



MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

NUMERO DE PUBLICATION : 1009704A3

NUMERO DE DEPOT : 09600517

Classif. Internat. : C07K A61K

Date de délivrance le : 01 Juillet 1997

**Le Ministre des Affaires Economiques,**

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

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

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

Vu le procès verbal dressé le 06 Juin 1996 à 15H00 à l'Office de la Propriété Industrielle

**ARRETE :**

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

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

un brevet d'invention d'une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : MODIFICATION DE MEDICAMENTS A BASE DE POLYPEPTIDE POUR AUGMENTER UN FLUX D'ELECTROTRANSPORT.

INVENTEUR(S) : Holladay Leslie A, 1200 Dale Avenue #96, Mountain View, California  
94040 (US)

PRIORITE(S) 06.06.95 US USA 466610

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

Bruxelles, le 01 Juillet 1997  
PAR DELEGATION SPECIALE :



L. WUYTS  
CONSEILLER

**"Modification de médicaments à base de polypeptide  
pour augmenter un flux d'électrotransport"**

L'invention est relative d'une manière générale à une délivrance de médicament par électrotransport, et plus particulièrement à une délivrance de médicament par électrotransport transdermique. D'une manière spécifique, l'invention est relative à un procédé pour améliorer un flux d'électrotransport de médicaments à base de polypeptide par remplacement de certains acides aminés dans le polypeptide.

**ARRIERE-PLAN DE L'INVENTION**

La délivrance transdermique (c'est-à-dire à travers la peau) d'agents thérapeutiques (par exemple de médicaments) est une voie d'administration de médicament importante. La délivrance transdermique de médicament contourne la dégradation gastro-intestinale et le métabolisme hépatique. La plupart des systèmes commerciaux de délivrance transdermique de médicament (par exemple des emplâtres sur la peau à base de nitroglycérine, de scopolamine, d'oestradiol, de testostérone) délivrent le médicament par diffusion passive. Le médicament diffuse depuis un réservoir situé dans l'emplâtre jusqu'à dans la peau du patient au moyen d'un gradient de concentration qui existe, c'est-à-dire que le médicament diffuse de la concentration élevée dans le réservoir d'emplâtre à la concentration faible du corps du patient. Le flux du médicament à travers une peau de patient est déterminé par un certain nombre de facteurs comprenant le coefficient de partage du médicament et ses caractéristiques de solubilité. Ce type de système de délivrance (c'est-à-dire un emplâtre) procure une

délivrance lente, mais contrôlée, du médicament à un courant sanguin du patient. La délivrance transdermique de médicament est une voie d'administration spécialement attractive pour des médicaments ayant un indice thérapeutique étroit, une courte demi-vie et une activité puissante.

Malheureusement, beaucoup de médicaments montrent des flux de diffusion transdermique qui sont trop faibles pour être thérapeutiquement efficaces. C'est spécialement vrai pour des médicaments de poids moléculaire élevé, comme des polypeptides et des protéines. Pour augmenter le flux de médicament transdermique, une technique développant une application de faibles niveaux de courant électrique appliqué à travers un réservoir de médicament en contact avec une surface de corps de patient (par exemple la peau) a été utilisée. Cette technique a été appelée de plusieurs noms, y compris l'ionophorèse et, plus récemment, l'électrotransport.

L'électrotransport est un procédé par lequel le transport transdermique d'espèces ou d'agents thérapeutiques est obtenu par l'utilisation d'un courant électrique comme force motrice, c'est-à-dire par l'application d'un courant électrique au patient à travers un réservoir contenant l'agent. En tant que tel, l'électrotransport est un procédé plus contrôlable qu'une délivrance de médicament transdermique passive, puisque l'amplitude, le réglage dans le temps et la polarité du courant électrique appliqué sont aisément réglés en utilisant des composants électriques standards. En général, le flux de médicament par électrotransport peut être de 50 % à plusieurs ordres de grandeur plus grand qu'un flux transdermique passif du même médicament.

Dans des dispositifs d'électrotransport actuellement connus, au moins deux électrodes sont

utilisées. Deux de ces électrodes sont disposées en contact électrique intime avec une même partie de la surface de corps du patient (par exemple la peau). Une électrode, appelée l'électrode active ou donneuse, est  
5 l'électrode à partir de laquelle l'agent thérapeutique (par exemple ionique ou ionisable), le précurseur de médicament ou le médicament est délivré dans le corps par électrotransport. L'autre électrode, appelée la contre-électrode ou électrode de retour, sert à fermer  
10 le circuit électrique à travers le corps. Conjointement à la surface de corps du patient mise en contact avec les électrodes, le circuit est complété par une connexion des électrodes à une source d'énergie électrique, par exemple une batterie.

15 En fonction de la charge électrique de l'espèce à délivrer par voie transdermique, soit l'anode soit la cathode peut être l'électrode "active" ou donneuse. Si, par exemple, la substance ionique à délivrer dans le corps est chargée positivement (c'est-  
20 à-dire un cation), alors l'anode est l'électrode active et la cathode sert à compléter le circuit. D'autre part, si la substance ionique à délivrer est chargée relativement négativement (c'est-à-dire un anion), alors l'électrode cathodique est l'électrode active et l'élec-  
25 trode anodique est la contre-électrode.

En variante, à la fois l'anode et la cathode peuvent être utilisées pour délivrer des médicaments de charge appropriée dans le corps. Dans un tel cas, les deux électrodes sont considérées comme étant des élec-  
30 trodes actives ou donneuses. C'est-à-dire que l'électrode anodique peut délivrer des agents chargés positivement dans le corps tandis que l'électrode cathodique peut délivrer des agents chargés négativement dans le corps.

35 Les dispositifs d'électrotransport existants demandent d'une manière générale un réservoir ou source

de l'agent thérapeutique qui est à délivrer dans le corps par électrotransport ; l'agent est avantageusement sous la forme d'une solution liquide d'une espèce ionisée ou ionisable, ou un précurseur de cette espèce.

5 Comme exemples de tels réservoirs ou sources, on peut citer une poche telle que décrite dans le US-A-4.250.878, un corps de gel préformé, comme décrit dans le US-A-4.382.529, et un récipient en verre ou en matière plastique contenant une solution liquide du

10 médicament, comme décrit dans le US-A-4.722.726. De tels réservoirs de médicament sont électriquement connectés à l'anode ou à la cathode du dispositif d'électrotransport pour former une source fixe ou renouvelable d'un ou de plusieurs des espèces ou agents

15 souhaités.

Le terme "électrotransport", tel qu'utilisé ici, fait référence d'une manière générale à la délivrance électriquement assistée d'un agent thérapeutique, que l'agent à délivrer soit complètement chargé (c'est-à-dire ionisé à 100%), complètement non chargé ou

20 partiellement chargé et partiellement non chargé. L'agent ou espèce thérapeutique peut être délivré par électromigration, électro-osmose, électroporation ou une quelconque combinaison de ces méthodes. L'électro-osmose en général résulte de la migration d'un solvant

25 liquide dans lequel l'espèce est contenue, à la suite de l'application d'une force électromotrice au réservoir d'espèce thérapeutique. L'électroporation développe la formation de pores existant de manière transitoire qui

30 apparaissent lors d'une application de courant électrique à la peau.

La délivrance par électrotransport transdermique de peptides, de polypeptides et de protéines est d'un intérêt particulier étant donné les problèmes

35 rencontrés par des voies d'administration de médicament plus communes, comme l'administration par voie orale.

Les molécules de polypeptides et de protéines sont hautement susceptibles d'une dégradation par des enzymes protéolytiques dans le tractus gastro-intestinal et elles sont soumises à un métabolisme hépatique accentué lorsqu'elles sont prises oralement. Les polypeptides et protéines demandent habituellement une administration parentérale pour obtenir des niveaux thérapeutiques dans le sang du patient. Les techniques d'administration parentérale les plus conventionnelles sont les injections hypodermiques et l'administration par voie intraveineuse. Cependant, les polypeptides et protéines ont une action courte, de façon inhérente, dans leur activité biologique, ce qui demande de fréquentes injections, souvent plusieurs fois par jour, pour maintenir les niveaux thérapeutiquement efficaces nécessaires. Les patients trouvent fréquemment ce régime de traitement comme étant incommode et douloureux, avec un risque associé par exemple d'infection.

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

Une délivrance par électrotransport de polypeptides et de protéines a également rencontré des difficultés techniques. Par exemple, l'eau est le solvant liquide préféré pour former la solution du médicament délivré par électrotransport, à la suite de son excellente biocompatibilité. Malheureusement, plusieurs polypeptides et protéines ne sont pas stables en présence d'eau (c'est-à-dire qu'ils deviennent hydrolysés, oxydés, dénaturés ou dégradés d'une autre manière). La peau contient aussi des enzymes protéolytiques qui peuvent dégrader le polypeptide/protéine lorsqu'il est délivré par voie transdermique. De plus, certains polypeptides/protéines, en particulier ceux qui ne sont pas naturels à l'animal en traitement, peuvent causer des réactions de la part de la peau, par exemple une sensibilisation ou une irritation.

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

Un certain nombre d'approches (autres que simplement augmenter les niveaux appliqués de courant d'électrotransport) ont été utilisées pour augmenter le flux d'électrotransport transdermique de médicaments à base de polypeptide et de protéine. Une approche

développe l'utilisation d'activeurs de flux, comme des agents tensioactifs ioniques. Voir par exemple le US-A-4.722.726. Une autre approche utilise des cosolvants autres que justement de l'eau pour activer le flux d'électrotransport. Voir par exemple la EP-A-0 278 473. Une autre approche encore développe une rupture mécanique de la couche externe (c'est-à-dire la couche cornée) de la peau avant la délivrance par électrotransport. Voir le US-A-5.250.023.

10 D'autres approches pour accroître le flux de médicament par électrotransport transdermique développent la création d'un promédicament ou d'un analogue du médicament intéressant et l'électrotransport du promédicament ou de l'analogue modifié. Par exemple, la WO-15 92/12999 décrit une délivrance d'insuline sous la forme d'un analogue d'insuline ayant une tendance réduite à s'auto-associer (les formes apparemment associées d'insuline présentes dans des compositions pharmaceutiques conventionnelles réduisent la délivrance transdermique de l'insuline). Les analogues sont créés par substitution de l'acide aspartique (Asp) ou de l'acide glutamique (Glu) à d'autres radicaux d'acide aminé dans des positions sélectionnées le long de la chaîne polypeptidique de l'insuline. La WO 93/25197 décrit une 20 délivrance de médicaments à la fois peptidiques et non peptidiques, sous la forme de complexes d'agent pharmaceutique-modificateur ou de promédicaments dans lesquels un agent modificateur chimique (par exemple un fragment chargé) est lié de manière covalente à l'agent pharmaceutique parental. La liaison covalente est brisée 30 après que l'agent est délivré dans le corps, en libérant ainsi l'agent parental.

Tandis que les problèmes associés à la délivrance par électrotransport de protéines et de polypeptides ont été reconnus et qu'il y a eu des tentatives 35 pour améliorer le flux d'électrotransport de médicaments

à base de polypeptide et de protéine, il existe encore un besoin de procurer un procédé pour obtenir un flux d'électrotransport transdermique plus élevé de polypeptides et de protéines.

5 C'est un aspect de la présente invention de prévoir un procédé permettant d'augmenter le flux d'électrotransport de médicaments, et plus spécifiquement de médicaments à base de polypeptide et de protéine.

10 Un autre aspect de l'invention consiste à prévoir un procédé pour augmenter le flux d'électrotransport transdermique de médicaments à base de polypeptide et de protéine. En tant que tel, le procédé suivant l'invention permet une délivrance par électrotransport de plusieurs polypeptides et protéines qui  
15 jusqu'à présent ne pouvaient pas être délivrés par voie transdermique par électrotransport à des vitesses thérapeutiquement efficaces.

Ces aspects et d'autres ressortiront, pour les  
20 personnes spécialisées dans la délivrance par électrotransport, de la description détaillée qui suit de la présente invention. La présente invention est relative à des procédés de conversion en dérivés de médicaments à base de polypeptide et de protéine de façon à améliorer ou accroître le flux d'électrotransport du médicament. Le procédé suivant la présente invention est  
25 caractérisé par la fourniture du polypeptide ou protéine intéressant sous la forme d'un analogue synthétique qui a des propriétés améliorées de flux d'électrotransport, comme une charge positive augmentée au pH où l'électrotransport se produit, une mobilité électrophorétique  
30 augmentée et/ou une hydrophilie augmentée.

L'analogue a de préférence au moins la même bioactivité que le polypeptide ou protéine parental, et de préférence il a une bioactivité plus grande que le  
35 parent. L'analogue diffère du parent à la suite d'une

substitution de radicaux d'histidine à un ou plusieurs radicaux d'acide aminé qui ont une chaîne latérale polaire, mais non chargée. Les radicaux d'histidine montrent une charge positive à des gammes de pH qui sont typiquement rencontrées pendant une délivrance par électrotransport anodique. Les radicaux d'acide aminé substituables préférés comprennent la glutamine, l'asparagine et la thréonine. Parmi celles-ci, la glutamine est substituée de préférence.

Suivant un autre aspect de l'invention, on prévoit un analogue synthétique ayant un flux d'électrotransport accru en comparaison de son médicament à base de polypeptide ou protéine parental. Le médicament à base de polypeptide ou de protéine parental comporte au moins un radical d'acide aminé à chaîne latérale polaire mais non chargée, et l'analogue comporte au moins un de ces radicaux substitués par un radical d'histidine. L'analogue montre de préférence au moins environ la même activité biologique que le médicament à base de protéine ou de polypeptide parental et de préférence il a la même distribution de charge globale que le parent au pH physiologique.

D'autres avantages et une évaluation plus complète des adaptations spécifiques, des variantes de composition et des attributs physiques de la présente invention ressortiront de la description détaillée qui suit et des dessins.

La figure 1 représente une vue schématique d'un dispositif de délivrance de médicament par électrotransport suivant la présente invention.

La présente invention est relative largement à un procédé pour augmenter le flux d'électrotransport d'agents thérapeutiques, et plus particulièrement le flux d'électrotransport transdermique de polypeptides et de protéines. La présente invention est également relative à des formulations d'agent thérapeutique et à

des systèmes de délivrance par électrotransport prévus pour mettre en oeuvre les procédés décrits ici.

La présente invention est caractérisée par une capacité d'améliorer le flux d'électrotransport de médicaments à base de polypeptide et de protéine pour  
5 une délivrance par électrotransport, par augmentation à la fois de l'hydrophilie et de la mobilité électrophorétique au pH d'électrotransport, tout en retenant une distribution de charge globale au pH approximativement  
10 physiologique, et de préférence en retenant également au moins environ la même activité biologique que le médicament à base de polypeptide ou de protéine.

Suivant un aspect, la présente invention prévoit un analogue synthétique d'un médicament à base  
15 de polypeptide biologiquement actif, qui présente des caractéristiques d'électrotransport accrues en comparaison du médicament. Tel qu'utilisé ici, le terme "polypeptide" est à interpréter largement comme incluant n'importe quels radicaux d'acide aminé liés par des  
20 liaisons peptidiques, c'est-à-dire des peptides, des polypeptides et des protéines. Tel qu'utilisé ici, le terme "analogue" est à interpréter largement comme se référant à une mutéine, un dérivé structurel d'un médicament à base de polypeptide parental, ou un polypeptide modifié dans lequel au moins un radical d'acide aminé a été remplacé dans le médicament à base de polypeptide parental par un radical d'acide aminé différent. Le médicament parental peut être dérivé de  
25 sources naturelles ou totalement synthétisé par des moyens chimiques ou biochimiques. Il faut entendre que le médicament parental peut être une séquence polypeptidique qui apparaît naturellement ou qu'il peut lui-même avoir des différences structurelles par rapport à un polypeptide apparaissant naturellement. Les expressions "médicament à base de polypeptide", "agent polypeptidique" ou "polypeptide pharmaceutique" font tous  
30  
35

référence, lorsque ces expressions sont utilisées ici, à un polypeptide quelconque qui a une activité physiologique, c'est-à-dire une bioactivité.

Suivant cet aspect de l'invention, comme  
5 médicaments à base de polypeptide préférés, on peut citer ceux qui contiennent au moins un radical d'acide aminé ayant une chaîne latérale polaire, mais non chargée. L'analogue suivant la présente invention est synthétisé en remplaçant au moins un de ces radicaux par  
10 un radical d'histidine (His). Les médicaments à base de polypeptide spécifiquement préférés sont ceux qui contiennent au moins un radical de glutamine (Gln), de thréonine (Thr) ou d'asparagine (Asn). Un ou plusieurs de ces radicaux sont remplacés par un radical d'histidine (His) dans l'analogue suivant la présente invention.  
15 Le plus préféré est le remplacement d'un ou de plusieurs radicaux de glutamine sur le médicament à base de polypeptide par des radicaux d'histidine.

L'analogue suivant la présente invention  
20 montre de préférence une activité biologique au moins approximativement la même que celle du médicament à base de polypeptide non modifié qui est intéressant, et, d'une manière encore plus préférable, il présente une bioactivité plus grande que le médicament, mais il n'a  
25 pas d'hydrophilie et de mobilité électrophorétique augmentées par rapport au médicament parental. Tel quel, l'analogue suivant la présente invention montre un flux d'électrotransport transdermique accru par rapport au médicament parental, c'est-à-dire le polypeptide non  
30 modifié.

La présente invention est utile pour augmenter la charge positive globale sur un polypeptide qui est fourni à partir d'un réservoir anodique d'un dispositif de délivrance par électrotransport. En parlant d'une  
35 manière générale, la gamme de pH d'une formulation de réservoir donneur anodique contenant le polypeptide

analogue est de l'ordre d'environ 3,5 à environ 8, et de préférence d'environ 5 à 6. A ces gammes de pH, le remplacement de Gln, Asn ou Thr par His a pour effet une hydrophilie augmentée de l'analogue par rapport au médicament parental ou au polypeptide non modifié étant donné la charge positive sur le noyau d'imidazole et une mobilité électrophorétique augmentée étant donné la charge positive globale supérieure. Le résultat est que l'analogue montre un flux d'électrotransport transdermique augmenté par rapport au médicament parental. En même temps, au pH physiologique, c'est-à-dire à un pH égal à 7,4, l'analogue retient la charge, la liaison d'hydrogène et les caractères d'hydrophobie du médicament à base de polypeptide parental. Au pH neutre, la chaîne latérale d'imidazole de His n'est pas chargée et donc le remplacement de Gln, Asn ou Thr par His ne diminue pas l'activité biologique de l'analogue d'une manière appréciable, c'est-à-dire que la substitution n'altère pas l'affinité de l'analogue pour son récepteur recherché.

Il est en outre envisagé que le nombre de substitutions de His à Gln, Asn ou Thr est limité seulement par la charge globale souhaitée au pH utilisé dans le système d'électrotransport. Cependant, le nombre de substitutions ne peut pas être nombreux au point que l'analogue soit reconnu comme une protéine étrangère par le système immunitaire du patient. Alors qu'il n'y a pas de règle absolue pour déterminer le nombre de substitutions avant qu'un polypeptide ou une protéine soit considéré comme "étranger", plus l'analogue est proche du parent en ce qui concerne la structure/séquence d'acides aminés (c'est-à-dire moins il y a de substitutions), moins il y aura probabilité que le polypeptide/protéine soit considéré par le système immunitaire du corps comme étant étranger.

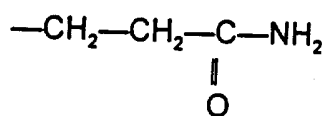
Typiquement, des polypeptides et des protéines, y compris leurs analogues, ont dans le cadre de la présente invention des poids moléculaires de l'ordre d'environ quelques centaines de daltons (par exemple pour un tripeptide) jusqu'à environ 30.000 daltons. Comme exemples spécifiques de médicaments à base de polypeptide, de protéine et de macromolécule de cet ordre, on peut citer, sans limitations, des CSF, GHRH, de l'insuline, de la calcitonine, des endorphines, de l'érythropoïétine, de l'hormone parathyroïdienne et des agonistes, GHRF, de l'insulintropine, de l'octréotide, des hormones pituitaires (par exemple HGH, HMG, de l'acétate de desmopressine, etc.), des lutéoïdes folliculaires, de l' $\alpha$ ANF, des facteurs de croissance, comme du facteur libérant un facteur de croissance (GFRF), de la somatostatine, du peptide auriculaire natriurétique, de la somatotropine, du facteur de croissance dérivé des plaquettes, de l'asparaginase, de la chymopapaïne, de la cholecystokinine, de la gonadotropine chorionique, de la corticotropine (ACTH), du facteur de croissance épidermique, de l'érythropoïétine, du glucagon, de l'hirulog, de l'hyaluronidase, des interférons, des facteurs de croissance du type insuline (par exemple IGF-1), des interleukines, des ménotropines (urofollitropine (FSH) et LH), de l'oxytocine, de la streptokinase, un activateur de plasminogène tissulaire, de l'urokinase, de la vasopressine, de la desmopressine, des analogues d'ACTH, de l'ANP, des inhibiteurs de libération d'ANP, des antagonistes d'angiotensine II, des agonistes d'hormone antidiurétique, des antagonistes d'hormone antidiurétique, des CD4, de la cérédase, des fragments de FAB, des supprimeurs de peptide IgE, du neuropeptide Y, des facteurs neurothrophiques, des peptides opiacés, des antagonistes d'hormone parathyroïdienne, de la protéine C, de la protéine S, des inhibiteurs de rénine, de la  $\alpha$ -1-thymosine, des thrombolytiques, du TNF, des vaccins,

des analogues d'antagoniste de vasopressine, de l'anti-trypsinase  $\alpha$ -1 (recombinante), et du  $\beta$ -TGF.

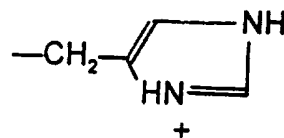
Les exemples illustratifs de médicaments à base de polypeptide, qui sont bien appropriés pour une modification suivant la présente invention, sont un facteur de stimulation de colonies de granulocytes (G-CSF), un facteur qui stimule la production de granulocytes, en particulier de neutrophiles, une hormone parathyroïdienne (PTH), un facteur régulateur dans le contrôle homéostatique du métabolisme du calcium et du phosphate et utilisé pour traiter l'ostéoporose, une hormone de libération d'hormone lutéinisante (LHRH) et ses analogues, et une hormone libérant une hormone de croissance (GHGH) et ses analogues, qui présentent un flux transdermique accru.

Un remplacement de Gln, Asn ou Thr par His suivant la présente invention est considéré comme une modification ou conversion en dérivé "conservatrice" d'un polypeptide ou protéine. Par cela on veut dire que l'hydrophobie, la charge globale au pH physiologique, le volume et les capacités de liaison d'hydrogène du polypeptide ou protéine parental sont préservés dans l'analogue. La substitution préférée de His à Gln est la plus conservatrice des trois substitutions possibles puisque les capacités de liaison d'hydrogène, charges au pH de 7 et volumes de chaîne latérale de l'analogue ainsi synthétisé sont virtuellement identiques au composé parental.

Les structures de chaîne latérale des radicaux Gln et His sont représentées ci-dessous :



Gln



His

Les chaînes latérales des radicaux Gln et His révèlent une similarité considérable dans les géométries de la capacité de liaison d'hydrogène, c'est-à-dire que le remplacement de Gln par His n'altère pas de manière appréciable la capacité de fixation d'hydrogène de la chaîne latérale. En fonction des angles de liaison entre le groupe amide plane, le  $\text{CH}_2\beta$  et le  $\text{CH}_2\alpha$ , des liaisons d'hydrogène développées par la chaîne latérale Gln peuvent aussi être réalisées par une chaîne latérale His.

De plus, les caractères hydrophobes des radicaux His (état non chargé) et Gln sont très semblables. Voir Tanford et coll., J. Biol. Chem., vol. 246 (1971) 2211-2217 où les caractères hydrophobes des chaînes latérales d'acides aminés à la fois dans l'eau et dans différents alcools sont mesurés, et des énergies exemptes de transfert très semblables pour His et Gln ont été trouvées dans des concentrations modérées de dioxane.

Les analogues suivant la présente invention peuvent être synthétisés de nombreuses manières connues et courantes dans la technique, et par conséquent cela ne sera pas décrit en détail ici. Ces procédés comprennent une synthèse en phase solide de novo des polypeptides, des procédés chimiques à l'état humide et des procédés biotechnologiques.

Une synthèse de protéine en phase solide utilise la fixation du premier acide aminé de la séquence souhaitée par son groupe carboxyle à une résine insoluble. Une fois que le produit souhaité est obtenu, la séquence peptidique est segmentée à partir de la résine. Voir par exemple R.B. Merrifield et coll., Biochemistry, vol. 21 (1981) 5020, M. Bodanszky, "Principles of Peptide Synthesis" Akad. Verlag (1984), J.M. Stewart et coll. "Solid Phase Peptide Synthesis," Freeman (1969), dont les descriptions sont incorporées

ici à titre de référence. D'autres procédés synthétiques sont également connus. Par exemple, les analogues décrits ici peuvent être préparés par le procédé d'une synthèse peptidique multiple simultanée. Voir par exemple Houghten, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 82 (1985) 5131-5135, Houghten et coll., Peptide Chemistry, (1987) 295-298 et US-A-4.631.211, dont les descriptions sont incorporées ici à titre de référence.

Les analogues peuvent aussi être synthétisés par programmation d'un appareil synthétiseur de peptide commercial, de telle façon que certains jusqu'à tous les radicaux de glutamine dans la séquence d'acides aminés d'un médicament à base de polypeptide ou de protéine concerné soient remplacés par des radicaux d'histidine.

Les analogues suivant la présente invention peuvent aussi être synthétisés par des techniques de génie génétique connues, comme des systèmes d'expression de recombinant. Une mutagénèse in vitro peut être utilisée pour altérer le gène du polypeptide parental par remplacement des bases appropriées dans le gène au site approprié par d'autres pour coder le substitut souhaité du radical d'acide aminé. Par exemple, le remplacement de certains jusqu'à tous les codons pour Gln par le codon pour His demande seulement un remplacement d'une simple base du A ou G dans la dernière position du codon Gln par un U ou C. Le gène codant l'analogue souhaité est alors inséré dans un vecteur d'expression approprié qui, lorsqu'il est transféré à un organisme hôte approprié, par exemple E.coli, Bacillus ou une levure, engendre l'analogue souhaité. L'analogue exprimé est alors isolé des cellules ou du bouillon de culture en fonction de ce que l'analogue exprimé est sécrété à partir des cellules ou non. Dans l'analogue exprimé, certains à tous les radicaux de glutamine n'apparaissent pas dans la séquence polypeptidique, mais en ces endroits de la séquence il y a, substitués, des

radicaux d'histidine. Des procédés d'identification et d'isolement de gènes codant des peptides et protéines intéressantes analogues ou de construction de tels gènes et d'expression de ceux-ci dans des systèmes d'hôtes  
5 sont bien compris et développés. Ces procédés sont décrits dans des brevets et dans d'autres littératures. Voir par exemple US-A-4.431.739 et 5.013.653 et Sambrook et coll., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2e. Ed., Cold Spring Harbor (1989), "ACS Symposium Series,  
10 477: Expression Systems and Processes of rDNA Products", R.T. Hatch et coll., American Chemical Society (1991), R. Seetharam et coll., "Purification and Analysis of Recombinant Proteins" dans "Bioprocess Technology", vol. 12, Marcel Dekker (1991), dont les descriptions sont  
15 incorporées ici à titre de référence.

La structure altérée des gènes peut aussi être construite par des techniques synthétiques automatisées, par exemple par le procédé au phosphoramidate de synthèse en phase solide d'oligonucléotides. Voir par exemple  
20 S.L. Beaucage et coll., Tetrahedron Lett., vol. 22 (1981) 1859-1862 et M.D. Metteneci et coll., J. Am. Chem. Soc. vol. 103 (1981) 3185-3191, dont les descriptions sont incorporées ici à titre de référence.

Tandis que des exemples illustratifs d'analogues envisagés par la présente invention sont donnés ci-après pour G-CSF, une hormone parathyroïdienne et une hormone libérant une hormone de croissance humaine, les enseignements suivants s'appliquent à n'importe quels autres protéines ou polypeptides biologiquement actifs  
25 qui contiennent des radicaux substituables.

G-CSF (un polypeptide à 174 radicaux d'acides aminés) est connu pour comporter 12 radicaux Gln qui se trouvent aux positions 11, 20, 25 et 32 dans l'hélice A, 107, 119 et 120 dans l'hélice C, 145, 158 et 173 dans  
35 l'hélice D, et 131 et 134 dans la région de boucle. Un remplacement de l'un ou de plusieurs jusqu'à et y

compris tous les Gln de G-CSF par des radicaux His produit un analogue qui montre une activité spécifique proche de celle du G-CSF non modifié ou parental. Comme exemples d'analogues de G-CSF suivant la présente invention ont peut citer : His(11)G-CSF, His(11), His(20) G-CSF ; voir SEQ ID Nos. 1 et 2.

L'hormone parathyroïdienne (PTH), une protéine ayant un poids moléculaire d'environ 9.500 daltons, comporte une séquence polypeptidique d'environ 34 radicaux d'acides aminés depuis la terminaison N qui montre une totale activité biologique. La séquence de 34 acides aminés est rapportée comme ayant deux radicaux de glutamine aux positions 5 et 29 de la chaîne polypeptidique. Comme dans le cas de G-CSF, il est possible d'utiliser la présente invention pour créer des mutations aux codons 5 et 29 du gène d'hormone parathyroïdienne ce qui a pour effet qu'un ou deux des radicaux Gln sont remplacés par des radicaux His. De tels analogues suivant la présente invention comprennent : His(5)PTH, His(5), His(29)PTH ; voir SEQ ID Nos. 3 et 4.

L'hormone libérant une hormone de croissance humaine (h-GHRH) est un polypeptide de 44 acides aminés contenant des radicaux de glutamine aux positions 16, 24, 30, 31 et 36. Comme dans le cas du G-CSF, un gène de h-GHRH peut être préparé en induisant une mutagénèse spécifique de site dans le gène h-GHRH aux codons spécifiant les positions 16, 24, 30, 31, 36 ou une combinaison quelconque de deux ou plusieurs positions qui préservent ou augmentent une activité biologique. De préférence, un mutagénèse dirigée sur un oligonucléotide peut être employé pour réaliser un gène de h-GHRH analogue qui code un analogue ayant une activité de h-GHRH, mais ayant Gln 31 et 36 changés en His 31 et 36, à savoir His(31), His(36) h-GHRH ; voir SEQ ID No.5.

Les analogues de la présente invention sont particulièrement bien appropriés pour une délivrance par

électrotransport à travers une surface de corps ou membrane (par exemple une peau) d'un animal (par exemple un être humain ou d'autres mammifères, tels que des bovins, des chevaux, des cochons, etc.). Donc, la présente invention procure un procédé d'administration d'un analogue à un patient par électrotransport, comprenant les étapes de prévision d'un polypeptide, sous la forme d'un analogue synthétique, dans un réservoir donneur adapté pour être placé en relation de transmission d'analogue avec une surface de corps du patient, et d'application d'un champ électrique au réservoir pour transporter l'analogue à travers la surface de corps par électrotransport. Le flux d'électrotransport (par exemple transdermique) de l'analogue est plus élevé que le flux d'électrotransport (par exemple transdermique) du médicament parental dans des conditions semblables (c'est-à-dire courant d'électrotransport appliqué, pH, concentration du médicament, etc.).

Le procédé suivant la présente invention peut être effectué en utilisant un dispositif de délivrance par électrotransport transdermique alimenté en courant électrique et comportant un réservoir donneur, un réservoir contenant l'analogue et configuré et dimensionné pour être placé en relation de transmission d'analogue avec la peau, et une source de courant électrique. La source de courant applique un courant électrique au réservoir qui provoque une délivrance par électrotransport de l'analogue depuis le réservoir d'agent et à travers la surface de corps. L'analogue présente un ou plusieurs, jusqu'à et y compris la totalité, de ses radicaux Gln substitués par des radicaux His (c'est-à-dire en comparant la structure de polypeptide ou de protéine parental) et de préférence il montre une activité biologique au moins approximativement la même que celle du polypeptide parental.

Suivant un autre aspect, l'invention prévoit une composition thérapeutique qui comprend une formulation de réservoir donneur avec une quantité suffisante d'analogue synthétique d'un médicament à base de polypeptide parental pour être thérapeutiquement efficace lorsqu'il est délivré par électrotransport. L'analogue a au moins un des radicaux Gln du médicament à base de polypeptide parental qui est substitué par un ou des radicaux His. L'analogue montre de préférence une activité biologique qui est au moins approximativement la même ou de préférence plus grande que celle de la protéine ou du polypeptide parental.

Le procédé et la formulation suivant la présente invention ne sont pas limités à un dispositif d'électrotransport d'une structure quelconque particulière. Un exemple d'un dispositif de délivrance par électrotransport 10 à utiliser suivant la présente invention pour délivrer un analogue à travers une surface de corps 22 (typiquement une peau intacte ou une membrane muqueuse) est illustré sur la figure 1.

Le dispositif de délivrance par électrotransport 10 comprend une unité d'électrode donneuse 8 et une unité de contre-électrode 9. Les unités d'électrode 8 et 9 sont électriquement connectées à une source de courant électrique 27 qui consiste avantageusement en une ou plusieurs batteries de faible tension, et à un circuit de commande éventuel 19, qui sera décrit ci-après de manière plus détaillée. Lorsque le dispositif 10 est placé sur la peau ou une membrane muqueuse par exemple d'un patient, le circuit entre les électrodes est fermé, et la source de courant commence à délivrer du courant à travers le dispositif et à travers la peau ou membrane muqueuse du patient. Les unités d'électrode donneuse et de contre-électrode 8 et 9 comprennent normalement un recouvrement à libérer détachable (non représenté sur la figure 2) qui est ôté avant l'applica-

tion des unités d'électrode 8 et 9 à la surface de corps 22.

5 L'unité d'électrode donneuse 8 comprend une électrode donneuse 11 et un réservoir d'agent 15. Le réservoir d'agent 15 contient l'analogue à délivrer par électrotransport à partir du dispositif 10. L'unité d'électrode donneuse 8 est amenée à adhérer de manière appropriée à la surface du corps 22 au moyen d'une couche d'adhésif conducteur d'ions 17.

10 Le dispositif 10 comprend une unité de contre-électrode 9 qui est placée sur la surface du corps 22 en un endroit espacé de l'unité d'électrode 8. L'unité de contre-électrode 9 comprend une contre-électrode 12 et un réservoir d'électrolyte 16. L'unité de contre-  
15 électrode 9 est amenée à adhérer de manière appropriée à la surface du corps 22 au moyen d'une couche d'adhésif conducteur d'ions 18.

20 Les électrodes 11 et 12 sont électriquement conductrices et elles peuvent être formées d'un métal, par exemple d'une feuille de métal ou de métal déposé ou peint sur un support approprié. Comme exemples de métaux appropriés, on peut citer de l'argent, du zinc, de l'argent/chlorure d'argent, de l'aluminium, du platine, de l'acier inoxydable, de l'or et du titane.  
25 D'une autre manière, les électrodes 11 et 12 peuvent être formées d'une matrice de polymère contenant une charge conductrice, comme une poudre métallique, du graphite en poudre, des fibres de carbone ou d'autres matières de charge électriquement conductrices connues.

30 Les électrodes 11 et 12 sont électriquement connectées à une source de courant 27 par utilisation de moyens bien connus, par exemple des circuits imprimés flexibles, des feuilles de métal, des fils, ou par un contact direct.

35 Le réservoir d'électrolyte 16 contient un sel pharmacologiquement acceptable approprié. Les sels

appropriés comprennent du chlorure de sodium, des sels de métal alcalin, des sels de métal alcalino-terreux, comme des chlorures, des sulfates, des nitrates, des carbonates, des phosphates, et des sels organiques, comme des ascorbates, des citrates, des acétates et leurs mélanges. Le réservoir 16 peut éventuellement contenir un agent tampon.

Les réservoirs 15 et 16 sont de préférence constitués en une matière quelconque adaptée pour absorber et maintenir une quantité suffisante de liquide (c'est-à-dire une solution liquide de l'analogue) à l'intérieur en vue de permettre le passage de l'analogue par électrotransport. De préférence, les réservoirs contiennent un ou plusieurs polymères hydrophiles, comme de la polyvinylpyrrolidone, de l'alcool polyvinylique ou des glycols de polyéthylène, et éventuellement un ou plusieurs polymères hydrophobes, comme du polyisobutylène, du polyéthylène ou du polypropylène. Bien que cela ne soit pas limité à une forme ou volume particuliers quelconques, les réservoirs 15 et 16 présentent chacun avantageusement une épaisseur de 0,6 cm (1/4 pouce) ou moins et une superficie en section transversale (par exemple de contact avec la peau) de l'ordre d'environ 1 à environ 50 cm<sup>2</sup>. L'analogue peut être ajouté à la matrice polymère du réservoir 15 par des moyens conventionnels, tels qu'un mélange dans un état liquide et plus tard un moulage ou une extrusion de la matrice de réservoir contenant l'analogue.

Le courant d'électrotransport appliqué par le dispositif est avantageusement de l'ordre d'environ 50 à 400  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ .

Le flux d'électrotransport transdermique d'analogues suivant la présente invention est attendu comme étant d'au moins environ 20 % plus élevé, et de façon préférable d'au moins environ 50 %-100 % plus élevé que celui du polypeptide parental.

La présente invention va être expliquée de manière plus détaillée par les exemples suivants qui ne doivent pas être considérés comme une limitation à la portée de la présente invention.

5 **Exemple 1 : Analogue de G-CSF**

G-CSF est une protéine pharmaceutique utilisée pour traiter des patients qui se rétablissent d'une chimiothérapie. Il est également utilisé comme thérapie

10 Un analogue de G-CSF est préparé conformément à des procédés connus et conventionnels décrits ici, analogue dans lequel les radicaux de glutamine aux positions 107, 119, 120, 131, 134, 145, 158 et 173 sont remplacés par des radicaux d'histidine. Cet analogue a une charge  
15 globale, à un pH de 6, proche de +4.

Un réservoir donneur anodique, comprenant une solution aqueuse de l'analogue de G-CSF dans une matrice d'hydrogel à base d'hydroxyéthylcellulose (HEC), est préparé. La formulation contient 5 mg/ml d'analogue de  
20 G-CSF dans 5 mM de tampon d'histidine à pH 6 dans un hydrogel HEC 3 % contenant 1 % de glycérol.

Le réservoir donneur contenant de l'analogue de G-CSF est utilisé dans un dispositif de délivrance par électrotransport. Le dispositif de délivrance  
25 comprend une électrode anodique en feuille d'argent, placée sur une surface du réservoir donneur, et une contre-électrode en chlorure d'argent placée sur une surface d'une matrice d'hydrogel HEC contenant une solution saline tamponnée et utilisée comme unité de  
30 contre-électrode/ réservoir. Les électrodes sont connectées par des rubans adhésifs électriquement conducteurs aux sorties d'un circuit de production et de commande de courant d'électrotransport qui fournit un courant de 2,0 mA. Le réservoir donneur et le contre-  
35 réservoir présentent chacun une superficie de contact avec la peau de 20 cm<sup>2</sup>. Le dispositif est placé sur une

peau de patient, et il applique une densité de courant d'électrotransport de  $100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Le dispositif est adapté pour être porté sur une période de temps allant jusqu'à 24 heures, pendant laquelle le dispositif applique de manière continue 2,0 mA de courant d'électrotransport et, par conséquent, délivre l'analogue de G-CSF de manière continue sur la période de 24 heures.

Après démarrage de l'électrotransport, des échantillons de sang sont recueillis d'une façon périodique, héparinisés, centrifugés et le plasma est entreposé à  $-80^\circ\text{C}$ . Les concentrations de l'analogue dans le plasma sont déterminées par un procédé à essai immunologique lié à une enzyme. Les résultats montrent des niveaux augmentés dans le plasma en comparaison d'un témoin d'électrotransport de G-CSF non modifié.

#### Exemple 2 : Analogue de PTH

L'hormone parathyroïdienne (PTH) est un polypeptide pharmaceutique utilisé pour traiter l'ostéoporose. Un exemple d'un analogue de PTH est celui dans lequel le radical de glutamine en position 29 est remplacé par de l'histidine pour augmenter la charge globale d'environ +1 à un pH de 5. Le remplacement du radical de glutamine en position 29 retient l'activité biologique approximative du composé parental.

Un réservoir donneur anodique est préparé, ce réservoir comprenant une solution aqueuse d'analogue de PTH dans une matrice d'hydrogel HEC. La formulation contient 10 mg/ml d'analogue de PTH dans 5 mM de tampon d'acétate à pH 5 dans de l'hydrogel HEC 3 % contenant 1 % de glycérol.

Le réservoir donneur contenant de l'analogue de PTH est utilisé dans un dispositif semblable à celui décrit dans l'Exemple 1 à l'exception du fait que la formation du courant d'électrotransport et le circuit de commande fonctionnent suivant l'un de deux modes. Le premier mode est un mode de délivrance continu, comme

décrit dans l'Exemple 1, et le deuxième mode est un mode de délivrance intermittent, dans lequel la libération d'analogue de PTH se produit de manière périodique sur des intervalles prédéterminés pendant la journée.

5 Des échantillons de sang sont recueillis et analysés comme décrit dans l'Exemple 1, et les résultats montrent des niveaux améliorés d'électrotransport dans le plasma en comparaison de la PTE non modifiée.

**Exemple 3 : Analogue h-GHRH**

10 La GHRH humaine (h-GHRH) est utilisée pour traiter les enfants présentant une déficience de croissance (c'est-à-dire de petite taille) et des patients adultes âgés et frêles. Un analogue de h-GHRH est préparé, dans lequel les radicaux de glutamine aux  
15 positions 16, 24, 30 et 31 sont remplacés par des radicaux d'histidine. Un tel analogue aura la charge globale augmentée d'environ +4 à un pH de 5.

Un réservoir donneur anodique est préparé qui comprend une solution aqueuse de l'analogue de h-GHRH  
20 dans une matrice d'hydrogel HEC. La formulation contient 4 mg/ml d'analogue de h-GHRH dans 5 mM de tampon d'acétate à pH 5 dans de l'hydrogel HEC 3 % contenant 1 % de glycérol.

Le réservoir donneur contenant de l'analogue  
25 de h-GHRH est utilisé dans un dispositif tel que décrit dans l'Exemple 1. Le dispositif est placé sur une peau de patient et il délivre l'analogue de h-GHRH de manière continue sur la période de port de 24 heures.

Des échantillons de sang sont recueillis et  
30 analysés comme décrit dans l'Exemple 1, et les résultats montrent un électrotransport et des niveaux dans le plasma améliorés en comparaison de la h-GHRH non modifiée.

En bref, la substitution de radicaux d'histidine aux radicaux de glutamine, asparagine ou thréonine  
35 dans des médicaments à base de polypeptide procure des

propriétés améliorées d'électrotransport parce que les deux acides aminés ont une hydrophobie très semblable et une tendance semblable à ne pas former d'hélice  $\alpha$ . Ils ont la même charge au pH physiologique et ils ont  
5 presque exactement la même géométrie et capacité de liaison d'hydrogène.

Alors que la présente invention a à présent été décrite et illustrée par des exemples avec une certaine spécificité, les hommes de métier apprécieront  
10 les diverses modifications, y compris variantes, additions et omissions qui peuvent être faites dans ce qui a été décrit. Conformément à cela il est prévu que ces modifications soient également englobées dans la présente invention et que la portée de la présente inven-  
15 tion soit uniquement limitée par l'interprétation la plus large qui puisse être accordée légalement aux revendications annexées.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES :

- (i) DEPOSANT : ALZA
- (ii) TITRE DE L'INVENTION : MODIFICATION DE MEDICAMENTS A BASE DE POLYPEPTIDE POUR AUGMENTER UN FLUX D'ELECTROTRANSPORT
- (iii) NOMBRE DE SEQUENCES : 10
- (iv) ADRESSE DE CORRESPONDANCE :
  - (A) DESTINATAIRE : Stroud, Stroud, Willink, Thompson & Howard
  - (B) RUE : 25 West Main Street
  - (C) VILLE : Madison
  - (D) ETAT : WI
  - (E) PAYS : USA
  - (F) ZIP : 53701-2236

(2) INFORMATIONS CONCERNANT SE

Q ID NO:1:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
  - (A) LONGUEUR : 174 acides aminés
  - (B) TYPE : acide aminé
  - (D) CONFIGURATION : linéaire
- (ix) CARACTERISTIQUE :
  - (A) NOM/CLE : peptide
  - (B) LOCALISATION : 1..174
  - (D) AUTRE INFORMATION: /note= "facteur de stimulation de colonie de granulocytes"
- (xi) DESCRIPTION DE SEQUENCE : SEQ ID NO:1:

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys  
 1 5 10 15

Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln  
 20 25 30

Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val  
 35 40 45

Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys  
 50 55 60

Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser  
 65 70 75 80

Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser  
 85 90 95



## (2) INFORMATIONS CONCERNANT SEQ ID NO:3:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 174 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

5

(D) CONFIGURATION : linéaire

## (ix) CARACTERISTIQUE :

(A) NOM/CLE : Peptide

(B) LOCALISATION : 1..174

10

(D) AUTRE INFORMATION : /note = "facteur de stimulation de colonie de granulocytes"

## (xi) DESCRIPTION DE SEQUENCE : SEQ ID No:3:

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro His Ser Phe Leu Leu Lys  
 1 5 10 15  
 Cys Leu Glu His Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln  
 15 20 25 30  
 Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val  
 35 40 45  
 Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys  
 50 55 60  
 Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser  
 20 65 70 75 80  
 Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser  
 85 90 95  
 Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp  
 100 105 110  
 Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro  
 115 120 125  
 Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe  
 130 135 140  
 Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe  
 145 150 155 160  
 Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro  
 165 170

30

## (2) INFORMATION CONCERNANT SEQ ID NO:4:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 174 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

35

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ix) CARACTERISTIQUE :  
 (A) NOM/CLE : Peptide  
 (B) LOCALISATION : 1..174  
 (D) AUTRE INFORMATION : /note= "facteur de  
 stimulation de colonie de granulocytes"

(xi) DESCRIPTION DE SEQUENCE : SEQ ID NO:4:

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys  
 1 5 10 15  
 Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln  
 10 20 25 30  
 Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val  
 35 40 45  
 Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys  
 50 55 60  
 Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser  
 15 65 70 75 80  
 Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser  
 85 90 95  
 Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu His Leu Asp Val Ala Asp  
 100 105 110  
 Phe Ala Thr Thr Ile Trp His His Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro  
 115 120 125  
 Ala Leu His Pro Thr His Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe  
 130 135 140  
 His Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu His Ser Phe  
 145 150 155 160  
 Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala His Pro  
 165 170

(2) INFORMATIONS CONCERNANT SEQ ID NO:5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :  
 (A) LONGUEUR : 34 acides aminés  
 (B) TYPE : acide aminé  
 (D) CONFIGURATION : linéaire

(ix) CARACTERISTIQUE :  
 (A) NOM/CLE : Peptide  
 (B) LOCALISATION : 1..34  
 (D) AUTRE INFORMATION : /note = "hormone para-  
 thyroïdienne"

- 31 -

(xi) DESCRIPTION DE SEQUENCE : SEQ ID NO:5:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn  
 1                   5                   10                   15  
 5 Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His  
                  20                   25                   30  
 Asn Phe

(2) INFORMATIONS CONCERNANT SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

10 (A) LONGUEUR : 34 acides aminés  
 (B) TYPE : acide aminé  
 (D) CONFIGURATION : linéaire

(ix) CARACTERISTIQUE :

15 (A) NOM/CLE : Peptide  
 (B) LOCALISATION : 1..34  
 (D) AUTRE INFORMATION : /note = "hormone para-  
   thyroïdienne modifiée"

(xi) DESCRIPTION DE SEQUENCE : SEQ ID NO:6:

20 Ser Val Ser Glu Ile His Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His  
                  20                   25                   30  
 Asn Phe

(2) INFORMATIONS CONCERNANT SEQ ID NO:7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

25 (A) LONGUEUR : 34 acides aminés  
 (B) TYPE : acide aminé  
 (D) CONFIGURATION : linéaire

(ix) CARACTERISTIQUE :

30 (A) NOM/CLE : Peptide  
 (B) LOCALISATION : 1..34  
 (D) AUTRE INFORMATION : /note = "hormone para-  
   thyroïdienne modifiée"

(xi) DESCRIPTION DE SEQUENCE : SEQ ID NO:7:

35

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn  
 1                   5                   10                   15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu His Asp Val His  
 20 25 30

Asn Phe

(2) INFORMATIONS CONCERNANT SEQ ID NO:8:

5

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 44 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ix) CARACTERISTIQUE :

10

(A) NOM/CLE : Peptide

(B) LOCALISATION : 1..44

(D) AUTRE INFORMATION : /note = "hormone de libération d'hormone de croissance humaine"

(ix) CARACTERISTIQUE :

15

(A) NOM/CLE : Site de fixation

(B) LOCALISATION : 44

(D) AUTRE INFORMATION : /note = "amide terminal

carboxy"

20

(xi) DESCRIPTION DE SEQUENCE : SEQ ID NO:8:

Tyr Ala Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Gly Gln  
 1 5 10 15

Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Met Ser Arg Gln Gln Gly  
 20 25 30

25

Glu Ser Asn Gln Glu Arg Gly Ala Arg Ala Arg Leu  
 35 40

(2) INFORMATIONS CONCERNANT SEQ ID NO:9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 44 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

30

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ix) CARACTERISTIQUE :

(A) NOM/CLE : Peptide

(B) LOCALISATION : 1..44

35

(D) AUTRE INFORMATION : /note= "hormone de libération d'hormone de croissance humaine modifiée"

## (ix) CARACTERISTIQUE :

(A) NOM/CLE : site de fixation

(B) LOCALISATION : 44

(D) AUTRE INFORMATION : /note= "amide terminal  
carboxy"

5

## (xi) DESCRIPTION DE SEQUENCE : SEQ ID NO:9:

Tyr Ala Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Gly Gln  
1 5 10 15Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Met Ser Arg Gln His Gly  
20 25 30

10

Glu Ser Asn His Glu Arg Gly Ala Arg Ala Arg Leu  
35 40

## (2) INFORMATIONS CONCERNANT SEQ ID NO:10:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 44 acides aminés

15

(B) TYPE : acide aminé

(D) CONFIGURATION : linéaire

## (ix) CARACTERISTIQUE :

(A) NOM/CLE : Peptide

(B) LOCALISATION : 1..44

20

(D) AUTRE INFORMATION : /note= "hormone de  
libération d'hormone de croissance humaine  
modifiée"

## (ix) CARACTERISTIQUE :

(A) NOM/CLE : site de fixation

25

(B) LOCALISATION : 44

(D) AUTRE INFORMATION : /note= "amide terminal  
carboxy"

## (xi) DESCRIPTION DE SEQUENCE : SEQ ID NO:10:

Tyr Ala Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Gly His  
1 5 10 15

30

Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu His Asp Ile Met Ser Arg His His Gly  
20 25 30Glu Ser Asn Gln Glu Arg Gly Ala Arg Ala Arg Leu  
35 40

REVENDEICATIONS

1. Analogue synthétique d'un polypeptide parental, ce polypeptide parental comportant au moins un radical d'acide aminé qui présente une chaîne latérale polaire, mais non chargée, cet analogue étant caracté-  
5 risé par remplacement d'au moins un de ces radicaux par un radical d'histidine.

2. Analogue suivant la revendication 1, caractérisé en ce que cet analogue montre une activité  
10 biologique au moins approximativement la même que le polypeptide parental.

3. Analogue suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le radical d'acide aminé qui a une chaîne latérale polaire, mais non chargée, est choisi  
15 parmi le groupe comprenant de la glutamine, de l'asparagine et de la thréonine.

4. Analogue suivant la revendication 3, caractérisé en ce que le radical d'acide aminé ayant une chaîne latérale polaire, mais non chargée, est de la  
20 glutamine.

5. Composition pharmaceutique comprenant une quantité thérapeutiquement efficace de l'analogue suivant l'une quelconque des revendications 1 à 4, et un excipient ou support physiologiquement acceptable.

6. Dispositif de délivrance par électrotransport comportant un réservoir donneur contenant l'analogue suivant l'une quelconque des revendications 1 à 4.  
25

7. Analogue synthétique d'un agent polypeptidique pharmaceutique parental, ce parent comportant au moins un radical choisi parmi le groupe comprenant de la glutamine, de la thréonine et de l'asparagine, cet analogue synthétique montrant un flux d'électrotransport accru à travers une surface de corps, cet analogue étant caractérisé en ce qu'il présente un remplacement dudit  
30 au moins un radical précité par un radical d'histidine.  
35

8. Analogue suivant la revendication 7, caractérisé en ce qu'il montre une activité biologique au moins approximativement la même que le polypeptide parental.

5 9. Analogue suivant la revendication 7, caractérisé en ce que chaque radical de Gln dans le polypeptide parental est substitué par His dans l'analogue.

10 10. Analogue suivant la revendication 7, caractérisé en ce que la charge globale de l'analogue est positive à un pH de l'ordre d'environ 5 à 6, mais est sensiblement isoélectrique à un pH de 7,4.

15 11. Analogue suivant la revendication 7, caractérisé en ce que l'analogue a, à un pH de l'ordre d'environ 5 à 6, une charge positive plus grande que le polypeptide parental.

12. Dispositif d'électrotransport comprenant un réservoir donneur contenant l'analogue suivant l'une quelconque des revendications 7 à 11.

20 13. Composition comprenant un agent polypeptidique pharmaceutique modifié pour accroître la délivrance par électrotransport de l'agent, l'agent polypeptidique étant caractérisé par au moins un radical de glutamine substitué par un radical d'histidine pour former un analogue dans lequel l'analogue présente une charge globale plus grande que la charge sur l'agent à  
25 un pH d'environ 5-6.

14. Dispositif de délivrance par électrotransport comportant un réservoir donneur contenant la composition suivant la revendication 13.

30 15. Procédé de modification d'un agent polypeptidique pharmaceutique parental pour accroître un électrotransport à travers une surface de corps, caractérisé par une substitution d'un radical histidine à un ou plusieurs radicaux de glutamine de l'agent polypeptidique pharmaceutique parental pour former un analogue  
35 synthétique de l'agent parental, cet analogue présentant

une charge globale plus grande que la charge sur l'agent parental à un pH d'environ 3,5-8.

5 16. Procédé de modification d'un agent polypeptidique pharmaceutique parental pour accroître un électrotransport à travers une surface de corps, caractérisé par une substitution d'au moins un radical d'acide aminé non-histidine de l'agent polypeptidique parental par un radical d'histidine (His).

10 17. Procédé suivant la revendication 16, caractérisé en ce que le radical de l'agent polypeptidique parental est choisi parmi le groupe comprenant de la glutamine (Gln), de la thréonine (Thr) et de l'asparagine (Asn).

15 18. Procédé suivant la revendication 16, caractérisé en ce que le radical de l'agent polypeptidique parental comprend de la glutamine (Gln).

20 19. Procédé suivant l'une ou l'autre des revendications 15 et 16, caractérisé en ce que l'analogue montre au moins approximativement la même activité biologique que l'agent polypeptidique parental.

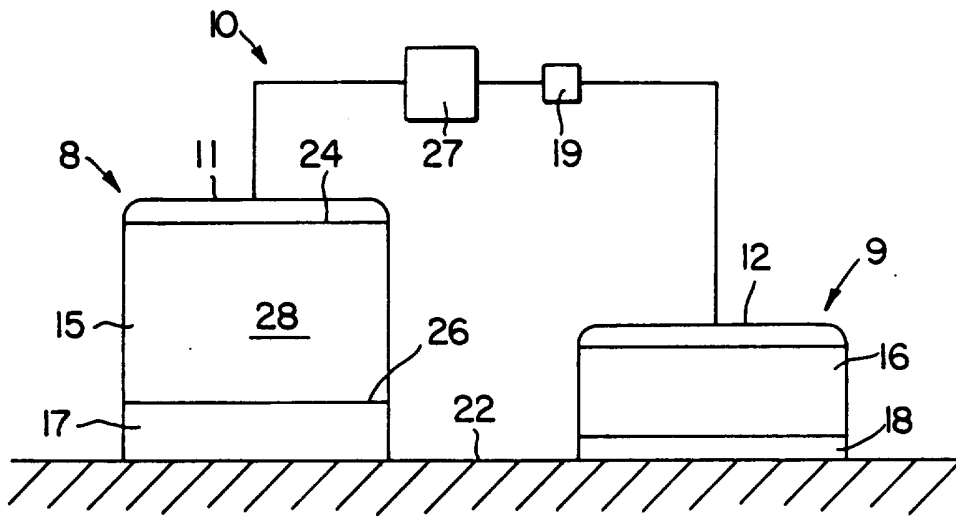


FIG. 1



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

BO 6205  
BE 9600517

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.  
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

27-01-1997

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US-A-4628043	09-12-86	US-A- 4595676	17-06-86
		AU-B- 557046	04-12-86
		AU-A- 2307584	19-07-84
		BG-A- 40815	16-02-87
		CA-A- 1247601	27-12-88
		DE-A- 3473764	06-10-88
		EG-A- 16824	30-08-90
		EP-A- 0117034	29-08-84
		JP-B- 6089033	09-11-94
		JP-A- 59139347	10-08-84
		OA-A- 7631	23-05-85
		SU-A- 1477248	30-04-89
		US-A- 4728726	01-03-88
EP-A-0667355	16-08-95	DE-A- 4404168	17-08-95
		AU-A- 1163795	17-08-95
		CA-A- 2142173	11-08-95
		JP-A- 7252299	03-10-95
EP-A-0643981	22-03-95	CA-A- 2132574	23-03-95
		JP-A- 7213627	15-08-95
		JP-A- 7213628	15-08-95
WO-A-9511988	04-05-95	AU-A- 8124594	22-05-95
		EP-A- 0730661	11-09-96
WO-A-9325197	23-12-93	AU-A- 4534593	04-01-94
		AU-A- 6764794	29-08-94
		CA-A- 2153243	18-08-94
		EP-A- 0647133	12-04-95
		EP-A- 0683668	29-11-95
		JP-T- 8510720	12-11-96
WO-A- 9417792	18-08-94		

**BE 9600517 - BO 6205**

**RECHERCHE INCOMPLETE**

Revendications ayant fait l'objet de recherches complètes: 15-19

Revendications ayant fait l'objet de recherches incomplètes: 1-14

Vu le nombre extrêmement important de composés couverts par les revendications 1-14 et en l'absence de tout support technique relatif à ces composés dans la description, l'ISA considère qu'il n'est pas raisonnable du point de vue économique d'effectuer une recherche couvrant la totalité de l'objet décrit ci-dessus.

De ce fait, la recherche a été limitée aux exemples concrets fournis dans la description et à ceux qui s'y rapprochent et inclut les composés ayant les effets prétendus.