

23222

1222/34

59.159/SZE

K I V O N A T

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDANY

69682

Eljárás növekedési hormont és aszparagint tartalmazó stabilizált
gyógyszerkészítmény előállítására

Novo Nordisk A/S, BAGSVAERD, DÁNIA

A bejelentés napja: 1992. 12. 16.

Elsőbbsége: 1991. 12. 20. (2047/91), DÁNIA

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/DK92/00378.

A nemzetközi közzététel száma: WO 93/12811.

A találmány tárgya eljárás növekedési hormont és aszparagint tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítására, melynek során növekedési hormont vizes aszparagin-oldatban oldják és ad.os. liofilizálják.

Államtitár

XXXXXX

59.159/SZE

S.B.G. & K.
Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1051 Budapest, Dalszínház u. 10.
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

1 0 3 . 1 . 9 2

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDANY

ELJÁRÁS NÖVEKEDÉSI HORMONT ÉS ASZPARAGINT TARTALMAZÓ STABILIZÁLT
GYÓGYSZER-KÉSZÍTMÉNY ELŐÁLLÍTÁSÁRA

NOVO NORDISK A/S, BAGSVAERD, DÁNIA

Feltaláló:

SØRENSEN Hans, Holmegaard, VIRUM,
DÁNIA

A bejelentés napja: 1992. 12. 16.

Elsőbbsége: 1991. 12. 20. / 2047/91 /
DÁNIA

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/DK92/00378.

A nemzetközi közzététel száma: WO 93/12811.

A találmány növekedési hormont /GH/ tartalmazó stabilizált gyógyszer-készítmény~~re, a készítmény~~ előállítására alkalmas eljárásra és a növekedési hormon készítmények stabilizálásához aszparagin alkalmazására vonatkozik.

Az emberből és a szokásos háziállatokból származó növekedési hormonok mintegy 191 aminosavból álló fehérjék, amelyek a hipofízis elülső lebenyében szintetizálódnak és választódnak ki. Az emberi növekedési hormon 191 aminosavat tartalmaz.

A növekedési hormon nemcsak a testi növekedés, hanem a fehérjék, szénhidrátok és lipidek anyagcseréjének szabályozásában is kulcsszerepet betöltő hormon. A növekedési hormon fő hatása a növekedés előmozdítása.

A növekedési hormon befolyása alatt álló szervrendszerek közé tartozik a csontváz, kötőszövet, izomszövetek és zsigerek, mint a máj, bél és vese.

A növekedési hormon gén rekombináns technológiájának és klónozásának kifejlesztése ma már lehetővé teszi például a humán növekedési hormon /hGH/ és a Met-hGH ipari szintű előállítását, korábban azonban a hGH-t csak emberi holttestek hipofíziséből lehetett kivonni. A hGH erősen korlátozott hozzáférhetősége miatt e hormon használata gyermekkorban a hosszanti növekedés serkentésére és serdülőkorban a törpenövés kezelésére szorítkozott, noha egyebek mellett

növekedési hormon-hiány, Turner-szindróma okozta vagy normális alacsony termet, felnőttkori növekedési hormon-hiány, terméketlenség, égési sebek, sebgyógyulás, disztrófia, csontösszeforrás, csontritkulás, diffúz gyomorvérzés és álizület kezelésére is javasolták.

A növekedési hormont emellett háziállatok növekedési sebességének fokozására, vagy az emberi fogyasztásra szánt állatok zsirtömegének csökkentésére is ajánlották.

A növekedési hormont tartalmazó gyógyszer-készítmények bomlásra hajlamosak. Bomlástermékek, mint dezamidált vagy szulfoxidált termékek és dimer vagy polimer formák képződnek, főként a növekedési hormon oldataiban.

A hGH legfőbb bomlási reakciói közé tartoznak a következők: 1/ közvetlen hidrolizis vagy ciklusos szukcinimid közbenső terméken át végbemenő dezamidálás, melynek során különböző mennyiségű L-asp-hGH, L-izo-asp-hGH, D-asp-hGH és D-izo-asp-hGH képződik /1-3. irodalmi hivatkozás/, 2/ a 14- és 125-helyzetű metioninrészek oxidációja /4-9. hivatkozás/ és 3/ peptidkötések felhasadása.

A dezamidálás különösen a 149-helyzetű aszparaginon /Asn/ következik be.

A hGH elég könnyen oxidálódik a 14- és 125-helyzetben, különösen oldat formájában /4-8. hivatkozás/.

A hGH szulfoxidok képződéséhez vezető oxidációját

általában a készítményben feloldott oxigén okozza. Az oxigén oldékonysága desztillált vízben körülbelül 200 μM /9/. Mint-hogy a hGH koncentrációja egy 4 NE/ml készítményben 1,3 mg/ml /60 nM hGH/, szokásos tárolási körülmények között az oxigén mennyisége a hGH oxidációjához szükséges sztöchiometrikus mennyiség 3000-szerese. A probléma nem oldható meg a pufferek gáztalanítása útján a készítmények kitöltése vagy kiszerezése előtt.

Ma nem hisszük, hogy e bomlástermékek toxikusak lennének, vagy megváltozott biológiai aktivitással vagy receptorkötő tulajdonságokkal rendelkeznének, mégis bizonyos jelek arra utalnak, hogy a szulfoxidok szerkezeti stabilitása a nativ hGH-val összehasonlítva csökken.

Növekedési hormont tartalmazó stabil, oldat formájú készítmény kifejlesztéséhez fontos ismerni a szulfoxidok képződési sebességét, valamint az oxidáció visszaszorításának eszközét.

A bomlás kinetikája függ a hőmérséklettől, pH-tól és a hGH készítményben levő különböző adalékoktól vagy adjuvánsoktól.

Instabilitása miatt a növekedési hormont ma liofilezik és ebben a formában 4°C -on tárolják a felhasználása előtti rekonstruálásig /ujraoldásig/, hogy a bomlás a lehető legkisebb legyen.

A hGH-t tartalmazó liofilezett gyógyszer-készít-

ményeket ma a beteg rekonstruálja, majd a legfeljebb 14 napi felhasználási idő alatt 4°C -on oldatként tárolja. Ezen^a alatt bizonyos mértékű bomlás következik be.

Ezenfelül a liofilezett növekedési hormon rekonstruálási módja nehézséget jelenthet a beteg számára.

Ezért ma előnyösnek tartják, hogy a növekedési hormont a felhasználás előtt a lehető legkésőbb rekonstruálják és a készítményt liofilezett állapotban tárolják és szállítsák. A gyártótól a gyógyszertárig vezető lánc lehetővé teszi a készítmények alacsony hőmérsékleten, például 4°C -on történő ellenőrzött kezelését, ami 2 éves tárolási időt is lehetővé tesz.

Az öngyógykezeléshez használt írótollszerű rendszerek /pen systems/ elterjedt használata és a kibővült felhasználási terület azonban olyan készítményt igényel, amely a végső felhasználónál elég hosszú időn át stabil olyan körülmények között, ahol a "megfelelő" hűtés nem áll mindig rendelkezésre.

Előnyösen a végső felhasználónál a liofilezett állapotú készítmény mintegy 1 hónapig, és rekonstruált állapotban további 1 hónapig stabil egy írótollszerű eszközben /pen device/ a betét /cartridge/ tervezett felhasználási ideje alatt.

Stabilabb növekedési hormon-készítményekre van tehát szükség, amelyek bizonyos időn át viszonylag magas hő-

mérsékleten liofilezett állapotban, ezenfelül a felhasználási idő alatt viszonylag magas hőmérsékleten oldat formájában is stabilak. E stabilizálás igen nagy fontosságu, amikor a hormonkezelés a klinikáról a kezelendő egyén otthonába tevődik át, ahol - mint említettük - nem állnak rendelkezésre optimális tárolási körülmények.

Ezenfelül a növekedési hormon alkalmazását az író tollszerű eszköz használatára kell adaptálni, ami miatt a beteg által elvégzendő kezelés megkönnyítése céljából növekedési hormont tartalmazó stabil, oldott készítményre van szükség. Növekedési hormont tartalmazó stabil, oldott, használatra kész készítmény állítható elő az író tollszerű eszközbe beleillő betétek formájában, amelyeket a beteg közvetlenül használ a preparátum rekonstruálásának szükségessége nélkül és így nem kell liofilezett készítménnyel, rekonstruáláshoz szükséges hordozóanyaggal, szükséges jártassággal, valamint a készítmény steril rekonstruálásához steril felszereléssel rendelkeznie.

Biztonsági okokból az is előnyös, hogy a liofilezett készítmények közvetlenül a felhasználás előtti rekonstruálása mellőzhető.

További előnyt jelent a liofilező művelet elhagyása a növekedési hormon-készítmények előállításakor. A liofilezés időigényes és költséges művelet, és a fagyasztva-száritó berendezés korlátozott kapacitása következtében a terme-

lésben gyakran szűk keresztmetszetet képez.

Ezért szükség van a bomlási sebesség csökkentésére, hogy a feloldott hGH készítmények tárolásuk folyamán és felhasználási idejük alatt egészen 1 hónapig stabilak legyenek.

A hGH stabilizálására irányuló korábbi kísérleteknél nem sikerült teljesen kiküszöbölni a dimerképződést. A dimerképződéssel járó problémákat Becker G.W. írja le a Biotech. Appl. Biochem. 9, 478 /1987/ közleményben.

A WO 89/09614 számú nemzetközi szabadalmi bejelentés és a 30771/89 számú ausztráliai szabadalmi bejelentés humán növekedési hormont, glicint és mannitot tartalmazó stabil gyógyszer-készítményt ismertet. A készítmények liofilizett állapotban nagyobb stabilitással rendelkeznek normális feldolgozás és tárolás esetében, valamint a rekonstrukció utáni felhasználási időszak folyamán.

A 303 746 számú európai szabadalmi bejelentés szerint állati növekedési hormon különböző stabilizátorokkal történő stabilizálása az oldhatatlan anyagok kisebb mértékű képződéséhez és vizes környezetben az aktivitás megőrzéséhez vezet. Stabilizátorként egyes poliolokat, aminosavakat, fiziológiai pH-nál töltést hordozó oldallánccal rendelkező aminosavak polimerjeit és kolinsókat alkalmaztak. A poliolok közé nem-redukáló cukrok, cukoralkoholok, cukorsavak, pentaeritrit, laktóz, vízoldható dextránok és ficoll; az amino-

savak közé glicin, szarkozin, lizin vagy sói, szerin, arginin vagy sói, betain, N,N-dimetil-glicin, aszparaginsav vagy sói, glutaminsav vagy sói; fiziológiás pH-nál töltést viselő oldal-lánccal rendelkező aminosav-polimerek közé polilizin, poli-aszparaginsav, poliglutaminsav, poliarginin, polihisztidin, poliornitin és sóik; és a kolinszármazékok közé kolin-klorid, kolin-dihidrogén-citrát, kolin-bitartarát, kolin-bikarbonát, trikolin-citrát, kolin-aszkorbát, kolin-borát, kolin-glukonát, kolin-foszfát, di/kolin/-foszfát, di/kolin/-szulfát és di-/kolin/-mukát tartoznak.

Meglepő módon azt találtuk, hogy az adalékként vagy pufferként aszparagint tartalmazó humán növekedési hormon készítmények nagy stabilitást mutatnak dezamidálás, oxidáció és peptidkötés-felnyílás ellen. A termék stabilitása lehetővé teszi a liofilezett állapotú, vagy a feloldott vagy újrafeloldott készítmény tárolását és szállítását.

A találmány szerinti készítmény formája liofilezett por lehet, amit később rekonstruálni kell szokványos hordozóanyagok, mint desztillált víz vagy injekciókészítéshez használatos víz segítségével. Az ilyen hordozóanyagok szokásos tartósítószereket, mint m-krezolt és benzil-alkoholt tartalmazhatnak.

A találmány előnyben részesített kiviteli alakja növekedési hormont tartalmazó olyan készítmény, amelyben a növekedési hormon aszparagint tartalmazó, aszparagin puffer-

rel pufferezett vizes oldatban ^{oldunk} ~~van jelen~~. Az ilyen készítmények használatra kész formájuk és jelentős bomlás nélkül tárolhatók és szállíthatók.

Stabilitási okokból az oldat pH-ját előnyösen a 2 - 8 tartományba állítjuk be. Előnyösebbek az 5 - 8, különösen a 6 - 7,5 pH-ju készítmények.

Stabilizáló hatás elérés^e céljából az aszparagin használt mennyisége legfeljebb 100 mM. Az aszparagin koncentrációja előnyösen 2 - 20 mM, legelőnyösebben 2 - 10 mM.

A találmány szerinti készítmény liofilezett formája is lehet.

A találmány szerinti gyógyszer-készítmény a feldolgozás, például liofilezés megkönnyítése céljából sókat és szacharidokat is tartalmazhat. A liofilezéshez terjedelmesítő anyagként általában mannitot használunk.

A találmány további aspektusát az aszparagin felhasználása jelenti stabilizált növekedési hormon készítmények előállításához.

A fenti szövegösszefüggésben "növekedési hormon" alatt bármilyen eredetű növekedési hormont értünk, így madárból, ökörből, lóból, emberből, tojásból, sertésből, lazacból, pisztrángból vagy tonhalból, előnyösen ökörből, emberből vagy sertésből származót; legelőnyösebb a humán növekedési hormon. A találmány szerint használt növekedési hormon természetes forrásból izolált nativ növekedési hormon, például a hipofizis-

ből szokásos módon kivont növekedési hormon, vagy rekombináns technikákkal, például Jensen E.B. és Carlsen S. közleményében leírtak szerint nyert növekedési hormon lehet /Biotech. Bio-eng. 36, 1-11 /1990//. "Növekedési hormon-származék" lehet a növekedési hormon csonka formája, ahol egy vagy több aminosav hiányzik; a növekedési hormon olyan analógja, ahol a nativ molekulában egy vagy több aminosavat más aminosavmaradékkal, előnyösen egy természetes előfordulású aminosav maradékával helyettesítünk, amennyiben a helyettesítésnek nincs káros hatása, mint antigénképesség vagy csökkent hatás; vagy a növekedési hormon valamely származéka, például N- vagy C-terminális "nyulvánnyal" rendelkező formája, mint Met-hGH, Met-Glu-Ala-Glu-hGH vagy Ala-Glu-hGH. Előnyben részesített növekedési hormon a hGH.

A fenti összefüggésben "nagy stabilitást" akkor érünk el, ha a készítmény stabilabb, mint a foszfát puffert tartalmazó hagyományos készítmények.

A "sók" megjelölés a gyógyszer-készítmények további reagensre vonatkozik. E sók közé szerves savak, például citromsav, borkósav vagy ecetsav alkálifém-, alkáli-földfém- vagy ammóniumsói, például nátrium-citrát, nátrium-tartarát vagy nátrium-acetát, vagy ásványi savak, mint a sósav sói, például nátrium-klorid tartoznak.

A "szacharidok" mono- vagy diszacharidok vagy cukoralkoholok lehetnek, amelyek gyógyszer-készítményekben

szokásosan használatosak. Közéjük tartozik a laktóz és mannit.

A találmány szerinti preparáláshoz oldószerként vizet, továbbá alkoholokat, mint etil-, n-propil- vagy izo-propil-, butil-alkoholt, vagy ezek elegyeit alkalmazzuk. Az oldószer tartósítószerrel, mint m-krezolt vagy benzil-alkoholt tartalmazhat.

A találmány részletesebb magyarázatára szolgálnak a találmányt illusztráló alábbi példák, amelyek nem korlátozzák a találmány igénypontokban meghatározott hatókörét.

Kísérleti rész

Példa

A dezamidálódás csökkenése

A dezamidálódás sebességét 25°C-on vizsgáljuk 6 NE hGH-t 10 mM aszparagin jelenlétében /pH 6,5/ tartalmazó készítményen, összehasonlítva az azonos pH-ju és 7,3 pH-ju foszfát pufferrel készült preparátummal.

A hGH készítményeket úgy állítjuk elő, hogy 20 mg hGH-t 10 ml 10 mM aszparagin pufferben oldunk /a puffer előállítás: 13,2 g aszparagint 0,9% /térfogat per térfogat/ benzil-alkoholt tartalmazó 10 ml ionmentesített vízben oldunk és a fenti pH-ig 0,1N sósavoldatot adunk hozzá/.

Az alábbi táblázatban feltüntetett hGH készítmé-

nyeket 25°C-on tartjuk és dezamido-hGH tartalmukat IE-HPLC elemzés útján 14 és 30 nap múlva határozzuk meg. Az eredmények az előbbi táblázatban láthatók.

Táblázat

Dezamido-hGH tartalom a készítmény és a feloldási idő függvényében 25°C-on, IE-HPLC után meghatározva:

Készítmény / π /	Dezamido-vegyület képződése 25°C-on	
	14 nap / π /	30 nap
8 mM di-Na-foszfát, pH 6,5	7,8	10,8
8 mM di-Na-foszfát, pH 7,3	15,2	20,3
8 mM di-Na-foszfát, pH 6,5, 0,3% m-krezol	9,4	13,2
10 mM Asp, pH 6,5	21,7	nd
10 mM Asn, pH 6,5	6,5	8,3
10 mM Glu, pH 6,5	14,8	nd

π : 0,9% benzil-alkoholt tartalmaz a $\neq$ 3. kivételével. A kiindulóanyag dezamido-hGH tartalma 2,1%.

A fenti táblázatból kitűnik, hogy a hGH deamidálódását pH 6,5-nél az aszparagin hozzáadása mintegy 25%-kal csökkenti, összehasonlítva a foszfát pufferrel.

(aszparaginsav és glutaminsav)

Asp és Glu hozzáadása fokozza a dezamidálódás sebességét, összehasonlítva a 6,5 pH-ju foszfát pufferrel.

A fenti eredmények azt mutatják, hogy a dezamidálás sebességét a pH csökkentése és kis koncentrációju aszparagin hozzáadása - legfeljebb 100 mM, előnyösen mintegy 5 mM - csökkenti. A dezamidálás sebessége több mint 50%-kal csökkenthető a pH csökkentése és a foszfát puffer aszparagin-nal történő helyettesítése után.

A hasadást /peptidkötése hidrolizise/ pH 6,5-nél csökkenti az aszparagin, összehasonlítva a foszfát pufferrel.

Irodalom

- 1/ Wang Y.-C.J., Hanson M.A., Parenteral Formulations of Proteins and Peptides: Stability and Stabilizers. J. Parenteral Science and Technology 42 /Suppl./, 53-525 /1988/
- 2/ Manning M.C., Patel K., Borchardt R.T., Stability of Protein Pharmaceuticals. Pharm. Res. 6, 903-918 /1989/
- 3/ Johnson B.A., Shirokawa J.M., Hancock W.S., Spellman M.W., Basa L.J., Asward D.W., J. Biol. Chem. 264, 1462-71 /1989/
- 4/ Teh L.C. et al., J. Biol. Chem. 262, 785-794 /1987/
- 5/ Becker G.W. et al., Biotech. Appl. Biochem. 10, 326-337 /1988/
- 6/ Houghten R.A. et al., Arch. Biochem. Biophys. 178, 350-355 /1977/
- 7/ Riggin R.M. et al., Anal. Biochem. 167, 199-209 /1987/.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás növekedési hormont és aszparagint tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítására, azzal j e l l e m e z v e, hogy a növekedési hormont vizes aszparagin-oldatban oldjuk és ad.os. liofilizáljuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az oldatot liofilizáljuk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a vizes oldat pH-ját aszparaginnal 2 és 8 közötti értékre állítjuk.

4. Az 1 - 3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az aszparagint legfeljebb 100 mM koncentrációban alkalmazzuk.

5. Az 1 - 4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy sókat és szacharidokat is tartalmazó vizes oldatot alkalmazunk.

6. Az 1 - 5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy növekedési hormonként hGH-t alkalmazunk.

7. Aszparagin alkalmazása stabilizált növekedési hormon készítmények előállításához.

[Handwritten signature]