

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

201 681 B

(21) A bejelentés száma: 1137/88
(22) A bejelentés napja: 1988. 03. 09.
(30) Elsőbbségi adatok:
023427 1987. 03. 09. US

(51) Int. Cl⁵
A 61 K 37/24
A 61 K 31/70

(40) A közzététel napja: 1989. 02. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1990. 12. 28. SZKV 90/12.

(72) Feltaláló:

ARENDE, Volker Dietrich, Princeton, New Jersey (US)

(73) Szabadalmaz:

AMERICAN CYANAMID CO. Stamford,
Connecticut (US)

(54) **Eljárás nyújtott hatású növekedési hormon tartalmú parenterális
alkalmazásokra szánt gyógyszerkészítmények előállítására**

(57) KIVONAT

A találmány szerinti eljárással előállított új gyógyszer-
készítmények aktivált poliszacharid és biológiailag ak-
tív növekedési hormonok, vagy biológiailag aktív
fragmensékből alkotott adduktumokat tartalmaznak.
A gyógyszerkészítmények alkalmasak arra, hogy a ke-
zelt állatok vagy ember vérében a hormonszintet meg-
határozott ideig magas szinten tartsák.

A leírás terjedelme: 4 oldal, 1 rajz

HU 201 681 B

A találmány tárgya nyújtott hatású, növekedési hormon tartalmú parenterálisan alkalmazható új gyógyszerkészítmények előállítására.

Az olyan hatásos, nyújtott hatású gyógyszerkészítmények előállítása, amelyek komplex biológiai aktív molekulákat, például növekedési hormonokat tartalmaznak, szükségessé teszi azt, hogy ismerjünk olyan biokompatibilis rendszereket, amelyek ezeknek a molekuláknak az aktivitását nem befolyásolják.

A találmány tárgya tehát közelebbről eljárás olyan nyújtott hatású gyógyszerkészítmények előállítására, amelyek növekedési hormonok, növekedési faktorok és ezek biológiai aktív fragmenszeinek biológiai kompatibilis, ciano-bromiddal aktivált poliszacharidokkal alkotott, kovalens kötött adduktumait tartalmazza, amelyek alkalmazsak parenterális adagolásra.

A találmány szerinti eljárással előállított gyógyszerkészítmények parenterális adagolása útján a kezelt állatok és emberek vérében a növekedési hormonszint emelhető és ezen a magas szinten tartható hosszú ideig, ezáltal olyan előnyös hatások érhetőek el, mint a testtömeggyarapodás fokozása, tejtermelő állatok tejtermelésének fokozása, növekedési arány fokozása, takarmányozás hatékonyságának fokozása, izomméret fokozása, zsírfelhalmozás csökkentése, hús-zsír arány javítása.

A találmány szerinti eljárásban poliszacharidként bármely természetben előforduló vagy szintetikus, biológiai kompatibilis, farmakológiailag elfogadható poliszacharid vagy ezek származéka alkalmazható, amelyek hidroxilcsoportjai aktiválhatók úgy, hogy olyan reaktív csoportokkal kapcsoljuk, amelyek alkalmasak a biológiai aktív hatóanyag megkötésére. A *Methods Enzymology* Vo. XLIV, Academic Press 1976 ismerteti a poliszacharidok olyan célra történő aktiválásának módszerét, amellyel enzimeket imido-karbonátokon, karbonátokon, oxiránokon, aziridineken és aktivált ketős kötésekben és halogenideken keresztül immobilizálunk. A találmány szerinti eljárásban aktivált poliszacharidként előnyösen a természetben előforduló és szintetikus poliszacharidok imido-karbonátjait alkalmazzuk.

Poliszacharidként általában olyan vízben diszpergálható szénhidrátpolimereket alkalmazunk, amelyek vizes vagy szerves oldószerekben diszpergálva a rendszer viszkozitását fokozzák, és általában sűrítőanyagként vagy gélesítő anyagként alkalmazzák. A találmány szerinti eljárással előállított nyújtott hatású adduktumokban aktivált poliszacharidként előnyösen agarózt alkalmazunk, alkalmazhatunk továbbá agart, cellulózt, hemicellulózt, beleértve a xilánt, karboxi-metil-cellulózt, dextránt, dextrin keményítőket, beleértve az amilózt, glukánokat, mint lichenint, nigeránt és glikogéneket, fruktánokat, beleértve az inulint, galaktánokat, mannánokat, poliuronidokat, beleértve a gyantákat és mucilágokat, fukoidint és ezek származékait.

A találmány szerinti eljárással előállított gyógyszerkészítményekben biológiai aktív komponenseként növekedési hormonokat, ezek biológiai aktív fragmenszeit alkalmazzuk. Előnyös hatóanyagok a szarvasmarha, birka, ló, sertés, madár és humán növekedési hormonok, amelyek természetes, szintetikus, rekombináns vagy bioszintetikus eredetűek.

A találmány szerinti eljárással előállított nyújtott hatású adduktumok injekciós úton, farmakológiailag elfo-

gadható folyékony hordozóanyagokkal készült diszperzió formájában adagolhatók. Folyékony hordozóanyagként vizes, vízzel elegyedő vagy vízzel nem elegyedő folyékony oldószereket alkalmazhatunk. Vizes hordozóanyagok lehetnek például a vizes pufferrendszerek, mint például foszfáttal pufferolt sóoldat (PBS), amelynek összetétele $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,025 mol), Na_2HPO_4 (0,025 mol), NaCl (0,15 mol), pH-ja 7,1; karbonáttal pufferolt sóoldat (CBS), amelynek összetétele Na_2CO_3 (0,025 mol), NaHCO_3 (0,025 mol) és NaCl (0,15 mol), pH-ja 9,4; továbbá sóoldat. Ezeket alkalmazhatjuk önmagukban vagy más, farmakológiailag elfogadható, vízzel elegyedő oldószerekkel, amelyeket parenterálisan adagolható biológiai készítményekben általában alkalmaznak. Ilyenek például a különböző alkoholok, glikolok, észterek és amidok. Ezek alkalmazhatók a találmány szerinti eljárással előállított kompozíciókban is. Farmakológiailag elfogadható, vízzel nem elegyedő folyékony oldószerek például az olajok, folyékony zsíradékok, vízzel nem elegyedő alkoholok és glikolok, vagy ezek elegye. A vízzel nem elegyedő hordozóanyagot úgy választjuk meg, hogy az diszpergálja és bevonja az aktivált poliszacharid adduktumot, és megfelelő viszkozitást biztosítson az injekciós elegynek. A találmány szerinti eljárással előállított gyógyszerkészítményekben vízzel nem elegyedő hordozóanyagként előnyösen zsírsav glicerideket és ezek elegyét alkalmazzuk, amelyek szobahőmérsékleten folyékonyak. Ilyenek például a szintetikus és növényi olajok, például az olívaolaj, szeszamamag olaj, földimogyoró olaj, pálmaolaj, repceolaj és kókuszolaj; az állati olajok, például halolaj, halmájolaj, spermaolaj, továbbá ezek frakciói és elegyei.

A találmány szerinti eljárással előállított injektható gyógyszerkészítmények tartalmazhatnak továbbá stabilizálószereket, konzerválószereket, felületaktív anyagokat, sókat, pufferokat vagy ezek elegyét, előnyösen 15 tömeg% koncentráció körüli mennyiségben. Stabilizálószerként alkalmazhatunk például dehidro-ecetsavat és sóit, ezek közül a nátriumsó az előnyös, szalicil-anilidot, szorbinsavat, bórsavat, benzoesavat és sóit, nátrium-nitritet és nátrium-nitrátot.

Felületaktív anyagként előnyösen nem ionos felületaktív anyagokat alkalmazhatunk, így például polioxi-etilén-szorbitán-monooleátot (20 mol etoxilezés), továbbá etilén-oxid és propilén-oxid kopolimerjét, előnyösen 0,1–10,0 tömeg% mennyiségben.

Meglepő módon azt találtuk, hogy ha a találmány szerinti eljárással előállított, és megfelelő vívmennyiséget tartalmazó gyógyszerkészítménnyel állatokat injektálunk, akkor a testtömeggyarapodás fokozható. A vizsgált állatoknál, ahol a biológiai aktív hatóanyag előnyös és/vagy gyógyhatása érvényesül, úgy mint a testtömeggyarapodás, növekedési arány, tejtermelés és izomméret növekedése, valamint a takarmányozás hatékonysága javul, csökken a test zsírtartalma és javul a zsír-hús arány, a hatóanyag magasabb koncentrációja figyelhető meg a vérben. A hatóanyag lassú leadását a vérben lévő magasabb koncentráció fenntartása jelzi. Ha a vérben a hatóanyag magas koncentrációját tartjuk fenn, az olyan előnyös tulajdonságok, mint a javuló tejtermelés, növekedési arány, takarmányozás hatékonyságának fokozódása és a húсарány javulása figyelhető meg. A találmány szerinti eljárással előállítható gyógyszerkészítmények alkalmazhatók a tejtermelés, növekedési arány, takarmányozási hatékonyság és a húсарány javítására állatok-

ban, továbbá az állatok vérhormonszintjének fokozására és fenntartására.

A találmány szerinti eljárás értelmében a poliszacharid aktiválását előnyösen ciano-bromid segítségével imido-karbonát kialakításával végezzük, majd az aktivált poliszacharidot a növekedési hormonnal szobahőmérsékleten reagáltatjuk. Az eljárást az I. folyamatábra illusztrálja, ahol az aktivált poliszacharid-imido-karbonát kialakítását ciano-bromiddal végzett reakcióval, majd a növekedési hormonnal képzett adduktum kialakítását ábrázoltuk.

A kapott adduktumot ezután centrifugálással izoláljuk, mossuk és szárítjuk. A kapott szilárd terméket ezután 20–70 mikron szemcseméretűre megőröljük. Meghatározzuk a nitrogéntartalmat a jelenlévő növekedési hormon százalékarányának meghatározása céljából. Az említett eljárással szarvasmarha növekedési hormonnal képzett adduktumok növekedési hormon tartalma körülbelül 60–80%.

Aktivált agaróz és szarvasmarha növekedési hormon adduktuma (68% telítettség) in vitro oldási kísérletekben azt mutatta, hogy a hormon 35%-a oldódik 16 nap után.

A találmány szerinti eljárással előállított gyógyszerkészítmények hipofízisüktől megfosztott patkányok testi növekedését 10 napon keresztül biztosították.

A találmány szerinti eljárást a következő példákkal szemléltetjük a korlátozás szándéka nélkül.

1. példa

Szarvasmarha növekedési hormon – aktivált agaróz adduktum előállítása

100 mg ciano-bromiddal aktivált agarózport (Sigma gyártmány, katalógusszám: C1150) 500 mg rekombináns technikával, a 319 049 sz. európai szabadalmi leírás szerinti módon előállított szarvasmarha növekedési hormon (bGH) 20 ml desztillált vízzel készült oldathoz adjuk keverés közben, szobahőmérsékleten. A szuszpenziót 16 óra hosszat keverjük. Ezután az anyagot centrifugáljuk, a felülúszó folyadékot leöntjük és a maradékot kétszer 20 ml desztillált vízzel mossuk. A szilárd terméket szobahőmérsékleten vákuumban megszáritjuk, majd felaprítjuk és egy 0,149 mm-es lyukméretű szitán osztályozzuk. Így olyan adduktumot kapunk, amelynek szarvasmarha növekedési hormon tartalma 75,4%.

A fenti módon állítjuk elő az I. táblázatban felsorolt kompozíciókat.

I. táblázat

Szarvasmarha növekedési hormon-agaróz adduktum

Összetétel	2	3	4
Kiindulási anyag	500	1200	7 000
bGH (mg)	1000	2400	14 000
Termék			
Kitermelés (mg)	449	1371	7 000
N-analízis	11,53	9,90	12,21
bGH (%)	74,4	64,0	78,7

2. példa

Szarvasmarha növekedési hormon-agaróz adduktum oldódása

Az oldási kísérletet úgy végezzük, hogy 30 ml foszfáttal pufferolt sóoldatba merített mintákat állandó hőmérsékleten rázó fürdőben tartunk. Az oldatokat periódikusan kicseréljük, és nagynyomású folyadékkromatográfiával meghatározzuk a növekedési hormontartalmat. A kísérletet 39 °C-on végezzük, pufferolt sóoldatban ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3,45 g, Na_2HPO_4 3,55 g, NaCl 9,5 g, 1000 ml-re hígítva), amelyeknek pH-ja 7,4.

Az 1. példa szerinti módon előállított növekedési hormon-agaróz adduktumok (68% hormontöltés) kísérleti eredményét a II. táblázat tartalmazza.

II. táblázat

Szarvasmarha növekedési hormon-agaróz adduktum oldódása

Idő nap	Kumulatív %-os növekedési hormon leadás
1.	26,6
2.	28,3
3.	31,4
6.	32,0
9.	33,0
12.	34,0
16.	35,0
19.	35,0
26.	35,2

3. példa

A találmány szerinti eljárással előállított injektálható gyógyszerkészítmények hatékonysága

A találmány szerinti eljárással előállított injektálható gyógyszerkészítmények hatékonyságát hipofízisüktől megfosztott patkányokon vizsgáltuk. A hipofízisüktől megfosztott patkányok nem termelnek saját növekedési hormont, és így az injektált szarvasmarha növekedési hormonokra érzékenyek. Az eredményt egy bizonyos időn, például 10 napon belül bekövetkezett növekedés mutatja.

Hipofízistől megfosztott albino patkányoknak (Taconic Farms, Sprague Dawley) az 1. példa szerinti módon előállított második gyógyszerkészítményt adagoljuk olyan mennyiségben, hogy napi 80 µg szarvasmarha növekedési hormont kapjanak 0,2 ml foszfáttal pufferolt sóoldatban, amely 2% karboxil-metil-cellulózt tartalmaz.

A vizsgálat kezdete előtt az állatok testtömegét megmérjük, és ez alapján kiválogatjuk. Azokat az állatokat használjuk, amelyeknek testtömege a standard deviáción belül van a csoport átlag testtömegéhez képest. A kapott csoportot ezután véletlenszerűen 8 állatot tartalmazó kezelési csoportokra osztjuk. A vizsgált állatokat négyesével tiszta ketrecben helyezük el. A vizsgálat első napján megmérjük az állatok testtömegét, és a vizsgálat során naponta mérjük a testtömeg változását.

A 10 napos vizsgálat végén feljegyezzük állatonként a teljes testtömeggyarapodást, az átlagos testtömeggyarapodást patkányonként minden vizsgálat esetén. Az eredményeket a III. táblázatban foglaltuk össze, amely

III. táblázat

A találmány szerinti elnyújtott hatású gyógyszerkészítmény testtömeg-gyarapodást fokozó hatékonysága

Testtömeg (g)											
	Nap 0	Nap 2	Nap 4	Nap 7	Nap 10		Napok 0–2	Napok 2–4	Napok 4–7	Napok 7–10	Napok 0–10
	92	100	101	101	104		8.0	1.0	0.0	3.0	12.0
	96	103	106	105	111		7.0	3.0	–1.0	6.0	15.0
	93	98	102	101	103		5.0	4.0	–1.0	2.0	10.0
	94	100	100	105	103		6.0	0.0	5.0	–2.0	9.0
	95	102	104	105	102		7.0	2.0	1.0	–3.0	7.0
	87	92	96	100	101		5.0	4.0	4.0	1.0	14.0
	89	95	100	101	103		6.0	5.0	1.0	2.0	14.0
	92	99	101	104	106		7.0	2.0	3.0	2.0	14.0
Átlag (g)	92.3	98.6	101.3	102.8	104.1		6.4	2.6	1.5	1.4	11.9
Standard deviáció (g)	3.0	3.6	3.0	2.2	3.1	Standard deviáció (g)	1.1	1.7	2.3	2.8	2.9

egyértelműen mutatja a találmány szerinti eljárással elő- 25 állított gyógyszerkészítmények hatékonyságát.

SZABADALMI IGÉNYPONT

Eljárás nyújtott hatású növekedési hormon tartalmú, 30 parenterálisan alkalmazható gyógyszerkészítmények

előállítására, azzal jellemezve, hogy ciano-bromiddal aktivált farmakológiailag elfogadható poliszacharid – előnyösen agaróz – és egy növekedési hormon, vagy biológiailag aktív fragmense adduktumát a gyógyszerkészítésben szokásos hordozó- és adott esetben egyéb segédanyaggal összekeverve gyógyszerkészítménnyé alakítjuk.

I. folyamatábra

