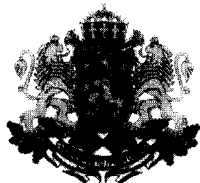


РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) BG

(11) 97281A

(51) C07K 14/00

A61K 38/27

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

<p>(21) Заявителски № 97281 (22) Заявено на 12.01.1993 (24) Начало на действие на патента от:</p> <p style="text-align: center;"><b>Приоритетни данни</b></p> <p>(31) 1687      (32) 13.07.1990      (33) DK</p> <p>(41) Публикувана заявка в бюлетин № 2   24.03.1994 (45) Отпечатано на (46) Публикувано в бюлетин № на (56) Информационни източници:</p> <p>(62) Разделена заявка от рег. №</p>	<p>(71) Заявител(и): NOVO NORDISK A/S , , DK-2880 BAGSVAERD , NOVO ALLE ( DK ) ; (72) Изобретател(и): JUNKER , FLEMMING . , HUMLEBAEK ( DK ) ; THEISEN , CLAUS F . , KOBENHAVN ( DK ) ; (74) Представител по индустриална собственост: Георги Цветанов Перев , 1124 София , ул. "Леонардо да Винчи" 3</p> <p>(86) № на PCT заявка: PCT/ DK91/0 / 0203 , 12.07.1991 (87) № и дата на PCT публикация: 92/009 / 98 , 23.01.1992</p>
--	--

**(54) КРИСТАЛНИ ХОРМОНИ НА РАСТЕЖА И МЕТОД ЗА ПРОИЗВОДСТВОТО ИМ**

(57) 1. Метод за производство на катионни кристали на RX или негови деривати, характеризиращ се с това, че към разтвор от RX или негови деривати се долавят катиони от органичен или неорганичен произход и органични разтворители или смес от органични разтворители при рН между 5,0 и 6,8, кристалите израстват при температура приблизително от 0 до 300С, след които посочените кристални катиони се изолират.

19 претенции , 0

BG 97281A

Кристални хормони на растежа и процес за  
производството им

Същност на изобретението

Настоящото изобретение се отнася за метод на производство на кристални хормони на растежа при наличието на катиони, нови кристални хормони на растежа и фармацевтични препарати съдържащи такива нови кристали.

Данни за изобретението

Хормоните на растежа при хора и домашни животни са протеини изградени приблизително от 191 аминокислини, синтезирани и секретирани от предния дял на хипофизата. Хормонът на растежа е ключов хормон, отговорен не само за соматичния растеж, но също и за регулиране на метаболизма на белтъци, въглехидрати и мазнини.

През последните 40 години се отдава голямо значение на разкриването на биохимичната функция на хормоните на растежа. Причината за този интерес в молекулярната функция на горния протеин почива на търговските интереси на ветеринарните и медицински среди. Генът на растежния хормон /РХ/ е клониран, човешкия растежен хормон /чРХ/ и Me<sup>t</sup>-чРХ обикновено се произвеждат биосинтетично чрез употреба на култури от бактерия и клетка на бозайник.

Фармацевтичните препарати на ХР са нестабилни. Разпадни продукти такива като сулфоксидни продукти и димерни или полимерни форми са произведени- особено в разтвори на ХР. Ето защо, днес ХР е лиофилизиран и съхраняван в лиофилизирана форма при 4<sup>o</sup> докато бъде създаден отново от пациента преди започване на употребата.

Предпочита се отново създадените препарати да се съхраняват при 4<sup>o</sup>С, за да се намали разграждането в разтвора. Обаче, известно разграждане са появява по време на такова съхранение, кое-

то може да продължи около 14 дни. Ето защо в производството има нужда от повече стабилни препарати на РХ.

Предимство би могло да бъде предотвратяване на лиофилизираната при производство на препарати с ХР. Лиофилизираната е отмащ време и скъп процес и често ограничаващо процедурата поради обема на сухото замръзване.

Настоящото изобретение се основава на изненадващото признаване, че гореспоменатите необходими са изпълнени чрез етапа на кристализация в производството на ХР.

Ръпреки лесно достъпно в достатъчно количество за кристализация, ХР досега отбягва успешна кристализация. Микрочристали или аморфни материали са докладвани от различни източници: *Jones* и сътр., Биотехнология /1987/ 5, 499-500; *Wilhelmi* и сътр. *J. Biol. Chem.* /1984/ 176, 735-745; *Clarkson* и сътр., списание Молекулярна биология /1989/ 208, 719-721; и и сътр., списание Биохимия /1985/ 260, 8520-8525.

Капковият метод е най-използвания метод за тази цел. Очевидно поради хетерогеността сред препаратите на хормоните на растежа размера и формата на кристалите се мени значително. Най-големите кристали са били открити от *Jones* и сътр. /1987/. За успешните си опити са използвали смес от полиетилен гликол 3500 и бета октил глюкозид в <sup>неутрално</sup> ~~киселинно~~ рН. *Clarkson* и сътр. допускат нарастване на кристалите от 0,001 до 0,005 мм<sup>3</sup> с различни форми. Никой от известните методи обаче не е подходящ за търговско производство на кристали на ХР поради факта, че за растежа са необходими от няколко седмици до една година.

Говеждия хормон на растежа е образуван за ветеринарна употреба в смес от двувалентни йони и мазнинина /EP 343 696/. Чрез добавянето на  $ZnCl_2$  или към говежди или към овнешки хормон на растежа в присъствието на неопределени липидни частици са

произведени, за да създадат пролонгирано освобождаваща се формула. Растежният хормон е разпръснат в носителя по такъв начин, че да хване 1 до 4 молекули  $Zn$  за 1 молекула хормон на растежа. Разтворите са приготвени при наличието на различни концентрации от денатуриращи разтвори /1 до 4 M от урея/ при високо рН /9,5/. Възпроизводството на този процес с чХР показва, че не е възможно да се произвеждат кристали по този начин.

От литературата е добре известно, че наличието на двувалентни катиони по време на процеса на кристализация позволява не само отлична ориентация по време на анализа, но също подобрява физичните условия за кристализацията на инсулина / *US* патент № 2174862/. Хормона на растежа е повече от три пъти по-голям от инсулина и има съвсем различна структура. Осудващо добавянето на катиони към разтвори съдържащи чХР допускат нарастване на устойчивостта, еднородни кристали на растежния хормон в голямо количество. Понаатък, времето необходимо за формирането на висококачествени кристали на чХР е сравнително кратко.

#### Съдържание на изобретението

В най-широк аспект, настоящото изобретение е свързано с процес на производство на катионни кристали на ХР или деривати на ХР, включвайки следните етапи:

- а. Добавяне на катиони от неорганично или органично естество към разтвор на ХР или деривати при рН между 5 и 8,
- б. Нарастване на кристалите при  $T^{\circ}$  от около 0 до около  $30^{\circ}C$ ,
- в. Изолиране на катионните кристали чрез известни средства.

В настоящия контекст, ХР се възнамерява да покрие всички разновидности на ХР включвайки човешки, говежди, свински, овнешки, и такъв от сьомга, пастърва или тон. Дериватите на ХР възнамеряват да покрият ХР на човешки или животински видове с малка разлика в протеинната редица. Така няколко аминокиселини

остатъци могат да бъдат премахнати или изместени от други аминокиселинни остатъци. При това покриването е общи форми за растежния хормон и неговите деривати така добре както растежния хормон с аминокиселинните остатъци добавени към *N* и/или *C*-терминалния край на протеина, така както Met-чРХ.

Процесът, съгласно настоящото изобретение, за първи път прави възможно производството на хичически устойчиви и еднакви катйонни кристали на ХР. Също така настоящия процес осигурява производството и на по-големи и по-малки кристали на хормона на растежа, според необходимостта.

pH в етап а. е за предпочитане от 5 до 7,5, по-желателно - от 5,0 до 6,8, още по-желателно - от 5,8 до 6,5 и най за предпочитане от 6,0 до 6,5.

Според препочитаното включване на изобретението, хормонът на растежа е от човешки произход.

Катйоните могат да бъдат от органичен или неорганичен произход. Двувалентните катйони за да предпочитане и  $Zn^{++}$  от неорганичните се оказва, че е подходящ за бързо формиране на стабилни кристали на ХР. Също така могат да бъдат използвани смесите на тези катйони.

Катйоните трябва да бъдат добавени в количество осигуряващо бързо и ефективно формиране на добре оформени кристали. Горната граница за количеството на добавените катйони е количеството, което причинява неспецифично утаяване на големи количества аморфни материали.

Ако се използва  $Zn^{++}$  подходящите концентрации са около 0,2 до 10 мол  $Zn^{++}$  / мол РХ. Обаче ако сместа с кристализиращата реакция съдържа буфер или друго съединение, което е способно да свързва някои от катйоните, т.е. в комплексна форма, по-голяма концентрация на катйоните ще е необходима, защото някои от последните

не са подходящи за процеса на кристализация.

За предпочитане е  $Zn^{++}$  да се използва в количество, което предизвиква образуването на кристали на ХР с моларно съотношение между  $Zn^{++}$  и ХР от около 0,2 до около 10, за предпочитане от около 0,5 до около 5 и по-желателно от около 0,5 до около 2.

В предпочитаното включване на изобретението се добавя органичен разтворител или смес от органични разтворители в етап а. Органичният разтворител може да се избере от групата на късо верижни алифатни, циклични или ароматни алкохоли и кетони. Подходящи органични разтворители са ацетон, метанол, етанол и 2-пропанол. Предпочитаният органичен разтворител е етанол или ацетон. Концентрацията на органичния разтворител може да бъде от 0,1 до 50% V/V, за предпочитане от 0,1 до 30%, по-желателно от 0,1 до 20%, още по-желателно - от 5 до 15% и най-желателно - от 5 до 12% V/V.

Настоящият процес може да се използва като бърз и ефикасен за производството на растежен хормон.

Настоящото изобретение също се отнася до нови катионни кристали на ХР или на негови деривати.

Предпочитаните кристали са кристалите на чРХ или кристалите на дериватите чРХ. Предпочитаният катион е този на  $Zn^{++}$  и моларното съотношение между  $Zn^{++}$  и ХР е от около 0,2 до 10, за предпочитане от 0,5 до 5, по-желателно от 0,5 до 2. Размерът на кристалите зависи от съотношението на  $Zn^{++}$  към ХР и избора и съдържанието на разтворителя използван в процеса.

Според настоящото изобретение, кристалите на чХР имат биологична активност еднаква с тази на стандарта на разтворения чХР в ин виво и ин виитро тестове. Новите кристали на ХР могат да бъдат използвани за същата цел, както търговските препарати с чРХ.

Настоящото изобретение предвижда възможността на производство на фармацевтични препарати, които са по-подходящи, особено за пациентите. Поради голямата стабилност на кристалите в разтвор настоящото изобретение, например, прави възможно производството на готови за употреба фармацевтични препарати под форма на разтвор, който не е необходимо да бъде създаден отново от пациента преди употреба.

Е по-натъшен аспект, изобретението осигурява ценен инструмент за производство и пречистване на РХ.

Подробно описание на изобретението

Началният материал, хормонът на растежа, който може да бъде от какъвто и да е произход и при желание неговите деривати в разтвор, с приспособен към концентрация, желателно по-голяма от около 0,1 мг/мл, по-желателно от около 4 до около 7 мг/мл и най-желателно около 6 мг/мл. рН за предпочитане е от 6 до 6,3 .

Към горепосочения разтвор може да бъде добавен органичен разтворител. Предпочитаният органичен разтворител е етанол, в концентрация, която може да варира между 0,1 и 20%, за предпочитане 5 и 15% и най-за предпочитане 6 и 12%.

Други разтворители, такива като ацетон, метанол или пропанол, могат да бъдат използвани самостоятелно и ли като смес или заедно с етанол в концентрация в границите от 1 до 50%.

Катионите от неорганично или органично естество или смесите се добавят към получения разтвор.

Предпочитан катион е  $Zn^{++}$ , който обикновено се използва в концентрация от 0,5 до 10 мол/мол РХ, за предпочитане от 1,0 до 3,0 мол/мол РХ, по-желателно от 1,1 до 2,2 мол/мол РХ и най-за предпочитане е от 1,2 до 2,0 мол/мол РХ.

Ако се използват други катиони от неорганично естество, а

не  $Zn^{++}$ , концентрацията може да варира между 0,5 и 10 мол/мол РХ.

Тогава кристалите нарастват за период от 1 до 120 часа, за предпочитане 5-72 часа, най-желателно - 20 - 48 часа, на температура между 0 и 30°C, за предпочитане от 4 до 25°C.

Кристалите могат да бъдат възстановени чрез центрофугиране или филтрация, последвана от промиване и / или сухо замръзване до премахване останалите органични разтворители.

Фармацевтични препарати на сухи кристали или на кристали в суспензия могат да бъдат създадени чрез използване на различни избрани буфери и други фармацевтично приемливи добавки.

По-нататък изобретението е илюстрирано, но не ограничено от следните примери:

#### ПРИМЕР 1

Кристализация на чРХ в присъствие на

500 мл от разтвор на чРХ произведен според *H. Dalboge* и сътр., Биотехнология /1987/, 5, 161-164, в концентрация 6 мг/мл е инкубиран в 10 mM фосфатен буфер  $/K_2H_2PO_4/$  и приспособен към pH 6,1 с  $H_3PO_4$ . Добавя се ацетон към крайна концентрация от 10% /V/V/ и след това се добавя разтвор на цинков ацетат към крайна концентрация 0,08 мг  $Zn$   $Ac_2$ ,  $2H_2O$  /мл  $\sim$  1,34 мол  $Zn^{++}$  /мол чРХ

Полученият разтвор се оставя при температура 15°C за 20 часа, при което се оформят кристалите.

След това кристалите се възстановяват и промиват три пъти с кристализационен буфер без ацетон. Кристализацията се проверява под микроскоп и размера на кристалите е до 8-12  $\mu m$ . На фигура 1 е показан фотомикрограф.

Производството на кристали на чРХ се определя от разтворимостта на промитите кристали в 7M уреа, последвано от йонен обменен НРИС анализ.

Производството се основава на повече от 50%.

ПРИМЕР 2

Пример 1 се повтаря с изключение на това, че се използва  $\text{Me}_2\text{-cPX}$  вместо  $\text{cPX}$ . Кристалите получени при този процес са идентични по форма и размер на тези, които са получени с  $\text{cPX}$ . Производството е по-голямо от 50%.

#### ПРИМЕР 3

Пример 1 се повтаря с изключение на това, че се пропуска добавянето на ацетон.

Кристалите на  $\text{cPX}$ , получени по този начин са много по-малки околкото кристалите получени при пример 1, по-малки от  $2\mu\text{m}$ .

#### ПРИМЕР 4

Пример 1 се повтаря при условия където ацетона е смесен с етанол и температурата по време на периода на растеж е  $20^\circ\text{C}$  вместо  $15^\circ\text{C}$ . Всички други експериментални условия са идентични на тези описани в пример 1. Чрез изменение на концентрацията на етанола, оптималната концентрация става 7,5% / V/V /. Производството се повишава над 80% ако създаденият флуид следващ първоначалната кристализация за 16 се допълва с още 4% V/V етанол и кристализационната температура се понижи от  $20^\circ$  на  $10^\circ\text{C}$  по време на период от 16 часа. Размерът на кристалите е между 3 до 6  $\mu\text{m}$  с форма подобна на описаната в пример 1.

#### ПРИМЕР 5

Определяне количеството  $\text{Zn}$  свързан в кристалите на  $\text{cPX}$

Примерът 1 се повтаря с изключение на това, че е добавен етанол в концентрация 7,5% / V/V / вместо ацетон и че кристалите се оформят за 16 часа при  $20^\circ\text{C}$ , след което кристалите се отделят от създадения флуид чрез центрофугиране и се промиват един път с 10 мм фосфатен буфер. Кристалите се разтварят чрез повишаване на pH до 8,0 с  $\text{NaOH}$ .  $\text{cPX}$  се измерва чрез йонобмен HPLC или чрез UV определяне. Концентрацията на  $\text{Zn}$  се измерва чрез атомна абсорбция и резултатите се сравняват с тези полу-

чени за цялата кристална суспензия. Съотношението на свързания към чРХ е 1,9 мола  $Zn$  за 1 мол чРХ.

#### ПРИМЕР 6

Формулиране на фармацевтичен препарат съдържащ чРХ

Кристалите нарастват, както описаните в пример 5 и се съхраняват при  $T^{\circ} - 4^{\circ}C$ . Тогава кристалите се изолират чрез центрофугиране и след това се отстраняват от ~~вещния~~ създадения флуид. В последствие кристалите се подлагат на сухо замразяване през нощта, за да се получат сухи кристали без да остане органичен разтворител. Фармацевтичната суспензия на сухите кристали се приготвя съгласно следната формула:

чРХ- кристали	1,3 мг/мл
$NaH_2PO_4, 2H_2O$	3,0 мг/мл
$Zn / Ac / 2, H_2O$	0,1 мг/мл
Глицерол	15,0 мг/мл
Бензилов алкохол	15,0 мг/мл

pH е нагласено на 6,2

#### ПРИМЕР 7

Пример 6 се повтаря с изключение на това, че се пропуска

$Zn / Ac / 2, H_2O$  и суспензията е със следната формула:

чРХ- кристали	1,3 мг/мл
$NaH_2PO_4, 2H_2O$	3,0 мг/мл
Глицерол	15,0 мг/мл
Бензилов алкохол	15,0 мг/мл

pH е нагласено на 6,2.

#### ПРИМЕР 8

Кристалите се третираат по същия начин както в пример 6 и следващата суспензия се формулира така:

чРХ- кристали	1,3 мг/мл
$NaH_2PO_4, 2H_2O$	2,5 мг/мл
$NaCl$	5,7 мг/мл

Бензилов алкохол

15,0 мг/мл

pH е нагласено на 6,2.

ПРИМЕР 9

Примерите са третирани по същия начин, както в пример 6 и е приготвен следния разтвор:

чХР- кристали

1,3 мг/мл

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

2,14 мг/мл

$\text{NaCl}$

9,0 мг/мл

pH е нагласено на 6,1.

ПРИМЕР 10.

Тибия тест

получените

За да се оцени биологичната активност *ин vivo* на промаринтескх кристали от чРХ съгласно изобретението, се извършва тибия тест върху хипофизектомирани плъхове. Тестът се извършва съгласно метода описан в Европейската фармакопеа.

Два препарата от кристали на чРХ произведени съгласно пример 1 и формулирани като препарати съгласно пример 9 / Ф-7 и Ф-8 / всеки съдържащ приблизително определено количество, еквивалентно на 4 ИЕд, се тества с разтворим чРХ стандартен препарат.

Получени са следните резултати:

ТАБЛИЦА 1

Активност на препаратите Ф-7 и Ф-8

Тест пре- парати	Активност % от станд дарта	ИЕд/ампула	95% достоверни гра- ници, % от стд.
Ф-7	90,1	3,9	87,6- 114,1
Ф-8	103,8	4,5	90,6- 110,4
Стд. чРХ 1986	$\bar{x}$ 100,0	$\bar{x}$ 4,4	-

От извършения тест може да се направи заключение, че кристалите на чРХ, съгласно изобретението имат еднаква биологична активност с разтворимия чРХ стандарт и следователно има биологична годност еднаква с тази на обикновения разтворим чРХ.

#### ПРИМЕР 11

Кристалите на чРХ израстват както описаните в пример 5. Непосредствено преди употреба се приготвя суспензия чрез centrifугиране на кристалите, следва премахване на образувания флуид и отново образуване на суспензия от кристалите в стерилен 10мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , рН 6,2, даваща накрая концентрация от 0,16 мг чРХ/мл суспензия.

Суспензията се използва, за да се определи активността на препаратa от кристали на чРХ в опит за напълняване. Тестът се извършва съгласно метода описан в Европейската фармакопея, с изключение на това, че времето за дозиране е удължено на 10 дни, за да се оптимизира биологичния отговор.

Използват се два препарата от кристали на чРХ, всеки от които съдържа еднакво количество протеин на чРХ, с това на препаратите със стандартен растежен хормон, използвани за тестване. Стандартът се стадава чрез сухо замразяване на чРХ.

Активността на препаратa от кристали на чРХ е 92,6% от тази на стандарта. 95% достоверни граници са 79,1-126,4% от стандарта.

Препаратът от кристали на чРХ, както бе показано, има биологична активност еднаква с тази на разтворимия чРХ стандарт.

#### ПРИМЕР 12

Стабилност на кристали от чРХ съхранявани в суспензия за 6 месеца при 22 - 24°C.

Кристалите са формирани както описаните в пример 1, с това изключение, че е добавен 7,5% / V/V / ацетон, вместо 10%.

Допуска се кристалите да останат в суспензия в образувания флуид за 6 месеца при 22 - 24°C. Проба от кристалите на чРХ

се взема чрез центрофугиране, еднократно се промива с кристализационен буфер без ацтон и се разтваря чрез повишаване на рН до 8,0.

Разтворените кристали на чРХ се подлагат на ионообмен НРІ С или ГРС за разлагане на дезамидни и отцепващи се форми, респективно димери и полимери.

Когато данните се сравняват с тези на лиофилизирания препарат на чРХ, съхраняван при 25°C за 32 дни, площта на основния пик на чРХ в образуваните кристали на чРХ е по-голяма от лиофилизирания чРХ, съхраняван при сравняеми условия / виж таблица 2/.

Т А Б Е Л И Ц А 2

	Образуван чРХ	Кристали
Съхранение	25°C 32 дни	22 - 24°C 6 месеца
Основен пик при ІЕ-НРІ С /%/	71,2	92,3
Димер /%/	0,7	1,2
Полимер /%/	0,3	0,3
Дезамидо /%/	25,9	5,0
Лидезамидо /%/	2,9	1,8
Сплит /отцепили се/ форми /%/	-	-

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Процес за производство на катионни кристали на РХ или на деривати на РХ, включващ следните етапи:
  - а. добавяне на катиони от неорганичен или органичен произход към разтвор на РХ или на негови деривати, при рН между 5 и 8,
  - б. нарастване на кристалите при температура от около 0 до около 30°C, и
  - в. изолиране на катионните кристали чрез познати средства.
2. Процес, съгласно претенция 1, при който рН в етап а. е от 5 до 7,5, за предпочитане от 5,0 до 6,8.
3. Процес, съгласно претенция 1, при който рН в етап а. е под 7.
4. Процес, съгласно претенция 1, при който рН в етап а. е от 5,8 до 6,5, за предпочитане от 6,0 до 6,5.
5. Процес, при който, съгласно някоя от предшестващите претенции, органичен разтворител или смес от органични разтворители се добавят в етап а.
6. Процес, при който, съгласно претенция 5, органичният разтворител се избира от групата съдържаща късоверижни алифатни, циклични или ароматни алкохоли или кетони.
7. Процес, при който, съгласно претенция 6, органичният разтворител е избран от групата съставена от ацетон, метанол, етанол и 2-пропанол.
8. Процес, при който, съгласно претенция 7, органичният разтворител е етанол или ацетон.
9. Процес, при който, съгласно една от претенциите 5 - 8, органичният разтворител се добавя в концентрация от около 0,1 до около 50% V/V.
10. Процес, при който, съгласно претенция 9, органичният разтворител се добавя в концентрация от 0,1 до 30%, за предпочитане от 0,1 до 20% за предпочитане от 5 до 15% и най-малко

предпочитане от 6 до 12%.

11. Процес, при който, съгласно претенции 1 - 10, катиона е двувалентен
12. Процес, при който, съгласно претенция 11, двувалентния катион е  $Zn^{++}$
13. Процес, при който, съгласно претенция 12,  $Zn^{++}$  се добавя в концентрация под границата на неспецифичната преципитация на аморфния материал.
14. Процес, при който, съгласно претенция 13,  $Zn^{++}$  се добавя в концентрация от 0,5 до 10 мол  $Zn^{++}$ /мол РХ.
15. Процес, при който, съгласно претенция 14, концентрацията на  $Zn^{++}$  е от 1,0 до 3,0 мол /молРХ, по-за предпочитане от 1,1 до 2,2 мол  $Zn^{++}$ /мол РХ и най-за предпочитане от 1,2 до 2,0 мол  $Zn^{++}$ /мол РХ.
16. Процес, при който, според някоя от предшестващите претенции, растежния хормон е чРХ или негови деривати.
17. Процес, при който, според някоя от предшестващите претенции, температурата в етап б. е от около 4 до около 25°C.
18. Катионни кристали от РХ или деривати на РХ.
19. Кристалите, съгласно претенция 17, са на чРХ или на негови деривати.
20. Кристали, при които, съгласно претенция 17 или 18, катиона е  $Zn^{++}$
21. Кристали, при които, съгласно претенция 19, моларното съотношение между  $Zn^{++}$  и РХ е от около 0,2 до около 10, за предпочитане от около 0,5 до 5 и най-за предпочитане от около 0,5 до 2,0.
22. Фармацевтични препарати, които съгласно някои от претенции 16 -20, съдържат кристали.
23. Използване на кристализационен процес, съгласно претенции 1-15, като преципитация и/или изолиращ етап в производството на РХ.

Добре аргументирано изложение относно претенциите  
обобщаващи новостите, творческите етапи /изобретенията/  
индустриалното приложение

Нито една от предшестващите методики включва процес за про-  
изводство на катионни кристали на РХ, включващ етапи от а. до  
с., съгласно настоящата претенция 1.

Освен това катионните кристали на човешкия РХ не са предви-  
дени в наличните предшестващи методики.

Съдържанието на претенции 1 - 17 представлява сбор от изис-  
квания на статия 33 /2/ РСТ.

Относно творческите етапи, *V.L. Spitsberg, Analytical Biochemistry*  
160, 489-495, 1987 /D1/ смята да представи завършените пред-  
шестваща методика.

Кристализационният процес, съгласно настоящото приложение,  
се отличава само по това, че в етап а. е добавен органичен раз-  
творител или смес от органични разтворители.

Тази техническа особеност позволява производството на по-  
големи кристали на РХ/ Пример 3, второто изречение: ако се про-  
пусне ацетона, получените кристали са много по-малки, отколкото  
ако в етап а. се добави ацетон./

Съгласно страница 494 на D 1/ дясна колона, последния пара-  
граф/ "...по-нататъшната работа е необходимо да усъвършенства  
кристализацията на говежди РХ. Възпроизводителни резултати трябва  
да бъдат търсени с увеличаване размерите и броят на криста-  
лите.../ цитат от D 1/.

И така, процесът, съгласно настоящото приложение, включва  
етап на изобретението.

чРХ получен чрез споменатия процес, се явява изобретение.

В действителност, както е показано на таблица 2, чРХ -крис-  
талите, получени съгласно настоящото приложение, където съхра-  
нението в суспензия за 6 месеца при температура 22 - 24°C, са

по-стабилни отколкото получения чрез лиофилизация чРХ-препарат.

И така, съдържанието на настоящите претенции 1 - 17 включва изискванията на статия 33 /3/ РСТ.

Някои недостатъци в международното приложение  
Описанието трябва да бъде въведено в съответствие с новите претенции изпълнени с вашите данни от 03/06/92.

## КОРИГИРАНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Процес за производство на катионни кристали на РХ или на деривати на РХ, включващ следните етапи:
  - а. към разтвор от РХ или негови деривати се добавят катиони от органичен или неорганичен произход и органични разтвори или смеси от органични разтворители при рН между 5,0 и 6,8,
  - б. израстване на кристалите при температура от около 0 до около 30°C, и
  - в. изолиране на споменатите кристални катиони чрез известни средства.
2. Процес, който съгласно претенция 1, има рН в етап а. от 5,8 до 6,5, за предпочитане от 6,0 до 6,5.
3. Процес, при който, съгласно претенция 1, органичният разтворител е избран от група съдържаща хлороверижни алифатни, циклически или ароматни алкохоли или кетони.
4. Процес, при който, съгласно претенция 3, органичният разтворител е избран от групата съдържаща ацетон, метанол, етанол и 2-пропанол.
5. Процес, при който, съгласно претенция 4, органичният разтворител е етанол или ацетон.
6. Процесът, при който съгласно някоя от претенциите 1 - 5, органичният разтворител се добавя в концентрация от около 0,1 до около 50% V/V.
7. Процес, при който, съгласно претенция 6, органичният разтворител се добавя в концентрация от 0,1 до 30%, за предпочитане от 0,1 до 20%, по-за предпочитане от 5 до 15% и най-за предпочитане от 6 до 12%.
8. Процес, при който, съгласно една от предшестващите претенции 1 - 7, катионът е двувалентен.
9. Процес, при който, съгласно претенция 8, двувалентният катион е  $Zn^{++}$ .

10. Процес, при който, съгласно претенция 9,  $Zn^{++}$  се добавя в концентрация под границата на неспецифична преципитация на аморфен материал.
11. Процес, при който, съгласно претенция 10,  $Zn^{++}$  се добавя в концентрация от 0,5 до 10 мол  $Zn^{++}$ /мол РХ.
12. Процес, при който съгласно претенция 11, концентрацията на  $Zn^{++}$  е от 1,0 до 3,0 мол  $Zn^{++}$ /мол РХ.
13. Процес, при който, съгласно някои от предшестващите претенции, расежният хормон е чРХ или негови деривати.
14. Процес, при който, съгласно някои от предшестващите претенции, температурата в етап б. е от около 4 до максимум 25°C.
15. Катионни кристали от чРХ или деривати на чРХ.
16. Кристали, в които, според претенция 15, катионът е .
17. Кристали, при които, съгласно претенция 16, моларното отношение между  $Zn^{++}$  и РХ е от около 0,2 до около 10, за предпочитане от около 0,5 до 5 и най- за предпочитане от около 0,5 до 2,0.
18. Фармацевтични препарати, които съгласно някои от претенциите 15 - 17, съдържат кристали.
19. Използване на кристализационен процес, съгласно претенции 1-14, като пречистващ и/или изолиращ етап в производството на РХ.