



УКРАЇНА

(19) UA (11) 96257 (13) C2

(51) МПК

A61K 47/10 (2006.01)

A61K 47/02 (2006.01)

A61K 31/557 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД(54) СТАБІЛІЗОВАНА ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ ЛЕЙКОТРИЕН-В₄ (LTB₄) АГЕНТА

1

2

(21) а200704260

(22) 20.09.2005

(24) 25.10.2011

(86) PCT/IB2005/002781, 20.09.2005

(31) 60/610,962

(32) 20.09.2004

(33) US

(31) 60/635,009

(32) 13.12.2004

(33) US

(31) 60/635,482

(32) 14.12.2004

(33) US

(46) 25.10.2011, Бюл.№ 20, 2011 р.

(72) БОРЖА П'ЄР, СА

(73) ЛТБ4 СВІДЕН АБ, SE

(56) WO 03/105823 A; 24.12.2003

WO 98/24397 A; 11.06.1998

WO 03/004054 A; 16.01.2003

WO 97/29751 A; 21.08.1997

EP 0 179 959 A; 07.05.1986

US 5789441 A; 04.08.1998

(57) 1. Стабілізована фармацевтична композиція LTB₄ агента, що містить терапевтично ефективну кількість LTB₄ агента, його солі, його складного ефіру або його простого ефіру разом з фармацевтично прийнятним носієм при лужній рН від 8,2 до 14, ефективною для стабілізації зазначеного LTB₄ агента, що, таким чином, підвищує термін придатності зазначеної композиції, або з фармацевтично прийнятним носієм і лужною реакцією;

де LTB₄ агент являє собою одну або більше поліненасичених жирних кислот, вибраних з групи, що включає LTB₄, 14,15-дигідро-LTB₄, 17,18-дегідро-LTB₄, 19-гідрокси-LTB₄, 20-гідрокси-LTB₄ та їх 5(R)-гідрокси, 5(S)-гідроперокси, 5(R)-гідроперокси та 5-деокси аналоги; LTA₄; 14,15-дигідро-LTA₄, 17,18-дегідро-LTA₄; 14,15-дигідро-LTA₄ метиловий складний ефір, LTA₄ метиловий складний ефір, 5(S)-гідрокси-6,8,11,14(E,Z,Z,Z)-ейкозатетраєноєву кислоту ("5-HETE"), 14,15-дигідро-5-HETE, 17,18-дегідро-5-HETE та їх 5(R)-гідрокси, 5(S)-гідроперокси, 5(R)-гідроперокси аналоги, та де носій з лужною реакцією являє собою інертну, фармацевтично прийнятну речовину (або речовини), що створює лужну мікро-рН від 8,2 до 14

навколо кожної частинки LTB₄, у випадку стабілізованої композиції LTB₄, що знаходиться в ліофілізованій, кристалічній або твердій аморфній формі, якщо вода адсорбована на частинках суміші або якщо вода додана до суміші в невеликих кількостях.

2. Композиція, що містить LTB₄ агент, його сіль, його складний ефір або його простий ефір разом з фармацевтично прийнятним носієм при лужній рН від 8,2 до 14 або з фармацевтично прийнятним носієм з лужною реакцією;

де LTB₄ агент являє собою одну або більше поліненасичених жирних кислот, вибраних із групи, що включає LTB₄, 14,15-дигідро-LTB₄, 17,18-дегідро-LTB₄, 19-гідрокси-LTB₄, 20-гідрокси-LTB₄ та їх 5(R)-гідроперокси, 5(S)-гідроперокси, 5(R)-гідроперокси та 5-деокси аналоги; LTA₄; 14,15-дигідро-LTA₄, 17,18-дегідро-LTA₄; 14,15-дигідро-LTA₄ метиловий складний ефір, LTA₄ метиловий складний ефір, 5(S)-гідрокси-6,8,11,14(E,Z,Z,Z)-ейкозатетраєноєву кислоту ("5-HETE"), 14,15-дигідро-5-HETE, 17,18-дегідро-5-HETE та їх 5(R)-гідрокси, 5(S)-гідроперокси, 5(R)-гідроперокси аналоги,

та де носій з лужною реакцією являє собою інертну, фармацевтично прийнятну речовину (або речовини), що створює лужну мікро-рН від 8,2 до 14 навколо кожної частинки LTB₄, у випадку стабілізованої композиції LTB₄, що знаходиться в ліофілізованій, кристалічній або твердій аморфній формі, якщо вода адсорбована на частинках суміші або якщо вода додана до суміші в невеликих кількостях.

3. Композиція або стабілізована композиція за будь-яким з пп. 1 або 2, де композиція або стабілізована композиція містить тільки нетоксичні речовини.

4. Композиція або стабілізована композиція за будь-яким з пп. 1-3, де зазначена лужна рН змінюється від 8,5 до 11,5,

5. Композиція або стабілізована композиція за будь-яким з пп. 1-4, де зазначена лужна рН змінюється від 9,5 до 11,5.

6. Композиція або стабілізована композиція за будь-яким з пп. 1-5, де зазначена композиція знаходиться в рідкій формі або в ліофілізованій формі

(13) C2

(11) 96257

(19) UA

або в кристалічній формі, або в твердій аморфній формі.

7. Композиція або стабілізована композиція за будь-яким з пп. 1-6, де зазначений носій являє собою водний носій.

8. Композиція або стабілізована композиція за п. 7, де зазначений водний носій вибраний із групи, що включає воду, розчини гідроксидів лужних металів, наприклад, розчин гідроксиду натрію, буферний сольовий розчин, наприклад, фосфатний буферний сольовий розчин (PBS), водний розчин, що включає спирт, розчини цукрів або їх суміш.

9. Композиція або стабілізована композиція за п. 8, де спирт зазначеного водного розчину, що містять спирт, вибраний із групи, що включає етанол, пропіленгліколь, бензиловий спирт, пропандіол, гліцерол та маніт.

10. Композиція або стабілізована композиція за будь-яким з пп. 1-6, де зазначений носій є носієм, вибраним із групи, що включає органічні розчинники та їх суміш і воду.

11. Композиція або стабілізована композиція за п. 10, де зазначена суміш містить воду та щонайменше 50 % (об'єм/об'єм), переважно щонайменше 60 % (об'єм/об'єм) спирту.

12. Композиція або стабілізована композиція за п. 11, де зазначений спирт вибраний із групи, що включає етанол, пропіленгліколь, бензиловий спирт, пропандіол, гліцерол та маніт.

13. Композиція або стабілізована композиція за п. 8, де зазначена композиція є стабілізованою при температурі від -25 °C до 45 °C, якщо зазначений носій є водним носієм, а зазначена композиція знаходиться в рідкій формі, та температурі від -25 °C до 45 °C, якщо зазначений носій є носієм, що містить спирт, або зазначена композиція знаходиться в ліофілізованій формі.

14. Композиція або стабілізована композиція за будь-яким з пп. 1-5, де зазначений носій являє собою тверду частинку, покриту лужною матрицею або складає лужну матрицю.

15. Композиція або стабілізована композиція за будь-яким з пп. 1-14, де зазначений LTB₄ агент є лейкотрієном B₄ [5S,12R-дигідрокси-6,8,10,14(Z,E,E,Z)-ейкозатетраєноєвою кислотою] ("LTB₄").

16. Композиція або стабілізована композиція за будь-яким з пп. 1-14, де зазначений LTB₄ агент вибраний із групи, що включає LTB₄, 14,15-дигідро-LTB₄ ("LTB₃"), 17,18-дегідро-LTB₄ ("LTB₅"), 19-гідрокси-LTB₄, 20-гідрокси-LTB₄ та їх 5(S)-гідроперокси та 5-деокси аналоги.

17. Композиція або стабілізована композиція за будь-яким з пп. 1-14, де зазначений LTB₄ агент вибраний із групи, що включає 5(R)-гідрокси та 5(R)-гідроперокси аналоги зазначеного LTB₄ агента.

18. Композиція або стабілізована композиція за будь-яким з пп. 1-14, де зазначений LTB₄ агент вибраний із групи, що включає метиловий складний ефір LTB₄ та етиловий складний ефір LTB₄.

19. Композиція або стабілізована композиція за будь-яким з пп. 1-14, де зазначений LTB₄ агент вибраний із групи, що включає 5(S)-гідрокси-6,8,11,14(E,Z,Z,Z)-ейкозатетраєнову кислоту ("5-

НЕТЕ"), 14,15-дигідро-5-НЕТЕ, 17,18-дегідро-5-НЕТЕ та їх 5(R)-гідрокси, 5(S)-гідроперокси, 5(R)-гідроперокси аналоги.

20. Композиція або стабілізована композиція за будь-яким з пп. 1-14, де зазначений LTB₄ агент вибраний із групи, що включає LTB₄, LTB₃, LTB₅, 20-гідрокси-LTB₄, 19-гідрокси-LTB₄ та їх 5-деокси аналоги.

21. Композиція або стабілізована композиція за будь-яким з пп. 1 - 14, де зазначений LTB₄ агент вибраний із групи, що включає LTB₄, LTB₃, LTB₅, 20-гідрокси-LTB₄ та їх 5-деокси аналоги.

22. Композиція або стабілізована композиція за будь-яким з пп. 1-21, де зазначений LTB₄ агент присутній у кількостях від близько 0,1 мкг/мл до 25 мкг/мл композиції.

23. Композиція або стабілізована композиція за будь-яким з пп. 1-22, де зазначений LTB₄ є присутнім у кількостях від близько 0,1 мкг/мл до 1 мкг/мл композиції.

24. Композиція або стабілізована композиція за будь-яким з пп. 1-23, що містить менш ніж 25 % (об'єм/об'єм) ацетонітрилу.

25. Композиція або стабілізована композиція за будь-яким з пп. 1-24, що додатково містить як зовнішній шар ентеросолюбильне покриття.

26. Композиція або стабілізована композиція за п. 25, що додатково містить шар, що відокремлює, між ядром, що містить LTB₄ агент та носій з лужною реакцією, та зовнішнім шаром.

27. Композиція або стабілізована композиція за будь-яким з пп. 1-26, що додатково містить хелатоутворюючий агент або фармацевтично прийнятну сіль хелатоутворюючого агента в кількості, ефективній для стабілізації зазначеного LTB₄ агента.

28. Композиція або стабілізована композиція за п. 27, де хелатоутворюючий агент являє собою амінополікарбоксильну кислоту.

29. Композиція або стабілізована композиція за будь-яким з пп. 27-28, де хелатоутворюючий агент вибраний із групи, що включає етилендіамінтетраоцтову кислоту (EDTA), діетилентриамінпентаоцтову кислоту (DTPA), нітрилотриоцтову кислоту (NTA), глутамінову кислоту та аспарагінову кислоту.

30. Композиція або стабілізована композиція за п. 29, де хелатоутворюючим агентом є EDTA.

31. Композиція або стабілізована композиція за п. 29, де хелатоутворюючим агентом є DTPA.

32. Композиція або стабілізована композиція за п. 27, де фармацевтично прийнятна сіль вибрана з групи, що включає солі натрію та калію.

33. Композиція або стабілізована композиція за будь-яким з пп. 27-32, що додатково містить людський сироватковий альбумін (HSA).

34. Композиція або стабілізована композиція за будь-яким з пп. 27-33, де зазначений хелатоутворюючий агент присутній у кількостях від близько 0,001 % до близько 1,0 % ваги стабілізованої композиції LTB₄ агента.

35. Композиція або стабілізована композиція за будь-яким з пп. 27-33, де зазначений хелатоутворюючий агент присутній у кількостях від близько

0,01 % до близько 40 % ваги стабілізованої компо-

зиції LTB₄ агента.

(a) Галузь даного винаходу

Даний винахід стосується нової фармацевтичної формуляції LTB₄ агента з лужною рН, ефективною для стабілізації LTB₄ агента і забезпечення підвищеного терміну придатності формуляції. Таким чином, даний винахід стосується композиції, що включає LTB₄ агент і фармацевтично прийнятний носій при лужній рН.

(b) Опис відомого рівня техніки

Лейкотрієн В₄ являє собою тетраненасичену жирну кислоту з двадцятьма атомами вуглецю і є відносно нестабільною молекулою. Ізотонічні водні розчини LTB₄ при рН 7,0 - 7,6, що прийнятні для введення людям і тваринам, стабільні тільки короткі періоди часу (від тижнів до місяців), якщо зберігаються при температурному діапазоні від 2°C до 25°C (і вище 25°C). Фактично, LTB₄ агенти піддаються окисненню, ізомеризації подвійних зв'язків (LTB₄ містить два *cis* і два *trans* подвійні зв'язки), рацемізації (LTB₄ містить два хіральних центра), етерифікації (LTB₄ містить карбоксильну групу), лактонізації в числі можливих різних структуральних перебудов.

Незважаючи на те, що LTB₄ агенти широко застосовуються у фармацевтиці, їх застосування як терапевтичних агентів для тварин або людей проблематично, через їх недостатню стабільність і термін придатності в розчині при температурах від 2°C до 25°C.

З наукової літератури видно, що дотепер формуляції LTB₄ для введення людям і тваринам являють собою водні розчини при рН 7,0 - 7,5, які зберігаються при дуже низьких температурах (-20°C або нижче), щоб уникнути розкладу. Альтернативно, LTB₄ застосовують у формі розчинів у етанолі, що також зберігаються при низькій температурі, які розбавляють буфером (рН 7,0 - 7,5) або випарюють насухо і заново розчиняють у буфері (рН 7,0 - 7,5) безпосередньо перед застосуванням, щоб уникнути розкладу. Такі формуляції не відповідають вимогам для застосування LTB₄ як терапевтичного агента для людей і тварин (недоцільні і мають короткий термін придатності).

З огляду на потенціал LTB₄ агентів як терапевтичних агентів для профілактики і лікування інфекцій та раку у людей і тварин, було б бажане одержання нової фармацевтичної формуляції LTB₄ агента, що діє в лужній рН для стабілізації LTB₄ агента, і одержання формуляції з підвищеним терміном придатності.

Однією з цілей даного винаходу є одержання нової фармацевтичної формуляції LTB₄ агента, що діє в лужній рН для стабілізації LTB₄ агента, і одержання формуляції з підвищеним терміном придатності.

За одним варіантом здійснення даного винаходу представлена фармацевтична формуляція LTB₄ агента, що включає терапевтично ефективну кількість LTB₄ агента, його солі, його складного ефіру або його простого ефіру разом з фармацевтично прийнятним носієм при лужній рН, ефектив-

ний для стабілізації LTB₄ агента, що, таким чином, підвищує термін придатності формуляції. Таким чином, даний винахід стосується композиції, що включає LTB₄ агент, його сіль, його складний ефір або його простий ефір і фармацевтично прийнятний носій при лужній рН.

За іншим варіантом здійснення даного винаходу переважна лужна рН змінюється від 7,1 до 14, більш переважно від 7,5 до 10,5. Переважно рН складає більш 7,6, більш переважно від 7,7 до 11,5. Ще більш переважно рН складає більш 8,1, наприклад, від 8,2 до 14, особливо від 8,5 до 12,5, наприклад, від 8,5 до 11,5, найбільше переважно від 9,5 до 11,5, наприклад, близько 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10,0, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4, 10,5, 10,6, 10,7, 10,8, 10,9, 11,0, 11,1, 11,2, 11,3, 11,4 або 11,5. В іншому переважному варіанті здійснення переважна лужна рН змінюється від 8,0 до 9,0, від 8,5 до 9,5, від 9,0 до 10,0, від 9,5 до 10,5 або від 10,0 до 11,5.

У деяких варіантах здійснення фармацевтичної формуляції LTB₄ агента включає терапевтично ефективну кількість LTB₄ агента разом з фармацевтично прийнятним носієм, що реагує в лужному середовищі. Дана заявка описує варіант здійснення, що стосується фармацевтично прийнятного носія при лужній рН, ефективний для стабілізації розглянутої фармацевтичної формуляції, цей варіант здійснення також включає фармацевтично прийнятний носій, що реагує в лужному середовищі.

За наступним варіантом здійснення даного винаходу носій являє собою водний носій.

За іншим варіантом здійснення даного винаходу носій є твердою частинкою, покритою лужною матрицею, або являє собою лужну матрицю, і носій може бути вибраний із групи, що включає органічні розчинники або їх суміш і воду.

За наступним варіантом здійснення даного винаходу стабілізована формуляція включає воду і, щонайменше, 50% (об'єм/об'єм), переважно, щонайменше, 60% (об'єм/об'єм), більш переважно, щонайменше, 70% (об'єм/об'єм), наприклад, близько 75% (об'єм/об'єм), особливо, щонайменше, 80% (об'єм/об'єм) співрозчинника. В окремому варіанті здійснення даного винаходу стабілізована формуляція включає воду і 1 - 49% розчинника або воду і 50 - 99% співрозчинника. Зазначений співрозчинник може бути вибраний з групи, що включає етанол, пропіленгліколь, поліетиленгліколь, ізопропіловий спирт, бензиловий спирт, пропандіол, гліцерол, глікофуrol, диметилсульфоксид, диметилацетамід та їх суміші. В окремому варіанті здійснення даного винаходу стабілізована формуляція включає, щонайменше, 90% (об'єм/об'єм) зазначеного співрозчинника.

За іншим варіантом здійснення даного винаходу формуляція знаходиться в рідкій формі або ліофілізованій формі або в кристалічній формі або в твердій аморфній формі, переважно в рідкій формі або в ліофілізованій формі.

За наступним варіантом здійснення даного винаходу водний носій вибраний із групи, що включає воду, розчини гідроксидів лужних металів, наприклад, розчин гідроксиду натрію, буферні сольові розчини, наприклад, фосфатно-буферний сольовий розчин (PBS), водний розчин, що містить співрозчинники, наприклад, водний розчин, що містить спирт, розчини цукрів або їх суміш. Зазначений водний розчин, що містить співрозчинник, звичайно містить від близько 1% до близько 49% (об'єм/об'єм) співрозчинника.

За іншим варіантом здійснення даного винаходу співрозчинник, що міститься у водному розчині, вибраний із групи, що включає етанол, пропіленгліколь, поліетиленгліколь, ізопропіловий спирт, бензиловий спирт, пропандіол, гліцерол, глікофурол, диметилсульфоксид, диметилацетамід та їх суміші.

За наступним варіантом здійснення даного винаходу формуляція стабілізована при температурі, що змінюється від -25°C до 45°C, переважно від 0°C до 40°C, наприклад, 2°C - 35°C, особливо 5°C - 25°C, якщо носій є водним носієм, а формуляція знаходиться в рідкій формі, та при температурі, що змінюється від -25°C до 45°C, переважно від -20°C до 40°C, більш переважно -10°C - 30°C, особливо 0°C - 20°C, найбільше переважно 0°C - 10°C, якщо носій є органічним носієм, наприклад, носій, що містить спирт, або формуляція знаходиться в ліофілізованій формі. Іншими найбільш переважними температурними діапазонами, якщо носій є органічним носієм, наприклад, носій, що містить спирт, або формуляція знаходиться в ліофілізованій формі, є -20°C - 0°C, наприклад, -10°C - 0°C або 20°C - 40°C, наприклад, 20°C - 30°C.

За іншим варіантом здійснення даного винаходу формуляція додатково включає хелатоутворюючий агент або фармацевтично прийнятну сіль хелатоутворюючого агента в кількості, ефективній для стабілізації LTB₄ агента.

Переважні хелатоутворюючі агенти за іншим варіантом здійснення даного винаходу включають, без обмеження, наступні:

- амінополікарбоксильну кислоту,
- етилендіамінтетраоцтову кислоту (EDTA), діетилендіамінпентаоцтову кислоту (DTPA), нітрилтриоцтову кислоту (NTA), глютамінову кислоту та аспарагінову кислоту,
- етиленглікольтетраоцтову кислоту (EGTA) та
- діетилтриамінпентаоцтову кислоту (DTPA).

За наступним варіантом здійснення даного винаходу фармацевтично прийнятна сіль може бути вибрана з групи, що містить солі іонів натрію та калію.

За окремим варіантом здійснення даного винаходу стабілізована формуляція може також бути стабілізована в ліофілізованій формі за допомогою включення у формуляцію людського сироваткового альбуміну (HSA).

За наступним варіантом здійснення даного винаходу хелатоутворюючий агент присутній у кількостях від близько 0,001% до близько 1,0% ваги формуляції LTB₄ агента, більш переважно хелатоутворюючий агент присутній у кількостях від бли-

зько 0,01% до близько 40% ваги формуляції LTB₄ агента.

Переважні LTB₄ агенти за даним винаходом включають, без обмеження, наступні:

- лейкотрієн В₄ [5S,12R-дигідрокси-6,8,10,14(Z,E,E,Z)-ейкозантетраеноєва кислота] ("LTB₄"),
- LTB₄, 14,15-дигідро-LTB₄ ("LTB₃"), 17,18-дегідро-LTB₄ ("LTB₅"), 19-гідрокси-LTB₄, 20-гідрокси-LTB₄ і 5(S)гідроперокси та їх 5-деокси аналогів,
- 5(R)-гідрокси та 5(R)-гідроперокси аналогів LTB₄ агента,
- лейкотрієн А₄ ("LTA₄"), 14,15-дигідро-LTA₄ ("LTA₃") та 17,18-дегідро-LTA₄ ("LTA₅"),
- 14,15-дигідро-LTA₄ метиловий складний ефір та LTB₄ метиловий складний ефір,
- 5(S)-гідрокси-6,8,11,14(E,Z,Z,Z)-ейкозантетраеноєву кислоту ("5-HETE"), 14,15-дигідро-5-HETE, 17,18-дегідро-5-HETE та їх 5(R) гідрокси, 5(R)-гідроперокси, 5(S)-гідроперокси аналогів,
- лейкотрієні C₄ і D₄ та 14,15-дигідро або їх 17,18-дегідро аналогів; N-ацил або N-алкіл похідні лейкотрієнів C₄ і D₄ та їх 14,15-дигідро або 17,18-дегідро аналогів,
- 5,12-дигідрокси-6,8,10,14-ейкозантетраеноєву кислоту, 5-гідрокси-6,8,11,14-ейкозантетраеноєву кислоту та їх ізомери,
- 20,20,20-трифторметил-LTB₄; 19-метил-LTB₄, 19,19-диметил-LTB₄, 19-фтор-LTB₄, 19,19-дифтор-LTB₄, 18,20-дифтор-LTB₄ і 20-фтор-LTB₄,
- 3-тіо-LTB₄, 3-гідрокси-LTB₄, 3-метил-LTB₄, 3,3-диметил-LTB₄, 3-фтор-LTB₄, 3,3-дифтор-LTB₄ та 2,3-дифтор-LTB₄, LTB₄ метилсульфоніламід, LTB₄ метиламід, 1-тетразоль LTB₄, та
- їх сіль, їх похідне простого ефіру та їх похідне складного ефіру.

Особливо переважно LTB₄ агенти за даним винаходом вибрані з групи, що включає LTB₄, LTB₃, LTB₅, 20-гідрокси-LTB₄, 20,20,20-трифторметил-LTB₄, 19-гідрокси-LTB₄, 18-гідрокси-LTB₄, 3-гідрокси-LTB₄, 2-гідрокси-LTB₄, 4-гідрокси-LTB₄, їх 5-деокси аналогів та солі, їх прості або складні ефіри.

Ще більш переважно LTB₄ агенти за даним винаходом вибрані з групи, що включає LTB₄, LTB₃, LTB₅, 20-гідрокси-LTB₄, 20,20,20-трифторметил-LTB₄, 3-гідрокси-LTB₄, їх 5-деокси аналогів та солі, їх прості або складні ефіри.

LTB₄ агент переважно присутній у кількостях від близько 0,1 мкг/мл до 25 мг/мл формуляції, переважно від 1 мкг/мл до 25 мг/мл формуляції, більш переважно від близько 1 мкг/мл до 1 мг/мл формуляції.

Фігура 1 показує, що хелатоутворюючий агент EDTA підсилює стабільність водного розчину Na солі LTB₄ при pH 7,4.

Фігура 2 показує вплив концентрації LTB₄ на стабільність водних розчинів Na солі LTB₄.

Фігура 3 показує вплив pH (фосфат/гліциновий буфер) на стабільність водного розчину Na солі LTB₄ при 1,75 мг/мл.

Фігура 4 показує вплив рН (фосфатний буфер) на стабільність водних розчинів Na солі LTB₄ при 17,5мкг/мл.

Фігура 5 показує вплив різних буферних міцностей (фосфат/гліциновий буфер) на стабільність водних розчинів Na солі LTB₄.

Фігура 6 показує, що людський сироватковий альбумін (HSA) або/та лужна рН (фосфатний буфер) підсилює стабільність водних ліофілізованих розчинів (що містять маніт) Na солі LTB₄.

Фігура 7 показує, що лужна рН (фосфат/гліциновий буфер) підсилює стабільність розчинів в етанолі (95/5, етанол/вода та 75/25, етанол/буфер, об'єм/об'єм) LTB₄ (кислотна форма та Na сіль).

Фігура 8 показує, що лужна рН (фосфат/гліциновий буфер) підсилює стабільність різних LTB₄ агентів у розчині.

Фігура 9 додатково показує, що лужна рН (фосфат/гліциновий буфер) підсилює стабільність різних LTB₄ агентів у розчині.

Фігура 10 показує, що LTB₄ стабілізований у широкому діапазоні лужної рН, та що високу рН потрібно підняти для забезпечення стабільності.

Фігура 11 показує ефективне поглинання LTB₄ на моделі щура при введенні в тонку кишку та порівняння з внутрішньовенним та підшкірним введенням.

Стабільність водних розчинів LTB₄ аналізували при різних експериментальних умовах. З'ясували, що 1) стабільність LTB₄ розчинів значно підвищувалася при лужній рН; та що 2) хелатоутворюючі агенти, наприклад, EDTA, сприяли стабільності LTB₄ розчинів. Позитивний ефект лужної рН на стабільність LTB₄ розчину спостерігали при застосуванні або фосфатного буфера, або гліцинового буфера; позитивний ефект лужної рН на стабільність LTB₄ розчину спостерігали при усіх концентраціях аналізованого лікарського засобу (17,5мкг/мл - 17,5мкг/мл) та при усіх аналізованих температурах (4°C та 40°C).

Вираз "підвищений термін придатності" у контексті даного винаходу означає розширення стабільності LTB₄ агентів у формуляціях або композиціях за даним винаходом у порівнянні з формуляціями або композиціями LTB₄ агентів, що не включають фактор рН, як описано вище, та/або хелатоутворюючі агенти, як описано вище. Період часу стабільності LTB₄ агентів у формуляціях або композиціях за даним винаходом в порівнянні з формуляціями або композиціями LTB₄ агентів, що не включають фактор рН, як описано вище, та/або хелатоутворюючі агенти, як описано вище, складає, в залежності від температури, домішок та концентрації LTB₄ агентів, переважно більш, щонайменше, тижня, наприклад, щонайменше, два, три або чотири тижні, більш переважно, щонайменше, два, три або чотири місяці, особливо, щонайменше, шість, дев'ять або дванадцять місяців, наприклад, щонайменше, 24 або 48 місяців.

Посилання на період часу стабільності LTB₄ агентів у формуляціях або композиціях потрібно розуміти як період часу, коли рівень включень менше ніж 10%, переважно менше ніж 6%, найбільше

переважно менше ніж 5%, наприклад, менше ніж 4%, 3%, 2% або 1%.

Вираз "включення" у контексті даного винаходу потрібно розуміти як продукти розпаду LTB₄ агента, що вимірюються зворотно-фазовою високоефективною рідинною хроматографією (HPLC) та ультрафіолетовою (UV) фотометрією при 270нм. Таким чином, чим вище рівень включень, тим нижче стабільність формуляції LTB₄ агента. У даному описі, у прикладах і фігурах рівень включень виражається як відсоток пікової площі включень по відношенню до пікової площі LTB₄, що вимірювали за допомогою UV фотометрії при 270нм. У прикладах і фігурах, що мають до них відношення, рівень включень можна виразити як відсоток загальної площі під кривою при 270нм. Використовуване визначення буде зрозумілим з контексту прикладів.

Вираз "їх солі" потрібно розуміти як фармацевтично прийнятні основно-адитивні солі, отримані обробкою кислотної функціональної групи, наприклад, карбонової кислоти, відповідними основами, такими як, неорганічні основи, наприклад, гідроксиди лужних металів; звичайно гідроксид натрію або калію; карбонати лужних металів; звичайно карбонат або гідрокарбонат натрію або калію; гідроксиди лужноземельних металів; звичайно гідроксид кальцію або магнію; карбонати лужноземельних металів; звичайно карбонат або гідрокарбонат кальцію або магнію; або амонію; або органічні основи, наприклад, первинні, вторинні або третинні аміни, алкоголяти лужних або лужноземельних металів, наприклад, метанолат натрію, етанолат натрію або етанолат калію. Переважними солями за даним винаходом є основно-адитивні солі з гідроксидом натрію або калію.

Вираз "їх складні ефіри" потрібно розуміти як фармацевтично прийнятні складні ефіри, отримані обробкою функціональної групи кислотної форми або форми похідної кислоти будь-яким типовим етерифікуючим агентом, відомим фахівцю в даній галузі. У контексті даного винаходу складні ефіри зазначених LTB₄ агентів являють собою переважно C₁₋₆ алкільні ефіри, наприклад, метиловий ефір, етиловий ефір, n-пропіловий ефір, i-пропіловий ефір, n-бутиловий ефір, i-бутиловий ефір, s-бутиловий ефір, t-бутиловий ефір, n-пентиловий ефір, i-пентиловий ефір, s-пентиловий ефір, неопентиловий ефір та n-гексиловий ефір. Складні ефіри описаних LTB₄ агентів можуть також являти собою внутрішньомолекулярні складні ефіри, тобто лактони, утворені внутрішньомолекулярною етерифікацією, наприклад, 5-гідроксигрупи з карбоксильною групою.

Вираз "їх прості ефіри" потрібно розуміти як фармацевтично прийнятні прості ефіри, отримані обробкою функціональної групи спиртової форми або форми похідної спирту будь-яким звичайним етерифікуючим агентом, відомим фахівцю в даній галузі. У контексті даного винаходу простими ефірами описаних LTB₄ агентів є переважно C₁₋₆, алкільні прості ефіри, наприклад, метиловий простий ефір, етиловий простий ефір, n-пропіловий простий ефір, i-пропіловий простий ефір, n-бутиловий простий ефір, i-бутиловий простий ефір, s-

бутиловий простий ефір, t-бутиловий простий ефір, n-пентиловий простий ефір, i-пентиловий простий ефір, s-пентиловий простий ефір, неопентиловий простий ефір та n-гексиловий простий ефір.

LTV₄ агенти

Лейкотрієн B₄ (LTV₄) агент за даним винаходом є або LTV₄, або деякими структурально спорідненими поліненасиченими жирними кислотами, що відповідають їх біологічній активності. Вони являють собою або речовини природного походження, або аналоги таких речовин природного походження. Усі LTV₄ агенти можна одержати хімічним синтезом за допомогою методів, описаних у літературі, і більшість з них є комерційно доступними.

Застосовуваний у даному описі вираз "LTV₄ агент" означає одну або більш наступну поліненасичену жирну кислоту, що на додаток до LTV₄ є або попередником, або метаболітом LTV₄, або LTV₄ аналогом: LTV₄, 14,15-дигідро-LTV₄, 17,18-дегідро-LTV₄, 19-гідрокси-LTV₄, 20-гідрокси-LTV₄ та їх 5(R)-гідрокси, 5(S)-гідроперокси, 5(R)-гідроперокси та 5-деокси аналоги; LTA₄; 14,15-дигідро-LTA₄, 17,18-дегідро-LTA₄; 14,15-дигідро-LTA₄ метиловий складний ефір, LTA₄ метиловий складний ефір, 5(S)-гідрокси-6,8,11,14(E,Z,Z,Z)-ейкозантетраеноєва кислота ("5-HETE"), 14,15-дигідро-5-HETE, 17,18-дегідро-5-HETE та їх 5(R)-гідрокси, 5(S)-гідроперокси, 5(R)-гідроперокси аналоги.

Вираз "LTV₄ агент" також включає інші похідні поліненасичених жирних кислот: лейкотрієни C₄ і D₄ та їх 14,15-дигідро або 17,18-дегідро аналоги; N-ацильні або N-алкільні похідні лейкотрієнів C₄ і D₄ та їх 14,15-дигідро або 17,18-дегідро аналоги; усі ізомерні 5,12-дигідрокси-6,8,10,14-ейкозантетраеноєві кислоти та 5-гідрокси-6,8,11,14-ейкозантетраеноєві кислоти.

Вираз "LTV₄" також включає варіанти, що являють собою нековалентно модифіковані жирні кислоти, наприклад, натрієву або калієву солі LTV₄ агентів.

Вираз "LTV₄ агент" також включає варіанти, при яких модифікацію вводять у молекулу за допомогою реагуючих цільових функціональних груп жирної кислоти з органічним дериватизуючим агентом, який здатний реагувати з обраною функціональною групою (що дає, наприклад, похідні складних або простих ефірів LTV₄ агента) або викликати внутрішньомолекулярне перегрупування (наприклад, утворення лактонів з гідроксильованими жирними кислотами). Утворені сполуки можуть змінювати біологічну активність та/або біодоступність. Таким чином, ковалентно модифікована жирна кислота може бути проліками зі зниженою біологічною активністю, що при введенні *in vivo* повільно трансформується в більш активну молекулу (недериватизований LTV₄ агент). Варіантами також можуть бути метаболічно стабільні і біологічно активні аналоги LTV₄ агентів, зміна яких приводить до уповільненого розподілу сполуки (знижений метаболізм та/або елімінація). Варіанти з модифікаціями на омега-кінці (наприклад, 20,20,20-трифторметил-LTV₄) виявляють підвищену

стійкість до омега-окиснення (катаболічний процес ненасичених жирних кислот); інші варіанти з модифікацією на омега-кінці з 13 - 20 атомами вуглецю (наприклад, 19-метил-LTV₄ або 19,19-диметил-LTV₄ або 19-фтор-LTV₄ або 19,19-дифтор-LTV₄ або 18,20-дифтор-LTV₄ або 20-фтор-LTV₄) можуть виявляти підвищену стійкість до омега-окиснення, а варіанти з модифікаціями на карбоксильному кінці з числом атомів вуглецю 1, 2, 3 або 4 (наприклад, 3-тіо-LTV₄, 3-гідрокси-LTV₄, 3-метил-LTV₄ або 3,3-диметил-LTV₄ або 3-фтор-LTV₄ або 3,3-дифтор-LTV₄ або 2,3-дифтор-LTV₄, LTV₄ метилсульфоніламід, LTV₄ метиламід, 1-тетразоль LTV₄), можуть виявляти підвищену метаболічну стійкість до бета-окиснення та/або до елімінації (наприклад, включення в чуттєвий до пробенециду переносник органічних кислот). Інші варіанти з модифікацією(ями) з 12 атомами вуглецю, наприклад, 12(R)-метил-LTV₄, можуть виявляти підвищену стійкість до скорочення 11,12 подвійних зв'язків (метаболічний шлях LTV₄). Іншими варіантами є аналоги LTV₄ агентів зі структуральними змінами, наприклад, змінами в довжині ланцюга (довжина ланцюга підвищується або знижується до 4 вуглеців), додавання подвійного зв'язку(ів), насичення подвійного зв'язку(ів), зміна у геометрії подвійного зв'язку(ів) (*cis* на *trans* або навпаки), зміна подвійного зв'язку(ів) на потрійний зв'язок(и), зміна в конфігурації однієї або більше функціональних груп (R на S або S на R), або де одна або більше функціональних груп або замісників або вилучені, додані або замінені на інші функціональні групи або замісники (включаючи, але не обмежуючи, гідропероксил, карбоніл, сульфгідрил, сульфоксид, сульфон, цистеїніл, глутатіоніл, цистеїніл-глутамін, метил, ізопропіл, бензил, хлоро, фторо), або де положення однієї або більше функціональних груп та/або одного або більше подвійних зв'язків зрушені на один, два або три вуглеці відносно омега-кінця. LTV₄ агентом може бути варіант, що має одну або кілька вищезгаданих структуральних модифікацій.

Вираз "формуляція LTV₄ агента" також включає формуляції сполук, що можуть містити суміш двох або кількох LTV₄ агентів або LTV₄ агента та одного або кількох однаково або менш активного ізомеру(ів) LTV₄ агента (позиційних, геометричних або оптичних ізомерів).

Інфекції

Інфекціями, які можна лікувати LTV₄ агентами за даним винаходом, є інфекції, викликані мікробними патогенами людини та/або тварин. Більш того, розглядається попередження або профілактика інфекцій і стимулювання нейтрофільної функції формуляціями або композиціями LTV₄ за даним винаходом.

Вираз "мікробні патогени людини та/або тварин" включає, без обмеження, ДНК і РНК віруси, загалом, та Retroviridae, бактерії, гриби та паразити.

Діапазони доз

Терапевтично ефективна кількість LTV₄ агента для введення буде варіювати в залежності від даного застосовуваного LTV₄ агента, типу або способу введення, одночасного застосування ін-

ших активних сполук, віку і розміру пацієнта, типу, серйозності та поширеності інфекції, відгуків окремих пацієнтів і т. п. У випадку LTB₄ його можна вводити в достатніх дозах для одержання ефективної пікової або стабілізованої концентрації від близько 0,1 нМ до 10мкМ, переважно від 0,1нМ до 1000нМ, більш переважно від близько 0,25нМ до 2,5мкМ, наприклад, 0,25нМ до 25нМ. Ефективну дозовану кількість LTB₄ агента можна визначити клінічно після розгляду усіх вищезгаданих критеріїв. У випадку агентів LTB₄, крім LTB₄, що мають різну біологічну активність, необхідна ефективна пікова або стабільна концентрація може бути різною, наприклад, до 25мкМ, такою як до 10мкМ. Дозовану кількість агента, необхідну для отримання бажаних концентрацій у крові, можна визначити фармакокінетичними дослідженнями, як описано в Marleau et al., J. Immunol. 150: 206, 1993, and Marleau et al, Br. J. Pharmacol. 112: 654, 1994.

pH

Вираз "лужна рН" включає лужну рН від 7,1 до 14, що ефективна при стабілізації LTB₄ агента у водних або органічних розчинах або у твердій або ліофілізованій формуляції за даним винаходом. Переважні діапазони лужної рН складають від 8,2 до 14, особливо від 8,5 до 12,5, наприклад, від 8,5 до 11,5, найбільше переважно від 9,5 до 11,5, наприклад, близько 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10,0, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4, 10,5, 10,6, 10,7, 10,8, 10,9, 11,0, 11,1, 11,2, 11,3, 11,4 або 11,5. В іншому кращому варіанті здійснення переважна лужна рН змінюється від 8,5 до 9,5, від 9,0 до 10,0, від 9,5 до 10,5 або від 10,0 до 11,5.

Вираз "носій із лужною реакцією" включає іншу інертну, фармацевтично прийнятну речовину (або речовини), що у випадку стабілізованої формуляції LTB₄, яка знаходиться в ліофілізованій, кристалічній або твердій аморфній формі, якщо вода адсорбована частинками суміші, або якщо вода додана до суміші в невеликих кількостях, створює лужну "мікро-рН" від 8,2 до 14, особливо від 8,5 до 12,5, наприклад, від 8,5 до 11,5, найбільше переважно від 9,5 до 11,5, наприклад, близько 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10,0, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4, 10,5, 10,6, 10,7, 10,8, 10,9, 11,0, 11,1, 11,2, 11,3, 11,4 або 11,5, навколо кожної частинки LTB₄. У наступному переважному варіанті здійснення лужна "мікро-рН" змінюється від 8,0 до 9,0, від 8,5 до 9,5, від 9,0 до 10,0 або від 10,0 до 11,5. Такі речовини, що створюють зазначену "мікро-рН", можна вибрати, не обмежуючи, з речовин, наприклад, натрієвої, калієвої, кальцієвої, магнієвої та алюмінієвої солі фосфornoї кислоти, карбонової кислоти, лимонної кислоти або інших прийнятних слабких неорганічних або органічних кислот; речовин, що звичайно застосовують в антацидних препаратах, наприклад, гідроксидів алюмінію, кальцію і магнію; оксиду магнію або композитних речовин, наприклад, Al₂O₃·6Mg·CO₂·12H₂O, (Mg₆Al₂(OH)₁₆CO₃·4H₂O), Mg·Al₂O₃·2SiO₂·nH₂O або подібних сполук; органічних рН-буферних речовин, наприклад, тригідроксиметиламінометану або інших подібних, фармацевтично прийнятних рН-буферних речовин.

Фармацевтично прийнятні носії

Вираз "фармацевтично прийнятний носій" включає будь-який носій, наприклад, будь-який водний носій, прийнятний для фізіологічного та фармацевтичного застосування. Такий носій вибраний із групи, що включає воду, буферні сольові розчини, наприклад, фосфатно-буферний сольовий розчин (PBS), або розчин хлориду натрію, забуферений агентами, такими як Tris, гліцин або інші амінокислоти, зокрема основні амінокислоти, водний розчин, що містить спирт, наприклад, етанол, пропіленгліколь, пропандіол, гліцерол або маніт, а також розчини цукрів, наприклад, розчини глюкози або лактози, або суміш різних згаданих розчинників. Більш того, вираз "фармацевтично прийнятний носій" може включати інертні розріджувачі або наповнювачі, наприклад, сахарозу, сорбітол, цукор, маніт, мікрокристалічну целюлозу, крохмалі, включаючи картопляний крохмаль, карбонат кальцію, хлорид натрію, лактозу, фосфат кальцію, сульфат кальцію або фосфат натрію; агента, що гранулюють, та агенти, що дезінтегрують, наприклад, похідні целюлози, включаючи мікрокристалічну целюлозу, крохмалі, включаючи картопляний крохмаль, кроскармелозу натрію, альгінати або альгінову кислоту; зв'язуючі агенти, наприклад, сахарозу, глюкозу, сорбітол, акацієву камедь, альгінову кислоту, натрію альгінат, желатин, крохмаль, пептизований крохмаль, мікрокристалічну целюлозу, магнію алюмінію силікат, карбоксиметилцелюлозу натрію, метилцелюлозу, гідроксипропілметилцелюлозу, етилцелюлозу, полівінілпіролідон або поліетиленгліколь; та агенти, що змазують, включаючи гліданти та антиадгезиви, наприклад, стеарат магнію, стеарат цинку, стеаринову кислоту, кремнезем, гідрогеновані рослинні олії або тальк.

В окремому варіанті здійснення даного винаходу вираз "фармацевтично прийнятний носій" включає тільки нетоксичні речовини. У переважному варіанті здійснення даного винаходу вираз "фармацевтично прийнятний носій" не включає ацетонітрил.

Вираз "токсичний" має значення, добре відоме фахівцю в даній галузі, більш детально в контексті формуляцій за даним винаходом токсична речовина являє собою речовину, яка кількісно присутня у формуляціях за даним винаходом і може знижувати функціональність або викликати структуральні ушкодження клітини або організму. Тому "нетоксична речовина" не включає ацетонітрил.

В особливо переважному варіанті здійснення даного винаходу формуляція включає тільки нетоксичні речовини.

Формуляція за даним винаходом може включати менше ніж 25% (об'єм/об'єм) ацетонітрилу, переважно менше ніж 15%, ще більш переважно менше ніж 5%, найбільше переважно менше ніж 1% (об'єм/об'єм).

Можна застосовувати будь-який прийнятний тип або спосіб введення для забезпечення ссавця, особливо людини, ефективною дозою формуляції LTB₄ агента за даним винаходом. Наприклад, можна застосовувати пероральне, парентеральне, внутрішньодуоденальне, усередину тонкої кишки та місцеве введення. Дозовані форми включають

таблетки, капсули, порошки, розчини, дисперсії, суспензії, креми, мазі та аерозолі.

Для парентерального, наприклад, підшкірного, внутрішньовенного або місцевого введення, формуляцію за даним винаходом, якщо необхідно, перетворюють у розчин, гель або емульсію за допомогою фармацевтичних речовин, прийнятих для цієї мети, наприклад, солюбілізаторів, загусників, емульсифікаторів, агентів для тоничності, консервантів або інших допоміжних речовин.

Місцеві засоби, застосовувані у фармацевтиці, являють собою водні розчини, серед яких, наприклад, буферні системи або ізотонічні або гіпертонічні суміші води і розчинників, що змішуються з водою, такі як, наприклад, спирти або арилові спирти, олії, поліалкіленгліколи, етилцелюлоза, гідроксипропілцелюлоза, карбоксиметилцелюлоза, полівінілпіролідон або сополімери етиленоксиду та пропіленоксиду (плуронілового) ізопропілміристату. Приклади прийнятих буферних речовин являють собою гідроксид натрію та амінокислоти, наприклад, гліцин, аргінін, гістидин та лізин; фосфат натрію, ацетат натрію або глюконатний буфер. Форма для місцевого введення може також містити нетоксичні допоміжні речовини, такі як, наприклад, поліетиленгліколи, та протибактеріальні сполуки.

Формуляції тривалого вивільнення також розкладаються в межах даного винаходу. Такі формуляції дуже різноманітні, що зрозуміло фахівцю в даній галузі. Приклади речовин тривалого вивільнення включають органічні розчинники або полімери, що біологічно руйнуються, біологічно сумісні полімери, включаючи, наприклад, емульсії, гелі, мікросфери та гідрогелі. Переважними формуляціями тривалого вивільнення для використання за даним винаходом є мікрокапсула або мікросфера та міцели. Мікрокапсули/сфери являють собою надзвичайно маленькі частинки активних сполук, що поміщені у прийнятний полімер, щоб сформувати сфери, які варіюють у діаметрі від близько 40 до 500мкм (переважно менше ніж 150мкм), та легко вводяться ін'єкцією при суспендуванні в прийнятному рідкому носії.

LTV₄ агент можна формулювати як стерильну фармацевтичну композицію для терапевтичного застосування, прийнятну для будь-якого місцевого або системного введення. Продукт може бути у формі без розчинника (наприклад, ліофілізований розчин, що містить маніт) та готовим до відновлення для застосування шляхом додавання прийнятного носія або розріджувача. Для запобігання розкладу, продукт може знаходитися у формі розчину, який може бути водним або органічним та готовим до введення або готовим до модифікації шляхом додавання прийнятного розріджувача.

Для модифікації продукту у формі розчину за даним винаходом можна використовувати стерильний розріджувач, що може містити матеріали, звичайно застосовувані в умовах, наближених до фізіологічних. У цьому випадку стерильний розріджувач може містити солі та/або буферні агенти для досягнення фізіологічно прийнятної тоничності та pH, наприклад, хлорид натрію, фосфат та/або

інші речовини, фізіологічно прийнятні та/або безпечні для використання.

Застосовувана у формі водного розчину фармацевтична композиція буде головним чином містити багато речовин, описаних вище, для відновлення продукту, що не містить розчинник. Якщо застосовувати у формі розчину в органічному розчиннику, то для відновлення продукту, що не містить розчинник, невеликий об'єм розчину, що містить жирну кислоту (LTV₄ агент), потрібно буде розбавити водним розчином, що містить багато речовин, описаних вище. Така фармацевтична композиція, головним чином, буде містити багато речовин, описаних вище, для відновлення продукту, що не містить розчинник.

LTV₄ агент можна застосовувати в комбінації з іншими агентами, включаючи, але не обмежуючи, протимікробні агенти, протиракові агенти, імуносупресивні агенти, імуностимулюючі агенти, протизапальні агенти, цитокіни, ростові фактори (наприклад, G-CSF, M-CSF та GM-CSF), ретиноїди та сполуки, здатні знижувати поглинання, елімінування або метаболізм LTV₄ агента, наприклад, пробенецид, дипірідамо́л або клофібрат.

Якщо представлений LTV₄ агент вводити пацієнту в якості протиінфекційного, то це може бути пероральна, внутрішньоартеріальна, внутрішньовенна, внутрішньоперитоніальна, підшкірна, внутрішньоназальна, внутрішньом'язова ін'єкція, інгаляція або подібне.

Дозовані форми з ентросолюбильним покриттям

Як показано на моделі щура (Приклад 11), внутрішньодуоденальне введення LTV₄ агентів забезпечує необхідний фармакокінетичний профіль. Таким чином, у переважному варіанті здійснення формуляції за даним винаходом можуть бути в пероральній дозованій формі з ентросолюбильним покриттям. З зазначених вище аспектів стабільності LTV₄ агентів очевидно, що необхідно захистити пероральну дозовану форму зазначених LTV₄ агентів від контакту з кислотною реакцією шлункового соку, щоб вона досягла тонкої кишки без руйнування.

Препарати з ентросолюбильним покриттям стійкі до розчинення в кислому середовищі, але швидко розчиняються в середовищі від нейтрального до лужного. Дозована форма з ентросолюбильним покриттям переважно характеризується наступним чином. Ядра, що містять LTV₄ агент, змішаний із сполуками, що реагують у лужному середовищі, або сіль LTV₄ агента, необов'язково змішаного із сполукою, що реагує в лужному середовищі, покриті двома або більш шарами, причому перший шар/шари, що розчиняється у воді або швидко розпадається у воді, складається з некіслотних або інертних фармацевтично прийнятих речовин. Цей/ці перший шар/шари відокремлює/відокремлюють матеріал ядра з лужною реакцією від зовнішнього шару, що є ентросолюбильним покриттям. На завершення, дозовану форму з ентросолюбильним покриттям обробляють прийнятним способом для зниження вмісту води до дуже низького рівня, щоб досягти задовільної

стабільності дозованої форми під час тривалого терміну зберігання.

Ядра

LTV₄ агент змішують з інертними, переважно розчинними у воді, традиційними фармацевтичними компонентами для одержання переважної концентрації активної сполуки у фінальній суміші та з реагуючою у лужному середовищі або інертною, фармацевтично прийнятною речовиною (або речовинами), що створює "мікро-pH", як зазначено вище, якщо вода адсорбується частинками суміші, або якщо вода додається до суміші в невеликих кількостях. Такі речовини можна вибрати з речовин, наприклад, натрієвої, калієвої, кальцієвої, магнієвої та алюмінієвої солей фосфорної кислоти, вугільної кислоти, лимонної кислоти або інших прийнятних слабких неорганічних або органічних кислот; речовин, що звичайно застосовують в антацидних препаратах, наприклад, гідроксиди алюмінію, кальцію та магнію; оксиду магнію або композитних речовин, наприклад, $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 6\text{MgCO}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $(\text{Mg}_6\text{Al}_2(\text{OH})_{16}\text{CO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$, $\text{Mg} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, причому n не є цілим числом та менше ніж 2, або подібних сполук; органічних pH-буферних речовин, наприклад, трисгідроксиметиламінометану або інших подібних, фармацевтично прийнятних pH-буферних речовин.

Потім порошкову суміш формулюють у невеликій гранулі, тобто пелети або таблетки, традиційними фармацевтичними способами. Ці пелети або таблетки використовують як ядра для подальшого процесу.

Шар, що відокремлює

Ядра з лужною реакцією, що містять LTV₄ агент, повинні відокремлюватися від полімерів ентросолубільного покриття, що містить вільні карбоксильні групи, що у протилежному випадку викликає руйнування LTV₄ агента під час процесу покриття або під час зберігання. Підшар (шар, що відокремлює) також служить pH-буферною зоною, де іони водню, що дифундують від зовнішнього покриття до лужного ядра, можуть реагувати з гідроксильними іонами, що дифундують від лужного ядра до поверхні покритих частинок. pH-буферні властивості шару, що відокремлює, можна додатково підсилити введенням у шар речовин, вибраних із групи сполук, що звичайно використовуються в антацидних формуляціях, таких як, наприклад, магнію оксид, гідроксид або карбонат, алюмінію або кальцію гідроксид, карбонат або силікат; композитних сполук алюмінію/магнію, таких як, наприклад, $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 6\text{MgCO}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $(\text{Mg}_6\text{Al}_2(\text{OH})_{16}\text{CO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$, $\text{MgO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, причому n не є цілим числом та менше ніж 2, або подібних сполук; або інших фармацевтично прийнятних pH-буферних речовин, таких як, наприклад, натрієва, калієва, кальцієва, магнієва та алюмінієва солі фосфорної, лимонної або інших прийнятних, слабких, неорганічних або органічних кислот.

Шар, що відокремлює, складається з одного або більш розчинних у воді інертних шарів, що необов'язково містять pH-буферні речовини.

Шар(шари), що відокремлює, можна наносити на ядра - пелети або таблетки - традиційними спо-

собами нанесення покриття в прийнятній ємності з покриттям або в апараті з флюїдизованим шаром із застосуванням води та/або традиційних органічних розчинників для розчину покриття. Матеріал для шару, що відокремлює, вибирають з фармацевтично прийнятних, розчинних у воді, інертних сполук або полімерів, що застосовують для нанесення плівки, таких як, наприклад, цукор, поліетиленгліколь, полівінілпіролідон, полівініловий спирт, гідроксипропілцелюлоза, гідроксиметилцелюлоза або гідроксипропілметил-целюлоза. Товщина шару, що відокремлює, складає не менше ніж 2мкм, для невеликих сферичних пелетів переважно не менше ніж 4мкм, для таблеток переважно не менше ніж 10мкм.

У випадку таблеток можна застосовувати інший спосіб нанесення покриття шляхом сухого покриття. Спочатку таблетку, що містить кислотнolабільну сполуку, пресують, як описано вище. Навколо цієї таблетки за допомогою прийнятного таблеткового преса пресують інший шар. Зовнішній шар, що відокремлює, містить фармацевтично прийнятні таблеткові наповнювачі, що розчиняються у воді або швидко розпадаються у воді. Шар, що відокремлює, має товщину не менше ніж 1мм. Шар, що відокремлює, також може містити традиційні пластифікатори, пігменти, діоксид титану, тальк та інші добавки.

Шар ентросолубільного покриття наносять на ядра з підшаром традиційною методикою нанесення покриття, наприклад, у ємності з покриттям, в апараті з флюїдизованим шаром із застосуванням розчинів полімерів у воді та/або в прийнятних органічних розчинниках або за допомогою латексної суспензії зазначених полімерів. Як ентросолубільні покриваючі полімери можна використовувати, наприклад, целюлози ацетат фталат, гідроксипропілметилцелюлози фталат, полівініл ацетат фталат, со-полімеризовані метакрилову кислоту/метиллові ефіри метакрилової кислоти, наприклад, сполуки, відомі під торговою маркою Eudragit[®] L 12,5 або Eudragit[®] L 100, (Röhm Pharma), або подібні сполуки, що застосовують для одержання ентросолубільних покриттів.

Ентросолубільне покриття також можна наносити за допомогою водної дисперсії полімеру, наприклад, Aquateric (FMC Corporation), Eudragit[®] L 100-55 (Röhm Pharma), Coating CE 5142 (BASF). Шар ентросолубільного покриття може необов'язково містити фармацевтично прийнятний пластифікатор, такий як, наприклад, цетанол, триацетин, ефіри лимонної кислоти, наприклад, відомі під торговою маркою Citroflex[®] (Pfizer), ефіри фталевої кислоти, дибутил сукцинат або подібні пластифікатори.

Для кожного полімеру ентросолубільного покриття звичайно оптимізують дозу пластифікатора, і вона звичайно складає 1 - 20% полімеру ентросолубільного покриття. Шар ентросолубільного покриття може також включати дисперсанти, наприклад, тальк; барвники та пігменти.

Таким чином, препарат з ентросолубільним покриттям за даним винаходом складається з ядер, що містять LTV₄ агент, змішаний із сполукою з лужною реакцією, або ядер, що містять сіль луж-

ного металу кислотнo-лабільно́ї сполуки, змішано́ї із сполукою з лужною реакцією. Ядра з покриттям, що розчиняється у воді або швидко розпадається у воді та не обов'язково містить рН-буферну речовину, яка відокремлює лужні ядра від ентeросолубільного покриття. Дозовану форму з підшаром остаточно покривають ентeросолубільним покриттям, що робить дозовану форму нерозчинною в кислотному середовищі, але вона швидко розпадається/розчиняється в середовищі від нейтрального до лужного, такому як, наприклад, рідини, що присутні у проксимальній частині тонкої кишки, ділянці, де повинне відбуватися розчинення.

Хелатоутворюючий агент

Вираз "хелатоутворюючий агент" включає металеві хелатоутворюючі агенти, відомі в даній галузі. Хелатори для іонів металу звичайно являють собою поліфункціональні молекули, що мають безліч негативно заряджених та/або багатих електронами ліганд, що можуть блокувати іони металу з різними афінностями. Прийнятні багаті електронами функціональні групи включають карбоксильні групи, гідроксигрупи та аміногрупи. Розташування цих груп в амінополікарбоксильних кислотах, гідроксиполікарбоксильних кислотах, гідроксамінокарбоксильних кислотах і т. п. приводить до утворення компонентів, що діють як чудові хелатори. При цьому вони включають амінополікарбоксильні кислоти, такі як, наприклад, етилендіамінтетраоцтова кислота (EDTA), діетилентриамін пентаоцтова кислота (DTPA), нітрилотриоцтова кислота (NTA), N-2-ацетамідо-2-імінодіоцтова кислота (ADA), bis(аміноетил)-гліколевий ефір, N,N,N',N'-тетраоцтова кислота (EGTA), trans-діаміноциклогексан тетраоцтова кислота (DCTA), глутамінова кислота та аспарагінова кислота; та гідроксамінокарбоксильні кислоти, такі як, наприклад, N-гідроксietiлімінодіоцтова кислота (HIMDA), N,N-bis-гідроксietiлгліцин (біцин) та N-(трисгідроксietiлметил)гліцин (трицин); та N-заміщені гліцини, наприклад, гліцилгліцин. Інші кандидатні хелатори включають 2-(2-аміно-2-оксоетил)аміноетан сульфонову кислоту (BES). Усе вищезгадане також включає солі карбоксильних та інших кислотних функціональних груп.

Приклади таких солей включають солі натрію, калію та інших слабо зв'язаних іонів металу; природа солі та число зарядів, що будуть нейтралізовані, буде залежати від числа присутніх карбоксильних груп та рН, при якій додається стабілізуючий хелатор.

Як відомо в даній галузі, хелатоутворюючі агенти мають різну міцність зв'язку даних цільових іонів. Загалом, іони важких металів зв'язані міцніше, ніж їх еквіваленти з однаковими зарядами, але з меншою молекулярною масою. Наприклад, Cu^{+2} завжди хелатується сильніше, ніж Ca^{+2} , що дає можливість у деяких випадках застосовувати кальцієві солі використовуваних хелаторів. Щоб оцінити відносну міцність, як довільний стандарт для порівняння хелаторів, тут використовується постійна стабільності іона міді при рН формуляції. Ці постійні стабільності, звичайно, залежать від рН. Вони доступні з літератури, і можуть бути знайдені, наприклад, у Perrin, D. D., et al., "bufferss for рН

and Metal Ion Control" Chapman & Hall, London, N.Y., (1974), та, зокрема, у International Union of Pure & Applied Chemistry: "Stability Constants", suppl 1 (1971) Alden press, Oxford. Силу хелаторів можна класифікувати за допомогою знайдених у цих посиланнях значень стабільності комплексів Cu^{+2} , як міри сили хелатора. Використовують значення "log бета" як негативні логарифми константи дисоціації для комплексу. Чим вище значення log-бета, тим сильніше зв'язок між іоном міді та хелатоутворюючим компонентом. Звичайно, рН при який проводять визначення, є істотним чинником, тому що різні карбоксильні групи, що містяться у хелаторі, сильніше зв'язуються з окремим іоном, оскільки вони негативно заряджені.

Особливо ефективними за даним винаходом є хелатори зі значеннями log-бета для іона міді близько 7 або більш (як визначено при рН формуляції, що заявляється); більш переважні мають значення 10 або більш; та найбільш переважні мають значення log-бета при рН застосування 15 або більш. Таким чином, переважними є, наприклад, трицин, біцин, ADA та HIMDA, як досить сильні; ще більш переважними є NTA, DTPA та EDTA. Серед найбільш переважних хелаторів для застосування за даним винаходом - EDTA та DTPA.

У даній галузі відома велика кількість хелатоутворюючих агентів, а кандидатний хелатор можна легко визначити за його значенням log-бета стосовно іона міді при певній рН застосування, та, якщо він має фармацевтично прийнятні властивості, що дозволяють його застосовувати в композиціях для введення пацієнтам, його можна оцінити як прийнятний для застосування у способі за даним винаходом та у композиціях за даним винаходом.

Необхідно також враховувати розчинності у воді, хоча різні хелатори можуть бути присутніми у різних кількостях, в залежності від природи іншої частини формуляції.

Тоді як, хелатоутворюючий агент присутній у стабілізуючих кількостях, його % від загальної ваги може складати від близько 0,001% до близько 1,0% (вага/вага) усієї формуляції. Переважно % хелатоутворюючого агента від загальної ваги складає від близько 0,01% до близько 0,1% (вага/вага). Ці значення відносяться до остаточного відновленого продукту для фармацевтичних показань. Якщо формуляція ліофілізована, % хелатоутворюючого агента в сухій масі може складати від близько 10% до близько 40%. Тому, у сухій формі хелатоутворюючий агент може бути присутнім у кількостях від близько 0,01% до близько 40% загальної ваги, переважно від близько 1,0% до близько 30%. Як буде зрозуміло фахівцю в даній галузі, % хелатоутворюючого агента у формуляції змінюється в залежності від специфічного агента, що збільшує об'єм, що застосовують для формуляції активної сполуки. Зрозуміло, що, чим вище рівні проблематичних іонів металу, що присутні в агенті, що збільшує об'єм, або в іншому агенті в композиції, тим вище рівні необхідного хелатора. Це легко визначити за допомогою методик для визначення оптимальних концентрацій хелатоутворюючого агента, описаних нижче.

Даний винахід буде легше зрозуміти завдяки посиланню на наступні приклади, що наведені для ілюстрації даного винаходу, а не для обмеження його об'єму.

ПРИКЛАД 1

Матеріали і способи

LTB₄ (у кислотній формі) одержали від Cascade Biochem (Великобританія) у водно-спиртовому розчині, 95/5. Ступінь чистоти цього стартового матеріалу складав близько 98,5% ($\pm 0,3\%$), як визначили зворотно-фазовою HPLC. Розчин LTB₄ у етанолі нейтралізували еквівалентом гідроксиду натрію для одержання натрієвої (Na) солі LTB₄. Розчин Na солі LTB₄ у етанолі випарювали насухо при зниженому тиску за допомогою роторного випарного апарата і водяної бані (30°), поки не утворився маслянистий залишок. Залишок знову розчинили у фосфатно-буферному сольовому розчині Дюльбеко (DPBS) при pH 7,4, що містить або не містить 0,01% етилендіамінтетраоцтову кислоту (EDTA), для одержання остаточної концентрації LTB₄ 5мг/мл. Розчини розлили у 2мл боросилікатні скляні ампули типу I, які потім закупорили під аргоном за допомогою гумових пробок, покритих тефлоном, та алюмінієвих кришок. Зразки зберігали у темноті при $25 \pm 5^\circ\text{C}$ до аналізу у певні точки часу. Аналіз розчинів LTB₄ виконували зворотно-фазовою HPLC за допомогою C18, 5 μ частинки, колонки 4,7 \times 250мм (Nucleosil) та метанол/ацетонітрил градієнтного елювання; визначення LTB₄ та включень виконували потоком за допомогою HPLC UV спектрофотометра при 270нм.

Результати

Як показано на Фігурі 1 водні розчини Na солі LTB₄ при 5мг/мл, що не містять EDTA, показали підвищений рівень включень вже після 7 днів зберігання при 25°C, а рівень домішок досяг 23,3% пікової площі LTB₄ після 14 днів зберігання. На відміну від них, розчини Na солі LTB₄ при 5мг/мл, що містять 0,01% EDTA, не показали підвищення погіршення властивостей до 14 днів зберігання, а рівні домішок складали 2,9% та 8,6% після 60 та 90 днів зберігання при 25°C, відповідно. Ці дані чітко показують, що EDTA значно сповільнює деградацію водних розчинів Na солі LTB₄.

ПРИКЛАД 2

Матеріали і способи

Розчин LTB₄ (у кислотній формі) при концентрації 12мг/мл у водно-спиртовому розчині, 95/5 (від Cascade Biochem, Великобританія), нейтралізували еквівалентом гідроксиду натрію для утворення Na солі. Цей стартовий матеріал, що застосовували в експериментах, описаних у Прикладах 2-7, мав ступінь чистоти 96,8% ($\pm 0,3\%$), як визначили зворотно-фазовою HPLC. Розчин Na солі LTB₄ у етанолі випарили (див. Приклад 1) до утворення маслянистого залишку. Потім залишок заново розчинили у фосфатному буферному розчині хлориду натрію (соляному розчині) (30мМ фосфату натрію, pH 7,5), що містить 0,01% EDTA, для одержання ізотонічного розчину Na солі LTB₄ при 25мг/мл. Шляхом розчинення 25мг/мл розчину в 30мМ ізотонічному натрій фосфатно-буферному сольовому розчині, pH 7,5, що містить 0,01%

EDTA, одержали розчин Na солі LTB₄ з концентрацією 0,1мг/мл. Аліквоти розчинів розлили в 2мл скляні ампули типу I, як описано в Прикладі 1, та зберігали на повітрі у темноті при $40 \pm 5^\circ\text{C}$. Проаналізували LTB₄ та включення шляхом визначення часу зворотно-фазовою HPLC за допомогою UV визначення при 270нм.

Результати

На Фігурі 2 показані результати вивчення змушеної деградації (40°C) водних ізотонічних з pH 7,5 розчинів Na солі LTB₄ при концентрації 0,1 та 25мг/мл. Дані чітко показують, що при визначенні зворотної залежності між стабільністю і концентрацією в розчинах Na солі LTB₄ 25мг/мл розчин Na солі LTB₄ набагато менш стабільний, чим розчин Na солі LTB₄ при 0,1мг/мл. Стабільність розчину Na солі LTB₄ при 0,01мг/мл подібна стабільності розчину при 0,1мг/мл (дані не показані).

ПРИКЛАД 3

Матеріали і способи

Водні ізотонічні розчини Na солі LTB₄ при концентрації 1,75мг/мл у фосфат/гліциновому буферному сольовому розчині (3мМ фосфату натрію та 10мМ гліцинового буфера, pH 7,5, 8,5, 9,5 та 10,5), що містить 0,01% EDTA, одержали шляхом розчинення 25мг/мл розчину Na солі LTB₄ (див. Приклад 2) у відповідному фосфат/гліциновому буферному сольовому розчині, що містить 0,01% EDTA. Розчини розлили в 2мл ампули для зберігання на повітрі у темноті при $4 \pm 4^\circ\text{C}$ і $20 \pm 5^\circ\text{C}$ протягом 9 місяців до аналізу LTB₄ та включень зворотно-фазовою HPLC, як описано в Прикладі 1.

Результати

На Фігурі 3 чітко показано, що підвищення pH водних ізотонічних розчинів Na солі LTB₄ значно підсилює стабільність LTB₄, як видно по зниженню рівнів включень, визначених у зразках аналізом HPLC. Вплив лужної pH на стабільність розчинів Na солі LTB₄ спостерігали і при 4°C, і при 20°C, це показало, що вплив лужної pH на стабілізацію не залежить від температури. При вивченні змушеної деградації (зберігання при 40°C) підвищення pH розчинів Na солі LTB₄ також привело до значного поліпшення стабільності розчину Na солі LTB₄ (дані не показані).

ПРИКЛАД 4

Матеріали і способи

Водні ізотонічні розчини Na солі LTB₄ при концентрації 17,5мг/мл одержали розчиненням у фосфатно-буферному сольовому розчині (3мМ натрій фосфатний буфер, pH 7,5, 8,5, 9,5 та 10,5), що містить 0,01% EDTA, розчину Na солі LTB₄ при 25мг/мл (Приклад 2). Розчини Na солі LTB₄ при 17,5мг/мл з 4 різними pH розлили у 2мл ампули для зберігання на повітрі у темноті при $4 \pm 4^\circ\text{C}$ або $20 \pm 5^\circ\text{C}$ протягом 15 місяців до аналізу LTB₄ і включень зворотно-фазовою HPLC, як описано в Прикладі 1.

Результати

На Фігурі 4 чітко показано, що підвищення pH водних ізотонічних розчинів Na солі LTB₄ при 17,5мг/мл значно підсилює стабільність LTB₄, що видно по зниженню рівня включень, який визначали в зразках аналізом HPLC. Цей вплив лужної pH на стабільність розчинів Na солі LTB₄ при

17,5мкг/мл набагато більш очевидний при 20°C, чим при 4°C, подібні розчини показали дуже незначну деградацію LTB₄ після 15 місяців зберігання. Ці дані разом з даними, приведеними на Фігурі 3, показують, що вплив лужної рН на стабілізацію чітко спостерігається в розчинах Na солі LTB₄ при 1,75мг/мл, а також 17,5мкг/мл, отже, вплив лужної рН на стабілізацію відбувається в широкому діапазоні концентрацій LTB₄.

ПРИКЛАД 5

Матеріали і способи

Водні ізотонічні розчини Na солі LTB₄ при концентраціях 35 та 350мкг/мл у фосфатно-буферному сольовому розчині (3мМ натрій фосфатний буфер, рН 9,5), що містить 0,01% EDTA і різні концентрації гліцину (від 0,01мМ до 10мМ), одержали розчиненням 25мг/мл розчину Na солі LTB₄ (Приклад 2). Розчини Na солі LTB₄ при 35 та 350мкг/мл з 4 різними концентраціями гліцину розлили в 2мл ампули для зберігання на повітрі у темноті при 40 ± 5°C протягом 5 місяців до аналізу LTB₄ і включень зворотно-фазовою HPLC, як описано в Прикладі 1.

Результати

У цьому експерименті розчин Na солі LTB₄ при 35мкг/мл, рН 7,5, що містить 10мМ гліцину і зберігається 5 місяців при 40°C, показав рівень включень 20% (дані не показані). На Фігурі 5 показано, що подібний розчин Na солі LTB₄ при 35мкг/мл, а не при рН 9,5, був більш стабільний, як визначили по більш низькому рівню включень (6,5%), та чітко показано, що концентрація гліцинового буфера, що змінюється від 0,01мМ до 10мМ, виявляла невеликий вплив на стабільність розчинів Na солі LTB₄. Дуже схожі спостереження зробили в розчинах Na солі LTB₄ при 350мкг/мл, рН 9,5, що зберігаються 5 місяців при 40°C, з 4 різними концентраціями гліцину.

ПРИКЛАД 6

Матеріали і способи

Водні ізотонічні розчини Na солі LTB₄ з концентрацією 35мкг/мл у фосфатно-буферному сольовому розчині (3мМ натрій фосфатний буфер, рН 7,5 або 9,5), що містить 0,01% EDTA, одержали, як описано в Прикладі 5. В усі розчини додали маніт до остаточної концентрації 4% для утворення при ліофілізації твердого залишку (манітового осаду), що містить Na сіль LTB₄ та усі компоненти наповнювача. До деяких розчинів до остаточної концентрації 1мг/мл перед остаточним регулюванням рН (до 7,5 або 9,5) додали людський сироватковий альбумін (HSA, Sigma Chemicals, Сант Луїс, Міссурі) без жирної кислоти (деліпідований). Розчини розлили у 2мл ампули, заморозили при -20°C та ліофілізували. Потім ампули, що містять ліофілізовані розчини (манітові осади), закупорили, як описано в Прикладі 1 (але на повітрі замість аргону), та зберігали у темноті при 40 ± 5°C. Через 1,5 або 4,5 місяці ампули відкрили, манітові осади (що містять LTB₄) розчинили в 1мл води для утворення вихідних розчинів Na солі LTB₄ при 35мкг/мл. Потім зворотно-фазовою HPLC проаналізували LTB₄ та включення, як описано в Прикладі 1.

Результати

На Фігурі 6 показано, що ліофілізований розчин Na солі LTB₄ при 35мкг/мл, рН 7,5, заново розчинений у воді безпосередньо після ліофілізації (час 0), мав рівень включень 2,9%, та що ідентичні ліофілізовані зразки, що зберігалися 1,5 та 4,5 місяці при 40°C, мали рівні включень 22,7% та 51,3%, відповідно. На Фігурі 6 також показано, що додавання HSA до розчину Na солі LTB₄ (рН 7,5) перед ліофілізацією приводить до зниження приблизно на 50% рівня включень через 1,5 місяця зберігання. На Фігурі 6 також чітко показано, що підвищення рН від 7,5 до 9,5 у розчинах LTB₄ перед ліофілізацією приводить до значного зниження рівня включень, як спостерігалось і через 1,5 місяця зберігання (у присутності HSA), і через 4,5 місяці зберігання. Ці дані чітко показують, що лужна рН також підсилює стабільність Na солі LTB₄ у твердій формі, тобто після ліофілізації, у присутності маніту та у присутності або відсутності HSA.

ПРИКЛАД 7

Матеріали і способи

Розчин LTB₄ у етанолі (кислотна форма) (EtOH/вода, 95/5), отриманий від виробника (Cascade Biochem, Великобританія), розбавили розчином EtOH/вода, 95/5, для утворення розчину LTB₄ у етанолі (кислотна форма) при 9 та 0,9мг/мл. Розчин натрієвої солі LTB₄ у етанолі при 9 та 0,9 мг/мл одержали шляхом додавання 1,05 еквівалента гідроксиду натрію. Розчини натрієвої солі LTB₄ з концентраціями 9 та 0,9мг/мл у 75/25 у розчині EtOH/10мМ гліцину у воді при рН 10,5 (гідроксид натрію) одержали шляхом змішування 3 об'ємів розчинів натрієвої солі LTB₄ при 12 та 1,2мг/мл у розчині EtOH/вода, 95/5, з 1 об'ємом 40мМ гліцинового буфера при рН 10,5. Розчини розлили у 2мл ампули для зберігання на повітрі у темноті при -80°C та 40 ± 5°C протягом 17 місяців до аналізу LTB₄ та включень зворотно-фазовою HPLC, як описано в Прикладі 1.

Результати

На Фігурі 7 показані результати вивчення змущеної деградації розчину LTB₄ у етанолі (кислотна форма) або Na солі LTB₄ при 2 різних концентраціях. Після 17 місяців зберігання при 40°C розчину LTB₄ (кислотна форма) у етанолі (EtOH/вода, 95/5) при 9,0мг/мл відбулася повна деградація (LTB₄ не визначався) з рівнем включень 100% AUC (площа під кривою при 270нм). На Фігурі 7 чітко показано, що якщо LTB₄ перетворений на його натрієву сіль шляхом додавання 1,05 еквівалента гідроксиду натрію, стабільність отриманого розчину Na солі LTB₄ у етанолі при однакових умовах значно покращилася з рівнем домішок тільки 5,4%. Подібним чином, вивчення змущеної деградації розчину натрієвої солі LTB₄ у 75/25 EtOH 10мМ гліцину, рН 10,5, показало, що при лужній рН натрієва сіль LTB₄ більш стабільна (рівень домішок 3,8%), чим LTB₄ у його кислотній формі в розчині EtOH/вода, 95/5. Такі ж висновки можна зробити для розчинів LTB₄ (кислотна форма) і натрієвої солі LTB₄ при концентрації в 10 разів меншій (0,9 мг/мл), натрієвої солі LTB₄ у розчині EtOH/вода, 95/5, з підвищеною стабільністю або в розчині EtOH/10мМ гліцин, 75/25, рН 10,5 (рівні домішок 4,9 та 4,3% AUC, відповідно), у порівнянні з кислотною формою LTB₄ у

розчині EtOH/вода, 95/5 (рівень домішок 62% AUC). Рівні домішок, визначені в 3 однакових формуляціях LTB₄ у етанолі при 9 та 0,9 мг/мл, що зберігали при -80°C 17 місяців, варіювали від 2,8 до 3,7% AUC (дані не показані). У Таблиці 1, нижче, приведені значення pH, визначені у формуляціях LTB₄ у етанолі, що зберігали 17 місяців при -80°C та 40°C. Дані чітко показують, що підвищена

стабільність дійсно відповідає більш високій pH формуляцій. Нарешті, на Фігурі 7 також показано, що за аналогією зі спостереженнями, проведеними у водних розчинах Na солі LTB₄, більш концентрований (9мг/мл) розчин LTB₄ у EtOH/вода, 95/5, менш стабільний, чим більш розведений (0,9 мг/мл) розчин LTB₄ при однакових умовах експерименту.

Таблиця 1

pH¹, що спостерігається у формуляціях LTB₄ у етанолі

Формуляція	-80°C	+40°C
9 мг/мл, кислотна форма в EtOH/вода, 95/5	7,08 ²	5,27
9 мг/мл, натрієва сіль у EtOH/вода, 95/5	10,15	9,68
9 мг/мл, натрієва сіль у EtOH/буфер ³ , 75/25	12,54	10,07
0,9 мг/мл, кислотна форма в EtOH/вода, 95/5	7,25	5,26
0,9 мг/мл, натрієва сіль у EtOH/вода, 95/5	9,80	9,77
0,9 мг/мл, натрієва сіль у EtOH/буфер ³ , 75/25	10,77	10,17

¹ pH виміряли за допомогою малогабаритного pH-метра "Fisher Scientific Accumet" з комбінованим електродом, при кімнатній температурі.

² pH виміряли після 17 місяців зберігання при зазначених температурах.

³ 10мМ гліцин/NaOH, pH 10,5.

ПРИКЛАД 8

Матеріали і способи

LTB₄ та аналоги одержали в кислотній формі як розчини в етанолі. LTB₄ одержали від Cascade Biochem (Великобританія), LTB₅ одержали від Biomol (Plymouth Meeting, PA, США), а всі інші сполуки (LTB₃, трифтор-LTB₄, 20-гідрокси-LTB₄ та 5-HETE) одержали від Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, США). Розчин натрієвої солі різних LTB₄ агентів в етанолі (LTB₄ та аналоги) одержали додаванням 1 еквівалента гідроксиду натрію. Розчин натрієвої солі LTB₄ агентів в етанолі випарили насухо в потоці азоту та заново розчинили з концентрацією ~ 35мкг/мл у фосфатному буферному сольовому розчині (30мМ), що містить 10мМ гліцину, 0,01% EDTA, pH відрегулювали гідроксидом натрію до 7,5 або 9,5. Для негайного аналізу (t₀) взяли аликвоти розчинів, а розчини Na солі LTB₄ агента при 35мкг/мл, що залишилися, розлили у 2мл ампули для зберігання на повітрі у темноті при 40 + 5°C шість місяців до аналізу LTB₄ агентів та включень зворотно-фазовою HPLC, як описано в Прикладі 1.

Результати

У цьому експерименті різні розчини натрієвої солі LTB₄ агентів при 35мкг/мл показали вихідний (t₀) рівень домішок, що варіює від 2% до 15%, як показано на Фігурі 8 (незабарвлені стовпчики). На Фігурі 8 показано, що рівні домішок у всіх розчинах LTB₄ агента, що зберігалися шість місяців при 40°C при pH 7,5, значно підвищені (сірі стовпчики). На Фігурі 8 також показано, що розчини однакових LTB₄ агентів, що зберігали шість місяців при 40°C, але при більш високій pH 9,5, значно більш стабільні, що видно з більш низьких рівнів домішок усіх розчинів (чорні стовпчики).

ПРИКЛАД 9

Матеріали і способи

LTB₄ та аналоги одержали в кислотній формі у вигляді розчинів в етанолі. Енантіомерну форму LTB₄ одержали від Cascade Biochem (Великобританія), а всі інші сполуки (6-trans-LTB₄, 12-epi-LTB₄ та 6-trans-12-epi-LTB₄) одержали від Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, США). Розчин натрієвої солі різних LTB₄ агентів (LTB₄ та аналоги) у етанолі одержали додаванням 1 еквівалента гідроксиду натрію. Розчин натрієвої солі LTB₄ агентів в етанолі випарили насухо в потоці азоту та заново розчинили з концентрацією ~ 35мкг/мл у фосфатному буферному сольовому розчині (30мМ), що містить 10мМ гліцину, 0,01% EDTA, за допомогою гідроксиду натрію pH довели до 7,5 або 9,5. Взяли аликвоти розчинів для негайного аналізу (t₀), а розчини Na солі LTB₄ агента, що залишилися, при 35мкг/мл розлили у 2мл ампули для зберігання на повітрі у темноті при 40 + 5°C шість місяців до аналізу LTB₄ агентів та включень зворотно-фазовою HPLC, як описано в Прикладі 1.

Результати

У цьому експерименті різні розчини натрієвої солі LTB₄ агентів при 35мкг/мл показали вихідний (t₀) рівень домішок 2% - 5%, як представлено на Фігурі 9 (незабарвлені стовпчики). На Фігурі 9 показано, що рівні домішок у всіх розчинах LTB₄ агента, що зберігали шість місяців при 40°C при pH 7,5, значно підвищилися (сірі стовпчики). Також на Фігурі 9 показано, що розчини однакових LTB₄ агентів, що зберігали шість місяців при 40°C, але при pH вище, ніж 9,5, значно більш стабільні, про що говорять більш низькі рівні домішок усіх розчинів (чорні стовпчики).

ПРИКЛАД 10

Матеріали і способи

Розчин LTB₄ (кислотна форма) у етанолі, отриманий від Cascade Biochem (Великобританія), нейтралізували додаванням 1 еквівалента гідроксиду натрію для утворення натрієвої солі LTB₄.

Аліквоти розчину натрієвої солі LTB₄ в етанолі розлили у 2мл ампули (по 2мг LTB₄ в ампулу), а розчинник випарили насухо в потоці азоту. Залишки в ампулах розчинили у 0,9% хлоридом натрію (NaCl) (ампула 1), 0,9% NaCl у 0,1 мN NaOH (ампула 2), 0,9% NaCl у 1 мN NaOH (ампула 3), 0,9% NaCl у 10 мN NaOH (ампула 4), 0,3% NaCl у 0,1N NaOH (ампула 5) та у 1N NaOH (ампула 6). Аліквоти розчинів взяли для негайного аналізу (t_0), а розчини натрієвої солі LTB₄ при 2 мг/мл, що залишились, зберігали на повітрі у темноті при $40 \pm 5^\circ\text{C}$ протягом п'яти тижнів до аналізу LTB₄ та включень зворотно-фазовою HPLC, як описано в Прикладі 1.

Результати

На Фігурі 10 приведені результати вивчення змущеної деградації водних розчинів натрієвої солі LTB₄ при концентраціях гідроксиду натрію, що підвищуються (рН, що підвищується). Отримані дані показують, що натрієва сіль LTB₄ цілком деградувала з рівнями домішок 100% (LTB₄ не визначили) в ампулах 1 та 2, де рН опустилася до значень нижче 5 після п'яти тижнів зберігання при 40°C . Навпаки, в ампулах 3 - 6, де остаточна рН (після п'яти тижнів) складала 8,02, 9,83, 12,50 та 13,03, відповідно, рівні домішок склали 5,34, 3,46, 4,38 та 5,77 (% AUC 270nm), відповідно. Вихідні рівні домішок (при t_0) варіювали від 2,65% до 3,35%. Ці дані чітко показують, що розчини натрієвої солі LTB₄ стабілізувалися при лужній рН, у дуже широкому діапазоні рН, у відсутності і буфера, і хелатуючого агента.

ПРИКЛАД 11

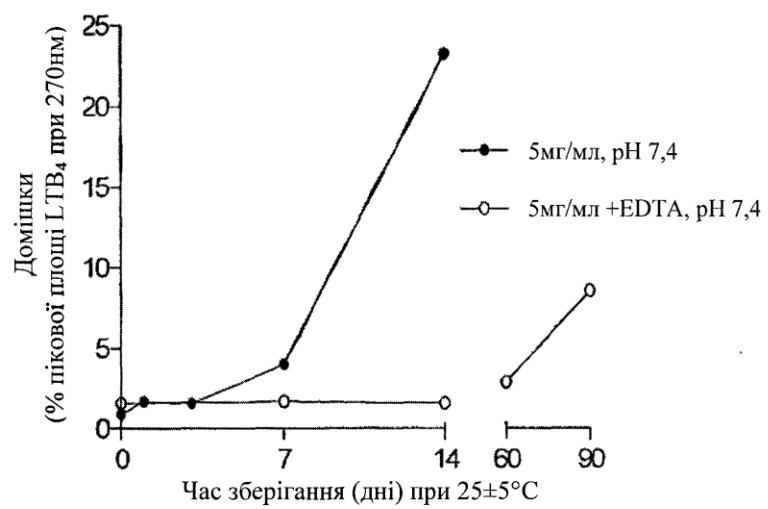
У цьому прикладі досліджувалися фармакокінетичні параметри LTB₄ на щурах після введення трьома різними способами, внутрішньовенно (i.v.), усередину тонкої кишки (i.j.) та підшкірно (s.c.).

Використовували три групи з трьох самок щурів Sprague-Dawley (вагою ~250г); тварини голодували протягом 18 годин, їх анестезували кетамін/ксилазином, у яремні вени їм ввели канюлі для постійного забору зразків крові. LTB₄ вводили дозою 50мкг/кг на дозу об'ємом 4мл/кг для усіх способів введення. Зразки крові (0,5мл/зразок) відбирали через 0, 0,5, 1, 2, 5, 15, 30 та 60 хвилин після ін'єкції LTB₄. Зразки крові відразу ж антикоагулювали EDTA та перенесли в крижану водяну баню до центрифугування для виділення плазми. Зразки плазми зберігали при -80°C до аналізу на вміст

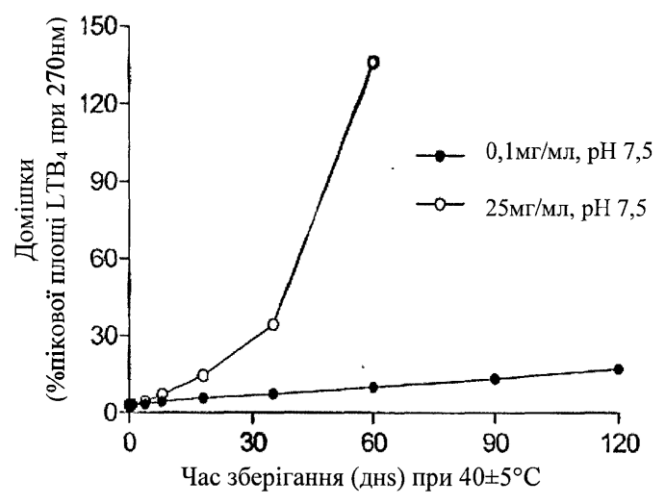
LTB₄ за допомогою комерційного твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA) (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, США). Внутрішньовенне введення (15 сек. болюс) LTB₄ виконали через хвостову вену; при введенні усередину тонкої кишки LTB₄ прямо ввели в тонку кишку після розтину абдомінальної порожнини; підшкірне введення виконали в області спини.

На Фігурі 11A наведені фармакокінетичні параметри після i.j. введення щурам LTB₄ дозою 50мкг/кг. Дані показують, що концентрація LTB₄ у плазмі швидко збільшується у щура після i.j. ін'єкції, досягаючи максимального рівня через 5 хвилин після i.j. введення; дані також показують, що рівні LTB₄ у плазмі повертаються до вихідних рівнів через 30 хвилин після i.j. введення. Ці дані чітко показують, що LTB₄ ефективно переноситься з тонкої кишки в периферичний кровотік. На Фігурі 11B приводиться порівняння площі під кривою (AUC) (для концентрації LTB₄ у плазмі) для трьох різних способів введення. У цьому випадку фармакокінетичний параметр AUC показує системний вплив лікарського засобу. Як і передбачалося, пряме введення LTB₄ у кровотік (i.v. ін'єкція) приводить до найвищої AUC. Крім того, ці дані чітко показують, що AUC LTB₄ після i.j. ін'єкції досягає 35% від i.v. введеного LTB₄, демонструючи, що при i.j. введенні, відбувається ефективне поглинання LTB₄ у кровотоку. Ці дані також означають, що пероральне введення LTB₄ за допомогою відповідної формуляції для доставки в тонку кишку представляє ефективний спосіб системного введення лікарського засобу. Для порівняння наведена AUC при s.c. введенні LTB₄. Підшкірне введення відоме в даній галузі як ефективний спосіб введення LTB₄ на моделях щурів.

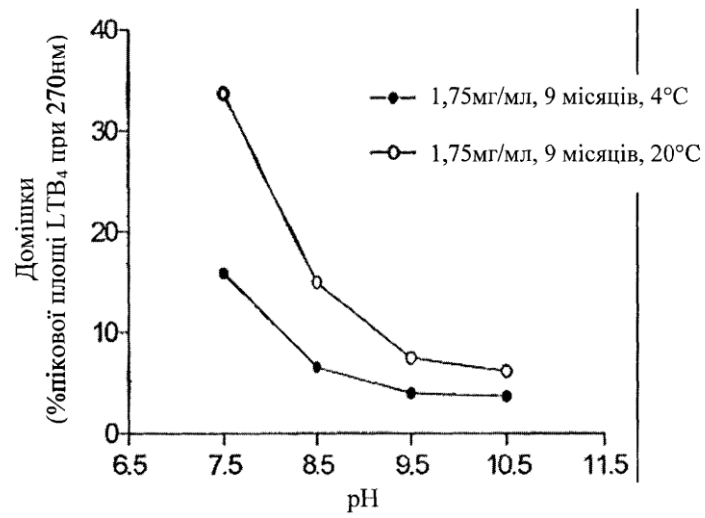
Тоді як, даний винахід описаний стосовно до специфічних варіантів його здійснення, буде зрозуміло, що можливі додаткові модифікації, а дана заявка призначена охопити будь-які варіанти, застосування або адаптації даного винаходу, що впливають, загалом, з принципів даного винаходу, і включають відступи від даного опису, які попадають під відомі або традиційні методики в галузі, до якої належить даний винахід, можуть бути застосовані до вищезгаданих особливостей та знаходяться в об'ємі формули винаходу.



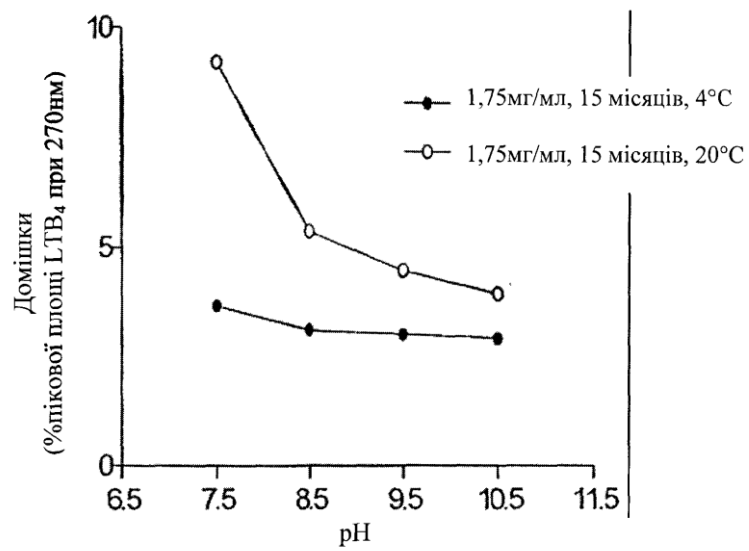
Фігура 1



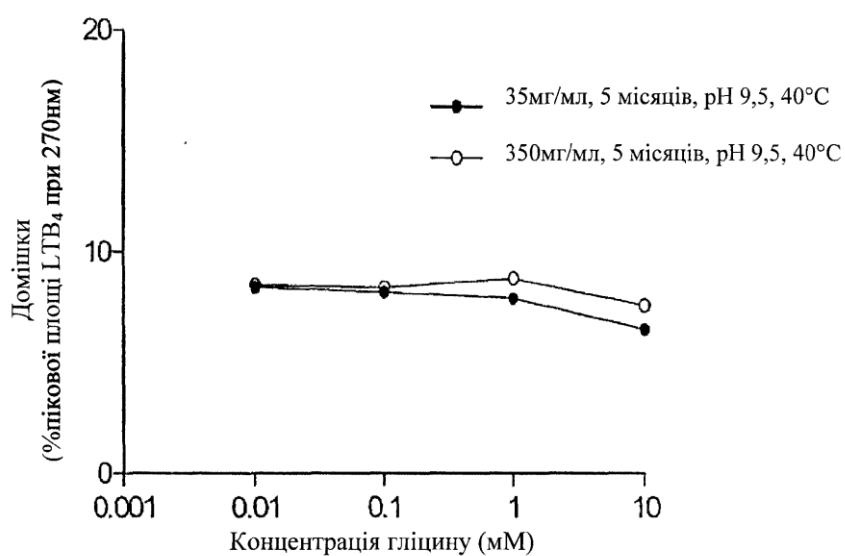
Фігура 2



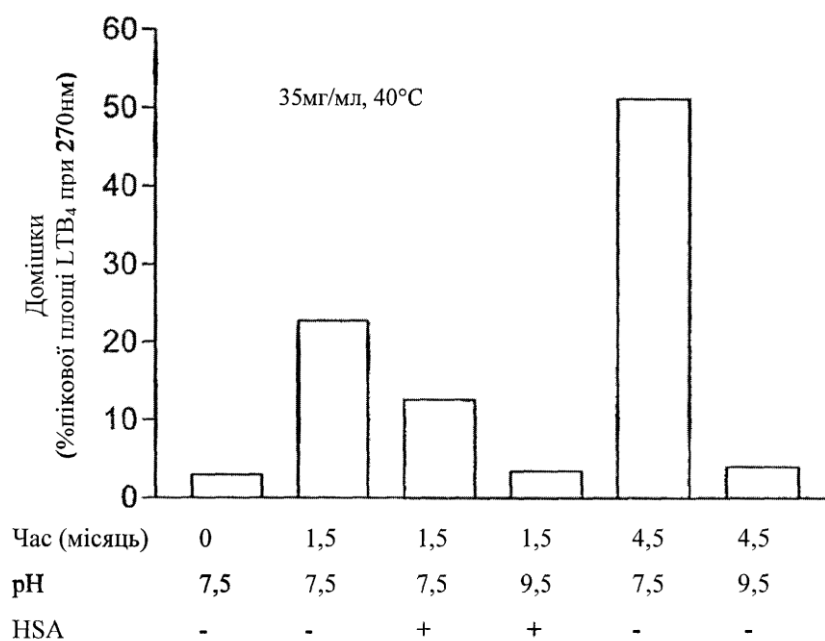
Фігура 3



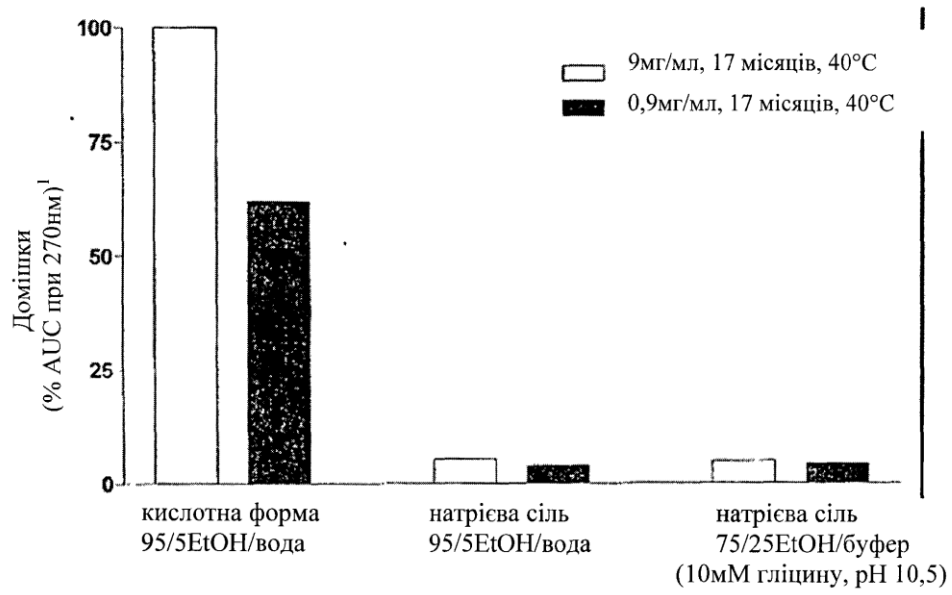
Фігура 4



Фігура 5

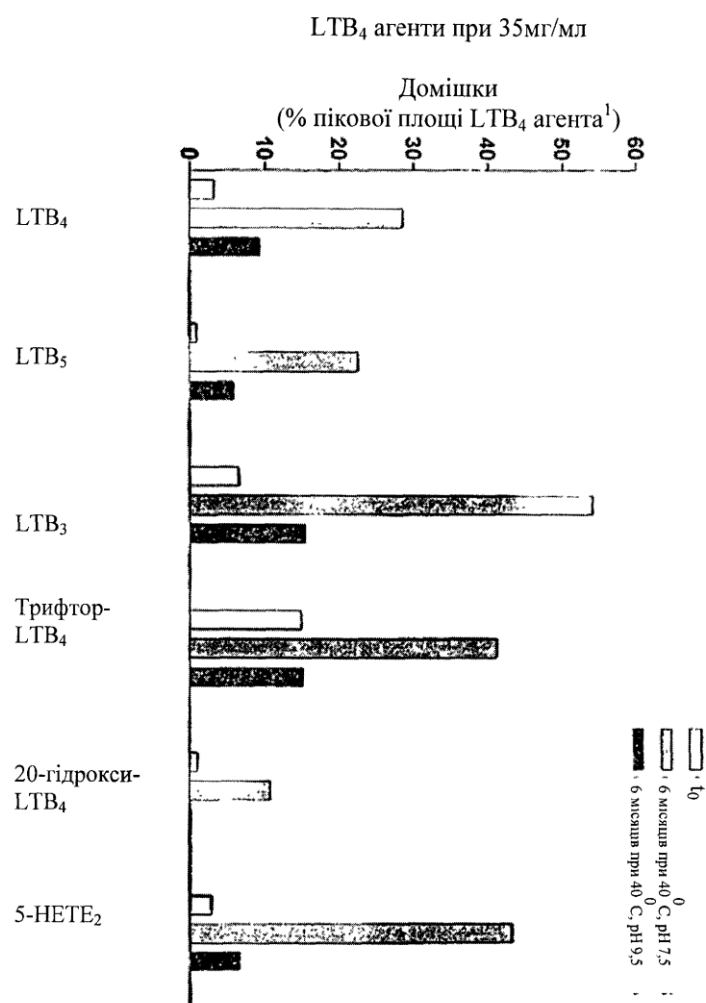


Фігура 6



¹AUC – площа під кривою

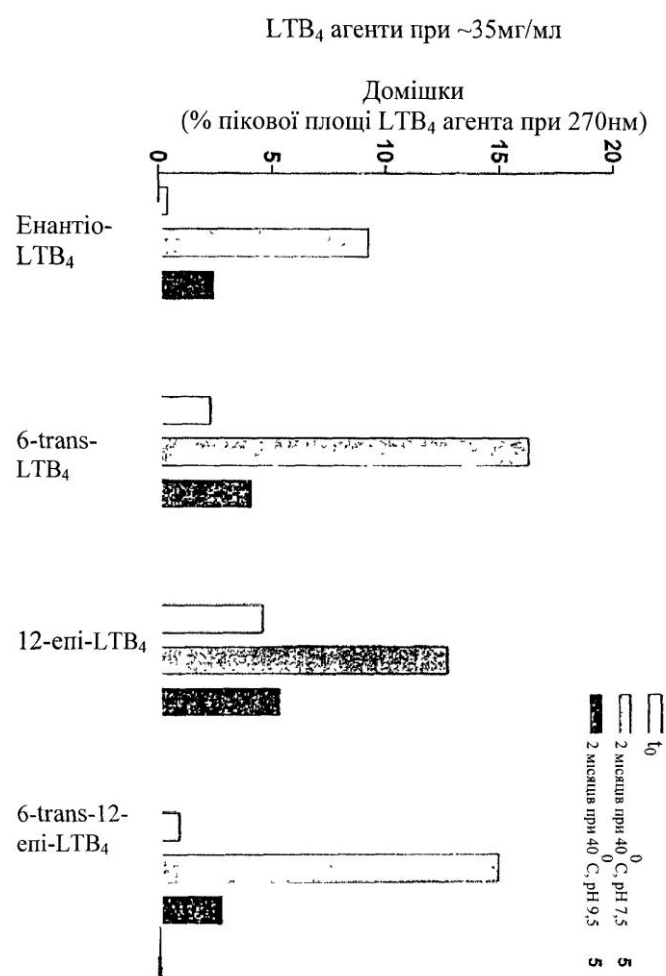
Фігура 7



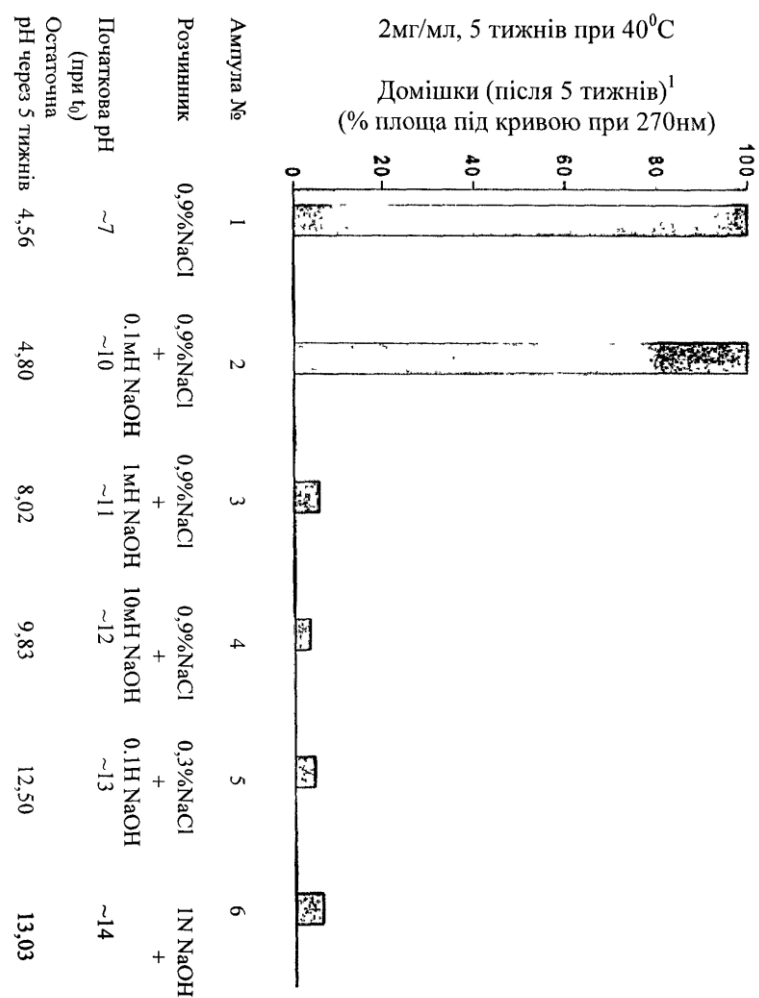
¹ UV дослідження HPLS елюатів при 270нм для усіх LT та 235нм для 5-НЕТЕ

² для 5-НЕТЕ, включення показані при 50% дійсного рівня

Фігура 8

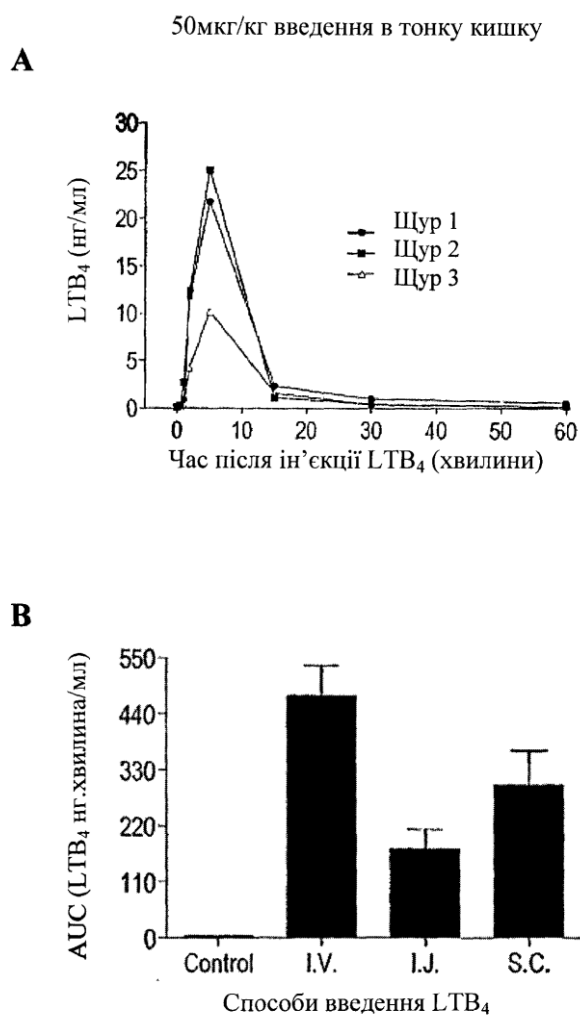


Фігура 9



¹ Домішки при t₀, де 3% ± 0,35% для усіх зразків

Фігура 10



Фігура 11