

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

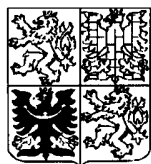
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

61-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **28. 06. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **12.07.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/000881**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17. 06. 98**
(Věstník č. 6/98)

(86) PCT číslo: **PCT/DK96/00290**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/02833**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 K 38/27
A 61 K 38/08

(71) Přihlášovatel:

NOVO NORDISK A/S, Bagsvaerd, DK;

(72) Původce:

Christensen Thorkild, Alleroed, DK;

Balschmidt Per, Espergaerde, DK;

Soerensen Hans Holmegaard, Virum, DK;

Olsen Ole Hvilsted, Broendhoej, DK;

Thim Lars, Gentofte, DK;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1,
Praha 4, 14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Stabilizovaný farmaceutický přípravek
obsahující růstový hormon a peptid**

(57) Anotace:

Je popsán farmaceutický přípravek, který obsahuje růstový hormon a peptid obsahující alespoň jeden zbytek bazické aminokyseliny a alespoň jeden zbytek kyselé aminokyseliny, a způsob výroby tohoto přípravku. Je popsáno použití peptidu, který obsahuje alespoň jeden zbytek bazické aminokyseliny a alespoň jeden zbytek kyselé aminokyseliny, pro výrobu stabilizovaného přípravku s růstovým hormonem. Je popsán také způsob léčení poruchy ovlivnitelné růstovým hormonem, podle kterého se podává uvedený farmaceutický přípravek.

CZ 61-98 A3

Farmaceutický přípravek, způsob jeho výroby, použití peptidu, který obsahuje alespoň jeden zbytek bazické aminokyseliny a alespoň jeden zbytek kyselé aminokyseliny, a způsob léčení poruchy ovlivnitelné růstovým hormonem

Oblast techniky

Předložený vynález se týká farmaceutického přípravku, který obsahuje růstový hormon, způsobu výroby tohoto farmaceutického přípravku, použití peptidu, který obsahuje alespoň jeden zbytek bazické aminokyseliny a alespoň jeden zbytek kyselé aminokyseliny, pro stabilizování přípravku s růstovým hormonem a způsobu léčení poruchy ovlivnitelné růstovým hormonem.

Dosavadní stav techniky

Růstové hormony z člověka a z obvyklých domácích zvířat jsou proteiny s přibližně 191 aminokyselinami, které jsou syntetizovány a sekretovány z přední smyčky podvězku mozkového. Lidský růstový hormon sestává ze 191 aminokyselin.

Růstový hormon je klíčový hormon, který je zahrnut v regulaci nejen somatického růstu, ale také v regulaci metabolismu proteinů, uhlovodíků a tuků. Hlavním účinkem růstového hormonu je podporovat růst.

Mezi orgánové systémy, které jsou ovlivněny růstovým hormonem, patří kostra, pojivové tkáně, svaly a vnitřnosti, jako jsou játra, střeva a ledviny.

Až do vyvinutí rekombinantní technologie a klonování genu růstového hormonu, které nyní zvýšily výrobu např. lidského růstového hormonu (hGH) a Met-hGH v průmyslovém měřítku, mohl být lidský růstový hormon získáván pouze extrakcí z podvězků mozkových mrtvých lidí. Velmi omezené dodávky růstového hormonu omezovaly jeho použití pro podporu dlouhivého růstu v dětství a v pubertě při léčení trpasličího vzrůstu, i když byl navržen

mimo jiné pro léčení krátké postavy (díky deficitu růstového hormonu, normální krátké postavy a Turnerova syndromu), deficitu růstového hormonu u dospělých, neplodnosti, léčení popálenin, hojení ran, dystrofie, zpevnění kostí, osteoporózy, difuzního žaludečního krvácení a pseudoartrózy.

Dále byl růstový hormon navržen pro zvýšení rychlosti růstu domácích zvířat nebo pro snížení podílu tuku u zvířat, která se porážejí pro spotřebu lidí.

Farmaceutické přípravky růstového hormonu mají tendenci být nestálé. Degradační produkty, jako jsou deamidované nebo sulfoxylované produkty a dimerní nebo polymerní formy, vznikají zvláště v roztocích růstového hormonu.

Převládajícími degradačními reakcemi hGH jsou 1. deamidace přímou hydrolýzou nebo přes cyklický sukcinimidový meziprodukt za vzniku různých množství L-asp-hGH, L-iso-asp-hGH, D-asp-hGH a D-iso-asp-hGH [Y.-C.J.Wang a M.A.Hanson: *J. Parenteral Science and Technology* 42 (Suppl.), 53 (1988), M.C.Manning, K. Patel a R.T.Bochardt: *Pharmaceutical Research* 6(11), 903 (1989) a B.A. Johnson, J.M.Shirokawa, W.S.Hancock, M.W.Spellman, L.J. Basa a D.W.Asward: *J. Biol. Chem.* 264, 1452 (1989).] a 2. oxidace methioninových zbytků v polohách 14 a 125 [L.C.Teh a spol.: *J. Biol. Chem.* 262, 785 (1987), G.W.Becker a spol.: *Biotech. Appl. Biochem.* 10, 326 (1988), R.A.Houghten a spol.: *Arch. Biochem. Biophys.* 178, 350 (1977), R.M.Riggin a spol.: *Anal. Biochem.* 167, 199 (1987), P.Gellerfors a spol.: *Acta Paediatr. Scand.* 370 (suppl.), 93 (1990) a M.J.Kaufman: *Pharm. Res.* 7(3), 289 (1990).]. Hlavním degradačním produktem hGH v lyofilizovaném stavu stejně jako v roztoku je deamidovaný hGH.

K deamidaci zvláště dochází na Asn v poloze 149 a v menším rozsahu v poloze 152.

hGH se také snadno oxiduje v polohách 14 a 125, zvláště v roztoku [L.C.Teh a spol.: *J. Biol. Chem.* 262, 785 (1987), G.

W.Becker a spol.: Biotech. Appl. Biochem. 10, 326 (1988), R.A. Houghten a spol.: Arch. Biochem. Biophys. 178, 350 (1977), R.M. Riggin a spol.: Anal. Biochem. 167, 199 (1987) a P.Gellerfors a spol.: Acta Paediatr. Scand. 370 (suppl.), 93 (1990).].

Oxidace hGH v roztoku za vzniku sulfoxidů probíhá normálně díky kyslíku, který je v přípravku rozpuštěn. Rozpustnost kyslíku v destilované vodě je kolem 200 μM [M.J.Kaufman: Pharm. Res. 7(3), 289 (1990).]. Jelikož koncentrace hGH v přípravku obsahujícím 4 m.j./ml je 1,3 mg/ml, což odpovídá 60nM hGH, bude kyslík za normálních podmínek skladování přítomen v asi 3000-násobném stechiometrickém nadbytku pro oxidaci hGH. Není snadné vyřešit tento problém odvzdušněním pufrů před uzavřením a zabalením přípravků.

V dnešní době se nepředpokládá, že by tyto tyto deamidované formy a oxidované formy hGH měly mít toxickou nebo pozměněnou biologickou aktivitu nebo vlastnosti vázání na receptor, ale existuje náznak toho, že konformační stabilita sulfoxidů je snížena při srovnání s přírodním hGH.

Pro vyvinutí stabilního rozpuštěného přípravku obsahujícího hGH je důležité znát rychlost deamidace a tvorby sulfoxidů stejně jako způsoby regulace těchto reakcí.

Kinetiky degradace závisejí na teplotě, pH a různých přísadách nebo adjuvans v prostředí s hGH.

Vzhledem k nestabilitě je dnes růstový hormon lyofilizován a skladován v lyofilizované formě při 4 °C, dokud není rekonstituován pro použití, aby se tak minimalizovala degradace.

Lyofilizované farmaceutické přípravky obsahující hGH jsou dnes rekonstituovány pacientem a potom jsou během používání skladovány jako roztok po dobu až 14 dnů při 4 °C, při čemž dochází k částečné degradaci.

Postup rekonstituování lyofilizovaného růstového hormonu představuje pro pacienta obtíže. V dnešní době je tedy výhodné rekonstituovat růstový hormon co nejpozději před použitím a skladovat a zasílat přípravek v lyofilizovaném stavu. Řetěz od výrobce do lékárny je vhodný pro zacházení s prostředky za regulované nízké teploty, např. 4 °C, což umožňuje dlouhou životnost až dvou let.

Avšak rozšířené použití injekčních per pro samoléčení a rozšířená oblast používání volá pro prostředku, který je stabilní po dostatečně dlouhou dobu i u konečného uživatele za podmínek, kde není vždy dostupné "dostatečné" chlazení.

Prostředek by měl být stabilní s výhodou v lyofilizovaném stavu, u konečného uživatele po dobu jednoho měsíce a v injekčním peru v rekonstituovaném stavu další jeden měsíc pro zamýšlenou dobu používání náplně.

Existuje tedy potřeba stabilnějších prostředků s růstovým hormonem v lyofilizovaném stavu za relativně vysoké teploty a po další dobu používání za relativně vysoké teploty v roztoku. Tato stabilizace je velmi důležitá, jestliže se podávání růstového hormonu přenesse z klinik do bytů jednotlivců, kteří mají být léčeni, při čemž tam nemusí být dostupné optimální podmínky, jak shora uvedeno.

Dále pak posun podávání růstového hormonu k použití injekčního pera opět volá po stabilním rozpuštěném přípravku obsahujícím růstový hormon, aby se usnadnilo zacházení, které musí pacient provádět. Stabilní rozpuštěný přípravek obsahující růstový hormon se může vyrábět pro okamžité použití ve formě náplně pro injekční pero používané pacientem, který se může vyhnout rekonstituování přípravku a tedy nemusí mít lyofilizovaný přípravek, vhodné ředidlo pro rekonstituci a také nutnou zručnost a sterilní zařízení pro sterilní rekonstituci přípravku.

Z bezpečnostních důvodů bude také žádoucí vyhnout se re-

konstituci lyofilizovaného přípravku přímo před použitím přípravku.

Dále by bylo také výhodné vyhnout se stupni lyofilizace při výrobě přípravků s růstovým hormonem. Lyofilizace spotřebovává čas, jde o drahý postup a často také představuje "úzké místo" při výrobě vzhledem k omezené kapacitě vymrazovače.

Existuje tedy potřeba snížit rychlost degradačního procesu, aby se umožnilo, že rozpuštěné přípravky s hGH budou stabilní během svého skladování a během používání po dobu až jednoho měsíce.

Dřívější pokusy stabilizovat hGH plně neuspěly při předcházení tvorbě dimeru. Tyto problémy související s tvorbou dimeru jsou zaznamenány např. Beckerem G.W.: *Biotechnology and Applied Biochemistry* 9, 478 (1987).

Mezinárodní patentový spis č. WO 89/09614 a australská patentová přihláška č. 30771/89 popisují stabilní farmaceutický prostředek, který obsahuje lidský růstový hormon, glycin a manitol. Tento přípravek vykazuje zlepšenou stabilitu během normálního zpracování a skladování v lyofilizovaném stavu stejně jako v době používání po rekonstituci.

Publikovaná evropská patentová přihláška č. 303 746 popisuje, že zvířecí růstový hormon může být stabilizován různými stabilizátory, které snižují tvorbu nerozpustných podílů a chrání aktivitu roztoku ve vodných prostředích. Mezi tyto stabilizátory patří některé polyoly, aminokyseliny, polymery aminokyselin s nabitou postranní skupinou při fyziologickém pH a soli cholinu. Polyoly jsou vybrány ze skupiny sestávající z neredukujících cukrů, cukerných alkoholů, cukerných kyselin, pentaerythritolu, laktosy, ve vodě rozpustných dextranů a Ficollu; aminokyseliny jsou vybrány ze skupiny sestávající z glycinu, sarkosinu, lysinu nebo jeho solí, serinu, argininu nebo jeho solí, betainu, N,N-dimethyl-glycinu, kyseliny aspar-

tové nebo jejích solí, kyseliny glutamové nebo jejích solí; polymery aminokyselin, které mají nabitou postranní skupinu při fyziologickém pH, mohou být vybrány z polylysinu, polyaspartové kyseliny, polyglutamové kyseliny, polyargininu, polyhistidinu, polyornithinu a jeho solí; a cholinové deriváty jsou vybrány ze skupiny sestávající z cholinchloridu, cholindihydrogencitrátu, cholinhydrogenvinanu, cholinhydrogenuhličitanu, tricholincitrátu, cholinaskorbátu, cholinborátu, cholinglukonátu, cholinfosfátu, dicholinsulfátu a cholinmukátu.

USA patentový spis č. 4 917 685 popisuje dodávací zařízení navržené pro implantaci, které obsahuje růstový hormon stabilizovaný použitím stejných stabilizátorů, jako je uvedeno v evropském patentu 303 746.

Publikovaná evropská patentová přihláška č. 374 120 popisuje stabilizovaný přípravek obsahující hGH a polyol, který má tři hydroxyskupiny. Zmíněn je glycerol a tri(hydroxymethyl)-aminomethan. Dále je popsána přítomnost hydrochloridu histidinu jako pufru spolu s polyolem.

Mezinárodní patentový spis č. WO 93/12811 popisuje stabilní přípravky s růstovým hormonem ve formě lyofilizovaného prášku nebo vodného roztoku obsahujícího asparagin.

Mezinárodní patentový spis č. WO 93/12812 popisuje stabilní přípravky s růstovým hormonem ve formě lyofilizovaného prášku nebo vodného roztoku obsahujícího histidin. V těchto přípravcích je deamidace snížena o 25 až 30 % při srovnání s odpovídajícím přípravkem růstového hormonu, který obsahuje fosforečnanový pufr.

Mezinárodní patentový spis č. WO 93/19776 popisuje proteinové přípravky s růstovým hormonem, které obsahují jako pufrovací látku citrát, jako stabilnější než přípravky, které obsahují fosforečnanový pufr. Tyto přípravky mohou obsahovat také aminokyseliny, jako je glycin a alanin a/nebo manitol nebo jiné

cukerné alkoholy a/nebo glycerol a/nebo jiné uhlovodíky a popřípadě ochranné činidlo, jako je benzylalkohol.

Mezinárodní patentový spis č. WO 94/03198 popisuje stabilní vodný přípravek s lidským růstovým hormonem, pufrem, neiontovým povrchově aktivním činidlem a popřípadě neutrální solí, manitolem nebo ochranným činidlem.

Podstata vynálezu

Překvapivě bylo nyní zjištěno, že přípravek s lidským růstovým hormonem obsahující jako přísadu peptid, který obsahuje alespoň jeden zbytek bazické aminokyseliny a alespoň jeden zbytek kyselé aminokyseliny, vykazuje velmi vysokou stabilitu vůči deamidaci a oxidaci. Stabilita tohoto produktu umožňuje skladování a zasílání tohoto přípravku v lyofilizovaném stavu nebo ve formě rozpuštěného nebo znovu rozpuštěného přípravku.

Peptid, který obsahuje alespoň jeden zbytek bazické aminokyseliny a alespoň jeden zbytek kyselé aminokyseliny, který se používá podle předloženého vynálezu, může znamenat peptid obsahující až od 10 do 20 aminokyselinových zbytků, s výhodou 3 až 10 aminokyselinových zbytků, výhodněji 3 až 6 aminokyselinových zbytků, jako jsou 3 nebo 4 aminokyselinové zbytky. Podle jednoho aspektu tohoto vynálezu bazický a kyselý aminokyselinový zbytek kratšího peptidu jsou odděleny jedním nebo dvěma zbytky aminokyselin.

Farmaceutické přípravky podle vynálezu se mohou připravovat pro podávání jakýmkoliv vhodným způsobem, např. parenterálním nebo orálním podáváním nebo podáváním do mukózní membrány, např. nazálním podáváním. Farmaceutický přípravek se může připravit ve formě dávky, která je obsažena v lékovce nebo kazetě nebo v jakékoliv vhodné nádobě, jako je předem naplněná injekční stříkačka nebo injekční pero.

Přípravek podle vynálezu může tedy existovat ve formě lyo-

filizovaného prášku, který se musí později rekonstituovat konvenčními ředidly, jako je destilovaná voda nebo voda pro injekce, nebo ve formě roztoku obsahujícího růstový hormon. Tato ředidla mohou obsahovat konvenční ochranná činidla, jako je benzylalkohol a fenoly, např. fenol nebo m-kresol nebo jejich směs.

Výhodným provedením podle vynálezu je taková forma farmaceutického přípravku s lidským růstovým hormonem obsahujícím peptid, který obsahuje alespoň jeden zbytek bazické aminokyseliny a alespoň jeden zbytek kyselé aminokyseliny, a dále obsahujícím nosič ve formě pufrovaného vodného roztoku růstového hormonu. Tento prostředek je připraven k okamžitému použití a může být skladován a zasílán jako vodný roztok bez jakékoliv značné degradace.

Pufrem, který se používá v roztoku růstového hormonu, může být např. histidinový, citrátový, vínanový nebo fosforečnanový puf.

Z důvodů stability se pH tohoto roztoku s výhodou upraví na hodnotu v rozmezí od 2 do 8, s výhodou od 5 do 7, výhodněji od 6,0 do 7,0, ještě výhodněji od 6,0 do 6,8.

Aby se získal stabilizující účinek, peptid, který obsahuje alespoň jeden zbytek bazické aminokyseliny a alespoň jeden zbytek kyselé aminokyseliny, se s výhodou přidává v množství až 100 mM, výhodněji v množství 1 až 10 mM, výhodněji 2 až 6 mM, nejvýhodněji 3 až 5 mM.

Farmaceutický přípravek podle vynálezu může dále obsahovat soli pro úpravu tonicity a popřípadě excipient, aby se usnadnilo jeho zpracování, např. lyofilizace, a rychlé a úplné rozpuštění lyofilizovaného přípravku, když se přípravek před použitím rekonstituuje.

Excipient může být vybrán z disacharidů, jako je laktosa,

trehalosa a sacharosa, cukerných alkoholů, jako je sorbitol nebo manitol, polysacharidů, jako jsou polymerní formy Dextranu^(R), jako je Dextran^(R) 40, Dextran^(R) 70 nebo Dextran^(R) 75, a Ficoll^(R), a vícemocných alkoholů, jako je polyethylenglykol nebo polyvinylalkohol nebo kombinace dvou nebo více z uvedených.

V dalším aspektu se tento vynález týká způsobu přípravy farmaceutického přípravku obsahujícího růstový hormon, peptid, který obsahuje alespoň jeden zbytek bazické aminokyseliny a alespoň jeden zbytek kyselé aminokyseliny, při čemž růstový hormon je rozpuštěn v roztoku obsahujícím peptid, který obsahuje alespoň jeden zbytek bazické aminokyseliny a alespoň jeden zbytek kyselé aminokyseliny, rozpuštěním peptidu, který obsahuje alespoň jeden zbytek bazické aminokyseliny a alespoň jeden zbytek kyselé aminokyseliny v deionizované vodě, popřípadě obsahující benzylalkohol, přidáním růstového hormonu a popřípadě úpravou pH na hodnotu od 2 do 8.

Hodnota pH se může upravit přidáním kyseliny, která nemá žádný nepříznivý účinek na růstový hormon, s výhodou fyziologicky přijatelné kyseliny, např. minerální kyseliny, jako je kyselina chlorovodíková, kyselina sírová nebo kyselina dusičná, nebo organické kyseliny, jako je kyselina octová.

V provedení podle způsobu podle vynálezu se přidávají případně soli a excipient, načež se roztok naplní do nádoby a lyofilizuje se.

Ještě jiný aspekt vynálezu se týká použití peptidu, který obsahuje alespoň jeden zbytek bazické aminokyseliny a alespoň jeden zbytek kyselé aminokyseliny, pro přípravu stabilizovaného přípravku růstového hormonu.

V ještě jiném aspektu se tento vynález týká způsobu léčení poruchy, která je ovlivnitelná růstovým hormonem, vyznačující se tím, že zahrnuje podávání přípravku, který obsahuje růstový

hormon a peptid, který obsahuje alespoň jeden zbytek bazické aminokyseliny a alespoň jeden zbytek kyselé aminokyseliny.

V předložené souvislosti "růstový hormon" může znamenat růstový hormon jakéhokoliv původu, jako je ptačí, hovězí, koňský, lidský, ovčí, prasečí, lososový, pstruží nebo tuňáčí růstový hormon, s výhodou hovězí, lidský nebo prasečí, nejvýhodnějším je lidský růstový hormon. Růstový hormon používaný podle vynálezu může znamenat přírodní růstový hormon izolovaný z přírodního zdroje, např. extrakcí podvězků mozkových konvenčním způsobem, nebo růstový hormon připravený rekombinantními technikami, např. tak, jak popisují E.B.Jensen a S.Carlsen: *Bio-tech. and Bioeng.* 36, 1 (1990). "Růstový hormon" může znamenat také upravenou formu růstového hormonu, v němž je jeden nebo více zbytků aminokyselin deletován(o), jeho analog, v němž jeden nebo více aminokyselinových zbytků v přírodní molekule je substituován(o) zbytkem jiné aminokyseliny, s výhodou zbytkem přirozené aminokyseliny, pokud tato substituce nemá nějaký nepříznivý vliv, jako je antigeničnost nebo snížený účinek, nebo jeho derivát, např. takový, který má prodloužení na N- nebo C-konci, jako je Met-hGH. Výhodným růstovým hormonem je hGH.

Pojem "dávka" růstového hormonu se týká množství, které poskytuje léčivý účinek při režimu podávání. Přípravky se připravují tak, aby obsahovaly alespoň 0,1 mg/ml hGH, s výhodou až 10 mg/ml, s výhodou od 1 mg/ml do 40 mg/ml, výhodněji od 1 mg/ml do 40 mg/ml, výhodněji od 1 mg/ml do 25 mg/ml, např. od 1 mg/ml do 5 mg/ml, vypočteno pro přípravek určený k okamžitému použití. Při použití těchto prostředků pro podávání člověku, který trpí trpasličím vzrůstem díky nízké funkci podvězku mozkového, tyto přípravky obsahují například od 0,1 mg/ml do 10 mg/ml, podle běžně zamýšleného režimu dávkování pro zamýšlené léčení. Koncentrační rozsah není pro vynález rozhodující, může se měnit podle dohledu lékaře nad podáváním.

Peptid, který obsahuje alespoň jeden zbytek bazické aminokyseliny a alespoň jeden zbytek kyselé aminokyseliny, který se

používá podle předloženého vynálezu, s výhodou obsahuje přirozeně se vyskytující zbytky α -aminokyselin. Aminokyseliny mohou znamenat l nebo d aminokyseliny nebo jejich směsi.

"Zbytky kyselých aminokyselin" jsou např. Glu nebo Asp, "zbytky bazických aminokyselin" jsou např. Lys nebo Arg.

V předložené souvislosti se "vysoká stabilita" získává tehdy, když přípravek je stabilnější než konvenční přípravek, který obsahuje fosforečnanový pufr, a s výhodou je tak stabilní, jako odpovídající přípravek, který obsahuje jako stabilizátor histidin, při čemž deamidace hGH je snížena o přibližně 20 % při srovnání s fosforečnanovým pufrem, jak je popsáno ve spisu WO 93/12812.

Rozpouštědlo použité ve způsobu podle vynálezu může znamenat vodu, alkoholy, jako je ethyl-, propyl-, isopropyl- nebo butyl-alkohol, nebo jejich směsi. Rozpouštědlo může obsahovat ochranné činidlo, jako benzylalkohol a fenoly, např. fenol nebo m-kresol, nebo jejich směsi.

Tento vynález je podrobněji vysvětlen v následujících příkladech, které ilustrují vynález. Tyto příklady nejsou zamýšleny jako omezení rozsahu vynálezu tak, jak je definován připojenými nároky.

Příklad provedení vynálezu

Zmenšení deamidace

Rychlost deamidace byla zkoumána při 37 °C u hGH přípravků obsahujících 4 mg/ml hGH, při pH 6,8, v přítomnosti 5mM peptidu, který obsahuje alespoň jeden zbytek bazické aminokyseliny a alespoň jeden zbytek kyselé aminokyseliny (Lys-Gly-Asp-Ser), při srovnání s histidinem při pH 6,8.

hGH přípravky byly připraveny rozpuštěním 8 mg hGH ve 2

ml 10mM roztoku Lys-Gly-Asp-Ser nebo histidinu. Přidají se tedy 2 ml 3,0% (hmotn.) benzylalkoholu, aby se získala konečná koncentrace 4 mg/ml hGH, 5mM Lys-Gly-Asp-Ser nebo histidinu, 1,5% (hmotn.) benzylakoholu, pH 6,8 (upraví se přidáním HCl nebo NaOH).

hGH prostředky uvedené níže v tabulce byly skladovány 7 dnů při 37 °C a analyzovány na obsah deamidovaného hGH IE-HPLC. Výsledky jsou zřejmé z následující tabulky.

Tabulka

přípravek	počáteční pH/ /koncové pH/ /% desamido	opravený obsah deamidovaného hGH*	obsahy des- amido-hGH při srovnání s His
Lys-Gly-Asp-Ser	6,8/6,8/13,6	13,6	83
histidin	6,8/6,8/16,4	16,4	100

* Desamido opraveno o 1 % na 0,1 jednotky pH odchylky od hodnoty 6,8.

Obsah deamidovaného hGH ve výchozím materiálu byl 2,0 % hmotn.

Ze shora uvedené tabulky je vidět, že deamidace hGH je snížena přidáním Lys-Gly-Asp-Ser na alespoň stejnou hladinu, jaká se získá přidáním histidinu (25 až 30 % hmotn. při srovnání s fosforečnanovým pufrem, viz shora spis WO 93/12812.

Shora uvedené výsledky ukazují, že rychlost deamidace je snížena ve velkém rozsahu přidáním Lys-Gly-Asp-Ser v nízké koncentraci až 100 mM, s výhodou 1 až 10 mM, výhodněji 2 až 6 mM a nejvýhodněji 3 až 5 mM. Rychlost deamidace může být tsk snížena o více než 30 % náhradou fosforečnanového pufru Lys-Gly-Asp-Ser.

Zdá se, že použití benzylalkoholu jako ochranného činidla nemá na rychlost deamidace žádný vliv.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Farmaceutický přípravek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje růstový hormon a peptid, který obsahuje alespoň jeden zbytek bazické aminokyseliny a alespoň jeden zbytek kyselé aminokyseliny.
2. Farmaceutický přípravek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje nosič ve formě pu-frovaného vodného roztoku růstového hormonu obsahujícího peptid, který obsahuje alespoň jeden zbytek bazické amino-kyseliny a alespoň jeden zbytek kyselé aminokyseliny.
3. Farmaceutický přípravek podle nároku 1 nebo 2, v y - z n a č u j í c í s e t í m, že pH je upraveno na hod-notu v intervalu od 2 do 8.
4. Farmaceutický přípravek podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že koncentrace peptidu, který obsahuje alespoň jeden zbytek bazické ami-nokyseliny a alespoň jeden zbytek kyselé aminokyseliny, je až 100 mM.
5. Farmaceutický přípravek podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje soli a/nebo sacharidy.
6. Farmaceutický přípravek podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že růstový hormon znamená lidský růstový hormon.
7. Způsob výroby farmaceutického přípravku, který obsahuje růstový hormon a peptid, který obsahuje alespoň jeden zby-tek bazické aminokyseliny a alespoň jeden zbytek kyselé aminokyseliny, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje a) rozpuštění peptidu v deionizované vodě, která popřípadě obsahuje ochranné činidlo, za vzniku roztoku,

b) přidání růstového hormonu k tomuto roztoku a c) popřípadě úpravu pH na hodnotu od 2 do 8.

8. Způsob výroby farmaceutického přípravku podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se případně přidají soli a/nebo excipient, načež se roztok naplní do zásobníku a lyofilizuje se.
9. Použití peptidu, který obsahuje alespoň jeden zbytek bazické aminokyseliny a alespoň jeden zbytek kyselé aminokyseliny, pro výrobu stabilizovaného přípravku s růstovým hormonem.
10. Způsob léčení poruchy ovlivnitelné růstovým hormonem, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se podává přípravek podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6.

Zastupuje: