

Галузь винаходу

Різноманітні хвороби і клінічні розлади можна лікувати за допомогою введення фармацевтично активного пептиду. Одним таким прикладом є рак простати, який залежить від статевих гормонів і який можна лікувати введенням аналогу гормону, що вивільнює лютеїнезуючий гормон (LHRH), який стимулює вивільнення лютеїнезуючого гормону (LH), що регулює синтез чоловічих гормонів. Зокрема, для зменшення вивільнення LH використовували пептидні аналоги LHRH, які діють як суперагоністи рецептору гормону, що вивільнює лютеїнізуючий гормон, такий як лейпролід і гозерелін.

В багатьох випадках, терапевтична ефективність фармацевтично активного пептиду залежатиме від його подовженої присутності *in vivo* протягом тривалих термінів часу. Для досягнення тривалої доставки пептиду *in vivo* є бажаною композиція з пролонгованим вивільненням або пролонгованою доставкою, для того, щоб уникнути потреби у повторюваних введеннях. Одним підходом з тривалою доставкою ліків є мікроінкапсуляція, де активний інгредієнт включають всередину полімерної мембрани з утворенням мікрочасток. Наприклад, суперагоністи LHRH, такі як лейпролід і гозерелін, типово включають всередину мікрочастки, що складається з полілактид/полігліколідного сополімеру, для одержання композиції, придатної для депонованої ін'єкції, що приводить до пролонгованої доставки суперагоністу протягом від кількох тижнів до місяців (див наприклад, Патенти США 4,675,189; 4,677,191; 5,480,656 і 4,728,721).

Необхідні додаткові композиції з пролонгованою доставкою для безперервного введення фармацевтично активних пептидів *in vivo* протягом тривалого терміну часу.

Стислий опис винаходу

Цей винахід пропонує фармацевтичні композиції, що складаються зі стабільного водонерозчинного комплексу, що містить пептидну сполуку (наприклад, пептид, поліпептид, білок, пептидоміметик тощо), краще фармацевтично активну пептидну сполуку і макромолекулу-носію, яке забезпечує тривале виділення пептидної сполуки *in vivo* при введенні комплексу. Таким чином, комплекс винаходу може забезпечити безперервну доставку фармацевтично активної пептидної сполуки протягом тривалих періодів часу, наприклад, одного місяця. Крім того, сполучення пептидної сполуки і макромолекули-носія у міцний, стабільний комплекс дозволяє завантаження високих концентрацій пептидної сполуки у композицію.

Комплекс винаходу одержують сполученням пептидної сполуки і макромолекули-носія за таких умов, що утворюється суттєво водонерозчинний комплекс, наприклад, водні розчини пептидної сполуки і макромолекули-носія змішують доки комплекс не осаджується. Комплекс може бути у формі твердої речовини (наприклад, пасти, гранул, порошка або ліофілізату), або порошкоподібна форма комплексу може бути достатньо дрібно розтерта, щоб утворити стабільні рідкі суспензії або напівтверді дисперсії.

У кращому втіленні, пептидною сполукою водонерозчинного комплексу є аналог LHRH, ще краще антагоніст LHRH, а макромолекула-носію є аніонним полімером, краще карбоксиметилцелюлозою. Комплекс винаходу придатний для стерилізації, такої як γ -опромінення або опромінення пучком електронів, перед введенням *in vivo*.

Також запропоновано спосіб лікування суб'єкта зі станом, що прямокутники) у собак протягом часу після внутрішньом'язової ін'єкції PPI-149-CMC у вказаних дозах при 28 добових проміжках, що показує тривале пригнічення рівнів тестостерону в плазмі.

Детальний опис винаходу

Цей винахід стосується фармацевтичних композицій, що складаються зі стабільного водонерозчинного комплексу, що містить пептидну сполуку (наприклад, пептид, поліпептид, білок, пептидоміметик тощо) і макромолекулу-носію, способів приготування таких композицій і способів використання таких композицій. До переваг фармацевтичних композицій винаходу належить здатність доставляти фармацевтично активну пептидну сполуку або по всьому організму, або локально протягом тривалого часу (наприклад кілька тижнів, один місяць або кілька місяців), і здатність завантажувати високі концентрації пептидної сполуки у комплекс.

Для того, щоб винахід був якомога більше зрозумілий, спочатку слід розглянути певні терміни.

Як використано тут, термін "пептидна сполука" стосується сполук, що складаються, принаймні частково, із залишків амінокислот, з'єднаних амідними зв'язками (тобто, пептидними зв'язками). Термін "пептидна сполука" стосується пептидів, поліпептиду і білків. Типово, пептид складатиметься з менш, ніж приблизно 100 амінокислот, ще типовіше менше, ніж приблизно 50 залишків амінокислот і навіть ще типовіше, менше, ніж приблизно 25 залишків амінокислот. Термін "пептидна сполука" також стосується аналогів пептиду, похідних пептидів і пептидоміметиків, які є копією хімічної структури пептиду, що містить природні амінокислоти. До прикладів аналогів пептиду належать пептиди, що складаються з однієї або кількох неприродних амінокислот. До прикладів похідних пептидів належать пептиди, у яких амінокислотний боковий ланцюг, головний ланцюг пептиду, або аміно- чи карбокси-кінець дериватизували (наприклад, пептидні сполуки з метильованими амідними зв'язками). До прикладів пептидоміметиків належать пептидні сполуки, у яких головний ланцюг пептиду заміщений на одну або кілька молекул бензодіазепіну (див., наприклад, James, G.L. et al. (1993) Science 260:1937-1942), "Інвертовані" пептиди, в яких всі L-амінокислоти заміщені на відповідні D-амінокислоти, "ретро-інвертовані" пептиди (див. Патент США № 4,522,752 Sisto), у яких послідовність амінокислот змінена ("ретро"), і всі L-амінокислоти заміщені на D-амінокислоти "інвертовані", й інші ізостери, такі як міметики головного ланцюгу пептиду (тобто, амідний зв'язок), включаючи модифікації амідного азоту, α -вуглецю, амідного карбонілу, повне заміщення амідного зв'язку, продовжень, делецій або поперечних зв'язків поміж головними ланцюгами. Відомі кілька модифікацій головного ланцюгу пептиду, включаючи $\psi[\text{CH}_2\text{S}]$, $\psi[\text{CH}_2\text{NH}]$, $\psi[\text{CSNH}_2]$, $\psi[\text{NHCO}]$, $\psi[\text{COCH}_2]$, і $\psi[(\text{E}) \text{ або } (\text{Z}) \text{CH}=\text{CH}]$. У номенклатурі, що використана вище, ψ вказує на відсутність амідного зв'язку. Структура, що заміщує амідну групу, зазначена всередині дужок. До інших можливих модифікацій належать N-алкіл (або арил) заміщення ($\psi[\text{CONR}]$), поперечне зв'язування головних ланцюгів для побудови лактамів і інших циклічних структур й інших похідних, включаючи C-кінцеві гідроксиметильні похідні, O-модифіковані похідні і N-кінцеві модифіковані похідні, включаючи заміщені аміди, такі як алкіламіди і гідразиди.

Як використано тут, термін "фармацевтично активна пептидна сполука" стосується пептидної сполуки, що

виявляє фармакологічну активність у її існуючій формі або при перетворенні *in vivo* (тобто, до фармацевтично активних пептидних сполук належать пептидні сполуки з конститутивною фармакологічною активністю і пептидні сполуки у формі "проліків", що мають метаболізуватися або перетворюватися певним чином *in vivo* після введення для того, щоб виявити фармакологічну активність).

Як використано тут, терміни "мультивалентна катіонна пептидна сполука" і "мультивалентна аніонна пептидна сполука" стосується пептидних сполук, що складаються з багаточисельних позитивних або негативних зарядів, відповідно. "Двовалентна катіонна" або "двовалентна аніонна" пептидна сполука стосується пептидної сполуки, що складається з двох позитивних або двох негативних зарядів, відповідно. "Тривалентна катіонна" або "тривалентна аніонна" пептидна сполука стосується пептидної сполуки, що включає три позитивні або три негативні заряди, відповідно.

Як використано тут, термін "аналог LHRH" стосується пептидних сполук, що імітують структуру гормону, який вивільнює лютеїнізуючий гормон. Аналогом LHRH може бути агоніст LHRH або антагоніст LHRH.

Як використано тут, "агоніст LHRH" стосується сполуки, яка стимулює рецептор гормону, що вивільнює лютеїнізуючий гормон (LHRH-R), так, що стимулюється вивільнення лютеїнізуючого гормону, або "антагоніст LHRH", який стосується сполуки, що інгібує LHRH-R так, що інгібується вивільнення лютеїнізуючого гормону. До прикладів агоністів LHRH належать лейпролід (торгова марка: Lupron®; Abbott/TAP), гозерелін (торгова марка: Zoladex®; Zeneca), бузерелін (Hoechst), трипторен (також відомі, як Декапептил, D-Trp-6-LHRH і Дебіофарм®; Ipsen/Beaufour), нафарелін (торгова марка Synarel®, Syntex), лутрелін (Wyeth), цисторелін (Hoechst), гонадорелін (Ayerst) і рістерелін (Ortho).

Як використано тут, термін "антагоніст LHRH" стосується сполуки, що інгібує рецептор гормону, який вивільнює лютеїнізуючий гормон, так, що вивільнення лютеїнізуючого гормону інгібується. До прикладів антагоністів LHRHs належать Антид (Antide), Цетрорелікс (Cetrorelix), сполуки, описані у Патенті США 5,470,947, виданому Folkers et al.; PCT Публікація №WO 89/01944 by Folkers et al.; Патенті США 5,413,990, виданому Naviv; Патенті США 5,300,492, виданому Naviv; Патенті США 5,371,070, виданому Koeber et al.; Патенті США 5,296,468, виданому Hoeger et al.; Патенті США 5,171,835, виданому Janaky et al.; Патенті США 5,003,011, виданому Coe et al.; Патенті США 4,431,635, виданому Coe; Патенті США 4,992,421, виданому De et al.; Патенті США 4,851,385, виданому Roeske; Патенті США 4,801,577, виданому Nestor, Jr. et al.; і Патенті США 4,689,396, виданому Roeske et al., і сполуки, описані у Патенті США №08/480,494, що має назву "Пептиди-антагоністи LHRH" і відповідна їх PCT заявка (PCT Заявка №PCT/US96/09852), також названа "Пептиди-антагоністи LHRH", повний вміст яких спеціально включений сюди шляхом посилання. Особливо краший антагоніст LHRH має структуру:

Ac-D-Nal¹, 4-Cl-D-Phe², D-Pal³, N-Me-Tyr⁵, D-Asn⁶, Lys (iPr)⁸, D-Ala¹⁰-LHRH, що має тут назву, PPI-149.

Як використано тут, термін "макромолекула-носії" стосується макромолекули, що може вступати в комплекс з пептидною сполукою з утворенням водонерозчинного комплексу. Перед утворенням комплексу з пептидною сполукою макромолекула-носії типово є водорозчинною. Краще, якщо макромолекула має молекулярну масу принаймні 5кДа, ще краще 10кДа. Термін "аніонна макромолекула-носії" стосується молекули, що містить негативно заряджені молекули з великою молекулярною масою, такі як аніонні полімери. Термін "катіонна макромолекула-носії" стосується молекули, що містить позитивно заряджені молекули з великою молекулярною масою, такі як катіонні полімери.

Як використано тут, термін "водонерозчинний комплекс" стосується фізично і хімічно стабільного комплексу, що утворюється при певній комбінації пептидної сполуки і макромолекули-носія згідно з процедурами, описаними тут. Цей комплекс типово приймає форму осаду, що утворюється при змішуванні водних препаратів пептидної сполуки і макромолекули-носія. Хоча, немає наміру обмежувати за механізмом, утворення кращих водонерозчинних комплексів винаходу включає в себе (тобто, опосередковується принаймні частково), іонні взаємодії у випадках, де пептидна сполука є катіонною і молекула носія є аніонною, або навпаки. Крім того або як альтернатива, утворення водонерозчинного комплексу винаходу може складатися з (тобто, опосередковується принаймні частково) гідрофобними взаємодіями. Ще утворення водонерозчинного комплексу винаходу може включати (тобто, опосередковується принаймні частково) ковалентні взаємодії. При описі комплексу як "водонерозчинного" варто відмітити, що комплекс не суттєво або легко розчиняється у воді, як зазначено по його осадженню у водних розчинах. Проте, повинно бути зрозумілим, що "водонерозчинний" комплекс винаходу може виявляти обмежену розчинність (тобто, часткову розчинність) у воді *in vitro* або у водному фізіологічному середовищі *in vivo*.

Як використано тут, термін "продовжена доставка" стосується подовженої доставки фармацевтичного агента *in vivo* протягом періоду часу після введення, краще принаймні кількох днів, тижня або кількох тижнів. Продовжена доставка агента може бути показана, наприклад, тривалим терапевтичним впливом агента протягом часу (наприклад, для аналога LHRH, продовжена доставка аналога може бути показана тривалим пригніченням синтезу тестостерону протягом часу). Як альтернатива, продовжена доставка агента може бути показана виявленням присутності агента *in vivo* протягом часу.

Як використано тут, термін "суб'єкт" стосується теплокровних тварин, краще ссавців, ще краще приматів і найкраще людини.

Як використано тут, термін "введення суб'єктові" стосується роздачі, передачі або застосування композиції (наприклад, фармацевтичної композиції) об'єктові будь-яким придатним шляхом для доставки композиції у бажане місце у суб'єкті, включаючи доставку парентеральним або оральним шляхом, внутрішньом'язовою ін'єкцією, підшкірною/внутрішньошкірною ін'єкцією, внутрішньовенною ін'єкцією, введенням у щок, черезшкірною доставкою і введенням ректально, через ободову кишку, вагінально, через носову порожнину або дихальний шлях.

Як використано тут, термін "стані, які можна лікувати аналогом LHRH" стосуються хвороб, розладів й інших станів, у яких введення агоністу LHRH або антагоністу LHRH має бажаний вплив, наприклад, терапевтично корисний вплив. До прикладів станів, що можуть лікуватися аналогом LHRH, належать гормон-залежний рак (включаючи рак простати, рак грудей, рак яєчників, рак матки і рак яєчок), доброякісна

гіпертрофія простати, завчасна статева зрілість, ендометріоз, фібрози матки, безплідність (через запліднення in vitro) та плідність (тобто, використання контрацептивів).

Один аспект цього винаходу стосується фармацевтичної композиції, що складається з водонерозчинного комплексу фармацевтично активної пептидної сполуки і макромолекули-носія. У кращому втіленні, утворення водонерозчинного комплексу опосередковується принаймні частково іонними взаємодіями між фармацевтично активною пептидною молекулою і макромолекулою-носієм. В цих втіленнях фармацевтично активна пептидна сполука є катіонною і макромолекула-носіє є аніонною або фармацевтично активна пептидна сполука є аніонною і макромолекула-носіє є катіонною. У іншому втіленні, утворення водонерозчинного комплексу опосередковується принаймні частково гідрофобними взаємодіями між фармацевтично активною пептидною сполукою і макромолекулою-носієм. У кращому втіленні, пептидна сполука, використана у комплексі, є мультивалентною катіонною пептидною сполукою, такою як двовалентна або тривалентна катіонна пептидна сполука, і макромолекула-носіє є аніонною макромолекулою.

Фармацевтичні композиції винаходу дозволяють пролонговану доставку пептидної сполуки об'єктові in vivo після введення композиції об'єктові, де тривалість пролонгованої доставки може змінюватись залежно від концентрації пептидної сполуки і макромолекули-носія, використаної для утворення комплексу. Наприклад, у одному втіленні, одинична доза водонерозчинного комплексу забезпечує пролонговану доставку пептидної сполуки об'єктові протягом принаймні одного тижня після ведення фармацевтичної композиції об'єктові. У іншому втіленні, одинична доза водонерозчинного комплексу забезпечує пролонговану доставку пептидної сполуки об'єктові протягом принаймні двох тижнів після ведення фармацевтичної композиції об'єктові. У ще іншому одному втіленні, одинична доза водонерозчинного комплексу забезпечує пролонговану доставку пептидної сполуки об'єктові протягом принаймні трьох тижнів після ведення фармацевтичної композиції об'єктові. У ще іншому втіленні, одинична доза водонерозчинного комплексу забезпечує пролонговану доставку пептидної сполуки об'єктові протягом принаймні чотирьох тижнів після ведення фармацевтичної композиції об'єктові. Композиції, що забезпечують пролонговану доставку протягом довшого або коротшого терміну, також належать винаходу, такі як композиції, що забезпечують тривалу доставку протягом 1 дня, 1-7 днів, одного місяця, двох місяців, трьох місяців тощо. Пролонгована доставка пептидної сполуки протягом кількох місяців може бути досягнена, наприклад, повторними щомісячним дозуванням, кожне з яких забезпечує пролонговану доставку пептидної сполуки протягом приблизно одного місяця (див., наприклад, Приклад 14).

Пептидна сполука будь-якого розміру може бути придатною для використання у комплексі протягом часу, коли пептидна сполука має здатність утворювати водонерозчинний нековалентний комплекс з макромолекулою-носієм при комбінації пептидної сполуки і макромолекули-носія. Проте, у певних кращих втіленнях пептидною сполукою є пептид, що є довжиною приблизно від 5 до приблизно 20 амінокислот, від приблизно 8 до приблизно 15 амінокислот або приблизно 8 до приблизно 12 амінокислот. Різноманітні фармацевтично активні пептиди можуть бути використані у композиції, до необмежених прикладів яких належать аналоги LHRH (що обговорюватимуться нижче), аналоги брадікініну, паратиреоїдного гормону, аденокортикотропного гормону (ACTH), кальцитоніну і аналоги вазопресину (наприклад, 1-дезаміно-8-D-аргінін вазопресин (DDAVP)).

Хоча різноманітні макромолекули-носії можуть бути придатними для утворення водонерозчинних комплексів винаходу, кращими макромолекулами є полімери, краще водорозчинні полімери. У кращому втіленні, макромолекула-носіє є аніонним полімером, таким як аніонна похідна багатоатомного спирту або її фрагмент і її солі (наприклад, натрієві солі). До аніонних складових, якими багатоатомний стир може бути дериватизований, належать, наприклад, карбоксилатні, фосфатні або сульфатні групи. Особливо кращим аніонним полімером є аніонна полісахаридна похідна або її фрагмент і її солі (наприклад, натрієві солі). Макромолекула-носіє може містити одини тип молекул (наприклад один тип полімеру) або два чи кілька різних видів молекул (наприклад, суміш двох типів полімерів). До прикладів специфічних аніонних полімерів належать карбоксиметилцелюлоза, альгін, альгінат, аніонні ацетатні полімери, аніонні акрильні полімери, ксантамові смоли, натрій-крохмальний гліколат і фрагменти, похідні і фармацевтично прийнятні її солі, також, як і аніонна похідні карагану, аніонні похідні полігалактуронової кислоти і сульфатовані і сульфоновані похідні полістиролу. Кращим аніонним полімером є натрієва сіль карбоксиметилцелюлози. До прикладів катіонних полімерів належать полі-L-лізин й інші полімери основних амінокислот.

У особливо кращому втіленні винаходу, пептидною сполукою водонерозчинного комплексу є аналог LHRH, наприклад, агоніст LHRH або, ще краще, антагоніст LHRH. Такі аналоги LHRH містять типово 10 амінокислот. До кращих антагоністів LHRH належать антагоністи LHRH, що містять пептидну сполуку, де залишок пептиду, що відповідає амінокислоті у положенні 6 природного LHRH ссавців, містить структуру D-аспарагіну (D-Asn). Як використано тут, термін "структура D-аспарагіну" стосується D-Asn і аналогів, похідних і його імітантів, що зберігають функціональну активність D-Asn. До інших кращих антагоністів LHRH належать антагоністи LHRH, що містять пептидну сполуку, що складаються з структури:

A-B-C-D-E-F-G-H-I-J

де

A це nipo-Glu, Ac-D-Nal, Ac-D-Qal, Ac-Sar, або Ac-D-Pal

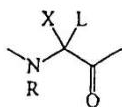
B це His або 4-Cl-D-Phe

C це Trp, D-Pal, D-Nal, L-Nal, D-Pal (N-O), або D-Trp

D це Ser

E це N-Me-Ala, Tyr, N-Me-Tyr, Ser, Lys (iPr), 4-Cl-Phe, His, Asn, Met, Ala, Arg або lie;

F це



де

R і X це, незалежно, H або алкіл; і L містить малу полярну складову;

G це Leu або Trp;

H це Lys (iPr), Gin, Met, або Arg

I це Pro; і

J це Gly-NH₂ або D-Ala-NH₂;

або фармацевтично прийнятну її сіль.

Термін "мала полярна складова" стосується складової, яка має малий стеричний об'єм і є відносно полярною. Полярність вимірюється як гідрофільність по шкалі Р. Коефіцієнт розподілення, Р, між 1-октанолом і водою використовували як посилення для вимірювання гідрофільності сполуки. Гідрофільність може бути виражена як логарифм Р, логарифм коефіцієнта розподілення (Hansch et al., Nature 194:178 (1962); Fujita et al., J. Am. Chem. Soc. 86:5175 (1964)). Були складені стандартні таблиці гідрофільності для багатьох молекул і константи заміщення ліпофільності (гідрофобності) (позначені як π) для багатьох функціональних груп (див. наприклад, Hansch і Leo, "Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology", Wiley, New York, New York, (1979)). Гідрофільність великої кількості гідрофільних складових може бути досить точно передбачена з допомогою цих таблиць. Наприклад, вимірний log Р (октанол/вода) нафталіну складає 3,45. Константа заміщення ρ для -ОН становить -0,67. Таким чином, передбачений log Р для (3-нафтолу складає 3,45+(-0,67)=2,78. Це значення добре передбачений log Р для β-нафтолу дорівнює 3,45+(-0,67)=2,78. Це значення добре узгоджується з вимірним log Р для р-нафтолу, яке складає 2,84. Як використано тут, термін "мала полярна складова" стосується складової, що має log Р між -1 і +2 і стеричний об'єм, що є меншим, ніж стеричний об'єм Trp.

У певних втіленнях, L містить малу полярну складову за умови, що F це не D-Cit, D-Hci або похідна нижчого алкілу D-Cit або D-Hci. Краще, якщо F вибрана з групи, що складається з D-Asn, D-Gln і D-Thr. Ще краще, якщо F це D-Asn. Краще, якщо E це тирозин (Tyr) або N-метил-тирозин (N-Me-Tyr). У особливо кращому втіленні, антагоніст LHRH має наступну структуру:

Ac-D-Nal¹, 4-Cl-D-Phe², D-PaP, N-Me-Tyr⁵, D-Asn⁶, Lys (iPr)⁸, D-Ala¹⁰-LHRH (що має назву тут PPI-149). Особливо кращий комплекс винаходу містить PPI-149 і карбоксиметилцелюлозу.

Окрім водонерозчинного комплексу фармацевтичні композиції винаходу можуть містити додаткові фармацевтично прийнятні носії і/або ексципієнти. Як використано тут, "фармацевтично прийнятний носій" стосується будь-яких і всіх розчинників, дисперсійних середовищ, покриття, антибактеріальних і протигрибкових агентів, ізотонічних агентів і агентів, що затримують поглинання тощо, що є фізіологічно сумісними. Краще, якщо носій придатний для внутрішньовенного, внутрішньом'язового, підшкірного або парентерального введення (наприклад, ін'єкцією). До ексципієнтів належать фармацевтично прийнятні стабілізатори і дезінтегратори.

Окрім фармацевтичних композицій аналогів LHRH, що входять у комплекс з макромолекулою-носієм, винахід також стосується упакованих композицій, що містять такі комплекси, і шприців, що містять такі комплекси. Наприклад, винахід пропонує упаковані композиції для лікування суб'єкта із станом, який можна лікувати аналогом LHRH, що складаються з водонерозчинного комплексу аналога LHRH (краще PPI-149) і макромолекули-носія (краще карбоксиметилцелюлози), упаковані з інструкціями для використання водонерозчинного комплексу для лікування суб'єкта із станом, що може лікуватися аналогом LHRH. У іншому втіленні, винахід пропонує шприц, що містить водонерозчинний комплекс аналога LHRH (краще PPI-149) і макромолекули-носія (краще, карбоксиметилцелюлози).

Комплекс винаходу одержують змішуванням пептидної сполуки і макромолекули-носія за умови, що утворюватиметься водонерозчинний комплекс пептидної сполуки і макромолекули-носія. Таким чином, інший аспект винаходу стосується методів одержання фармацевтичної композиції. У одному втіленні, спосіб складається з:

- постачання пептидної сполуки і макромолекули-носія;

- змішування пептидної сполуки і макромолекули-носія за умов, що утворюватиметься водонерозчинний комплекс пептидної сполуки і макромолекули-носія; і

- одержання фармацевтичної композиції, що складається з водонерозчинного комплексу. Наприклад, розчин пептидної сполуки і розчин макромолекули-носія змішують доки не осаджується у розчині водонерозчинний комплекс пептидної сполуки і макромолекули-носія. У певних втіленнях, розчини пептидної сполуки і макромолекули-носія є водними розчинами. Як альтернатива, якщо пептидна сполука або молекула носія (або обидва) є не суттєво водорозчинними перед змішуванням обох, тоді пептидну сполуку і/або макромолекулу-носія можна розчинити у водозмішувачому розчиннику, такому як спирт (наприклад, етанол) перед змішуванням двох компонентів комплексу. У іншому втіленні методу одержання водонерозчинного комплексу, розчин пептидної сполуки і розчин макромолекули-носія змішують і нагрівають доки водонерозчинний комплекс пептидної сполуки і макромолекули-носія не випаде в осад в розчині. Кількість пептидної сполуки і макромолекули-носія, необхідна для досягнення водонерозчинного комплексу, може змінюватись залежно від певної використовуваної пептидної сполуки і макромолекули-носія, певного використовуваного розчинника(ів) і/або процедури досягнення комплексу. Типовим є те, що пептидна сполука буде у надлишку стосовно макромолекули-носія у молярному співвідношенні. Часто пептидна сполука також може бути у надлишку по масі, як показано у Прикладах. У певних втіленнях, макромолекулу-носія, краще натрій карбоксиметилцелюлозу, і пептидну сполуку, краще PPI-149, змішують при співвідношенні 0,2:1 (по

масі) макромолекула-носії:пептидна сполука. У різних інших втіленнях, відношення макромолекули-носія до пептидної сполуки (по масі) може бути, наприклад, 0,5:1, 0,4:1, 0,3:1, 0,25:1, 0,15:1 або 0,1:1. Не обмежуючі приклади станів і методів одержання водонерозчинного комплексу винаходу описані далі у Прикладах 1 -5 і 8-9.

Як тільки комплекс пептидна сполука/макромолекула випадає в осад в розчині, осад може бути видалений з розчину способами, відомими у галузі. Такими як фільтрація (наприклад, через найлонну мембрану з отворами розміром 0,45мкм), центрифугування тощо. Виділену пасту тоді можна висушити (наприклад, у вакуумі або у сушильній шафі при температурі 70 C) і тверду речовину можна подрібнити або розтерти до порошка способами, відомими у галузі (наприклад, молотком або подрібнювачем, або перетиранням у ступці з пестиком). Після перетирання або розтирання, порошок може бути просіяний через сито (краще 90мкм сито) для одержання рівномірного розподілу часток. Крім того, виділену пасту можна заморозити і ліофілізувати до сухої речовини. Порошкоподібна форма комплексу може бути диспергована у розчині-носії з утворенням рідкої суспензії або напівтвердої дисперсії, придатної для ін'єкції. Таким чином, у різноманітних втіленнях, фармацевтична композиція винаходу є сухою твердою речовиною, рідкою суспензією або напівтвердою дисперсією. До прикладів рідких носіїв, придатних для використання у рідких суспензіях, належать розчини солей, розчини гліцерину і розчини лецитину.

У іншому втіленні, фармацевтична композиція винаходу є стерильною композицією. Наприклад, після утворення водонерозчинного комплексу, комплекс може бути стерилізований, оптимально у-опроміненням або р-опроміненням. Таким чином, спосіб винаходу для одержання фармацевтичної композиції, описаної вище, може надалі складатися зі стерилізації водонерозчинного комплексу у-опроміненням або опроміненням пучком електронів. Краще, якщо композицію стерилізують у-випроміненням, використовуючи дозу у-опромінення принаймні 15KGu. У інших втіленнях, композицію стерилізують у-опроміненням, використовуючи дозу у-опромінення принаймні 19KGu або принаймні 24KGu. Як показано у Прикладі 11, композиції винаходу залишаються прийнятно стабільними при у-опроміненні.

Як альтернатива, для одержання стерильної фармацевтичної композиції, водонерозчинний комплекс може бути виділений, використовуючи загальноприйняті стерильні технології (наприклад, використовуючи стерильні вихідні матеріали і проводячи процес одержання асептично). Таким чином, у іншому втіленні способу одержання фармацевтичної композиції, описаної вище, водонерозчинний комплекс утворюється, використовуючи асептичні процедури.

Способи утворення водонерозчинного комплексу винаходу описані далі у Прикладах 1-5 і 8-9. Фармацевтичні композиції, включаючи порошки, рідкі суспензії, напівтверді дисперсії, сухі тверді речовини (наприклад ліофілізовані тверді речовини), і їх стерилізовані форми (наприклад, у-опроміненням), одержані згідно зі способами винаходу, також належать цьому винаходу.

Ще інший аспект винаходу стосується способів використання фармацевтичних композицій згідно з винаходом для лікування суб'єкта, що страждає від стану, який лікується фармацевтично активною

пептидною сполукою, що знаходиться у водонерозчинному комплексі. Таким чином, у кращому втіленні винахід пропонує спосіб лікування суб'єкта від стану, що може лікуватися аналогом LHRH, який складається з введення об'єктові фармацевтичної композиції, що складається з водонерозчинного комплексу аналога LHRH і макромолекули-носія.

Фармацевтична композиція може бути введена об'єктові будь-яким шляхом, придатним для досягнення бажаного терапевтичного результату(тів), хоча кращими шляхами введення є парентеральні шляхи, зокрема, внутрішньом'язова (і.т.) ін'єкція і підшкірна/внутрішньошкірна (s.c./i.d.) ін'єкція. Як альтернатива, композиція може бути введена об'єктові орально. Іншими придатними парентеральними шляхами служать внутрішньовенна ін'єкція, введення в шок, черезшкірна доставка і введення ректально, вагінально, в носову порожнину або через дихальний шлях. Варто відмітити, що коли композиція, що забезпечує пролонговану доставку протягом від тижнів до місяців і.т або s.c./i.d. шляхом, вводиться іншим шляхом, пролонгована доставка агента протягом еквівалентного проміжку часу може не відбуватися завдяки очищенню агента іншим фізіологічними механізмами (тобто, дозована форма може бути усунена з місця доставки так, що тривалий терапевтичний вплив не спостерігається протягом часу, за який спостерігається дія при і.т або s.c./i.d. ін'єкції).

Фармацевтична композиція містить терапевтично ефективну кількість аналога LHRH. "Терапевтично ефективна кількість" стосується кількості, ефективною при дозах і протягом періодів часу, необхідного, для досягнення бажаного результату. Терапевтично ефективна кількість аналога LHRH може змінюватись згідно з факторами, такими як стадія хвороби, вік і вага особи, і здатність аналога LHRH (одного або разом з одними або кількома іншими ліками) виявляти бажану відповідь у особи. Режим дозування може бути пристосований для впровадження оптимальної терапевтичної відповіді. Терапевтично ефективною кількістю є також та, у якій на будь-який токсичний або шкідливий вплив антагоністу можна не зважати у порівнянні з терапевтично корисним впливом. Не обмежений діапазон терапевтично ефективною кількістю аналога LHRH є від 0,01 до 10мг/кг. Кращою дозою аналога LHRH PPI-149 для тривалого зменшення кількості тестостерону плазми протягом 28 днів становить приблизно 0,1-10мг/кг, ще краще 0,3-1,2мг/кг (виражена як вільний пептид) у об'ємі рідкої суспензії приблизно 1мл або менше. Варто зазначити, що значення доз можуть змінюватись з тяжкістю стану, який потрібно полегшати. Також зрозуміло, що для будь-якого певного суб'єкта, специфічний режим дозування повинен бути пристосований протягом часу згідно з особистою потребою і професійним судженням особи, яка вводить або наглядає за введенням композицій, і що діапазон доз викладений тут лише для прикладу і не намагатиметься обмежити об'єм або застосування композиції, що заявляється.

Спосіб лікування винаходу може бути застосований для лікування різноманітних станів, хвороб і розладів, при яких введення аналога LHRH має бажаний клінічний ефект. До прикладів хвороб і розладів належать гормон-залежний рак, такий як рак простати, рак грудей, рак яєчників, рак матки і рак яєчка, доброякісна гіпертрофія простати, завчасна статева зрілість, ендометріоз і фібрози матки. Таким чином, винахід пропонує способи лікування цих хвороб і розладів введенням фармацевтичної композиції винаходу. Крім того, аналоги LHRH можуть бути використані для зміни плідності. Таким чином, способи винаходу також можуть бути

використані для запліднення *in vitro* і як контрацептиви.

У особливо кращому втіленні, спосіб використовується для лікування раку простати, аналог LHRH, використовуваний у композиції є антагоністом LHRH, найкраще PPI-149, і спосіб передбачає пролонговану доставку аналога LHRH *in vivo* протягом принаймні чотирьох тижнів після введення внутрішньом'язово або підшкірно. Аналог LHRH, краще PPI-149, одержаний з винаходом, може бути використаний для інгібування росту клітин раку простати введенням аналога LHRH об'єктові, що страждає від раку простати. Крім того, антагоніст LHRH, краще PPI-149, одержаний з винаходом, може бути використаний для інгібування підвищення кількості тестостерону, що супроводжується використанням агоністу LHRH, попереднім введенням антагоністу LHRH, краще PPI-149, об'єктові, що страждає від раку простати, перед початком терапії агоністом LHRH. Способи інгібування викликаного агоністом LHRH підвищення кількості тестостерону, й інші способи лікування раку простати, використовуючи антагоніст LHRH, - до якого композиції цього винаходу можуть бути застосовані, описані далі у заявці на видачу патенту США 08/573,109. Під назвою "Methods for Treatment Prostate, Using LHRH Antagonists", поданою 15 грудня 1995, і часткове продовження в патентній заявці. 08/755.593, також названою "Methods for Treatment Prostate, Using LHRH Antagonists", поданою 25 Листопада, 1996, зміст яких включений у опублікованій РСТ заявці WO 97/22357. Повний зміст заявок США і опублікованої РСТ заявки спеціально включені сюди шляхом посилання.

Специфічні способи одержання комплексу фармацевтично активної пептидної сполуки з макромолекулою-носієм викладено у Прикладах 1-5 і 8-9 нижче. Також описані результати тестів, що показують, що комплекс, який містить антагоніст LHRH, може надавати тривалу доставку фармацевтично активного пептиду *in vivo* (Приклад 6) і може інгібувати викликане агоністом LHRH підвищення кількості тестостерону (Приклад 7). Наступні приклади, які далі ілюструють винахід, не повинні вважатися як обмежуючі. Зміст всіх посилань, патентів і опублікованих патентних заявок, цитованих у цій заявці, включені сюди шляхом посилання.

Приклад 1

100мл розчину антагоністу LHRH PPI-149 одержували розчиненням 6,25мг/мл PPI-149 у воді. Однаковий зразок (100мл мінімум) USP натрійкарбоксиметилцелюлози (СМС) (низького ступеню в'язкості, Hercules Chemical Co.) готували при 0,125% вага/об'єм і перемішували доки вона не розчинялася. Однакові порції PPI-149 і СМС розчинів перемішували (при відношенні СМС:пептид 0,2:1 (по масі)) і одержували тверду речовину. Тверду речовину перемішували протягом ночі і тоді збирали фільтрацією через найлоновий фільтр з розміром отворів 0,45мкм. Аналіз HPLC розчину фільтрату показав, що принаймні 95% PPI-149 сполуки перетворилося на твердий комплекс, після чого її видаляли з розчину. Виділену білу пасту промивали двічі водою, після чого переносили до пляшечки і висушували у вакуумі. Після висушування протягом 72 годин одержували 633мг білого порошку. Тверду речовину тоді перетирали у ступці з пестиком. Елементний аналіз виявив 57% пептиду у комплексі.

Приклад 2

Розчиняли 25мг PPI-149 у 1мл води. До цього додавали 1мл 0,5% розчину карбоксиметилцелюлози. Суміш утворювала шовковисту білу тверду речовину при перемішуванні. Суміш нагрівали при дефлегмації протягом п'яти хвилин і утворювався білий осад у вигляді пластівців. Цей матеріал виділяли центрифугуванням/фільтрацією. Тверду речовину ресуспендували у воді і збирали повторним центрифугуванням. Аналіз HPLC фільтрату розчину показав, що принаймні 90% PPI-149 сполуки перетворилося на твердий комплекс. Білий осад висушували у вакуумі і тверду речовину подрібнювали у ступці з пестиком. Елементний аналіз показав 77% пептиду у комплексі.

Приклад 3

50мг PPI-149 розчиняли у 2мл 5% манітолу і перемішували з 2мл 0,5% карбоксиметилцелюлози (низька в'язкість, USP, Spectrum Quality Chemicals). Суміш перемішували і відразу ж одержували білий осад. Суспензію заморожували і ліофілізували до сухого стану для одержання комплексу з пролонгованою доставкою PPI-149.

Приклад 4

25мг PPI-149 розчиняли у 1мл води. До цього додавали 1мл 0,5% альгілату натрію. USP (Spectrum). Суміш відразу ж після перемішування утворювала білий осад. Цей матеріал виділяли центрифугуванням/фільтрацією. Тверду речовину ресуспендували у воді і збирали повторним центрифугуванням. Білий осад висушували у вакуумі. Проводили елементний аналіз, який показав вміст пептиду 66%.

Приклад 5

25мг PPI-149 розчиняли у 1мл води. Аміак додавали для встановлення рН 11,0. До цього додавали 1мл 0,5% альгінової кислоти, USP (Spectrum). Суміш відразу ж утворювала білий осад при перемішуванні. Цей матеріал виділяли центрифугуванням/декантацією. Тверду речовину ресуспендували у воді і збирали повторним центрифугуванням. Білий осад висушували у вакуумі. Проводили елементний аналіз, який показав вміст пептиду 79%.

Приклад 6

Водонерозчинний комплекс антагоністу LHRH PPI-149 і карбоксиметилцелюлози одержували згідно з попередніми прикладами.

Одержували суспензію PPI-149/СМС комплексу і одиничну дозу вводили внутрішньом'язово щуром і собакам. Доза для щурів складала 50мг/кг/день x 60 днів і доза для собак складала 40мг/кг/день x 28 днів. Кількість тестостерону плазми (у нг/мл) визначали через різні проміжки часу як вимірювання активності антагоністу LHRH у тварин. Результати, наведені у графіку Fig.1, показують, що внутрішньом'язова ін'єкція PPI-149/СМС комплексу веде до тривалого зменшення кількості тестостерону плазми протягом принаймні 42 днів у щурів і принаймні 28 днів у собак (показано білими прямокутниками у Fig.1), показуючи пролонговану доставку антагоністу LHRH. У тварин також визначали кількість PPI-149 (у нг/мл) плазми (показано чорними прямокутниками у Fig.1). Початковий пік PPI-149 спостерігали протягом приблизно перших восьми днів, після чого PPI-149 не можна було визначити в плазмі. Незважаючи на нездатність визначити PPI-149 в плазмі після

приблизно 8 дня, результати кількості тестостерону показують, що PPI-149 був ще терапевтично активним in vivo протягом експерименту.

Приклад 7

Водонерозчинний комплекс антагоністу LHRH PPI-149 і карбоксиметилцелюлози одержували згідно з попередніми прикладами. Одержували суспензії PPI-149/CMC комплексу і одиничну дозу вводили внутрішньом'язово щурам на день 0. На день 30 щурам вводили агоніст LHRH Lupron™ (лейпролід). Кількість тестостерону плазми (у нг/мл; показано білими прямокутниками у Фіг.2) визначали через різні проміжки часу як вимірювання активності антагоністу LHRH у тварин. У тварин також визначали кількість PPI-149 плазми (у нг/мл) (показано чорними прямокутниками на Фіг.2). Результати, представлені на графіку на Фіг.2, показують, що попереднє лікування PPI-149/CMC комплексом швидко зменшує тестостерон плазми до мінімального рівня і, крім того, блокує викликане агоністом LHRH підвищення кількості тестостерону. Незважаючи на нездатність визначити PPI-149 в плазмі після приблизно 8 дня, результати визначення кількості тестостерону показують, що PPI-149 був ще терапевтично активним in vivo протягом експерименту.

Приклад 8

У цьому прикладі нерозчинний комплекс утворювався між аналогом LHRH PP1-258 і карбоксиметилцелюлозою (CMC). PPI-258 має структуру: ацетил-D-нафталілаланіл-D-4-Cl-фенілаланіл-D-піридилаланіл-L-серил-L-тирозил-D-аспарагініл-L-лейцил-L-N^{ізо}пропіл-лізил-L-пропіл-D-аланіл-амід. Для одержання депо PPI-258/CMC додавали 174,8мг (148,6мг чистого) PP1-258 до 29,72мл води і матеріал перемішували для суспендування і розчинення пептиду. До цього перемішаного розчину додавали 1,85мл 2% розчину натрій-СМС (Hercules). Відразу ж спостерігали утворення твердого осаду. Після нагрівання при дефлегмації суспензія стала напівпрозорою, а потім перетворилася на білий осад. Після 5-ти хвилинної дефлегмації суміш охолоджували і тверду речовину виділяли центрифугуванням. Тверду речовину промивали водою і висушували у вакуумі протягом ночі. Висушений порошок подрібнювали у ступці з пестиком і просівали через сито з нержавіючої сталі з розміром отворів 90мкм. Просіяний порошок (90мкм сито) збирали і аналізували. Загальний вихід становив 198,4мг висушеної твердої речовини, яка дала 110,8мг порошку з певним розміром часток після етапу перемелювання. Аналіз показав наступний композиційний склад комплексу: пептид PPI-258-80%, СМС - 18,8%, вода - 6,6%.

Приклад 9

У цьому прикладі, нерозчинний комплекс утворювався між аналогом LHRH Cetorelix™ (також відомий як SB-75) і карбоксиметилцелюлозою (CMC), Cetorelix™ мав структуру: ацетил-D-нафталілаланіл-D-4-Cl-фенілаланіл-D-піридилаланіл-L-серил-L-тирозил-D-цитруліл-L-лейцил-L-аргініл-L-пропіл-D-аланіл-амід. Для одержання депо Ceіorehх/CMC 102,8мг (87мг чистого) Cetorelix™ додавали до 17,4мл води і матеріал перемішували для суспендування і розчинення пептиду. До цього перемішаного розчину додавали 1,1мл 2% розчину натрій-СМС (Hercules). Відразу ж спостерігали утворення комкуватого білого осаду. Суспензію нагрівали при дефлегмації протягом 5 хвилин і охолоджували для одержання твердого білого осаду. Тверду речовину виділяли центрифугуванням, промивали водою і висушували у вакуумі протягом ночі. Висушений порошок подрібнювали у ступці з пестиком і просівали через 90мкм сито із нержавіючої сталі. Порошок збирали і характеризували. Загальний вихід складав 95мг висушеної твердої речовини, яка дала 60мг порошку з частками певного розміру після етапу перемелювання. Аналіз показав наступний композиційний склад комплексу: пептид Cetorelix™ - 75%, СМС - 20,7%, води - 6,5%

Приклад 10

У цьому прикладі пролонговане вивільнення трьох різних аналогів LHRH, PPI-149, PPI-258 і Cetorelix™, одержаних як депоновані композиції СМС, як описано в трьох попередніх прикладах, перевіряли in vivo. Перевіряли три різні носії композиції - сольовий розчин, гліцерин (15% гліцерин/4% декстроза) і лецитин. Використовували щурів лінії Sprague-Dawley (25 самців, ваговим діапазоном 300-325г) і вимірювали ефективність аналогу LHRH, основуючись на зменшенні кількості тестостерону плазми.

Дози і шляхи введення були наступними:

Група	Сполука	Доза (мг/кг)	Доза (мкг/кг/день)	Доза (мг/щура)	Носій	Шлях введення
A	PPI-149	9	300	2,7	Сольовий Розчин	ІМ
B	PPI-149	9	300	2,7	Гліцерин	ІМ
C	PPI-149	9	300	2,7	Гліцерин	SC
D	PPI-149	9	300	2,7	Лецитин	ІМ
E	PP1-258	9	300	2,7	Сольов. Р-н	ІМ
F	Cetorelix™	9	300	2,7	Сольов. Р-н	ІМ

Реальна доза пептиду була 300мкг/кг/день протягом 30днів, що складало 2,7мг/щура, введених як одинична доза в об'ємі 200мкл внутрішньом'язово (ІМ) або підшкірно (SC). Загальний об'єм, потрібний для ін'єкції 5 щурів/групу, складав 1,3мл при концентрації 13,5мг/мл активного пептиду. Об'єм ін'єкції залишали постійним і масу порошка підбирали під загальний вміст пептиду:

Група	Необхід. об'єм мл	Необхідн. масамг порошку	Використ. масамг порошку	Використ. об'єм мл
A	1,3	22,5	29,5	1,7мл сол. р-н
B, C	2,6	45	71,1	4,1мл гліцерин/декстроза
D	1,3	22,5	35,2	2,03мл 0,5% лецитин/манітол
E	1,3	22,5	31	1,79мл сол. р-н
F	1,3	22,5	20,9	1,21мл сол. р-н

Була зроблена одинична 200мкл внутрішньом'язова або підшкірна ін'єкція тестової речовини у верхній бік лівої задньої кінцівки або під шкіру між лопатками, відповідно, на день 0 під наркозом.

Для визначення кількості тестостерону плазми приблизно 0,4мл крові видаляли з ретро-очном'язового синусу на день 1 після введення дози і на дні 3, 7, 14, 21, 28 і 35. З крові виділяли плазму і заморожували на сухому льоді для визначення кількості тестостерону плазми стандартними способами.

Результати, наведені на Фіг.3А-3С, показують, що кількість тестостерону плазми у щурів-самців лінії Sprague-Dawley була зменшена і підтримувалась на низькому рівні протягом принаймні 28 днів і 50 днів у відповідь на пролонговане вивільнення аналогу LHRH PPI-149, PPI-258 і Centrolix™, одержаного як депонована композиція СМС (показано у Фіг.3А, 3В і 3С, відповідно). Ці результати свідчать, що всі три композиції є ефективними у зменшенні рівнів тестостерону в плазмі *in vivo* і підтриманні зменшених рівнів тестостерону в плазмі протягом тривалого часу.

Приклад 11

У цьому прикладі PPI-149-СМС композиції піддавали у-опроміненню з метою стерилізації, після чого перевіряли фізичні і хімічні властивості опроміненої композиції. Дані, описані нижче, свідчать, що у-опромінення являє собою придатний засіб стерилізації депо PPI-149-СМС.

Стабільність пептиду

Приблизно 40мг кожного з двох окремих PPI-149-СМС партій пакували окремо (із вільним місцем над пробкою) у скляні пляшки Типу 1, запечатані гумовими пробками і алюмінієвою фольгою. Пляшки піддавали різноманітним номінальним дозам у-опромінення. Двоє пляшок аналізували на пептидну чистоту (виражену у %) на кожному рівні у-опромінення для кожної з двох партій. Результати показали, що при дозах у-опромінення 24KGu і менших, PPI-149-СМС постійно виявляв менше, ніж 2% зменшення пептидної чистоти (як визначено профілем домішок HPLC). Друге дослідження, в якому використовували вищі дози у-опромінення, проводили на додатковій лабораторній партії PPI-149-СМС. PPI-149-СМС виявила значно кращу хімічну стабільність при у-опроміненні високими дозами.

Були проведені наступні дослідження для порівняння профілю деградації, одержаного після у-опромінення PPI-149-СМС, з партією, що одержували після автоклавування PPI-149 розчину для ін'єкцій (1мг/мл). Готували два зразки: а) PPI-149-СМС, що піддавали 19KGu у-опроміненню; б) PPI-149 розчин (1мг/мл), що піддавали обробці в автоклаві (12ГС/20 хвилин). HPLC хроматограми двох зразків показали, що деградація обох зразків якісно однакова (однаковий відносний час затримки головних піків).

Стабільність при зберіганні після у-опромінення

Дослідження стабільності при зберіганні попередньо одержаної композиції також виконували на пляшках після у-опромінення. Закупорені пляшки двох лабораторних партій PPI-149-СМС піддавали 19KGu у-опроміненню і зберігали при 25 С, 37 С і 50 С до одного місяця. Дані про хімічну стабільність у цих дослідженнях попередньо одержаних композицій свідчать, що у-опромінення в дозі 19KGu з наступним зберіганням в стресових умовах не призвели до значної хімічної нестабільності навіть у високостресових умовах зберігання (наприклад, протягом 1 тижня при 50 С). Дані свідчать, що у-опромінення в дозах 19KGu і менших, зберігання PPI-149-СМС протягом до 28 днів при або нижче 50°С, постійно виявляло менше, ніж 2% зменшення у чистоті пептиду (як було визначено за допомогою HPLC). Незважаючи на очевидну різницю у початковому вмісті вологи між двома досліджуваними партіями, ніякої значної різниці у чистоті пептиду не було виявлено у зразках на стабільність попередньо одержаної композиції або тих, що зберігалися протягом місяця.

Аналіз розміру часток PPI-149-СМС

Був розроблений спосіб визначення розміру часток з використанням розсіювання лазерного променя, що застосовували при дослідженні розміру часток PPI-149-СМС. Для опису використання способу, представлений експеримент попередньо одержаної композиції, який виконували для виявлення впливу у-опромінення на розмір часток PPI-149-СМС. Цей експеримент задумували з попереднім розумінням, що аморфні тверді речовини можуть бути сприйнятливими до злипання часток при зберіганні. Два зразки лабораторної партії PPI-149-СМС запаковували у скляні пляшки типу I, закривали сірими бутиловими гумовими кришками і закупорювали алюмінієвою фольгою. Вимірювання розміру часток виконували перед і після піддаванням дозі у-опромінення 15,5KGu. Вимірювання розміру часток виконували по розсіюванню лазерного променя (використовуючи Malvern Mastersizer S™, оздобленого зворотними лінзами). 20мг зразків для аналізу розміру часток розсіюванням лазерного променя диспергували у приблизно 0,5мл деіонізованої води енергійним струшуванням, тоді обробляли ультразвуком у камері при температурі навколишнього середовища протягом 5 хвилин. Після визначення фону виконували експеримент. Дослідну дисперсію додавали краплями до ємності з тривалим заповненням (приблизно з номінальним об'ємом 60мл), доки не одержували приблизно 20% мутності. Швидкість обертів міксера утримували при 2700обертах/хв протягом експерименту (плюс перевірка фону). При цій швидкості не утворювалось ніяких бульбашок внаслідок перемішування, але підтримували рівномірну стабільну дисперсію. Виконували вісім випробувань, аналіз одержаних даних показав стандартне відхилення <0,03%, як максимум в будь-якій одержаній точці. Коли дослідну дисперсію утримували в камері протягом 15 хвилин і тоді знову проводили дослідження, ніяких значних змін не відбувалось, що вказувало на відсутність розкладання часток протягом експерименту.

Зразки аналізували, використовуючи експериментальні параметри, наведені вище. Виконували вісім вимірювань і визначали середній розмір часток. Було виявлено розподілення часток на два розміри, і всі частки мали чітку верхню границю розміру, що вказувало на відсутність агрегації часток. Одна партія PPI-149-СМС мала явно нижчий середній діаметр часток перед у-опроміненням, ніж після у-опромінення. Це дослідження попередньо одержаної композиції вказує на деяке злипання часток, що відбувається при процесі стерилізації.

Приклад 12

У цьому прикладі виконували різні експерименти з попередньо одержаною композицією для вивчення

впливу γ -опромінення і стресу температура/вологість на твердий стан речовини PPI-149-CMC.

Дифракція рентгенівських променів на порошку

У початковому експерименті два 60мг зразки PPI-149-CMC пакували (з вільним повітрям над зразком) у скляні пляшки типу I, закривали сірими бутиловими гумовими пробками і закупорювали алюмінієвою фольгою. Один зразок піддавали дозі γ -опромінення 19,0KGu. Тверду форму двох 60мг зразків вивчали дифракцією рентгенівських променів порошком.

Порівнювали дифрактограми, одержані перед і після піддавання дозі γ -опромінення 19,0KGu.

У наступному дослідженні 60мг зразку PPI-149-CMC (після γ -опромінення) розміщували у скляних пляшках типу I і переносили у попередньо врівноважений інкубатор з постійною вологою при 50 C/75% відносної вологості, де витримували протягом 5 днів. Відразу ж після виймання з інкубатору контейнер зі зразком закривали сірою бутиловою гумовою пробкою і закупорювали алюмінієвою фольгою. Дифрактограму рентгенівського опромінення цього зразку порівнювали з іншим зразком тієї самої партії, що утримували при кімнатній температурі у закритому контейнері. Зразки аналізували, використовуючи Siemens D500 автоматизований дифрактометр порошку, оснащений графітовим монохроматором і Cu ($\lambda=1,54$) джерелом рентгенівських променів при 50kV, 40mA. Два- θ діапазон сканування складав 4-40°, використовуючи покрокове скануюче віконце 0,0571,2 секунди на крок. Щілини для променю виставляли на №(1) 1°, (2) 1°, (3) 1°, (4) 0,15° і (5) 0,15° шириною. Два- θ калібровку виконували, використовуючи NBS стандарт слюди (SRM 675). Зразки аналізували, використовуючи пластинку-зразок з нульовим фоном.

Дані показали, що перед γ -опроміненням PPI-149-CMC не мало ніякої кристалічної або псевдо-кристалічної структури. Насправді, аналіз дифракції рентгенівських променів зразку показав її як тверду речовину (широкий максимум між 2-20°, без значних піків у дифрактограмі). PPI-149-CMC зразок після опромінення виявив однакову дифракційну картину з неопроміненим зразком, вказуючи, що процес γ -опромінення (в дозах 19KGu і менше), очевидно, не викликає поліморфних переміщень у твердому стані всередині матеріалу. Таким же чином, зразок PPI-149-CMC, що перевірявся на стрес температура/вологість, виявив дуже схожу дифракційну картину як з неопроміненим, так і опроміненим зразками, що припускає, що PPI-149-CMC не схильний до утворення поліморфних переміщень в твердому стані всередині матеріалу.

Гігроскопічність

Виконували дослідження попередньо одержаної композиції PPI-149-CMC (після опромінення) по визначенню врівноваженого поглинання води (виміряне по приросту ваги води) при постійній температурі (25 C) за різних умов відносної вологості. Аналіз врівноваженої вологості (% води) як функцію відносної вологості (% RH) показав, що вміст води поступово підвищувався до приблизно 80% відносної вологості. При відносно високій вологості (95% RH) PPI-149-CMC був здатний до значного поглинання води. При відносній вологості при 80% RH або нижче значні застереження у термінах захисту від води не вважаються за необхідні; таким чином, можуть бути застосовані певні етапи одержання за умов вологості оточуючого середовища (уникаючи високої вологості).

Приклад 13

У цьому прикладі проводили дослідження розчинення PPI-149-CMC. Експерименти виконували, використовуючи умови занурення і не занурення. PPI-149-CMC має приблизну розчинність 100мг/мл (виміряно як вільний пептид) при 25 C у 0,1М фосфатному буфері при pH7,3. В умовах занурення (визначено як <10% розчинності насичення у системі при даній температурі), навіть у відсутність перемішування PPI-149-CMC розчинявся швидко (виміряно і виражено як вільний пептид). У такому ж експерименті, рівноважну розчинність PPI-149-CMC визначали (виміряно і виражено як вільний пептид) при 25 C у 0,1М фосфатному буфері при pH7,3, використовуючи три зразки: PPI-149-CMC один, PPI-149-CMC у присутності 10% додаткової кількості (за вагою) PPI-149 (виражено як вільний пептид, але введено як PPI-149 з приєднаним ацетатом) і PPI-149-CMC у присутності 50% додаткової кількості (за вагою) натрій-карбоксиметилцелюлози USP. Всі три зразки виявили близьку рівноважну розчинність пептиду. Оскільки вибрана буферна система близька до фізіологічних умов, присутність додаткової вільної карбоксиметилцелюлози або пептидів, присутніх у PPI-149-CMC, навряд чи впливатиме на розчинність.

Приклад 14

У цьому прикладі на собаках перевіряли фармакокінетику, фармакодинаміку і безпеку повторної підшкірних (SC) і внутрішньом'язових (IM) доз PPI-149-CMC.

У першому дослідженні, що проводили протягом трьох місяців, використовували сорок самців гончих собак, застосовуючи щомісячні IM або SC ін'єкції PPI-149-CMC при 1,2мг/кг (День 1), 0,3 або 0,6мг/кг (День 29) і 1,2мг/кг (День 57) у різноманітних носіях, що відновлюють вміст води. Для дослідження: застосовували вісім груп по п'ять собак.

Група	N	Відновлюючий вологу носій ^{a,b}			Доза (мг/кг)"			Шлях введення
		День 1	День 29	День 57	День 1	День 29	День 57	
A ^d	5	Сол.роз.	Гліцерин	Лецитин	0	0	0	IM
B	5	Гліцерин	Гліцерин	Лецитин	1,2	0,3	1,2	IM
C	5	Гліцерин	Гліцерин	Лецитин	1,2	0,6	1,2	IM
D	5	PEG	Гліцерин	Лецитин	1,2	0,3	1,2	IM
E	5	PEG	Гліцерин	Лецитин	1,2	0,3	1,2	SC
Fd ^d	5	Лецитин	Гліцерин	Лецитин	1,2	0,6	1,2	IM
Gd ^d	5	Лецитин	Гліцерин	Лецитин	1,2	0,6	•1,2	SC
H	5	Гліцерин	Гліцерин	Лецитин	1,2	0,3	1,2	SC

a. носії, що відновлюють вміст води використовуються для відновлення PPI-149-CMC як певної

суспензії. Вони мають наступний вміст (у воді):

1. Гліцерин = 15% гліцерин/5% декстроза
2. PEG = 4% поліетиленгліколь - 3350/4% манітол
3. Лецитин = 0,5% лецитин/5% манітол

b. примітка: носії, що відновлюють вміст вологи, які мають використовуватись у клінічних дослідженнях, це 0,9% хлорид натрію USP.

c. всі дози виражені у складових вмісту пептиду (PPI-149).

d. три тварини забивали на 85 день для повної анатомічної і мікроскопічної гістології.

Це дослідження було розроблене так, щоб вимірювати ефективність PPI-149-CMC у початкових дозах у різних носіях протягом першого місяця лікування. Протягом другого місяця дослідження собаки одержували менші дози PPI-149-CMC у спробах визначити ефективне "утримання" дози. На третьому місяці вимірювали довгострокову безпеку і характеристики ефективності PPI-149-CMC.

ІМ або SC дози PPI-149-CMC, складені у одному з відновлюючих носіїв, або ІМ дози контрольної речовини вводили кожного дня у верхній бік правої задньої кінцівки (ІМ) або у ділянку між лопатками (SC). Матеріал засмоктували у туберкуліновий шприц ємністю 1 см³ з короткою конусною голкою, вагою 23г. Місце введення протирали тампоном із спиртом безпосередньо перед введенням. Об'єм ін'єкції ґрунтувався на величині специфічної дози пептиду/кг маси тіла. Варто відмітити, що всі дози стосуються кількості введеного пептиду PPI-149.

Кожну тварину спостерігали принаймні двічі на день протягом повного терміну дослідження на наявні ознаки токсичного або фармакологічного впливу і змін у загальній поведінці і вигляді. Всі ненормальні клінічні спостереження записувались.

Кров збирали перед введенням першої дози і в різні проміжки часу після введення дози для повного підрахунку кров'яних тілець (CBC), хімічного аналізу сироватки і визначення PPI-149 і концентрації тестостерону двічі на тиждень радіоімунним аналізом.

Після трьох місяців дослідження дев'ять тварин забивали, і їх тканини збирали на загальний патологічний і гістопатологічний аналіз. Тварин відбирали для забиття з контрольної групи, одну з ІМ групи, і одну з SC групи. Тканинами, що збирали на загальну патологію і гістопатологію на 3-й місяць, були: місце введення (SC або ІМ), наднирники, аорта, кістка, кістковий мозок, мозок, діафрагма, придаток яєчка, стравохід, око з очним нервом, серце, нирки, товстий кишечник (сліпа кишка, ободова кишка), печінка з жовчним міхуром, легені з бронхами, лімфатичні вузли, підшлункова залоза, гіпофіз, простата з сечовипускальним каналом, слинні залози, сідничний нерв, скелетні м'язи, шкіра, тонкий кишечник (дванадцятипала кишка, порожня кишка, клубова кишка), спинний мозок, селезінка, шлунок, яєчки, тимус, тиреоїдна залоза з паратиреоїдними залозами, язик, трахея, сечовий міхур і великі пошкодження.

Не відбувалося значних змін у гематології або хімії крові від норми протягом дослідження тварин, що лікували, або контрольних тварин. Загальна і гістологічна перевірка на третій місяць не виявила значної різниці між собаками, що лікували PPI-149-CMC, і контрольними (що одержували носій) тваринами, за винятком змін у яєчках і простаті, які й очікувались з цим антагоністом LHRH.

Стосовно фармакокінетики PPI-149-CMC, всі собаки, на яких діяли 1,2мг/кг PPI-149-CMC, ресуспендованим у різноманітних носіях, що відновлює вміст вологи, і введенням ІМ або SC, виявили однакову фармакокінетику PPI-149 в плазмі, з максимальною концентрацією в плазмі в середині перших 2 днів, яка потім повільно зменшувалась експоненційно протягом наступного місяця. PPI-149-CMC виявив однакове розповсюдження в плазмі PPI-149 в суспензії з будь-яким з трьох носіїв, що відновлюють вміст вологи, що використовувались у дослідженні.

Стосовно ендокринної ефективності PPI-149-CMC, низькі рівні тестостерону (<0,6нг/мл) спостерігали протягом 24 годин ініціації PPI-149-CMC у всіх собак, і такий рівень залишався протягом першого місяця, незважаючи на шлях введення або вибір носія, що відновлює вміст вологи. Двадцять шість (26) з 35 собак (75%) мали низькі рівні тестостерону у зразках крові, одержаних безпосередньо перед введенням другої дози PPI-149-CMC на день 29. Ці результати свідчать, що початкова доза 1,2мг/кг у собак успішно викликала швидке, довготривале пригнічення (>28 днів) тестостерону в плазмі. На другий місяць, коли досліджували ефективність "підтримання" дози (дози, нижчої, ніж початкова доза), результати показали, що введення 0,3 або 0,6мг/кг PPI-149-CMC підтримували низький рівень тестостерону протягом більше, ніж 20 днів у 30 з 35 собак. Наприкінці другого місяця лікування (День 57), 21 з 35 собак (60%) залишалися кастрованими, в той час як 14 тварин мали тестостерон на нормальному рівні (>0,6%нг/мл). Дозу 1,2мг/кг вводили на початку третього місяця. Концентрації в плазмі PPI-149 утримувались після 28 дня, в той час як кількість тестостерону плазми була знову низькою. Наприкінці третього місяця (День 85), кількість тестостерону плазми були на надзвичайно низькому рівні у 30 з 35 собак, яким вводили PPI-149-CMC.

У підсумок, тридцять п'ять (35) собак одержали 1,2мг/кг PPI-149-CMC на день 1, 0,3 або 0,6мг/кг PPI-149-CMC на день 29 і 1,2мг/кг PPI-149-CMC на 57 день, використовуючи ІМ або SC введення з різноманітними носіями, що відновлюють вміст вологи. З цих 35 собак 19 тварин (54%) мали кількість тестостерону плазми, яка залишилась на надзвичайно низькому рівні протягом повного курсу терапії. Таким чином, введення PPI-149-CMC на 28 день призводило до повного пригнічення тестостерону в плазмі, яке було швидким (всі тварин мали надзвичайно низький рівень протягом 24 годин) і довготривалим (підтримувався протягом курсу введення).

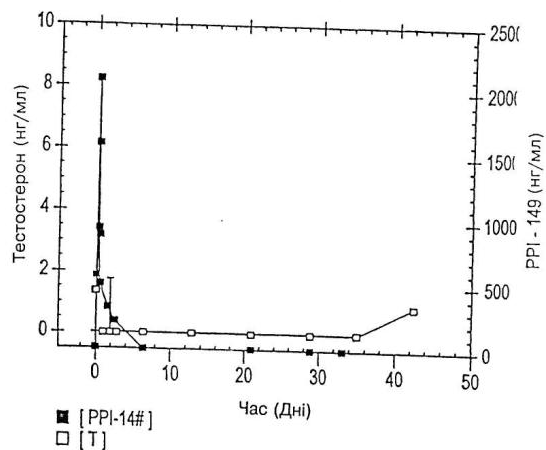
Таке ж дослідження, що описане вище, було проведено протягом шести місяців у собак для того, щоб надалі оцінити довготривалість безпеки і характеристики ефективності PPI-149-CMC. Тварини одержували початкову дозу 1,2мг/кг PPI-149-CMC ІМ або SC і п'ять наступних доз (при концентрації 0,3мг/кг, 0,6мг/кг або 1,2мг/кг) на 28 день. Тестостерон плазми і кількість PPI-149 визначали радіоімунним аналізом через однакові проміжки часу. Результати наведені у Фіг.4 (для SC введення) і Фіг.5 (для ІМ введення), які показують кількість тестостерону плазми (білі прямокутники) і рівень PPI-149 (чорні прямокутники). Певні дози, застосовані при кожному введенні PPI-149-CMC, показані на графіках. Результати, представлені на Фігурах 4 і 5, далі

показують, що введення PPI-149-СМС на 28 день викликало повне пригнічення тестостерону в плазмі, яке було швидким і довготривалим зі зменшеними рівнями тестостерону в плазмі, що одержували 6 місяців до того.

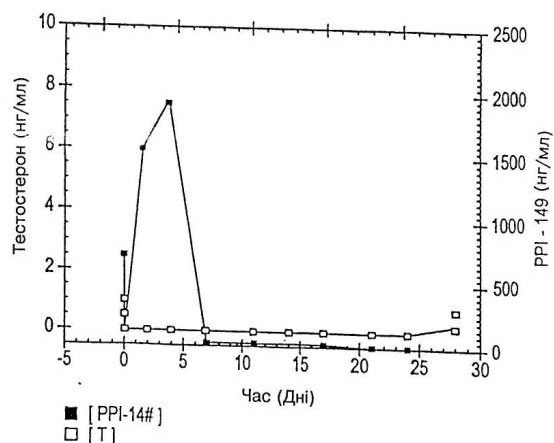
Рівнозначності

Фахівці у галузі визнаватимуть або будуть здатними переконатися, виконуючи не більше, ніж рутинну роботу, багато еквівалентів, специфічних втіленням винаходу, описаному тут. Такі еквіваленти охоплені формулою винаходу, яка наводиться нижче.

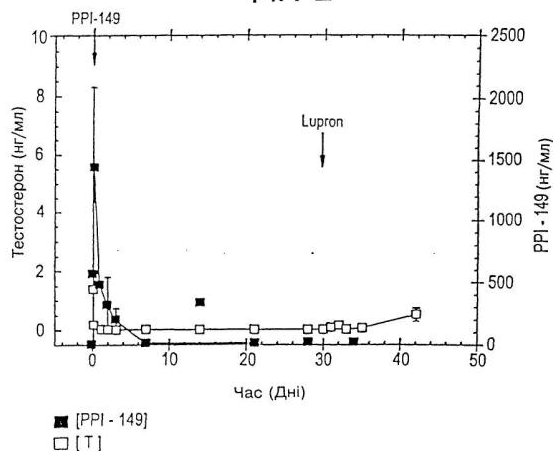
Фіг. 1А



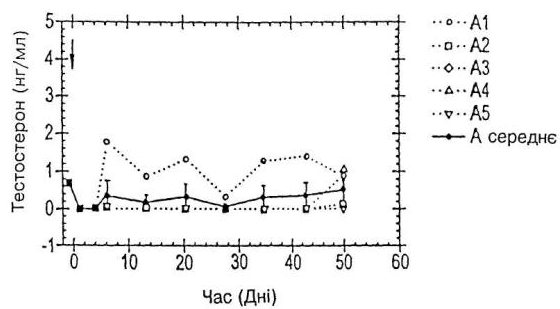
Фіг. 1Б



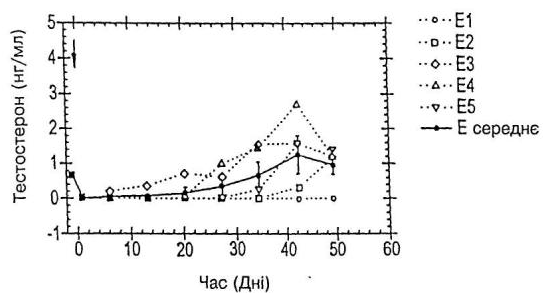
Фіг. 2



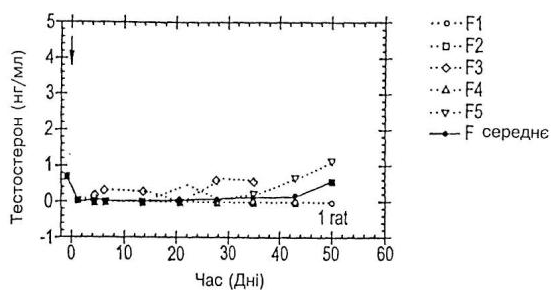
Фіг. 3А



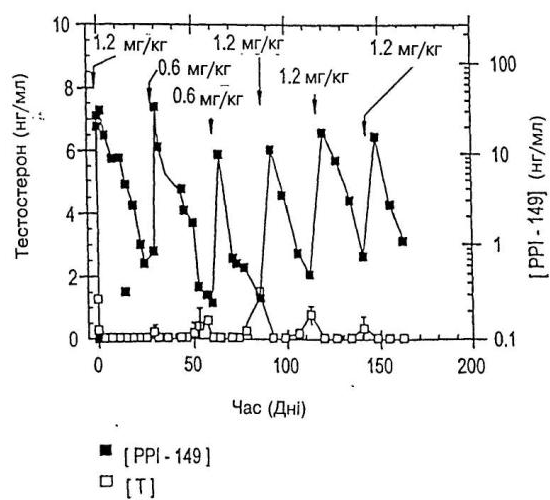
Фіг. 3Б



Фіг. 3В



Фіг. 4



Фіг. 5

