



PATENTDIREKTORATET  
TAASTRUP

- (21) Patentansøgning nr.: 4297/84  
(22) Indleveringsdag: 07 sep 1984  
(41) Alm. tilgængelig: 09 mar 1985  
(44) Fremlagt: 28 jan 1991  
(86) International ansøgning nr.: -  
(30) Prioritet: 08 sep 1983 DE 3332329

(51) Int.Cl.<sup>5</sup> A 61 K 37/43

- (71) Ansøger: \*Hoechst Aktiengesellschaft; Brueningstrasse 45; D-6230 Frankfurt am Main 80, DE  
(72) Opfinder: Wolfgang \*Koenig; DE, Horst \*Neubauer; DE

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.

**(54) Farmaceutisk præparat til behandling af stofskiftesygdomme og fremgangsmåde til dets fremstilling**

**(56) Fremdragne publikationer**

FR off. g. skrift nr. 2450109  
Andre publikationer. Klinisk ordbog, 13. udg. (1984), 31  
Römpps Chemie-Lexikon, 8. udg. (1981)  
1532

**(57) Sammendrag:**

4297-84

Et farmaceutisk præparat til behandling af stofskiftesygdomme, der kan opstå ved for ringe sekretion af endogent parathormon, har et farmakologisk virksomt indhold af gonadoliberin eller dets mindst lige så kraftigt virksomme agonister i en farmaceutisk uskadelig bærer.

Præparatet kan eksempelvis anvendes til behandling af hypoparathyreoidismus og hypocalcæmi, til normalisering af blodtrykket og til behandling af sygdomme, der beror på en for ringe glucoseforsyning.

Opfindelsen angår et farmaceutisk præparat til parenteral indgivelse til behandlingen af stofskiftesygdomme, der opstår ved for ringe sekretion af endogent parathormon, samt en fremgangsmåde til fremstilling af et sådant præparat.

5 Parathormon (PTH) (parathyreoïdt hormon) regulerer sammen med calcitonin (CT)  $\text{Ca}^{2+}$ -husholdningen. Hvis  $\text{Ca}^{2+}$ -spejlet er for lavt, stimuleres dannelsen af PTH, der forøger  $\text{Ca}^{2+}$ -spejlet, jfr. The New England J. Med., 307, 226-228 (1982). PTH angriber herved direkte knoglerne og mobiliserer  
10  $\text{Ca}^{2+}$ . Calcitonin sænker derimod  $\text{Ca}^{2+}$ -spejlet.

Reguleringen af plasma- $\text{Ca}^{2+}$  er af stor betydning. Eksempelvis er højt blodtryk åbenbart også  $\text{Ca}^{2+}$ -afhængigt.  $\text{Ca}^{2+}$ -antagonister sænker således blodtrykket. Hypertensive  
15 patienter har et lavere serumspejl af ioniseret  $\text{Ca}^{2+}$ , og de her derfor også mere cellemembranbundet  $\text{Ca}^{2+}$  end normotensive personer, jfr. Science, 217, 267-269 (1982).  $\text{Ca}^{2+}$ -indstrømmingen i cellen er altså lettet, og det kommer lettere til kontraktioner af den glatte muskulatur, hvilket i sidste  
20 ende fører til en forhøjelse af blodtrykket. Ved spontant hypertensive rotter kan man fastslå, at PTH har en blodtryks-sænkende virkning, jfr. 1982 Blood Pressure Council, Suppl. I, Hypertension, 5, 59-63 (1983). Også på intakte dyr har PTH en blodtryks-sænkende virkning. Ved forsøg in vitro har der ved vaskulære kar vist sig en vasodilatorisk virkning,  
25 jfr. Adv. Exp. Med. Biol., 151, 619-632 (1982).

En for ringe mængde PTH kan altså føre til et lavere  $\text{Ca}^{2+}$ -serumspejl, hvilket igen gennem en formering af  $\text{Ca}^{2+}$ -receptorer på cellemembranerne kan bevirke et forhøjet blodtryk. Rent teoretisk skulle også en for ringe mængde  $\text{Ca}^{2+}$   
30 kunne bevirke et for lavt blodtryk, hvis cellemembranerne ikke dannede flere  $\text{Ca}^{2+}$ -receptorer.

Gennem frigørelsen af glucagon har PTH også en indflydelse på blodsukkerspejlet. PTH forøger glykogendannelsen ud fra glucose, jfr. FEBS Lett., 148, 31-34 (1982), men  
35 stimulerer også frigørelsen af glucagon og kan dermed også virke hyperglykæmisk, jfr. Clin. Res., 28, 55 A (1980). PTH

har altså en regulerende indflydelse på blodsukkerspejlet. Ved muskelsmerter, der kan føres tilbage til en utilstrækkelig mængde blodglucose (McArdle-sygdom), tilvejebringer f.eks. en glucagonterapi en lindring, jfr. Dtsch. Med  
 5 Wochenschr., 107, 1809-1811 (1982).

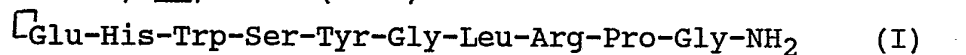
Stoffer, der er i stand til at stimulere PTH, kan altså anvendes terapeutisk til regulering af det  $\text{Ca}^{2+}$ -betingede blodtryk eller til forøgelse af blodglucosen, f.eks. ved McArdle-sygdommen.

10 Det har nu ifølge opfindelsen vist sig, at gonadoliberin og gonadoliberin-analogen buserelin overraskende stimulerer PTH i lille dosering. Allerede doser på 5 ng/kg buserelin eller 50 ng/kg gonadoliberin stimulerer PTH hos rotter.

Opfindelsen angår således et farmaceutisk præparat  
 15 af den allerede angivne art, og dette præparat er ejendommeligt ved, at det, i en farmaceutisk acceptabel bærer, til intravenøs indgivelse indeholder 0,5 til under 5  $\mu\text{g}$  gonadoliberin eller 0,05 til 0,5  $\mu\text{g}$  af gonadoliberin-analogen buserelin pr. enkeltdosis for en normalvægtig voksen person, og  
 20 at det til indgivelse på slimhinden indeholder 10 til under 50  $\mu\text{g}$  gonadoliberin eller 1 til 20  $\mu\text{g}$  af gonadoliberin-analogen buserelin pr. enkeltdosis for en normalvægtig voksen person.

Stofskiftesygdomme, der kan opstå ved for ringe sekre-  
 25 tion af endogent parathormon, er f.eks. hypoparathyroidisme, hypocalkæmi med tetani, forhøjet blodtryk samt for lavt blodtryk såvel som sygdomme, der beror på en for ringe glucosforsyning.

Gonadoliberin er et decapeptid med den følgende formel  
 30 (I), som dannes i hypothalamus og i hypofysen bevirker frigørelse af follitropin og lutropin, jfr. Biochem. Biophys. Res. Commun., 43, 1334 (1971):



Den diagnostiske dosis af gonadoliberin til frigørelse  
 35 af gonadotropinerne (follitropin og lutropin) ligger ved en parenteral indgivelse på 25-100  $\mu\text{g}$  for et voksent menneske,

jfr. Rote Liste 1983, 34002 og 34004. Den ved kryptorchismus anvendte intranasale dosering til børn mellem tre og seks år andrager tre gange dagligt 400  $\mu\text{g}$ , jfr. Rote Liste 1982, 49038.

5 Ifølge den offentliggjorte franske patentansøgning nr. 2.450.109 ligger dosis af LH-RH-frigørelshormonet (gonadoliberin) til regulering af cyklus ved en parenteral indgivelse fra 5 til 20.000 (intranasalt: fra 50 til 200.000)  $\mu\text{g}$  for en voksen person; den tilsvarende dosis af en LH-RH-  
10 agonist ved parenteral indgivelse ligger ved 5-10.000  $\mu\text{g}$  for en voksen person.

I modsætning hertil er det med præparatet ifølge opfindelsen til behandling af stofskiftesygdomme, der kan føres tilbage til for lavt parathormonspejl, tilstrækkeligt  
15 med parenteral, intravenøs indgivelse af kun fra 0,5 til under 5  $\mu\text{g}$  gonadoliberin pr. normalvægtig voksen person, svarende omtrentlig til 6 til 60 ng pr. kg pr. dosering. Ved applikation på slimhinden, fortrinsvis ved intranasal indgivelse, er det tilstrækkeligt med doseringer på kun fra  
20 10 til under 50  $\mu\text{g}$  gonadoliberin pr. normalvægtig voksen person, svarende omtrentlig til fra 0,1 til 0,6  $\mu\text{g}$  pr. kg pr. dosering. Der kan altså ikke ventes en kraftig indflydelse af gonatropinerne under behandlingen med lavt doseret gonadoliberin. Den til den her omhandlede behandling nødven-  
25 dige intranasale dosis på fra 10 til under 50  $\mu\text{g}$  pr. menneske, der i gunstigste tilfælde svarer til en parenteral dosis på fra 0,5 til under 5  $\mu\text{g}$ , ligger langt under den til diagnostiske formål anvendte stofmængde. Tilsvarende gælder for den her omhandlede behandling med gonadoliberin-analogen  
30 buserelin.

Den agonistiske virkning af gonadoliberinet forstærkes først og fremmest ved substituenten af Gly-NH<sub>2</sub><sup>10</sup> med ethylamin-gruppen og ved udbytningen af Gly<sup>6</sup> med lipofile D-amino-syrer. Man kommer på denne måde frem til forbindelser, der  
35 alt efter den benyttede test virker 100-200 gange kraftigere end gonadoliberin, jfr. Vitamins and Hormones, 38, 257-

323 (1980). Vigtigt for ombytningen i position 6 er det, at D-aminosyren indeholder en  $\alpha$ -CH- og en  $\beta$ -CH<sub>2</sub>-gruppe, jfr. Peptides-Chemistry, Structure, Biology, 883-888, Ann Arbor Science Publishers Inc., Ann Arbor, Mich., 1975. Blandt de  
5 "naturlige" D-aminosyrer har D-Trp, D-Leu og den tert.butyl-ester af D-Ser vist sig bedst egnede. Ved anvendelsen af syntetiske aromatiske D-aminosyrer kan der imidlertid opnås endnu højere aktiviteter, f.eks. med [D-3-(2,4,6-trimethyl-phenyl)-Ala<sup>6</sup>]- og [D-3-(2-naphthyl)-Ala<sup>6</sup>]-gonadoliberin,  
10 jfr. J. Med. Chem., 25, 795-801 (1982).

På tale for indikationen "frigørelse af endogent PTH" og de dermed forbundne stofskifteprocesser kommer gonadoliberin-analogen buserelin, der også betegnes som [D-Ser-(Bu<sup>t</sup>)<sup>6</sup>]-gonadoliberin-(1-9)-nonapeptid-ethylamid, jfr. Drugs  
15 of the Future 4, 1979, side 173-177, og 8, 1983, side 254.

Gonadoliberin-analogen buserelin er højvirksom og virker på mennesker ca. 10 gange kraftigere end gonadoliberin og har en længere varende virkning. Den må altså doseres i en lavere dosering og ikke så ofte som gonadoliberin. Almin-  
20 deligvis er det ved parenteral indgivelse tilstrækkeligt med en dosis på fra 0,05 til 0,5  $\mu$ g af den ovennævnte gonadoliberin-analog buserelin pr. normalvægtig voksen person, svarende omtrentlig til 0,6 til 70 ng pr. kg pr. dosis. Ved  
25 applikation på slimhinden, f.eks. ved intranasal indgivelse, er en dosering på fra 1 til 20  $\mu$ g buserelin pr. normalvægtig voksen person nødvendig, svarende omtrentligt til fra 10 til 300 ng pr. kg pr. dosis.

I rotter forøges plasma-Ca<sup>2+</sup>-spejlet ved en Ca<sup>2+</sup>-gluconat-infusion. Ved denne infusion supprimeres PTH-spejlet,  
30 jfr. The New England J. Med., 307, 226-228 (1982). En bolusinjektion af gonadoliberin-analogerne forøger imidlertid signifikant PTH-spejlet i forhold til kontrollerne og potenserer plasma-Ca<sup>2+</sup>. Den 30 minutter efter injektionen af gonadoliberin-analogerne forøgede PTH bevirker efter 60  
35 minutter en signifikant stigning i serum-Ca<sup>2+</sup>. At denne indflydelse på plasma-Ca<sup>2+</sup>-spejlet med endogent PTH eller

PTH selv har en indflydelse på blodtrykket, er blevet verificeret ved forsøg med en kvinde med forhøjet blodtryk. Efter én gangs indgivelse ad intranasal vej af 100  $\mu\text{g}$  gonadoliberin, hvilket ved en resorptionsrate på 2-5% altså kun svarer  
5 til ca. 2 til ca. 5  $\mu\text{g}$  resorberet gonadoliberin, kunne det forhøjede blodtryk nedsættes i 8 timer.

Indflydelsen på blodsukkeret er først blevet undersøgt hos kaniner. Kaniner blev til hæmning af det endogene glucagon udstyret med en glucosebolus. Efter indgivelse af 5-  
10 -50 ng pr. kg. af en gonadoliberin-analog forøges plasma-glucosespejlet signifikant, hvilket beror på en forøgelse af glucagonet. En kvindelig patient med stærke muskelsmerter i overarmen (McArdle-sygdommen) fik indgivet to enkeltdoser på hver 49  $\mu\text{g}$  gonadoliberin intranasalt. De stærke vedvarende  
15 smerter forsvandt efter ca. 15 minutter. Ved behandlingens begyndelse blev der foretaget indgivelse flere gange dagligt (tre gange), senere to gange og derefter kun én gang dagligt, til forebyggelse af en tachyphylaksi. Under terapien kunne armen atter bevæges uden smerter. Den kvindelige patients  
20 til at begynde med meget lave blodtryk på 90/60 blev interessant nok ikke formindsket, med derimod svagt forøget således, at det under terapien indstillede sig på 110/65. Disse lave gonadoliberin-doser virker altså ikke generelt blodtryks-sænkende, men kan derimod også ved nedsat blodtryk virke  
25 blodtryksforhøjende.

Gonadoliberin og buserelin bevirker altså f.eks. gennem frigørelsen af endogent PTH en regulering af blodtrykket og af blodsukkeret.

De her omhandlede præparater kan indgives intranasalt  
30 eller parenteralt. Til en intranasal indgivelsesform blandes de virksomme forbindelser med de for disse gængse tilsætningsstoffer, f.eks. stabilisatorer eller indifferente fortyndingsmidler, og bringes ved hjælp af gængse metoder på egnede indgivelsesformer, f.eks. vandige, alkoholiske eller  
35 olieagtige suspensioner eller vandige, alkoholiske eller olieagtige opløsninger. Som olieagtige bærestoffer eller

opløsningsmidler kan der f.eks. anvendes vegetabiliske eller animalske olier, f.eks. solsikkeolie eller levertran.

Til subcutan eller intravenøs indgivelse bringes de aktive forbindelser eller deres fysiologisk acceptable salte, om ønsket sammen med de herfor gængse stoffer såsom opløsningsformidlere, emulgatorer eller yderligere hjælpestoffer, i opløsning, suspension eller emulsioner. Som opløsningsmidler hertil kommer f.eks. følgende på tale: vand, fysiologiske kogsaltopløsninger eller alkoholer, f.eks. ethanol, propandiol eller glycerol, og desuden også sukkeropløsninger såsom glucose- eller mannitolopløsninger, eller også en blanding af de forskellige nævnte opløsningsmidler.

De følgende eksempler tjener til nærmere belysning af opfindelsen.

15

#### Eksempel 1

Stimulering af plasma-spejlet af parathormon og  $Ca^{2+}$  med buserelin (jfr. fig. 1 og 2)

---

20

To grupper på hver 31 Wistar-rotter narkotiseres med pentobarbital (45 mg pr. kg intraperitonealt). Der udtages fra alle dyrene en blodprøve (udgangsværdi). Derpå gives alle dyrene en mindst én times  $Ca^{2+}$ -infusion (30 mg pr. kg. pr. time, indgivelsesrumfang 1,2 ml pr. time), og ca. 5 minutter efter infusionens begyndelse gives der til behandlingsgruppen en injektion af buserelin (5 ng pr. kg i.v.) i fysiologisk kogsaltopløsning med 0,25% Haemaccel<sup>®</sup>-tilsætning (et med diisocyanater tværbundet gelatinepartialhydrolysat), og placebo-gruppen indgives den samme mængde fysiologisk kogsaltopløsning med 0,25% Haemaccel<sup>®</sup>-tilsætning. Efter 30, 60, 90, 120 og 180 minutter dræbes en del af dyrene, og deres blod opsamles. Blodserummet undersøges for  $Ca^{2+}$  og for parathormon. Efter 30 minutter stiger parathormonet i behandlingsgruppen i sammenligning med placebo-gruppen signifikant. Det ved hjælp af  $Ca^{2+}$ -infusionen allerede forøgede i  $Ca^{2+}$ -spejl er efter 60 minutter ligeledes tydeligt forhøjet i behandlingsgruppen, hvilket er en følge af det frigjorte

35

parathormon.

På tegningen viser fig. 1 tidsforløbet for PTH-spejlet (pg/ml), og fig. 2 viser det tidsmæssige forløb for  $\text{Ca}^{2+}$ -spejlet (mg-%).

- 5 I begge figurer er der ved de enkelte målepunkter angivet antallet n af målingerne samt standardafvigelsen fra måleværdien (grafisk).

### Eksempel 2

- 10 Stimulering af plasma-glucosen ved hjælp af buserelin, jfr. fig. 3

Til hver af 3 vågne kaniner indgives en glucosebolus (500 mg pr. kg i.v.). Behandlingsgruppen indgives samtidig buserelin (5 ng pr. kg i.v.) i fysiologisk kogsaltopløsning  
15 med 0,25% Haemaccel<sup>®</sup>-tilsætning, og til placebo-gruppen gives der den samme mængde fysiologisk kogsaltopløsning med 0,25% Haemaccel<sup>®</sup>-tilsætning. Efter 10, 30, 40, 50, 60, 70, 80 og 90 minutter udtages blodet, og blodglucosen bestemmes. I behandlingsgruppen er blodglucoseværdierne efter 70-  
20 90 minutter forøget signifikant.

Fig. 3 viser det tidsmæssige forløb af blodglucoseværdierne hos kaninerne. Ved de enkelte målepunkter er der hver gang angivet standardafvigelsen grafisk (n er hver gang 3).

25

### Eksempel 3

#### Blodtrykssenkning med gonadoliberin

En hypertensiv, 48 år gammel kvinde, hvis forhøjede blodtryk behandles med  $\beta$ -blokkere, standsede sin behandling  
30 på forsøgsdagen. Forsøget begyndtes kl. 17.00. Det systoliske blodtryk på ca. 150 mm Hg sank efter intranasal indgivelse af 100  $\mu\text{g}$  gonadoliberin i løbet af 30 minutter til ca. 125 mm Hg, forblev i 90 minutter ved 125 mm Hg og steg derpå i løbet af de næste 4 timer til 130 mm Hg. Efter 8 timers  
35 sengeleje, hvorunder forsøgspersonen sov udmærket, var blodtrykket steget til 137 mm Hg. Gunstige virkninger blev senere

også iagttaget med en enkeltdosis på 49  $\mu$ g gonadoliberin ved anvendelse af flere ganges (mindst to) indgivelse pr. dag.

5 Eksempel 4

Behandling af muskelsmerter

En 46 år gammel kvinde havde stærke smerter i overarmen. Armen kunne ikke bevæges væk fra kroppen. Efter en intranasal indgivelse af 100  $\mu$ g gonadoliberin var den vedvarende smerte i ro forsvundet. Det meget svage blodtryk på 90/60 steg under behandlingen med gonadoliberin til 110/65. Den første dag blev der behandlet i alt tre gange, den anden og tredje dag to gange, og den fjerde og de følgende dage kun én gang dagligt om morgenen. Under terapien blev også bevægelsessmerterne mindre, og armen kunne atter bevæges normalt. Gunstige virkninger blev senere også iagttaget med en enkeltdosis på 49  $\mu$ g gonadoliberin ved anvendelse af flere ganges (mindst to) indgivelse pr. dag.

P A T E N T K R A V

1. Farmaceutisk præparat til parenteral indgivelse til behandling af stofskiftesygdomme, der opstår ved for ringe sekretion af endogent parathormon, k e n d e t e g n e t ved, at det, i en farmaceutisk acceptabel bærer, til intravenøs indgivelse indeholder 0,5 til under 5  $\mu$ g gonadoliberin eller 0,05 til 0,5  $\mu$ g af gonadoliberin-analogen buserelin pr. enkeltdosis for en normalvægtig voksen person, og at det til indgivelse på slimhinden indeholder 10 til under 10 50  $\mu$ g gonadoliberin eller 1 til 20  $\mu$ g af gonadoliberin-analogen buserelin pr. enkeltdosis for en normalvægtig voksen person.

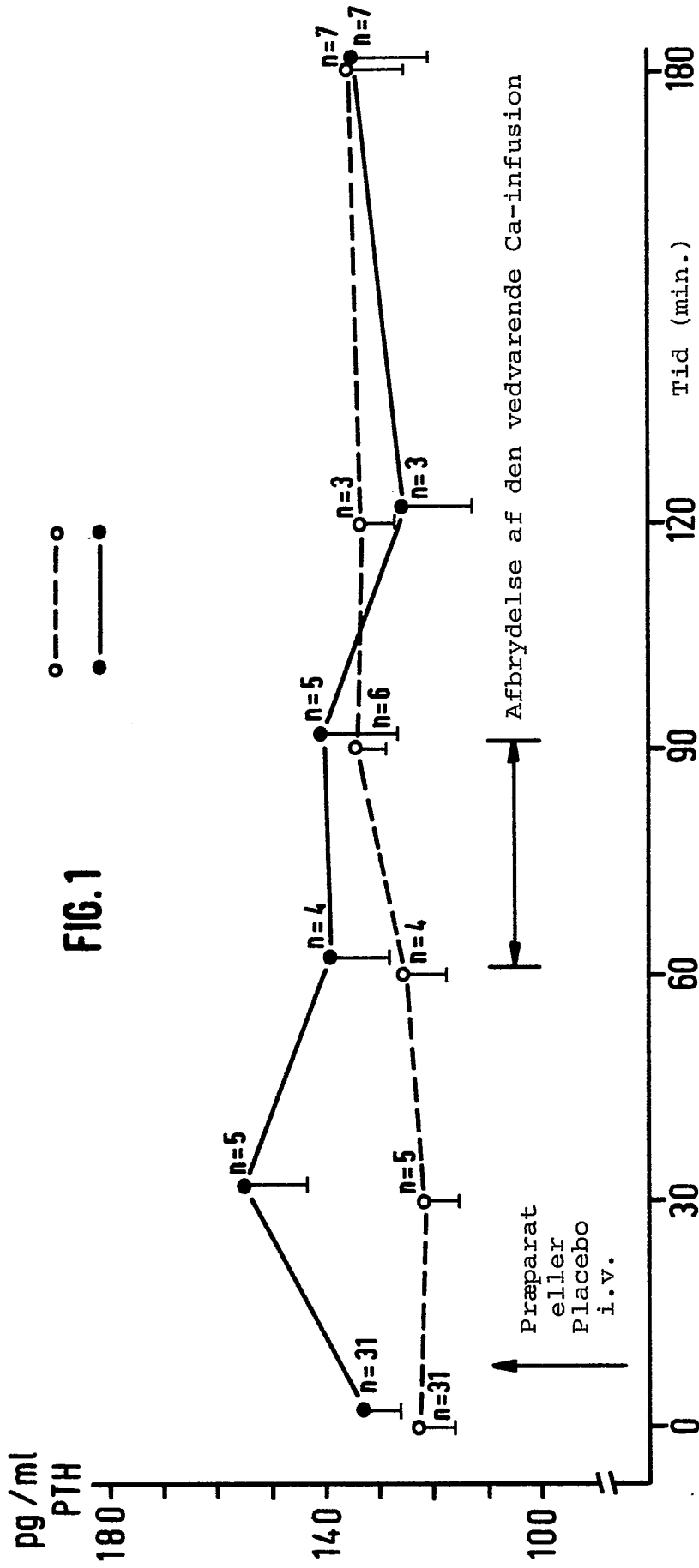
2. Præparat ifølge krav 1 til behandling af parathyreoïdisme.

15 3. Præparat ifølge krav 1 til behandling af hypocalkæmi.

4. Præparat ifølge krav 1 til normalisering af blodtrykket.

20 5. Præparat ifølge krav 1 til behandling af sygdomme, der beror på en for ringe glucoseforsyning.

6. Fremgangsmåde til fremstilling af et præparat ifølge ethvert af kravene 1-5, k e n d e t e g n e t ved, at gonadoliberin eller gonadoliberin-analogen buserelin sammen med en farmaceutisk acceptabel bærer bringes på en 25 præparatform til parenteral indgivelse.



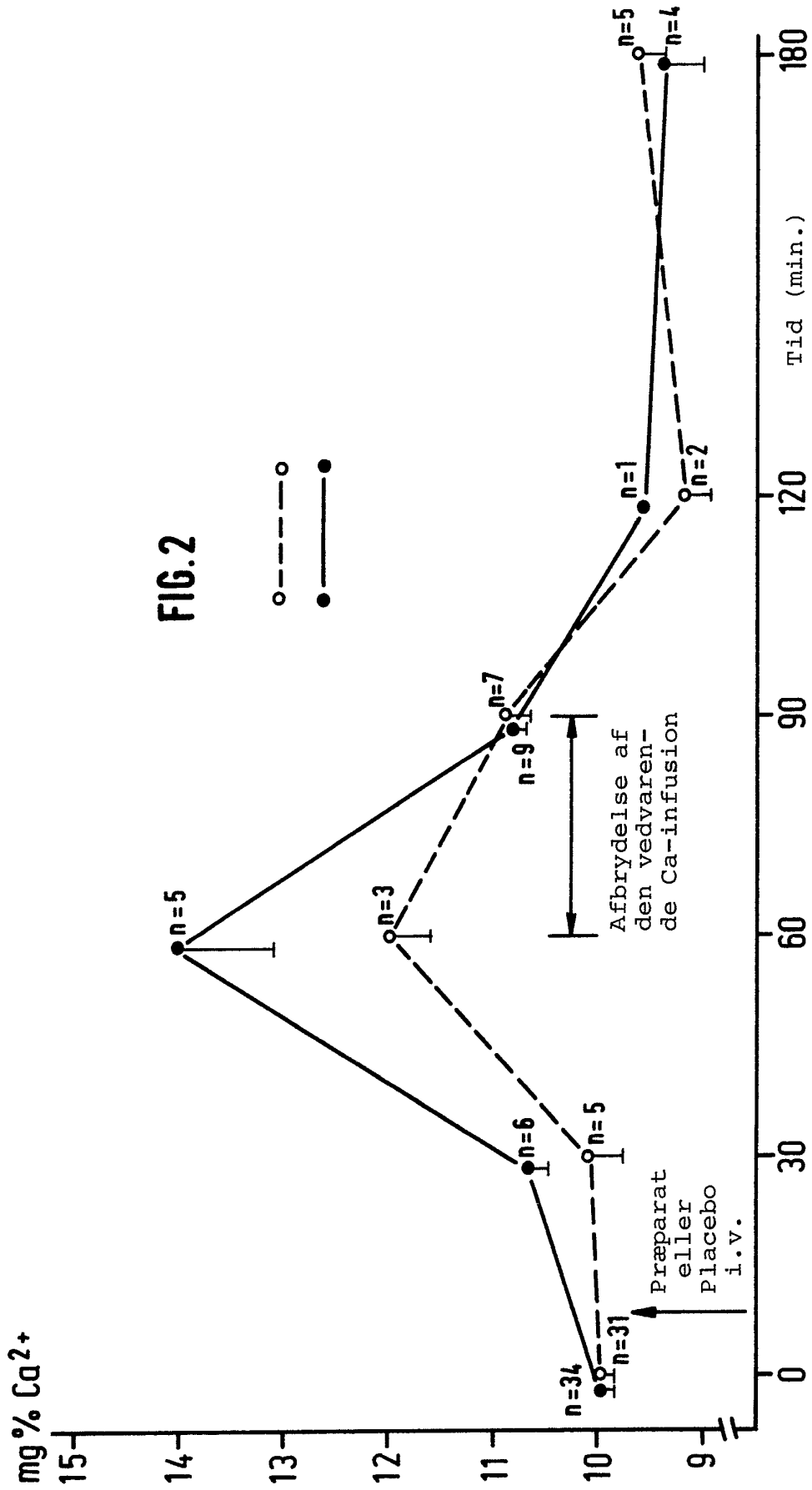


FIG. 3

