluble dans l'eau, absorbant de l'eau, apte à gonfler dans l'eau, gélifiant ou soluble dans l'eau. Comme exemples de tels véhicules, on peut citer des polymères synthétiques ou semi-

synthétiques éventuellement réticulés, tels que des polyacrylates, par exemple le polyacrylate de sodium, de potassium ou d'ammonium, le poly(acide lactique), le poly(acide glycolique); des copolymères d'acides lactique et glycolique, le poly(alcool vinylique), le poly(acétate de vinyle), des copolymères d'alcool et d'acétate vinyliques, un polymère carboxyvinylique, la polyvinylpyrrolidone et le polyéthylèneglycol; des celluloses, telles que la cellulose, la cellulose microcristalline et l' α -cellulose, et des dérivés de cellulose tels que la méthylcellulose, l'éthylcellulose, l'hydroxyéthylcellulose, l'hydroxypropylcellulose, l'hydroxypropylméthylcellulose, la carboxyméthylcellulose sodique et l'éthylhydroxyéthylcellulose; des dextrines, telles que l' α -, β - ou γ -cyclodextrine, la diméthyl- β -cyclodextrine, la dextrine; des amidons, tels que des amidons natifs et leurs dérivés, par exemple l'amidon hydroxyéthylé ou hydroxypropylé et l'amidon carboxyméthylé; des polysaccharides, tels que le dextrane, des dextrans réticulés, le pullulan, l'acide alginique et ses sels, l'acide hyaluronique et ses sels, l'acide pectique et ses sels, l'acide phytique et la phytine; des sucres, tels que le D-mannitol, le glucose, le lactose, le fructose, l'inositol, le saccharose et l'amylose; des aminoacides, tels que la glycine et la taurine; des poly(aminoacide)s, tels que le poly(acide glutamique), le poly(acide aspartique), la polyglycine et la polyleucine; des protéines, telles que la caséine, la gélatine, des dérivés de la gélatine tels que la succinylgélatine, la chitine et le chitosane; des gommes, telles que la gomme arabique, la gomme adragante et le glucomannane; et des phospholipides; et des mélanges de ceux-ci.

Ces véhicules peuvent également être présents dans les compositions orales de l'invention.

Les véhicules préférés sont ceux qui améliorent le contact de la composition nasale avec la muqueuse nasale ou

facilitent la diffusion du médicament, de la composition nasale à la muqueuse nasale, par exemple qui prolongent le temps de résidence nasale de la composition nasale et/ou réduisent la distance entre le médicament ou la composition et la muqueuse.

Les véhicules solides préférés sont des des polyacrylates, la carboxyméthylcellulose sodique, des amidons et leurs dérivés, l'acide alginique et ses sels, l'acide hyaluronique et ses sels, l'acide pectique et ses sels, la gélatine et ses dérivés, des gommes, le poly(acide lactique) et ses copolymères, le poly(acétate de vinyle), les celluloses et leurs dérivés, des celluloses enrobées, des dextrans réticulés, encore mieux le poly(acide lactique) et ses copolymères, le poly(acétate de vinyle), les celluloses et leurs dérivés, des celluloses enrobées et des dextrans réticulés. On préfère en particulier la cellulose microcristalline.

Pour, par exemple, des raisons de stabilité, les compositions liquides de l'invention ont de préférence un pH légèrement acide, par exemple de 3,7. Le degré requis d'activité peut convenablement être atteint, par exemple, par addition d'un agent tampon ou d'un acide tel que HCl ou un autre acide organique ou minéral approprié, l'acide phosphorique par exemple.

Les compositions liquides et les compositions solides de l'invention peuvent également contenir d'autres additifs, par exemple des conservateurs-antioxydants, tels que le chlorure de benzalkonium, un p-hydroxybenzoate d'alkyle (Paraben), tel que le p-hydroxybenzoate de méthyle et le p-hydroxybenzoate de propyle, ou le méthylmercurithiosalicylate de sodium (Thiomersal).

Selon un autre mode de réalisation, l'invention fournit une composition pharmaceutique destinée à l'administration nasale et comprenant le composé A et un véhicule liquide ou solide, en l'absence d'un activateur de résorp-

tion.

Par "activateur", on entend un composé qui est présent principalement pour augmenter l'absorption à travers la muqueuse nasale, par exemple par interaction avec les composants de la muqueuse et/ou par augmentation de la perméabilité de la muqueuse.

Des activateurs appropriés comprennent par exemple des esters de choline, par exemple comme décrit dans EP-A-214 898, des acylcarnitines, par exemple telles que décrites dans EP-A-215 697, des aldoses et des glucosamines, des ascorbates et salicylates, par exemple tels que décrits dans EP-A-37 943, l' α -cyclodextrine, par exemple telle que décrite dans EP-A-94 157, des esters de pyroglutamate, par exemple tels que décrits dans EP-A-173 990, des agents chélateurs, par exemple tels que décrits dans US-A-4 476 116, une base de gel de poly(acide acrylique), le glycyrrhétinate de sodium, le caprate de sodium, le tartrate d'ammonium, un glycyrrhizanate, par exemple le glycyrrhizanate de sodium ou d'ammonium, par exemple comme décrit dans EP-A-327 756, la glycine ou l'acide γ -aminolévulinique.

La taille de particules des composants, y compris les véhicules, par exemple le véhicule cellulosique, dans la composition nasale solide de l'invention, peut aller de 5 à 500 μm , de préférence de 10 à 250 μm , encore mieux de 20 à 200 μm .

Les compositions liquides de l'invention peuvent être préparées par mise en mélange intime dudit composé A dans le véhicule liquide, éventuellement conjointement avec les autres composants.

La composition nasale solide de l'invention peut être préparée de façon classique. On peut mélanger le composé A avec les particules de véhicule, par exemple une base polymère ou un produit cellulosique, de façon classique, éventuellement avec d'autres composants comme indiqué plus haut, par exemple un activateur d'absorption ou un agent tensio-

actif, tel que décrit. Le composé A peut être en solution, par exemple une solution aqueuse ou alcoolique, et être mélangé avec les particules de véhicule, et on peut évaporer le solvant, par exemple par lyophilisation ou séchage par atomisation. Un tel séchage peut être effectué dans les conditions classiques. Une autre possibilité consiste à tasser ou granuler le mélange et ensuite à le pulvériser et/ou le tamiser.

Des compositions pour administration nasale peuvent être préparées en un état pulvérulent ou liquide, de façon classique, sous forme d'aérosols, et sont ensuite administrées spécialement au moyen d'un nébuliseur ou d'un vaporisateur. Des doses unitaires peuvent être libérées par un système de valve doseuse.

Les compositions pharmaceutiques de l'invention sont convenablement préparées pour administration orale ou nasale.

La dose exacte de composé A, l'isocaproyl-[Ala⁷, Aib^{10,17}, Lys(For)^{11,18}, Lys(désoxyfructosyl)²⁴]-calcitonine de saumon-(5-32) peut être déterminée dans des études cliniques classiques ou des études classiques sur l'animal. Par exemple, la dose peut être déterminée par des essais de biodisponibilité comparative, par comparaison avec d'autres formulations ayant un effet thérapeutique connu, la dose étant choisie pour produire, dans l'état stationnaire, des taux plasmatiques de médicaments comparables aux taux thérapeutiquement efficaces.

En général, la dose d'un composé A avec le sel biliaire, pour absorption par voie orale ou rectale, va d'environ la moitié à environ un dixième de la dose de A dans une formulation comparable, pour le même mode d'administration, mais ne contenant pas de promoteur de résorption.

Des doses journalières indiquées d'isocaproyl-[Ala⁷, Aib^{10,17}, Lys(For)^{11,18}, Lys(désoxyfructosyl)²⁴]-calcitonine

de saumon-(5-32) vont d'environ 2 μ g à environ 30 mg, par exemple de 0,1 à 20 mg pour utilisation par voie orale ou rectale ou nasale.

Les compositions sont convenablement sous forme de
5 dose unitaire ou peuvent être fragmentées en doses unitaires contenant chacune, de préférence pour utilisation orale, par exemple d'environ 0,1 à 300, de préférence de 50 à 200, en particulier jusqu'à environ 100 mg d'acide
10 biliaire, la quantité exacte étant fonction, par exemple, du mode d'administration. Le rapport pondéral de l'isocaproyl-[Ala⁷, Aib^{10,17}, Lys(For)^{11,18}, Lys(désoxyfructosyl)²⁴]-calcitonine de saumon-(5-32) au sel d'addition avec un acide de l'invention va par exemple d'environ 1:1 à environ 1:5 000, de préférence de 1:2 à 1:2 000, pour administration
15 par voie orale ou rectale.

L'activateur de résorption, par exemple l'acide biliaire, est par exemple utilisable en une quantité allant de 0,1 à 10, de préférence de 0,7 à 1,5 % en poids, en tant qu'excipient dans des compositions pharmaceutiques nasales;
20 en particulier, en une quantité allant de 1 à 75 % en poids dans des compositions orales et rectales; et notamment en une quantité allant de 20 à 75, par exemple de 40 à 75 % en poids, dans des compositions orales.

Une composition préférée contient 10 mg de composé A
25 et 200 mg de l'acide biliaire, par exemple tel que décrit dans l'exemple 2, sous forme de sel de lysine, ou la quantité équivalente sous forme de sel métallique, par exemple du sel de sodium.

La dose du composé A à administrer au moyen de la
30 composition de l'invention est naturellement fonction du type d'affection à traiter, de la fréquence de doses souhaitable et du type d'effet recherché.

L'invention fournit en particulier une composition pharmaceutique selon l'invention, pour utilisation dans le
35 traitement de la maladie de Paget, de l'hypercalcémie ou de

l'ostéoporose.

L'invention fournit également un procédé d'administration du composé A à un sujet nécessitant un traitement par ledit composé, lequel procédé comprend l'administration
5 audit sujet d'une quantité efficace d'une composition pharmaceutique selon l'invention.

Exemple 1

Capsules pour administration orale

1A

10	Composé A	0,1 à 20 mg
	Lysinate d'acide taurocholique	100 mg
	Cellulose microcristalline	50 mg
	Lactose	50 mg

On a administré à chaque membre d'un groupe de singes
15 rhésus, ayant un poids corporel d'environ 5-7 kg, en 6 essais séparés, des capsules selon l'exemple 1A, contenant 0,1, 0,5, 1, 2 et 10 mg de composé A, et une capsule placebo. On a fait jeûner les animaux pendant 1 jour avant le traitement.

20 Les concentrations du calcium ionisé dans le sang ont été mesurées après 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12 et 24 heures. Le calcium a été dosé à l'aide d'un analyseur de calcium ionisé (ICA 2 Radiometer), selon la méthode décrite dans *Selected Short Communications*, présentées au symposium
25 international "Calcitonin 1984", Milan, 2-4 octobre 1984, *Current Clinical Practical Series*, 42, *Excerpta Medica*.

Les résultats ont été portés sur une courbe sur la figure 1 ci-annexée, qui montre le bon effet hypocalcémiant du composé A, utilisable par exemple dans le traitement de
30 l'ostéoporose. n représente le nombre d'animaux dans l'essai.

Dans un autre essai, on a déterminé sur des singes la variation de la teneur totale en calcium du sang, après administration d'une capsule orale selon l'exemple 1A, con-
35 tenant 1 mg du composé A, et d'une capsule de placebo.

On a répété le même essai avec des capsules, dans lesquelles était omis le lysinate d'acide taurocholique.

Il a été établi (figure 2 ci-annexée) que le composé A a un effet hypocalcémiant plus marqué en présence de
 5 lysinate d'acide taurocholique.

Les résultats montrent que lorsqu'elles sont administrées par voies orales à un singe rhésus pesant 5-7 kg, les compositions pharmaceutiques comprenant de l'isocaproyl-
 [Ala⁷, Aib^{10,17}, Lys(For)^{11,18}, Lys(désoxyfructosyl)²⁴]-
 10 calcitonine de saumon-(5-32), en quantités correspondant à 0,1, 0,5, 1 ou 10 mg du composant actif, ont des effets hypocalcémiants allant jusqu'à -9, -15, -21 et -25 %, respectivement.

L'effet hypocalcémiant est l'effet sur les taux sanguins de calcium ionisé.
 15

Exemple 2

Capsules pour administration orale

Les compositions suivantes ont été comparées comme décrit dans l'exemple 1.

20	<u>2A</u>	<u>mg</u>
	Composé A	3
	Lysinate d'acide taurocholique	200
	Cellulose microcristalline	50
	Stéarate de magnésium	25
25	Lactose	25
	<u>2B</u>	
	Composé A	3
	Lysinate d'acide chénodésoxycholique	200
	Cellulose microcristalline	50
30	Stéarate de magnésium	25
	Lactose	25

<u>2C</u>		
	Composé A	3
	Lysinate d'acide taurocholique	200
	Microsphères d'amidon	50
5	Cellulose microcristalline	50
	Stéarate de magnésium	25
	Lactose	25
<u>2D</u>		
	Composé A	3
10	Lysinate d'acide chénodésoxycholique	200
	Microsphères d'amidon	50
	Cellulose microcristalline	50
	Stéarate de magnésium	25
	<u>Composition placebo (capsule)</u>	
15	Composé A	3
	Cellulose microcristalline	100

Après administration orale des compositions à des singes rhésus, il est apparu que les effets hypocalcémiant de l'administration simultanée de lysinate d'acide taurocholique et de celle de lysinate d'acide chénodésoxycholique étaient du même ordre. Le sel cité en premier a donné un effet plus marqué. Les microsphères d'amidon ont, en association avec les deux sels, un faible effet intensifiant, comme indiqué par les valeurs numériques dans les tableaux I et II ci-annexés.

Les résultats obtenus montrent que les formes orales contenant du lysinate d'acide taurocholique ou du lysinate d'acide chénodésoxycholique donnent des bioactivités hypocalcémiantes relatives de 567 et 534 %, respectivement, et des biodisponibilités supérieures (taux plasmatiques) du composé A de 586 et 453 %, respectivement, par rapport à la composition de composé A ne contenant pas de sel d'addition avec un acide cholique (placebo), qui a été prise comme 100 % par définition.

Dans ces essais, les taux plasmatiques du composé A ont été mesurés au moyen d'un essai radio-immunologique spécifique. La limite de détection était de 0,025 mg/ml.

Exemple 3

5 Compositions nasales

On a mesuré comme décrit dans l'exemple 1 l'effet hypocalcémiant des compositions suivantes sur du calcium ionisé.

3A

10 Solution pour aérosol

Composé A	440 ou 4 400 ou 8 800 µg
Chlorure de sodium	7,5 mg
Chlorure de benzalkonium	0,1 mg
HCl 0,1 N, jusqu'à pH 3,7	9,5 mg
15 Eau distillée	1,0 ml
N ₂ gazeux	quantité suffisante
(environ 40, 400 ou 800 µg/activation)	

3B

Poudre

20 Composé A	40 µg
Cellulose microcristalline	
(environ 40 µg/capsule)	30 mg

Composition de référence

Solution de calcitonine de saumon (CS) pour aérosol

25 Calcitonine de saumon (CS)	440 µg (= 2 200 UI)
Chlorure de sodium	7,5 mg
Chlorure de benzalkonium	0,1 mg
HCl 0,1 N, jusqu'à pH 3,7	quantité suffisante
Eau distillée	complément à 1,0 ml
30 N ₂ gazeux	quantité suffisante
(environ 40 µg = 200 UI/activation).	

Solution placebo pour aérosol

	Chlorure de sodium	7,5 mg
	Chlorure de benzalkonium	0,1 mg
	HCl 0,1 N, jusqu'à pH 3,7	quantité suffisante
5	Eau distillée	1,0 ml
	N ₂ gazeux	quantité suffisante
	(environ 90 µl/activation).	

1. L'administration en quantités accrues de la solution 3A pour aérosol a donné des résultats qui ont été portés sur la courbe de la figure 3. Ceux-ci montrent le bon effet hypocalcémiant du composé, par rapport au placebo, allant jusqu'à -21 %. L'effet hypocalcémiant maximum de la CS (référence) était de -6 % ou moins, après une administration par voie nasale de 80 µg de CS au total.
- 15 2. En dosant pendant 24 heures le calcium ionisé des compositions 3A et 3B et de la solution pour aérosol de référence, on a trouvé par le calcul un effet de bioactivité (hypocalcémie) de 555 % de la composition 3A et de 760 % de la composition 3B, par rapport à 100 % de la solution (CS) de référence, solutions administrées en quantité de 80 µg (40 µg dans chaque narine) à des singes rhésus pesant 5-7 kg.
- 20 3. En mesurant pendant 8 heures les taux plasmatiques du composé A à partir des compositions 3A et 3B et le taux de CS dans la solution pour aérosol de référence, on a trouvé par le calcul au total une biodisponibilité relative de 316 % à partir de la composition 3A et de 702 % à partir de la composition 3B, par rapport à 100 % de CS à partir de la solution de référence, solutions administrées en une quantité de 80 µg de composé A à des singes rhésus pesant 5-7 kg.
- 25
- 30

Exemple 4

On a administré par intubation orale à des rats Wistar mâles (n=6), ayant un poids corporel de 280-300 g,, des quantités de 500 µl de solution salée contenant 200 µg

de composé A soit sans (référence), soit avec une quantité donnée d'un activateur de résorption.

On a prélevé des échantillons de sang de 0,7 ml par la veine jugulaire de chaque animal conscient, 15 minutes avant et 10, 30, 60, 120, 180 et 300 minutes après l'administration de médicament. On a analysé tous les échantillons en utilisant un essai radio-immunologique pour la calcitonine de saumon, après détermination de la réactivité croisée pour le composé A. Dans toutes les administrations, la concentration de médicament a été contrôlée par HPLC. Les biodisponibilités (BA) absolues après administration orale ont été calculées selon l'équation suivante:

$$BA (\%) = \frac{AAC^0 \text{ moyenne (0-5 h) (p.o.)} \times \text{dose (i.v.)}}{AAC^0 \text{ moyenne (0-5 h) (i.v.)} \times \text{dose (p.o.)}} \times 100$$

Les paramètres pharmacocinétiques calculés, en fonction de l'utilisation des activateurs de résorption spécifiés, sont donnés dans le tableau III.

D'après le tableau III, exemple 4A, ci-annexé, il apparaît que la biodisponibilité absolue du composé A avec l'activateur de résorption va jusqu'à 3 930 % par rapport à 100 % de la composition de référence contenant le composé A sans activateur de résorption.

On fournit ainsi une composition pharmaceutique comprenant de l'isocaproyl-[Ala⁷, Aib^{10,17}, Lys(For)^{11,18}, Lys(désoxyfructosyl)²⁴]-calcitonine de saumon-(5-32) et sans activateur de résorption, qui, administrée par voie nasale en une quantité correspondant à 80 µg de composant actif à un singe rhésus pesant de 5 à 7 kg, présente une biodisponibilité relative allant jusqu'à 702 %, en ng.h/ml, par rapport à une solution de référence comprenant de la calcitonine de saumon en tant que composant, et dépourvu d'activateur de résorption, ayant par définition une biodisponibilité relative de 100 %, mesurée pendant 8 heures après administration.

Tandis que la biodisponibilité du composé A avec du lysinate d'acide taurocholique (exemple 4C) est meilleure qu'avec du lysinate d'acide chénodésoxycholique (exemple 4B), l'activité de résorption de l'acide chénodésoxycholique sous la forme de son sel de sodium est meilleure en association avec de la lysine.HCl (exemple 4A).

Le mélange de 1 % en poids de sel sodique de chénodésoxycholate avec 1 % de lysine.HCl est théoriquement équivalent à un mélange de 2,4 moles-g de lysinate d'acide chénodésoxycholique avec 3,1 moles-g de lysine.HCl, ce qui signifie que, par comparaison avec l'exemple 4B, la présence de lysine supplémentaire a un grand effet d'amélioration sur l'absorption.

Il est donc possible d'accroître la biodisponibilité en composé A en présence d'un acide biliaire, indépendamment de la présence du sel d'addition avec un acide de l'acide biliaire avec l'acide aminé basique, ou de la présence des deux acides, en quantités d'équivalents nécessaires à la formation d'un sel d'addition avec un acide.

D'après l'exemple 4D du tableau III, il apparaît que le sel de sodium de l'acide chénodésoxycholique a lui aussi un effet favorable. Après administration orale, ce sel peut être converti, dans le milieu acide de l'estomac, en l'acide chénodésoxycholique libre.

Contrairement à l'acide taurocholique, l'acide chénodésoxycholique est faiblement soluble dans le milieu acide de l'estomac. Le composé A est lentement libéré dans un milieu acide, à partir d'une composition le contenant, lorsque de l'acide chénodésoxycholique ou son sel de sodium est également présent dans la composition, et plus lentement qu'avec l'acide taurocholique ou son sel de sodium.

Le composé A peut donc être mieux protégé contre des attaques destructrices dans le milieu acide de l'estomac, en association avec l'acide chénodésoxycholique ou un de ses sels alcalins, qu'avec l'acide taurocholique ou un de ses

sels alcalins.

Du point de vue de la protection du composé A,
l'acide chénodésoxycholique ou un de ses sels alcalins est
donc son activateur de résorption préféré pour administra-
5 tion orale.

TABLEAU I

Activité hypocalcémiante chez le singe rhésus après administration orale de 3 mg de composé A dans une capsule avec différentes formulations (n=4)

Principaux paramètres biocinétiques

Forme pharmaceutique	Moyenne d'hypo-calémie (mg%)	Moyenne de T max. (h)	Hypo-calémie max. de la moyenne ($\Delta\%$)	T max. de la moyenne (h)	AAC 0 - 24h ($\Delta\% \cdot h$)	Bioactivité relative (%)
avec tauro-Lys. (2A)	-17,8	10	-16,4	8	-250,9	497
avec chéno-Lys. (2B)	-17,1	8,8	-16,7	8	-253,1	486
avec tauro-Lys. + micro-sphères d'amidon (2C)	-19,6	12	-19,6	12	-295,6	567
avec chéno-Lys. + micro-sphères d'amidon (2D)	-10,5	10,8	-16,3	8	-278,3	534
avec cellulose micro-cristalline (réf.)	-7,2	3	-6,4	4	-52,1	100 (par définition)

TABLEAU II
Taux plasmatiques chez le singe rhésus après administration orale
de 3 mg de composé A dans une capsule avec des formulations différentes (n=4)
Principaux paramètres pharmacocinétiques

Forme pharmaceutique	Moyenne de C max. (ng/ml)	Moyenne de T max. (h)	C max. de la moyenne (ng/ml)	T max. de la moyenne (h)	AAC 0 - 24h (ng*h/ml)	Biodisponibilité relative (%)
avec tauro-Lys. (2A)	0,470	0,875	0,325	1	0,999	377
avec chéno-Lys. (2B)	0,278	1,375	0,275	1.5	0,798	301
avec tauro-Lys. + micro- sphères d'amidon (2C)	0,539	1	0,430	1	1,552	506
avec chéno-Lys. + micro- sphères d'amidon (2D)	0,401	1,625	0,339	1	1,201	453
avec de la cellulose microcristalline (réf.)	0,150	1,5	0,090	1.5	0,265	100 (par définition)

TABLEAU III

Taux plasmatiques chez le rat après administration orale de 200 ug de composé A

	AAC° 5h ng h/ml	CV %	C _{max} ng/ml	CV %	T _{max} h	CV %	Facteur de biodisponibilité absolu, %
(dose: 200 µg A/rat dans 500 µl de solution salée)							
4A + 1 % de chénodésoxy- cholate de sodium + 1 % de lysine.HCl	10,09	101	3,27	79	0,48	157	2,36 3930%
4B + 1 % de lysinate d'acide chénodésoxycholique	2,32	67	2,32	60	0,48	157	0,55 920%
4C + 1 % de lysinate d'acide taurocholique	6,20	133	2,92	126	0,36	93	1,10 1970%
4D + 0,5 % de chénodésoxy- cholate de sodium	7,08	163	4,35	113	0,17	0	1,73 2880%
Référence	1,40	101	0,53	53	0,96	143	0,06 100% (par définition)

REVENDICATIONS

1. Composition pharmaceutique comprenant de l'isocaproyl-[Ala⁷, Aib^{10,17}, Lys(For)^{11,18}, Lys(désoxy-fructosyl)²⁴]-calcitonine de saumon-(5-32), qui, administrée
5 par une voie d'administration à travers les muqueuses, à un singe rhésus pesant 5-7 kg, donne un effet hypocalcémiant dans le sang d'au moins -9 %.
2. Composition pharmaceutique comprenant de l'isocaproyl-[Ala⁷, Aib^{10,17}, Lys(For)^{11,18}, Lys(désoxy-fructosyl)²⁴]-calcitonine de saumon-(5-32) en présence d'un
10 acide biliaire ou d'un sel de celui-ci.
3. Composition pharmaceutique selon la revendication 2, caractérisée en ce que l'acide est l'acide taurocholique.
4. Composition pharmaceutique selon la revendication 2, caractérisée en ce que l'acide est l'acide chéno-désoxycholique.
15
5. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisée en ce que le sel est
20 un sel d'un aminoacide.
6. Composition pharmaceutique selon la revendication 5, caractérisée en ce que l'acide est la lysine.
7. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisée en ce que le sel est
25 un sel métallique.
8. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications précédentes, destinée à l'administration orale.
9. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications précédentes, destinée à l'administration
30 rectale.
10. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications précédentes, destinée à l'administration nasale.

11. Composition pharmaceutique destinée à l'administration nasale, comprenant de l'isocaproyl-[Ala⁷, Aib^{10,17}, Lys(For)^{11,18}, Lys(désoxyfructosyl)²⁴]-calcitonine de saumon-(5-32) et un véhicule liquide ou solide, en l'absence
5 d'un activateur de résorption.

12. Composition pharmaceutique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est sous forme solide.

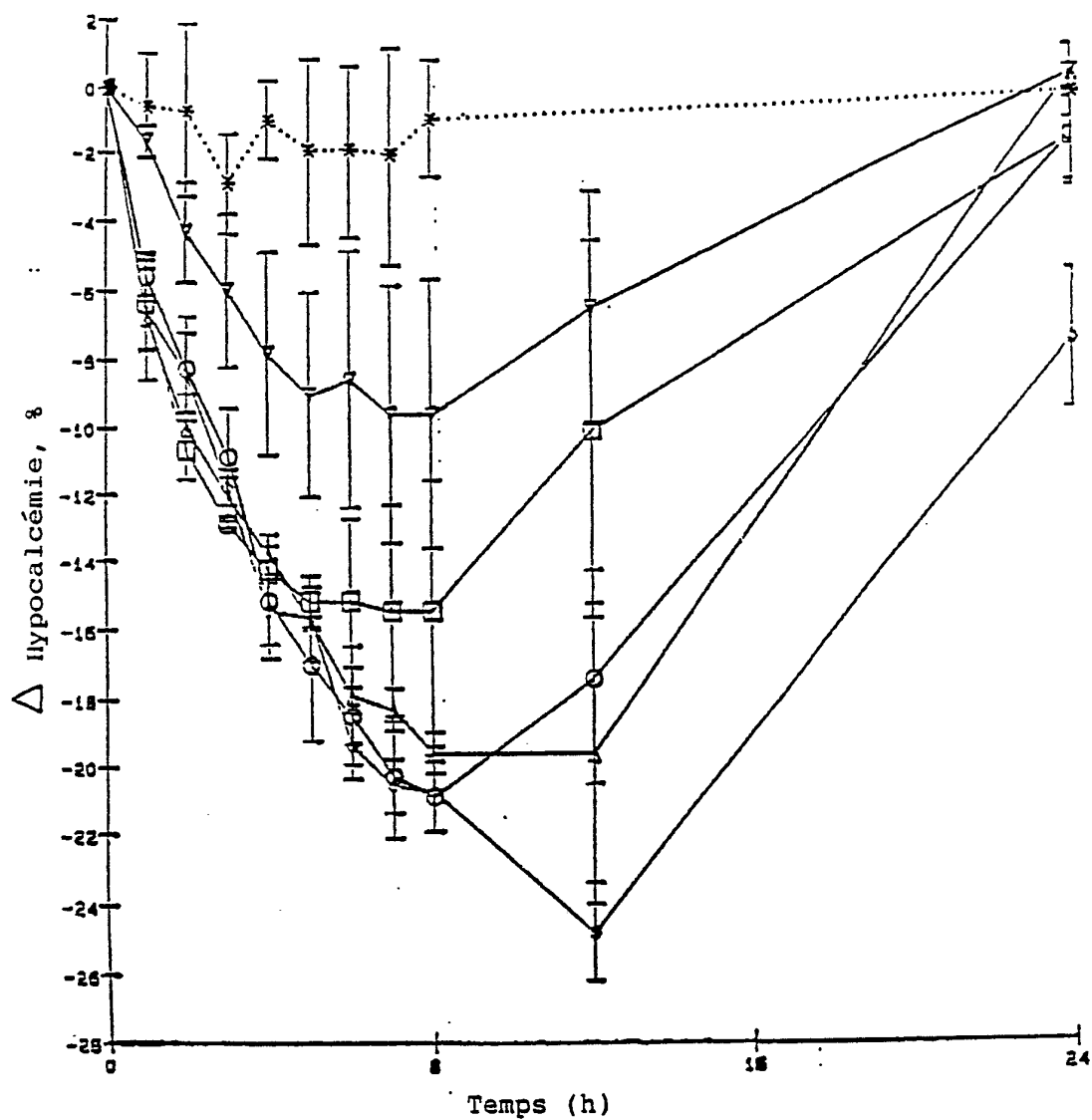
13. Composition pharmaceutique selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'elle comprend de la cellulose
10 microcristalline.

14. Composition pharmaceutique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est sous forme liquide, comprenant du chlorure de benzalkonium.

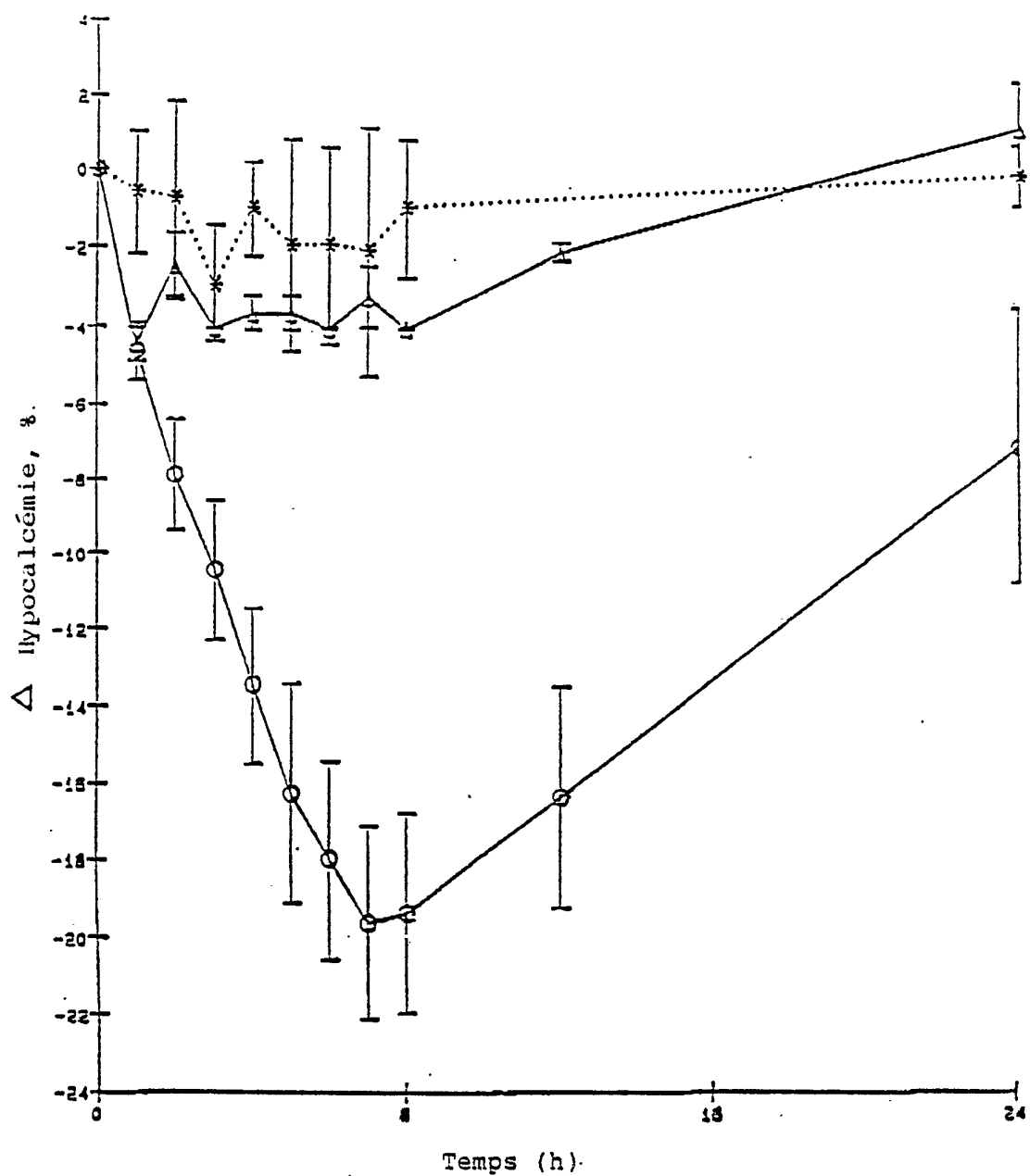
15. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comprend de 2 à 30 µg de calcitonine par dose unitaire.

16. Procédé pour la préparation d'une composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications
20 précédentes, comprenant le traitement de la calcitonine par des substances auxiliaires et, si l'on désire un effet d'activation de la résorption, avec un acide biliaire ou un sel de celui-ci.

Fig. 1



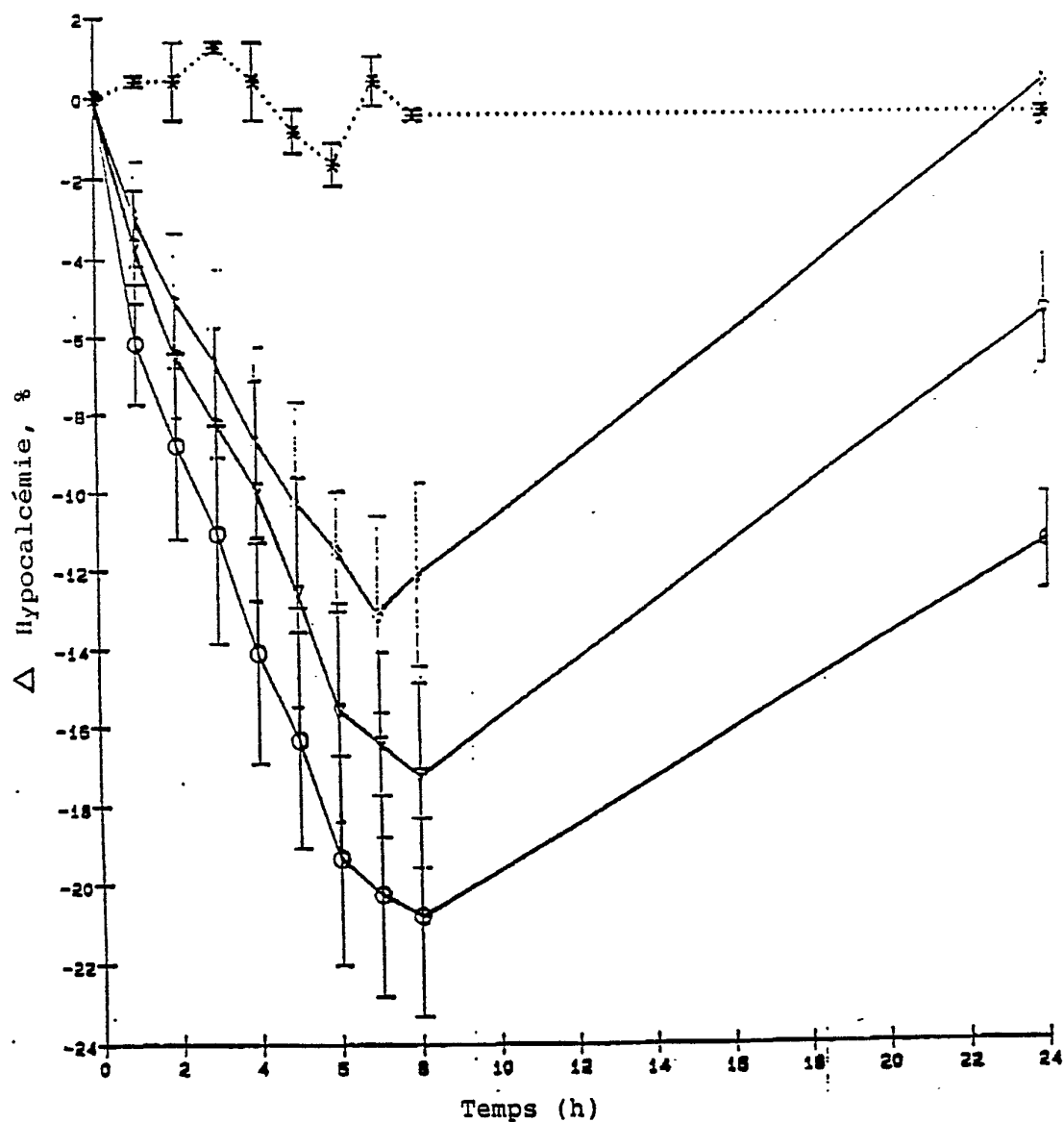
.....*..... placebo (n=4)
 —▽— 0.1mg voie orale (n=4)
 —□— 0.5mg " (n=4)
 —○— 1 mg " (n=4)
 —△— 2 mg " (n=4)
 —◇— 10 mg " (n=4)



.....*..... placebo avec taurocholate de lysine (n=2)
 —Δ— 1mg A sans taurocholate de lysine (n=2)
 —○— 1mg A avec taurocholate de lysine (n=4)

Fig. 3

Réponses en fonction de la dose
 Variations du calcium ionisé sanguin chez le singe rhésus
 après administration intranasale (n=4)
 (moyenne +/- EC erreur type de la moyenne)



.....*..... placebo 180 ul (90 ul dans chaque narine) (n=2)
 ---○--- A 80 ug (40 ug dans chaque narine)
 ---▽--- A 800 ug (400 ug dans chaque narine)
 ---○--- A 1 600 ug (800 ug dans chaque narine)



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE
établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

Numero de la demande
nationale

BO 3769
BE 9200650

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.6)
D,X	WO-A-89 09786 (SANDOZ-PATENT-GMBH ET AL.)	1,8-12, 15-17	A61K37/30 A61K47/28
D,Y	* page 53, ligne 9 - page 54, ligne 15; revendications 13,15,16; exemple 11 * * page 56, ligne 24 - ligne 28 * ---	2-7,13, 14	A61K47/38 A61K47/18 A61K9/00 A61K9/02
Y	FR-A-2 620 331 (SANDOZ S.A.) * revendications; exemples 1,2 * ---	2,3,7	
Y	EP-A-0 418 642 (TEIKOKU SEIYAKU K.K. ET AL.) * page 5, ligne 9 - ligne 10; revendications 1,3,11,12; tableau 4 * ---	4	
D,Y	GB-A-2 218 098 (SANDOZ LTD) * page 11, ligne 1 - page 13, ligne 27; revendications 9-11-15,19,21; exemples 2-4 * ---	5,6	
Y	US-A-4 151 276 (F.B. CAULIN ET AL.) * colonne 4, ligne 39 - ligne 63; revendications * ---	13	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6)
Y	GB-A-2 127 689 (SANDOZ LTD.) * revendications 1,6 * ---	14	A61K
A	EP-A-0 115 627 (ARMOUR PHARMACEUTICAL COMPANY) * revendications * -----	1-17	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
28 Mars 1995		Ryckebosch, A	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ----- & : membre de la même famille, document correspondant	



BO 3769

RECHERCHE_INCOMPLETE

Remarque : Bien que la revendication 16 concerne une méthode de traitement du (méthode de diagnostic appliqué au) corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit (à la composition).

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.**

BO 3769
BE 9200650

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

28-03-1995

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-8909786	19-10-89	AU-A- 3263789	12-10-89
		AU-A- 3362889	03-11-89
		BE-A- 1004357	10-11-92
		CH-A- 682152	30-07-93
		FR-A- 2629825	13-10-89
		GB-A- 2218102	08-11-89
		GB-A- 2246782	12-02-92
		IL-A- 89881	30-05-94
		JP-A- 1305099	08-12-89
		LU-A- 87495	14-11-89
		NL-A- 8900864	01-11-89
		NZ-A- 228677	26-08-94
		SE-A- 8901241	02-02-90
		FR-A- 2682680	23-04-93
FR-A-2620331	17-03-89	AT-B- 396424	27-09-93
		AU-B- 614769	12-09-91
		AU-B- 2217588	20-04-89
		BE-A- 1001937	17-04-90
		CA-A- 1330417	28-06-94
		CH-A- 677320	15-05-91
		DE-A- 3830245	30-03-89
		GB-A, B 2209670	24-05-89
		JP-A- 1228919	12-09-89
		LU-A- 87334	07-07-89
		NL-A- 8802274	03-04-89
		NO-B- 175518	18-07-94
		SE-A- 8803222	16-03-89
		US-A- 5149537	22-09-92
EP-A-0418642	27-03-91	JP-A- 3099021	24-04-91
		DE-T- 69001876	11-11-93
		US-A- 5238917	24-08-93
GB-A-2218098	08-11-89	AT-B- 396475	27-09-93
		AU-B- 624610	18-06-92
		AU-A- 3386589	02-11-89
		BE-A- 1003817	23-06-92
		CH-A- 679309	31-01-92
		DE-A- 3913350	09-11-89

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.**

BO 3769
BE 9200650

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

28-03-1995

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
GB-A-2218098		FR-A- 2630649	03-11-89
		GR-A- 89100285	31-01-90
		JP-A- 2011598	16-01-90
		LU-A- 87509	14-11-89
		NL-A- 8901059	16-11-89
		NO-C- 173447	22-12-93
		SE-A- 8901552	17-01-90
		US-A- 5122520	16-06-92
US-A-4151276	24-04-79	CA-A- 1053150	24-04-79
		GB-A- 1550473	15-08-79
GB-A-2127689	18-04-84	AT-B- 394947	27-07-92
		AU-B- 572800	19-05-88
		AU-A- 1984983	12-04-84
		AU-A- 2103588	22-12-88
		BE-A- 897904	04-04-84
		CA-A- 1220138	07-04-87
		CH-A- 657779	30-09-86
		DE-A, C 3335086	03-05-84
		DE-A- 3348341	14-09-89
		FR-A, B 2533826	06-04-84
		JP-B- 3054647	20-08-91
		JP-A- 59089619	23-05-84
		NL-A- 8303386	01-05-84
		SE-B- 455671	01-08-88
		SE-A- 8305485	06-04-84
EP-A-0115627	15-08-84	AU-B- 572815	19-05-88
		AU-A- 2259683	05-07-84
		CA-A- 1222948	16-06-87
		JP-A- 59130820	27-07-84