

#### Галузь винаходу

Даний винахід стосується фармацевтичних композицій фармакологічно активних поліпептидів, які забезпечують уповільнене вивільнення поліпептиду протягом тривалого періоду часу.

#### Опис існуючого рівня техніки

Відповідно до існуючого рівня техніки (WO98/25642), заявлено фармацевтичні композиції, які включають стійкий нерозчинний у воді комплекс, який складається з пептидної сполуки (наприклад, пептиду, поліпептиду, білка, пептидоміметичної сполуки і т. ін.), в оптимальному варіанті - фармацевтично активної пептидної сполуки та макромолекули-носія, яка забезпечує уповільнене постачання пептидної сполуки *in vivo* після введення комплексу. Комплекс існуючого рівня техніки дозволяє безперервне постачання фармацевтично активної пептидної сполуки пацієнтові протягом тривалого періоду часу, наприклад, одного місяця. Крім того, зв'язок пептидної сполуки та макромолекули-носія у міцному, стійкому комплексі дозволяє вводити високу концентрацію пептидної сполуки у композицію.

Комплекс винаходу згідно з існуючим рівнем техніки утворюють шляхом комбінування пептидної сполуки та макромолекули-носія за умов утворення практично нерозчинного у воді комплексу, тобто, водні розчини пептидної сполуки та макромолекули-носія перемішують до осадження комплексу.

Комплекс може бути у твердій формі (наприклад, у формі пасти, гранул, порошку або ліофілізату) або комплекс у порошкоподібній формі може бути достатньо тонко подрібнений для утворення стійких рідких суспензій або напівтвердих дисперсій.

В оптимальному варіанті втілення пептидна сполука нерозчинного у воді комплексу є аналогом LHRH, краще - антагоністом LHRH, а макромолекула-носіє є аніонним полімером, в оптимальному варіанті - натрійкарбоксиметилцелюлозою. Комплекс згідно з винаходом є придатним для стерилізації, наприклад, шляхом гамма-випромінювання або електронно-променевого випромінювання, перед введенням *in vivo*. Пропонуються також способи лікування пацієнта від захворювання, яке піддається лікуванню аналогом LHRH шляхом введення пацієнтові композиції згідно з винаходом, що містить аналог LHRH.

#### Проблеми, пов'язані з існуючим рівнем техніки

Для виробництва заявлених комплексів потрібні розчини пептидної сполуки у воді досить високої концентрації (5-25мг/мл). Через характерну схильність багатьох пептидних сполук до агрегації неможливо гарантувати одержання вільних від агрегатів розчинів у чистій воді з застосуванням заявленої процедури одержання. Залежно від розчинності у воді конкретної пептидної сполуки та технології, застосованої для одержання цього розчину, концентрований розчин пептиду у воді може бути вільним від агрегату або забрудненим пептидними агрегатами та осадами різних концентрацій та різних типів. Оскільки такий висококонцентрований пептидний розчин є вихідним матеріалом для виробництва заявлених комплексів, розчинення пептидної сполуки у воді є вирішальним етапом.

Внаслідок додавання водного розчину натрійкарбоксиметилцелюлози до цього не дуже визначеного й охарактеризованого висококонцентрованого пептидного розчину у різних співвідношеннях (від 0,1:1 до 0,5:1 (маса/маса)) спонтанно, невизначено й неконтрольовано виникають комплекси. Осади збирають шляхом фільтрації або центрифугування, промивають, ополоскуючи водою, і висушують. Твердий матеріал після цього подрібнюють на порошок, застосовуючи ступку та пестик. Після цього аналітичним шляхом визначають вміст пептидної сполуки. При такій процедурі виробництва неможливо гарантувати утворення стехіометричних комплексів, яке можна було б відтворити і належним чином визначити.

Крім того, через додавання розчину натрійкарбоксиметилцелюлози (що містить 8,5-9,5% натрію згідно з USP), значна кількість іонів металів, тобто, іонів натрію, входить у контакт із пептидною сполукою. Пептиди та білки можуть бути осажені у присутності солей. Отже, до кінця не зрозуміло, чи утворюються комплекси або осади, описані в існуючому рівні техніки, завдяки взаємодії між пептидною сполукою та функціональними групами самої карбоксиметилцелюлози, чи лише завдяки пептидоосаджувальному ефектові іонів натрію, чи завдяки невідомому й неконтрольованому поєднанню цих двох процесів.

Після висушування й перемелювання пептидні композиції, описані в існуючому рівні техніки суспендують у соляному розчині, що також може призводити до небажаних неконтрольованих процесів взаємодії.

Даний винахід забезпечує фармацевтичні композиції, які включають стійку, чітко визначену стехіометричну сіль, яка складається відповідно з кислотної або основної пептидної сполуки (такої, як пептид, поліпептидний білок, пептидоміметична сполука і т. ін.) та з іонної, основної або кислотної, макромолекули-носія, що забезпечує уповільнене постачання пептидної сполуки після введення *in vivo* солі конкретної пептидної сполуки.

Іонна макромолекула-носіє може бути аніонним полімером, наприклад, аніонним поліспиртом, його похідною або фрагментом.

Крім того, макромолекула іонного носія може бути аніонним полісахаридом, його похідною або фрагментом. В оптимальному варіанті макромолекула-носіє є карбоксиметилцелюлозою. Макромолекулу-носіє у фармацевтичній композиції також вибирають з групи, яка складається з альгіну, альгінової кислоти, альгінату натрію, аніонних ацетатних полімерів, іонних акрилових або метакрилових полімерів та співполімерів, пектину, трагаканту, ксантанових смол, аніонних карагеноанових похідних, похідних аніонної полігалактуронової кислоти, сульфатованого та сульфонованого полістиролу, натрієвокрохмального гліколяту та їх фрагментів або похідних.

Іонна макромолекула-носіє також може бути альбуміном, желатином (тип А або тип В)<sup>1</sup> та його фрагментом або похідною.

Катіонні полімери також можуть бути полі-L-лізином та іншими полімерами основних амінокислот.

Пептид у сполуці є фармацевтично активною пептидною сполукою і може бути моно-, дво- або багатовалентним катіонним або аніонним поліпептидом, де поліпептид має довжину від 5 до 100 амінокислот, в оптимальному варіанті - від 5 до 20 амінокислот, ще краще - пептид має довжину від 8 до 12 амінокислот. Точніше, пептидна сполука є аналогом LHRH, і аналог LHRH є антагоністом LHRH. Аналогом LHRH є, наприклад, Cetrorelix, Teverelix (Antarelix, Deghenghi et al., Biomed & Pharmacother 1993, 47, 107), Abarelix

(Molineaux et al., Molecular Urology 1998, 2, 265), Ganirelix (Nestor et al., J. Med. Chem. 1992, 35, 3942), Azaline B, Antide, A-75998 (Cannon et al., J. Pharm. Sci. 1995, 84, 953), Detirelix (Andreyko et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 1992, 74, 399), RS-68439, Ramorelix (Stoeckermann and Sandow, J. Pak Res. Clin. Oncol. 1993, 119, 457), Nal-Glu. Структуру вищезгаданих аналогів LHRH представлено, наприклад, у наведених вище посиланнях та таких роботах: Behre et al., GnRH antagonists: an overview, Proceedings of the 2nd World Conference on Ovulation Induction, The Parthenon Publishing Group Ltd, UK; Kutscher et al., Angew. Chem. 1997, 109, 2240.

Крім того, описано спосіб одержання таких солей.

Згідно з винаходом, вільну основу або вільну кислоту пептидної сполуки одержують, видаляючи протиіон, застосовуючи іонообмінники. Так само, вільну основу або вільну кислоту макромолекули-носія одержують, видаляючи протиіон, застосовуючи іонообмінники. Після цього комбінують еквівалентну кількість щойно одержаної пептидної основи або пептидного кислотного розчину, відповідно, у наведених макромолекули-носія без протиіонів. Співвідношення пептидної сполуки з макромолекулою-носієм (маса/маса) може становити, наприклад, 1:0,1, 1:0,213, 1:0,5, 1:2,13. Окремі приклади умов та процедур одержання нерозчинного у воді комплексу згідно з винаходом описано у Прикладах з 1 по 4,

Цей процес в результаті забезпечує чітко визначені, стехіометричні та чисті солі пептидної сполуки з протиіонною макромолекулою. Ці чисті солі не є забрудненими іншими іонами, ні аніонами (наприклад, ацетатом), ні катіонами (наприклад, натрієм).

Фармацевтичні композиції винаходу забезпечують уповільнене постачання пептидної сполуки пацієнтові *in vivo* після введення йому композиції. Тривалість та міру уповільненого постачання змінюють залежно від концентрації пептидної сполуки та макромолекули-носія, застосованої для утворення солі.

#### Приклад 1

Ліофілізат солі cetorelix-СМС з масовим співвідношенням cetorelix : СМС 1:0,1, подібним до молярного співвідношення cetorelix : карбоксильна функція СМС 1:0,48, приготували таким чином. 0,22г Na-СМС (карбоксиметилцелюлоза низької в'язкості, Hercules) розчиняли у 40г води й додавали 3г іонообмінника (Amberlite®). Після перемішування протягом 20хв іонообмінник видаляли шляхом фільтрації, застосовуючи скловолоконний фільтр. 2,21г ацетату cetorelix розчиняли у 23,4г води та додавали 74,6г 96% етанолу (об'єм/об'єм). Додавали 20г іонообмінника (Amberlite®). Після перемішування протягом 20хв іонообмінник видаляли шляхом фільтрації, застосовуючи скловолоконний фільтр. При безперервному перемішуванні до безнатрієвого розчину СМС додавали фільтрований основний розчин cetorelix, одержуючи на виході прозорий розчин. Через 1 годину перемішування розчин випарювали у вакуумі для видалення етанолу й одержання на виході дисперсії. І нарешті, дисперсію заморожували та висушували шляхом ліофілізації.

#### Приклад 2

Ліофілізат солі cetorelix-СМС з масовим співвідношенням cetorelix : СМС 1:0,213, подібним до молярного співвідношення cetorelix : карбоксильна функція СМС 1:1, приготували таким чином. 0,426г Na-СМС (карбоксиметилцелюлоза низької в'язкості, Hercules) розчиняли у 40г води і додавали 5г іонообмінника (Amberlite®). Після перемішування протягом 25хв іонообмінник видаляли шляхом фільтрації, застосовуючи скловолоконний фільтр. 2,21г ацетату cetorelix розчиняли у 23,4г води та додавали 74,8г 96% етанолу (об'єм/об'єм). Додавали 20г іонообмінника (Amberlite®). Після перемішування протягом 20хв іонообмінник видаляли шляхом фільтрації, застосовуючи скловолоконний фільтр. При безперервному перемішуванні до безнатрієвого розчину СМС додавали фільтрований основний розчин cetorelix, одержуючи на виході прозорий розчин. Через 1 годину перемішування розчин випарювали у вакуумі для видалення етанолу та одержання на виході дисперсії. І нарешті, дисперсію заморожували та висушували шляхом ліофілізації.

#### Приклад 3

Ліофілізат солі cetorelix-СМС з масовим співвідношенням cetorelix : СМС 1:0,5, подібним до молярного співвідношення cetorelix : карбоксильна функція СМС 1:2,41, приготували таким чином. 1,1г Na-СМС (карбоксиметилцелюлоза низької в'язкості, Hercules) розчиняли у 200г води і додавали 15г іонообмінника (Amberlite®). Після перемішування протягом 20хв іонообмінник видаляли шляхом фільтрації, застосовуючи скловолоконний фільтр. 2,21г ацетату cetorelix розчиняли в 23,4г води та додавали 74,6г 96% етанолу (об'єм/об'єм). Додавали 20г іонообмінника (Amberlite®). Після перемішування протягом 20хв іонообмінник видаляли шляхом фільтрації, застосовуючи скловолоконний фільтр. При безперервному перемішуванні до безнатрієвого розчину СМС додавали фільтрований основний розчин cetorelix, одержуючи на виході розчин. Через 1 годину перемішування розчин випарювали у вакуумі для видалення етанолу й одержання на виході дисперсії. І нарешті, дисперсію заморожували та висушували шляхом ліофілізації.

#### Приклад 4

Ліофілізат солі cetorelix-СМС з масовим співвідношенням cetorelix : СМС 1:2,13, подібним до молярного співвідношення cetorelix : карбоксильна функція СМС 1:10, приготували таким чином. 4,26г Na-СМС (карбоксиметилцелюлоза низької в'язкості, Hercules) розчиняли у 400г води та додавали 50г іонообмінника (Amberlite®). Після перемішування протягом 25хв іонообмінник видаляли шляхом фільтрації, застосовуючи скловолоконний фільтр. 2,21г ацетату cetorelix розчиняли у 23,4г води та додавали 74,6г 96% етанолу (об'єм/об'єм). Додавали 20г іонообмінника (Amberlite®). Після перемішування протягом 20хв іонообмінник видаляли шляхом фільтрації, застосовуючи скловолоконний фільтр. При безперервному перемішуванні до безнатрієвого розчину СМС додавали фільтрований основний розчин cetorelix, одержуючи на виході мутну дисперсію. Через 1 годину перемішування дисперсію випарювали у вакуумі для видалення етанолу. І нарешті, дисперсію заморожували й висушували шляхом ліофілізації.

#### Приклад 5

Розчинність безнатрієвих чистих солей СМС при різних співвідношеннях пептид-основа : кислота СМС визначали в ізотонічному розчині Рінгера. Солі cetorelix-СМС одержували згідно з прикладами з 1 по 4.

Крім того, *in vitro* вивільнення у розчині Рінгера cetorelix з цих безнатрієвих солей СМС випробували протягом 168 годин, застосовуючи проточну систему. Кількість cetorelix, вивільненого через 168 годин виражають як відсоток дози cetorelix, яку вводять згідно з цим *in vitro* випробуванням.

Пептид основа: СМС (маса/маса)	Розчинність у розчині Рингера у мкг/мл	Вивільнення in vitro у розчині Рингера через 168 год у %
1:0,1	3,5	23
1:0,213	2,7	30
1:0,5	17,5	63
1:2,13	54	76

Ці in vitro дані безнатрієвих солей СМС згідно з цим винаходом порівнювали з комплексами cetorelix, одержаними з Na-СМС в ідентичних масових співвідношеннях пептиду та СМС існуючого рівня техніки (WO98/25642).

Пептид-основа: Na-СМС (маса/маса)	Розчинність у розчині Рингера у мкг/мл	Вивільнення in vitro у розчині Рингера через 168 год у %
1:0,1	2,5	46
1:0,253	1,5	48
1:0,5	2	45
1:2,13	2	17

Видалення іонів натрію та ацетату в пептидних солях СМС веде до значного поліпшення характеристик таких композицій, тобто, розчинності та вивільнення in vitro.

У комплексах Na-СМС існуючого рівня техніки розчинність у розчині Рингера є дуже низькою і не може бути змінена шляхом зміни співвідношення компонентів - пептиду та Na-СМС. Таким чином, кінетика вивільнення пептидної сполуки з цих композицій не може бути змінена.

На відміну від них, у безнатрієвих солях СМС пептидної сполуки, одержаних згідно з винаходом, існує чітка залежність між масовим співвідношенням солей та їх характеристиками in vitro. Збільшення відсотка безнатрієвої СМС кислоти у таких композиціях веде до значного збільшення розчинності пептидної сполуки у розчині Рингера. Таким чином, кінетика вивільнення пептидної сполуки з цих безнатрієвих композицій солей СМС може змінюватися й регулюватися. Отже, залежно від потрібної кінетики вивільнення для певних клінічних потреб, можна одержувати чітко визначені композиції солей СМС з потрібним характером вивільнення.

#### Приклад 6

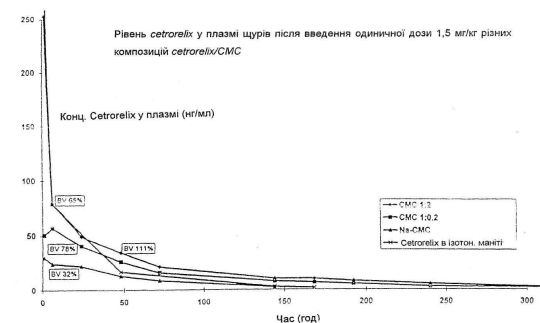
Одержували як безнатрієві СМС-солі cetorelix згідно з Прикладами з 1 по 4, так і Na-СМС-комплекси cetorelix з еквівалентним масовим співвідношенням cetorelix : СМС існуючого рівня техніки. Одержували суспензії таких безнатрієвих СМС-солей cetorelix та Na-СМС-комплексів cetorelix, відповідно, і одиничну дозу 1,5мг/кг вводили шляхом внутрішньом'язової ін'єкції щурам. У різні моменти часу визначали рівні тестостерону в плазмі та cetorelix у плазмі. Крім того, наприкінці тестостеронової супресії щурів убивали. М'яз, у який вводили дозу, вирізали та піддавали аналізу на залишки введеної дози cetorelix у місці ін'єкції. Результати показано на Фіг.1.

Абсолютне біонакопичування солей Cetorelix-СМС становило 78%-111%. Біонакопичування комплексів Cetorelix-Na-СМС становило лише 32%, що свідчило про негативний вплив іонів натрію на властивості композицій, одержаних згідно з існуючим рівнем техніки.

#### Приклад 7

Безнатрієві СМС-солі cetorelix згідно з даним винаходом, описані у попередніх прикладах, одержували як ліофілізата. Ліофілізати диспергували у водному середовищі і підшкірно вводили собакам одиничні дози по 1,0мг/кг. У різні моменти часу визначали рівень тестостерону у плазмі та рівень cetorelix у плазмі. Результати показано на Фіг.2.

Фіг. 1 / Приклад 6



Фіг. 2 / Приклад 7

