

Винахід стосується гальмуючих комплексів таких антагоністів гормону, що стимулює виділення лютеїнізуючого гормону (LHRH), як Antide, Amarelix, Azalme, A-75998, Ganirelix, антагоніст Nal-Glu з поліамінокислотами, зокрема, поліглутаміновою кислотою та поліаспарагіновою кислотою зі стабілізованою активністю, а також способу їх одержання та приготування медикаментів, що їх містять.

Представлені комплекси пептидних гормонів - поліамінокислот знаходять застосування у медицині, наприклад, для лікування чутливих до гормонів пухлин, таких як рак молочної або передміхурової залози, доброякісна гіпертрофія передміхурової залози та у гінекології для лікування ендометріозу, гістероскопії, а також для лікування безпліддя.

У патентних заявках DD 257197, DD 269785 та DD 299265 для інсуліну та для інших біологічно активних протеогормонів описано способи приготування іммобілізованих пептидних композицій зі стабілізованою біологічною активністю та зміненими фармакологічними властивостями, найсуттєвішою особливістю яких є утворення комплексу даних пептидів з поліамінокислотами.

У наведених патентах описані способи приготування, при яких комплекси утворюються під дією мурашиної кислоти, а також органічних розчинників, таких як хлороформ, і наочно показані умови приготування. При цьому для пептидного гормону існує небезпека часткової інактивації та зниження стабільності.

У літературі у 1981р. вперше було описано в EP 0042753 та EP 0049628 важкорозчинні солі або комплекси для аналогів LHRH. Представлення цих комплексів відбувалося з огляду на розробку фармацевтичних продуктів для різних випадків медичного застосування.

У 1989р. Орсоліні (ORSOLINI) у Патенті DE 38 22 459 описав приготування розчинних у воді поліпептидів шляхом комплексоутворення аналогів LHRH з ембоною кислотою, таніном та стеариноювою кислотою. Одержані важкорозчинні комплекси при цьому додатково вводять у полімерну матрицю зі співполімеру (молочна кислота - гліколева кислота).

Інші способи приготування Cetorelix-комплексу, введеного у співполімер (молочна кислота - гліколева кислота) були описані у 1993р. Орсоліні (ORSOLINI) та Хаймгартнером (HEIMGARTNER) у патентах DE 42 23 282 та DE 42 23 284. У цьому патенті наводяться приклади важкорозчинних Cetorelix-комплексів з ембоною кислотою, таніном, стеариноювою кислотою та пальмтиноювою кислотою.

Мета винаходу полягає у приготуванні композицій подовженої дії з поліпшеною й контрольованою здатністю до затриманої дії та підвищеною стійкістю до передчасного протолітичного розкладу антагоністів LHRH для лікування таких звичних захворювань, як чутливі до гормонів пухлини, наприклад, рак молочної або передміхурової залози, доброякісна гіпертрофія передміхурової залози, ендометріоз, гістероскопія, а також для лікування безпліддя, та забезпечення простого і екологічно безпечного способу приготування цих композицій.

Задача винаходу полягає у приготуванні нових композицій подовженої дії з поліпшеною й контрольованою здатністю до затриманої дії таких антагоністів LHRH, як Antide, Antarelix, Azaline, A-75998, Ganirelix, антагоніст Nal-Glu (однак перевагу віддають Cetorelix) з полімерами, що піддаються біологічному розкладові, а також у забезпеченні способу їх виготовлення.

Згідно з винаходом, задача вирішується завдяки приготуванню іммобілізованих композицій пептидних гормонів зі стабілізованою активністю для парентерального введення з комплексів антагоністів LHRH з поліамінокислотами, зокрема, поліглутаміновою кислотою та поліаспарагіновою кислотою, причому поліамінокислотно-пептиднорормональний комплекс осаджують без органічного розчинника з водних розчинів. В оптимальному варіанті інші поліамінокислотно-пептиднорормональні комплекси з регульованим вмістом гормонів також приготують шляхом ліофілізації водних розчинів. Регульований ступінь вивільнення активної речовини залежить від типу та молярної маси поліамінокислот, від вставлення гідрофобної амінокислоти у полімерний каркас або від часткової естерифікації. (Fig.2 та 3).

Комплекси згідно з винаходом застосовують у медицині для лікування чутливих до гормонів пухлин, зокрема, для лікування раку молочної або передміхурової залози, доброякісної гіпертрофії передміхурової залози, а також у гінекології для викликання овуляції, штучного запліднення та ендометріозу і у зв'язку з гістероскопією.

Термін „комплекс" у межах цього винаходу охоплює зв'язування двох або кількох компонентів у важкорозчинну систему, яка не підлягає чіткій стехіометрії. Це веде до певного накладення взаємодії, причому основну роль відіграють зв'язки побічної валентності.

У літературі важкорозчинні пептидні комплекси часом визначають як „сіль". Однак таке визначення у багатьох випадках є неточним, якщо не йдеться, як уже було згадано, про речовини з визначеним складом. У разі пептидів та протеїнів, щоправда, спостерігають йонну взаємодію, хоча самі вони не відповідають за зміну структури або агрегатного стану.

Для пептидів та протеїнів терміни "комплекс" та „сіль" через різноманітність функціональних груп мають ширше значення через накладання кількох складових взаємодій, які ведуть до побудови та утворення структури пептиду та протеїну.

Застосовували поліамінокислоти, які є придатними як основні носії для пептидів. При цьому для винаходу має значення, що активні речовини зв'язуються з полімером не хімічним шляхом, а прикріплюються до полімеру виключно через побічну валентність та гідрофобну взаємодію.

Було несподівано виявлено, що, зокрема, антагоніст LHRH Cetorelix виявляє дуже високу зв'язувальну спорідненість до поліамінокислот, зокрема, до поліглутамінової кислоти та поліаспарагінової кислоти. Цю високу спорідненість Cetorelix на основі існуючої літератури не можна було передбачити, а з огляду на структуру пептиду вона виявилася несподіваною.

Комплекси, які утворюються спонтанно, мають визначений відновлюваний вміст гормонів.

Якщо ж вміст гормонів у комплексах треба змінити і точно визначити, то придатним способом для цього виступає ліофілізація.

Ці умови приготування є значно менш суворими, ніж описані у попередніх патентах, і, таким чином, перешкоджають можливій інактивації гормону.

Взаємодія між молекулами, що трапляється при перемішуванні розчинів, веде до утворення стабільних комплексів, які мають регульований графік виділення активної речовини та підвищену стабільність протеолізу.

Поліамінокислоти, таким чином, впливають не тільки на затримку дії, але й одночасно забезпечують захист від небажаного передчасного протеолітичного розкладу. Цей аспект є вигідним, перш за все, з огляду на тривале застосування подібних композицій.

На затримку дії комплексів значною мірою впливають тип та молярна маса поліамінокислот, вставлення амінокислот з гідрофобними боковими ланцюгами у полімерний каркас, а також часткова естерифікація наявних карбоксильних груп.

Винахід краще висвітлюється за допомогою поданих нижче прикладів втілення, якими він, однак, не обмежується.

Приготування поліамінокисотно-пептидних комплексів шляхом осадження

Приклад 1

50мг поліамінокислоти розчиняють у 5мл H<sub>2</sub>O, у разі поліглутамінової кислоти, з додаванням 1п NH<sub>4</sub>OH при легкому нагріванні до 40°C та обробці ультразвуком. 50мг Cetorelix (у вигляді ацетату) розчиняють у 4мл H<sub>2</sub>O. Розчин поліамінокислоти перемішують, в один прийом додають розчин Cetorelix і відразу після цього залишають стояти 4 години при 4°C. Після цього осад 5 хвилин центрифугують при 4000об/хв, надосадову рідину видаляють, а преципітат 24 години висушують у вакуумі над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Оскільки стехіометричних комплексів не існує, вихідну кількість співвідносять з сумарною кількістю вихідних сполук. На Фігурі 1 показано різні криві вивільнення у статичній системі виділення залежно від молярної маси (Середовище вивільнення: 0,01м ацетату амонію, рН 7,0).

Вихід: 50-65% від теор.

Вміст Cetorelix у комплексі. Див. Таблицю 1

Таблица 1

Склад осаджених комплексів Cetorelix-поліамінокислота

Поліамінокислота	Середня молярна маса (г/моль)	Вміст гормону у комплексі (%) відн. похибка 5%	Молярне співвідношення гормон : PAS	Молярне співвідношення гормон : вільні карбоксил, групи
Поліглутамінова кислота	5000 16000 50000	86 85 60	1:0,05 1:0,016 1:0,02	1:1,9 1:2,1 1:8,2
Метилловий естер поліглутамінової кислоти Метилування: 2,2% 24,4%	16000 16000	81 58	1:0,02 1:0,06	1:2,8 1:6,7
Поліаспарагінова кислота	7300 14000 28000	86 78 69	1:0,03 1:0,03 1:0,03	1:2,2 1:3,8 1:6,1
Полі [(Glu,Phe)/4:1]	45000	65	1:0,017	1:4,5
Полі [(Glu,Leu)/4:1]	70000	79	1:0,005	1:2,4

Приготування комплексів поліамінокислота-пептид з визначеним вмістом пептиду через ліофілізацію

Приклад 2

Cetorelix-комплекс з 50% вмістом пептиду

50г поліамінокислоти розчиняють у 5мл H<sub>2</sub>O, у разі поліглутамінової кислоти, з додаванням 1п NH<sub>4</sub>OH при легкому нагріванні до 40°C та обробці ультразвуком. 50мг Cetorelix (у вигляді ацетату) розчиняють у 4мл H<sub>2</sub>O. Розчин поліамінокислоти перемішують, в один прийом додають розчин Cetorelix і перемішують ще 2 хвилини. Утворений комплекс заморожують при -20°C і після цього ліофілізують. Оскільки стехіометричних комплексів не існує, вихідну кількість співвідносять з сумарною кількістю вихідних сполук.

Вихід 90-95% від теор.

Вміст Cetorelix у комплексі – 45-50%

Приклад 3

Через відповідну зміну кількості поліамінокислоти та Cetorelix аналогічним чином приготувляють 70% Cetorelix-комплекс.

Приклад 4

Підвищення гідрофобності разом з більшою затримкою дії досягають через часткову естерифікацію карбоксильних груп. На Фіг.2 представлено криві вивільнення Cetorelix-комплексів за допомогою метилових естерів поліглутамінової кислоти. На Фіг.3 показано вивільнення Cetorelix-комплексів поліглутамінової кислоти лейцином та фенілаланіном.

Приклад 5

Для перевірки in v/ro-експериментів з вивільнення комплекси Cetorelix-поліамінокислота випробували на тваринах.

Ідеться про Cetorelix-комплекс з такими поліамінокислотами.

Поліглутамінова кислота, М 5000г/моль

Поліглутамінова кислота, М 16000г/моль

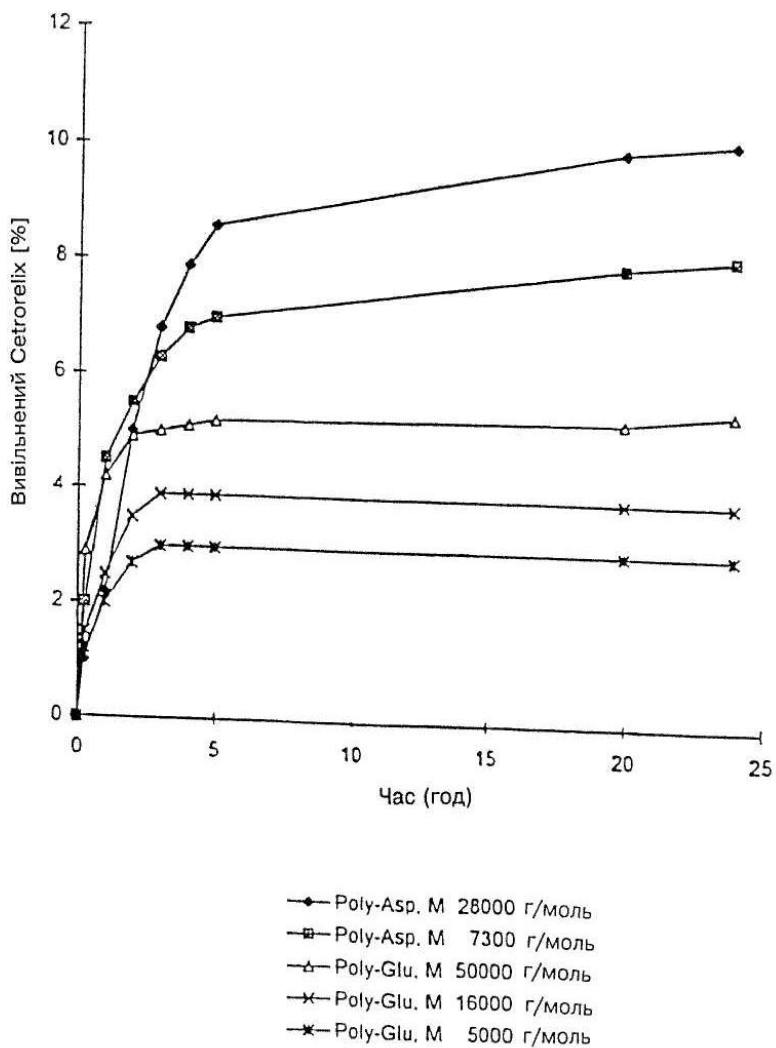
Поліаспарагінова кислота, М 7300г/моль

На Фіг.4 представлено супресію тестостерону у самця щура після одноразової підшкірної ін'єкції 1,5мг/кг. У кожній піддослідній групі досліджували по 5 тварин.

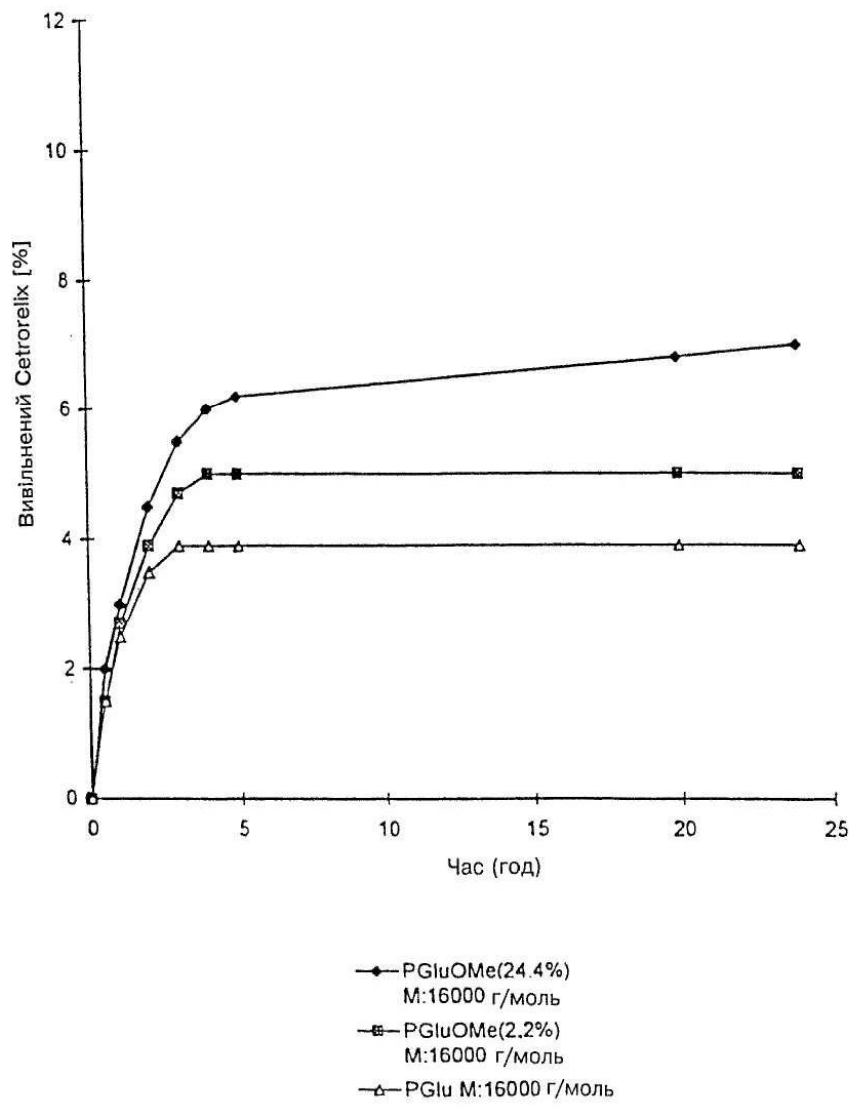
Ці результати показали, що досліджені комплекси мають тривалий вплив, який виявляється у супресії тестостерону, понад 600 годин (Фіг.4)

Було доведено принципову ефективність та придатність комплексів Cetorelix-поліамінокислота як композицій подовженої дії.

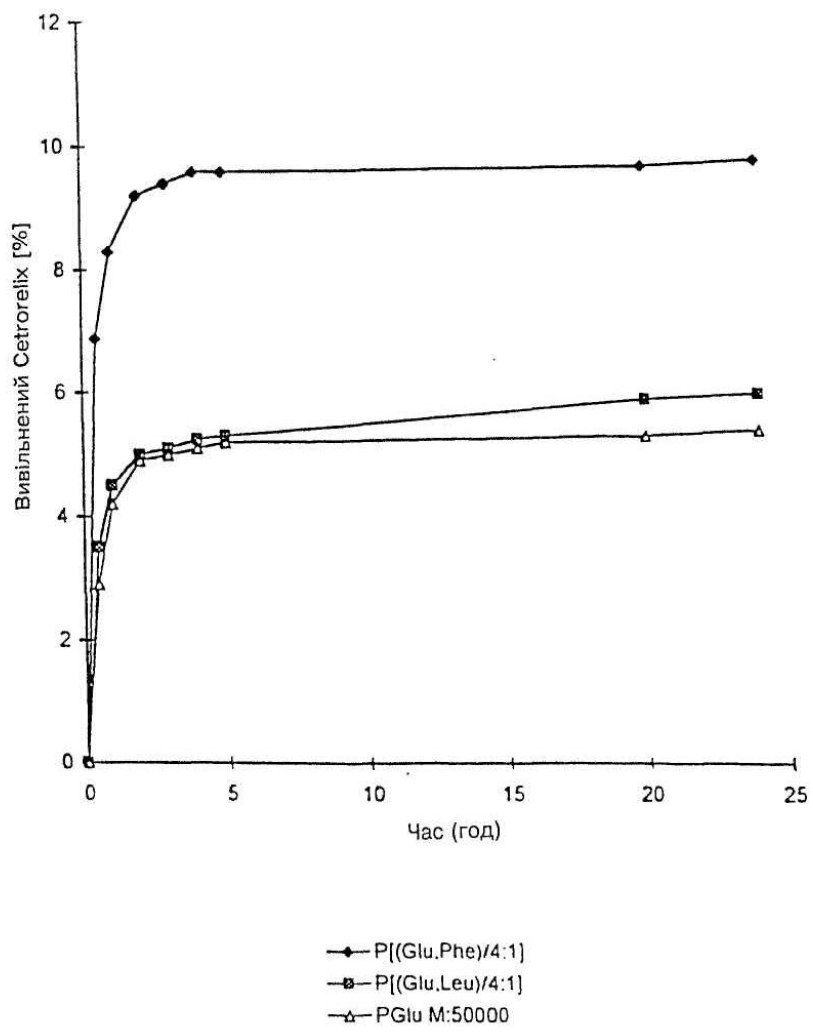
ФІГ. 1



ФІГ. 2



ФІГ. 3



ФІГ. 4

Супресія тестостерону у самців щурів, доза 1,5 мг/кг

