



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **314784**

(13) B1

(51) Int Cl⁷

A 61 K 38/50, A 23 K 1/165

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19944782	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1993.06.11, PCT/US93/05659
(22) Inng. dag	1994.12.09	(85) Videreføringsdag	1994.12.09
(24) Løpedag	1993.06.11	(30) Prioritet	1992.06.11, US, 896958
(41) Alm. tilgj.	1994.12.09		
(45) Meddelt dato	2003.05.26		

(71) Patenthaver	Pfizer Inc, 235 East 42nd Street, New York, NY 10017-5755, US
(72) Oppfinner	Michael T. Clark, Downingtown, PA 19335, US Robert J Gyurik, Exeter, NH 03833, US Sharon K. Lewis, Exton, PA 19341, US Marianne C. Murray, Coatesville, PA 19320, US Matthew J. Raymond, Paoli, PA 19301, US
(74) Fullmektig	Bryn Aarflot AS, 0104 Oslo

(54) Benevnelse **Vekstfremmende kompleks som gir langvarig frigjøring av et somatotropin og en fremgangsmåte for tilveiebringelse av forlenget frigjøring av et somatotropin**

(56) Anførte publikasjoner Ingen

(57) Sammendrag

Stabilisert kompleks omfattende et veksthormon og et aromatisk aldehyd. Spesielt omfatter komplekset svinesomatotropin og et substituert benzaldehyd, og en fremgangsmåte for å tilveiebringe en langvarig frigjøring av somatotropinet og forbedret forvirkningsgrad hos dyr.

Oppfinnelsens område

Denne oppfinnelse vedrører et kompleks omfattende et veksthormon (også henvist til som et somatotropin) og et aromatisk aldehyd. Nærmere bestemt vedrører denne oppfinnelsen et svinesomatotropin(PST)-aromatisk aldehyd-kompleks og en fremgangsmåte for tilveiebringelse av forlenget frigjøring av et
5 somatotropin.

Bakgrunn for oppfinnelsen

Når svinesomatotropin (PST) gis til griser på daglig basis, registreres en markert forbedring i forutnyttelsesgrad, dvs. før-til-økning, dyret tar inn mindre før
10 enn kontrolldyr men vinner likevel vekt i samme eller større grad. Imidlertid er det tungvint å administrere legemidler til svin på daglig basis på grunn av høye omkostninger og tiden som kreves for å avgi legemidlet til hvert medlem av en stor gruppe dyr. Det ville derfor være greiere å gi en enkeltdose og ha PST-frigjøring
15 over et lengre tidsrom. Det synes å være den letteste måten å administrere PST i før, men i likhet med de fleste proteiner og makromolekylære legemidler, er PST ikke oralt biologisk tilgjengelig. Generelt har litteraturen ikke vist nevneverdig evne til å gi proteiner og peptider ad oral vei. Bruken av salicylater og mineralolje for å øke oral avgivelse av disse legemidler er beskrevet i E.P. søknad nr. 177342. US patent
20 4.548.922 beskriver videre bruk av steroide forsterkere så som fusidinsyre.

Parenteral administrering f.eks. implantater, har vært brukt med andre makromolekylære legemidler for å gi forlenget frigjøring, som beskrevet i US patent nr. 4.666.704. PST er et ustabilt protein utsatt for enzymatisk samt vandig nedbrytning. Det reagerer med seg selv og spaltes lett med proteaser. Faktisk er
25 ustabiliteten til PST-implantatet antatt å skyldes proteasene som dannes på implantasjonsstedet på grunn av den inflammatoriske respons som finner sted (US patent 5.015.627). Det er på grunn av denne ustabilitet at administreringen av PST til svin hittil bare har vært marginalt, om overhodet vellykket. (Se f.eks.: US patentene 4.837.381; 4.857.505; 5.045.312 og EP søknadene 193917 og 458064).

Det er et kommersielt behov for forbedrete forlengede frigjøringsimplantater for parenteral administrering av makromolekylære legemidler med veksthormon-aktivitet.

Det er derfor et mål for denne oppfinnelsen å tilveiebringe en blanding og fremgangsmåte for å stabilisere og frigjøre et biologisk veksthormon hos dyr over et lengre tidsrom.

Beskrivelse av oppfinnelsen

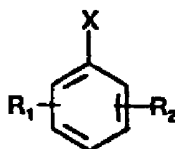
Ifølge denne oppfinnelsen er det oppdaget at når PST omsettes med et aromatisk aldehyd, dannes et kompleks som fører til forbedret forutnyttelse, dvs. vektøkning og før-til-økingsforhold for dyrene. Det nye kompleks har ikke bare den samme bioaktivitet som PST, men gir også virkningsgrad over et vedvarende tidsrom i likhet med daglige injeksjoner av PST.

Som nevnt ovenfor, ble flere forsøk foretatt på å fremstille et PST-produkt som ville overvinne de ovenfor bemerkede ulemper, og som med hell kunne gis til svin. For eksempel beskriver US patent nr. 5.015.627 PST og leupeptin, et tripeptid-aldehyd blandet som tørre pulvere, granulert og implantater dannet fra granulatet. Disse implantater var ikke effektive.

Uventet ble det derfor funnet at når PST og et aromatisk aldehyd ifølge denne oppfinnelse ble oppløst i vann og komplekset ble isolert fra løsningen, fulgte et krystallinsk produkt som ga en langvarig frigjøring av somatotropinet.

Komplekset kan isoleres fra den vandige løsning ved enhver i og for seg kjent metode, så som f.eks. konsentrering, fordampning eller frysetørring. Implantet fremstilt fra komplekset og gitt til griser, førte til et vedvarende plasma-PST-nivå opp til 7 dager.

Foreliggende oppfinnelse vedrører følgende vekstfremmende kompleks som gir langvarig frigjøring av et somatotropin, hvilket omfatter et somatotropin og et aromatisk aldehyd med den følgende formel:

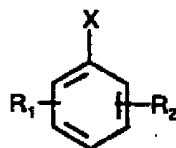


hvor X er CHO eller CH_2CHO , og hver av R_1 og R_2 er hydrogen, hydroksey, metoksey, etoksey, metyl eller etyl.

Det er også beskrevet fremgangsmåte for tilveiebringelse av forlenget frigjøring av et somatotropin som omfatter parenteral administrering til en animalsk organisme i en tilstrekkelig mengde til å gi nevnte frigjøring av et vekstfremmende middel som er et kompleks av somatotropin og et aromatisk aldehyd ifølge hvert av kravene 1-3.

Det er videre beskrevet fremgangsmåte for å forbedre forutnyttelsen hos dyr, hvilken omfatter administrering til en animalsk organisme av komplekset ifølge krav 1-3 i en tilstrekkelig mengde til å gi nevnte utnyttelsesgrad.

De aromatiske aldehyder som er tilstede i komplekset og anvendes i fremgangsmåten i denne oppfinnelse har følgelig fortrinnsvis den følgende formel:



Formel 1

hvor X er CHO eller CH_2CHO , og hver av R_1 og R_2 kan være hydrogen, hydroksey, metoksey, etoksey, metyl eller etyl.

Foretrukne aromatiske aldehyder som er tilstede i komplekset, og fremgangsmåten ifølge denne oppfinnelsen, er forbindelser med Formel 1 hvori X er CHO , og hver av R_1 og R_2 er hydroksey eller metoksey. Et spesielt foretrukket aromatisk aldehyd tilstede i komplekset og fremgangsmåten i denne oppfinnelsen er 2-hydroksey-3-metoksey benzaldehyd. Dette aldehydet er også kjent som o-vanillin.

De aromatiske aldehyder som anvendes for å fremstille det stabile komplekset ifølge denne oppfinnelsen og deres fremstillingsmetode, er velkjente på området.

I en foretrukket utførelsesform omfatter også komplekset ifølge oppfinnelsen et animalsk veksthormon så som f.eks. humant, storfe-, fugle-, svine-, heste- eller saue-veksthormon. Med fordel er komplekset og metodene anvendelige på svine-somatotropin.

Mest fordelaktig omfatter komplekset ifølge denne oppfinnelsen 2-hydroksey-3-metoksey-benzaldehyd og svinesomatotropin.

Det aromatiske aldehydet med Formel 1 kan være tilstede i komplekset fra ca. 0,5% til ca. 10 vekt%. Fortrinnsvis kan det aromatiske aldehydet være tilstede fra ca. 0,5% til ca. 5,0 vekt%.

Det aromatiske aldehyd med formel 1 og komplekset ifølge denne
5 oppfinnelsen ble fremstilt som følger:

Eksempel 1

Svinesomatotropin	99 vekt%
Aromatisk aldehyd med Formel 1	1,0 vekt%

10

PST'et og aldehydet ble oppløst i vann og omsatt ved 39°C i 6 til 24 timer. Vannet drives langsomt av, og det resulterende produkt oppslemmes i etanol. Suspensjonen filtreres, og fellingen tørkes natten over i en vakuum-ovn, hvilket fører til tørkede krystaller.

15 Det krystallinske kompleks formes i 35 mg pellets (implantater) med en 0,48 cm stempelpresse og presses ved over 34 atmosfærer.

Eksempel 2

Svinesomatotropin	99,0 vekt%
20 2-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd	1,0 vekt%

Komplekset og implantatene ble fremstilt etter fremgangsmåten i Eksempel 1.

Eksempel 3

Svinesomatotropin	99,0 vekt%
25 4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd	1,0 vekt%

Eksempel 4

Svinesomatotropin	99,0 vekt%
4-metoksybenzaldehyd	1,0 vekt%

30

De ovennevnte komplekser ble fremstilt etter fremgangsmåten i Eksempel 1.

Formen til pelletene eller implantatene er ikke kritisk, og enhver egnet form for implantat kan anvendes. I tillegg til somatotropinet og det aromatiske aldehydet, kan det være en fordel å innta andre farmasøytiske eksipienter i blandingene ifølge denne oppfinnelsen. For eksempel kan implantatet inneholde smøremidler så som
5 magnesiumstearat eller stearinsyre, fyllmidler så som sukrose eller laktose og binde-
midler så som akasia, polyvinylpyrrolidon eller gelatin.

Kompleksene ifølge denne oppfinnelsen kan gis til et dyr parenteralt ved å anvende enhver av de kjente implantasjonsmetoder så som subkutan, intramuskulær og intraperitoneal. Fortrinnsvis blir implantatblandingene implantert subkuntant i et
10 dyr ved anvendelse av hvilken som helst velkjent teknikk.

Dyr som behandles på denne måten kan innbefatte uten begrensninger, pattedyr så som fe, sau, geiter, svin o.l., og fugler så om fjærkre.

Den følgende fremgangsmåte ble anvendt for å bestemme plasma PST-nivåer, førkonsum, gjennomsnittlig daglig økning og før-til-økning.

15 Svin ble huset i en låve og tilpasset 3-4 uker til binger inneholdende 7 til 8 griser pr. bing. I hver bing hadde grisene tilgang til et oppvarmet skjul og ad libitum fôr og vann.

Da de fleste grisene nådde ca. 75 kg, ble vektene deres sammenlignet statistisk og underkastet 4 forskjellige behandlinger, 9 griser pr. behandling.

20 Startdagen ble ansett som dag 0, på hvilken kroppsvekter, kontrollblodprøver og implantater ble igangsatt. Ved slutten av 21 dager ble grisene tatt ut fra undersøkelsen.

Grisene ble injisert med 1 pellet (avhengig av behandling) S.C. bak øret, idet et kommersielt buskapimplantatgevær ble brukt og administreringsstedet ble rensset
25 med 70% ETOH. Griser behandlet daglig med 5 mg/hode/dag ble injisert med en 3,8 cm 16 g nål i nakkeområdet. Behandlingen var som følger:

1. Kontroll - falsk implantat
2. PST - daglig injeksjon - (5 mg/hode/dag)
3. PST - o-vanillin-implantat - 1 pellet (35 mg PST)
- 30 4. PST - leupeptin-implantat - 1 pellet (35 mg PST)

Blodprøver ble tatt fra den slyngede gris gjennom halsvenen ved bruk av en vakutainer med en 3,8 cm nål. Blodet fikk sette seg, ble sentrifugert, og plasma fjernet. Plasma-prøver ble frosset for PST-bestemmelser som ble målt på en senere dato.

5

Fôrkonsum

Alle griser fikk Enhanced Finisher diet Nr.634 under undersøkelsen. På dag 0 ble to fôrsekker satt til føreren, og en begynnelsesvekt ble tatt. Førerne ble sjekket daglig og 1 sekk forveiet mat ble tilsatt etter behov (førerne fikk aldri gå tomme).

- 10 En sluttvekt av fører ble tatt på den dag alle griser ble tatt ut fra en binge. Sluttvekten ble trukket fra begynnelsesvekten, og dette ble addert til totalt fôr tilsatt som er lik totalt fôrkonsum pr. binge.

	Begynnelsesvekt av fører
-	<u>sluttvekt av fører</u>
15	Total
+	<u>Totalvekt av sekker for tilsatt</u>
	Totalt fôrkonsum pr. binge.

- 20 Grisene ble veiet i kilogram enkeltvis dag 0 og med 7 dagers mellomrom under undersøkelsen. Total gjennomsnittlig daglig økning ble utledet ved å subtrahere begynnelsesvekten på dag 0 fra grisenes sluttvekt og dividere med antallet dager på undersøkelse.

Fôr-til-økning pr. binge under undersøkelsen ble utledet ved å addere alt fôr konsumert pr. binge og dividere med totalvektøkningen pr. binge.

- 25 Den gjennomsnittlige daglige økning (ADG) og fôr-til-økning resultater er angitt i den følgende tabell:

TABELL 1

	PST behandling	Gj.sn. daglig økn. kg	% økning i forhold til kontr.	Før-til- økning- forhold	% av kontroll
5					
	Kontroll (intet PST)	0,71	-	4,4	-
10	5 mg/hode/dag	0,86	21	2,7	39
	0-vanillin/PST (1 pellet) (35 mg)	0,79	11,9	3,52	21
15					
	leupeptin/PST (1 pellet) (35 mg)	0,70	-1,4	4,12	6
20					

Resultatene av plasma-PST-nivåene viser at den daglige injeksjon av PST demonstrerer meget lave, om noen, plasma-PST nivåer etter 24 timer. Etter implantasjon av pelletene, derimot ble et vedvarende plasma-PST-nivå notert.

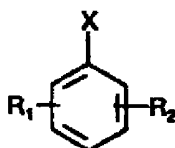
25 Resultatene ovenfor viser tydelig at når o-vanillin/PST komplekset administreres til griser ved implantasjon, er det en økning i forhold til kontrollen både i gjennomsnittlig daglig økning og før-til-økning observert hos grisene.

Videre viser resultatene at det ikke er nødvendig å til-sette en protease-inhibitor med PST'et. Vi viser nå at en ikke-proteaseinhibitor (o-vanillin) samvirker
30 på en positiv måte med PST for å opprettholde virksomhet over et 21 dagers tidsrom.

Metoden omfatter parenteral administrering til en animalsk organisme av ovennevnte PST-aromatiske aldehydkompleks i en tilstrekkelig mengde til å forlenge PST-blodnivåer og øke før-effektiviteten. Dosen er avhengig av flere
35 faktorer, f.eks. dyrets størrelse og den ønskede virkning. For administrering til svin vil komplekset fortrinnsvis være i en mengde fra 10 mg til ca. 500 mg, med fordel vil fra ca. 30 mg til ca. 75 mg like doser administreres med mellomrom på ca. 7 til 42 dager.

Patentkrav

1. Vekstfremmende kompleks som gir langvarig frigjøring av et somatotropin, hvilket omfatter et somatotropin og et aromatisk aldehyd med den følgende formel:



hvor X er CHO eller CH₂CHO, og hver av R₁ og R₂ er hydrogen, hydroksy, metoksy, etoksy, metyl eller etyl.

2. Kompleks ifølge krav 1, hvor X er CHO, og hver av R₁ og R₂ er hydroksy eller metoksy, og somatotropinet er valgt fra gruppen bestående av svine-, menneske-, storfe-, fugle-, heste- og saue-somatotropin.

3. Kompleks ifølge krav 2, hvor aldehydet er 2-hydroksy-3-metoksy benzaldehyd, og somatotropinet er svinesomatotropin.

4. Fremgangsmåte for tilveiebringelse av forlenget frigjøring av et somatotropin som omfatter parenteral administrering til en animalsk organisme i en tilstrekkelig mengde til å gi nevnte frigjøring av et vekstfremmende middel som er et kompleks av somatotropin og et aromatisk aldehyd ifølge hvert av kravene 1-3.

5. Fremgangsmåte ifølge krav 4, hvor det aromatiske aldehyd foreligger i komplekset i en mengde fra ca. 0,5 % til ca. 10 vekt%.

6. Fremgangsmåte ifølge krav 4, hvor komplekset administreres i en mengde fra ca. 10 mg til ca. 500 mg.

7. Fremgangsmåte ifølge krav 4, hvor administreringen foretas ved fra ca. 7 til 42 dagers intervaller.

8. Fremgangsmåte ifølge krav 4, hvor komplekset administreres subkutan som et implantat.

9. Fremgangsmåte for å forbedre forutnyttelsen hos dyr, hvilken omfatter administrering til en animalsk organisme av komplekset ifølge krav 1-3 i en tilstrekkelig mengde til å gi nevnte utnyttelsesgrad.

10. Fremgangsmåte ifølge krav 9, hvor komplekset er ifølge krav 5-8.