



MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

NUMERO DE PUBLICATION : 1009752A5

NUMERO DE DEPOT : 09600518

Classif. Internat. : C07K A61K

Date de délivrance le : 01 Juillet 1997

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 06 Juin 1996 à 15H00 à l'Office de la Propriété Industrielle

ARRETE :

ARTICLE 1.- Il est délivré à : ALZA Corporation
Page Mill Road 950, Palo Alto, CALIFORNIA 94303-0802(ETATS-UNIS D'AMERIQUE)

représenté(e)(s) par : VOSSWINKEL Philippe, GEVERS Patents S.A., Brussels Airport
Bus. Park-Holidaystr. 5-1831 DIEGEM.


un brevet d'invention d'une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : PROCEDE POUR AUGMENTER LE FLUX D'ELECTROTRANSPORT DE POLYPEPTIDES.

INVENTEUR(S) : Holladay Leslie A, 1200 Dale Avenue #96, Mountain View, California 94040 (US); Oldenburg Kevin R, Cathryn Court 4849, Fremont, California 94536 (US)

PRIORITE(S) 06.06.95 US USA 468275

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 01 Juillet 1997
PAR DELEGATION SPECIALE :


L. WUYTS
CONSEILLER

**"Procédé pour augmenter le flux d'électrotransport
de polypeptides"**

L'invention est relative d'une manière générale à la délivrance de médicament par électrotransport. Plus particulièrement l'invention est relative à un procédé pour augmenter un flux d'électrotransport d'un polypeptide par réduction du potentiel du polypeptide à former des segments en hélice α ou des segments en feuille β . L'invention concerne également des molécules qui ont été ainsi modifiées.

ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE

Une délivrance transdermique (c'est-à-dire à travers la peau) d'agents thérapeutiques offre une technique confortable, appropriée et non invasive à l'administration de médicaments. Le procédé procure plusieurs avantages par rapport aux modes conventionnels de délivrance de médicament. Par exemple des vitesses variables d'absorption et un métabolisme (par exemple hépatique) rencontrés dans le traitement par voie orale sont évités et d'autres inconvénients inhérents, par exemple une irritation gastro-intestinale et analogues, sont éliminés. La délivrance transdermique permet également un haut degré de contrôle des concentrations sanguines en un médicament particulier et elle est une voie d'administration spécialement attractive pour des médicaments ayant des indices thérapeutiques étroits, de courtes demi-vies et des activités puissantes.

La délivrance transdermique peut être soit passive, soit active. Plusieurs médicaments ne sont pas appropriés pour une délivrance de médicament transdermique passive à cause de leur dimension, de leurs caracté-

ristiques de charge ionique et leur caractère hydrophobe. Un procédé pour surmonter cette limite consiste à utiliser de faibles niveaux de courant électrique pour transporter activement des médicaments dans le corps à travers une peau intacte. Cette technique est connue sous le nom de délivrance de médicament par "électrotransport" ou "ionophorèse". La technique procure un procédé plus contrôlable qu'une délivrance de médicament transdermique passive puisque l'amplitude, le réglage dans le temps et la polarité du courant électrique appliqué sont aisément réglés en utilisant des composants électriques standards. Sous ce rapport, le flux de médicament par électrotransport peut être de 50 % à plusieurs ordres de grandeur plus grand qu'un flux transdermique passif du même médicament.

Des dispositifs d'électrotransport emploient d'une manière générale au moins deux électrodes. Ces deux électrodes sont situées en contact électrique intime avec une certaine partie de la peau du corps. Un électrode, appelée l'électrode active ou donneuse, est l'électrode à partir de laquelle l'agent thérapeutique est délivré dans le corps. L'autre électrode, appelée la contre-électrode ou électrode de retour, sert à fermer le circuit électrique à travers le corps. Conjointement à la peau du patient, le circuit est achevé par connexion des électrodes à une source d'énergie électrique, par exemple une batterie, et habituellement à des éléments de circuit capables de commander un passage de courant à travers le dispositif.

En fonction de la charge électrique de l'espèce à délivrer par voie transdermique, soit l'anode soit la cathode peut être l'électrode active ou donneuse. Sous ce rapport, si la substance ionique à amener dans le corps est chargée de manière positive, alors l'électrode positive (l'anode) est l'électrode active et l'électrode négative (la cathode) sert de contre-élec-

trode, en achevant le circuit. D'autre part, si la substance ionique à délivrer est chargée négativement, l'électrode cathodique est alors l'électrode active et l'électrode anodique sera la contre-électrode. D'une
5 autre manière, à la fois l'anode et la cathode peuvent être utilisées pour délivrer des médicaments de charge appropriée dans le corps. Dans ce cas, les deux électrodes sont considérées comme étant des électrodes actives ou donneuses. En d'autres mots, l'électrode
10 anodique peut délivrer des agents chargés de manière positive dans le corps tandis que l'électrode cathodique peut délivrer des agents chargés de manière négative dans le corps.

Des dispositifs d'électrotransport existants
15 demandent en supplément un réservoir ou source de l'agent thérapeutique qui est à délivrer dans le corps. De tels réservoirs à médicament sont connectés à l'anode ou à la cathode du dispositif d'électrotransport pour fournir une source fixe ou renouvelable d'un ou de
20 plusieurs agents ou espèces souhaités. Comme exemples de réservoirs et sources on peut citer une poche, comme décrit dans le US-A-4.250.878, un corps à base de gel préformé, comme décrit dans le US-A-4.382.529, et un récipient en verre ou en matière plastique contenant une
25 solution liquide du médicament, comme décrit sur les figures du US-A-4.722.726.

La délivrance par électrotransport transdermique de peptides, de polypeptides et de protéines est d'un intérêt particulier étant donné les problèmes
30 rencontrés par des voies d'administration de médicament plus communes, comme l'administration par voie orale. Les molécules de polypeptides et de protéines sont hautement susceptibles d'une dégradation par des enzymes protéolytiques dans le tractus gastro-intestinal et
35 elles sont soumises à un métabolisme hépatique accentué lorsqu'elles sont prises oralement. Les polypeptides et

protéines demandent habituellement une administration parentérale pour obtenir des niveaux thérapeutiques dans le sang du patient. Les techniques d'administration parentérale les plus conventionnelles sont les injections hypodermiques et l'administration par voie intraveineuse. Cependant, les polypeptides et protéines ont une action courte, de façon inhérente, dans leur activité biologique, ce qui demande de fréquentes injections, souvent plusieurs fois par jour, pour maintenir les niveaux thérapeutiquement efficaces nécessaires. Les patients trouvent fréquemment ce régime de traitement comme étant incommode et douloureux, avec un risque associé par exemple d'infection.

Beaucoup d'efforts ont été faits pour trouver d'autres voies (autres que des injections parentérales) pour administrer de manière efficace des polypeptides et protéines pharmaceutiques. Les voies d'administration avec moins d'effets secondaires ainsi qu'une meilleure commodité pour le patient ont été d'un intérêt particulier. De telles voies alternatives ont généralement compris une administration orale "protégée" dans laquelle le polypeptide/protéine est libéré d'une capsule ou d'un autre récipient après passage à travers le milieu à faible pH de l'estomac, une délivrance à travers les tissus muqueux, par exemple les tissus muqueux des poumons avec des inhalateurs ou les tissus muqueux nasaux avec des pulvérisateurs nasaux, et des pompes implantables. Malheureusement actuellement, ces voies alternatives de délivrance de polypeptides/protéines ont rencontré seulement un succès limité.

Une délivrance par électrotransport de polypeptides et de protéines a également rencontré des difficultés techniques. Par exemple, l'eau est le solvant liquide préféré pour former la solution du médicament délivré par électrotransport, à la suite de son excellente biocompatibilité. La peau contient des

enzymes protéolytiques qui peuvent dégrader le polypeptide/protéine lorsqu'il est délivré par voie transdermique. De plus, certains polypeptides/protéines, en particulier ceux qui ne sont pas naturels à l'animal en traitement, peuvent causer des réactions de la part de la peau, par exemple une sensibilisation ou une irritation.

Un certain nombre de chercheurs ont décrit la délivrance par électrotransport de polypeptides et de protéines. Une étude ancienne de R. Burnette et coll., J. Pharm. Sci., vol. 75 (1986) 738, a développé la perméation à travers la peau in vitro d'une hormone libérant de la thyrotropine, une petite molécule de tripeptide. On a constaté que le flux d'électrotransport était supérieur au flux par diffusion passive. Chien et coll., J. Pharm. Sci., vol. 78 (1988) 376, ont montré, à la fois dans des études in vitro et in vivo, qu'une délivrance transdermique de vasopressine et d'insuline par électrotransport était possible. Voir aussi Maulding et coll., U.S. Statutory Invention Registration No. H1160, qui décrivent une délivrance par électrotransport de calcitonine dans des cochons nains.

Un certain nombre d'approches (autres que simplement augmenter les niveaux appliqués de courant d'électrotransport) ont été utilisées pour augmenter le flux d'électrotransport transdermique de médicaments à base de polypeptide et de protéine. Une approche développe l'utilisation d'activateurs de flux, comme des agents tensioactifs ioniques. Voir par exemple le US-A-4.722.726. Une autre approche utilise des cosolvants autres que justement de l'eau pour activer le flux d'électrotransport. Voir par exemple la EP-A-0 278 473. Une autre approche encore développe une rupture mécanique de la couche externe (c'est-à-dire la couche cornée) de la peau avant la délivrance par électrotransport. Voir le US-A-5.250.023.

D'autres approches pour accroître le flux de médicament par électrotransport transdermique développent la création d'un promédicament ou d'un analogue du médicament intéressant et l'électrotransport du promédicament ou de l'analogue modifié. Par exemple, la WO-
5 92/12999 décrit une délivrance d'insuline sous la forme d'un analogue d'insuline ayant une tendance réduite à s'auto-associer (les formes apparemment associées d'insuline présentes dans des compositions pharmaceuti-
10 ques conventionnelles réduisent la délivrance transdermique de l'insuline). Les analogues sont créés par substitution de l'acide aspartique (Asp) ou de l'acide glutamique (Glu) à d'autres radicaux d'acide aminé dans des positions sélectionnées le long de la chaîne poly-
15 peptidique de l'insuline. La WO 93/25197 décrit une délivrance de médicaments à la fois peptidiques et non peptidiques, sous la forme de complexes d'agent pharmaceutique-modificateur ou de promédicaments dans lesquels un agent modificateur chimique (par exemple un fragment chargé) est lié de manière covalente à l'agent pharmaceutique parental. La liaison covalente est brisée après que l'agent est délivré dans le corps, en libérant ainsi l'agent parental.

En dépit des approches ci-dessus, certains
25 polypeptides montrent encore un pauvre flux d'électrotransport transdermique. En particulier, le caractère hydrophobe des peptides est connu pour avoir un impact négatif sur le flux d'électrotransport in vitro. Différents paramètres contribuent au caractère hydrophobe, y compris la structure primaire d'une protéine,
30 c'est-à-dire la séquence des acides aminés de la molécule, ainsi que la structure secondaire de la protéine, c'est-à-dire l'agencement récurant, régulier, de la chaîne polypeptidique dans les trois dimensions. Une telle conformation peut prendre la forme de structures
35 hélicoïdales, comme une hélice α , ou une conformation en

zigzag, plus étendue, connue sous le nom de conformation β .

L'hélice α présente approximativement 3,6 radicaux par spire de l'hélice. Les groupes R des acides aminés s'étendent vers l'extérieur de l'hélice et des liaisons d'hydrogène intrachaine sont formées entre l'oxygène des carbonyle du squelette de chaque radical et un atome d'hydrogène de squelette attaché à l'azote électronégatif du quatrième radical le long de la chaîne. L'unité de base de la conformation β est le brin β qui existe sous la forme d'une hélice enroulée de manière moins serrée, avec 2,0 radicaux par spire. La conformation du brin β est stable uniquement lorsqu'elle est incorporée dans une feuille β où des liaisons d'hydrogène ayant une géométrie proche de l'optimale sont formées entre les groupes peptidiques de brins β adjacents ; les moments dipolaires des brins sont également alignés favorablement. Des chaînes latérales provenant de radicaux adjacents du même brin font saillie à partir de côtés opposés de la feuille et ils n'interagissent pas l'un sur l'autre, mais ils ont des interactions importantes avec leur squelette et avec les chaînes latérales de brins voisins. Pour une description générale des hélices α et feuilles β , voir par exemple T.E. Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W.H. Freeman and Company, 1993), et A.L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., 1975).

Les paramètres de Zimm-Bragg, s et σ (B.H. Zimm et J.K. Bragg J. Chem. Phys. (1959) 31:526-535), et les équations de Lifson-Roig (S. Lifson et A. Roig J. Chem. Phys. (1961) 34:1963-1974) sont habituellement utilisés pour déterminer la stabilité d'un segment hélicoïdal dans un polypeptide donné. s représente la constante de stabilité de l'enroulement d'hélice et σ est le facteur de nucléation. Sur base de ces paramètres, la probabilité que certaines régions de molécules

polypeptidiques forment des hélices α et des feuilles β peut être prédite en utilisant divers calculs et programmes d'ordinateur. Voir par exemple Finkelstein, A.V. Program "ALB" for protein and polypeptide secondary structure calculation and prediction (1983). Déposé à la
5 Brookhaven Protein Data Bank, Upton, N.Y. et à l'EMBL, Heidelberg, Allemagne, Finkelstein, A.B. Biopolymers (1977) 16:525-529, Finkelstein et coll. Proteins: Structure, Function and Genetics (1991) 10:287-299. De
10 plus, les probabilités de Chou-Fasman (Chou, P.Y. et Fasman, G.D. Ann. Rev. Biochem. (1978) 47:251-276) ont été utilisées pour apprécier la propension d'un radical d'acide aminé particulier à favoriser ou défavoriser une formation en hélice α et en feuille β .

15 Cependant, ces principes n'ont pas été appliqués précédemment pour altérer les propriétés hydrophobes d'un polypeptide donné, en vue d'augmenter le flux d'électrotransport de celui-ci.

DESCRIPTION DE L'INVENTION

20 Suivant la présent invention le flux d'électrotransport d'un polypeptide donné est accru par rupture de sa structure secondaire. En particulier, des radicaux d'acides aminés connus pour stabiliser des segments d'hélice α et de feuille β peuvent être rempla-
25 cés par des radicaux déstabilisants et des agents de rupture d'hélice connus. De cette manière, le flux du polypeptide à travers une surface de corps (par exemple la peau) peut être augmenté, en permettant une délivrance par électrotransport d'une gamme plus large de
30 médicaments polypeptidiques à des vitesses thérapeutiquement efficaces.

Conformément à cela, suivant une forme de réalisation, l'invention est relative à un procédé de réalisation d'un analogue d'un polypeptide parental
35 présentant un segment d'hélice α et/ou de feuille β , l'analogue montrant une capacité d'électrotransport

meilleure/accrue à travers une surface de corps, ce procédé comprenant une substitution d'un ou de plusieurs radicaux d'acides aminés du polypeptide parental dans le polypeptide analogue pour rompre un ou plusieurs segments d'hélice α et/ou de feuille β du polypeptide parental. Le polypeptide analogue offre un électrotransport accru en comparaison du polypeptide parental.

Suivant une forme de réalisation supplémentaire, l'invention concerne un procédé de délivrance d'un agent polypeptidique à travers une surface de corps. Le procédé comprend (a) une formation d'un analogue d'un polypeptide parental, ce polypeptide parental comprenant un segment d'hélice α et/ou de feuille β , le polypeptide analogue présentant un ou plusieurs radicaux d'acides aminés substitués par rapport au polypeptide parental et (b) une délivrance par électrotransport du polypeptide analogue à travers la surface de corps.

Suivant des formes de réalisation particulièrement préférées, la rupture est faite par substitution d'un ou de plusieurs radicaux d'acide aminé du polypeptide parental, un ou plusieurs radicaux d'acide aminé ayant une valeur de $P\alpha$ ou de $P\beta$ plus faible que le radical d'acide aminé parental.

Suivant une autre forme de réalisation, l'invention a pour but un analogue d'hormone parathyroïdienne (PTH) comprenant la séquence d'acides aminés illustrée sur la Figure 1 C.

Suivant encore une autre forme de réalisation, l'invention concerne un analogue d'hormone parathyroïdienne (PTH) comprenant la séquence d'acides aminés illustrée sur la Figure 1 D.

La présente invention ne couvre pas l'analogue de PTH dans lequel Met_8 est substitué par Leu, Leu_{15} par Arg, Met_{18} par Leu, Glu_{19} par Arg, Glu_{22} par Arg, Glu_{29} par Lys, Phe_{34} par Tyr, une lactone d'homosérine étant présente à la terminaison C du peptide (figure 1B).

Ces formes de réalisation de la présente invention ainsi que d'autres apparaîtront aisément à l'homme de métier à la lumière de la description non limitative qui suit.

La figure 1 représente la séquence d'acides aminés de différentes molécules d'hormone parathyroïdienne (PTH) utilisées pour illustrer l'invention par des exemples. La figure 1A montre la séquence d'acides aminés du polypeptide PTH parental de type sauvage. La figure 1C montre la séquence d'acides aminés de l'analogue 1C de PTH (1-35). La figure 1D montre la séquence d'acides aminés de l'analogue 1D de PTH (1-35). HSL signifie de l'homosérine/lactone d'homosérine. Les radicaux soulignés sur les figures 1C et 1D indiquent les positions de substitution.

La figure 2 représente les séquences d'acides aminés de différents polypeptides dérivés de l'hirudine et utilisés à titre d'exemples de l'invention. La figure 2A montre la séquence d'acides aminés d'un polypeptide parental hirulog. La figure 2B montre la séquence d'acides aminés de hirulog-1. La figure 2C montre la séquence de hirulog-B2.

La figure 3 est une vue schématique d'un dispositif de délivrance de médicament par électrotransport représentatif, qui peut être utilisé suivant la présente invention.

La figure 4 représente un graphique du caractère elliptique résiduaire moyen de plusieurs analogues d'hormone parathyroïdienne par rapport à une concentration de trifluoroéthanol.

La figure 5 représente un graphique du caractère elliptique résiduaire moyen de deux polypeptides dérivés d'hirudine par rapport à une concentration de trifluoroéthanol.

La pratique de la présente invention emploie, à moins que cela ne soit indiqué autrement, des procédés conventionnels de chimie des protéines, d'électrochimie, de biologie moléculaire et de techniques d'ADN recombinant, connus de l'homme de métier. Ces techniques sont expliquées complètement dans la littérature. Voir par

exemple T.E. Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W.H. Freeman and Company, 1993), A.L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., 1975), J.S. Newman, Electrochemical Systems (Prentice Hall, 5 1973), A.J. Bard et L.R. Faulkner, Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications (John Wiley & Sons, 1980), Sambrook et coll., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).

10 Il faut noter que, lorsque cela est utilisé dans la description et les revendications annexées, les formes singulières "un", "une", "le" et "la" comprennent des références plurielles à moins que le contenu ne le dicte clairement d'une autre manière. Donc, par exemple, faire référence à "un polypeptide" comprend un 15 mélange de deux ou de plusieurs polypeptides, etc.

I. DEFINITIONS

Dans la description de la présente invention, les termes suivants sont employés et ils sont destinés pour être définis comme indiqué ci-dessous.

20 Ici, les termes "électrotransport", "ionophore" et "ionophorétique" sont utilisés pour se référer à la délivrance à travers une surface de corps (par exemple la peau) d'un ou de plusieurs agents polypeptidiques pharmaceutiquement actifs au moyen d'une force 25 électromotrice appliquée à un réservoir contenant l'agent. L'agent peut être délivré par électromigration, électroporation, électro-osmose ou une combinaison quelconque de celles-ci. L'électro-osmose a aussi été désignée par électrohydrocinèse, électroconvection, et 30 osmose électriquement induite. En général, une électro-osmose d'une espèce dans un tissu résulte de la migration d'un solvant dans lequel l'espèce est contenue, à la suite de l'application d'une force électromotrice au réservoir de l'espèce thérapeutique, c'est-à-dire du 35 flux de solvant induit par électromigration d'autres espèces ioniques. Pendant le processus d'électrotrans-

port, certaines modifications ou altérations de la peau peuvent apparaître, comme la formation de pores existant transitoirement dans la peau, ce que l'on appelle également "une électroporation". N'importe quel transport électriquement assisté d'espèces, qui est accru par des modifications ou altérations à la surface du corps (par exemple formation de pores dans la peau), est également inclus dans le terme de "électrotransport" tel qu'utilisé ici. Donc, lorsqu'on les utilise ici, les termes "électrotransport", "ionophorèse" et "ionophorétique" désignent (1) la délivrance d'agents chargés par électromigration, (2) la délivrance d'agents non chargés par le processus d'électro-osmose, (3) la délivrance d'agents chargés ou non chargés par électroporation, (4) la délivrance d'agents chargés par les processus combinés d'électromigration et d'électro-osmose et/ou (5) la délivrance d'un mélange d'agents chargés et non chargés par les processus combinés d'électromigration et d'électro-osmose.

Les termes de "polypeptide", "agent polypeptidique" et "médicament à base de polypeptide" sont utilisés de manière interchangeable ici pour désigner tout polymère bioactif de radicaux d'acide aminé. Les termes comprennent des peptides, des oligopeptides, des dimères, des multimères et des matières analogues. Ces polypeptides peuvent être dérivés de sources naturelles ou ils peuvent être synthétisés ou produits par recombinaison. Les termes comprennent également des modifications post-expression du polypeptide, par exemple une glycosylation, une acétylation, une phosphorylation, etc.

Un médicament ou agent polypeptidique, tel que défini ici, est généralement constitué des 20 acides aminés naturels Ala (A), Arg (R), Asn (N), Asp (D), Cys (C), Gln (Q), Glu (E), Gly (G), His (H), Ile (I), Leu (L), Lys (K), Met (M), Phe (F), Pro (P), Ser (S), Thr

(T), Trp (W), Tyr (Y) et Val (V) et il peut aussi comprendre un quelconque des nombreux analogues connus d'acides aminés, à la fois ceux apparaissant naturellement et les analogues synthétisés, comme, d'une manière non limitative, de l'homoisoleucine, de l'asaleucine, de la 2-(méthylèncyclopropyl)glycine, de la S-méthylcystéine, de la S-(prop-I-ényl)cystéine, de l'homosérine, de l'ornithine, de la norleucine, de la norvaline, de l'homoarginine, de la 3-(3-carboxyphényl)alanine, de la cyclohexylalanine, de la mimosine, de l'acide pipécolique, de l'acide 4-méthylglutamique, de la canavanine, de l'acide 2,3-diaminopropionique et des matières analogues. D'autres exemples d'agents polypeptidiques qui trouvent usage dans la présente invention sont donnés dans la suite.

Par polypeptide, agent polypeptidique ou médicament à base de polypeptide "parental", il faut entendre un polypeptide tel que défini ci-dessus qui comprend des segments en hélice α ou en feuille β qui peuvent être modifiés de telle façon que le flux d'électrotransport du polypeptide soit accru. En particulier, un polypeptide parental comprend d'une manière générale d'environ 10 à environ 50 radicaux d'acides aminés, de préférence d'environ 10 à environ 40 radicaux d'acides aminés. De plus, le polypeptide parental est un qui n'est pas enclin à adopter une structure pliée tertiaire stable en solution, par exemple comme résultat d'une haute concentration de radicaux Cys. Le polypeptide parental peut être un polypeptide qui apparaît dans la nature ou il peut lui-même avoir des différences structurales par rapport à un polypeptide apparaissant dans la nature, comme des substitutions, délétions ou additions d'acides aminés ainsi que des modifications post-traductionnelles, comme décrit ci-dessus.

Par "analogue" de polypeptide il faut entendre un polypeptide tel que défini ci-dessus, qui résulte de

la modification de la structure secondaire du polypeptide parental. Sous ce rapport, l'analogue diffère du parent par voie de substitution d'un ou de plusieurs radicaux d'acide aminé de telle façon qu'un ou plusieurs segments en hélice α et/ou en hélice β présents dans la molécule parentale soient rompus. Les substitutions appropriées d'acides aminés sont décrites de manière plus complète ci-dessous. L'analogue peut aussi contenir des modifications supplémentaires qui n'affectent pas la structure secondaire, comme des substitutions, délétions ou additions supplémentaires d'acides aminés, ou des modifications post-traductionnelles, comme décrit ci-dessus. L'analogue peut aussi exister sous des formes neutres ou de sels, par exemple de sels d'addition d'acide (formés avec les groupes amino libres des polypeptides analogues) et ceux qui sont formés avec des acides inorganiques, tels que par exemple des acides chlorhydrique ou phosphorique, ou des acides organiques tels que les acides acétique, succinique, maléique, tartrique, mandélique, et analogues. Des sels formés à partir de groupes carboxyle libres peuvent aussi être dérivés de bases inorganiques, comme par exemple de sodium, de potassium, d'ammonium, de calcium, ou des hydroxydes ferriques, et de bases organiques, telles que de l'isopropylamine, de la triméthylamine, du 2-éthylaminoéthanol, de l'histidine et des matières analogues. L'analogue de polypeptide a au moins une certaine bioactivité du polypeptide parental, et de préférence il a la même bioactivité ou une bioactivité plus grande que la molécule parentale.

Par "accroissement de l'électrotransport" d'un polypeptide, il faut entendre une augmentation du flux d'électrotransport du polypeptide à travers la surface du corps (par exemple la peau ou une muqueuse), en comparaison du polypeptide parental. Le flux d'électrotransport transdermique peut être déterminé en utilisant

un certain nombre de méthodes in vivo ou in vitro bien
connues dans la technique. Les procédés in vitro
comprennent un pincage d'un morceau de peau d'un animal
approprié (par exemple une peau de cadavre humain) entre
5 les compartiments donneur et récepteur d'une cellule à
flux d'électrotransport, avec le côté de la couche
cornée du morceau de peau en face du compartiment
donneur. Une solution liquide ou un gel contenant le
médicament à délivrer est placé en contact avec la
10 couche cornée et un courant électrique est appliqué aux
électrodes, une électrode dans chaque compartiment. Le
flux transdermique est calculé par échantillonnage de la
quantité de médicament dans le compartiment récepteur.
Deux modèles satisfaisants, qui sont utilisés pour
15 optimiser une délivrance de médicament par électrotrans-
port transdermique, sont le modèle à patte de peau de
cochon isolée de Riviere, M.C. Heit, et coll., J. Pharm.
Sci., 82, 240-243 (1993), et l'utilisation d'une peau
nue isolée de rongeurs ou cochons d'Inde sans poils, par
20 exemple voir B.W. Hadzija et coll., J. Pharm. Pharma-
col., 44, 387-390 (1992).

II. MODES DE MISE EN OEUVRE DE L'INVENTION

La présente invention concerne une substitu-
tion par des acides aminés qui rompent des segments en
25 hélice α et en feuille β d'une molécule de polypeptide
pour accroître le flux d'électrotransport de cette
molécule, en comparaison du flux du polypeptide paren-
tal. Le procédé permet par conséquent un électrotrans-
port d'un grand nombre de substances qui autrement ne
30 seraient pas capables d'une telle délivrance. Sans être
lié à une théorie particulière, il apparaît que de tels
changements secondaires diminuent la tendance de chaînes
latérales hydrophobes de radicaux d'acides aminés, tels
que Leu, Phe et Trp, à devenir spatialement agglomérées.
35 Donc la capacité de la molécule à se fixer à des zones
hydrophobes dans la peau pendant l'électrotransport est

réduite, ce qui facilite le passage du polypeptide à travers la peau.

La présente invention est décrite par l'utilisation, à titre d'exemple, d'une molécule d'hormone parathyroïdienne (PTH) et d'un dérivé d'hirudine comme composés parentaux. La PTH est une hormone peptidique qui règle le contrôle homéostatique du métabolisme du calcium et du phosphate et elle a été utilisée pour traiter l'ostéoporose. Une PTH de type sauvage est représentée sur la figure 1A. La molécule comporte 34 radicaux d'acides aminés et elle présente un poids moléculaire d'environ 4.000 daltons. Comme montré ici, la molécule a une très grande tendance à adopter la formation hélicoïdale α .

Le hirulog est un anticoagulant peptidique synthétique à base d'hirudine qui inhibe de manière efficace à la fois de la thrombine libre et de la thrombine liée à de la fibrine. L'hirulog a été montré comme inhibant une thrombose veineuse post-opératoire chez des patients subissant une intervention chirurgicale orthopédique. La séquence du composé hirulog parental utilisé à titre d'exemple dans la présente invention est représentée sur la figure 2A.

Comme l'utilisation des substances parentales décrites ci-dessus est donnée à titre d'exemple, la présente invention trouve également application avec une large variété d'autres protéines et agents polypeptidiques parentaux, comme d'autres polypeptides dérivés de sources eucaryotes, procaryotes et virales, ainsi que des peptides synthétiques. De tels polypeptides ont d'une manière générale d'environ 10 à environ 50 acides aminés, une structure secondaire qui peut être amenée à une manipulation et qui n'est pas encline à adopter une structure pliée tertiaire stable, par exemple à la suite d'une haute concentration de radicaux Cys. De tels polypeptides comprennent, sans limitation, des médica-

ments peptidiques qui sont des antibiotiques et des agents antiviraux, des antinéoplasiques, des immunomodulateurs, des hormones peptidiques comme ACTH, CRF, GHRH, de la cholécystokinine, des dynorphines, des endorphines, de l'endothéline, des fragments de fibronectine, de la galanine, de la gastrine, de l'insulino-tropine, du glucagon, des fragments de protéine de fixation de GTP, de la guanyline, les leukokinines, de la magainine, des mastoparans, de la dermaseptine, de la systémine, des neuromédines, de la neurotensine, de la pancréastatine, un polypeptide pancréatique, une substance P, de la sécrétine, de la thymosine, et des substances analogues.

La structure secondaire du polypeptide parental est généralement manipulée par remplacement d'un ou de plusieurs radicaux d'acides aminés parentaux sélectionnés par un ou plusieurs radicaux d'acide aminé ayant une moindre tendance à former des conformations d'hélice α et/ou de feuille β . Sous ce rapport, chaque radical d'acide aminé montre des préférences de conformation. Une mesure de la tendance relative d'un radical particulier à intervenir dans une hélice α ou un brin β a été définie par les paramètres $P\alpha$ et $P\beta$ (Chou, P.Y. et Fasman, G.D., Ann. Rev. Biochem. (1978)47:251-276). Une liste mise à jour et révisée des valeurs de $P\alpha$ et $P\beta$ est donnée au Tableau 1. Les valeurs $P\alpha$ dans le Tableau 1, qui sont plus grandes que 1,00, représentent des acides aminés qui favorisent des conformations hélicoïdales α et elles sont définies ici comme étant de "hautes valeurs de $P\alpha$ ". D'une manière semblable, les valeurs de $P\beta$ dans le Tableau 1, qui sont plus grandes que 1,00, représentent des acides aminés qui favorisent une formation de brin β et elles sont définies ici comme étant de "hautes valeurs de $P\beta$ ". Les acides aminés ayant des valeurs de $P\alpha$ et de $P\beta$ de 1,00 ou moins défavorisent ou rompent les conformations secondaires et

elles sont définies ici comme étant des "valeurs de $P\alpha$ faibles" et des "valeurs de $P\beta$ faibles".

Donc, par exemple, les acides aminés Glu, Ala et Leu ont des valeurs de $P\alpha$ élevées et ils favorisent une formation d'hélice, tandis que Pro, Gly, Ser, Cys, Tyr et Asn ont des valeurs de $P\alpha$ faibles et par conséquent défavorisent une formation d'hélice. D'une manière semblable, les radicaux d'acides aminés Val, Ile et Tyr ont des valeurs de $P\beta$ élevées et favorisent une formation de brin β , tandis que les acides aminés Pro, Asp, Asn, Glu et Gly défavorisent une telle formation. En combinant les valeurs de $P\alpha$ et de $P\beta$, les acides aminés qui montrent la plus faible tendance à former ces types de structures secondaires sont Gly, Asn, Pro et Ser.

15

TABLEAU 1 *Préférences de conformation des acides aminés

<u>Radical d'acide</u>	<u>Hélice α</u>	<u>Brin β</u>
<u>aminé</u>	<u>($P\alpha$)</u>	<u>($P\beta$)</u>
Glu	1,59	0,52
20 Ala	1,41	0,72
Leu	1,34	1,22
Met	1,30	1,14
Gln	1,27	0,98
Lys	1,23	0,69
25 Arg	1,21	0,84
His	1,05	0,80
Val	0,90	1,87
Ile	1,09	1,67
Tyr	0,74	1,45
30 Cys	0,66	1,40
Trp	1,02	1,35
Phe	1,16	1,33
Thr	0,76	1,17
Gly	0,43	0,58
35 Asn	0,76	0,48
Pro	0,34	0,31

Ser	0,57	0,96
Asp	0,99	0,39

* Les données dans le Tableau 1 sont prises de T.E. Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W.H. Freeman and Company, 1993), p.256.

Un segment d'une structure secondaire particulière est beaucoup plus probable lorsque plusieurs radicaux adjacents préfèrent cette structure. Donc, une hélice α peut être prédite si quatre de six radicaux adjacents sont favorables à une hélice et si la valeur moyenne de $P\alpha$ est plus grande que 1,05 et plus grande que $P\beta$. D'une manière semblable, un brin β est prédit si trois de cinq radicaux adjacents sont favorables à une feuille et si la valeur moyenne de $P\beta$ est plus grande que 1,04 et plus grande que $P\alpha$. T.E. Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W.H. Freeman and Company, 1993), pp. 255-257.

Donc, en utilisant ces principes, des radicaux d'acide aminé dans des parties de la molécule, qui sont enclins à une formation d'hélice α et de feuille β , peuvent être remplacés par ces radicaux du Tableau 1 qui défavorisent de telles conformations. De préférence, un radical ayant une valeur élevée de $P\alpha$ ou de $P\beta$ est remplacé par un radical ayant une valeur faible de $P\alpha$ ou respectivement de $P\beta$.

D'autres procédés de détermination de la propension d'un polypeptide à former des segments d'hélice α et de feuille β sont également connus. Par exemple le potentiel d'hélice α d'un polypeptide linéaire peut être estimé par exemple par les équations de Lifson-Roig (S. Lifson et A. Roig, J. Chem. Phys. (1961) 34: 1963-1974) en utilisant des valeurs pour les paramètres de formation d'hélice résiduaire converties à partir de leurs valeurs de Zimm-Bragg calculées (Zimm, B.H. et Bragg, J.K., J. Chem. Phys. (1959) 31:526-535) en employant des équations de conversion de Qian et

Schellman (Qian, H. et Schellman, J.A., J. Chem. Phys. (1992) 96:3987-3994).

Plus particulièrement, les paramètres de Zimm-Bragg, s et σ , représentent la constante de stabilité
5 d'enroulement d'hélice et respectivement le facteur de nucléation. Un jeu de valeurs s et σ de Zimm-Bragg ont été définies pour chaque radical d'acide aminé (voir
Tableau 1 de Finkelstein et coll., Proteins: Structure, Function and Genetics, (1991) 10:287-299) et la probabi-
10 lité que la chaîne polypeptidique entière (ou une certaine sous-séquence définie) adopte une hélice α peut être calculée en utilisant les équations rapportées.

Les paramètres d'hélice de Lifson-Roig correspondants, u , v et w , peuvent aussi être utilisés pour
15 réaliser une détermination semblable (Lifton, S. et Roig, A., J. Chem. Phys., (1961) 34:1963-1974). Sous ce rapport, w , qui est utilisé pour définir une unité peptidique à l'intérieur d'une séquence ininterrompue d'états hélicoïdaux, peut être calculé à partir de s .
20 v de Lifson-Roig définit une unité peptidique au commencement ou à la fin d'une séquence ininterrompue d'états hélicoïdaux et il peut être calculé à partir du paramètre $\sigma^{1/2}$ de Zimm-Bragg. Le facteur u définit le poids statistique de la région d'enroulement et il ne corres-
25 pond pas à une paramètre de Zimm-Bragg.

En utilisant ces paramètres, il y a deux calculs généralement utilisés pour estimer un potentiel d'hélice α . Le premier prend le paramètre d'initiation d'hélice de Lifson-Roig v comme étant une constante de
30 0,039 (c'est-à-dire que le paramètre σ de Zimm-Bragg est de 0,0013 pour tous les radicaux), avec le paramètre w pour chaque acide aminé calculé à partir de la valeur s de Zimm-Bragg trouvée dans le Tableau 1 de Finkelstein et coll., Proteins: Structure, Function and Genetics,
35 (1991) 10:287-299. Le deuxième calcul ne suppose pas que tous les radicaux ont la même valeur pour le paramè-

tre d'initiation d'hélice v (c'est-à-dire que le paramètre σ de Zimm-Bragg est unique pour chaque radical d'acide aminé). En utilisant ce procédé, les valeurs s et σ de Zimm-Bragg pour chaque radical peuvent être
5 déterminées à partir du Tableau 1 de Skolnick, J. et Holtzer, A., *Macromolecules* (1982) 15:812-821. Ces procédés sont décrits davantage dans la suite, dans les exemples.

Les analogues de polypeptide suivant la
10 présente invention peuvent être produits suivant un nombre quelconque de manières qui sont bien connues dans la technique. Sous ce rapport, puisque les analogues sont relativement petits, c'est-à-dire jusqu'à environ
15 50 acides aminés en longueur, ils peuvent être synthétisés de manière appropriée par voie chimique, par n'importe quelle des nombreuses techniques qui sont connues des hommes de métier dans le domaine des peptides. En général, ces procédés emploient l'addition séquentielle
20 d'un ou de plusieurs acides aminés de façon à former une chaîne peptidique croissante. Normalement, soit le groupe amino soit le groupe carboxyle du premier acide aminé est protégé par un groupe de protection approprié. L'acide aminé protégé ou converti en dérivé peut alors
25 être attaché à un support solide inerte ou utilisé en solution par addition de l'acide aminé suivant dans la séquence ayant le groupe complémentaire (amino ou carboxyle) protégé de manière appropriée, dans des conditions qui permettent la formation d'une liaison
30 amide. Le groupe protecteur est alors éliminé du radical d'acide aminé nouvellement ajouté et l'acide aminé suivant (protégé de manière appropriée) est alors ajouté, et ainsi de suite. Après que les acides aminés souhaités ont été liés dans la séquence appropriée, n'importe quel groupe protecteur restant (et n'importe
35 quel support solide, si des techniques de synthèse en phase solide sont utilisées) est éliminé séquentielle-

ment ou conjointement pour rendre le polypeptide final. Par une simple modification de cette procédure générale, il est possible d'ajouter plus d'un acide aminé à la fois à une chaîne croissante, par exemple par couplage
5 (dans des conditions qui ne racémisent pas des centres chiraux) d'un tripeptide protégé à un dipeptide protégé de manière appropriée pour former, après enlèvement de la protection, un pentapeptide. Voir par exemple J.M. Stewart et J.D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis,
10 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL 1984) et G. Barany et R.B. Merrifield, The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, éditeurs E. Gross et J. Meienhofer, Vol. 2, (Academic Press, New York, 1980), p. 3-254, pour des techniques de synthèse de peptides en phase solide, et
15 M. Bodansky, Principles of Peptide Synthesis, (Springer-Verlag, Berlin 1984) et E. Gross et J. Meienhofer, Eds., The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 1, pour une synthèse en solution classique.

Les groupes protecteurs typiques comprennent
20 du t-butyloxycarbonyle (Boc), du 9-fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc), du benzyloxycarbonyle (Cbz), du p-toluènesulfonyle (Ts), du 2,4-dinitrophényle, du benzyle (Bzl), du biphénylisopropyloxy-carboxy-carbonyle, du t-amylloxycarbonyle, de l'isobornyloxycarbonyle, de l'o-bromobenzoyloxycarbonyle, du cyclohexyle, de l'isopropyle, de l'acétyle, de l'o-nitrophénylsulfonyle et des groupes analogues.

Comme supports solides avantageux, on peut citer des supports polymères réticulés. Ceux-ci peuvent
30 comprendre des polymères de divinylbenzène-styrène réticulé, par exemple des copolymères de divinylbenzène-hydroxyméthylstyrène, des copolymères de divinylbenzène-chlorométhylstyrène et des copolymères de divinylbenzène-benzhydrylaminopolystyrène.

35 Les analogues de polypeptide suivant la présente invention peuvent aussi être préparés par voie

chimique par d'autres procédés, comme par le procédé de synthèse de peptide multiple simultanée. Voir par exemple Houghten, Proc. Natl. Acad. Sci., USA (1985) 82:5131-5135, US-A-4.631.211.

5 En variante, les peptides peuvent être produits par des techniques de recombinaison, par exemple par synthèse d'ADN codant le peptide souhaité, conjointement à un codon d'initiation ATG. La séquence nucléotidique peut être conçue avec les codons appropriés pour
10 la séquence particulière souhaitée d'acides aminés. En général, on choisit des codons préférés pour l'hôte visé dans lequel la séquence est exprimée. La séquence complète est généralement assemblée par superposition d'oligonucléotides préparés par des méthodes standards
15 et assemblés en une séquence codante complète. Voir par exemple Edge Nature (1981) 292:756, Nambair et coll., Science (1984) 223:1299, Jay et coll., J. Biol. Chem. (1984), 259:6311. Des techniques synthétiques automatisées, telles qu'une synthèse en phase solide à phosphoramide, peuvent être utilisées pour former la séquence
20 nucléotidique. Voir par exemple Beaucage, S.L. et coll., Tet.Lett. (1981) 22:1859-1862, Matteucci, M.D. et coll., J. Am. Chem. Soc. (1981) 103:3185-3191. Ensuite l'ADN est cloné en un vecteur d'expression approprié,
25 soit procaryote soit eucaryote, en utilisant des procédés conventionnels.

D'une autre manière, des techniques de recombinaison sont aisément utilisées pour cloner le gène de polypeptide parental qui peut alors être soumis à une
30 mutagénèse in vitro par le remplacement de la ou des paires de bases appropriées de façon à obtenir le codon pour l'acide aminé souhaité. Un tel changement peut comprendre aussi peu qu'une paire de bases, en effectuant un changement dans un seul acide aminé, ou il peut
35 englober des changements de plusieurs paires de bases. D'une autre manière, les mutations peuvent être effec-

tuées en utilisant un amorçeur mal apparié qui s'hybride à la séquence nucléotidique parentale (d'une manière générale de l'ADNc correspondant à la séquence d'ARN), à une température en dessous de la température de fusion du duplex mal apparié. L'amorceur peut être rendu
5 spécifique en maintenant une longueur d'amorceur et une composition de base à l'intérieur de limites relativement étroites et en maintenant la base mutatrice centralement localisée. Zoller et Smith, Methods Enzymol. (1983) 100:468. Une extension d'amorceur est effectuée en utilisant de l'ADN polymérase, le produit est cloné et les clones contenant l'ADN muté, dérivés par ségrégation du brin étendu d'amorceur, sont sélectionnés. La sélection peut être accomplie en utilisant l'amorceur de mutant comme sonde d'hybridation. Cette technique est
15 également applicable pour engendrer des mutations en des points multiples. Voir par exemple Dalbie-McFarland et coll., Proc.Natl.Acad.Sci USA (1982) 79:6409.

En utilisant les procédés ci-dessus, un certain nombre d'analogues de polypeptide représentatifs montrant un flux d'électrotransport accru ont été réalisés.

L'analogue de PTH, illustré sur la figure 1C, diffère de la séquence parentale (figure 1A) comme suit :

Met₈ a été substitué par Leu ; Leu₁₁ a été substitué par Ser ; Leu₁₅ a été substitué par Arg ; Leu₁₈ a été substi

30

35

tué par Ser ; Met₁₈ a été substitué par Ser ; Glu₁₉ a été substitué par Arg ; Val₂₁ a été substitué par Ser ; Glu₂₂ a été substitué par Arg ; Leu₂₄ a été substitué par Ser ; Leu₂₈ a été substitué par Ser ; Gln₂₉ a été substitué par Lys ; Tyr₃₄ a été substitué par Ser ; et une lactone d'homosérine est présente à la terminaison C du peptide. Prises ensemble, ces substitutions ont pour résultat une structure secondaire diminuée.

Les hirulogs sont une série d'analogues synthétiques d'hirudine, un inhibiteur naturel de la thrombine. Deux de ces analogues sont représentés sur la figure 2. Hirulog-1, représenté sur la figure 2B, est décrit dans Maragnore et coll., Biochem. (1990) 29:7095-7101. Hirulog-B2, un peptide de vingt acides aminés ayant un poids moléculaire d'environ 2.186 daltons, a la séquence représentée sur la figure 2C. Ainsi qu'on peut le voir, l'analogue hirulog-B2 diffère de l'analogue hirulog-1 représenté sur la figure 2C, en ce qu'il comporte de la D-cyclohexylalanine au lieu de D-phénylalanine dans la première position. Hirulog-B2 est décrit dans Witting et coll., Biochem. J. (1992) 287:663-664 et la WO 92/13.952.

Une fois que l'analogue de polypeptide souhaité est préparé, il peut être délivré au sujet en utilisant un quelconque des nombreux systèmes de délivrance de médicament par électrotransport et on n'est pas limité à l'utilisation d'un système particulier. Comme exemples de systèmes de délivrance de médicament par électrotransport on peut citer par exemple les US-A-5.312.326, US-A-5.080.646, US-A-5.387.189 et US-A-5.169.383, dont les descriptions sont incorporées ici à titre de référence.

La figure 3 illustre un dispositif de délivrance par électrotransport représentatif qui peut être utilisé conjointement au présent procédé. Le dispositif comprend un corps supérieur 16, une unité de pla-

quette de circuits 18, un corps inférieur 20, une
électrode anodique 22, une électrode cathodique 24, un
réservoir d'anode 26, un réservoir de cathode 28 et un
adhésif compatible avec la peau 30. Le corps supérieur
5 16 présente des ailes latérales 15 qui aident au main-
tien du dispositif 10 sur une peau de patient. Le corps
supérieur 16 est de préférence constitué d'un élastomère
moulable par injection (par exemple de l'éthylène
acétate de vinyle). L'unité de plaquette de circuits
10 imprimés 18 comprend un circuit intégré 19 couplé à des
composants électriques discrets 40 et à une batterie 32.
L'unité de plaquette de circuits 18 est attachée au
corps 16 par des montants (non représentés sur la figure
1) passant à travers des ouvertures 13a et 13b, les
15 extrémités des montants étant chauffées/fondues en vue
de piquer à chaud l'unité de plaquette de circuits 18
sur le corps 16. Le corps inférieur 20 est attaché au
corps supérieur 16 au moyen de l'adhésif 30, la surface
supérieure 34 de l'adhésif 30 étant amenée à adhérer à
20 la fois sur le corps inférieur 20 et le corps supérieur
16, y compris les surfaces inférieures des ailes 15.

Sur la face inférieure de l'unité de plaquette
de circuits 18 est représentée une pile à bouton 32.
D'autres types de batterie peuvent aussi être employés
25 pour alimenter le dispositif 10.

Le dispositif 10 est généralement constitué
d'une batterie 32, d'un circuit électronique 19, 40,
d'électrodes 22, 24, et de réservoirs de médicament/pro-
duit chimique 26, 28, tout cela étant intégré dans une
30 unité autonome. Les sorties (non représentées sur la
figure 3) de l'unité de plaquette de circuits 18 permet-
tent un contact électrique avec les électrodes 24 et 22
par des ouvertures 23, 23' dans les évidements 25, 25'
formés dans le corps inférieur, au moyen de rubans
35 adhésifs électriquement conducteurs 42, 42'. Les
électrodes 22 et 24 sont à leur tour en contact direct

mécanique et électrique avec les faces supérieures 44',
44 des réservoirs 26 et 28. Les faces inférieures 46',
46 des réservoirs 26, 28 sont en contact avec la peau du
patient à travers les ouvertures 29', 29 prévues dans
5 l'adhésif 30.

Le dispositif 10 comporte éventuellement une
particularité qui permet au patient de s'auto-adminis-
trer une dose de médicament par électrotransport. Après
enfoncement du commutateur à bouton poussoir 12, le
10 circuit électronique de l'unité de plaquette de circuits
18 fournit un courant continu prédéterminé aux électro-
des/réservoirs 22, 26 et 24, 28 pendant un intervalle de
délivrance de longueur prédéterminée. Le commutateur à
bouton poussoir 12 est avantageusement localisé sur la
15 face supérieure du dispositif 10 et il est aisément
actionné à travers le vêtement. Une double pression sur
le commutateur à bouton poussoir 12 en l'espace d'une
courte période de temps, par exemple de 3 secondes, est
de préférence utilisée pour actionner le dispositif de
20 délivrance de médicament, en minimisant ainsi la proba-
bilité d'un actionnement par inadvertance du dispositif
10. De préférence, le dispositif transmet à l'utilisa-
teur une confirmation visuelle et/ou audible du démar-
rage de l'intervalle de délivrance de médicament au
25 moyen de la DEL 14 devenant allumée et/ou d'un signal
sonore audible provenant par exemple d'un émetteur de
"bip-bip". Du médicament est délivré à travers la peau
du patient par électrotransport, par exemple sur le
bras, sur l'intervalle de délivrance prédéterminé.

30 L'électrode anodique 22 est de préférence
constituée d'argent et l'électrode cathodique 24 est de
préférence constituée de chlorure d'argent. Les deux
réservoirs 26 et 28 sont de préférence constitués de
matières à base d'hydrogel polymère. Les électrodes 22,
35 24 et les réservoirs 26, 28 sont retenus à l'intérieur
des dépressions 25', 25 dans le corps inférieur 20.

Le commutateur à bouton poussoir 12, le circuit électronique sur l'unité de plaquette de circuits 18 et la batterie 22 sont "scellés" de manière adhésive entre le corps supérieur 16 et le corps inférieur 20. Le corps supérieur 16 est de préférence constitué d'une matière caoutchouteuse ou d'une autre matière élastomère. Le corps inférieur 20 est de préférence constitué d'une matière en feuille plastique ou élastomère (par exemple du polyéthylène) qui peut être aisément moulée pour former les évidements 25, 25' et les découpes destinées à former des ouvertures 23, 23'. Le dispositif assemblé 10 est de préférence résistant à l'eau (c'est-à-dire résistant aux éclaboussures) et il est très avantageusement étanche à l'eau. Le système présente un profil bas qui se conforme aisément au corps en permettant une liberté de mouvement au site porteur et autour de celui-ci. Les réservoirs 26 et 28 sont situés sur la face en contact avec la peau du dispositif 10 et ils sont suffisamment séparés pour empêcher un court-circuit accidentel pendant une manipulation et une utilisation normales.

Le dispositif 10 adhère à la surface du corps du patient (par exemple la peau) au moyen d'un adhésif périphérique 30 qui présente une face supérieure 34 et une face en contact avec le corps 36. La face adhésive 36 a des propriétés adhésives qui assurent que le dispositif 10 reste en place sur le corps pendant une activité d'utilisateur normale, et elle permet encore un enlèvement raisonnable après la période de port prédéterminée (par exemple 24 heures). La face adhésive supérieure 34 adhère au corps inférieur 20 et retient le corps inférieur 20 attaché au corps supérieur 16.

Les réservoirs 26 et 28 comprennent d'une manière générale une matrice de gel, avec la solution de médicament uniformément dispersée dans au moins un des réservoirs 26 et 28. Des concentrations de médicament

de l'ordre d'environ $1 \times 10^{-4}M$ à $1,0 M$ ou davantage peuvent être utilisées, les concentrations de médicament dans la partie inférieure de la gamme étant préférées. Les polymères appropriés pour la matrice de gel peuvent

5 comprendre essentiellement n'importe quelle matière polymère synthétique et/ou apparaissant dans la nature, non ionogène. Une nature polaire est préférée lorsque l'agent actif est polaire et/ou capable d'ionisation, de façon à accroître la solubilité de l'agent. Eventuelle-

10 ment, la matrice de gel est capable de gonfler dans l'eau. Comme exemples de polymères synthétiques appropriés, on peut citer, mais d'une manière non limitative, du poly(acrylamide), du poly(2-hydroxyéthyl-acrylate), du poly(2-hydroxypropyl-acrylate), de la poly(N-vinyl-2-

15 pyrrolidone), du poly(n-méthylol-acrylamide), du poly(-diacétone-acrylamide), du poly(2-hydroxyléthyl-méthacrylate), du poly(vinyl-alcool) et du poly(allyl-alcool). Des polymères de condensation hydroxy fonctionnels (c'est-à-dire des polyesters, des polycarbonates, des

20 polyuréthanes) sont également des exemples de polymères synthétiques polaires appropriés. Les polymères polaires apparaissant naturellement (ou leurs dérivés) appropriés pour une utilisation comme matrice de gel sont par exemple des éthers de cellulose, des éthers de

25 méthylcellulose, de la cellulose et de la cellulose hydroxylée, de la méthylcellulose et de la méthylcellulose hydroxylée, des gommes, comme du guar, du locust, du karaya, du xanthane, de la gélatine et leurs dérivés. Des polymères ioniques peuvent aussi être utilisés pour

30 la matrice pourvu que les contre-ions disponibles soient soit des ions de médicament soit d'autres ions qui sont chargés de manière opposée par rapport à l'agent actif.

Donc, les analogues de polypeptide suivant la présente invention sont incorporés dans le réservoir de

35 médicament, par exemple une matrice de gel qui vient juste d'être décrite, et ils sont administrés à un

patient en utilisant un système de délivrance de médicament par électrotransport, éventuellement tel que celui donné en exemple ci-dessus. Une incorporation de la solution de médicament peut être faite un nombre quelconque de fois, c'est-à-dire par imbibition de la solution dans la matrice de réservoir, par mélange de la solution de médicament avec la matière de matrice avant la formation d'hydrogel, ou d'une manière analogue.

Tandis que l'invention a été décrite conjointement aux formes de réalisation spécifiques préférées de celle-ci, il faut entendre que la description qui précède ainsi que les exemples qui suivent sont destinés à illustrer et non pas à limiter la portée de l'invention. D'autres aspects, avantages et modifications dans le cadre de l'invention apparaîtront à l'homme de métier concerné par l'invention.

III. PARTIE EXPERIMENTALE

D'une manière générale, des techniques standards de technologie d'ADN recombinant sont décrites dans diverses publications, par exemple Sambrook et coll., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989), Ausubel et coll., Current Protocols in Molecular Biology, vols. 1 et 2 et suppléments (1987), et Wu et Grossman (éds.), Methods in Enzymology, Vol. 53 (Recombinant DNA Part D, 1987). Des enzymes de restriction, des milieux de culture de cellules de mammifère, et une lignée cellulaire d'E. coli DH10B (F-mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) F80dlacZDM15 DlacX74 deoR recA1 araD139 D(ara,leu)7697 galU galK I-rpsL endA1 nupG) sont vendus par Gibco/BRL (Gaithersburg, MD). De la Taq polymérase est disponible chez Perkin Elmer Cetus (Norwalk, CT). Une résine de liaison de His est vendue par Novagen (Madison, WI) et est utilisée conformément aux instructions du fabricant. De la DNase et du lysozyme sont vendus par Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN). Du bromure de cyanogène

est vendu par Aldrich (Milwaukee, WI). Des oligonucléotides sont synthétisés sur un synthétiseur d'ADN modèle 394 de Applied Biosystems Inc. (Foster City, CA), utilisant des produits chimiques ABI. Une hormone parathyroïdienne humaine synthétique et une hormone parathyroïdienne bovine synthétique sont vendues par Bachem (Torrance, CA).

EXEMPLE 1

CONSTRUCTION DE VECTEURS D'EXPRESSION

10 POUR LES POLYPEPTIDES PTH

Les vecteurs d'expression de PTH sont construits en plusieurs étapes en utilisant un plasmide pBAD18 (Guzman et coll. 1995), comme plasmide de départ. Le plasmide pBAD18 contient le promoteur araB suivi par un polylier et un agent de terminaison sous le contrôle du régulateur positif/négatif araC, également spécifié par le plasmide. Le plasmide pBAD18 contient également une origine de plasmide pBR322 modifié et le gène bla pour permettre une répllication et une sélection dans E. coli, ainsi que la région intragénique de phage M13 pour permettre une sauvetage d'ADN simple brin. Cependant, dans les buts de la présente invention, le vecteur de clonage effectif, utilisé pour construire les vecteurs d'expression de l'invention, n'est pas critique.

25 Par exemple, un plasmide pMC3 pourrait servir comme vecteur de clonage au lieu du plasmide pBAD18 dans les protocoles ci-dessous. Le plasmide pMC3 est décrit dans le US-A-5.270.170. Le plasmide pMC3 diffère du plasmide pBAD18 en ce que le plasmide pMC3 code un répresseur lac à queue dynorphine B dans la région correspondant à la région NheI-XbaI du site de clonage multiple de pBAD18 et code une séquence d'opérateur lac dans la région correspondant au fragment NdeI-ClaI du plasmide pBAD18. Comme ce dernier fragment n'est pas
35 essentiel dans les buts de la présente invention, on pourrait construire aisément des vecteurs appropriés

de Tris, pH=7,5, 10 mM d'EDTA, 100 mM de KCl), 250 ml de PBS, et 250 ml de 10 mM de Tris, pH=7,5. Les cellules sont alors remises en suspension dans 100 ml d'une solution composée de 10 mM de Tris, pH=7,5, de 0,1 mg/ml d'inhibiteur de protéase, la N-tosyl-L-phénylalanine-chlorométhyl-cétone (TPCK), de 0,1 mg/ml d'inhibiteur de protéase, la N-tosyl-L-lysine-chlorométhyl-cétone (TLCK), de 0,1 mg/ml d'inhibiteur de protéase, du fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF), et de 0,05 mg/ml de lysozyme. La solution résultante est mise à incuber sur de la glace pendant 1 heure. Les cellules sont alors soumises à un gel-dégel, 1 mg de DNase est ajouté aux cellules gelées-dégelées et le mélange résultant est mis à incuber sur de la glace pendant une heure supplémentaire.

Des corps d'inclusion issus des cellules sont purifiés par centrifugation à 10.000Xg pendant 15 minutes. Les corps d'inclusion sont solubilisés dans 10 % de SDS, mais dans certains cas, un traitement sonique de l'échantillon est aussi nécessaire pour solubiliser toute la protéine. Un tampon de fixation (5 mM d'imidazole, 500 mM de NaCl et 20 mM de Tris, pH=7,9) est ajouté pour diluer la concentration de SDS à 1 % et l'échantillon est chargé sur une colonne contenant une résine de fixation de His (Novagen). La colonne est alors lavée avec 15 volumes de colonne du tampon de fixation, et la protéine fixée est ensuite éluée avec un volume de colonne de tampon d'éluion (500 mM de NaCl, 100 mM d'EDTA et 50 mM de Tris, pH=7,9). Deux volumes d'éthanol absolu sont alors ajoutés pour faire précipiter la protéine.

Le polymère de PTH précipité est ensuite dissous dans 70 % d'acide formique, et un excès molaire de 500 fois (un excès de 100 à 1000 fois peut être utilisé) de CNBr est ajouté. Un espace de temps de clivage (effectué à différentes concentrations de CNBr

pour déterminer le temps optimal) indique, lorsqu'il est examiné par analyse d'acide aminé, qu'un clivage complet est obtenu en deux heures à la température ambiante. Après clivage au CNBr, les peptides sont lyophilisés et
5 remis en suspension dans de l'eau distillée. Le peptide est remis en suspension dans un tampon A (0,1 % de TFA) et ensuite il est purifié par HPLC en utilisant une colonne de semi-préparation VYDAC C-18. Approximativement 30 mg du peptide sont injectés sur la colonne. Le
10 peptide est ensuite élué avec un gradient de 20-40 % d'acétonitrile/0,1 % de TFA pendant 40 minutes. Le pic principal, éluant à approximativement 15 minutes, est recueilli et lyophilisé à sec.

Après isolement de corps d'inclusion et purification comme décrit ci-dessus, le peptide est
15 d'une pureté plus grande que 95 % ainsi qu'il est déterminé par SDS-PAGE. Le peptide est ensuite dessalé et il est partiellement purifié sur une colonne SepPak. Des pics individuels sont isolés et analysés par une
20 spectrométrie de masse à électropulvérisation pour déterminer la composition. Deux pics mineurs sont présents qui sont le résultat d'un clivage au bromure de cyanogène incomplet et qui représentent le peptide PTH-His₆ et le peptide I-N-M-PTH. Le pic principal englobe
25 davantage que 80 % de la protéine totale. Une comparaison entre l'échantillon purifié sur Sep-Pak "brut" et la RPTH purifiée par HPLC ne montre pas une différence significative dans la capacité de stimulation d'adénylate-cyclase.

30

EXEMPLE 3

PRODUCTION D'ANALOGUES DE PTH

En vue de produire les analogues de PTH de la présente invention, le peptide PTH est substitué avec les acides aminés indiqués sur les figures 1C et 1D. Des
35 analogues de PTH sont produits par recombinaison en étant construits d'une manière semblable à ce qui est

décrit ci-dessus pour le gène RPTH-A recombinant, par substitution des bases appropriées. Les analogues de PTH sont exprimés et purifiés comme décrit ci-dessus.

EXEMPLE 4

5 EXAMEN D'ACTIVITE D'ANALOGUE DE PTH

Une PTH synthétique ayant la séquence de type sauvage et les analogues de PTH recombinants (RPTH) sont testés quant à leur capacité de stimuler de l'adénylate-cyclase. Les concentrations de PTH sont déterminées par
10 DO_{280} en utilisant un coefficient d'extinction de 6600 pour le peptide recombinant et de 5500 pour le peptide synthétique. La lignée cellulaire d'ostéosarcome de rat UMR106 (ATCC CRL 1661) est utilisée pour tester in vitro la capacité des peptides à activer le récepteur de PTH.
15 Une activation du récepteur de PTH conduit à une augmentation intracellulaire de la concentration de cAMP.

Les cellules UMR106 sont ensemencées à environ $2,5 \times 10^5$ par puits dans une boîte à 48 puits et on les laisse croître jusqu'à confluence. Les essais sont effectués sur des cellules à 3-5 jours de post-confluence.
20 Les milieux (milieu d'Eagle modifié par Dulbecco, DMEM, avec du sérum de veau foetal) sont éliminés, et 1 ml de milieu frais est appliqué. La PTH (recombinante ou synthétique) à différentes concentrations et de la 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX) à une concentration
25 finale de 1 mM sont alors ajoutées à chaque puits de la plaque qui est ensuite mise à incuber pendant 5 minutes à la température ambiante. Le milieu est ensuite éliminé et les cellules sont rapidement lavées avec du
30 PBS refroidi par de la glace. Les cellules sont ensuite extraites à deux reprises avec 1 ml d'éthanol absolu. Les deux extractions sont combinées et l'éthanol est éliminé par évaporation. Ensuite on redissout l'extrait dans 1 ml de tampon de proximité de scintillation
35 (tampon SPA) (Amersham, Arlington Heights, IL).

EXEMPLE 5PREDICATION DES EFFETS DES SUBSTITUTIONS
D'ACIDE AMINE DANS LES ANALOGUES DE PTH SUR
LE POTENTIEL D'HELICE α

5 Comme expliqué précédemment, le potentiel
d'hélice α de polypeptides linéaires peut être estimé en
utilisant les équations de Lifson-Roig (Lifson, S. et
Roig, A., J. Chem. Phys. (1961) 34:1963-1974) et des
valeurs pour les paramètres de formation d'hélice
10 résiduaire convertis à partir de leurs valeurs de Zimm-
Bragg (Zimm, B.H. et Bragg, J.K., J. Chem. Phys.
(1959)31:526-535), en employant des équations de conver-
sion de Qian et Schellman (Qian, H. et Schellman, J.A.,
J. Chem. Phys. (1992) 96:3987-3994). Une fois qu'un jeu
15 de valeurs s et σ de Zimm-Bragg sont définies pour
chaque radical, la probabilité que la chaîne polypepti-
dique entière (ou une certaine sous-séquence définie)
adopte une hélice α peut être calculée en utilisant des
équations dans les références ci-dessus.

20 Les deux calculs généralement utilisés pour
estimer un potentiel d'hélice α , décrit ci-dessus, sont
appliqués aux deux analogues de PTH engendrés. Le
premier calcul prend le paramètre d'initiation d'hélice
 v de Lifson-Roig comme étant une constante de 0,039
25 (c'est-à-dire que le paramètre σ de Zimm-Bragg est de
0,0013 pour tous les radicaux), avec le paramètre w pour
chaque acide aminé calculé à partir de la valeur s de
Zimm-Bragg trouvée dans le Tableau 1 de Finkelstein et
coll., Proteins: Structure, Function and Genetics (1991)
30 10:287-299. En appliquant les calculs aux analogues de
PTH (figures 1C et 1D), les valeurs s du Tableau 1 de
cette référence sont tout d'abord converties de leurs
valeurs à 300°K en les valeurs estimées à 273°K en
utilisant un changement d'enthalpie supposé de 1 kcal/-
35 mole (identique pour tous les radicaux). Pour l'ana-
logue 1C de PTH ce calcul donne une probabilité de 0,18

pour que la séquence entière soit une hélice α . Pour l'analogue 1D de PTH ce calcul donne une probabilité de 0,15 pour que la séquence entière soit une hélice α .

Le deuxième calcul ne suppose pas que tous les radicaux aient la même valeur pour le paramètre d'initiation d'hélice v (c'est-à-dire que le paramètre σ de Zimm-Bragg soit unique pour chaque radical d'acide aminé). Dans ce cas, les valeurs de s et σ de Zimm-Bragg pour chaque radical sont prises (excepté pour His, Pro et Trp) du Tableau 1 de Skolnick, J. et Holtzer, A., *Macromolecules* (1982) 15:812-821. Les valeurs de Zimm-Bragg pour His sont prises de Sueki et coll., *Macromolecules* (1984) 17:148-155. Les valeurs de Zimm-Bragg pour Pro et Trp sont prises de Finkelstein et coll. Pour ce second calcul alternatif dans chaque cas, la valeur s est calculée à 273°K, et pour les radicaux ayant des chaînes latérales ionisables, la valeur s pour l'état d'ionisation qui prédominerait à un pH de 7 est admise. Les valeurs s (à 273°K) et les valeurs σ obtenues de Sueki et coll. et Skolnick et Holtzer sont converties (Qian et Schellman) à leurs valeurs v et w de Lifson-Roig et ensuite utilisées pour calculer la probabilité pour que la chaîne polypeptidique entière (ou une certaine sous-séquence) existe dans l'état hélicoïdal α . Pour l'analogue 1C de PTH, ce calcul donne une probabilité de 0,02 pour que la séquence entière soit une hélice α . Pour l'analogue 1D de PTH, ce calcul donne une probabilité de 0,02 pour que la séquence entière soit une hélice α .

EXEMPLE 6

ESTIMATION DU POTENTIEL D'HELICE α A PARTIR D'UN DICHROÏSME CIRCULAIRE EN FAISANT VARIER DES CONCENTRATIONS DE TRIFLUOROETHANOL

Des examens de dichroïsme circulaire au trifluoroéthanol (TFE) ont été faits en utilisant un spectromètre de dichroïsme circulaire modèle 62DS de

AVIV Associates, Inc. Des concentrations de protéine sont déterminées à partir de lectures d'absorbance en utilisant des coefficients d'extinction calculés pour les analogues dans 10 mM de tampon ionique. Des titrages de TFE sont effectués de 0 à 50 % de TFE, en balayant de 250 à 200 nm à 20°C pour chaque échantillon de TFE. $[\theta]_{222}$ est calculé par :

$\theta_{\text{observé à } 222^*}$ (poids résiduaire moyen)/(10(longueur de trajet cellulaire)(concentration de protéine)).

10 Les données des titrages de TFE à pH 6,5, 10 mM de cacodylate, sont résumées ci-dessous dans le tableau 2 pour les analogues de PTH et elles sont tracées sur la figure 4. La figure 4 montre que, lorsque le cosolvant induisant une hélice α , le trifluoroéthanol, atteint une concentration de 30 % (v/v), sensiblement la quantité maximale d'hélice est formée pour PHT, la quantité moyenne de configuration hélicoïdale étant d'environ 80 %. Le PTH parental, même en l'absence de l'agent inducteur d'hélice, est environ à 20 % α -hélicoïdal.

20 L'analogue 1C de PTH, en l'absence de TFE inducteur d'hélice, est essentiellement dépourvu d'hélice, et à 30 % de TFE il est au maximum à environ 30 % α -hélicoïdal.

25 L'analogue 1D de PTH, en l'absence de TFE inducteur d'hélice, est essentiellement dépourvu d'hélice, et à 30 % de TFE il est environ 15 % α -hélicoïdal.

30 Cette réduction de 2 à 3 fois dans la teneur observée en hélice à 30 % de trifluoroéthanol peut être prédite sur base de l'équation de Lifson-Roig et des calculs dérivés de celle-ci, comme indiqué précédemment.

TABLEAU 2Données de titrage de TFE

% TFE	U_{222} pour hPTH(1-34)	U_{222} pour analogue 1C	U_{222} pour analogue 1D
0	- 7793	- 2750	- 3867
10	-15863	- 4600	- 6479
20	-21491	- 9065	-12329
30	-26288	-12081	-15161
40	-27011	-14320	-15191
50	-26802	-15649	-15395

EXEMPLE 7FLUX D'ELECTROTRANSPORT IN VITRODES ANALOGUES DE PTH

Des études sur l'électrotransport in vitro sont effectuées dans des cellules à plusieurs compartiments de petit volume, construites sur demande, et utilisant une commande anodique. 1mM de PTH dans 10mM de tampon est placé dans le compartiment donneur et 25mM de récepteur de force ionique finale sont placés dans le compartiment récepteur. La solution de récepteur pour le PTH naturel et l'analogue 1C est constituée de 15mM de NaCl tamponné à pH 7 avec 10mM d'imidazole, 0,1 % d'albumine de sérum de boeuf (BSA) comme agent bloquant, du détergent Tween 20 et de l'azothydrure de sodium, comme bactéricide. La solution de récepteur pour l'analogue 1D de PTH est constituée de 15mM de NaCl tamponné à un pH de 7 avec 10mM d'imidazole, 0,5 % de bromure de dodécyltriméthyl-ammonium (DTAB, un tensioactif) et 0,3 mg/ml de Trp-Nle-Arg-Phe-amide, un tétrapeptide utilisé comme substrat "alterné" pour des enzymes protéolytiques présentes dans la peau.

La couche cornée d'un cadavre humain, séparée à chaud, est placée entre les compartiments donneur et récepteur, avec le côté épiderme vers le compartiment récepteur. Un courant continu constant de $127 \mu\text{A}$ (c'est-à-dire $0,1 \text{ mA/cm}^2$) est appliqué. Les cellules sont maintenues à 32°C pendant les examens in vitro avec des échantillons de récepteur prélevés toutes les deux heures (volume de récepteur enlevé et remplacé par du récepteur "frais" à chaque échantillonnage). Les échantillons de récepteur sont analysés par HPLC en phase inverse.

Les zones de pic des échantillons de récepteur de PTH sont comparées aux courbes standards du même analogue d'une opération à des concentrations connues en même temps en utilisant une colonne polymère analytique, à un débit de $1,5 \text{ ml/minute}$ avec un gradient de $10-50 \%$ de B en dix minutes pour élution. Le tampon A consiste en $0,1 \%$ d'acide trifluoroacétique (TFA), 1% d'acétonitrile; le tampon B consiste en $0,1 \%$ de TFA, $98,9 \%$ d'acétonitrile. Des concentrations analogues sont converties en flux de masse et tracées en fonction du temps.

Pour les examens d'électrotransport in vitro, les donneurs décrits contiennent la variante rétro-inverse (c'est-à-dire que les radicaux d'acide aminé D sont utilisés et sont assemblés dans l'ordre inverse à l'habituel) de l'analogue 1C de PTH (1mM) dans des solutions aqueuses à un pH de $5,0$. Cela est dû au fait que les analogues 1 et 2 de PTH ne sont pas stables lorsqu'ils sont mis à incuber avec une couche cornée séparée, probablement à la suite de la digestion protéolytique par des protéases de la peau. L'analogue 1D de PTH n'est pas une variante rétroinverse, mais au lieu de cela elle a été synthétisée par recombinaison. En vue de protéger l'analogue 1D d'une digestion par une enzyme protéolytique, le tétrapeptide est ajouté à la solution

de récepteur. Les cellules d'électrotransport totalement
assemblées sont mises à incuber à $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$. La super-
ficie de contact avec la peau disponible pour le trans-
port est de $1,27 \text{ cm}^2$. Le volume de compartiment donneur
5 est de $200 \mu\text{l}$; le volume du compartiment récepteur est
de $350 \mu\text{l}$. La solution de récepteur est séparée de la
cathode par une membrane échangeuse d'anions (IonacTM,
Eletrosynthesis Co., Lancaster, NY). Chaque cellule est
connectée à une source de courant constant, à une
10 densité de courant standard de $100 \mu\text{A cm}^{-2}$. La chute de
tension à travers chaque cellule est contrôlée à ap-
proximativement 2 heures d'intervalle pendant la durée
de l'expérience.

Des histogrammes de flux de masse pour chaque
15 point de temps sont tracés. Le flux de masse médian
(intervalle de confiance de 95 %) pour l'analogue 1C de
PTH est de $3,2 \mu\text{g cm}^{-2}\text{h}^{-1}$ (2,1 à 4,2) et pour l'analogue
1D de PTH il est de $1,1 \mu\text{g cm}^{-2}\text{h}^{-1}$ (0,9-1,7). Les valeurs
de flux de masse moyennes \pm ds pour ces analogues sont
20 de $4,1 \mu\text{g cm}^{-2}\text{h}^{-1} \pm 3,7$ et $1,5 \mu\text{g cm}^{-2}\text{h}^{-1} \pm 1,1$ pour les
analogues 1C et respectivement 1D.

EXEMPLE 8**ESTIMATION DU POTENTIEL D'HELICE α A PARTIR DU
DICHROISME CIRCULAIRE EN FAISANT VARIER
DES CONCENTRATIONS DE TRIFLUOROETHANOL**

5 Les examens de dichroïsme circulaire au tri-
fluoroéthanol (TFE) sont effectués en utilisant un
spectromètre de dichroïsme circulaire de modèle 62DS de
AVIV Associates, Inc. Les concentrations de protéine
sont déterminées par des lectures d'absorbance en utili-
10 sant des coefficients d'extinction calculés pour les
analogues dans 10 mM de tampon ionique. Les titrages de
TFE sont effectués à partir de 0 jusqu'à 50 % de TFE, en
balayant de 250 à 200 nm à 20°C pour chaque échantillon
de TFE. $[\theta]_{222}$ est calculé par :

15 $\theta_{\text{observé à } 222^*}$ (poids résiduaire moyen)/(10(longueur de
trajet cellulaire)(concentration de protéine)).

Les données des titrages de TFE à un pH de
6,5, 10mM de cacodylate, sont résumées ci-dessous dans
le tableau 3 pour les analogues d'hirulog et elles sont
20 tracées sur la figure 5. La figure 5 montre que, lorsque
le cosolvant inducteur d'hélice α , le trifluoroéthanol,
atteint une concentration de 30 % (v/v), sensiblement la
quantité maximale d'hélice est formée pour à la fois
l'hirulog parental et l'analogue B2, la quantité moyenne
25 de caractère hélicoïdal étant d'environ 10 % pour
l'hirulog parental et sensiblement de 0 % pour l'analogue
B2. L'hirulog parental et l'analogue B2 ne montrent
pas de caractère hélicoïdal α en l'absence de TFE
inducteur d'hélice. L'analogue B2 d'hirulog n'a sensi-
30 blement pas d'hélice α même à des concentrations de 80 %
de TFE.

TABLEAU 3
Données de titrage de TFE

% TFE	U_{222} pour l'hirulog parental	U_{222} pour l'analogue B2
0	-1120	- 989
10	-3679	-1313
20	-5458	-1580
30	-6972	-1848
40	-8365	-1896
50	-8493	-1963

EXEMPLE 9

FLUX D'ELECTROTRANSPORT IN VITRO D'HIRULOG-B2

L'hirulog-B2 est synthétisé en utilisant des techniques standards. Voir par exemple Maraganore et al. Thromb. Haemostasis. (1991) 65:830; Bode et al. EMBO J. (1989) 8:3467-3475; et WO 92/13952. Le flux d'électrotransport transdermique d'hirulog-B2 est évalué en utilisant un épiderme humain séparé à chaud. De plus, des formulations d'hydrogel sont aussi investiguées en utilisant de l'épiderme humain en ce qui concerne l'effet de la densité de courant sur le flux transdermique de médicament. Le flux d'hirulog-B2 transdermique est estimé en utilisant des solutions aqueuses préparées avec à la fois du médicament tel que reçu et du médicament dessalé, tamponné par 10mM de tampon d'acétate de force ionique, pH de 5. Les études de flux d'hirulog-B2 sont effectuées à une densité de courant de 0,1 mA/cm². En utilisant 15 mM de NaCl tamponnés par de l'acétate à un pH de 5, comme solution de récepteur, des flux d'électrotransport en régime constant d'environ 19 $\mu\text{g h}^{-1}$

cm^2 et $17 \mu\text{g h}^{-1} \text{cm}^2$ sont obtenus pour la solution de médicament dessalé et la solution de médicament tel que reçu.

5 La variabilité du flux d'hirulog-B2 pour des échantillons de peau à partir d'un seul donneur ainsi qu'à partir de donneurs multiples apparaît comme étant d'environ 15 à 40 %, ce qui est bien dans les gammes de variabilités observées pour des peptides et des composés protéiques.

10 Pour les études d'hydrogel, des disques d'hydrogel sont imbibés de médicament et assemblés dans des logements en mousse. Soit des solutions de médicament tel que reçu (11mM d'hirulog-B2 dans 20mM d'acétate) ou des solutions de médicament dessalé (4mM d'hirulog B2 dans 4mM d'acétate) sont imbibées dans les gels.
15 Un flux d'électrotransport moyen en régime permanent d'environ $27 \mu\text{g h}^{-1} \text{cm}^2$ est obtenu avec des formulations d'hydrogel contenant du médicament tel que reçu ou du médicament dessalé.

20 En utilisant des hydrogels imbibés par du médicament tel que reçu, une autre expérience est effectuée pour évaluer l'effet de la densité de courant sur le flux transdermique d'hirulog-B2. Une augmentation de densité de courant a pour effet une augmentation
25 correspondante du flux d'hirulog-B2 sur la gamme de densités de courant examinées. Dans des conditions passives (courant zéro), aucun flux d'hirulog-B2 mesurable n'est observé.

EXEMPLE 10

30 FLUX D'ELECTROTRANSPORT IN VIVO D'HIRULOG-B2

A. ADMINISTRATION INTRAVEINEUSE D'HIRULOG-B2.

Des cochons utilisés pour des examens intraveineux (IV) pèsent $11 \pm 1 \text{ kg}$ ($n=3$) et ils sont mis à la
diète pendant la nuit avant les injections en bolus. Des
35 injections en bolus IV sont données dans la veine auriculaire ou la veine cave. L'injection IV est admi-

nistrée pendant environ 30 à 60 secondes et la dose est d'environ 0,3 mg/kg (dans 0,5 ml). Les niveaux d'hirulog-B2 dans le plasma augmentent rapidement chez tous les cochons après l'injection en bolus IV d'hirulog-B2, en atteignant un niveau de pic moyen de 66 ± 6 ng/ml au point d'échantillonnage de 15 minutes. Les niveaux d'hirulog-B2 dans le plasma diminuent à moins de 2 ng/ml à 2 heures après l'injection en bolus, et ils restent relativement constants de 2 à 8 heures après l'injection en bolus. La clairance et la demi-vie d'élimination calculées pour chaque cochon sont indiquées sur le tableau 4. Le volume apparent de distribution et la demi-vie d'élimination moyenne sont calculés, à partir des données de bolus IV, comme étant de 45,4 l et respectivement de 16 minutes.

TABLEAU 4

Pharmacocinétiques de hirulog-B2 sur des porcs

	Phase définitive	Cochon 303	Cochon 304	Cochon 305	Moyenne	DS
5	IV					
	Poids de corps [kg]	12	11	10	11	1
	K_e [1/h]	2,42	2,01	2,5	2,31	0,26
	V [l]	45,5	49,25	41,55	45,43	3,85
10	V [l/kg]	3,8	4,5	4,2	4,2	0,35
	CL [l/h]	110	99	104	104	5,5
	CL [l/h/kg]	9,2	9,0	10,4	9,5	0,76
	Elimination $T_{1/2}$ [min]	17,2	20,72	16,6	18,2 ^a 16 ^b	2,23 ^a --
15	SC					
	Elimination $T_{1/2}$ [min]	--	--	--	58 ^b	--
20	4-ETS					
	Elimination $T_{1/2}$ [min]	--	--	--	28 ^b	--
	Accumulation $T_{1/2}$ [min]	--	--	--	38 ^b	--
25	Phase de dépistage	Cochon SC-3A				
30	3-ETS					
	Elimination $T_{1/2}$ [min]	32				
	Accumulation $T_{1/2}$ [min]	33				

^a Moyenne calculée à partir de $T_{1/2}$ déterminations individuelles.

35 ^b Calculé par une régression linéaire de la courbe moyenne de concentration d'hirulog-B2 dans le plasma en fonction du temps.

B. ADMINISTRATION SOUS-CUTANEE D'HIRULOG-B2.

Des cochons sont mis à la diète pendant la nuit avant les injections sous-cutanées (SC). Environ 0,5 mg/kg (dans 0,5 ml) d'hirulog-B2 est administré SC pendant une minute. Les niveaux d'hirulog-B2 dans le plasma réalisent un pic dans la première heure après l'injection à 57 ± 10 ng/ml et ils déclinent ensuite. La demi-vie d'élimination moyenne qui suit l'injection SC est de 58 minutes (tableau 4). Les niveaux d'hirulog-B2 dans le plasma sont à environ 2 ng/ml à 6 heures après l'injection SC, et ils sont relativement constants de 6 à 8 heures.

C. ELECTROTRANSPORT D'HIRULOG-B2.

Les systèmes d'électrotransport utilisés pour la délivrance d'hirulog-B2 in vivo comprennent une unité contenant du médicament à jeter qui est en contact électrique avec un élément de commande de courant réutilisable. L'unité contenant du médicament à jeter est constituée d'un ruban de mousse adhésive à base de polyéthylène, de qualité médicale, laminé et recevant à la fois la contre-électrode anodique en feuille d'argent et une électrode cathodique en film de polyisobutylène chargé d'AgCl, et les gels respectifs. Le gel d'anode est en contact avec l'anode à base de feuille d'argent. Le gel d'interface cathodique est en contact avec l'électrode cathodique à base d'AgCl. Le gel d'interface est séparé du gel donneur contenant le médicament par une membrane échangeuse de cations. Le gel donneur est placé dans la cavité cathodique du logement de gel, juste avant l'application du système.

Les gels de médicament sont imbibés le jour avant l'électrotransport par de l'hirulog-B2 dans un tampon d'acétate (10mM, pH 5) pour donner une concentration finale de 5mM de peptide. La superficie de contact avec la peau pour chaque gel de médicament est de 6 cm². La densité de courant appliquée est de 0,1 mA/cm².

Les systèmes d'électrotransport sont contrôlés en ce qui concerne le courant et la tension pendant l'électrotransport pour confirmer une continuité électrique du système. Des valeurs de tension sont avantageuses pour ce modèle animal et elles indiquent une diminution initiale suivie par des valeurs presque constantes pendant la durée d'étude. La demi-vie d'élimination moyenne qui suit la fin de l'électrotransport est de 28 minutes (tableau 4). La demi-vie d'accumulation moyenne au début de l'électrotransport est de 38 minutes. Les niveaux d'hirulog-B2 dans le plasma réalisent un pic après 4 heures d'électrotransport continu à 23 ± 6 ng/ml. Les niveaux d'hirulog-B2 dans le plasma restent relativement stables, à 21 ± 7 ng/ml, depuis 2 jusqu'à 6 heures d'électrotransport, et ils diminuent lentement à 8 heures. La diminution apparente des niveaux d'hirulog-B2 dans le plasma de 6 à 8 heures d'électrotransport peut être due à un épuisement d'hirulog-B2 dans l'hydrogel donneur. Une rapide diminution des niveaux d'hirulog-B2 dans le plasma se produit après la fin de l'électrotransport. A 2 heures après la fin de l'électrotransport, les niveaux d'hirulog-B2 dans le plasma sont de 2 ng/ml ou au voisinage.

L'élimination moyenne à partir de trois systèmes d'électrotransport à la suite de la fin de l'électrotransport est de 32 minutes tandis que la demi-vie d'accumulation moyenne au début de l'électrotransport est de 33 minutes (tableau 4). Le niveau d'hirulog-B2 dans le plasma réalise un pic après 2 heures d'électrotransport à 9 ng/ml après quoi il y a un faible déclin des niveaux d'hirulog-B2 dans le plasma.

Les débits transdermiques, calculés à la fois sous la forme d'une vitesse d'entrée ($\mu\text{g}/\text{h}$) et d'un flux par unité de surface ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$), sont calculés en utilisant des analyses à la fois à un compartiment et sans compartiment. L'analyse sans compartiment calcule le

flux de médicament transdermique à partir de la concentration du médicament dans le sang de l'animal, cette concentration étant mesurée en utilisant des techniques standards, et la vitesse connue à laquelle le médicament
5 particulier est évacué du sang. L'analyse à un compartiment calcule le flux transdermique de médicament à partir de la concentration (c'est-à-dire celle mesurée) du médicament dans le sang de l'animal et l'hypothèse que
10 l'absorption par l'animal du médicament administré par délivrance IV à une vitesse particulière quelconque est la même que celle atteinte par une administration par électrotransport, en vue d'obtenir une concentration particulière de médicament dans le sang. Les modèles à un compartiment et sans compartiment sont discutés dans
15 Pharmacokinetics, M. Gibaldi, 2ème éd., Marcel Dekker (1982) p. 1-5 et 319-322. Les flux transdermiques d'entrée et par unité de surface utilisant les deux analyses sont indiqués dans le tableau 5. La vitesse d'entrée moyenne est calculée comme étant de $1873 \pm 444 \mu\text{g/h}$, et le flux est calculé comme étant de $78 \pm 18 \mu\text{g h}^{-1} \text{cm}^{-2}$ pour quatre systèmes ETS (hirulog-B2) utilisant le modèle à un compartiment. En utilisant une
20 analyse sans compartiment, la vitesse d'entrée est calculée comme étant de $1900 \pm 523 \mu\text{g/h}$, et le flux est calculé comme étant de $79 \pm 22 \mu\text{g h}^{-1} \text{cm}^{-2}$ pour quatre
25 systèmes ETS (hirulog-B2). Un flux moyen de $22 \mu\text{g h}^{-1} \text{cm}^{-2}$ est calculé pour l'animal de la phase de dépistage 2 qui reçoit trois systèmes ETS (hirulog-B2).

TABLEAU 5

Vitesses d'entrée et flux d'électrotransport
calculés pour hirulog-B2 chez des porcs

5	Phase définitive	Cochon 303	Cochon 304	Cochon 305	Moyenne	DS
	4-ETS (un compartiment)					
10	K_a [1/h]	3,64	2,5	2,94	3,03	0,58
	Vitesse [$\mu\text{g/h}$]	1361	2096	2161	1873	444
	Flux [$\mu\text{g/cm}^2\text{h}$]	56,7	87,3	90,0	78,0	18,5
	4-ETS (sans compartiment)					
15	Vitesse [$\mu\text{g/h}$]	1396	1866	2440	1900	523
	Flux [$\mu\text{g/cm}^2\text{h}$]	58,2	77,8	101,7	79,2	21,8
	Phase de dépistage	Cochon SC-3A				
	3-ETS (un compartiment)					
20	K_a [1/h]	3,15				
	Vitesse [$\mu\text{g/h}$]	392				
	Flux [$\mu\text{g/cm}^2\text{h}$]	21,8				
	3-ETS (sans compartiment)					
25	Vitesse [$\mu\text{g/h}$]	412				
	Flux [$\mu\text{g/cm}^2\text{h}$]	22,9				

Donc, des procédés pour accroître le flux par électrotransport d'agents polypeptidiques sont décrits. Bien que des formes de réalisation préférées de la présente invention aient été décrites dans un certain détail, il est entendu que des variantes évidentes peuvent être réalisées sans sortir de l'esprit et du cadre de l'invention, telle qu'elle est définie par les revendications annexées.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de préparation d'un analogue d'un polypeptide parental comportant un segment d'hélice α et/ou de feuille β , l'analogue montrant une capacité d'électrotransport meilleure/accrue à travers une surface de corps, ce procédé étant caractérisé par une substitution d'un ou de plusieurs radicaux d'acide aminé du polypeptide parental dans le polypeptide analogue pour rompre un ou plusieurs segments en hélice α et/ou en feuille β du polypeptide parental, le polypeptide analogue montrant une capacité d'électrotransport meilleure/accrue en comparaison du polypeptide parental, cette étape de substitution excluant la substitution dans une hormone parathyroïdienne (PTH) parentale (Figure 1A) de Met₈ par Leu, Leu₁₅ par Arg, Met₁₈ par Leu, Glu₁₉ par Arg, Glu₂₂ par Arg, Glu₂₉ par Lys, Phe₃₄ par Tyr, une lactone d'homosérine étant présente à la terminaison C du peptide.

2. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le procédé comprend une substitution d'un radical d'acide aminé par un radical d'acide aminé présentant une valeur de $P\alpha$ plus faible.

3. Procédé suivant la revendication 2, caractérisé en ce que le radical d'acide aminé ayant la valeur de $P\alpha$ plus faible est choisi parmi le groupe comprenant Pro, Gly et Asn.

4. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le procédé comprend une substitution d'un radical d'acide aminé par un radical d'acide aminé ayant une valeur de $P\beta$ plus faible.

5. Procédé suivant la revendication 4, caractérisé en ce que le radical d'acide aminé ayant la valeur de $P\beta$ plus faible est choisi parmi le groupe comprenant Pro, Gly et Asp.

6. Procédé suivant l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'analogue de polypeptide montre au moins environ la même activité biologique que le polypeptide parental.

5 7. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le polypeptide parental est une molécule d'hormone parathyroïdienne (PTH), telle qu'illustrée sur la figure 1A.

10 8. Procédé suivant la revendication 7, caractérisé en ce que l'analogue de polypeptide est un des analogues de PTH illustrés sur les figures 1B et 1C.

9. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le polypeptide parental est de l'hirulog, tel qu'illustré sur la figure 2A.

15 10. Procédé suivant la revendication 9, caractérisé en ce que l'analogue de polypeptide est de l'hirulog-B2, tel qu'illustré sur la figure 2C.

20 11. Procédé de réalisation d'un dispositif d'électrotransport pour délivrer par électrotransport un agent polypeptidique à travers une surface de corps, ce procédé comprenant une prévision d'une quantité thérapeutiquement efficace de l'agent polypeptidique dans un réservoir donneur du dispositif d'électrotransport, ce procédé étant caractérisé par une prévision de l'agent polypeptidique dans le réservoir sous la forme d'un
25 analogue d'un polypeptide parental, le polypeptide parental comprenant un segment en hélice α et/ou en feuille β , le polypeptide analogue présentant un ou plusieurs radicaux d'acide aminé substitués par rapport
30 au polypeptide parental pour rompre ce segment en hélice α et/ou en feuille β , à l'exclusion de l'analogue de la PTH parentale (Figure 1A) dans laquelle Met₈ est substitué par Leu, Leu₁₅ par Arg, Met₁₈ par Leu, Glu₁₉ par Arg, Glu₂₂ par Arg, Glu₂₉ par Lys, Phe₃₄ par Tyr, une

lactone d'homosérine étant présente à la terminaison C du peptide.

12. Procédé suivant la revendication 11, caractérisé en ce que le procédé comprend une substitution d'un radical d'acide aminé par un radical d'acide aminé présentant une valeur de $P\alpha$ plus faible.

13. Procédé suivant la revendication 12, caractérisé en ce que le radical d'acide aminé ayant une valeur de $P\alpha$ plus faible est choisi parmi le groupe comprenant Pro, Gly et Asn.

14. Procédé suivant la revendication 11, caractérisé en ce que le procédé comprend une substitution d'un radical d'acide aminé par un radical d'acide aminé présentant une valeur de $P\beta$ plus faible.

15. Procédé suivant la revendication 14, caractérisé en ce que le radical d'acide aminé ayant la valeur de $P\beta$ plus faible est choisi parmi le groupe comprenant Pro, Gly et Asp.

16. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 11 à 15, caractérisé en ce que le polypeptide parental est une molécule d'hormone parathyroïdienne (PTH), telle qu'illustrée sur la figure 1A.

17. Procédé suivant la revendication 16, caractérisé en ce que l'analogue de polypeptide est un des analogues de PTH tels qu'illustrés sur les figures 1B et 1C.

18. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 11 à 15, caractérisé en ce que le polypeptide parental est de l'hirulog, tel qu'illustré sur la figure 2A.

19. Procédé suivant la revendication 18, caractérisé en ce que l'analogue de polypeptide est de l'hirulog-B2, tel qu'illustré sur la figure 2C.

20. Analogue d'hormone parathyroïdienne (PTH) comprenant la séquence d'acides aminés illustrée sur les figures 1B ou 1C.

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

FIG. 1A

Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Leu-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Arg-Asn-Ser-Leu-
Arg-Arg-Val-Arg-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Lys-Asp-Val-His-Asn-Tyr-HSL

FIG. 1B

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

FIG. 1C

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

FIG. 1D

(D-Cha)-Ala-Arg-Ala-Ala-Ala-Ala-Asn-Ala-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Ala-Glu-Glu-Tyr-Leu

FIG. 2A

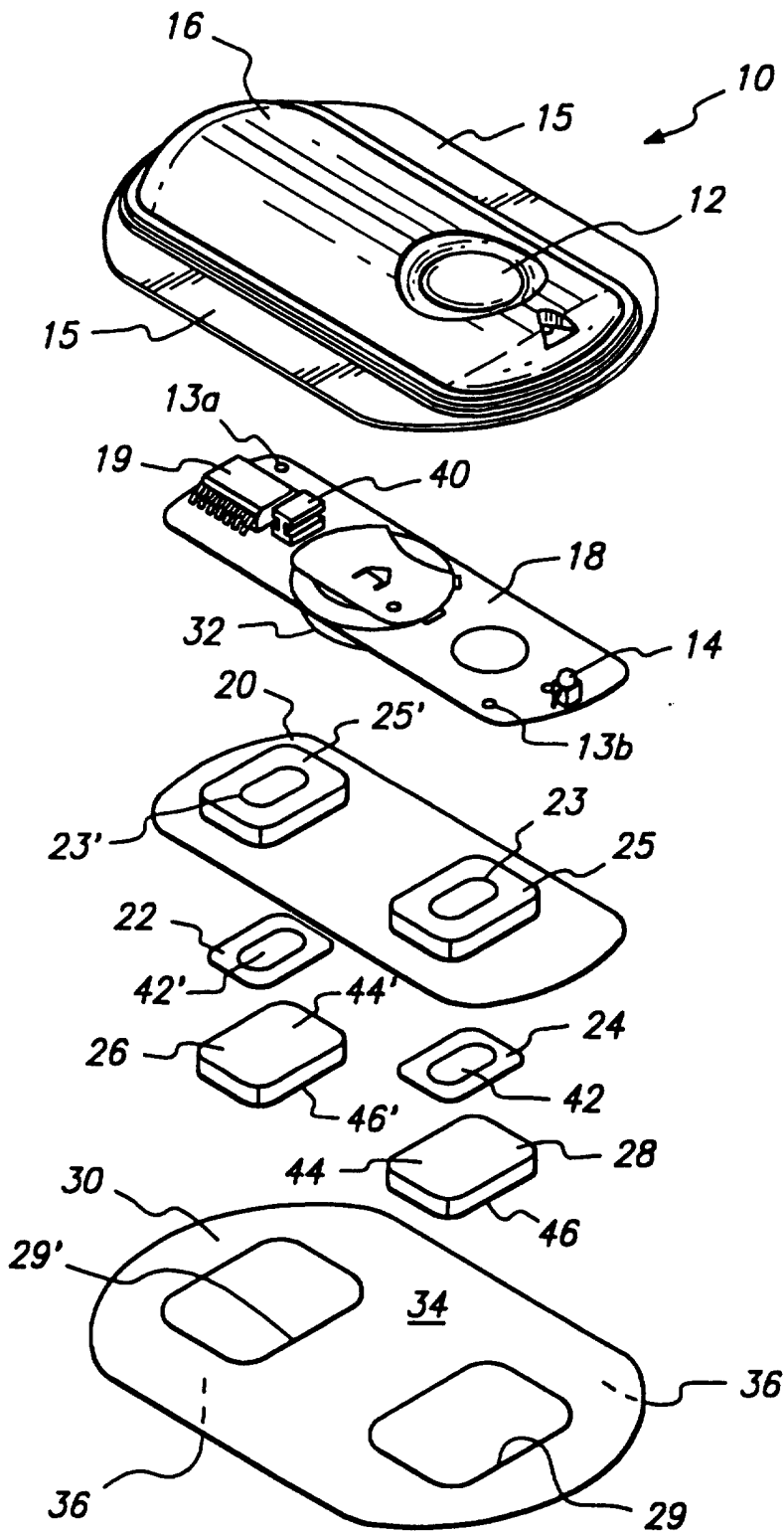
(D-Phe)-Pro-Arg-Pro-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu

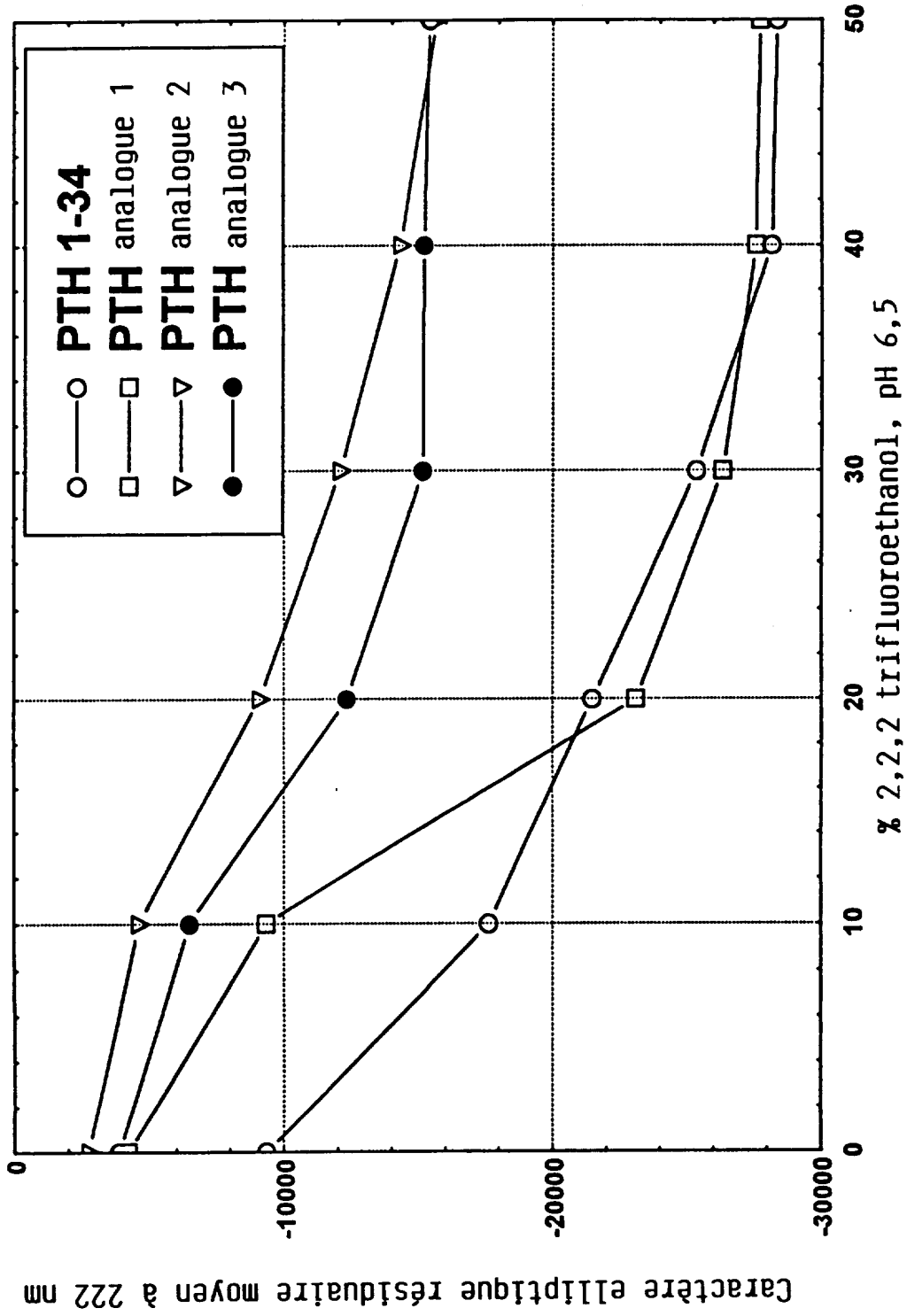
FIG. 2B

(D-Cha)-Pro-Arg-Pro-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu

FIG. 2C

FIG. 3





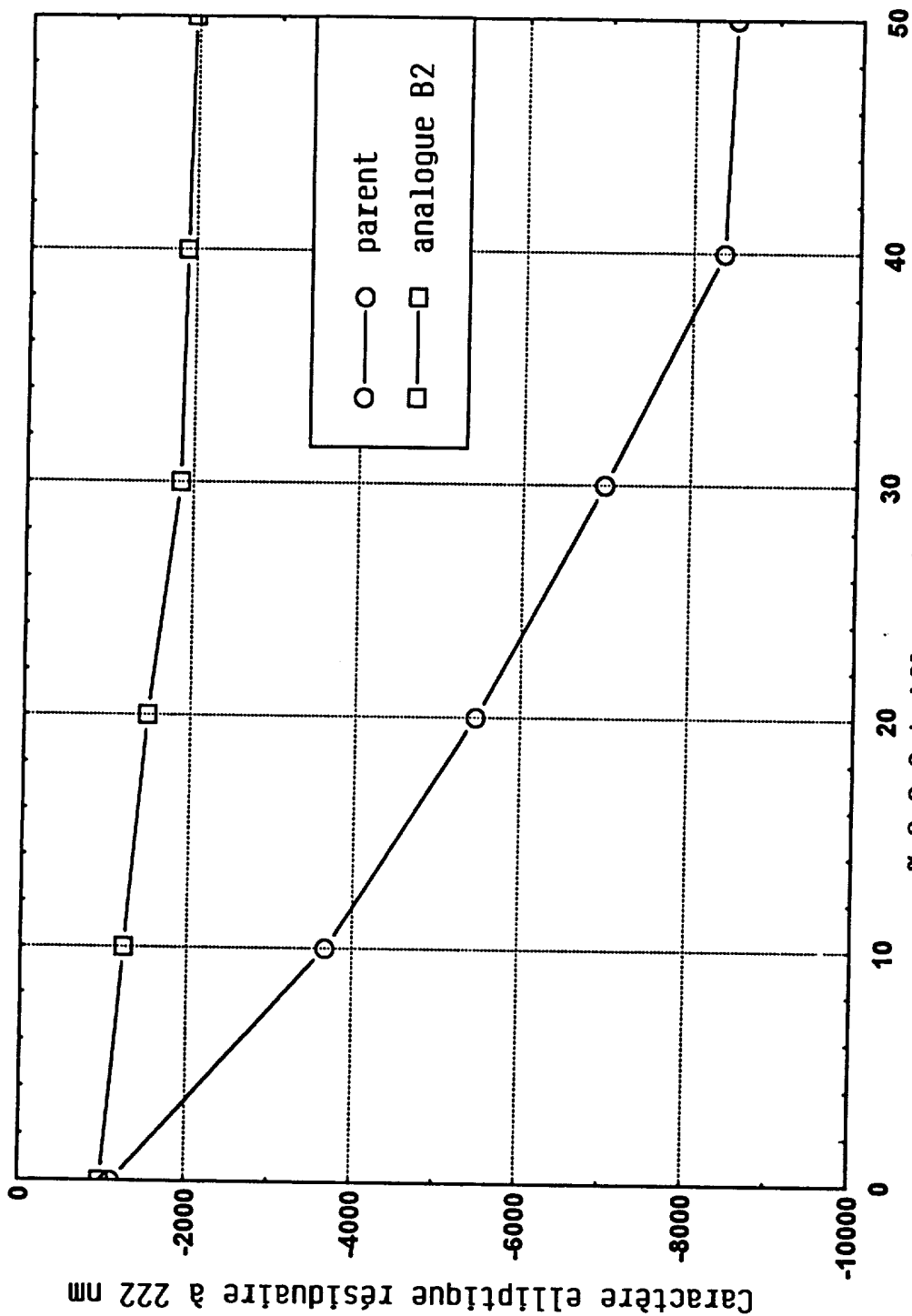


FIG. 5



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 6206
BE 9600518

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)
X	WO 95 11988 A (AFFYMAX TECH NV ;OLDENBURG KEVIN R (US); SELICK HAROLD E (US)) * page 86, ligne 12; revendications; exemples *	1-8, 11-17,20	C07K1/107 C07K14/635 C07K14/815 A61K38/00 A61K38/29 A61K38/58
A	EP 0 643 981 A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD) * revendications; exemples *	1-8, 11-17	
P,A	EP 0 667 355 A (HOECHST AG) * page 5, ligne 34 - ligne 36; revendications; exemples *	1-6,9-15	
A	DE 37 03 321 A (TRANSCUTAN GMBH) * colonne 6, ligne 16 - ligne 24; revendications; exemples *	1-6,9-15	
D,A	WO 93 25197 A (AFFYMAX TECH NV ;HALE RON L (US); LU AMY (US); SOLAS DENNIS (US);) * le document en entier *		
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6)
			C07K A61K
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		3 Décembre 1996	FUHR, C
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			

2

EPO FORM 1503 03.82 (P04C48)

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

BO 6206
BE 9600518

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.

03-12-1996

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9511988	04-05-95	AU-A- 8124594	22-05-95
		EP-A- 0730661	11-09-96
EP-A-0643981	22-03-95	CA-A- 2132574	23-03-95
		JP-A- 7213627	15-08-95
		JP-A- 7213628	15-08-95
EP-A-0667355	16-08-95	DE-A- 4404168	17-08-95
		AU-A- 1163795	17-08-95
		CA-A- 2142173	11-08-95
		JP-A- 7252299	03-10-95
DE-A-3703321	10-03-88	DE-A- 3744913	26-04-90
WO-A-9325197	23-12-93	AU-A- 4534593	04-01-94
		AU-A- 6764794	29-08-94
		CA-A- 2153243	18-08-94
		EP-A- 0647133	12-04-95
		EP-A- 0683668	29-11-95
		JP-T- 8510720	12-11-96
		WO-A- 9417792	18-08-94