



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

**Hotarârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării**

(21) Nr. cerere: **94-01055**

(22) Data de depozit: **16.12.1992**

(30) Prioritate: **20.12.1991 DK 2047/91;**

(41) Data publicării cererii:
BOPI nr.

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
30.05.1997 BOPI nr. **5/1997**

(45) Data eliberării și publicării brevetului:
BOPI nr.

(61) Perfecționare la brevet:
Nr.

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(86) Cerere internațională PCT:
Nr. **DK 92 / 00378 16.12.1992**

(87) Publicare internațională:
Nr. **WO /9312811 08.07.1993**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
AU 30771; EP 303746

(71) Solicitant: **NOVO NORDISK A/S , BAGSVAERD, DK;**

(73) Titular: **NOVO NORDISK A/S , BAGSVAERD, DK;**

(72) Inventatori: **SORENSEN HANS HOLMEGAARD, VIRUM, DK;**

(74) Mandatar: **ROMINVENT S.A. BUCURESTI**

(54) **PREPARATE FARMACEUTICE CONȚINÂND HORMONI DE
CREȘTERE SAU DERIVAT AL ACESTORA**

(57) **Rezumat:** Preparatele, conform invenției, se prezintă sub forma unei soluții-tampon apoase, cu pH între 2 ... 8, care conține un hormon de creștere sau un derivat al acestuia cum ar fi hormon de creștere uman hGH și asparagină, sau ca o pulbere liofilizată, care conține un hormon de creștere sau derivatul acestuia și asparagină. Asparagina este în

concentrație de până la 100 mM. Hormonul de creștere este hGH. Preparatele farmaceutice mai pot conține săruri și zaharide, cunoscute în domeniu și folosite la condiționare.

Revendicări: 4

RO 112086 B1



Prezenta invenție se referă la preparate farmaceutice conținând hormoni de creștere sau derivat al acestora, utilizate în domeniul medical.

Hormonii de creștere proveniți de la om sau de la animale domestice, cunoscute, sunt proteine având aproximativ 191 aminoacizi care sunt sintetizați și secretați de lobul anterior al glandei pituitare. Hormonul uman de creștere conține 191 de aminoacizi.

Hormonul de creștere este hormonul de bază implicat nu numai în reglarea creșterii somatice, ci și în reglarea metabolismului proteinelor, al hidraților de carbon și al lipidelor. Efectul major al hormonului de creștere este de a ajuta creșterea.

Sistemele de organe afectate de hormonul de creștere cuprind scheletul, țesutul conjunctiv, mușchii și viscerele (organele interne), cum ar fi ficatul, intestinele și rinichii.

Până la dezvoltarea tehnologiei recombinante și a clonării genelor hormonului de creștere, care determină (generează), în momentul de față obținerea lor, ca de exemplu hormonul de creștere conține 191 de aminoacizi.

Hormonul de creștere este hormonul de bază implicat nu numai în reglarea creșterii somatice, ci și în reglarea metabolismului proteinelor, al hidraților de carbon și al lipidelor. Efectul major al hormonului de creștere este de a ajuta creșterea.

Sistemele de organe afectate de hormonul de creștere cuprind scheletul, țesutul conjunctiv, mușchii și viscerele (organele interne) cum ar fi ficatul, intestinele și rinichii.

Până la dezvoltarea tehnologiei recombinante și a clonării genelor hormonului de creștere, care determină (generează), în momentul de față obținerea lor, ca de exemplu hormonul de creștere uman (hGh) și Met-hGH, la scară industrială, hormonul uman de creștere putea fi obținut numai prin extracție din glandele pituitare ale cadavrelor umane. Ofertele foarte limitate de hormoni de creștere au restrâns utilizarea acestora

la ajutarea creșterii în lungime în perioada copilăriei și a adolescenței, pentru tratamentul nanismului, cu toate că a fost propus pentru tratamentul staturii scunde (datorate deficienței hormonului de creștere, a staturii normale scunde și a sindromului Turner), a deficienței hormonului de creștere, a sterilității, la tratamentul arsurilor, la vindecarea plăgilor, a distrofiilor, la sudarea oaselor, la tratamentul osteoporozei, a sângerării gastrice difuze și a pseudoartrozei. Mai mult decât atât, hormonul de creștere a fost propus pentru mărirea ratei (ritmului) de creștere a animalelor care trebuie să fie sacrificate pentru consumul (alimentația) oamenilor.

Preparatele farmaceutice ce conțin hormonul de creștere au tendința de a fi instabile în timp. Producții de degradare, cum ar fi producții dezamidați sau producții sulfoxidați, precum și formele de dimer sau polimer, se formează în special în soluțiile care conțin hormonul de creștere.

Reacțiile predominante de degradare a hGh-ului sunt :

a) dezamidarea prin hidroliză directă sau pe calea intermediarului ciclic de succinimidă, pentru a forma diverse cantități de L-asp-hGh, L-izo-asp-hGH, D-asp-hGh și D-izo-asp-hGH (conf. 1-3).

2) oxidarea metioninei rămase, în pozițiile 14 și 125 (conf. 4-9)

3) desfacerea legăturilor peptidice.

Dezamidarea are loc, în special, la Asn în poziția 149.

HGH este oxidat, de preferință, în pozițiile 14 și 125, în special de soluție (conf. 4-8).

Oxidarea hGH-ului în soluție, cu formarea sulfoxizilor, în mod normal, se datorează oxigenului dizolvat în preparat. Solubilitatea oxigenului în apă distilată este de aproximativ 200 μm (conf. 9). Atunci când concentrația de hGH, dintr-un preparat care conține 4 IU/ml este de 1,3 mg/ml, corespunzând la 60 nM hGH, în condiții normale de depozitare, oxigenul va fi prezent într-un exces de cca. 3000 ori față de cantitatea stoichiometrică necesară pentru oxidarea hGH-ului. Nu este posibil să se încarce rezolvarea problemei

prin degazarea (purjarea) gazului tampon înainte de golirea și de îmbutelierea preparatelor.

În prezent, nu se consideră că această degradare a produselor poate avea acțiune toxică sau acțiune biologică modificată sau proprietăți obligatorii acceptoare, dar este cunoscut efectul reducerii stabilității conformației sulfoxizilor, în comparație cu hGh natural.

Pentru obținerea unui preparat stabil, dizolvat, care conține hGH, o importanță prezintă cunoașterea vitezei de formare a sulfoxizilor, precum și mijloacele pentru controlul oxidării.

Cinetica degradării depinde de temperatură, de pH și de diferiți aditivi sau adjuvanți din compoziția de bază de hGH-ului.

Datorită instabilității, hormonul uman de creștere, în prezent, este sub formă liofilizată și depozitat, sub această formă, la temperatura de 4°C, până când este reconstituit pentru utilizare, în scopul reducerii la minim a degradării.

Preparatele farmaceutice liofilizate care conțin hGH sunt, în prezent, reconstituite pentru pacient și de depozitează ca soluții, pentru o perioadă de utilizare de până la 14 zile și la temperatura de 4°C, timp în care poate avea loc o oarecare degradare.

Mai mult decât atât, procesul de reconstituire a hormonului de creștere liofilizat poate să producă dificultăți pentru pacient. De aceea, în prezent, se preferă reconstituirea hormonului de creștere liofilizat cât mai târziu posibil, înaintea utilizării și depozitării sau expedierii preparatului, în stare liofilizată. O serie de producători pentru produse farmaceutice pot să manipuleze preparatul la temperaturi scăzute, controlate, ca de exemplu la temperatura de 4°C, permițând o perioadă de timp mai lungă de depozitare, de până la doi ani.

Totuși, extinderea sistemului de depozitare în sistem închis pentru automedicație și lărgirea domeniului de utilizare impune necesitatea unui preparat care să fie stabil pe o perioadă de timp

condiții în care răcirea "suficientă", de obicei, nu este greu de realizat.

De preferință, un preparat trebuie să fie stabil la utilizatorul final, în stare liofilizată, timp de aproximativ o lună și în plus, încă o lună, în stare reconstituită, într-un dispozitiv închis, pe perioada preconizată de utilizare a unui cartuș.

Astfel, este nevoie de preparate mai stabile ale hormonului de creștere, care să fie stabile în stare liofilizată, la temperaturi relativ ridicate pe o perioadă de timp și, în plus, pe o perioadă de utilizare, la o temperatură relativ ridicată, în forma de soluție. Asemenea stabilizare este de foarte mare importanță când se trece de la administrarea hormonilor de creștere în clinici, la administrarea acestora acasă, la tratarea persoanelor individuale unde nu se poate realiza depozitarea optimă așa cum s-a arătat mai înainte. În plus, trecerea de la modul de administrare a hormonului de creștere (după modelul cunoscut în clinici, mai înainte), la utilizarea modului de depozitare în dispozitive închise necesită un preparat dizolvat și stabil, care să conțină hormon de creștere, în scopul facilitării manipulării efectuate în pacient. Un preparat stabil, dizolvat, care conține hormon de creștere poate fi produs rapid, pentru a fi utilizat sub formă de tuburi în cartușe, care se fixează în dispozitivul de depozitare, utilizat de clientul care poate, apoi, evita reconstituirea preparatului și, deci, nu va trebui să fie în posesia unui preparat liofilizat, a unei modalități corespunzătoare de reconstituire, precum și a priceperii necesare și a echipamentului steril în vederea reconstituirii sterile a preparatului. Din motive de siguranță, este de dorit să se evite reconstituirea preparatului liofilizat, chiar înaintea utilizării acestuia. În plus, mai poate fi un avantaj și evitarea treptei de liofilizare la producerea preparatelor de hormon de creștere. Liofilizarea este un procedeu costisitor, cu consum de timp și reprezintă, de multe ori, o stagnare în producție, datorită capacității delimitate a uscătorului de stabilizare. Astfel, se impune reducerea vitezei proceselor de degradare, cu scopul de a permite ca

preparatele de hormon de creștere dizolvate să fie stabile în timpul depozitării în dispozitive închise, în perioada de utilizare a acestuia și încă o lună, după aceea.

În primul rând, se încearcă stabilizarea hormonului de creștere uman, fără a reuși deplin să se împiedice formarea dimerului au fost prezentat în literatura de specialitate.

Astfel, în literatura cunoscută în domeniul de specialitate, cum ar fi brevetul Australia **30771/89** se prezintă o compoziție farmaceutică stabilă, care conține hormon uman de creștere, glicină și manitol. Un astfel de preparat prezintă stabilitate îmbunătățită, în timpul prelucrării normale și al depozitării în stare liofilizată, precum și în perioada utilizării după reconstituire.

Descrierea invenției din Brevetul European **303746**, prezintă faptul că hormonul animal de creștere poate fi stabilizat cu diverși stabilizatori, pentru a reduce formarea insolubilelor și pentru păstrarea activității solubile în medii apoase. Astfel de stabilizatori cuprind anumiți polioli, aminoacizi, polimeri ai aminoacizilor având o grupă laterală încărcată și săruri ale colinei.

Poliolii se selectează dintre grupele care conțin hidrați de carbon nereducători, alcoolii ai hidraților de carbon, acizi ai hidraților de carbon, pentaeritrol, lactoză, dextrani solubili în apă și ficol. Aminoacizii sunt aleși din grupa care conține glicină, sarcozină, lizină sau săruri ale acestora, serină, arginină, sau săruri ale acestora, betaină, N-N-dimetilglicină, acid aspartic sau săruri ale acestora, acid glutamic sau săruri ale acestuia; un polimer al unui aminoacid având o grupă laterală încărcată la pH-ul fiziologic poate fi ales dintre polilisină, acid poliaspartic, acid poliglutamic, poliarginină, polihistidină sau acid poliglutamic, poliarginină, polihistidină, poliornitină sau săruri ale acestora, iar derivații colinei sunt aleși din grupa care conține clorură de colină, citrat diacid de colină, bitartrat de colină, bicarbonat de colină, citrat tricolinic, ascorbat de colină, disulfat de colină și mucat de colină.

În mod surprinzător s-a constatat că un preparat având hormon de creștere, care conține asparagină ca aditiv sau ca substanță tampon, prezintă o foarte mare stabilitate la deamidare, la oxidare și la desfacerea legăturilor peptidice. Stabilitatea produsului permite depozitarea și transportul acestuia în stare liofilizată sau sub forma unui preparat dizolvat sau redizolvat.

Preparatele farmaceutice, conform invenției, se prezintă sub forma unei soluții apoase tampon cu pH între 2 și 8, care conțin un hormon de creștere sau un derivat al acestuia, cum ar fi hormon de creștere uman hGH și asparagină sau ca o pulbere liofilizată care conține un hormon de creștere sau derivatul acestuia și asparagină. Asparagina este în concentrație de până la 100 mM. Hormonul de creștere este hGH. Preparatele farmaceutice mai pot conține săruri și zaharide cunoscute în domeniu și folosite la condiționare.

Astfel, preparatele conform invenției pot fi sub formă liofilizată, care să fie reconstituite utilizând agenți vehiculanti convenționali, cum ar fi apa distilată sau aerul fiziologic, sau sub formă de soluții care cuprinde conservanți convenționali, cum ar fi *m*-crezolul sau alcoolul benzilic.

O variantă preferată de realizare, conform invenției, este sub forma unui preparat farmaceutic al hormonului de creștere uman ce conține asparagină, sub forma unei soluții apoase tampon; asparagina având rol de protecție a hormonului de creștere. Astfel de preparate sunt sub forma de produse gata de utilizare și pot fi depozitate sau transportate ca soluție apoasă, fără nici o degradare considerabilă.

Din motive de stabilitate, pH-ul soluției se ajustează, de preferință, la o valoare cuprinsă în intervalul de la 2 până la 8.

Preparatele care au pH-ul de la 5 până la 8 sunt mai preferate, iar cele mai preferate sunt preparatele care au pH-ul de la 6 până la 7,5.

În scopul obținerii efectelor de stabilizare, asparagina se adaugă, de în

cantitate de până la 100 mM. Concentrația asparaginei este, de preferință, cuprinsă în intervalul de la 2 până la 20 mM, cel mai preferat de la 2 până la 10 mM.

Preparatele farmaceutice, în conformitate cu prezenta invenție, pot fi și sub formă de preparate liofilizate.

Preparatul farmaceutic, conform invenției, mai poate conține în plus și săruri și zaharide, în scopul de a facilita prelucrarea acestuia, ca de exemplu liofilizarea. În mod convențional, se utilizează, ca agent de liofilizare, manitolul.

Un alt aspect al invenției se referă la utilizarea asparaginei pentru obținerea unui preparat stabilizat care conține un hormon de creștere.

În contextul prezentei invenții, "hormon de creștere" poate fi hormonul de orice origine, cum ar fi cel de pasăre, de bovine, de cabaline, de om (uman), de ovine, de porcine, de somon, de păstrăv sau hormon de creștere din peștele numit "ton", de preferință hormon de creștere de bovine, uman sau de porcine, hormonul de creștere uman fiind cel mai preferat. Hormonul de creștere utilizat, conform invenției, poate fi hormon de creștere nativ, izolat din surse naturale, ca de exemplu prin extracție din glandele pituitare, prin tehnici convenționale (cunoscute), sau poate fi un hormon de creștere obținut prin tehnica recombinării.

De asemenea, "hormonul de creștere" poate fi o formă trunchiată (micșorată) a hormonului de creștere, în care unul sau mai multe resturi de aminoacizi pot să lipsească; prin analogie cu aceasta, în care unul sau mai multe resturi de aminoacizi din molecula în stare naturală se înlocuiesc cu alte resturi de aminoacizi, de preferință cu un rest de aminoacid natural, atât timp cât substituția redusă; sau un alt derivat al acestora, ca de exemplu acela ce are cuplat un atom N- sau de carbon C-terminal, cum ar fi: Met-hGH, Met-Glu-Ala-Glu-hGH sau Ala-Glu-hGH. Hormonul de creștere cel mai preferat este hGh.

În contextul prezentei invenții, "înalta stabilitate" se obține când preparatul este

mai stabil decât compoziția convențională care conține soluția tampon de fosfat.

Termenul "săruri" utilizat în această descriere se referă la constituenții adiționali ai preparatului farmaceutic care conține astfel de săruri convenționale (cunoscute), cum ar fi cele de metale alcaline, de metale alcalino-pământoase sau sărurile de amoniu ale acizilor organici, cum ar fi acidul citric, acidul tartric sau acidul acetic, ca de exemplu citratul de sodiu, tartratul de sodiu sau acetatul de sodiu ale acizilor minerali, cum ar fi, de exemplu, acidul clorhidric, și anume clorura de sodiu.

"Zaharidele" pot fi monozaharide, dizaharide sau alcooli ai hidraților de carbon care se utilizează în mod convențional la preparatele farmaceutice, cum ar fi lactoza și manitolul.

Solventul utilizat în preparatele, conform invenției, poate fi: apa, alcooli, alcoolul butilic sau amestecuri ale acestora. Solventul poate conține un conservant, cum ar fi *m*-crezolul sau alcoolul benzilic.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției, însă acesta nu trebuie să fie considerat limitativ.

Preparatele de hormon de creștere uman se obțin prin dizolvarea a 20 mg hGH în 10 ml soluție 10 mM de asparagină, care a fost preparată prin dizolvarea a 13,2 mg de asparagină în 10 ml de apă deionizată, conținând 0,9% vol. de alcool benzilic și adăugarea unei cantități 0,1 N acid clorhidric până la pH-ul stabilit.

S-a studiat viteza de dezamidare, la temperatura de 25°C, pentru preparatele care conțin hGh, și anume acele preparate care conțin 6 UI hGH, la pH=6,5, în prezența a 10 mM Asn, prin comparație cu o soluție tampon fosfat având concentrația de 8 mM, la același pH și la pH=7,3.

În tabelul care urmează, se dau compozițiile de hGh, depozitate la temperatura de 25°C, conținutul de produs dezamidat fiind analizat după 14 zile și după 30 zile, prin IE-HPLC.

Pe baza datelor din tabel, se pot evidenția rezultatele obținute:

Conținuturile de hGH dezamidat, determinate prin IE-HPLC, în funcție de compoziție și de timp, la temperatura de 25°C și în soluție.

Compoziția ^{x)}	Formarea compusului dezamidat la 25°C	
	14 zile	30 zile
sol. 8mM fosfat disodic pH=6,5	7,8	10,8
sol.8 mM fosfat disodic pH= 7,3	15,2	20,3
sol.8 mM fosfat disodic pH=6,5 și 0,3 % <i>m</i> -crezol	9,4	13,2
sol.10 mM Asp, pH=6,5	21,7	nd.
Sol.10 mM Asn, pH=6,5	6,5	8,3
sol.10 mM Glu, pH=6,5	14,8	nd.

X) Conțin 0,9% alcool benzilic, cu excepția compoziției 3.

Conținutul de hGH dezamidat în materialul de pornire (inițial) este de 2,1%.

Din tabelul de mai sus rezultă că dezamidarea hGH se reduce cu aproximativ 25 %, prin adăugarea asparaginei, în comparația cu soluția tampon de fosfat ce are pH=6,5. Adăugarea de Asp sau Glu micșorează viteza de dezamidare, în comparație cu soluția de fosfat, la pH=6,5.

Rezultatele de mai sus arată că viteza de dezamidare scade prin coborârea pH-ului soluției și prin adăugarea asparaginei în soluție, la concentrații scăzute, de până la 100 mM, de preferință în jur de 5 mM. Viteza de dezamidare se poate reduce prin scăderea pH-ului cu mai mult de 50% și înlocuirea soluției tampon cu asparagină. Se pare că utilizarea *m*-crezolului sau a alcoolului benzilic drept solvenți nu are influență asupra vitezei de dezamidare. Formarea produșilor de degradare (hidroliza legăturilor peptidice) se reduce cu asparagină, la pH=6,5, în comparație cu soluția de tampon fosfat.

Revendicări

1. Preparate farmaceutice conținând hormoni de creștere sau derivat al acestora **caracterizate prin aceea că** se prezintă sub forma unei soluții apoase tampon cu pH între 2 și 8, care conțin un hormon de creștere sau un derivat al acestuia, cum ar fi hormon de creștere uman hGH și asparagină, sau ca o pulbere liofilizată care conține un hormon de creștere sau derivatul acestuia și asparagină.

2. Preparate farmaceutice, conform revendicării 1, **caracterizate prin aceea că** asparagina este în concentrație de până la 100 mM.

3. Preparate farmaceutice, conform revendicării 1, **caracterizate prin aceea că** hormonul de creștere este hGH.

4. Preparate farmaceutice, conform revendicării 1, **caracterizate prin aceea că** mai pot conține și zaharide cunoscute în domeniu și folosite la condiționare.

Președintele comisiei de examinare: **chim. Novac Maria**

Examinator: **farm. Pentelescu Elena**

