



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

# UIBM

<b>DOMANDA NUMERO</b>	<b>101996900523195</b>
<b>Data Deposito</b>	<b>05/06/1996</b>
<b>Data Pubblicazione</b>	<b>05/12/1997</b>

<b>Priorità</b>	468,275
<b>Nazione Priorità</b>	US
<b>Data Deposito Priorità</b>	

<b>Sezione</b>	<b>Classe</b>	<b>Sottoclasse</b>	<b>Gruppo</b>	<b>Sottogruppo</b>
A	61	M		

Titolo

<b>PROCEDIMENTO PER ACCRESCERE IL FLUSSO PER ELETTROTRASPORTO DI POLIPEPTIDI</b>
--

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:

"Procedimento per accrescere il flusso per elettrotrasporto di polipeptidi",

di: Alza Corporation, nazionalità statunitense, 950 Page Mill Road Palo Alto, California 94303-0802 (U.S.A.)

Inventori designati: Leslie A. Holladay;

Kevin R. Oldenburg.

Depositata il: - 5 OTT. 1996 TO 96A000495

#### DESCRIZIONE

##### CAMPO TECNICO

La presente invenzione si riferisce generalmente alla somministrazione di farmaco per elettrotrasporto. Più particolarmente, l'invenzione si riferisce ad un procedimento per aumentare il flusso di elettrotrasporto di un polipeptide riducendo il potenziale del polipeptide per formare segmenti ad elica  $\alpha$  o foglio  $\beta$ . L'invenzione si riferisce pure a molecole che sono state modificate in tal modo.

##### SFONDO DELLA TECNICA

La somministrazione transdermica (cioè attraverso la pelle) di agenti terapeutici costituisce una tecnica confortevole, conveniente e non invasiva per la somministrazione di farmaci. Il procedimento assicura vari vantaggi rispetto ai modi con-

venzionali di somministrazione del farmaco. Per esempio, vengono evitate velocità variabili di assorbimento ed il metabolismo (per esempio epatico) incontrato nel trattamento orale, e vengono eliminati altri inconvenienti specifici, come irritazione gastrointestinale e simili. La somministrazione transdermica consente pure un elevato grado di controllo sulle concentrazioni nel sangue di un particolare farmaco ed è una via di somministrazione particolarmente attraente per farmaci con ristretti indici terapeutici, semivita breve ed attività potente.

La somministrazione transdermica può essere passiva o attiva. Molti farmaci non sono adatti per la somministrazione transdermica passiva per la loro dimensione, caratteristiche di carica ionica e idrofobicità. Un procedimento per superare questa limitazione consiste nell'uso di bassi valori di corrente elettrica per trasportare attivamente i farmaci nel corpo attraverso la pelle intatta. Questa tecnica è nota come somministrazione del farmaco per "elettrotrasporto" o "iontoforetica". La tecnica provvede un procedimento più controllabile della somministrazione transdermica passiva di farmaco poiché la grandezza, il tempo e la polarità

della corrente elettrica applicata vengono regolate facilmente impiegando componenti elettrici standard. Sotto questo aspetto, il flusso di farmaco per elettrotrasporto può essere dal 50% a vari ordini di grandezza maggiore del flusso transdermico passivo dello stesso farmaco.

I dispositivi per elettrotrasporto utilizzano generalmente almeno due elettrodi. Ambedue questi elettrodi sono disposti in contatto elettrico intimo con una parte della pelle del corpo. Un elettrodo, chiamato elettrodo donatore o attivo, è l'elettrodo dal quale l'agente terapeutico viene somministrato nel corpo. L'altro elettrodo, chiamato controelettrodo o elettrodo di ritorno, serve a chiudere il circuito elettrico attraverso il corpo. Insieme alla pelle del paziente, il circuito viene completato collegando gli elettrodi ad una fonte di energia elettrica, per esempio una batteria, e normalmente ad un circuito capace di controllare la corrente che passa attraverso il dispositivo.

A seconda della carica elettrica delle speci da somministrare transdermicamente, l'elettrodo attivo o donatore può essere l'anodo o il catodo. Sotto questo aspetto, se la sostanza ionica da introdurre nel corpo è caricata positivamente,

l'elettrodo positivo (anodo) sarà l'elettrodo attivo e l'elettrodo negativo (catodo) servirà come contro elettrodo, per completare il circuito. Al contrario, se la sostanza ionica da somministrare è caricata negativamente, l'elettrodo catodico sarà l'elettrodo attivo e l'elettrodo anodico sarà il contro elettrodo. Alternativamente, sia l'anodo che il catodo possono venire impiegati per somministrare farmaci di carica appropriata nel corpo. In questo caso, ambedue gli elettrodi sono considerati come elettrodi attivi o donatori. In altre parole, l'elettrodo anodico può introdurre nel corpo agenti caricati positivamente, mentre l'elettrodo catodico può somministrare nel corpo agenti caricati negativamente.

I dispositivi di elettrotrasporto esistenti richiedono inoltre un serbatoio o fonte di agente terapeutico che deve essere introdotto nel corpo. Tali serbatoi di farmaco sono collegati all'anodo o al catodo del dispositivo di elettrotrasporto per costituire una fonte fissa o rinnovabile di una o più specie o agenti desiderati. Esempi di serbatoi e fonti comprendono una sacca come descritto nel brevetto U.S. N. 4.250.878, rilasciato a Jacobsen; un corpo di gel preformato come descritto nel bre-

vetto U.S. N. 4.382.529 rilasciato a Webster; ed un contenitore di vetro o plastica contenente una soluzione liquida del farmaco, come descritto nelle figure del brevetto U.S. N. 4.722.726 rilasciato a Sanderson e altri.

Di particolare interesse, in questa sede, è la somministrazione transdermica per elettrotrasporto di peptidi, polipeptidi e proteine a causa dei problemi incontrati con le vie di somministrazione di farmaco più comuni, come la somministrazione orale.

Le molecole di polipeptide e proteina sono altamente suscettibili di degradazione mediante enzimi proteolitici nel tratto gastrointestinale e sono soggette ad un profondo metabolismo epatico quando vengono assunte oralmente. I polipeptidi e le proteine richiedono normalmente la somministrazione parenterale per ottenere livelli terapeutici nel sangue del paziente. Le tecniche di somministrazione parenterale più convenzionali sono le iniezioni ipodermiche e la somministrazione intravenosa. Polipeptidi e proteine hanno, tuttavia, una specifica attività biologica breve, per cui richiedono frequenti iniezioni, spesso varie volte al giorno, per mantenere i livelli terapeuticamente efficaci necessari. I pazienti trovano spesso questo regime di

trattamento scomodo, doloroso e con il rischio, per esempio, di infezione.

Sono stati fatti molti sforzi per trovare altre vie (diverse dalle iniezioni parenterali) per una somministrazione efficace di polipeptidi e proteine farmaceutiche. Le vie di somministrazione con i minori effetti secondari, come pure migliore accettazione da parte del paziente, sono state di particolare interesse. Tali vie alternative hanno generalmente compreso la somministrazione orale (schermata) in cui il polipeptide/proteina viene rilasciato da una capsula o altro contenitore, dopo il passaggio attraverso l'ambiente a basso pH dello stomaco, somministrazione attraverso il tessuto mucosale, per esempio il tessuto mucosale dei polmoni con inalatori oppure in tessuti mucosali nasali con spray nasali, e pompe impiantabili. Sfortunatamente, queste vie alternative di somministrazione di polipeptide/proteina hanno incontrato soltanto un successo limitato.

La somministrazione transdermica per elettrotrasporto di polipeptidi e proteine ha pure incontrato difficoltà tecniche. Per esempio, l'acqua è il liquido solvente preferito per preparare la soluzione del farmaco che deve venire somministrato

per elettrotrasporto, per la sua eccellente biocompatibilità. La pelle contiene enzimi proteolitici che possono degradare il polipeptide/proteina quando viene somministrato per via transdermica. Inoltre, certi polipeptidi /proteine, particolarmente quelli che non sono originali dell'animale da trattare, possono provocare reazioni cutanee, per esempio sensibilizzazione o irritazione.

Un certo numero di ricercatori ha descritto la somministrazione per elettrotrasporto di polipeptidi e proteine. Uno studio iniziale di R. Burnette e altri, *J. Pharm. Sci.* (1986) 75:738, comportava la permeazione della pelle in vitro con ormone di rilascio di tirotropina, una piccola molecola di tripeptide. Il flusso di elettrotrasporto è risultato più alto del flusso di diffusione passiva. Chien e altri. *J. Pharm. Sci.* (1988) 78: 376, in studi sia in vitro che in vivo, hanno dimostrato che la somministrazione transdermica di vasopressina ed insulina per elettrotrasporto è possibile. Vedi pure Maulding e altri, U.S. Statutory Invention Registration N. H1160, che descrivono la somministrazione per elettrotrasporto di calcitonina nelle cavie.

Per migliorare il flusso di elettrotrasporto

transdermico di polipeptidi e farmaci proteici sono stati adottati vari approcci (diversi dal semplice aumento dell'intensità di corrente applicata). Un approccio comporta l'uso di miglioratori di flusso come tensioattivi ionici. Vedi, per esempio, il brevetto U.S. 4.722.726 rilasciato a Sanderson e altri. Un altro approccio comporta l'uso di cosolventi diversi dalla sola acqua per migliorare il flusso di elettrotrasporto. Vedi, per esempio, la domanda di brevetto europeo 278.473. Un altro approccio ancora comporta la distruzione meccanica dello strato esterno (cioè lo strato corneo) della pelle prima della somministrazione per elettrotrasporto attraverso la pelle. Vedi, per esempio, brevetto U.S. 5.250.023 rilasciato a Lee e altri.

Altri approcci per migliorare l'elettrotrasporto transdermico di farmaco comportano il creare un profarmaco o un analogo del farmaco che interessa ed elettrotrasportare il profarmaco o l'analogo modificato. Per esempio, WO92/12999 descrive la somministrazione di insulina come un analogo di insulina avente una ridotta tendenza all'autoassociazione (apparentemente le forme associate di insulina presenti nelle composizioni farmaceutiche convenzionali riducono la sommini-

strazione transdermica dell'insulina). Gli analoghi vengono creati sostituendo acido aspartico (Asp) o acido glutammico (Glu) ad altri residui di amminoacido in posizioni scelte lungo la catena polipeptidica dell'insulina. WO93/25197 descrive la somministrazione di farmaci sia peptidici che non peptidici e di complessi modificatori di agenti farmaceutici o profarmaci, in cui un modificatore chimico (per esempio una parte caricata) è legata in modo covalente all'agente farmaceutico progenitore. Il legame covalente viene rotto dopo che l'agente è stato introdotto nel corpo, liberando così l'agente progenitore.

Nonostante gli approcci suddetti, alcuni polipeptidi presentano ancora un modesto flusso di elettrotrasporto transdermico. In particolare l'idrofobicità del peptide è nota per influire negativamente sul flusso di elettrotrasporto in vitro. Vari parametri contribuiscono all'idrofobicità, compresa la struttura primaria di una proteina, cioè la sequenza di amminoacidi della molecola, come pure la struttura secondaria della proteina, e precisamente la disposizione regolare e ricorrente della catena polipeptidica nelle 3 dimensioni. Tale conformazione può assumere la forma

di strutture elicoidali, come una  $\alpha$ -elica, oppure una conformazione più estesa, a zig-zag, nota come conformazione  $\beta$ .

La  $\alpha$ -elica ha approssimativamente 3,6 residui per giro dell'elica. I gruppi R degli amminoacidi si estendono verso l'esterno dall'elica e legami di idrogeno intracatena vengono formati tra l'ossigeno carbonilico della struttura di ciascun residuo e l'atomo di idrogeno della struttura attaccato all'azoto elettronegativo del quarto residuo lungo la catena. L'unità di base della conformazione  $\beta$  è il filamento  $\beta$ , che esiste come una elica avvolta meno strettamente, con 2,0 residui per giro. La conformazione  $\beta$  è stabile soltanto quando è incorporata in un foglio  $\beta$ , in cui legami idrogeno con geometria più vicina a quella ottimale vengono formati tra i gruppi peptidici su filamenti  $\beta$  adiacenti; i momenti dipolari dei filamenti vengono così allineati favorevolmente. Le catene laterali da residui adiacenti dello stesso filamento sporgono da lati opposti del foglio e non interagiscono l'uno con l'altro, ma hanno interazioni significative con la loro struttura e con le catene laterali di filamenti adiacenti.

Per una descrizione generale delle  $\alpha$ -eliche e

dei fogli  $\beta$  vedi, per esempio, T.E. Creighton, Proteins; Structures and Molecular properties (W.H. Freeman and Company, 1993); e A.L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., 1975).

Per determinare la stabilità di un segmento elicoidale in un dato polipeptide, si impiegano convenzionalmente i parametri di Zimm-Bragg,  $s$  e  $\sigma$  (B.H. Zimm e J.K. Bragg *J. Chem. Phys.* (1959) 31:526-535), e le equazione di Lifson-Roig (S.Lifson e A. Roig *J. Chem. Phys.* (1961) 34:1963-1974).  $S$  rappresenta la costante di stabilità della spirale dell'elica e  $\sigma$  è il fattore di nucleazione. In base a questi parametri, si può prevedere la possibilità che certi regioni di molecole di polipeptide formino  $\alpha$ -eliche e fogli  $\beta$ , con vari calcoli e programmi computerizzati. Vedi, per esempio, Finkelstein, A.V. Program "ALB" from protein and polypeptide secondary structure calculation and prediction (1983). Depositato al Brookhaven Protein Data Bank, Upton, N.Y. and at the EMLB, Heidelberg, Germany; Finkelstein, A.V. *Biopolymers* (1977) 16:525-529; Finkelstein e altri, *Proteins: Structure, Function and Genetics* (1991) 10:287-299. Inoltre, sono state usate le probabilità di Chou-Fasman (Chou, P.Y. e Fasman, G.D. *Ann. Rev. Biochem*

(1978)47:251-276) per valutare la tendenza di un particolare residuo di amminoacido a favorire o meno la formazione di  $\alpha$ -elica e foglio  $\beta$ .

Tuttavia, questi principi non sono stati precedentemente applicati per alterare le proprietà idrofobe di un dato polipeptide, per aumentare il suo flusso di elettrotrasporto.

#### DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

Secondo la presente invenzione, il flusso di elettrotrasporto di un dato polipeptide viene migliorato rompendo la struttura secondaria. In particolare, i residui di amminoacido noti per stabilizzare i segmenti di  $\alpha$ -elica e foglio  $\beta$  possono venire sostituiti con residui destabilizzanti e mezzi di rottura dell'elica noti. In questo modo, il flusso del polipeptide attraverso una superficie del corpo (per esempio la pelle) può venire aumentato, permettendo così la somministrazione per elettrotrasporto di una serie più ampia di farmaci polipeptidici a velocità terapeuticamente efficaci.

Per conseguenza, in una realizzazione, l'invenzione si riferisce ad un procedimento per la preparazione di un analogo di un polipeptide progenitore avente un segmento di  $\alpha$ -elica e/oppure foglio  $\beta$ , l'analogo presentante una capacità di elet-

trotrasporto migliore o migliorata attraverso una superficie corporea, il procedimento comprendente la sostituzione di uno o più residui di amminoacidi del polipeptide progenitore nel polipeptide analogo, per rompere uno o più segmenti di  $\alpha$ -elica e/oppure foglio  $\beta$  del polipeptide progenitore. Il polipeptide analogo presenta elettrotrasporto migliorato rispetto al polipeptide progenitore.

In una ulteriore realizzazione, l'invenzione si riferisce ad un procedimento per somministrare un agente polipeptidico attraverso una superficie del corpo. Il procedimento comprende (a) provvedere un analogo di un polipeptide progenitore in cui il polipeptide progenitore comprende un segmento di  $\alpha$ -elica e/oppure foglio  $\beta$ , il polipeptide analogo avente uno o più residui di amminoacido sostituito rispetto al polipeptide progenitore; e (b) somministrare il polipeptide analogo attraverso la superficie del corpo mediante elettrotrasporto.

In realizzazioni particolarmente preferite, la rottura viene fatta sostituendo uno o più residui di amminoacido del polipeptide progenitore con uno o più residui di amminoacido aventi un valore  $P\alpha$  o  $P\beta$  minore di quello del residuo di amminoacido progenitore.

In un'altra realizzazione, l'invenzione è rivolta ad un analogo dell'ormone paratiroideo (PTH) comprendente la sequenza di amminoacido illustrata nella figura 1B.

In un'altra realizzazione ancora, l'invenzione si riferisce ad un analogo di ormone paratiroideo (PTH) comprendente la sequenza di amminoacido rappresentata nella figura 1C.

Queste e altre realizzazioni dell'invenzione verranno facilmente comprese dagli esperti del settore, alla luce della descrizione seguente.

#### **BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI**

La figura 1 illustra la sequenza di amminoacidi di varie molecole di ormone paratiroideo (PTH) impiegate per esemplificare l'invenzione. La figura 1A mostra la sequenza di amminoacido del polipeptide progenitore di PTH di tipo originale. La figura 1B mostra la sequenza di amminoacido dell'analogo 1 di PTH (1-35). La figura 1C mostra la sequenza di amminoacido dell'analogo 2 di PTH (1-35). HSL indica omoserina/omoserina lattone. I residui sottolineati nelle figure 1B e 1C indicano le posizioni di sostituzione.

La figura 2 mostra le sequenze di amminoacidi di vari polipeptidi derivati da irudina impiegati

per esemplificare l'invenzione. La figura 2A mostra la sequenza di amminoacidi di un polipeptide progenitore di un analogo dell'irudina. La figura 2B mostra la sequenza di amminoacidi dell'analogo 1 dell'irudina. La figura 2C mostra la sequenza dell'analogo B2 dell'irudina.

La figura 3 è una vista schematica di un dispositivo di somministrazione di farmaco per elettrotrasporto, esemplificativo, che può venire impiegato con la presente invenzione.

La figura 4 è un grafico di ellitticità residua media di vari analoghi di ormone paratiroideo in funzione della concentrazione di trifluoroetano-  
lo.

La figura 5 è un grafico di ellitticità residua media di due polipeptidi derivati dell'irudina in funzione della concentrazione di trifluoroetano-  
lo.

#### **DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE**

Per la realizzazione della presente invenzione si impiegano, a meno che sia altrimenti specificato, procedimenti convenzionali di chimica delle proteine, elettrochimica, biologia molecolare e tecniche di DNA ricombinante, che rientrano nelle conoscenze specifiche. Tali tecniche sono pienamen-

te spiegate in letteratura, vedi, per esempio, T.E. Creighton, Proteins; Structures and Molecular Properties (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publisher, Inc., 1975), J.S. Newman, Electrochemical Systems (Prentice Hall, 1973); A.J. Bard and L.R. Faulkner, Elettrochemical Methods, Fundamentals and Applications (John Wiley & Sons, 1980), Sambrook, e altri, Molecular Cloning; A. Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).

Si può notare che, come usata nella presente descrizione e nelle rivendicazioni allegate, la forma singolare "un" e "il" comprende riferimenti plurali, a meno che il contesto indichi chiaramente il contrario. Così, per esempio, riferimento a "un polipeptide" comprende una miscela di due o più polipeptidi, e simili.

#### I. DEFINIZIONI

Nel descrivere la presente invenzione verranno impiegati i termini seguenti, cui si intende attribuire il significato appresso indicato.

In questa sede i termini "elettrotrasporto", "iontoforesi", e "iontoforetico" vengono impiegati per riferirsi alla somministrazione attraverso una superficie corporea (per esempio la pelle) di uno o

più agenti polipeptidici farmaceuticamente attivi per mezzo di una forza elettromotrice applicata ad un serbatoio contenente un agente. L'agente può venire somministrato per elettromigrazione, elettroforazione, elettroosmosi o qualsiasi loro combinazione. L'elettroosmosi è stata anche indicata come elettroidrochinesi, elettroconvezione ed osmosi indotta elettricamente. In generale, l'elettroosmosi di una specie in un tessuto risulta dalla migrazione di solvente in cui la specie è contenuta, in conseguenza dell'applicazione di una forza elettromotrice al serbatoio della specie terapeutica, cioè flusso di solvente indotto mediante elettromigrazione di altre speci ioniche. Durante il procedimento di elettrotrasporto, si possono verificare certe modificazioni o alterazioni della pelle, come la formazione di pori temporanei nella pelle, anche indicata come "elettroporazione". Qualsiasi trasporto assistito elettricamente di speci, migliorato mediante modificazioni o alterazioni nella superficie corporea (per esempio formazione di pori nella pelle) è pure incluso nel termine "elettrotrasporto" come usato in questa sede. Quindi, come usati in questa sede, i termini "elettrotrasporto", "iontoforesi" e "iontoforetico"

si riferiscono a (1) la somministrazione di agenti caricati mediante elettromigrazione, (2) la somministrazione di agenti non caricati con il procedimento dell'elettroosmosi (3) la somministrazione di agenti caricati o non caricati mediante elettroforesione (4) la somministrazione di agenti caricati mediante i procedimenti combinati di elettromigrazione ed elettroosmosi, e/oppure (5) la somministrazione di una miscela di agenti caricati e non caricati mediante i procedimenti combinati di elettromigrazione ed elettroosmosi.

I termini "polipeptide", "agente polipeptidico" e "farmaco polipeptidico" vengono impiegati in modo intercambiabile per indicare qualsiasi polimero bioattivo di residui di amminoacidi. I termini comprendono peptidi, oligopeptidi, dimeri, multimeri e simili. Tali polipeptidi possono venire derivati da fonti naturali o possono venire sintetizzati o prodotti con tecniche ricombinanti. I termini comprendono pure modificazioni post-espressione del polipeptide, per esempio glicosilazione, acetilazione, fosforilazione, ecc.

Un farmaco o agente polipeptidico, come definito in questa sede, è generalmente costituito dai 20 amminoacidi naturali (Ala, (A), Arg (R), Asn (N),

10 p.A.

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) e Val (V) e può anche comprendere qualsiasi dei vari analoghi di amminoacido noti, sia presenti in natura che analoghi sintetizzati, come, ma senza limitarsi a questi, omoisoleucina, asaleucina, 2-(metilenciclopropil) glicina, S-metilcisteina, S-(prop-1-enil) cisteina, omoserina, ornitina, norleucina, norvalina, omoarginina, 3-(3-carbossifenil) alanina, cicloesilalanina, mimosina, acido pipercolico, acido 4-metilglutammico, canavanina, acido 2,3-diammino propionico, e simili. Ulteriori esempi di agenti polipeptidici che troveranno impiego nella presente invenzione sono indicati nel seguito.

Con polipeptide "progenitore", agente polipeptidico o farmaco polipeptidico, si intende un polipeptide come precedentemente definito, che comprende segmenti ad  $\alpha$ -elica o foglio  $\beta$ , che possono venire modificati in modo tale che il flusso di elettrotrasporto del polipeptide venga migliorato. In particolare, un polipeptide progenitore comprenderà generalmente da circa 10 a circa 50 residui di amminoacido, più preferibilmente tra circa 10 e circa

40 residui di amminoacido. Inoltre, il polipeptide progenitore sarà un polipeptide che non ha tendenza ad adottare una struttura ripiegata terziaria stabile in soluzione, cioè come risultato di una alta concentrazione di residui Cys. Il polipeptide progenitore può essere un polipeptide naturale oppure può esso stesso avere differenze strutturali da un polipeptide naturale come sostituzioni, cancellazioni o addizioni di amminoacido, come pure modifiche post-translazionali, come descritte in precedenza.

Con "analogo" di polipeptide si intende un polipeptide come precedentemente definito, che proviene dalla modifica della struttura secondaria del polipeptide progenitore. Sotto questo aspetto, l'analogo differisce dal progenitore per la sostituzione di uno o più residui di amminoacido in modo da demolire uno o più segmenti di  $\alpha$ -elica e/oppure  $\beta$ -elica presenti nella molecola progenitore. Sostituzioni adatte di amminoacido sono descritte più completamente nel seguito. L'analogo può anche contenere altre modificazioni che non influiscono sulla struttura secondaria, come sostituzioni, cancellazioni o aggiunte di altri amminoacidi, o modifiche post-translazionali come precedentemente de-

scritto. L'analogo può anche esistere sotto forma di sali o sotto forma neutra, per esempio sali di addizione con acido (formati con i gruppi amminici liberi dei polipeptidi analoghi) e che vengono formati con acidi inorganici come, per esempio, acido cloridrico o acido fosforico, o acidi organici come acido acetico, succinico, maleico, tartarico, mandelico e simili. I sali formati da gruppi carbossilici liberi possono anche essere derivati da basi inorganiche come, per esempio, idrossidi di sodio, potassio, ammonio, calcio o idrossido ferrico, e da basi organiche quale isopropilammina, trimetilammina, 2-etilammino etanolo, istidina e simili. Il polipeptide analogo avrà almeno parte della bioattività del polipeptide progenitore, e più preferibilmente avrà una bioattività uguale o maggiore di quella della molecola progenitore.

Con l'espressione "migliorando l'elettrotrasporto" di un polipeptide, si intende l'aumento del flusso di elettrotrasporto del polipeptide attraverso la superficie del corpo (per esempio la pelle o mucosa) rispetto al polipeptide progenitore. Il flusso di elettrotrasporto transdermico può venire determinato usando un certo numero di metodi in vivo o in vitro, ben noti nella tecnica. I meto-

di in vitro comprendono il bloccaggio di un pezzo di pelle di un animale adatto (per esempio pelle di cadavere umano) tra i compartimenti donatore e recettore di una cella di flusso per elettrotrasporto, con il lato dello strato corneo del pezzo di pelle rivolto verso il compartimento donatore. Una soluzione liquida o un gel contenente il farmaco da somministrare viene portata a contatto con lo strato corneo, quindi si applica corrente elettrica agli elettrodi, un elettrodo in ciascun compartimento. Il flusso transdermico viene calcolato misurando la quantità di farmaco nel compartimento recettore. Due modelli di successo impiegati per ottimizzare la somministrazione di farmaco per via transdermica mediante elettrotrasporto, sono il modello della pelle suina isolata di Riviere, M.C. Hei, e altri, J. Pharm, Sci., 82, 240-243 (1993), e l'uso di pelle isolata priva di peli, per esempio di roditori o cavie. Vedi B.W. Hadzjia e altri, J. Pharm. Pharmacol., 44, 387-390 (1992).

## II. MODI DI REALIZZARE L'INVENZIONE

La presente invenzione si riferisce alla sostituzione di amminoacidi che rompono i segmenti di  $\alpha$ -elica e foglio  $\beta$  di una molecola polipeptidica per migliorare il flusso di elettrotra-

INCOGNITO

sporto di tale molecola rispetto al flusso del polipeptide progenitore. Il procedimento permette quindi l'elettrotrasporto di un gran numero di sostanze che non sarebbero altrimenti trasportabili in tal modo. Senza legarsi ad una particolare teoria, pare che tali cambiamenti secondari diminuiscono la tendenza delle catene del lato idrofobo dei residui di amminoacido, come Leu, Phe, e Trp a rimanere spazialmente agglomerate. Così, la capacità della molecola a legarsi a zone idrofobe nella pelle durante l'elettrotrasporto viene ridotta, facilitando in tal modo il passaggio del polipeptide attraverso la pelle.

La presente invenzione è stata esemplificata usando una molecola di ormone paratiroideo (PTH) ed un derivato di irudina come composti progenitori. L'ormone paratiroideo è un ormone peptidico che regola il controllo omeostatico del calcio ed il metabolismo del fosfato ed è stato impiegato per trattare l'osteoporosi. PTH di tipo naturale è illustrato nella figura 1A. La molecola ha 34 residui di amminoacido ed un peso molecolare di circa 4000 Dalton. Come mostrato in questa sede, la molecola ha una notevole tendenza ad adottare la formazione ad  $\alpha$ -elica.

L'omologo dell'irudina è un peptide sintetico anticoagulante a base di irudina che inibisce efficacemente la trombina sia libera che legata a fibrina. L'omologo dell'irudina ha dimostrato di impedire la trombosi venosa post-operatoria in pazienti sottoposti a chirurgia ortopedica. La sequenza del composto progenitore dell'omologo dell'irudina usato per esemplificare la presente invenzione è rappresentata nella figura 2A.

Sebbene venga esemplificata usando le sostanze progenitori suddescritte, la presente invenzione trova pure impiego con un'ampia varietà di altre proteine progenitori ed agenti polipeptidici, come altri polipeptidi derivati da fonti eucariote, procariote e virali, come pure peptidi sintetici. Tali polipeptidi avranno generalmente tra circa 10 e circa 50 amminoacidi, una struttura secondaria che si può riportare alla manipolazione e che non tende ad adottare una struttura terziaria ripiegata stabile, per esempio come risultato di una alta concentrazione di residui Cys. Tali polipeptidi comprendono, senza limitazione, farmaci peptidici che sono agenti antivirali ed antibiotici, antineoplastici, immunomodulatori, ormoni peptidici come ACTH, CRF, GHRH, colecistochinina, dinorfine, en-

dorfine, endotelina, frammenti di fibronectina, galanina, gastrina, insulinotropina, glucagone, frammenti di proteina legante di GTP, guanilina, le leuocochinine, magainina, mastoparani, dermaseptina, sistemina, neuromedine, neurotensina, pancreastatina, polipeptide pancreatico, sostanza P, secretina, timosina e simili.

La struttura secondaria del polipeptide progenitore viene generalmente manipolata sostituendo uno o più residui di amminoacidi progenitori scelti con uno o più residui di amminoacidi aventi una tendenza minore a creare conformazioni ad  $\alpha$ -elica e /oppure foglio  $\beta$ . Sotto questo aspetto, ogni residuo di amminoacido dimostra preferenze di conformazione. Una misura della tendenza relativa di un particolare residuo a partecipare ad una  $\alpha$ -elica o filamento  $\beta$  è stata definita mediante i parametri  $P\alpha$  e  $P\beta$  (Chou, P.Y. and Fasman, G.D. *Ann. Rev. Biochem* (1978) 47: 251-276). Una lista aggiornata e riveduta di valori  $P\alpha$  e  $P\beta$  è riportata nella tabella 1. I valori  $P\alpha$  nella tabella 1 che sono superiori a 1,00 rappresentano amminoacidi che favoriscono le conformazioni ad  $\alpha$ -elica e sono definiti in questa sede come "valori  $P\alpha$  alti". Analogamente, i valori  $P\beta$  nella tabella 1 che sono supe-

riori a 1,00 rappresentano amminoacidi che favoriscono la formazione di filamento  $\beta$  e sono definiti in questa sede come "valori  $P\beta$  alti".

Gli amminoacidi con valori di  $P\alpha$  e  $P\beta$  di 1,00 o meno non favoriscono o rompono le conformazioni secondarie e sono qui definiti rispettivamente "valori  $P\alpha$  bassi" e "valori  $P\beta$  bassi".

Così, per esempio, gli amminoacidi Glu, Ala e Leu hanno valori  $P\alpha$  alti e favoriscono la formazione dell'elica, mentre Pro, Gly, Ser, Cys, Tyr e Asn hanno valori  $P\alpha$  bassi e quindi non favoriscono la formazione dell'elica.

Analogamente, i residui di amminoacido Val, Ile e Tyr hanno valori  $P\beta$  alti e favoriscono la formazione di filamento  $\beta$ , mentre gli amminoacidi Pro, Asp, Asn, Glu e Gly non favoriscono tale formazione. Combinando i valori  $P\alpha$  e  $P\beta$ , gli amminoacidi che possono presentare la minore tendenza a formare questi tipi di strutture secondarie sono Gly, Asn, Pro e Ser.

TABELLA 1\*

Preferenze conformazionali degli amminoacidi

residuo di amminoacido	$\alpha$ -elica (P $\alpha$ )	filamento $\beta$ (P $\beta$ )
Glu	1,59	0,52
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
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
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
Asn	0,76	0,48
Pro	0,34	0,31
Ser	0,57	0,96
Asp	0,99	0,39

\*I dati nella tabella 1 sono rilevati da T.E. Creighton, Proteins; Structures and Molecular Properties (W.H. Freeman and Company, 1993), p. 256.

Un segmento di una struttura secondaria particolare è molto più probabile quando vari residui adiacenti preferiscono tale struttura così, una  $\alpha$ -elica può essere prevista se 4 su 6 residui adiacenti sono favorevoli alla formazione dell'elica, e

se la media dei valori  $P\alpha$  è superiore a 1,05 e superiore a  $P\beta$ . Analogamente, si può prevedere un filamento  $\beta$  se 3 su 5 residui adiacenti tendono a favorirlo e se il valore medio di  $P\beta$  è superiore a 1,04 e superiore a  $P\alpha$ . T.E. Creighton, Proteins; Structures and Molecular Properties (W.H. Freeman and Company, 1993), pp. 255-257.

Quindi, impiegando questi principi, i residui di amminoacido nelle porzioni della molecola che tendono a formare  $\alpha$ -elica e foglio  $\beta$  possono essere sostituiti con quei residui della tabella 1 che non sono favorevoli a tali conformazioni. Preferibilmente, un residuo con un elevato valore  $P\alpha$  o  $P\beta$  verrà sostituito con un residuo avente rispettivamente il valore  $P\alpha$  o il valore  $P\beta$  basso.

Altri metodi per determinare la tendenza di un polipeptide a formare segmenti ad  $\alpha$ -elica e foglio  $\beta$  sono pure noti. Per esempio, il potenziale di  $\alpha$ -elica di un polipeptide lineare può essere stimato secondo, per esempio, l'equazione di Lifson-Roig (S.Lifson e A. Roig, *J. Chem. Phys* (1961), 34:1963-1974) usando valori per i parametri di formazione dell'elica residui trasformati dai loro valori di Zimm-Bragg, calcolati (Zimm, B.H. e Bragg, *J.K.J. Chem. Phys.* (1959) 31 526-535) impiegando le equa-

zioni di conversione di Qian e Schellman (Qian, H, e Schellman, J. A. *J. Chem. Phys* (1992) 96 3987-3994).

Più particolarmente, i parametri di Zimm-Bragg,  $s$  e  $\sigma$  rappresentano rispettivamente la costante di stabilità della spirale dell'elica ed il fattore di nucleazione. Una serie di valori  $s$  e  $\sigma$  di Zimm-Bragg è stata definita per ciascun residuo di amminoacido (vedi tabella 1 di Finkelstein e altri *Proteins: Structure, Function and Genetics* (1991)10:287-299) e la probabilità che l'intera catena polipeptidica (o talune sottosequenze definite) adotti una  $\alpha$ -elica può venire calcolata usando le equazioni indicate.

I corrispondenti parametri dell'elica di Lifson-Roig,  $u$ ,  $v$  e  $w$ , possono pure venire impiegati per una determinazione simile (Lifson S. E Roig, *A. J. Chem. Phys* (1961) 34:1963-1974). Sotto questo aspetto,  $w$ , che viene usata per definire una unità di peptide all'interno di una sequenza non interrotta di stati elicoidali, può essere calcolata come  $s$ . La  $d$  di Lifson-Roig definisce una unità peptidica all'inizio o alla fine di una sequenza ininterrotta di stati elicoidali e può essere calcolata dal parametro  $\sigma^{1/2}$  di Zimm-Bragg. Il fattore

u definisce il peso statistico della zona di spirale e non corrisponde al parametro di Zimm-Bragg.

Usando questi parametri, per stimare il potenziale di  $\alpha$ -elica vi sono due calcoli di impiego generale. Il primo assume il parametro  $d$  di inizio dell'elica di Lifson-Roig come una costante di 0,039 (cioè il parametro  $\sigma$  di Zimm-Bragg è 0,0013 per tutti i residui), con il parametro  $w$  per ciascun amminoacido calcolato dal valore  $s$  di Zimm-Bragg che si trova nella tabella 1 di Finkelstein e altri, *Proteins: Structure, Function and Genetics* (1991) 10:287-299. Il secondo calcolo non ammette che tutti i residui abbiano lo stesso valore per il parametro di inizio dell'elica  $d$  (cioè il parametro  $\sigma$  di Zimm-Bragg è diverso per ciascun residuo di amminoacido). Con questo metodo, i valori  $s$  e  $\sigma$  di Zimm-Bragg per ciascun residuo possono venire determinati dalla tabella 1 di Skolnick, J, e Holtzer, A. *Macromolecules* (1982)15:812-821. Questi metodi sono ulteriormente descritti in seguito negli esempi.

Gli analoghi di polipeptide della presente invenzione possono venire prodotti in vari modi ben noti nella tecnica. Sotto questo aspetto, poiché gli analoghi sono relativamente piccoli, cioè hanno

una lunghezza fino a circa 50 amminoacidi, essi possono venire convenientemente sintetizzati per via chimica, con una qualsiasi di varie tecniche che sono note agli esperti del settore dei peptidi. In generale, questi metodi adottano l'addizione sequenziale di uno o più amminoacidi ad una catena peptidica in crescita. Normalmente il gruppo amminico o il gruppo carbossilico del primo amminoacido è protetto con un gruppo protettore adatto. L'amminoacido protetto o derivatizzato può quindi essere attaccato ad un supporto solido inerte oppure utilizzato in soluzione per aggiungere l'amminoacido successivo nella sequenza avente il gruppo complementare (amminico o carbossilico) opportunamente protetto, in condizioni che consentano la formazione di un legame ammidico. Il gruppo protettore viene quindi allontanato dal residuo di amminoacidi sommati, quindi si aggiunge l'amminoacido successivo (opportunamente protetto), e così via. Quando il numero desiderato di amminoacidi è stato legato nella sequenza adatta, ogni gruppo protettivo rimanente (e eventuale supporto solido, se è stata impiegata la tecnica di sintesi in fase solida) viene allontanato sequenzialmente o contemporaneamente, per ottenere il polipeptide finale. Con

semplici modifiche di questa procedura generale, è possibile aggiungere più di un amminoacido per volta ad una catena in crescita, per esempio accoppiando, in condizioni che non racemizzino i centri chirali) un tripeptide protetto con un dipeptide opportunamente protetto per formare dopo deprotezione un pentapeptide. Vedi, per esempio, J. M. Stewart e J.D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis (Pierce Chemical Co., Rockford, IL 1984) e G. Barany e R.B. Merrifield, The Peptides; Analysis, Synthesis, Biology, editori E. Gross e J. Meienhofer, Vol. 2, (Academic Press, New York, 1980), pp. 3-254 per le tecniche di sintesi peptidica in fase solida; e M. Bodansky, Principles of Peptide Synthesis, (Springer-Verlag, Berlin 1984) e E. Gross e J. Meienhofer, Eds., The Peptides; Analysis, Synthesis, Biology, Vol, 1, per le sintesi con la soluzione classica.

Tipici gruppi protettori comprendono t-butilossicarbonile (Boc), 9-fluorenilmetossicarbonile (Fmoc) benzilossicarbonile (Cbz); p-toluensulfonile (Tx); 2,4-dinitrofenil; benzil (Bzl); bifenilisopropilossicarbossi-carbonile, t-amilossicarbonile, isobornilossicarbonile, o-bromobenzilossicarbonile, cicloesile, isopropile,

acetile, o-nitrofenilsulfonile e simili.

Tipici supporti solidi sono supporti polimerici reticolati. Questi possono comprendere polimeri reticolati a base di divinilbenzene e stirene, per esempio copolimeri divinilbenzene-idrossimetilstirene, divinilbenzene-clorometil stirene e divinilbenzene-benzidrilammino polistirene.

Gli analoghi di polipeptide della presente invenzione possono anche venire preparati chimicamente con metodi differenti dai metodi di sintesi peptidica multipla simultanea. Vedi, per esempio, Houghten *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 82:5131-5134; e il brevetto U.S. N. 4.631.211.

Alternativamente i peptidi possono venire prodotti con tecniche ricombinanti, per esempio sintetizzando DNA che codifichi il peptide desiderato, insieme ad un codone di inizio ATG. La sequenza nucleotidica può essere progettata con i codoni appropriati per la particolare sequenza di amminoacidi desiderata. In generale, si scelgono i codoni preferiti per l'ospite previsto in cui la sequenza viene espressa. La sequenza completa viene generalmente montata sovrapponendo oligonucleotidi preparati con metodi standard e montati in una sequenza codificante completa. Vedi, per esempio Edge Nature

ACQUA... PERALI S.P.A.

(1981) 292:756; Nambair e altri *Science* (1984) 223:1299; Jay e altri *J. Biol. Chem.* (1984) 259:6311. Tecniche di sintesi automatica come la sintesi in fase solida con fosforammide possono venire impiegate per generare la sequenza nucleotidica. Vedi, per esempio, Beaucage, S.L. e altri, *Tet. Lett.* (1981) 22:1859-1862,; Matteucci, M.D. e altri, *J. Am. Chem. Soc* (1981) 103:3185-3191. Successivamente il DNA viene clonato in un vettore di espressione adatto, procariota o eucariota, impiegando procedimenti convenzionali.

In alternativa si possono impiegare facilmente tecniche ricombinanti per clonare il gene del polipeptide progenitore che può poi essere mutagenizzato in vitro con la sostituzione delle opportune coppie di basi per ottenere il codone per l'amminoacido desiderato. Tale cambiamento può comprendere anche solo una coppia di basi, effettuando un cambiamento in un singolo amminoacido, oppure può comprendere varie coppie di basi da sostituire. Alternativamente, le mutazioni possono essere effettuate usando un innesco non accoppiato che si ibrida alla sequenza nucleotidica progenitore (generalmente cDNA corrispondente alla sequenza di RNA), ad una temperatura inferiore alla temperatura

di fusione del duplex non accoppiato. L'innesco può essere reso specifico mantenendo la lunghezza dell'innesco e la composizione della base entro limiti relativamente ristretti e mantenendo posizionata centralmente la base mutante. Zoller e Smith, *Methods Enzymol.* (1983) 100:468. La lunghezza dell'innesco viene regolata usando DNA polimerasi, il prodotto viene clonato ed i cloni contenenti il DNA mutato, ottenuto per segregazione del filamento allungato dell'innesco, vengono scelti. La selezione può essere effettuata usando l'innesco mutante come sonda di ibridazione. La tecnica è pure utilizzabile per generare mutazioni multipunto. Vedi, per esempio, Dalbie-McFarland e altri *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1982)79:6409.

Impiegando i metodi suddetti, è stato preparato un certo numero di analoghi di polipeptidi esemplificativi che presentano un flusso di elettrotrasporto migliorato. In particolare, la figura 1B riporta la sequenza dell'analogo 1 di PTH. Questo analogo di PTH differisce dalla sequenza progenitore (riportata nella figura 1A) per quanto segue: Met<sub>8</sub> è stato sostituito con Leu; Leu<sub>15</sub> è stato sostituito con Arg; Met<sub>18</sub> è stato sostituito con Leu; Glu<sub>19</sub> è stato sostituito con Arg; Glu<sub>22</sub> è stato so-

stituito con Arg; Gln<sub>29</sub> è stato sostituito con Lys; Phe<sub>34</sub> è stato sostituito con Tyr; ed è presente un lattone di omoserina al terminale C del peptide.

L'analogo 2 di PTH, riportato nella figura 1C, differisce dalla sequenza progenitore (figura 1A) per quanto segue: Met<sub>8</sub> è stato sostituito con Leu; Leu<sub>11</sub> è stato sostituito con Ser; Leu<sub>15</sub> è stato sostituito con Arg, Leu<sub>18</sub> è stato sostituito con Ser; Met<sub>18</sub> è stato sostituito con Ser; Glu<sub>19</sub> è stato sostituito con Arg; Val<sub>21</sub> è stato sostituito con Ser; Glu<sub>22</sub> è stato sostituito con Arg; Leu<sub>24</sub> è stato sostituito con Ser; Leu<sub>28</sub> è stato sostituito con Ser, Gln<sub>29</sub> è stato sostituito con Lys; Tyr<sub>34</sub> è stato sostituito con Ser; ed è presente un lattone di omoserina al terminale C del peptide. Prese insieme, queste sostituzioni portano ad una struttura secondaria allentata.

Gli omologhi di irudina sono una serie di analoghi sintetici di irudina, un inibitore naturale della trombina. Due di questi analoghi sono riportati nella figura 2. L'analogo 1 di irudina, riportato nella figura 2B, è descritto in Maragnore e altri *Biochem. (1990) 29:7095-7101*. L'analogo B2 di irudina, un peptide con 20 amminoacidi, con un peso molecolare di circa 2186 Dalton, ha la sequenza in-

dicata nella figura 2C. Come si può vedere, l'analogo B2 dell'irudina differisce dall'analogo 1 dell'irudina illustrato nella figura 2C, poiché ha la D-cicloesilalanina che sostituisce la D-fenilalanina nella prima posizione. L'analogo B2 di irudina è descritto in Witting e altri *Biochem. J.* (1992) 287:663-664; e nella pubblicazione internazionale N. WO 92/13952.

Quando si è preparato l'analogo di polipeptide desiderato esso può venire somministrato al soggetto usando uno qualsiasi dei sistemi di somministrazione di farmaco per elettrotrasporto e non è limitato all'uso di un particolare sistema. Esempi di sistemi di somministrazione di farmaco per elettrotrasporto sono descritti, per esempio, nei brevetti U.S. N. 5.312.326 rilasciato a Myers e altri, 5.080.646 rilasciato a Theeuwes e altri, 5.387.189 rilasciato a Gyory e altri, e 5.169.383 rilasciato a Gyory e altri, le descrizioni dei quali sono qui incorporate per riferimento.

La figura 3 illustra un dispositivo esemplificativo di somministrazione per elettrotrasporto che può venire usato con il presente procedimento. Il dispositivo 10 comprende un involucro superiore 16, una scheda di circuito 18, un involucro inferiore

20, un elettrodo anodico 22, un elettrodo catodico 24, un serbatoio anodico 26, un serbatoio catodico 28 e un adesivo compatibile con la pelle 30. L'involucro superiore 16 è dotato di alette laterali 15 che contribuiscono a mantenere il dispositivo 10 sulla pelle del paziente. L'involucro superiore 16 è preferibilmente costituito da un elastomero formabile per iniezione (per esempio etilen vinilacetato). La scheda di circuito stampato 18 comprende un circuito integrato 19 collegato a componenti discreti 40 e alla batteria 32. La scheda di circuito 18 è attaccata all'involucro 16 per mezzo di perni (non illustrati nella figura 3) che passano attraverso aperture 13A e 13B, le estremità dei perni essendo riscaldati/fusi per ottenere il fissaggio a caldo della scheda di circuito 18 all'involucro 16. L'involucro inferiore 20 è collegato all'involucro superiore 16 mediante adesivo 30, la superficie superiore 34 dell'adesivo 30 essendo fatta aderire sia all'involucro inferiore 20 che all'involucro superiore 16, comprese le superfici inferiori delle alette 15.

Nella parte sottostante della scheda di circuito 18 è illustrata (parzialmente) una batteria a bottone 32. Per alimentare il dispositivo 10 si

possono anche impiegare altri tipi di batterie. Il dispositivo 10 è generalmente costituito dalla batteria 32, il circuito elettronico 19, 40, elettrodi 22, 24 e serbatoi di farmaco o prodotto chimico 26 e 28, tutti integrati in una unità autocontenuta. Le uscite (non illustrate nella figura 3) della scheda di circuito 18 sono in contatto elettrico con gli elettrodi 24 e 22 attraverso aperture 23 e 23' nelle depressioni 25 e 25' ricavate nell'involucro inferiore 20, per mezzo di nastri adesivi elettricamente conduttori 42 e 42'. Gli elettrodi 22 e 24, a loro volta, sono in contatto diretto meccanico ed elettrico con i lati superiori 44' e 44 dei serbatoi di farmaco 26 e 28. I lati inferiori 46', 46 dei serbatoi di farmaco 26, 28, sono a contatto della pelle del paziente attraverso le aperture 29', 29 nell'adesivo 30.

Il dispositivo 10 ha opzionalmente una caratteristica che permette al paziente di autosomministrare una dose di farmaco mediante elettrotrasporto. Azionando l'interruttore a pulsante 12, il circuito elettronico sulla scheda di circuito 18 eroga una quantità predeterminata di corrente continua agli elettrodi/serbatoi 22, 26 e 24, 28 per un intervallo di somministrazione di durata prestabili-

ta. L'interruttore a pulsante 12 è opportunamente disposto sul lato superiore del dispositivo 10 e viene azionato con facilità attraverso gli indumenti. Per attivare il dispositivo per la somministrazione del farmaco, viene preferibilmente impiegato un doppio azionamento dell'interruttore a pulsante 12 entro un breve periodo di tempo, per esempio 3 secondi, per minimizzare la possibilità di azionamento accidentale del dispositivo 10. Preferibilmente, il dispositivo trasmette all'utilizzatore una conferma visiva e/oppure sonora dell'inizio dell'intervallo di somministrazione di farmaco, mediante un LED 14 che si accende e/oppure un segnale sonoro emesso, per esempio, da un "beeper". Il farmaco viene somministrato attraverso la pelle del paziente mediante elettrotrasporto, per esempio sul braccio, per l'intervallo di somministrazione prestabilito.

L'elettrodo anodico 22 è preferibilmente formato da argento e l'elettrodo catodico 24 è preferibilmente formato da cloruro di argento. Sia il serbatoio 26 che il serbatoio 28 sono preferibilmente formati da idrogel di materiali polimerici. Gli elettrodi 22 e 24 ed i serbatoi 26 e 28 vengono trattenuti entro le depressioni 25' e 25

nell'involucro inferiore 20.

L'interruttore a pulsante 12, il circuito elettronico sulla scheda di circuito 18 e la batteria 32, vengono sigillati con adesivo tra l'involucro superiore 16 e l'involucro inferiore 20. L'involucro superiore 16 è preferibilmente formato da gomma o altro materiale elastomero. L'involucro inferiore 20 è preferibilmente costituito da plastica o materiale elastomero in foglio (per esempio polietilene) che può venire facilmente stampato per formare le depressioni 25 e 25' e tagliato per ricavare le aperture 23 e 23'. Il dispositivo montato 10 è preferibilmente resistente all'acqua (cioè a prova di spruzzo) ed è più preferibilmente impermeabile. Il sistema ha un profilo basso che si adatta facilmente al corpo, per cui consente libertà di movimento in corrispondenza e nella zona di applicazione. I serbatoi 26 e 28 sono posti dal lato di contatto con la pelle del dispositivo 10 e sono sufficientemente distanziati per impedire corto circuito elettrico accidentale durante la normale manipolazione e l'impiego.

Il dispositivo 10 aderisce alla superficie del corpo del paziente (per esempio la pelle) per mezzo di un adesivo periferico 30 che ha un lato superio-

re 34 ed un lato di contatto con la pelle 36. Il lato adesivo 36 ha proprietà adesive che assicurano che il dispositivo 10 rimane sul luogo di inserimento sul corpo durante la normale attività dell'utilizzatore, e permette tuttavia una facile rimozione dopo il periodo di utilizzazione prestabilito (per esempio 24 ore). Il lato superiore dell'adesivo 34 aderisce all'involucro inferiore 20 e trattiene l'involucro inferiore 20 attaccato all'involucro superiore 16.

I serbatoi 26 e 28 sono generalmente costituiti da una matrice di gel, con la soluzione di farmaco dispersa uniformemente in almeno uno dei serbatoi 26 e 28. Si possono usare concentrazioni di farmaco comprese tra circa  $1 \times 10^{-4}$  M e 1,0 M o più, con le concentrazioni di farmaco nella parte inferiore del campo che sono quelle preferite. Polimeri adatti per la matrice di gel possono comprendere praticamente qualsiasi materiale polimerico sintetico e/oppure naturale nonionico. Una natura polare è preferita quando l'agente attivo è polare e/oppure capace di ionizzazione, in modo da migliorare la solubilità dell'agente. Opzionalmente la matrice di gel sarà rigonfiabile con acqua. Esempi di polimeri sintetici adatti comprendono, senza es-

sere limitati a questi, poliacrilammide, poli(2-idrossietilacrilato), poli(2-idrossipropilacrilato), poli(N-vinil-2-pirrolidone), poli(n-metilolacrilammide), poli(diacetonacrilammide), poli(2-idrossietil metacrilato), alcole polivinilico e alcole poliallilico. Polimeri di condensazione a funzionalità ossidrilica (cioè poliesteri, policarbonati, poliuretani) sono pure esempi di polimeri sintetici polari adatti. Polimeri naturali (o loro derivati) adatti all'impiego come matrice di gel, sono esemplificati da eteri di cellulosa, eteri di metilcellulosa, cellulosa e cellulosa ossidrillata, metilcellulosa e metilcellulosa ossidrillata, resine come gomma guar, gomma acacia, gomma karraya, gomma xanthan, gelatina, e loro derivati. Per la matrice si possono anche impiegare polimeri ionici, purché i controioni disponibili siano farmaci ionici oppure altri ioni con carica opposta a quella dell'agente attivo.

Quindi, gli analoghi di polipeptide della presente invenzione verranno incorporati nel serbatoio del farmaco, come una matrice di gel quale quelle appena descritte, e somministrati ad un paziente usando un sistema di somministrazione di farmaco per elettrotrasporto, opzionalmente come esemplifi-

cato in precedenza. L'incorporazione della soluzione di farmaco può essere fatta in vari modi, per esempio imbibendo la soluzione nella matrice del serbatoio, oppure miscelando la soluzione di farmaco con il materiale della matrice prima della formazione dell'idrogel o simili.

Mentre l'invenzione è stata descritta con riferimento a sue realizzazioni specifiche preferite, si comprenderà che la descrizione precedente, come pure gli esempi seguenti, intendono illustrare e non limitare lo scopo dell'invenzione. Altri aspetti, vantaggi e modifiche che rientrano nello scopo dell'invenzione saranno evidenti per gli esperti del settore al quale si riferisce l'invenzione stessa.

### III. PARTE SPERIMENTALE

In generale, le tecniche standard della tecnologia del DNA ricombinante sono descritte in varie pubblicazioni, per esempio in Sambrook e altri, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989); Ausubel e altri, Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1 e 2 e supplementi (1987); e in Wu e Grossman(eds), Methods in Enzymology. Vol. 53 (Recombinant DNA Part. D, 1987). Enzimi di restrizione, mezzi di coltura

di cellule di mammifero e la linea cellulare di E.coli di DH10B (F-mcrA D (mrr-hdsdRMS-mcrBC) F80dlacZDM15 DlacX74 deoR recA1 araD139 (ara, leu(7697 galU galKI-rpsL endA1 nupG) sono state acquistate da Gibco/BRL (Gaithersburg, MD). Taq polimerasi è della Perkin Elmer Cetus (Norwalk, CT). La resina His-bind è stata acquistata da Novagen (Madison, WI) ed impiegata secondo le istruzioni del produttore. DNasi e lisozima sono stati forniti da Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN). Il bromuro di cianogeno è stato fornito da Aldrich (Milwaukee, WI). Gli oligonucleotidi sono stati sintetizzati su un sintetizzatore di DNA modello 394 della Applied Biosystems Inc. (Foster City, CA), usando prodotti chimici ABI. L'ormone sintetico di paratiroide umana, e l'ormone sintetico di paratiroide bovina sono stati forniti da Bachem (Torrance, CA).

#### ESEMPIO 1

#### COSTRUZIONE DI VETTORI DI ESPRESSIONE PER I POLI- PEPTIDI PTH

I vettori di espressione PTH sono stati costruiti in varie fasi usando il plasmide pBAD18 (Guzman e altri 1995) come plasmide di partenza. Il plasmide pBAD18 contiene il promotore araB seguito

da un polilegante ed un terminatore sotto il controllo del regolatore positivo/negativo araC, pure specificato dal plasmide. Il plasmide pBAD18 contiene pure una origine di plasmide modificato pBR322 ed il gene bla, per permettere la replicazione e la selezione in E.coli. come pure la regione intragenica del fago M13, per permettere la raccolta di DNA a filamento singolo. Per gli scopi della presente invenzione, tuttavia il vettore di clonazione realmente impiegato per costruire i vettori di espressione dell'invenzione non è critico.

Per esempio, il plasmide pMC3 può servire come vettore di clonazione in sostituzione del plasmide pBAD18 nei protocolli seguenti. Il plasmide pMC3 è descritto nel brevetto US N. 5.270.170. Il plasmide pMC3 differisce dal plasmide pBAD18 per il fatto che il plasmide pMC3 codifica un repressore lac di dinorfina a coda B nella regione corrispondente alla regione NheI-XbaI del sito di clonazione multiplo di pBAD18 e codifica una sequenza operatore lac nella regione corrispondente al frammento NdeI-ClaI del plasmide pBAD18. Poiché questo frammento non è essenziale per gli scopi della presente invenzione, si possono facilmente costruire vettori adatti per gli scopi della presente inven-





## ESEMPIO 2

### ESPRESSIONE E PURIFICAZIONE DI POLIPEPTIDI

E.coli DH10B, contenente il plasmide precedentemente descritto, viene coltivata per una notte in mezzo LB contenente ampicillina (da 50 a 100  $\mu\text{g/ml}$ ). 10 ml di questa coltura vengono usati per inoculare una coltura di 500 ml di Superbroth (35 g/l di Bactotriptide, 20 g/l di estratto di lievito, 5 g/l di NaCl, e NaOH fino a pH = 7,5) contenente ampicillina. Le cellule vengono lasciate crescere fino ad una OD<sub>600</sub> di circa 0,5 e 1,0, quindi si aggiunge L-(+)-arabinosio fino ad una concentrazione finale dello 0,2%. Le cellule vengono lasciate crescere per altre 3 ore. Dopo questo tempo, la OD<sub>600</sub> è tra 1,5 e 3. Le cellule vengono raccolte per centrifugazione e lavate sequenzialmente con 250 ml di tampone WTEK (Tris 50mM, pH 7,5, e EDTA 10 mM, KCl 100 mM); 250 ml di PBS; e 250 ml di Tris 10 mM, pH 7,5.

Le cellule vengono quindi risospese in 100 ml di una soluzione costituita da Tris 10 mM, pH 7,5; 0,1 mg/ml di inibitore di proteasi N-tosil-L-fenilalanina clorometilchetone (TPCK); 0,1 mg/ml di inibitore di proteasi N-tosil-L-lisina clorometilchetone (TLCK); 0,1 mg/ml di inibitore di proteasi

fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) e 0,05 mg/ml di lisozima. La soluzione risultante viene incubata su ghiaccio per 1 ora. Le cellule vengono poi congelate e scongelate; si aggiunge 1 mg di DNase alle cellule scongelate e la miscela risultante viene incubata su ghiaccio per un'altra ora.

I corpi di inclusione delle cellule vengono purificati per centrifugazione a 10.000 xg per 15 minuti. I corpi di inclusione vengono solubilizzati in SDS al 10% ma, in alcuni casi, è pure necessaria la sonicazione del campione per solubilizzare tutta la proteina. Si aggiunge tampone legante (imidazolo 5mM, cloruro di sodio 500 mM e Tris 20 mM, pH 7,9) per diluire la concentrazione di SDS all'1%, ed il campione viene caricato su una colonna contenente resina His-bind (Novagen). La colonna viene poi lavata con 15 volumi di colonna di tampone legante e la proteina legata viene poi eluita con un volume di colonna di tampone di eluizione (cloruro di sodio 500 mM, EDTA 100 mM, e Tris 50 mM, pH 7,9). Si aggiungono quindi due volumi di etanolo assoluto per precipitare la proteina.

Il polimero PTH precipitato viene poi disciolto in acido formico al 70%, quindi si aggiunge un eccesso molare di 500 volte (si può usare un ecces-

so da 100 a 1000 volte) di bromuro di cianogeno. Un controllo del tempo di scissione (effettuato con differenti concentrazioni di bromuro di cianogeno per determinare il tempo ottimale), controllato mediante analisi dell'amminoacido, indica che la scissione completa si ottiene in 2 ore a temperatura ambiente. Dopo la scissione con bromuro di cianogeno i peptidi vengono liofilizzati e risospesi in acqua distillata. Il peptide viene risospeso in tampone A (0,1% di TFA) e ulteriormente purificato mediante HPLC, usando una colonna semipreparativa VIDAC C-18. Si iniettano circa 30 mg di peptide nella colonna. Il peptide viene quindi eluito con un gradiente del 20-40% di acetonitrile / 0,1% TFA, in 40 minuti. Il picco principale, che eluisce a circa 15 minuti, viene raccolto e liofilizzato a secchezza.

Dopo isolamento dei corpi di inclusione e purificazione nel modo suddescritto, il peptide presenta una purezza superiore al 95%, determinata mediante SDS - PAGE. Il peptide viene quindi dissalato e parzialmente purificato su una colonna Sep-Pak. I singoli picchi vengono isolati ed analizzati mediante spettrometro di massa ad elettrospruzzatura per determinarne la composizione. Sono presenti

due picchi minori che sono il risultato di una scissione incompleta con bromuro di cianogeno e rappresentano il peptide PTH-His<sub>6</sub> ed il peptide I-N-M-PTH. Il picco principale costituisce più dell'80% della proteina totale. Il confronto del campione "grezzo" purificato su Sep-Pak ed un RPTH purificato mediante HPLC non mostra una significativa differenza nella capacità di stimolazione dell'adenilato ciclasi.

#### ESEMPIO 3

##### PRODUZIONE DI ANALOGHI DI PTH

Per produrre gli analoghi di PTH della presente invenzione, il peptide PTH viene sostituito con gli amminoacidi indicati nelle figure 1B, 1C ed 1D. Gli analoghi di PTH vengono prodotti con tecnica ricombinante in un modo simile a quello descritto in precedenza per il gene ricombinante RPTH-A, sostituendo le basi appropriate. Gli analoghi di PTH vengono espressi e purificati nel modo suddescritto.

#### ESEMPIO 4

##### SAGGIO DELL'ATTIVITA' DI ANALOGO DI PTH

Un PTH sintetico avente la sequenza di tipo originale e gli analoghi di PTH (RPTH) ricombinanti vengono analizzati per valutarne la capacità a stimolare la

adenilato ciclasi. Le concentrazioni di PTH vengono determinate mediante  $DO_{280}$  usando un coefficiente di estinzione di 6600 per il peptide ricombinante e 5500 per il peptide sintetico. La linea cellulare di osteosarcoma di ratto UMR106 (ATCC CRL 1661) viene impiegata per la prova in vitro della capacità del peptide ad attivare il recettore (PTH). L'attivazione del recettore PTH porta ad un aumento intracellulare della concentrazione di cAMP.

Le cellule UMR106 vengono inseminate a circa  $2,5 \times 10^5$  per pozzetto in una piastra a 48 pozzetti, e lasciati sviluppare fino a confluenza. I saggi vengono effettuati sulle cellule 3-5 giorni dopo la confluenza. Il mezzo (mezzo di Eagle modificato da Dulbecco, DMEM, con siero fetale bovino) viene separato e si aggiunge 1 ml di mezzo fresco. A ciascun pozzetto della piastra si aggiunge quindi PTH (ricombinante o sintetico) a varie concentrazioni e 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) ad una concentrazione finale di 1 mM, quindi si incuba per 5 minuti a temperatura ambiente. Il mezzo viene quindi rimosso e le cellule vengono rapidamente lavate con PBS ghiacciato. Le cellule vengono poi estratte due volte con 1 ml di etanolo assoluto. Le due estrazioni vengono combinate e l'etanolo viene allonta-

nato per evaporazione. L'estratto viene quindi ridisciolti in 1 ml di tampone di prossimità di scintillazione (tampone SPA) (Amersham, Arlington Heights, IL). La concentrazione in cAMP viene determinata usando un kit di saggio di prossimità di scintillazione (SPA) fornito dalla Amersham. L'analogo 1 ha una costante di dissociazione (Kd) di 1,5 nM ed un EC-50 (concentrazione efficace) di 0,9nM. La PTH di tipo naturale ha una costante di dissociazione di 8,5 nM ed una EC-50 di 4,4 nM. Gli analoghi 2 e 3 non hanno attività misurabile.

#### ESEMPIO 5

#### PREVISIONE DEGLI EFFETTI DELLE SOSTITUZIONI DI AMMINOACIDO NEGLI ANALOGHI DI PTH SU UN POTENZIALE DI $\alpha$ -ELICA

Come spiegato in precedenza, il potenziale di  $\alpha$ -elica di polipeptidi lineari può essere stimato con l'impiego delle equazione di Lifson -Roig (Lifson, S e Roig, A. *J. Chem. Phys* (1961)34:1963-1974 ) ed i valori dei parametri di formazione dell'elica residua convertiti dai valori di Zimm-Bragg (Zimm, B.H. e Bragg. *J.K. J. Chem. Pys* (1959)31:526-535, impiegando equazioni di conversione di Qian e Schellman (Qian, H, e Schellman, *J.A.J. Chem. Phys*(1992) 96:3987-3994). Quando per

ogni residuo è stata definita una serie dei valori di Zimm-Bragg  $s$  e  $\sigma$ , la probabilità che l'intera catena polipeptidica (o qualche sottosequenza definita) adotti la  $\alpha$ -elica può essere prevista usando equazioni nei riferimenti suddetti.

I due calcoli generalmente adottati per stimare il potenziale di  $\alpha$ -elica, precedentemente descritti vengono applicati ai due analoghi di PTH formati. Il primo calcolo considera il parametro  $v$  di inizio dell'elica di Lifson-Roig come una costante pari a 0,039 (cioè il parametro  $\sigma$  di Zimm-Bragg è 0,0013 per tutti i residui), con il parametro  $w$  per ciascun amminoacido calcolato dal valore  $s$  di Zimm-Bragg trovato nella tabella 1 di Finkelstein e altri (Finkelstein e altri *Proteins: structure, Function and genetics* (1991) 10:287-299). Nell'applicare i calcoli agli analoghi di PTH, i valori  $s$  nella tabella 1 di questo riferimento vengono dapprima convertiti dai loro valori a 300 °K ai valori stimati a 273°K, ammettendo un cambiamento di entalpia di 1kcal/mol (identico per tutti i residui). Per l'analogo 1 di PTH questo calcolo fornisce una probabilità di 0,41 che l'intera sequenza sia  $\alpha$ -elicoidale. Per l'analogo 2 di PTH questo calcolo da una probabili-

tà di 0,18 che l'intera sequenza sia  $\alpha$ -elicoidale. Per l'analogo 3 di PTH questo calcolo da una probabilità di 0,15 che l'intera sequenza sia  $\alpha$ -elicoidale.

Il secondo calcolo non ammette che i residui abbiano lo stesso valore per i parametri di inizio dell'elica  $v$  (cioè il parametro  $\sigma$  di Zimm-Bragg è unico per ciascun residuo di amminoacido. In questo caso i valori  $s$  e  $\sigma$  di Zimm-Bragg per ciascun residuo vengono rilevati (salvo per His, Pro, e Trp) dalla tabella 1 di Skolnick, J, e Holtzer, A. *Macromolecules* (1982) 15:812-821. I valori di Zimm-Bragg per His vengono prelevati da Sueki e altri, *Macromolecules* (1984)17:148-155. I valori di Zimm-Bragg per Pro e Trp vengono prelevati da Finkelstein e altri. Per questo secondo calcolo alternativo, in ogni caso il valore  $s$  è stato computato a 273° K, e per i residui aventi catene laterali ionizzabili, è stato assunto il valore  $s$  per lo stato di ionizzazione che sarebbe predominante a pH 7. I valori  $s$  (a 273°K) ed i valori  $\sigma$  ottenuti da Sueki e altri e Skolnick e Holtzer vengono convertiti (Qian e Schellman) ai loro valori  $v$  e  $w$  di Lifson-Roig e quindi impiegati per calcolare la probabilità che l'intera catena polipeptidica ( o qualcuna

successiva) esista allo stato di  $\alpha$ -elica). Per l'analogo 1 di PTH questo calcolo fornisce una probabilità di 0,07 che l'intera sequenza sia ad  $\alpha$ -elica. Per l'analogo 2 di PTH questo calcolo fornisce una probabilità di 0,02 che l'intera sequenza sia ad  $\alpha$ -elica. Per l'analogo 3 di PTH, questo calcolo fornisce una probabilità di 0,02 che l'intera sequenza sia ad  $\alpha$ -elica.

Considerando insieme ambedue le serie di dati relativi alla tendenza dei polipeptidi ad assumere una conformazione ad  $\alpha$ -elica, si deduce che l'analogo 1 dovrebbe avere una probabilità da 2 a 3 volte maggiore di esistere come  $\alpha$ -elica dell'analogo 2.

#### ESEMPIO 6

#### VALUTAZIONE DEL POTENZIALE DI $\alpha$ -ELICA DA DICROISMO CIRCOLARE VARIANDO LE CONCENTRAZIONI DI TRIFLUOROETANOLO

Gli studi sul dicroismo circolare con trifluoroetano (TFE) sono stati fatti usando lo spettrometro a dicroismo circolare modello 62DS della AVIV Associates, Inc. Le concentrazioni di proteine sono state determinate dalle letture di assorbanza usando coefficienti di estinzione calcolati per gli analoghi in tampone ionico 10mM. Le titolazioni con

TFE sono state fatte tra 0 e 55% di TFE, leggendo tra 250 e 200 nm a 20°C per ciascun campione di TFE.  $\theta_{222}$  è stato calcolato da:

$\theta_{\text{osservato a } 222} * (\text{peso medio residuo}) / (10(\text{lunghezza del percorso della cellula}) (\text{concentrazione proteina}))$ .

I dati dalle titolazioni con TFE a pH 6,5 in cacodilato 10 mM sono riassunti in seguito nella tabella 2 per gli analoghi di PTH e riportati nella figura 4. La figura 4 dimostra che quando il cosolvente che induce l' $\alpha$ -elica, trifluoroetanolo, raggiunge il 30% (volume/volume) si forma praticamente la massima quantità di elica sia per PTH che per l'analogo 1, con la quantità media di elicità essendo attorno all'80%. Il PTH progenitore, anche in assenza dell'agente di induzione dell'elica è ad  $\alpha$ -elica per circa il 20%.

L'analogo 2 di PTH, in assenza del TFE di induzione dell'elica, è praticamente privo di elica e con il 30% di TFE, esso ha una frazione di  $\alpha$ -elica di circa il 30%.

L'analogo 3 del PTH in assenza di TFE di induzione dell'elica è essenzialmente privo di elica, e con il 30% di TFE è a circa il 15% di  $\alpha$ -elica.

La riduzione di 2-3 volte nel contenuto di

elica osservato al 30% di trifluoroetano è stata prevista in base all'equazione di Lifson-Roig, e dai relativi calcoli come è stato indicato prima.

TABELLA 2

DATI DI TITOLAZIONE DI TFE

%TFE	$\square_{222}$ per hPTH (1-34)	$\square_{222}$ per analogo 1	$\square_{222}$ per analogo 2	$\square_{222}$ per analogo 3
0	-7793	-4205	-2750	-3867
10	-15863	-9333	-4600	-6479
20	-21491	-23098	-9065	-12329
30	-26288	-26334	-12081	-15161
40	-27011	-27850	-14320	-15191
50	-26802	-27705	-15649	-15395

ESEMPIO 7

FLUSSO DI ELETTROTRASPORTO IN VITRO DEGLI ANALOGHI  
DI PTH

Gli studi sull'elettrotrasporto in vitro sono stati effettuati in celle di piccolo volume multi-compartimento, appositamente costruite, usando un comando anodico. Nel compartimento donatore si inserisce PTH 1 mM in tampone 10 mM, e nel compartimento recettore si carica un recettore con una forza ionica finale di 25 mM. La soluzione recettore per il PTH originale e per gli analoghi 1 e 2 è

NaCl 15 mM tamponata a pH 7 con imidazolo 10mM, albumina di siero bovino (BSA) allo 0,1% come agente bloccante, detergente Tween 20 e sodio azide come battericida. La soluzione di recettore per l'analogo 3 di PTH è NaCl 15 mM tamponata a pH 7 con imidazolo 10 mM, bromuro di dodecil trimetilammonio (DTAB, un tensioattivo) a 0,5% e 0,3 mg/ml di Trp-Nle-Ar-Phe-ammide, un tetrapeptide usato come substrato alternativo per gli enzimi proteolitici presenti nella pelle.

Strato corneo di pelle di cadavere umano distaccato a caldo viene posto tra i compartimenti donatore e recettore con il lato dell'epidermide rivolto verso il compartimento recettore. Si applica una corrente continua costante di 127 mA (cioè 0,1 mA/cm<sup>2</sup>). Le celle vengono mantenute a 32°C durante gli studi in vitro con campioni di recettore prelevati ogni 2 ore (il volume di recettore prelevato viene sostituito con recettore fresco a ciascun campionamento). I campioni di recettore vengono analizzati mediante HPLC a fase inversa.

Le aree di picco dei campioni di recettore pTH vengono confrontate a curve standard dello stesso analogo a concentrazioni note, eseguite nello stesso tempo usando una colonna polimerica analitica,

con una velocità di flusso di 1,5 ml/minuto ed un gradiente tra 10 e 50% B per una eluizione di 10 minuti. Il tampone A è acido trifluoroacetico (TFA) allo 0,1%, 1% di acetonitrile; il tampone B è TFA allo 0,1%, 98,9% di acetonitrile. Le concentrazioni di analogo vengono convertite in flusso di massa e riportate in funzione del tempo.

Per gli studi sull'elettrotrasporto in vitro, i donatori indicati contengono le versioni retro-inverso (cioè si usano residui di D-amminoacido che vengono montati in ordine inverso rispetto al normale) degli analoghi 1 e 2 di PTH (1mM) in soluzioni acquose a pH 5,0. Questo poiché gli analoghi 1 e 2 di PTH non sono stabili quando vengono incubati con lo strato corneo distaccato, probabilmente per la digestione proteolitica da parte della proteasi della pelle. L'analogo 3 di PTH non è una versione retro-inverso, ma è invece sintetizzato in modo ricombinante. Per proteggere l'analogo 3 dalla digestione da parte degli enzimi proteolitici, si aggiunge il tetrapeptide alla soluzione recettore. Le celle di elettrotrasporto completamente montate vengono incubate a  $32 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . L'area di contatto della pelle, disponibile per il trasporto, è di  $1,27 \text{ cm}^2$ . Il volume del compartimento donatore è

di 200  $\mu\text{l}$ , il volume del compartimento recettore è di 350  $\mu\text{l}$ . La soluzione di recettore viene separata dal catodo per mezzo di una membrana a scambio anionico (Ionac™, Eletrosynthesis Co., Lancaster, NY). Ciascuna cella viene collegata a una fonte costante di corrente ad una densità di corrente standard di 100  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ . La caduta di tensione attraverso ciascuna cella viene controllata ad intervalli di circa 2 ore per tutta la durata dell'esperimento. Si costruisce l'istogramma del flusso di massa in ciascun punto di tempo. Il flusso di massa medio (intervallo di confidenza 95%) per l'analogo 1 di PTH è di 0,3  $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ h}^{-1}$  (da 0,1 a 0,7), per l'analogo 2 di PTH è di 3,2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ h}^{-1}$  (da 2,1 a 4,2) e per l'analogo 3 di PTH è di 1,1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ h}^{-1}$  (0,9-1,7). I valori medi del flusso di massa  $\pm$  sd per questi analoghi sono di 1,4  $\mu\text{g cm}^{-2}\text{h}^{-1} \pm 2,3$ ; 4,1  $\mu\text{g cm}^{-2}\text{h}^{-1} \pm 3,7$ ; e 1,5  $\mu\text{g cm}^{-2}\text{h}^{-1} \pm 1,1$  rispettivamente per gli analoghi 1,2 e 3.

#### ESEMPIO 8

#### VALUTAZIONE DEL POTENZIALE DI $\alpha$ -ELICA DA DICROISMO CIRCOLARE VARIANDO LE CONCENTRAZIONI DI TRIFLUOROETANOLO

Gli studi sul dicroismo circolare con trifluoroetano (TFE) sono stati fatti usando uno spet-

trometro per dicroismo circolare modello 62DS della AVIV Associates, Inc. Le concentrazioni delle proteine sono state determinate dalle letture di assorbanza usando i coefficienti di estinzione calcolati per gli analoghi in tampone ionico 10 mM. Le titolazioni con TFE sono state effettuate tra lo 0 ed il 50% di TFE, analizzando da 250 a 200 nm a 20°C per ciascun campione di TFE.  $\theta_{222}$  è stato calcolato da:

$$\theta_{\text{osservata a } 222} * (\text{peso residuo medio}) / (10(\text{lunghezza percorso cellula})(\text{concentrazione proteina}))$$

I dati dalle titolazioni con TFE a pH 6,5, con cacodilato 10 mM, sono riassunti nel seguito nella tabella 3 per gli analoghi di irudina e riportati nella figura 5. La figura 5 dimostra che quando il trifluoroetano, cosolvente di induzione dell' $\alpha$ -elica, raggiunge una concentrazione del 30% (volume/volume) si forma praticamente la quantità massima di elica sia per l'analogo di irudina progenitore che l'analogo B2, con la quantità media di elicità essendo di circa il 10% per l'analogo di irudina progenitore e praticamente dello 0% per l'analogo B2. L'analogo di irudina progenitore e l'analogo B2 non presentano  $\alpha$ -elicità in assenza del TFE di induzione dell'elica. L'analogo B2 di i-

rudina non ha praticamente  $\alpha$ -elica anche con una concentrazione di TFE dell'80%.

TABELLA 3  
DATI DI TITOLAZIONE DI TFE

%TFE	$\square_{222}$ per analogo di irudina progenitore	$\square_{222}$ per analogo B2
0	-1120	-989
10	-3679	-1313
20	-5458	-1580
30	-6972	-1848
40	-8395	-1896
50	-8493	-1963

ESEMPIO 9

FLUSSO DI ELETTROTRASPORTO IN VITRO DI ANALOGO DI ERUDINA B2

L'analogo di erudina B2 viene sintetizzato con tecniche standard. Vedi, per esempio, Maraganore e altri, *Thromb. Haemostasis* (1991)65:830, Bode e altri, *EMBO J.* (1989)8:3467-3475; e la pubblicazione internazionale n. WO 92/13952. Il flusso di elettrotrasporto transdermico di analogo di irudina B2 viene valutato usando epidermide umana separata a caldo. Inoltre, le formulazioni di idrogel vengono pure studiate con l'uso di epidermide umana, come

viene studiato l'effetto della densità di corrente sul flusso di farmaco per via transdermica. Il flusso di analogo di irudina B2 per via transdermica viene valutato usando soluzioni acquose preparate con farmaco come ricevuto e dissalato, tamponato con un tampone acetato con forza ionica 10 mM, pH 5. Gli studi sul flusso di analogo B2 di irudina sono stati effettuati con una densità di corrente di  $0,1 \text{ mA/cm}^2$ . Usando come soluzione recettore cloruro di sodio 15 mM a pH 5 con tampone acetato, si ottiene, in equilibrio, un flusso di elettrotrasporto di circa  $19 \mu\text{g h}^{-1} \text{ cm}^{-2}$  e  $17 \mu\text{g h}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ , rispettivamente per le soluzioni di farmaco dissalato e di farmaco tal quale.

La variabilità nel flusso di analogo B2 di irudina per campioni di pelle prelevati da un singolo donatore, come pure da donatori multipli, risulta essere tra circa il 15 ed il 40%, il che rientra bene nei limiti di variabilità osservati per i composti peptidici e proteici.

Per gli studi sull'idrogel, dischi di idrogel sono stati imbibiti con farmaco e introdotti in alloggiamenti in espanso. I gel vengono imbibiti sia con soluzioni come ricevute (analogo B2 di irudina 11mM in acetato 20 mM) che con farmaco dissalato

(analogo B2 di irudina 4 mM in acetato 4 mM). Si ottiene un flusso di elettrotrasporto in condizioni di equilibrio che è mediamente di  $27 \mu\text{g h}^{-1} \text{cm}^{-2}$ , con formulazioni di idrogel contenenti il farmaco come ricevuto oppure dissalato.

Impiegando idrogel imbibiti con farmaco come ricevuto, si effettua un altro esperimento per valutare l'effetto della densità di corrente sul flusso di analogo B2 di irudina per via transdermica. Un aumento della densità di corrente porta ad un incremento corrispondente del flusso di analogo B2 di irudina nel campo di densità di corrente esaminate.

In condizioni passive (corrente 0) non si osserva flusso misurabile di analogo B2 di irudina.

#### ESEMPIO 10

#### FLUSSO DI ELETTROTRASPORTO IN VIVO DI ANALOGO B2 DI IRUDINA

##### A. SOMMINISTRAZIONE INTRAVENOSA DI ANALOGO B2 DI IRUDINA

I maialini usati per gli studi intravenosi (IV), del peso di  $11 \pm 1 \text{ kg}$  ( $n=3$ ), sono stati tenuti a digiuno per tutta la notte prima delle iniezioni di bolo. Le iniezioni di bolo IV sono state effettuate in una vena auricolare o nella vena ca-

va. L'iniezione IV è stata somministrata in un tempo tra 30 e 60 secondi e la dose è stata di circa 0,3 mg/kg (in 0,5 ml). I livelli di analogo B2 di irudina nel plasma aumentano rapidamente in tutti i suini dopo l'iniezione di bolo per via intravenosa di analogo B2 di irudina, raggiungendo un livello di picco medio di  $66 \pm 6$  ng/ml al punto di campionamento di 15 minuti. I livelli di analogo B2 di irudina nel plasma scendono al di sotto di 2 ng/ml in 2 ore dopo l'iniezione, e rimangono relativamente costanti per un tempo da 2 a 8 ore dopo l'iniezione. La semivita di eliminazione e la clearance calcolata per ciascun maialino sono riportate nella tabella 3. Il volume apparente di distribuzione e la semivita di eliminazione media sono state calcolate dai dati del bolo intravenoso rispettivamente come 45,4 litri e 16 minuti.

TABELLA 4

## FARMACOCINETICA DI ANALOGO B2 DI IRUDINA NEL SUINO

Fase definitiva	Suino 303	Suino 304	Suino 305	Media	SD
<b>IV</b>					
BW [kg]	12	11	10	11	1
$K_0$ [1/h]	2.42	2.01	2.5	2.31	0.26
V [L]	45.5	49.25	41.55	45.43	3.85
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
$T_{1/2}$ Elimin. (min)	17.2	20.72	16.6	18.2 <sup>a</sup> 16 <sup>b</sup>	2.23 <sup>a</sup> --
<b>SC</b>					
$T_{1/2}$ Elimin. (min)	--	--	--	58 <sup>b</sup>	--
<b>4-ETS</b>					
$T_{1/2}$ Elimin. (min)	--	--	--	28 <sup>b</sup>	--
$T_{1/2}$ Accumulo (min)	--	--	--	38 <sup>b</sup>	--
<b>Fase di selezione</b>	<b>Pig SC-3A</b>				
<b>3-ETS</b>					
$T_{1/2}$ Elimin. (min)	32				
$T_{1/2}$ Accumulo (min)	33				

a - media calcolata da singole determinazioni di  $T_{1/2}$ .

b - calcolato dalla regressione lineare della concentrazione media nel plasma di analogo B2 dell'irudina in funzione della curva del tempo.

## B. SOMMINISTRAZIONE SOTTOCUTANEA DI ANALOGO B2 DELL'IRUDINA

I maialini sono stati tenuti a digiuno per tutta la notte prima delle iniezioni sottocutanee (SC). Nel tempo di 1 minuto sono stati somministrati circa 0,5 mg /kg (in 0,5 ml) di analogo B2 dell'irudina, per via sottocutanea. I livelli di analogo B2 dell'irudina nel plasma sono saliti entro la prima mezz'ora dopo l'iniezione a  $57 \pm 10$  ng/ml per declinare in seguito. La semivita di eliminazione media dopo l'iniezione sottocutanea è di 58 minuti (tabella 4). I livelli di analogo B2 dell'irudina nel plasma sono a circa 2 ng/ml 6 ore dopo l'iniezione sottocutanea, e rimangono relativamente costanti per un tempo da 6 a 8 ore.

## C. ELETTROTRASPORTO DI ANALOGO B2 DELL'IRUDINA

I sistemi di elettrotrasporto impiegati per l'analogo B2 dell'irudina somministrato in vivo, comprendono una unità a perdere contenente il farmaco, a contatto elettrico con un regolatore di corrente riutilizzabile. L'unità a perdere contenente il farmaco è costituita da un nastro in polietilene espanso adesivo laminato, di tipo medico, contenente sia il controlettrodo anodico in foglio di argento che un elettrodo catodico in pellicola di po-

liisobutilene caricata con cloruro di argento, ed i rispettivi gel. Il gel anodico è a contatto con l'anodo in foglio di argento. Un gel catodico di interfaccia realizza il contatto con l'elettrodo catodico in cloruro di argento. Il gel di interfaccia viene separato dal gel donatore contenente il farmaco da una membrana a scambio cationico. Il gel donatore viene posto nella cavità catodica del contenitore del gel appena prima dell'applicazione del sistema.

Il gel di farmaco viene imbibito il giorno prima dell'elettrotrasporto con analogo B2 dell'irudina in tampone acetato (10 mM, pH 5) fino ad una concentrazione finale di 5mM di peptide. La superficie di contatto con la pelle per ciascun gel di farmaco è di 6 cm<sup>2</sup>. La densità di corrente adottata è di 0,1 mA/cm<sup>2</sup>.

I sistemi di elettrotrasporto sono stati controllati per l'intensità di corrente e la tensione durante l'elettrotrasporto per confermare la continuità elettrica del sistema. I valori di tensione sono tipici per questo modello animale e indicano una diminuzione iniziale seguita da valori pressoché costanti per tutta la durata della prova. La semivita di eliminazione media dopo il termine

dell'elettrotrasporto è di 28 minuti (tabella 5). La semivita di accumulo media all'inizio dell'elettrotrasporto è di 38 minuti. I livelli di analogo B2 di irudina nel plasma salgono dopo 4 ore di elettrotrasporto continuo a  $23 \pm 6$  ng/ml. I livelli di analogo B2 di irudina nel plasma rimangono relativamente stabili, a  $21 \pm 7$  ng/ml, per un tempo da 2 a 6 ore dopo l'elettrotrasporto, e diminuiscono leggermente dopo 8 ore. La diminuzione apparente nei livelli di analogo B2 dell'irudina nel plasma dopo da 6 a 8 ore di elettrotrasporto può essere dovuta a impoverimento di analogo B2 di irudina nell'idrogel donatore. Una diminuzione rapida dei livelli di analogo B2 dell'irudina nel plasma si verifica dopo la fine dell'elettrotrasporto. 2 ore dopo il termine dell'elettrotrasporto, i livelli di analogo B2 dell'irudina nel plasma si trovano a o presso 2 ng/ml.

L'eliminazione media da 3 sistemi di elettrotrasporto, dopo il termine dell'elettrotrasporto, è di 32 minuti, mentre la semivita di accumulo media all'inizio dell'elettrotrasporto è di 33 minuti (tabella 5). Il livello di analogo B2 dell'irudina nel plasma sale, dopo 2 ore di elettrotrasporto a 9 ng/ml, dopo di che si ha un lento declino dei li-

velli di analogo B2 dell'irudina nel plasma.

Le velocità di flusso transdermico, calcolate sia come velocità di immissione ( $\mu\text{g}/\text{ora}$ ) che come flusso per unità di superficie ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{ora}$ ), vengono calcolate usando sia l'analisi di compartimento che l'analisi non compartimentale. L'analisi non compartimentale calcola il flusso di farmaco per via transdermica dalla concentrazione di farmaco nel sangue dell'animale, concentrazione che viene misurata con tecniche standard, e dalla velocità nota alla quale il particolare farmaco viene eliminato dal sangue. L'analisi di compartimento calcola il flusso per via transdermica di farmaco dalla concentrazione (misurata) di farmaco nel sangue dell'animale e, ammettendo che l'assorbimento da parte dell'animale di farmaco somministrato mediante iniezione intravenosa a qualsiasi particolare velocità sia uguale a quello ottenuto con la somministrazione per elettrotrasporto, per ottenere una particolare concentrazione di farmaco nel sangue. I modelli di compartimento e non compartimentali sono descritti in Pharmacokinetics, M. Gibaldi, 2d ed. Marcel Dekker (1982) pps 1-5 e 319-222). L'immissione per via transdermica ed i flussi per unità di superficie, impiegando ambedue le analisi, sono ri-

portati nella tabella 4. La velocità di immissione media viene calcolata in  $1873 \pm 444 \mu\text{g /ora}$ , ed il flusso viene calcolato in  $78 \pm 18\mu\text{g/ora}^{-1}\text{cm}^{-2}$  per 4 sistemi ETS (analogo B2 dell'irudina) usando il modello di compartimento. Usando l'analisi non compartimentale, la velocità di immissione è stata calcolata in  $1900 \pm 523 \mu\text{g/ora}$ , ed il flusso è stato calcolato in  $79 \pm 22 \mu\text{g/ora}^{-1} \text{cm}^{-2}$  per 4 sistemi ETS (analogo B2 dell'irudina). Il flusso medio di  $22 \mu\text{g/ora}^{-1} \text{cm}^{-2}$  è stato calcolato per l'animale nella fase di selezione 2 che riceve 3 sistemi ETS (analogo B2 dell'irudina).

TABELLA 5

VELOCITA' DI IMMISSIONE PER ELETTROTRASPROTO CALCO-  
LATE E FLUSSO PER ANALOGO B2 DELL'IRUDINA NEI SUINI

Fase definitiva	Suino 303	Suino 304	Suino 305	Media	SD
<b>4-ETS (un compartimento)</b>					
$K_e$ [1/h]	3.64	2.5	2.94	3.03	0.58
Velocità [ $\mu\text{g/h}$ ]	1361	2096	2161	1873	444
Flusso [ $\mu\text{g/cm}^2\text{h}$ ]	56.7	87.3	90.0	78.0	18.5
<b>4-ETS (non compartimentale)</b>					
Velocità [ $\mu\text{g/h}$ ]	1396	1866	2440	1900	523
Flusso [ $\mu\text{g/cm}^2\text{h}$ ]	58.2	77.8	101.7	79.2	21.8
<b>Fase di selezione</b>					
	Suino SC-3A				
<b>3-ETS (un compartimento)</b>					
$K_e$ [1/h]	3.15				
Velocità [ $\mu\text{g/h}$ ]	392				
Flusso [ $\mu\text{g/cm}^2\text{h}$ ]	21.8				
<b>3-ETS (non compartimentale)</b>					
Velocità [ $\mu\text{g/h}$ ]	412				
Flusso [ $\mu\text{g/cm}^2\text{h}$ ]	22.9				

Sono stati così descritti i procedimenti per migliorare il flusso di elettrotrasporto di agenti polipeptidici. Sebbene siano state descritte alquanto dettagliatamente realizzazioni preferite dell'invenzione in oggetto, si comprenderà che è possibile apportare variazioni ovvie senza distaccarsi dallo spirito e dallo scopo dell'invenzione, come definita nelle rivendicazioni allegate.

## RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per preparare un analogo di un polipeptide progenitore avente un segmento ad  $\alpha$ -elica oppure a foglio  $\beta$ , l'analogo presentante una elettrotrasportabilità migliore/migliorata attraverso una superficie del corpo, detto procedimento caratterizzato dal fatto che:

si sostituiscono uno o più residui di amminoacido di detto polipeptide progenitore nel polipeptide analogo, per rompere uno o più segmenti ad  $\alpha$ -elica e/oppure a foglio  $\beta$  di detto polipeptide progenitore, in cui detto polipeptide analogo presenta elettrotrasportabilità migliore /migliorata rispetto a detto polipeptide progenitore.

2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui il procedimento comprende la sostituzione di un residuo acido con un residuo di amminoacido avente un valore  $P\alpha$  più basso.

3. Procedimento secondo la rivendicazione 2, in cui il residuo di amminoacido con il valore  $P\alpha$  più basso, è scelto dal gruppo costituito da Pro, Gly e Asn.

4. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui il procedimento comprende la sostituzione di un residuo di amminoacido con un residuo di ammino-

Biblioteca di P.A.

acido avente un valore  $P\beta$  più basso.

5. Procedimento secondo la rivendicazione 4, in cui il residuo di amminoacido con il valore  $P\beta$  più basso è scelto dal gruppo costituito da Pro, Gly e Asp.

6. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui detto analogo di polipeptide presenta almeno circa la stessa attività biologica del polipeptide progenitore.

7. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui detto polipeptide progenitore è una molecola di ormone paratiroideo (PTH), come illustrato nella figura 1A.

8. Procedimento secondo la rivendicazione 7, in cui detto analogo di polipeptide è 1 degli analoghi di PTH illustrati nelle figure 1B, 1C e 1D.

9. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui detto polipeptide progenitore è un analogo dell'irudina, come illustrato nella figura 2A.

10. Procedimento secondo la rivendicazione 9, in cui detto analogo di polipeptide è analogo B2 dell'irudina, come illustrato nella figura 2C.

11. Procedimento per fabbricare un dispositivo per elettrotrasporto per somministrare un agente polipeptidico attraverso una superficie del corpo

mediante elettrotrasporto, detto procedimento comprendente il provvedere una quantità terapeutica-mente efficace dell'agente polipeptidico in un serbatoio donatore del dispositivo di elettrotraspor-to, il procedimento caratterizzato dal fatto di:

provvedere l'agente polipeptidico nel serba-toio come un analogo di un polipeptide progenitore in cui detto polipeptide progenitore comprende un segmento di  $\alpha$ -elica e/ oppure un segmento di foglio  $\beta$ , il polipeptide analogo avente uno o più residui di amminoacido sostituiti rispetto a detto polipep-tide progenitore, per rompere detto segmento di  $\alpha$ -elica e/oppure foglio  $\beta$ .

12. Procedimento secondo la rivendicazione 11, in cui il procedimento comprende la sostituzione di un residuo acido con un residuo di amminoacido avente un valore di  $P\alpha$  più basso.

13. Procedimento secondo la rivendicazione 12, in cui il residuo di amminoacido con il valore  $P\alpha$  più basso è scelto dal gruppo costituito da Pro, Gly e Asn.

14. Procedimento secondo la rivendicazione 11, in cui il procedimento comprende la sostituzione di un residuo di amminoacido con un residuo di ammino-acido avente un valore di  $P\beta$  più basso.

15. Procedimento secondo la rivendicazione 14, in cui il residuo di amminoacido con il valore P $\beta$  più basso viene scelto dal gruppo costituito da Pro, Gly e Asp.

16. Procedimento secondo la rivendicazione 11, in cui detto polipeptide progenitore è una molecola di ormone paratiroideo (PTH), come illustrato nella figura 1A.

17. Procedimento secondo la rivendicazione 16, in cui detto analogo di polipeptide è uno degli analoghi di PTH, come illustrato nelle figure 1B, 1C e 1D.

18. Procedimento secondo la rivendicazione 11, in cui detto polipeptide progenitore è un analogo di irudina come illustrato nella figura 2A.

19. Procedimento secondo la rivendicazione 18, in cui detto analogo di polipeptide è l'analogo B2 dell'irudina, come illustrato nella figura 2C.

20. Analogo di ormone paratiroideo (PTH) comprendente la sequenza di amminoacidi riportata nelle figure 1B, 1C, o 1D.

PER INCARICO

Ing. Marco BAIAN  
N. BENT. ALBO 659  
in proprio e per gli altri



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

*Handwritten signature*  
Ing. Marco BOLDAN  
N. Iscritt. ALBO 559  
in proprio e per gli altri



TO 96A000495

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

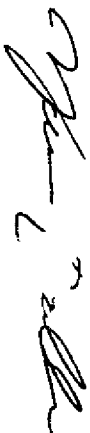
FIG. 2A

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

FIG. 2B

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

FIG. 2C

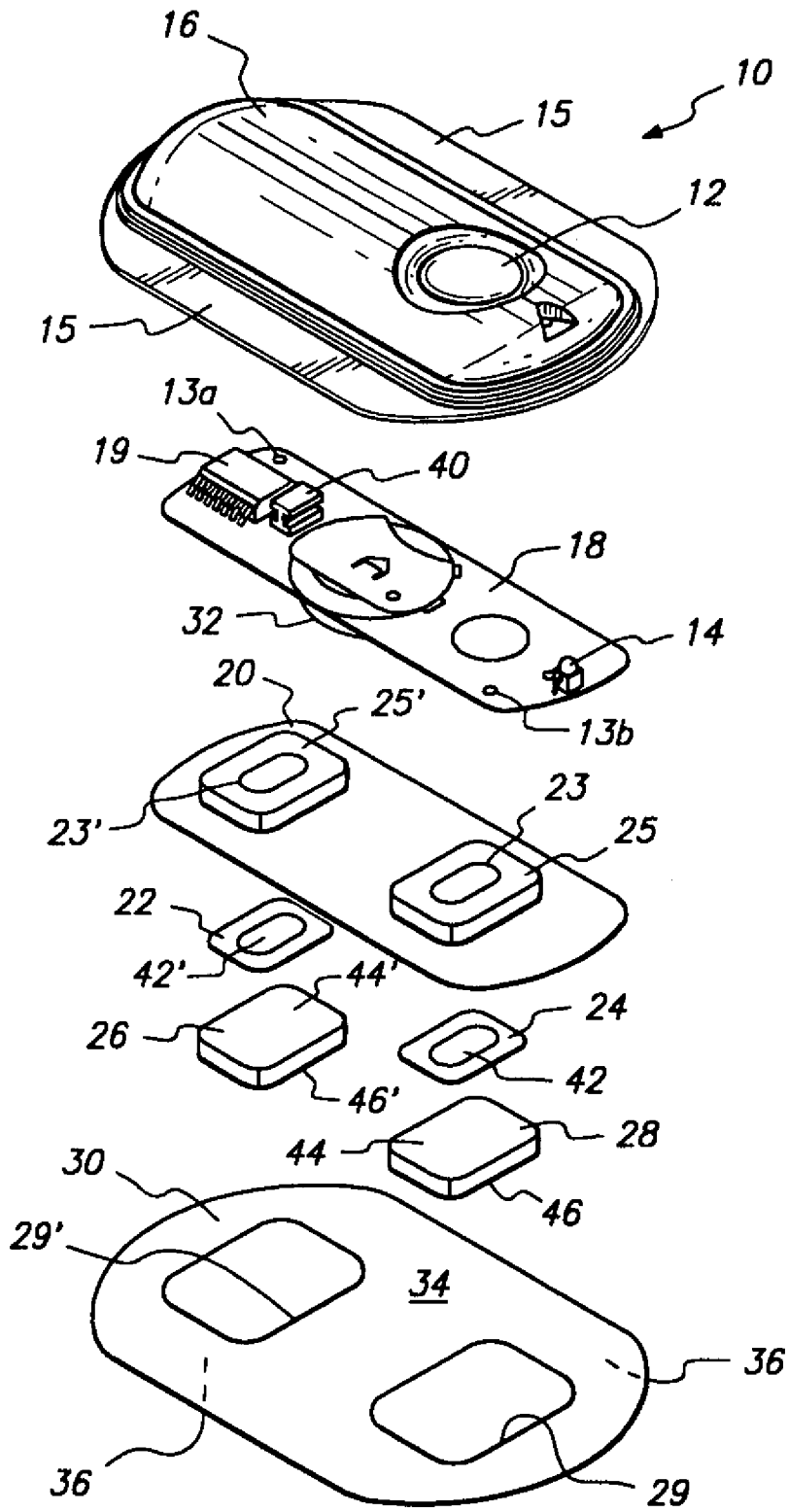
  
ING. MARIO BALDANI  
N. 117 ALBO 559  
in proprio e per gli altri



TO 964300495

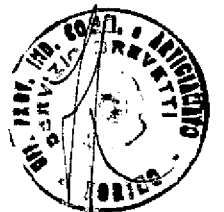
TO 96A000495

FIG. 3



Per incarico di ALZA CORPORATION

TOYOTA MOTOR CORPORATION  
Inventor: [Signature]  
Attorney: [Signature]



*[Handwritten signature and notes]*

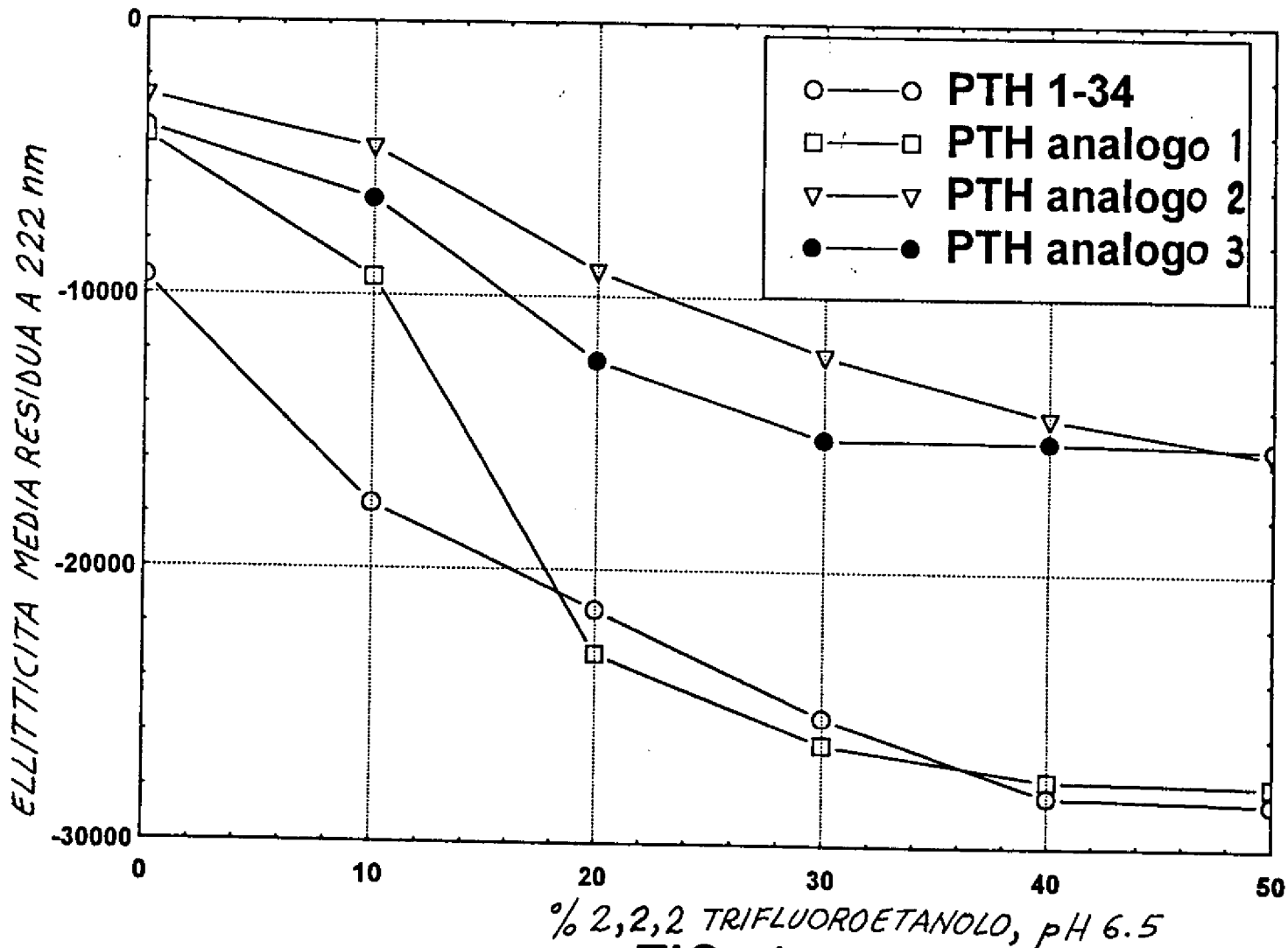


FIG. 4

TO 96A900495



*[Handwritten signature and notes]*  
INTELLIGIBILITÀ  
INTELLIGIBILITÀ  
INTELLIGIBILITÀ

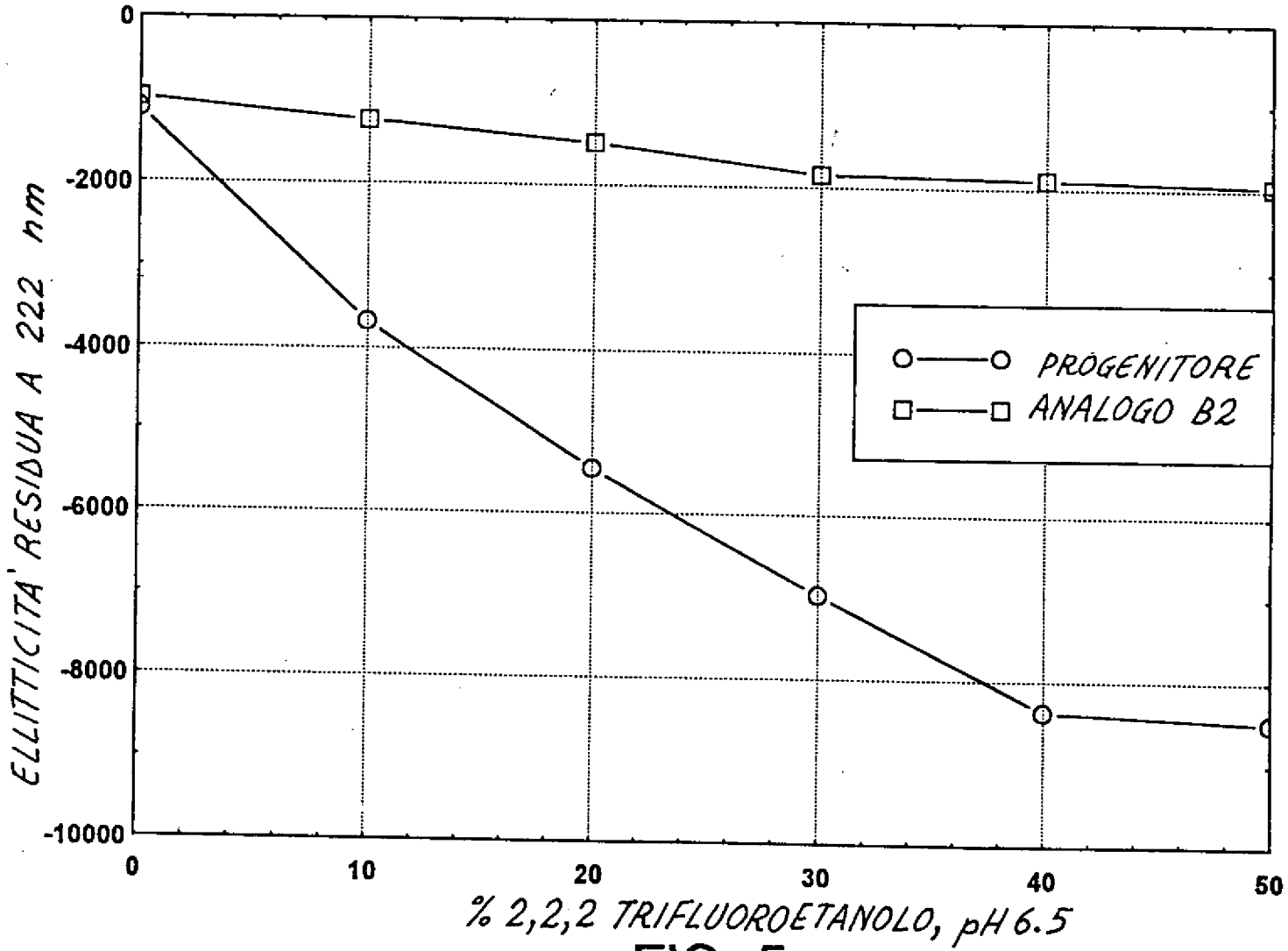


FIG. 5

10 96A000495

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



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

FIG. 2A

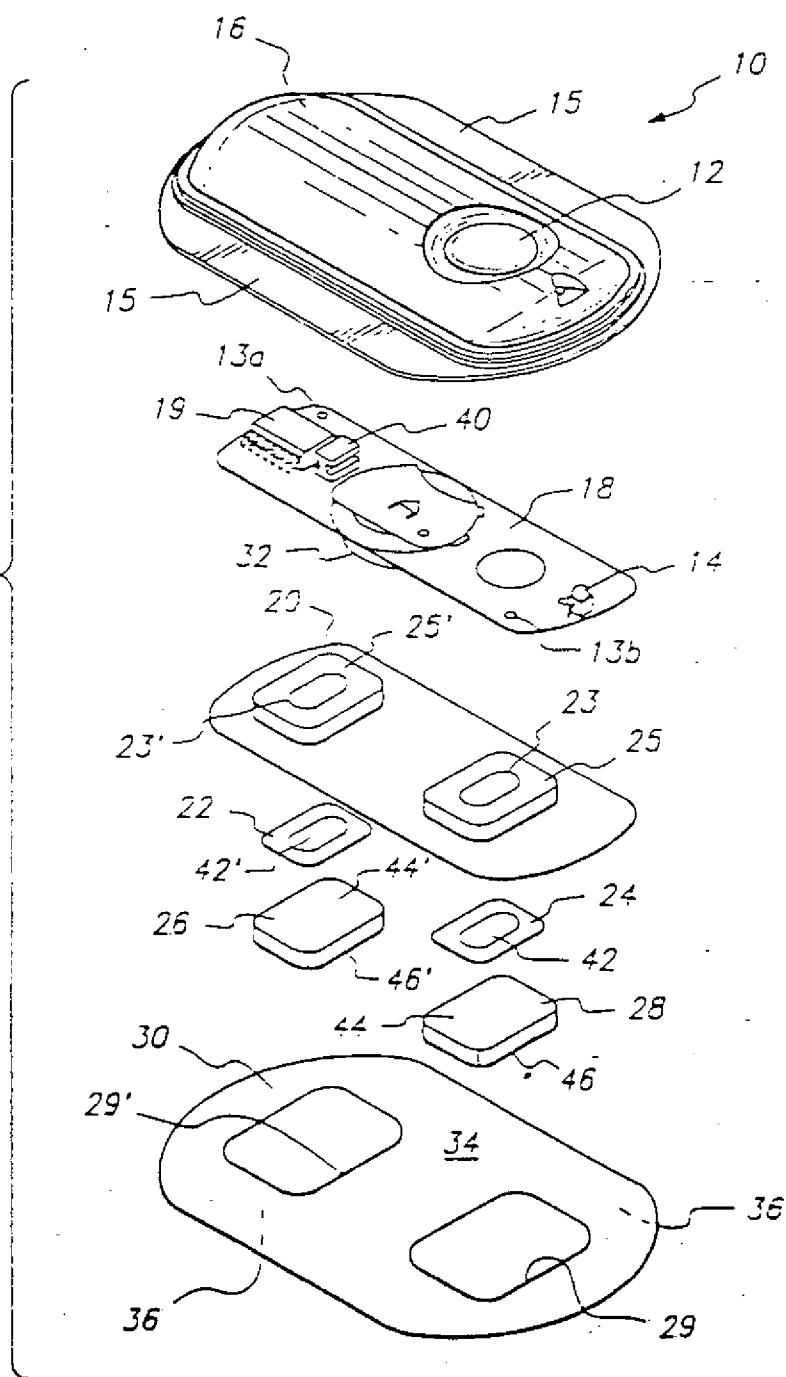
(D-Phe)-Pro-Arg-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu

FIG. 2B

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

FIG. 2C

FIG. 3



Determinazione della tendenza all' -elica degli analoghi di PTH

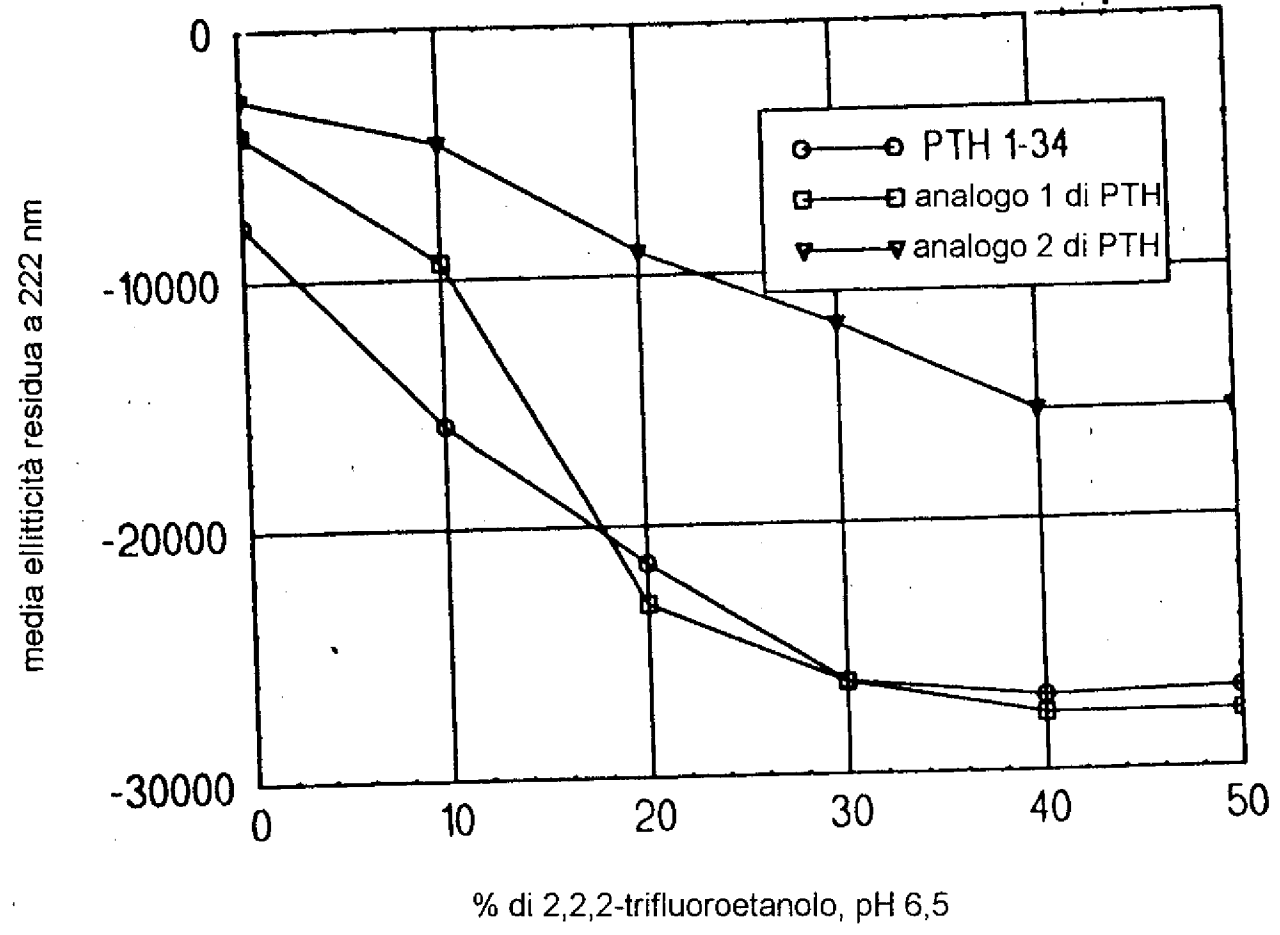


FIG. 4

PER TRADUZIONE CONFORME  
Ing. Mauro MARCHITELLI  
~~Autografo~~ 507  
(in proprio e per gli altri)