

Винахід стосується нових фармацевтичних композицій, що містять гормон росту, або похідну гормону росту, та амінокислоту, вибрану з групи Asp, Ile, Val, Leu, або His, або похідної гістидину, або пептид, до складу якого входить принаймні одна основна амінокислота та принаймні одна кисла амінокислота, та неіонний детергент, наприклад полісорбат або поллоксамер. Винахід в подальшому стосується методу приготування таких композицій та методу лікування з використанням таких композицій.

Гормони росту людини та звичайних свійських тварин є протеїнами приблизно з 191 амінокислоти, які синтезуються та секретуються з передньої долі гіпофізу. Гормон росту людини складається з 191 амінокислоти.

Гормон росту є ключовим гормоном, що бере участь в регуляції не лише росту тіла, але також і регуляції метаболізму протеїну, вуглеводів та ліпідів. Головною дією гормону росту є стимуляція росту.

Системи органів, на які впливає гормон росту, включають скелет, сполучну тканину, м'язи та внутрішні органи, такі як печінка, кишечник та нирки.

До розвитку рекомбінантної технології та клонування гена гормону росту, що дало зараз підйом виробництва, наприклад гормону росту людини (hGH) та Met-hGH у промисловому масштабі, гормон росту людини могли отримувати лише екстракцією з гіпофізів трупів людини. Обмежені джерела гормону росту зменшили його використання для тривалої стимуляції росту у дитинстві та при статевій зрілості для лікування карликовості, навіть хоча його було запропоновано, окрім іншого, для лікування низького зросту (завдяки дефіциту гормону росту, при нормальному низькому зрості та синдромі Тернера (Turner)), дефіциту гормону росту у дорослих, безпліддя, лікування опіків, загоєння ран, дистрофії, кісткового мозоля, остеопорозу, дифузної шлункової кровотечі та псевдоартрозу.

Далі гормон росту був запропонований для підвищення швидкості росту свійських тварин або для зменшення кількості жиру.

Фармацевтичні композиції гормону росту найчастіше є нестабільними. Продукти деградації, такі як деамідовані або сульфоксидовані продукти та димерні або полімерні форми утворюються, найчастіше, в розчинах гормону росту.

Головними реакціями хімічної деградації hGH є: 1) деамідування прямим гідролізом або через циклічний інтермедіат сукциніміду з утворенням різної кількості L-asp-hGH, L-iso-asp-hGH, D-asp-hGH, та D-iso-asp-hGH (посилання 1-3), 2) окислення залишків метіоніну у положеннях 14 та 125 (посилання 4-9), та 3) розщеплення пептидних зв'язків. Деамідування, головним чином, відбувається по Asp у положенні 149.

hGH досить легко окислюється у положеннях 14 та 125, особливо у розчині (4-8), оскільки окислення hGH у розчині з утворенням сульфоксидів відбувається в нормі завдяки кисню, що розчинений у композиції.

Зараз не вважається, що ці продукти деградації повинні мати токсичну або змінну біологічну активність або властивості зв'язування з рецептором, але не існує доказів зменшення конформаційної стабільності сульфоксидів у порівнянні з нативним hGH.

Інші "продукти деградації" гормону росту є продуктами агрегації, такими як димери та полімери. Були виконані дослідження для з'ясування ролі цих форм в індукванні імунної відповіді із достатньою кількістю антитіл до нативного hGH. Ці дослідження показали, що агрегати hGH є головною причиною його імуногенності у пацієнтів.

Таким чином, бажано у фармацевтичній композиції уникнути утворення агрегатів гормону росту, оскільки такі агрегати здатні викликати небажану імуногенність або змінений період напівжиття.

Кінетика деградації залежить від температури, pH та різних додатків або ад'ювантів у композиції hGH.

В зв'язку з нестабільністю, композицію гормону росту зараз ліофілізують звичайно та зберігають у ліофілізованій формі при 2-8°C, доки не використовуватимуть, для зменшення деградації. Ліофілізовані фармацевтичні суміші, що містять hGH, відтворюються пацієнтом та потім зберігаються у вигляді розчину при використанні до 30 днів, протягом яких відбувається деяка деградація.

На сьогоднішній день переважним вважається відтворення композиції гормону росту якомога пізніше перед використанням та перевезенням суміші у ліофілізованому стані. Ланцюжок від виробника до аптеки повинен відбуватися при контрольованій низькій температурі, наприклад 2-8°C, що дозволить зберігати композиції до трьох років.

Переважно, ліофілізована та потім знову відтворена композиція повинна бути стабільною з терміном використання у ліофілізованому стані протягом одного місяця та ще одного місяця у відтвореному стані у пристрої у вигляді олівця протягом запланованого періоду використання картриджу.

Як альтернатива ліофілізованим та відтвореним композиціям, гормон росту може існувати у вигляді рідкої композиції придатної для використання у пляшках або у системах у вигляді олівця для самолікування. Поширене використання систем у вигляді олівця для самолікування та широка галузь використання потребує композиції, яка є стабільною протягом достатньо тривалого часу терміну використання. Така стабілізація дуже важлива при перевезенні від клінік до домівок пацієнтів, де може не бути оптимальних умов зберігання. "Готова до використання" композиція подалі зменшує будь-які проблеми пов'язані з відтворенням та, таким чином, є зручною для пацієнта.

Стабільна розчинена композиція, що містить гормон росту, може бути вироблена готовою до використання у вигляді пляшок, що використовуються пацієнтом разом із загальнозживаними шприцями, або як картриджі, що підходять до пристрою у вигляді олівця, що використовується пацієнтом. В обох випадках пацієнт може уникнути відтворення композиції та, відповідно, не буде мати справи з ліофілізованою сумішшю, придатним носієм для відтворення, також як і мати необхідне вміння та стерильне обладнання для стерильного відтворення композиції. З причин безпеки також важливо уникнути відтворення ліофілізованої суміші прямо перед використанням композиції.

З точки зору виробника, перевагою є уникання етапу ліофілізації у приготуванні композицій гормону росту. Ліофілізація потребує часу та грошей, та є також часто перешкодою у виробництві завдяки обмеженому об'єму ліофільної сушарки.

Таким чином, існує потреба у більш стабільних розчинених композиціях гормону росту для того, щоб

сприяти кращому використанню пацієнтом. Таким чином, існує також потреба зменшення швидкості процесів деградації для того, щоб надати розчинним композиціям hGH стабільності при зберіганні та протягом періоду використання приблизно до одного місяця.

Попередні спроби стабілізувати hGH, запобігаючи утворенню димерів, закінчилися не зовсім успішно. Проблеми, пов'язані з утворенням димерів, відмічено, наприклад, у Becker, G.W., *Biotechnology and Applied Biochemistry* 9, 478 (1987).

Міжнародна патентна публікація №WO 89/09614 та Австралійська патентна заявка No.30771/89 описують стабільну фармацевтичну композицію, що містить гормон росту людини, гліцин, та манітол. Така композиція має кращу стабільність під час приготування та зберігання у ліофілізованому стані, також як і протягом використання після відтворення.

Опублікована Європейська патентна заявка №303 746 описує, що гормон росту тварин може бути стабілізований різноманітними стабілізаторами, що дає зменшене утворення нерозчинної фази та зберігання активності розчинної у водних середовищах, до таких стабілізаторів належать певні полііоли, амінокислоти, полімери амінокислот, які мають заряджену бічну групу при фізіологічному pH, та солі холіну. Полііоли вибираються з групи, яка складається з невідновлених цукрів, цукрових спиртів, цукрових кислот, пентаерітриту, лактози, розчинних у воді декстранів та Ficoll; амінокислоти вибираються з групи, яка складається з гліцину, саркозину, лізину або його солей, серину, аргініну або його солей, бетаїну, N, N,-диметилглїцину, аспарагінової кислоти або її солей, глутамінової кислоти або її солей; полімер амінокислот, який має заряджену бічну групу при фізіологічному pH, може бути вибраний з полілізину, поліаспарагінової кислоти, поліглутамінової кислоти, поліаргініну, полігістидину, поліорнітину або його солей; та похідні холіну, вибрані з групи, яка складається з хлориду холіну, дигідроцитрату холіну, бітартрата холіну, бікарбонату холіну, цитрату трихоліну, аскорбату холіну, борату холіну, глюконату холіну, фосфату холіну, сульфату ди(холіну) мукату дихоліну.

Патентна заявка США №4,917,685 описує пристрій для подачі, що має бути імплантований, що містить гормон росту, стабілізований використанням тих же стабілізаторів, що згадуються у EP 303746.

Опублікована Європейська патентна заявка №374,120 описує стабілізовану композицію, що містить hGH та поліол, що має три гідроксильні групи. Там також згадуються гліцерол та трис(гідроксиметил)амінометан. Далі описується присутність гідрохлориду гістидину як буферу разом з поліолом.

Міжнародна патентна публікація №WO 93/12811 описує стабілізовані композиції, що містять гормон росту у формі ліофілізованого порошку або водного розчину, що містить аспарагін.

Міжнародна патентна публікація №WO 93/12812 описує стабілізовані композиції, що містять гормон росту у формі ліофілізованого порошку або водного розчину, що містить гістидин. В таких композиціях деамідування зменшено на 25-30% у порівнянні з відповідною композицією гормону росту, що містить фосфатний буфер.

Міжнародна патентна публікація №WO 96/11703 описує стабілізовані композиції гормону росту, що містять ізолейцин.

Міжнародна патентна публікація №WO 96/11702 описує стабілізовані композиції гормону росту, що містять валін.

Міжнародна патентна публікація №WO 96/11704 описує стабілізовані композиції гормону росту, що містять лейцин.

Міжнародна патентна публікація №WO 93/19776 описує білкові композиції, що містять гормон росту, до складу яких входить цитратний буфер, які є більш стабільними, ніж композиції, що містять фосфатний буфер. Композиції можуть також містити амінокислоти, такі як гліцин та аланін та/або манітол або інші цукрові спирти та/або гліцерол та/або інші вуглеводи та за бажанням консервант, такий як бензиловий спирт.

Міжнародна патентна публікація №WO 94/03198 описує стабільну водну композицію, що містить гормон росту людини, буфер, неіонну поверхнево-активну речовину, за бажанням, нейтральну сіль, манітол або консервант. Буфером може бути гістидин, навіть хоча цитрат і кращий. Заявка описує кращу композицію, що містить цитрат як буфер, та хлорид натрію, та полісорбат 20 (Tween 20) для стабілізації. Ця комбінація стабілізує вищезгадану водну композицію від агрегації, але все ж таки приводить до утворення великої кількості деамідованого гормону росту.

Міжнародна патентна публікація No.WO 95/35116 описує стабільну ліофілізовану композицію, що містить сахарозу та, за бажанням, манітол.

Несподівано було знайдено, що фармацевтична композиція, що містить гормон росту, або похідну гормону росту, та амінокислоту вибрану з групи Asp, Ile, Val або Leu, гістидину, або похідної гістидину, або пептид, що містить принаймні один залишок основної амінокислоти та принаймні залишок однієї кислотної амінокислоти, та неіонний детергент, де кількість пептиду, або Asp, Ile, Val, Leu або His, або похідної гістидину складає від приблизно 0,01 до приблизно 10мг на мг GH, виявляє високу стабільність проти деамідування та агрегації. Стабільність продукту дозволяє зберігання та перевезення його у ліофілізованому стані або у формі розчиненої або повторно розчиненої композиції.

Пептид, що використовується згідно з цим винаходом, що містить залишок принаймні однієї основної амінокислоти та залишок принаймні однієї кислотної амінокислоти, може бути пептидом, що містить до 20 амінокислотних залишків, краще від 3 до 10 амінокислотних залишків, ще краще від 3 до 6 амінокислотних залишків, наприклад 3 або 4 амінокислотні залишки (наприклад Lys-Gly-Asp-Ser). Згідно з одним аспектом винаходу, основні та кислотні залишки коротших пептидів розділені 1 або 2 амінокислотними залишками. Пептиди краще містять альфа-амінокислотні залишки, що зустрічаються у природі. Амінокислота(ти) може бути I або D амінокислотою(тами) або їх сумішшю. "Кислими амінокислотними залишками" є, наприклад, Glu або Asp, та "основними амінокислотними залишками" є, наприклад, Lys або Arg.

Похідні гістидину для використання згідно з цим винаходом можуть бути амідами та естерами гістидину, такими як метиловий або етиловий естер, дипептиди, що мають послідовність His-X або X-His, де X є природним ос-амінокислотним залишком, та аналогами або похідними His, такими як імідазол, дез-аміно-His або полі-His.

У кращому аспекті винахід стосується фармацевтичної композиції, що містить гормон росту (GH) або похідну гормону росту та амінокислоту, вибрану з групи Asp, Ile, Val або Leu, та неіонний детергент, де кількість амінокислоти, вибраної з групи Asp, Ile, Val або Leu становить від приблизно 0,01 до приблизно 10мг на мг GH. У іншому кращому аспекті винахід стосується фармацевтичної композиції, що містить гормон росту (GH), або похідну гормону росту, та гістидин, або похідну гістидину, або пептид, що містить принаймні один залишок основної амінокислоти та принаймні один залишок кислої амінокислоти, та неіонний детергент, де кількість пептиду або гістидину або похідної гістидину становить від приблизно 0,01 до приблизно 10мг на мг GH.

становить від приблизно 0,05 до приблизно 5мг на мг GH, ще краще від приблизно 0,1мг до приблизно 3мг на мг GH, ще краще від приблизно 0,1 до приблизно 2мг на мг GH.

Композиція винаходу може бути у формі ліофілізованого порошку має бути відтворена пізніше, використовуючи загальноприйняті носії, такі як дистильована вода, або вода для ін'єкцій, або може бути у формі водного розчину, що містить гормон росту. Такі носії можуть містити загальноприйняті консерванти, такі як м-крезол, фенол та бензиловий спирт. Як наповнювач(і) для ліофілізації може бути вибрано один або кілька членів з групи, що складається з цукрових спиртів, наприклад манітолу, та дисахаридів, наприклад цукрози.

Ліофілізовані композиції, що містять цукрозу, є кращими завдяки дуже високій стабільності, а композиції, що містять цукрозу та манітол є особливо прийнятними, оскільки мають дуже високу стабільність з дуже доброю здатністю оброблятися, що дає тверді ліофілізовані продукти, що легко розчиняються, та дуже стабільні у розчині протягом довгого часу після розчинення. Іншими кращими композиціями згідно з винаходом є композиції, що містять манітол та цукрозу або трегалозу як наповнювач для ліофілізації. Композиції згідно з винаходом, що містять манітол та дисахарид, звичайно містять приблизно однакову кількість по вазі двох складових.

Кількість цукрози, присутньої у композиції винаходу, може змінюватись в широких межах. Відношення гормону росту до цукрози може змінюватись по вазі від 0,005 до 1,5. Таким чином, кількість цукрози може бути від 0,67 до 200мг на мг гормону росту, кращою є кількість від 1,1 до 50мг на мг гормону росту.

У кращому втіленні винаходу гормон росту є гормоном росту людини (hGH) та фармацевтична композиція надалі містить носій у формі водного буфера. Така водна композиція є в готовій до використання формі і може зберігатися та перевозитися як така, що не зазнає значної деградації.

Буфер для використання у розчині гормону росту може, наприклад, бути гістидиновим, цитратним, тартратним, або фосфатним буфером. L-гістидин має рКА 6,0 та є, отже, придатним як буфер в інтервалах pH від приблизно 5 до приблизно 7.

У подальшому аспекті винахід стосується способу приготування фармацевтичної композиції, що містить гормон росту, або похідну гормону росту, та амінокислоту, вибрану з групи Asp, Ile, Val, Leu або His, або похідної гістидину або пептид, що містить принаймні один залишок основної амінокислоти та принаймні один залишок кислої амінокислоти, та неіонний детергент, де певна кількість гормону росту, або похідн гормону росту, розчинена у розчині, що містить амінокислоту, вибрану з групи Asp, Ile, Val, Leu або His, або похідну гістидину, або пептид, що містить принаймні один залишок основної амінокислоти та принаймні один залишок кислої амінокислоти, у деіонізованій воді, та неіонний детергент, наприклад полісорбат або полоксамер, що, за бажанням, містить консервант, та що, за бажанням, містить агент для регулювання тоничності та, за бажанням, має значення pH від приблизно 6,0 до приблизно 8,8; відповідна кількість GH така ж, як і кількість пептиду, Asp, Ile, Val, Leu або His, або похідної гістидину від приблизно 0,01 до приблизно 10мг на мг GH.

У подальшому аспекті винахід стосується методу приготування фармацевтичної композиції, що містить гормон росту, або похідну гормону росту, та амінокислоту, вибрану з групи Asp, Ile, Val, Leu або His, або похідної гістидину, або пептид, що містить принаймні один залишок основної амінокислоти та принаймні один залишок кислої амінокислоти, та неіонний детергент, де гормон росту, або похідна гормону росту, розчинена у розчині, що містить амінокислоту, вибрану з групи Asp, Ile, Val, Leu або His, або похідної гістидину, або пептид, що містить принаймні один залишок основної амінокислоти та принаймні один залишок кислої амінокислоти у деіонізованій воді, та відповідну кількість неіонного детергенту, наприклад полісорбату або полоксамеру, що, за бажанням, містить консервант, та що, за бажанням, містить агент для регулювання тоничності та, за бажанням, має значення pH від приблизно 6,0 до приблизно 8,8; відповідна кількість неіонного детергенту така ж, як і кількість неіонного детергенту, і становить від приблизно 0,01 до приблизно 10мг на мг GH.

У подальшому аспекті винахід стосується способу приготування фармацевтичної композиції, що містить гормон росту, або похідну гормону росту, та амінокислоту, вибрану з групи Asp, Ile, Val, Leu або His, або похідної гістидину, або пептид, що містить принаймні один залишок основної амінокислоти та принаймні один залишок кислої амінокислоти, та неіонний детергент, що складає розчинення такої кількості гормону росту, або похідної гормону росту, що дорівнює кількості пептиду, або Asp, Ile, Val, Leu або His, або похідної гістидину від приблизно 0,05 до приблизно 0,5мг на мг GH, у розчині, що містить амінокислоту, вибрану з групи Asp, Ile, Val, Leu або His, або похідної гістидину, або пептид, що містить принаймні один залишок основної амінокислоти та принаймні один залишок кислої амінокислоти, та таку кількість неіонного детергенту, наприклад полісорбату або полоксамеру, що кількість неіонного детергенту становить від приблизно 0,1 до приблизно 2мг на мг GH, у деіонізованій воді, що, за бажанням, містить консервант, та що, за бажанням, містить агент для регулювання тоничності та, за бажанням, має значення pH від приблизно 6,0 до приблизно 8,8.

У подальшому аспекті винахід стосується способу приготування фармацевтичної композиції, що містить гормон росту, або похідну гормону росту, та амінокислоту, вибрану з групи Asp, Ile, Val, Leu або His, або похідну гістидину, або пептид, що містить принаймні один залишок основної амінокислоти та принаймні один залишок кислої амінокислоти, та полоксамер, де гормон росту або похідна гормону росту розчинена у розчині, що містить амінокислоту, вибрану з групи Asp, Ile, Val, Leu або His, або похідної гістидину, або пептид, що містить принаймні один залишок основної амінокислоти та принаймні один залишок кислої амінокислоти у деіонізованій воді, та полоксамер, що, за бажанням, містить консервант, та що, за бажанням, містить агент для регулювання тоничності та, за бажанням, має значення pH від приблизно 6,0 до приблизно 8,8.

Концентрація амінокислоти, вибраної з групи Asp, Ile, Val, Leu або His, або похідної гістидину, або пептиду, що містить принаймні один залишок основної амінокислоти та принаймні один залишок кислої амінокислоти, від приблизно 1мМ до приблизно 100мМ. Ще краще, коли концентрація Asp, Ile, Val, Leu або His, або похідної гістидину, або пептиду, що містить принаймні один залишок основної амінокислоти та принаймні один залишок кислої амінокислоти, становить від приблизно 2мМ до приблизно 20мМ, найкраще від приблизно 5мМ до приблизно 15мМ.

Фармацевтичні композиції винаходу можуть бути складені для введення будь-яким придатним шляхом,

наприклад парентеральним або оральним введенням або введенням у слизову мембрану, наприклад інтраназальне введення. Фармацевтична композиція може бути представлена у дозованій формі, що міститься у пляшці або картриджі, або у будь-якому іншому придатному контейнері, такому як завчасно заповнений шприц або пристрій у вигляді олівця.

Фармацевтична композиція винаходу може подалі містити солі, що звичайно використовуються для того, щоб зробити зручним її використання, наприклад ліофілізацію або відтворення.

Для стабілізації рН розчину краще підводити до значення від приблизно 6,0 до приблизно 8,8, краще від приблизно 6,0 до приблизно 7,0, ще краще від приблизно 6,0 до приблизно 6,8, навіть ще краще від приблизно 6,0 до 6,3, та найкраще від приблизно 6,0 до 6,2 (наприклад, приблизно 6,1).

рН може бути встановлено додаванням кислоти, яка не має шкідливої дії на гормон росту, краще фізіологічно прийнятної кислоти, наприклад мінеральної кислоти, такої як соляна кислота, сірчана кислота або азотна кислота або органічної кислоти, такої як оцтова кислота або лимонна кислота.

Фармацевтична композиція за винахідом може подалі містити солі для регулювання тоничності та за бажанням наповнювач для того, щоб зробити зручним її використання, наприклад, ліофілізацію, та швидке та повне розчинення ліофілізованої композиції при її відтворенні перед використанням.

Такі солі можуть бути вибрані із загальноприйнятих адитивів, таких як лужний метал, лужноземельний метал або амонійні солі органічних кислот, таких як лимонна кислота, тартарова кислота або оцтова кислота, наприклад, цитрат натрію, тартрат натрію або ацетат натрію, або мінеральних кислот, таких як соляна кислота, наприклад, хлорид натрію.

Наповнювач може бути вибраний з дисахаридів, таких як лактоза, трегалоза, та цукроза, цукрові спирти, такі як манітол, ксилітол, еритритол, трейтол, сорбтол або гліцерол, полісахариди, такі як полімери, що мають комерційну назву як продукти Dextran®, такі як Dextran® 40, Dextran® 70 або Dextran® 75, та Ficoll® та полівалентні спирти, такі як поліетиленгліколь або полівініловий спирт або комбінація двох або кількох цих.

У цьому контексті "гормон росту" або "hGH" може бути гормоном росту будь-якого походження, таким як пташиний, бичачий, кіньський, людський, овечий, свинячий, з лосося, з тунця або гормон росту форелі, краще бичачий, людський або свинячий гормон росту, гормон росту людини є найкращим. Використаний гормон росту згідно з винаходом може бути природним гормоном росту, виділеним з природного джерела, наприклад, екстрагуванням гіпофізів загальноприйнятим чином, або гормоном росту, виробленим рекомбінантними технологіями, наприклад, як описано у E.B. Jensen та S. Carlsen у Biotech та Bioeng. SS, 1-11 (1990). "Похідна гормону росту" може бути скороченою формою гормону росту, де один або кілька амінокислотних залишків були видалені; його аналогом, де один або кілька амінокислотних залишків у нативній молекулі були заміщені іншим залишком амінокислоти, краще залишком амінокислоти, що зустрічається у природі, але так, щоб заміщення не мало шкідливої дії, такої як антигенність або інгібування або його похідна, наприклад деамідована або сульфоксидована форма гормону росту, або форма, що має N- або C-кінцеві подовження, такі як Met-hGH, Met-Glu-Ala-Glu-hGH або Ala-Glu-hGH. Кращим гормоном росту є hGH. Гормон росту може бути концентратом, отриманим безпосередньо з ферментативного бульйону, або загальноприйнятою ліофілізованою сумішшю, яка розчиняється у придатному розчиннику.

Термін "похідні гістидину" використовується для того, щоб назвати амідні та естери гістидину, такі як метиловий або етиловий естер, дипептиди, такі як His-Gly, His-Ala, His-Leu, His-Lys, His-Ser, His-Phe, та дипептиди, такі як Ala-His, Gly-His, Val-His, Glu-His, Met-His, Arg-His, Asp-His, Leu-His, Ser-His та аналоги або похідні His, такі як імідазол, дез-аміно-His або полі-His.

У цьому контексті "неіонний детергент" або "неіонна поверхнево-активна речовина" (ПАР) можуть бути полісорбатами, такими як полісорбат 20 або 80 тощо, та полуксамерами, такими як полуксамер 188 або 407, полііоли Pluronic®, та інші полімери етилену/пропілену тощо. Кількості, ефективні для забезпечення стабільної, водної композиції, будуть використані звичайно від приблизно 0,01 до приблизно 10мг детергенту на мг гормону росту, краще від приблизно 0,05 до приблизно 5мг детергенту на мг гормону росту, ще краще від приблизно 0,1 до приблизно 2мг детергенту на мг гормону росту.

Використання неіонних детергентів дозволяє піддавати композицію зрізам та поверхневим стресам, не викликаючи денатурації білку.

Кількість неіонного детергенту у композиції може бути від 0,01 до приблизно 10мг детергенту на мг гормону росту, краще від 0,05 до приблизно 5мг детергенту на мг гормону росту, найкраще від 0,1 до приблизно 2мг детергенту на мг гормону росту.

У цьому контексті "дисахарид" використовується для того, щоб визначити дисахариди, що зустрічаються у природі, такі як цукроза, трегалоза, мальтоза, лактоза, сефароза, тураноза, ламінарибоза, ізомальтоза, гентіобіоза або мелібіоза.

Пептид, що містить принаймні один залишок основної амінокислоти та принаймні один залишок кислої амінокислоти для використання згідно з цим винаходом, краще є таким, що містить α-амінокислотні залишки, що зустрічаються у природі. Амінокислота(ти) може бути l або d амінокислотою(тами) або їх сумішшю. Кращим пептидом, що містить принаймні один залишок основної амінокислоти та принаймні один залишок кислої амінокислоти є Lys-Gly-Asp-Ser.

У цьому контексті "кислими амінокислотними залишками" є, наприклад, Glu або Asp, та "основними амінокислотними залишками" є, наприклад, Lys або Arg.

Розчинником, що використовується способом цього винаходу, може бути вода, спирти, такі як етиловий, n-пропіловий або ізопропіловий, бутиловий або їх суміші. Для затримання мікробного росту, розчинник може містити консервант, такий як m-крезоловий, феноловий, або бензиловий спирт.

Термін "доза" гормону росту стосується кількості, що забезпечує терапевтичний ефект у режимі введення. Композиції, що готуються таким чином, містять кількості hGH щонайменше приблизно 0,1мг/мл, краще більше приблизно 1мг/мл, краще від приблизно 1мг/мл до приблизно 40мг/мл, ще краще від приблизно 1мг/мл до приблизно 25мг/мл, ще краще від приблизно 1мг/мл до приблизно 15мг/мл, наприклад від 1мг/мл до приблизно 10мг/мл, підраховані по готовій для вживання композиції. Для використання цих композицій при

введенні людям, що страждають, наприклад, від гіпофізарної карликовості, ці композиції містять від приблизно 0,1мг/мл до приблизно 10мг/мл, відповідно призначеним дозам для певного лікування. Концентрації не є критичними щодо винаходу та можуть бути змінені особою, яка контролює введення.

Інший аспект винаходу стосується методу лікування пацієнта, який піддається дії гормону росту, що складає лікування пацієнта кількістю фармацевтичної композиції згідно з винаходом, ефективною для лікування вищезгаданої хвороби.

Винахід детально розглянутий у наведених нижче Прикладах, які ілюструють винахід. Вони не розглядаються такими, що обмежують об'єм винаходу, який описаний доданою формулою.

Приклад 1:

Інгібування агрегації

Рідкі композиції hGH готували розчиненням hGH у розчині наповнювачів та доводили рН за допомогою HCl/NaOH. Склад композиції був:

hGH	5мг/мл
Манітол	45мг/мл
L-гістидин	0,62мг/мл
Фенол	2,5мг/мл
ПАР	x мг/мл

pH=y (від 6,1 до 6,8)

Вигляд розчинів перевіряли візуально, після чого розчини зберігали 1 день при 8°C та обертали 19 годин (20обертів/хвилину) при 25°C, відповідно (Таблиця 1):

Таблиця 1

ПАР	X (мг/мл)	pH (У)	Вигляд після 1 дня при 8°C	Вигляд після 19 годин обертання
-	0	6,1	Осад	Осад
-	0	6,3	Осад	Багато пластівців
-	0	6,5	Пластівці	Багато пластівців
-	0	6,8	Пластівці	Кілька пластівців
Pluronic L64	0,5	6,8	Прозорий, трохи пластівців	Багато малих пластівців
Pluronic L64	1	6,8	Прозорий, трохи пластівців	Прозорий, кілька пластівців
Pluronic F68	2	6,1	Прозорий	Прозорий, кілька пластівців
Pluronic F68	2	6,3	Прозорий	Прозорий, трохи пластівців
Pluronic F68	2	6,5	Прозорий	Прозорий, трохи пластівців
Pluronic F68	2	6,8	Прозорий	Прозорий, кілька пластівців
Lutrol F127	1	6,1	Прозорий	Прозорий, кілька пластівців
Lutrol F127	1	6,3	Прозорий	Прозорий, кілька пластівців
Lutrol F127	1	6,5	Прозорий	Прозорий, трохи пластівців
Lutrol F127	1	6,8	Прозорий	Не аналізували
Tween 20	2	6,1	Невеликий осад	Досить прозорий, кілька пластівців
Tween 20	2	6,3	Прозорий	Прозорий, кілька пластівців
Tween 20	2	6,5	Прозорий, кілька пластівців	Прозорий, трохи пластівців
Tween 20	2	6,8	Прозорий	Прозорий, кілька пластівців

Приклад 2:

Швидкість деамідування

Всім композицій, наведені нижче у таблиці 2, готували додаванням hGH до розчинів, що містили наповнювачі. рН доводили до 6,1. Композиції потім зберігали протягом 28 днів при 25°C і протягом 14 днів при 37°C, та перевіряли на утворення деамідованих форм hGH. Константи швидкості деамідування підраховували на основі даних стабільності. У таблиці нижче вміст hGH та наповнювачів наведений у мг/мл, а константи швидкості k<sub>250C</sub> та k<sub>370C</sub> наведені у днях<sup>-1</sup>.

Таблиця 2

hGH	Фенол	Pluronic F68	Lutrol F127	L-гістидин	Дицитрат натрію	Манітол	NaCl	k <sub>250C</sub>	k <sub>370C</sub>
5	2,5	2		0,62		45		0,00180	0,00860
6,7	2,5	2			2,2	45		0,00221	0,0127
6,7	2,5	2		0,62			5,8	0,00244	0,0110
6,7	2,5	2			2,2		5,8	0,00263	0,0143
5	2,5		1	0,62		45		0,00178	0,00914
6,7	2,5		1		2,2	45		0,00221	0,0128
6,7	2,5		1	0,62			5,8	0,00236	0,0112
6,7	2,5		1		2,2		5,8	0,00259	0,0139

Приклад 3:

Утворення деамідованих форм

Композиції, наведені нижче у таблиці 3, готували додаванням hGH до розчину, що містив наповнювачі, та доводили рН. Композиції потім зберігали протягом 3 місяців при 8°C і 25°C та перевіряли на утворення

деамідованих форм hGH.

Таблиця 3

hGH (мг/мл)	ПАР (мг/мл)	Фенол	L-гістидин	Манітол	pH	Вміст дезамідоформ (%)			
						t=0	3 місяці при 8°C	12 тижнів при 25°C	3 тижні при 37°C
6,25	2 (F68)	2,5	0,62	45	6,3	0,6	2,7	18,1	21,1
6,25	2 (F68)	2,5	0,62	45	6,2	0,5	2,5	16,2	18,7
6,25	2 (F68)	2,5	0,62	45	6,1	0,6	2,2	14,8	17,1
3,33	3 (F68)	3,0	0,68	40	6,1	1,3	3,0	15,5	н/а
6,67	3 (F68)	3,0	0,68	40	6,1	1,0	3,2	16,6	н/а
10,0	3 (F68)	3,0	1,1	39	6,1	0,6	3,8	16,7	н/а
6,25	1 (L127)	2,5	0,62	45	6,1	0,6	2,5	15,4	18,2
6,25	2 (T20)	2,5	0,62	45	6,1	0,6	н/а	н/а	16,6

1): Тип ПАР наведений у дужках:  
F68= Pluronic F68= полуксамер 188  
F127= Lutrol 127= полуксамер 407  
T20= Tween 20= полісорбат 20

Приклад 4:  
24 композиції готували за наведеною нижче формулою:  
hGH від 3,33 до 13,1мг/м.  
L-гістидин 0,78мг/м.  
Манітол 22мг/м.  
Цукроза 21мг/м.  
Полуксамер 188 1,33-5,33мг/м.

Консервант: Бензиловий спирт (0-20мг/мл) або >енол (0-5мг/мл)  
Композиції готували додаванням hGH до розчину наповнювачів. pH доводили до 6,8. Композиції зберігали при 25°C протягом 4 тижнів та потім прозорість розчинів вимірювали як поглинання при 340нм, що визначало ступінь агрегації у розчинах (Таблиця 4).

Таблиця 4

hGH (мг/мл)	Полуксамер 188 (мг/мл)			Бензиловий спирт (мг/мл)		Фенол (мг/мл)	
		0	15	18	20	2,5	5
3,33	1,33	0,009	0,019	0,045	0,016	0,015	0,020
6,67	2,66	0,046	0,022	0,041	1)	0,025	0,026
10,0	4,0	0,022	0,060	1)	1)	0,034	0,050
13,1	5,33	0,018	0,041	0,042	1)	0,054	0,071

1): розчинення hGH неможливе.

#### Посилання

- 1) Y.-C.J.Wang та M.A.Hanson. Parenteral Formulations of Proteins та Peptides: Stability та Stabilizers. J. Parenteral Science та Technology 42 (Suppl.)(1988) 53-525.
- 2) M.C.Manning, K. Patel, R.T.Borchardt. Stability of Protein Pharmaceuticals. Pharmaceutical Research 6 (11) (1989) 903-918.
- 3) B.A.Johnson, J.M.Shirokawa, W.S.Hancock, M.W.Spellman, L.J.Basa та D.W.Asward. J.Biol.Chem. 264, 1462-71 (1989).
- 4) L.C. Teh et al., J.Biol.Chem., 262, 785-794 (1987).
- 5) G.W. Beckeretal., Biotech.Appl.Biochem., 10, 326-337 (1988).
- 6) R.A. Houghten et al., Arch.Biochem.Biophys., 178, 350-355 (1977).
- 7) R.M. Riggин et at, Anal.Biochem., 167, 199-209 (1987).
- 8) P. Gellerfors et al.. Acta Paediatr.Scand (suppl), 370, 93-100 (1990).
- 9) M.J.Kaufman, Pharm.Res., 7 (3) 289-292 (1990).