



УКРАЇНА

(19) UA (11) 43829 (13) C2

(51) 6 A61K38/09, C07K7/23

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СТЕРИЛЬНИЙ ПІСЛЯ ФІЛЬТРАЦІЇ ЦЕТРОРЕЛІКС-ЛІОФІЛІЗАТ ТА СПОСІБ ЙОГО ОДЕРЖАННЯ

1

2

(21) 94005526

(22) 18 02 1994

(24) 15 01 2002

(46) 15 01 2002, Бюл. № 1, 2002 р.

(31) P4305225 8

(32) 19 02 1993

(33) DE

(72) Енгел Юрген, DE, Вихерт Буркхард, DE, Зауербір Дітер, DE, Рейссманн Томас, DE

(73) АСТА МЕДІКА АКЦІОНЕРНЕ ТОВАРИСТВО, DE

(56) US, 5 017 384, 21 05 1991, US, 5 063 204, 05 11 1991, Dathe M. "Int. J. Peptide Protein Res.", №36, 1990, p. 344-349

(57) 1 Стерильный после фильтрации Цетрореликс-лиофилизат, где Цетрореликс означает (Ac-D-Nal(2)¹, D-phe(4Cl)², D-Pal(3)³, D-Cit⁶, D-Ala¹⁰)-LHRH, полученный путем растворения Цетрореликса в 30%-ном водном растворе (об/об) уксусной кислоты, разбавления раствора водой для инъекций, стерилизации посредством фильтрации, разлива в сосуды для инъекций и лиофилизации

2 Стерильный после фильтрации Цетрореликс-лиофилизат по п. 1 отличающийся тем, что перед фильтрацией предусмотрено добавление стабилизатора

3 Стерильный после фильтрации Цетрореликс-

лиофилизат по п. 2, отличающийся тем, что стабилизатор представляет собой маннит

4 Стерильный после фильтрации Цетрореликс-лиофилизат по одному из пп. 1-3, отличающийся тем, что разбавление водного раствора уксусной кислоты водой для инъекций происходит до приблизительно 3% (об/об)

5 Способ получения стерильного после фильтрации Цетрореликс-лиофилизата, где Цетрореликс означает (Ac-D-Nal(2)¹, D-phe(4Cl)², D-Pal(3)³, D-Cit⁶, D-Ala¹⁰)-LHRH, включающий растворение Цетрореликса в уксусной кислоте и последующую обработку, отличающийся тем, что Цетрореликс растворяют в 30%-ном водном растворе уксусной кислоты, полученный раствор разбавляют водой для инъекций, добавляют стабилизатор, стерилизуют посредством фильтрации, разливают в сосуды для инъекций и подвергают лиофилизации

6 Способ по п. 5, отличающийся тем, что перед фильтрацией добавляют стабилизатор

7 Способ по п. 6, отличающийся тем, что в качестве стабилизатора используют маннит

8 Способ по любому из пп. 5-7, отличающийся тем, что водный раствор уксусной кислоты разбавляют водой для инъекций до приблизительно 3% (об/об)

Настоящее изобретение относится к лиофилизату на основе пептида и к способу его получения

«Cetorelix» представляет собой декапептид с концевой группой амида кислоты, который используется в виде соли ацетата. Синтез и некоторые фармакологические действия описаны в европейской патентной заявке № 290402

Биологически активное вещество должно вводиться подкожно в дозе 0,1-20 мг. Водные растворы декапептида нестабильны, автоклавирование в конечной емкости невозможно. Декапептид при обычной для фармакопей стерилизации склонен к разложению. Для того, чтобы получить инъекционный раствор требуется поэтому получение лиофилизата

Правда, количество биологически активного вещества в лиофилизируемом растворе настолько незначительное, что при низких концентрациях биологически активного вещества получается только рыхлый пушок на стеклянной стенке ампулы после высушивания лиофилизата. Вспомогательных веществ раствора, который выносятся из ампулы с помощью используемого для стерилизации потока водяного пара. Следовательно, необходимо использовать структурообразователь (Gestaltbildner), который образует стабильные осадки. При высоких концентрациях от этого вспомогательного вещества можно отказаться. В качестве структурообразователей (каркасообразователей) принимают во внимание следующие вспомогательные вещества: гекситы, в особенно-

(13) C2

(11) 43829

(19) UA

сти маннит, глюцит, сорбит, как D-сорбит, дульцит, аллит, алтрит (например D- и L-алтрит), идит (например, D- и L-идит), их оптически активные формы (D-, соответственно, L-формы), а также соответствующие рацематы. В особенности применяют маннит, как D-маннит, L-маннит, DL-маннит, дульцит и/или сорбит, а именно из них предпочтительно D-маннит. В качестве гексита также можно применять смеси указанных гекситов, например, смеси маннита и сорбита и/или дульцита. Так как дульцит менее водорастворим, чем, например, маннит, то содержание дульцита в водном растворе не должно превышать, например, 3вес %. Маннит и сорбит, напротив, могут смешиваться, например, в любых соотношениях.

Наряду с гекситом также можно добавлять еще другие, обычные фармацевтические вспомогательные вещества, как, например, аминокислоты, как, например, аланин, глицин, лизин, фенилаланин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, лейцин, лактоза, поливинилпирролидон, глюкоза, фруктоза, альбумин и эквивалентные структурообразующие вещества. Далее, можно применять мочевины и хлорид натрия в качестве структурообразующих веществ. Общее количество таких веществ в растворе, который используется для сушки вымораживанием, составляет, например, 0-16,9вес частей, например, 0,1-7вес ч., в расчете на 1вес часть Getrorelix. В готовом лиофилизате общее количество таких вспомогательных веществ может составлять вплоть до 16,9вес ч., в расчете на 1вес ч. гексита. В частности, при выборе количества таких вспомогательных веществ руководствуются имеющимся количеством гексита и именно так, чтобы общее количество гексита и таких других вспомогательных веществ в готовом лиофилизате составляло максимально не более, чем 17вес частей, в расчете на 1вес ч. Getrorelix. В случае, если в лиофилизате находится только 0,1вес ч. гексита, то, следовательно, может иметься вплоть до 16,9вес ч. других вспомогательных веществ, в случае, если, например, имеются 8,5вес ч. гексита, то количество других вспомогательных веществ может составлять, например, вплоть до 8,5вес ч., в расчете на 1вес ч. Getrorelix.

Во время разработок по получению лиофилизата, однако, смогли установить, что биологически активное вещество при переработке ведет себя очень различно и не предусматриваемо.

Первые композиции приводят к хорошим результатам, однако, вскоре оказывается, что при фильтрации в стерильных условиях появляются затруднения и возникают потери.

Из литературы, например, из Powell M F. *Pharmaceutical Research*, 1258-1263 (8), 1991, Dathe M. *Int. J. Peptide Protein Res.* 344-349(36), 1990, Szejtli Z. *Pharmaceutical Technology International*.

16-22, 1991, известно, что олигопептиды, особенно такие с концевой функцией амида кислоты, склонны к гелеобразованию. При стерильной фильтрации это узнается по скорости фильтрации, часто, даже узнают уже органолептически повышенную вязкость такого рода растворов. На стерильном фильтре остается желеобразный

слой. Таким образом, невозможно получить лекарственное средство с точно определенным содержанием биологически активного вещества.

В таблице 1 перечислены различные результаты первых 11 композиций. Содержания биологически активного вещества колеблются в пределах 100-36%.

Таблица 1

Ацетат Getrorelix

Загрузка	Дозировка	Содержание биологически активного вещества, %
1	100мкг	100
2	500мкг	100
3	500мкг	90
4	500мкг	36
5	500мкг	100
6	500мкг	85
7	1мг	100
8	1мг	100
9	2мг	100
10	2мг	80
11	2мг	100

Для того, чтобы избежать этого гелеобразования, в литературе указываются следующие добавки, которые используются для опытов.

Речь идет об органических растворителях, например, такие как ацетонитрил, н-бутанол, трет-бутанол, этанол, изопропанол, октанол и бензиловый спирт. Далее, можно применять соли и буферные растворы, как, например, ацетатный буфер, цитратный буфер, хлорид натрия, фосфат натрия, натриевая соль ЭДТК, бикарбонат натрия, фосфатный буфер, гуанидинацетат, мочевины. Дальнейшее применение могут найти полимеры, как, например, желатина, полиэтиленгликоль 600, гидроксипропилкрахмалы, поливинилпирролидон, поливиниловый спирт. Также уже описана добавка аминокислот, например, как аланин, глицин, лизин, фенилаланин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота и лейцин. Из кислот используется лимонная, каприловая, октановая, соляная, серная и уксусная кислота. Из физиологически безопасных поверхностно-активных веществ имеются в распоряжении бензалконийхлорид, цетиловый спирт, желчные кислоты, лецитин, полисорбаты, Spans® и Pluronic®. Также уже использовали углеводы и циклодекстрины, как, например, глюкоза, лактоза, маннитол, сахароза, α-, β- и γ-циклодекстрины, гидроксипропил-α- и β-циклодекстрины, гидроксипропил-α- и β-циклодекстрины. Эти вспомогательные вещества испытывались в качестве вспомогательного при фильтрации средства для избежания гелеобразования.

Однако, удовлетворительного решения проблемы не было найдено. Лишь подкисление с помощью уксусной кислоты дало частичный успех. Однако, здесь также всегда сталкиваются с более

высокими потерями при фильтрации

В настоящее время было неожиданно установлено, что Cetorelix может хорошо растворяться в 30%-ном объем/объем растворе уксусной кислоты. Этот раствор затем доливают до целевой концентрации в 3% Cetorelix водой для инъекции и добавляют маннит. Хотя в литературе было описано, что в кислой среде концевые амидные группы легко гидролизуются, в случае Cetorelix этого не смогли установить. Растворы, которые получают согласно этому способу, при фильтрации не вызывают никаких затруднений. Получают всегда точные содержания биологически активного вещества.

Скорость фильтрации достигает величин, которые обеспечивают удовлетворительное протекание процесса. Общий способ для стерильной лиофилизации описывается в Susher, Fuchs и Speiser (редакторы) «Pharmazeutische Technologie» 2-е издание, 1991, Thieme-Verlag, Штутгарт-Нью-Йорк, на с 557-559. Дальнейшее описание процесса лиофилизации изложено в выкладке ФРГ 3735614.

Лиофилизат находит свое применение в терапии женского бесплодия. Способ лечения до сих пор состоит в том, чтобы путем человеческого гонадотропина менопауз стимулировать созревание фолликул и затем, путем введения человеческого хорион гонадотропина, вызывать овуляцию. Вызванная благодаря этому овуляция происходит спустя 32 часа. Выделенные благодаря этому яйцеклетки доступны для экстракорпорального оплодотворения.

Недостатком этой терапии с помощью агонистов является тот факт, что в фазе стимулирования созревают вплоть до 10 фолликул. Благодаря этому повышенному созреванию фолликул приходят к пикам гормональных уровней LH. Эти пики имеют последствием раннюю стадию созревания фолликул, и овуляция происходит в непредвиденный момент времени. Это нарушение овуляции наступает примерно в 25%-тах случаев лечения и представляет собой недостаток, так как цикл, который проявляет такое нарушение овуляции, теряется для получения яйцеклеток, и все лечение должно повторяться спустя примерно 1 месяц.

Другим недостатком общепринятого стимулирующего лечения является продолжительное время лечения, составляющее 4 недели, которое необходимо, чтобы достичь удовлетворительного подавления. Агонисты, далее, в 1-2% случаев проявляют синдром гиперстимуляции, при котором гипертрофируются клетки фолликул. Опасность гиперстимуляции особенно велика в случае поликистозных яичников. Синдром гиперстимуляции представляет собой тяжелое побочное действие, которое может привести к смертельным случаям.

В настоящее время установлено, что антагонист даже при этом лечении обладает следующими преимуществами.

Для того чтобы достичь полного подавления, при лечении с помощью Cetorelix достаточно времени лечения 5 дней. Синдром гиперстимуляции не может наступить. Сверх того, во второй фазе лечения можно экономить на фазе вызыва-

ния овуляции, HMG. Это представляет собой немалое преимущество в отношении стоимости этого лечения для ин витро-оплодотворения. Ин витро-оплодотворение используется, например, при наличии аномалии труб, для этой терапии необходимо точно контролировать цикл и по возможности точно устанавливать момент овуляции. До сих пор это достигалось только ограниченно, так как благодаря стимуляции с помощью HMG/HCG часто слишком рано наступал предовуляционный подъем-LH или не поддерживался достаточно длительное время. Однако, решающее значение для успеха лечения имеет предотвращение этого преждевременного подъема для того, чтобы можно было точно установить момент оплодотворения. Благодаря этому уменьшается соматическая и психическая нагрузка пациенток и оптимально используется пребывание в клинике. Для достижения этой цели с высокой надежностью необходимо по возможности полностью подавлять эндогенное продуцирование гормонов (LH-FSH, эстрадиол), чтобы одновременно за счет подачи экзогенного гонадотропина (HMG/HCG) стимулировать созревание фолликул и контролировать в любое время уровень гормонов. Лишь при достижении достаточно высокого количества фолликул (4-5), которые обладают примерно равной степенью зрелости, благодаря введению инъекции HCG-BOLUS вызывается овуляция.

Благодаря использованию антагонистов лечение можно проводить значительно успешнее и безопаснее для пациенток.

Дальнейшей областью применения Cetorelix лиофилизата согласно настоящему изобретению является использование его при защите половых желез мужчин-пациентов. Мужчин-пациентов сначала предварительно лечат с помощью Cetorelix лиофилизата, и поддерживают активность половых желез. Благодаря этому другие вредные патогенные факторы, как, например, лучевая терапия или цитостатическая терапия, не могут или только в незначительной степени могут воздействовать на чувствительные ткани половых желез.

Пример способа получения

В пригодный стеклянный сосуд помещают примерно 1,5л воды для инъекционных целей. В другой стеклянный сосуд помещают 210г воды для инъекций и добавляют 91,17г уксусной кислоты. Рассчитанное количество Cetorelix-ацетата (1,62-1,695г, в зависимости от содержания используемого наполнителя) при перемешивании растворяют в приготовленной 30%-ной уксусной кислоте. Этот раствор переносят в стеклянный сосуд с 1,5л воды для инъекционных целей, добавляют 82,2г маннитола, растворяют и доливают водой для инъекционных целей до 3039г.

Контролирование процесса

pH-значение	2,5-3,0
плотность	1,009-1,017г/см ³ при 20°C
показатель преломления	1,227-1,340 при 440нм и 20°C

Стерилизацию раствора осуществляют путем фильтрации через пригодный мембранный фильтр (размер пор 0,2мкм) при асептических условиях. 100мл первого прогона отбрасывают.

Фильтры стерилизуют с помощью водяного пара Cetorelix раствор, для сушки вымораживанием хранят защищенным от повторного загрязнения Раствор немедленно дозированно вносят во флаконы для инъекции согласно

ДИН 2R, флаконы бесцветные, гидролитического класса I, при асептических условиях и снабжают стерильными пробками для сушки вымораживанием. Необходимое заполняемое количество составляет 2,0мл=2,026г

Флаконы для инъекций емкостью 2мл споласкивают в машине для мытья флаконов для инъекций и высушивают и стерилизуют горячий воздухом. Очищенные пробки для сушки вымораживанием автоклавируют. Предварительно закрытые пузырьки для инъекций переносят в установку для сушки вымораживанием и вымора-

живают при температуре плиты -40°C, Высушивание осуществляют с помощью программы высушивания при температуре плиты, повышающейся от -40°C до +20°C, Затем установку заполняют стерильным азотом, флаконы в установке закрывают и пробки снабжают клапаном с бортиком

Флаконы для инъекций визуально контролируют на дефекты укупорки и наружные дефекты. Флаконы для инъекций с дефектами отделяют и уничтожают

Cetorelix-лиофилизат в количестве 1мг представляет собой белый твердый осадок после сушки вымораживаем в бесцветном, емкостью 2мл, флаконе для инъекции, который укупорен серой пробкой после сушки вымораживанием и снабжен желтой крышкой с бортиком, открываемой легким нажатием