

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

292 449

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1994 - 2937
(22) Přihlášeno: 25.05.1993
(30) Právo přednosti:
28.05.1992 GB 1992/9211268
(40) Zveřejněno: 15.03.1995
(Věstník č. 3/1995)
(47) Uděleno: 25.07.2003
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 17.09.2003
(Věstník č. 9/2003)
(86) PCT číslo: PCT/GB93/01079
(87) PCT číslo zveřejnění: WO 93/024150

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.⁷:

A 61 K 47/48
A 61 K 9/20
A 61 K 9/16

(73) Majitel patentu:

ZENECA LIMITED, London, GB;

(72) Původce vynálezu:

Hutchinson Francis Gowland, Lymm, GB;

(74) Zástupce:

Traplová Jarmila JUDr., U průhonu 36, Praha 7, 17000;

(54) Název vynálezu:

Farmaceutická kompozice a způsob její přípravy

(57) Anotace:

Farmaceutická kompozice obsahující farmaceuticky přijatelnou sůl tvořenou kationtem peptidu obsahujícího alespoň jednu bazickou skupinu a aniontem polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou a mající buď formu roztoku nebo disperze soli v rozpouštědle, které je rozpouštědlem volného polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou, avšak není rozpouštědlem volného peptidu obsahujícího alespoň jednu bazickou skupinu, přičemž velikost částic soli v disperzi je menší než 5 mikrometrů a výhodně menší než 0,2 mikrometru, nebo formu mikročástic nebo implantátu pro injekci nebo podkožní implantaci, jakož i způsob přípravy této kompozice.

CZ 292449 B6

Farmaceutická kompozice a způsob její přípravy

Oblast techniky

5

Vynález se týká farmaceutické kompozice a způsobu její přípravy. Specificky se vynález týká solí tvořených kationtem odvozeným od peptidu obsahujícího alespoň jednu bazickou skupinu a aniontu odvozeného od polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou. Tyto soli mají vlastnosti, které jsou vhodné pro formulování farmaceutických kompozic s prolongovaným uvolňováním účinné látky, a to jak v případě, kdy jsou tyto soli v čisté formě, nebo v případě, kdy se nacházejí ve směsi buď s přebytkem peptidu v jeho volné, nevázané formě nebo s přebytkem volného polyesteru. Takové soli jsou obojetné vzhledem k tomu, že jsou tvořeny částečně peptidem, který je hydrofilní a lipofilní, a částečně polyesterem, který je hydrofilní a lipofilní. Výraz „peptid“ je zde použit v generickém smyslu a zahrnuje poly(aminokyseliny), které jsou normálně obecně označovány jako „peptidy“, „polypeptidy“ nebo „proteiny“, a „bazickým peptidem“ je peptid, který má bazický charakter podmíněný přebytkem bazických aminokyselin, jakými jsou například arginin nebo lysin, nebo podmíněný N-koncem peptidu, nebo jednoduše peptid, který obsahuje alespoň jednu bazickou skupinu, případně v přítomnosti jedné nebo několika kyselých aminokyselinových skupin. Uvedený výraz rovněž zahrnuje syntetické analogy peptidu, nepřirozené aminokyseliny mající bazickou funkčnost nebo libovolnou jinou formu zavedené bazicity. Výraz „polyester“ je dále použit ve smyslu znamenajícím polyester ukončený karboxylovou skupinou.

Dosavadní stav techniky

25

V evropském patentovém dokumentu EP 58 481 je naznačena možnost specifické chemické interakce mezi koncovou karboxylovou skupinou polyesteru a bazickou skupinou nebo bazickými skupinami peptidu. Tato možnost je rovněž uvedena v Lawter a kol., Proc. Int. Symp. Cotrol Rel. Bioact. Mater., 14, 19, (1987) a v Okada a kol., Pharmaceutical Research, 8, 584–587 (1991), avšak tyto publikace se v tomto ohledu vyjadřují pouze spekulativně, neboť specificky nepopisují žádnou takovou jednotlivou peptid–polyesterovou sůl, neuvádí jakým způsobem by takové soli mohly být připraveny a nepopisují žádný příznivý účinek, kterého by mohlo být dosaženo použitím těchto solí při výrobě farmaceutických kompozic.

35

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je farmaceutická kompozice, jejíž podstata spočívá v tom, že obsahuje farmaceuticky přijatelnou sůl tvořenou kationtem peptidu obsahujícího alespoň jednu bazickou skupinu a aniontem polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou a má formu roztoku nebo disperze soli v rozpouštědle, které je rozpouštědlem volného polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou, avšak není rozpouštědlem volného peptidu obsahujícího alespoň jednu bazickou skupinu, přičemž velikost částic soli v disperzi je menší než 5 mikrometrů a výhodně menší než 0,2 mikrometru, nebo má formu mikročástic nebo implantátu pro injekci nebo podkožní implantaci.

V rámci farmaceutické kompozice podle vynálezu je peptid obsahující alespoň jednu bazickou skupinu farmakologicky účinným peptidem zvoleným z množiny zahrnující oxytocin, vasopresin, adrenokortikotropní hormon ACTH, epidemální růstový faktor EGF, prolaktin, luteinizující hormon, folikul–stimulující hormon, luliberin nebo hormon uvolňující luteinizující hormon LHRH, inzulin, somatostatin, glukagon, interferon, gastrin, tetragastrin, pentagastrin, urogastron, sekretin, kalcitonin, enkefaliny, endorfiny, kyotorfin, taftsin, thymopietin, thymosin, thymostimulin, brzlíkový humorální faktor, sérový brzlíkový faktor, faktor nádorové nekrózy, kolonie stimulující faktory, motilin, bombesin, dinorfin, neurotensin, cerulein, bradykinin,

55

urokinázu, kallikrein, analogy a antagonistů látky P, angiotensin, nervový růstový faktor, krevní koagulační faktory VII a IX, lysozym-chlorid, renin, tyrocidin, gramicidiny, růstové hormony, melanocyty stimulující hormon, hormon uvolňující hormon štítné žlázy, štítnou žlázu stimulující hormon, parathyroidní hormon, pankreozym, cholecystokinin, lidský placentální laktogen, lidský choriální gonadotropin, peptid stimulující syntézu proteinu, gastrický inhibiční peptid, vasoaktivní intestinální peptid, růstový faktor odvozený z krevních destiček, faktor uvolňující růstový hormon, kostní morfogenní protein a syntetické analogy a modifikace a farmakologicky účinné fragmenty těchto látek.

Výhodně je peptid obsahující alespoň jednu bazickou skupinu farmakologicky neúčinným peptidem zvoleným z množiny zahrnující polyarginin, polylysin a kopolymer argininu a lysinu, kopolymery neutrálních aminokyselin v D- L- nebo DL-formě s argininem nebo/a lysinem ve formě D nebo L nebo v racemické formě a peptidy nebo kopolypeptidy, ve kterých jsou peptidové řetězce zcela nebo částečně ukončeny na N-konci bazickou skupinou a základní řetězec je tvořen neutrálními aminokyselinovými zbytky.

Výhodně je polyester ukončený karboxylovou skupinou zvolen z množiny zahrnující polyestery odvozené od hydroxy-kyselin a polyestery odvozené z polykondenzace diolů nebo/a polyolů s karboxylovými kyselinami nebo/a polykarboxylovými kyselinami.

Předmětem vynálezu je dále způsob přípravy výše uvedené farmaceutické kompozice, jehož podstata spočívá v to, že se peptid obsahující alespoň jednu bazickou aminokyselinu ve formě volné báze nebo soli se slabou kyselinou a polyester ukončený karboxylovou skupinou rozpustí b neutrálním polárním rozpouštědlem, ve kterém jsou peptid a polyester rozpustné, načež se odstraní prakticky odstranitelný podíl rozpouštědla a zbývající koncentrovaný roztok se přidá k rozpouštědlu, které není rozpouštědlem vytvořené peptid-polyesterové soli, nebo se peptid obsahující alespoň jednu bazickou aminokyselinu ve formě volné báze nebo soli se slabou kyselinou a polyester ukončený karboxylovou skupinou rozpustí v rozpouštědlu, ve kterém je peptid a polyester rozpustný a které je odstranitelné lyofilizací, načež se získaný roztok mžikově zmrazí, získaná zmražená směs se lyofilizuje, zbytek po lyofilizaci se disperguje v rozpouštědlo polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou a vytvořená peptid-polyesterová sůl se ponechá rozpustit, nebo se uvede v reakci peptid obsahující alespoň jednu bazickou aminokyselinu ve formě soli se silnou kyselinou a polyester, který je zcela nebo částečně ve formě soli karboxylové kyseliny s alkalickým kovem nebo kovem alkalických zemin.

Výhodně je farmaceutická kompozice podle vynálezu tvořena farmaceutickou kompozicí obsahující farmaceuticky přijatelnou sůl tvořenou kationtem peptidu obsahujícího alespoň jednu bazickou skupinu a aniontem polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou a vykazující prodloužené uvolňování peptidu obsahujícího alespoň jednu bazickou skupinu, jejíž podstata spočívá v tom, že má formu mikročástic o průměru 0,2 až 500 mikrometru suspendovaných v dodatečném farmaceuticky přijatelném injekčním nosiči.

Výhodně je dodatečným farmaceuticky přijatelným nosičem vodný nebo organický nosič, který není rozpouštědlem látek tvořících kompozici nebo je tímto nosičem hydrofilní organický injekční nosič v případě použití vysoce lipofilního polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou.

Výhodně je farmaceutickou kompozicí podle vynálezu farmaceutická kompozice obsahující farmaceuticky přijatelnou sůl tvořenou kationtem farmakologicky účinného peptidu obsahujícího alespoň jednu bazickou skupinu a aniontem polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou a vykazující prodloužené uvolňování peptidu obsahujícího alespoň jednou bazickou skupinu, jejíž podstata spočívá v tom, že má formu farmaceuticky přijatelného roztoku obsahujícího

- peptid obsahující alespoň jednu bazickou aminokyselinu a mající molekulovou hmotnost alespoň 300, který je ve formě soli s polyesterem ukončeným karboxylovou skupinou, přičemž tato sůl je tvořena kationtem peptidu obsahujícího alespoň jednu bazickou skupinu a aniontem polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou,
 - rozpouštědlo, které je rozpouštědlem volného polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou, avšak které není rozpouštědlem volného peptidu obsahujícího alespoň jednu bazickou skupinu,
 - přebytek polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou a
 - případně podíl peptidu obsahujícího alespoň jednu bazickou skupinu v solubilizované nebo koloidně dispergované formě.
- Výhodně je peptidem obsahujícím alespoň jednu bazickou skupinu syntetický analog hormonu uvolňujícího luteinizující hormon zvolený z množiny zahrnující buserelin ([D-Ser(Bu)¹]⁶, des-Gly-NH₂¹⁰]-LHRH(1-9)NH₂), deslorelin ([D-Trp⁶, des-Gly-NH₂¹⁰]-LHRH(1-9)NH₂), fertorelin ([des-Gly-NH₂¹⁰]-LHRH(1-9)NH₂), goserelin ([D-Ser(Bu)¹]⁶, Azgly¹⁰]-LHRH), histrelin ([D-His(Bzl)⁶, des-Gly-NH₂¹⁰]-LHRH(1-9)NH₂), leuprorelin ([D-Leu⁶, des-Gly-NH₂¹⁰]-LHRH(1-9)NH₂), lutrelin ([D-Trp⁶, MeLeu⁷, des-Gly-NH₂¹⁰]-LHRH(1-9)NH₂), nafarelin ([D-Nal⁶]-LHRH), tryptorelin ([D-Nal⁶]-LHRH) a jejich farmakologicky účinné soli.

Rozpouštědlo je výhodně zvoleno z množiny zahrnující benzylbenzoát, benzylalkohol, ethyl-laktát, glyceryltriacetát, estery kyseliny citronové a polyethylenglykoly, alkoxy-polyethylenglykoly a polyethylenglykolacetáty s molekulovou hmotností nižší než 1000.

Poměr soli tvořené kationtem peptidu obsahujícího alespoň jednu bazickou skupinu a aniontem polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou k volnému polyesteru ukončeném karboxylovou skupinou je výhodně roven 1:0 až 0,1:10.

Poměr celkového pevného podílu k rozpouštědlu je roven 2 až 40 % (hmotn./obj.).

Předmětem vynálezu je rovněž způsob přípravy farmaceutické kompozice, jehož podstata spočívá v tom, že se homogenně promísená směs peptidu obsahujícího alespoň jednu bazickou skupinu a polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou rozpustí ve farmaceuticky přijatelném rozpouštědle, nebo se roztok peptidu obsahujícího alespoň jednu bazickou skupinu v alkoholu obsahujícím 1 až 6 uhlíkových atomů pozvolna přidá k roztoku polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou v rozpouštědle vhodném pro injekci, načež se v případě, že rozpouštědlo přítomné ve výchozím roztoku peptidu není farmaceuticky přijatelné, toto rozpouštědlo odstraní.

V následující části popisu bude peptid obsahující alespoň jednu bazickou skupinu někdy uváděn jako farmakologicky účinný peptid nebo bazická peptidová účinná látka nebo peptidová účinná látka, přičemž je pro odborníka z kontextu zřejmé, že ve všech těchto případech se jedná o peptid obsahující alespoň jednu bazickou skupinu. Stejně tak bude v následující části popisu polyester ukončený karboxylovou skupinou uváděn někdy jako polyester vykazující prolouhované uvolňování nebo pouze jako polyester, přičemž z kontextu bude pro odborníka zřejmé, že ve všech těchto případech se jedná o polyester ukončený karboxylovou skupinou.

Vynález poskytuje kompozici obsahující sůl, která je tvořena kationtem odvozeným od peptidu obsahujícího alespoň jednu bazickou skupinu a aniontem odvozeným od polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou. Tato kompozice je ve formě roztoku nebo disperze uvedené soli v rozpouštědle, které je rozpouštědlem pro volný polyester, avšak není rozpouštědlem pro volný peptid, přičemž částice uvedené soli v uvedené disperzi jsou menší než 5 mikrometrů a výhodně

menší než 0,2 mikrometru, nebo ve formě mikročástic nebo implantátu pro injekci, resp. podkožní implantaci.

5 Kationtová složka uvedené soli může být odvozena od bazického peptidu, který je farmakologicky účinný, nebo od bazického peptidu, který je farmakologicky neúčinný. V případě, že bazický peptid je farmakologicky účinný, potom může být do farmaceutické kompozice s prolongovaným uvolňováním účinné látky formulována samotná sůl podle vynálezu. V případě, že bazický peptid je farmakologicky neúčinný, potom může být sůl podle vynálezu použita jako pomocná látka při formulování kompozic s prolongovaným uvolňováním účinné látky, obsahujících jiné
10 farmakologicky účinné peptidy, které mají buď kyselý charakter (obsahují přebytek kyselých aminokyselin, jakými jsou kyselina aspargová a kyselina glutamová) nebo neutrální charakter.

Dalším požadavkem kladeným na formulace peptidů s prolongovaným uvolňováním účinné látky je samozřejmě to, že peptid by měl být ve formulaci v podstatě stabilní po předpokládanou dobu uvolňování účinné látky. Výrazem „podstatně stabilní“ se zde rozumí, že v průběhu předpokládané doby použití formulace y nemělo dojít k nulové rozpustnosti nebo denaturaci účinné látky spojené s úplnou ztrátou farmakologické účinnosti.
15

Vhodné farmakologicky účinné peptidy mají molekulovou hmotnost rovnou alespoň 300 a výhodně rovnou alespoň 800. Příklady takových peptidů, které mohou být ve formulacích s prolongovaným uvolňováním účinné látky v podstatě stabilní po dobu předpokládaného uvolňování účinné látky a které mohou být tedy použity v kompozicích podle vynálezu, jsou oxytocin, vasopresin, adrenokortikotropní hormon (ACTH), epidermální růstový faktor (EGF), prolaktin, luteinizující hormon, folikul–stimulující hormon, luliberin nebo luteinizující hormon uvolňující hormon (LHRH), inzulin, somastatin, glukagon, interferon, gastrin, tetragastrin, pentagastrin, urogastron, sekretin, kalcitonin, enkefaliny, endorfiny, kyaotorfin, taftsin, thymopoeitin, thymosin, thymostimulin, brzlíkový humorální faktor, sérový brzlíkový faktor, faktor nádorové nekrózy, buněčné kolonie stimulující faktory, motilin, bombesin, dinorfin, neurotensin, cerulein, bradykinin, urokináza, kallikrein, analogy a antagonisty látky P, angiotensin II, nervový růstový faktor, krevní koagulační faktor VII a IX, lysozyme–chlorid, renin, bradykinin, tyrocidin, gramicidiny, růstové hormony, melanocyty–stimulující hormon, hormon uvolňující hormon štítné žlázy, štítnou žlázu–stimulující hormon, parathyreoidní hormon, pankreozymín, cholecystokinín, lidský placentální laktogen, lidský chorionní gonadotropin, syntézu proteinů stimulující peptid, gastrický inhibiční peptid, vasoaktivní intestinální peptid, gastrický inhibiční peptid, vasoaktivní intestinální peptid, z krevních destiček odvozený růstový faktor, faktor uvolňující růstový hormon, kostní morfogenní protein a syntetické analogy a modifikace a farmakologicky účinné fragmenty uvedených látek.
20
25
30
35

Výhodnými peptidovými složkami kompozic podle vynálezu jsou syntetické analogy hormonu LHRH a tyto analogy neomezujícím způsobem zahrnují zejména:
40

buserelin (/D–ser(Bu¹), des–Gly–NH₂¹⁰/–LHRH(1–9)NHET),
deslorelin (/D–Trp⁶, des–Gly–NH₂¹⁰/–LHRH(1–9)NHET),
fertirelin (/des–Gly–NH₂¹⁰/–LHRH(1–9)NHET),
45 goserelin (/D–Ser(Bu¹)⁶, Azgly¹⁰/–LHRH),
histrelin (/D–His(Bzl)⁶, des–Gly–NH₂¹⁰/–LHRH(1–9)NHET),
leuprorelin (/D–Leu⁶, des–Gly–NH₂¹⁰/–LHRH(1–9)NHET),
lutrelin (/D–Trp⁶, MeLeu⁷, des–Gly–NH₂¹⁰/–LHRH(1–9)NHET),
nafarelin (/D–Nal⁶/–LHRH),
50 tryptorelin (/D–Trp⁶/–LHRH)
a jejich farmakologicky účinné soli.

Vhodnými farmakologicky neúčinnými bazickými peptidy, které mohou být použity v solích podle vynálezu, jsou polyarginin, polylysin a poly(arginin–ko–lysin), kopolymery neutrálních aminokyselin ve formě D, L nebo DL s argininem nebo/a lysinem ve formě D nebo L
55

v racemické formě, nebo peptidy nebo kopolypeptidy, ve kterých jsou peptidové řetězce zcela nebo částečně ukončeny bazickou skupinou na N-konci a ve kterých je základní řetězec tvořen neutrálními aminokyselinovými zbytky.

- 5 Polyesterem ukončeným karboxylovou skupinou a použitým jako zdroj aniontu soli podle vynálezu může být homo-polyester nebo ko-polyester. Výhodnými takovými polyestery jsou polyestery, které degradují nebo jsou odbourávány ve vodném fyziologickém prostředí, jakým je prostředí vyskytující se v intramuskulární nebo subkutánní tkáni, na ve vodě rozpustné fragmenty s nízkou molekulovou hmotností. V tomto prostředí je dominantním degradačním procesem
10 jednoduchá hromadná hydrolyza, zahrnující hydrolytické štěpení esterových skupin a vedoucí k homo-polyesterovým nebo ko-polyesterovým fragmentům s nízkou molekulovou hmotností nebo ko-polyesterovým fragmentům s nízkou molekulovou hmotností a nakonec k vymizení formulace z místa aplikace. Nicméně se připošití, že v těchto injekčních nebo implantačních místech, jakož i v ostatních místech v živé tkáni může docházet i k uplatnění degradačních mechanismů, jakými jsou například degradační mechanismy mediované enzymy.
15

Vhodnými homo- a ko-polyestery jsou polyestery odvozené od hydroxy-kyselin nebo z polykondenzace diolů nebo/a polyolů, jakými jsou například (následující výčet však nemá omezující charakter) polyethylenglykoly, polypropylenglykoly, alkylenglykoly se 2 až 10 uhlíkovými
20 atomy, glycerol, trimethylolpropan a polyoxyetylované formy polyfunkčních alkoholů, jakými jsou glycerol, trimethylolpropan a cukrem, s dikarboxylovými kyselinami nebo/a polykarboxylovými kyselinami, jakými jsou například (následující výčet však nemá omezující charakter) alkan-dikarboxylové kyseliny, ve kterých alkan obsahuje 1 až 10 uhlíkových atomů, zejména kyselina malonová, kyselina jantarová, kyselina glutarová, kyseliny ftalové, kyselina mellitová a kyselina pyromellitová, případně v přítomnosti hydroxykyseliny nebo hydroxy-kyseliny nebo/a monoólů.
25

Výhodnými způsoby příprava homo- a ko-polyesterů na bázi hydroxy-kyselin jsou polymerace mechanismem otevření kruhu cyklických dimerů kyseliny nebo přímá polykondenzace nebo kopolykondenzace hydroxy-kyselin nebo směsí hydroxy-kyselin nebo laktonů odvozených od
30 hydroxy-kyselin. Tyto polymerace, a to jak na bázi otevření kruhu, tak i polykondenzačního typu, se výhodně provádějí tak, aby rezultující homo- nebo kopolyestery obsahovaly, a to zcela nebo částečně, polymerní řetězce mající funkční skupiny karboxylových kyselin. Polykondenzace mechanismem otevření kruhu dimerů kyselin se takto provádí v přítomnosti vhodného přenašeče polymerního řetězce nebo koiniciátoru, který reguluje jak molekulovou hmotnost, tak i strukturu rezultujícího homo- nebo kopolyesteru. Vhodnými přenašeči polymerního řetězce jsou
35 voda, kyseliny hydroxykarboxylové, kyseliny monokarboxylové, kyseliny dikarboxylové a kyseliny polykarboxylové.

V případě polyesterů připravených polykondenzací nebo kopolykondenzací a polymerace provádí za podmínek, kdy se použije přebytek funkčních skupin karboxylové kyseliny, tj. kdy je poměr $-COOH/$ k $-OH/$ rovný nebo větší než 1. Struktura a molekulární hmotnost polykondenzátu je dána charakterem použitých alkoholů (zda je použito monoólů, diolů nebo polyolů nebo jejich směsí), charakter použitých kyselin (zda je použito mono-, di- nebo polykarboxylových kyselin nebo jejich směsí) a mírou přebytku použité karboxylové kyseliny.
45 Obzvláště vhodné jsou kyseliny zahrnuté v Krebsově cyklu.

Příklady vhodných hydroxy-kyselin nebo laktonů, které mohou být použity při přípravě homo- nebo kopolyesterů užitečných v rámci vynálezu, jsou beta-propionolakton, betabutyrolakton, gama-butyrolakton a pivalolakton a kyselina alfa-hydroxymáselná, alfa-hydroxyizomáselná,
50 alfa-hydroxyvalerová, alfa-hydroxyizovalerová, alfa-hydroxykapronová, alfa-hydroxyizokapronová, alfa-hydroxy-beta-methylvalerová, alfa-hydroxyheptanová, alfa-hydroxydekanová, alfa-hydroxymyristová a alfa-hydroxystearová. Výhodnými takovými homo- a kopolyestery jsou polyestery odvozené od kyseliny mléčné ve formě D, L nebo DL nebo kyseliny glykolové nebo odpovídajících laktidových a glykolidových dimerů, přičemž výhodným případným přerušovačem řetězce je kyselina mléčná.
55

Jakkoliv může makromolekulární bazická peptidová účinná látka existovat zcela nebo částečně jako polymer-kation a polyester může existovat zcela nebo částečně jako polymer-kation, je tvorba soli, ke které dochází interakcí kyselina-báze mezi takovými polymerními subjekty za použití konvenčních způsobů mísení nebo za použití organických rozpouštědel, extrémně obtížná nebo dokonce nemožná. Tak například mísení obou složek ve formě taveniny je nevhodné, poněvadž je velmi dobře známé, že peptidy netají normálně a že při zvýšených teplotách, které se obvykle používají pro tavení polymerů, mají peptidy tendenci k degradaci. Nicméně dokonce v případě, že by peptidy byly v roztaveném stavu (což je pouze teoretický předpoklad), byly by vzhledem k následujícím termodynamickým důvodům neslučitelné s homo- nebo kopolyestery nebo nerozpustné v homo- polyesterech.

Peptidy jsou tvořeny makromolekulami a mají takto mnoho typických vlastností konvenčních polymerů. Jsou tudíž (při absenci specifických chemických nebo fyzikálních interakcí) zcela neslučitelné s dalšími makromolekulami (nebo jsou zcela nerozpustné v dalších makromolekulách), které mají odlišnou chemickou strukturu a strukturu základního polymerního řetězce, neboť volná energie mísení dvou nesourodých polymerních typů je vysoce pozitivní a není tudíž termodynamicky příznivá. V základním stavu jsou peptidy tvořeny vysoce polárními molekulami, které jsou značnou měrou vázány vodíkovými můstky, což má za následek, že entalpie mísení peptidů s homo- nebo kopolyestery (které jsou zase relativně nepolární a buď u nich neexistuje vodíková vazba nebo je slabá) je vysoce pozitivní, tzn. endotermní a termodynamicky nepříznivá. Kromě toho jsou makromolekuly, jak vyplývá z jejich podstaty, velké a tak mají nízkou vnitřní entropii, což má za následek, že entropii mísení dvou odlišných makromolekulárních subjektů je velmi nízká nebo dokonce negativní (o tom viz například: P. J. Florey, „Principles of Polymer Chemistry“, Cornell University, 1953, 555; L. Bohn, „Polymer Handbook“, 2. vyd., J. Wiley 1975, III-211; a L. Bohn, Rubber Chemistry and Technology, 1966, 493). Vzhledem k výše uvedenému nedojde při mísení peptidu s polyesterem při zvýšené teplotě v roztaveném stavu k mísení na molekulární úrovni, které by bylo nezbytné k tomu, aby došlo k tvorbě soli. Při pouhé smíšení peptidu a polyesteru tudíž nedojde k vytvoření požadované soli.

K obdobným potížím dochází při pokusech vytvořit soli peptidů a polyesterů za použití organických rozpouštědel, pokud není peptid alespoň do určité míry v uvedeném rozpouštědle rozpustný a pokud není tímto rozpouštědlem alespoň do určité míry zbobtnatelný. Rozpustnost polyesterů a peptidů je zcela odlišná. Rozpouštědla, která rozpouští peptidy, jako například voda, vůbec nerozpouští polyestery a obecně platí, že dobrá rozpouštědla polyesterů, jako například dichlormethan, naprosto nerozpouští peptidy. Ta rozpouštědla, která rozpouští jak peptid, tak i polyester, jako například dimethylsulfoxid, dimethylformamid, dimethylacetamid a N-methylpyrrolidon, vykazují zase nedostatky jiného typu, protože jsou relativně netěkavá a mají vysoké teploty varu a jsou tudíž extrémně těžko odstranitelná, přičemž některá z těchto rozpouštědel mají nepřijatelnou toxicitu. Bylo by možné najít některá rozpouštědla obou uvedených složek, která jsou těkavější a která jsou přijatelná i z hlediska toxicity, nicméně taková rozpouštědla mají zase jiné nedostatky. Tak například kyselina octová je rozpouštědlem jak peptidů, tak i polyesterů, avšak použití velkého množství kyselinového rozpouštědla predisponuje existenci ve formě acetátové soli (v důsledku jevu na bázi hmotnostního přebytku), takže odstranění kyseliny octové při okolní teplotě (tj. při teplotě 20 až 25 °C) nebo lyofilizací bude mít za následek fázové rozdělení peptidu a polyesteru, takže reakční směs nebude mít tendenci k tvorbě požadované soli.

Cílem vynálezu je proto poskytnout způsob přípravy soli tvořené kationtem bazického peptidu a aniontem polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou.

Příprava peptid-polyesterové soli podle vynálezu může být provedena za použití homo-kopolyesterů obsahujících karboxylové skupiny a peptidů, ve kterých se bazické zbytky vyskytují jako volná báze nebo jako soli slabé kyseliny, výhodně těkavé kyseliny, mající disociační konstantu kyseliny menší než 10^{-3} nebo pK_a ($pK_a = -\log_{10}K_a$, kde K_a je disociační konstanta

kyseliny větší než 3. Obzvláště výhodnou takovou bazickou peptidovou solí je sůl s kyselinou octovou. Nicméně vzhledem k inherentní neslučitelnosti obou uvedených makromolekulárních subjektů musí být použity specifické podmínky, za kterých může dojít k tvorbě uvedených peptid–polyesterových solí.

5

Jedním z prostředků, jak toho dosáhnout, je použití rozpouštědla, které rozpouští jak peptid, tak i polyester, za vzniku roztoku, ze kterého může být přímo odstraněno rozpouštědlo, přičemž zbyde buď za prvé obojetná sůl, nebo za druhé směs polyesteru a peptidu ve fyzikálním stavu, který predisponuje vytvoření obojetné soli v případě, že je uvedená směs dále zpracována.

10

Příkladem prvního přístupu je použití rozpouštědel, jakými jsou (následující výčet nemá omezující charakter) dimethylsulfoxid, dimethylformamid, dimethylacetamid a N–methylpyrrolidon, která jsou v podstatě neutrální a která mohou být rozpouštědla jak peptidu, tak i polyesteru. Jak již bylo uvedeno výše, jsou tato rozpouštědla za normálních okolností extrémně těžko odstranitelná, v důsledku jejich vysoké teploty varu a relativní netěkavosti. V případě, že se peptid (například acetátová sůl) a polyester rozpustí v jednom z těchto rozpouštědel, má peptid tendenci existovat jako sůl s polyesterem, poněvadž skupina mnohem silnější kyseliny mléčné nebo kyseliny glykolové v polyesteru vytěsni slabší karboxylovou kyselinu. Podstatné množství rozpouštědla a uvolněná kyselina octová (nebo jiná slabá avšak těkavá karboxylová kyselina) může být odstraněna za vakua, načež se zbylý roztok obsahující peptid–polyesterovou sůl přidá k destilované vodě za účelem vysrážení nerozpustné polymerní soli.

15

20

25

Použitá destilovaná voda je výhodně prosta oxidu uhličitého za účelem zabránění tvorbě uhličitánových solí vytěsněním polyesterového anionu. Rozpouštědlo zbylé v peptid–polyesterové soli může být potom odstraněno dalším promytím vodou, která je výhodně rovněž prosta oxidu uhličitého. V některých případech může být polymerní sůl izolována přímým vysrážením ve vodě, aniž by předtím bylo nezbytné odstranit rozpouštědlo, přičemž tento přístup je vhodný v případě, kdy je peptid použit jako báze.

30

35

Podle dalšího znaku vynálezu je zde tudíž poskytnut způsob přípravy soli obsahující bazický peptid a polyester ukončený karboxylovou skupinou, jehož podstata spočívá v tom, že se bazický peptid ve formě volné báze nebo ve formě soli se slabou kyselinou a polyester ukončený karboxylovou skupinou rozpustí v neutrálním polárním rozpouštědle, ve kterém, jsou obě uvedené složky rozpustné, načež se odstraní veškeré rozpouštědlo nebo jeho převážná část a zbylý koncentrovaný roztok se přidá k přebytku rozpouštědla nerozpouštějícího vytvořenou peptid–polyesterovou sůl.

40

45

Také druhý přístup je založen na použití rozpouštědla, které rozpouští jak peptid, tak i polyester, a toto rozpouštědlo musí být odstranitelné zmrazením a konvenční lyofilizací (mrazovou sublimací) nebo sušením rozprašováním. Základním rysem tohoto způsobu je odstranění rozpouštědla z peptid–polyesterové směsi extrémně rychle, tj. téměř okamžitě a výhodně při teplotě, která je nižší než teplota přechodu do skelného stavu polyesteru a peptidu. V tomto případě může být rozpouštědlo neutrální nebo kyselé a výhodně je tímto rozpouštědlem kyselina octová.

50

Takové extrémně rychlé odstranění rozpouštědla z roztoku, který v určité míře vykazuje viskózní tok nebo má viskoelastické chování, má za následek fázovou separaci obou neslučitelných makromolekulárních typů, ke které dochází v krajně malém koloidním měřítku. To znamená, že rezultující peptidpolyesterová směs má extrémně vysokou povrchovou plochu a povrchovou energii. V důsledku toho se v případě, že se k peptidpolyesterové směsi tohoto typu v podstatě prosté rozpouštědla přidá další odlišné rozpouštědlo polyesteru, které normálně nerozpouští peptid, spotřebuje se uvedená vysoká povrchová energie na tvorbu soli a vymizení koloidního charakteru peptidu v polyesteru. Vhodná rozpouštědla pro tento druhý přístup musí být lyofilizovatelná a zahrnují (následující výčet nemá omezující charakter) kyselinu octovou, směsi

dioxanu a vody a směsi terc.butanolu a vody, nebo musí být odstranitelné v průběhu sušení rozprašováním.

V rámci dalšího znaku vynálezu je zde poskytnout způsob přípravy soli obsahující bazický peptid a polyester ukončený karboxylovou skupinou, jehož podstata spočívá v tom, že se bazický peptid ve volné formě nebo ve formě soli se slabou kyselinou, například s kyselinou octovou, a polyester ukončený karboxylovou skupinou rozpustí v rozpouštědle, ve kterém jsou obě uvedené složky rozpustné a které je odstranitelné lyofilizací, načež se získaný roztok velmi rychle zmrazí, zmrazený roztok se lyofilizuje, získaná směs se disperguje v rozpouštědle polyesterové složky, načež se směs ponechá rozpustit v okamžiku, kdy se vytvořila peptid–polyesterová sůl.

Zejména se při tomto způsobu přidá roztok peptidu a kyseliny polymléčné nebo kopolymeru kyseliny mléčné a kyseliny glykolové v kyselině octové po kapkách ke kapalnému dusíku. To má za následek v podstatě okamžité zmrazení uvedeného roztoku v kyselině octové a v podstatě okamžitou tvorbu peptid–polyesterové směsi v podstatě prosté rozpouštědla. Lyofilizace provedená za účelem odstranění rozpouštědla tvořeného kyselinou octovou poskytne peptid–polyesterový produkt smíšený na extrémně jemné, koloidní úrovni. U mnoha peptidů se koloidní charakter takového materiálu demonstruje v případě, kdy se přidá rozpouštědlo polyesteru, například dichlormethan, a kdy se vytvoří extrémně jemná koloidní suspenze, přičemž za předpokladu, že zde existuje přebytek funkčních skupin karboxylové kyseliny, může být po případném stání získán čirý roztok a přebytečná povrchová energie se ztratí po vytvoření peptid–polyesterové soli. Namísto přidání po kapkách ke kapalnému dusíku mohou být k víceméně okamžitému zmrazení směsi peptidu, polyesteru a kyseliny octové použity i jiné postupy, například přidání po kapkách uvedené směsi ke směsi pevného oxidu uhličitého a hexanu.

Hypoteticky je ovšem možné učinit rozpustnou i zcela nerozpustnou sloučeninu v případě, kdy může být tato sloučenina převedena na částice s dostatečně malou střední velikostí. Za předpokladu, že částice má kulový tvar s poloměrem r , že má hustotu τ a povrchovou energii γ , potom taková částice bude mít přidruženou povrchovou energii $4\pi^2\gamma$. Tato částice bude mít také hmotnost $4/3\pi r^3$ a povrchová energie na jednotku hmoty bude tudíž rovna $3\pi\gamma/\tau r$.

Uvažujeme nyní dva případy nasycených roztoků:

i) převážná část pevného podílu je extrémně hrubá a má proto velmi malou povrchovou energii a nasycený roztok má v tomto případě koncentraci C_s . Potom je Gibbsova volná energie:

$$G^1_{\text{roztok}} = G_0 + RT \ln C_s = G^1_{\text{pevná fáze}}$$

ii) převážná část pevného podílu je tvořena extrémně malými částicemi s poloměrem r . Gibbsova volná energie roztoku, který je v rovnováze s extrémně malými částicemi, je:

$$G^2_{\text{roztok}} = G_0 + RT \ln C,$$

avšak pevná fáze má v tomto případě Gibbsovu volnou energii:

$$G^1_{\text{pevná fáze}} + 3\pi\gamma/\tau r,$$

$$\text{a } G^2_{\text{roztok}} + G_0 + RT \ln C = G^1_{\text{pevná fáze}} + 3\pi\gamma/\tau r.$$

Avšak z i) plyne, že

$$G^1_{\text{pevná fáze}} = G_0 + RT \ln C_s$$

a tudíž

55

$$G_0 + RT \ln C - 3\pi\gamma/tr = G_0 + RT \ln C_s$$

nebo

$$C = C_s e^3 / r,$$

takže, když se r zmenšuje, C (hypoteticky) vzrůstá.

V obvyklém případě má rozpustnost, které je dosaženo v důsledku malé velikosti částic a která je vyšší než normální rozpustnost, metastabilní charakter a dochází k růstu velikosti částic, například rozpouštěním a rekrystalizací, takže je účinek vysoké povrchové energie negován. Nicméně u směsi peptid–polyester s malou velikostí částic může dojít k tvorbě soli a tato tvorba poskytuje alternativní prostředek pro snížení povrchové energie koloidních částic v důsledku možnosti tvorby rozpustné obojetné soli, která ve formě roztoku představuje stav s nejnižší volnou energií.

Podle dalšího znaku vynálezu je zde poskytnout způsob přípravy soli obsahující bazický peptid a polyester ukončený karboxylovou skupinou, jehož podstata spočívá v tom, že se uvede v reakci bazický peptid ve formě soli se silnou kyselinou, jakou je chlorid nebo sulfát, s polyesterem, který je částečně nebo zcela ve formě soli karboxylové kyseliny s vhodným alkalickým kovem nebo kovem alkalických zemin, jakou je například sodná, draselná, vápenatá nebo hořečnatá sůl karboxylové kyseliny (mající hmotnostní střední molekulovou hmotnost menší než asi 10 000), přičemž soli s alkáliemi mohou být rozpuštěny nebo velmi jemně dispergovány ve vodě. Přidání takového roztoku nebo disperze k vodnému roztoku (výhodně prostému oxidu uhličitého) peptidu má za následek vysrážení ve vodě nerozpustné obojetné peptid–polyesterové soli.

Obdobně jsou nebo mohou být chloridové nebo sulfátové soli pegylovaných bazických peptidů (polyoxyethylenové konjugáty peptidů) částečně slučitelné s rozpouštědly (nebo rozpustné v rozpouštědlech), jakým je například dichlormethan, přičemž sodná nebo draselná sůl polyesterů ukončených karboxylovou skupinou může být rovněž rozpustná v dichlormethanu. V případě, že se tedy dvě takové soli smísí ve vhodných množstvích, vytvoří se rozpustná peptid–polyesterová sůl za současného vysrážení chloridu nebo síranu alkalického kovu.

Výše diskutovaná termodynamická neslučitelnost různých makromolekul je již známa celou řadou let, avšak byla zřídka brána v úvahu v souvislosti s prolongovaným uvolňováním peptidových účinných látek z polyesterové matrice. Nezbytným důsledkem této termodynamické neslučitelnosti nebo nerozpustnosti je to, že za normálních okolností jsou polyestery zcela nepropustné pro peptidové účinné látky. Aby mohlo dojít k partitně dependentní Fickianově difuzi peptidové účinné látky do polyesteru, musí být peptid do určité míry rozpustný v polyesteru. Avšak vzhledem k výše uvedenému tato rozpustnost neexistuje a tak je transport peptidu skrze polyester uvedenou Fickianovou difuzí nemožný.

Kromě toho i v případě, kdy je peptidová účinná látka nebo některý z jejích syntetických analogů do určité míry rozpustná v polyesteru nebo do určité míry slučitelná s polyesterem, což je teoretická argumentace, ani potom by nebyl možný transport skrze polyesterovou fázi difuzí. Je již dlouho známo, že volný objem v polyesteru, který existuje v důsledku rotační a translační mobility polyesterových segmentů a který by měl umožnit průchod difundujících molekul, je nedostatečně veliký k tomu, aby umožnil difuzi makromolekul s molekulovou hmotností vyšší než asi 500 (o tom viz například: R. W. Baker a H. K. Lonsdale, „Controlled Release: Mechanisms and Rates“ in „Controlled Release of Biologically Active Agents, nakl. A. C. Tanquary a R. E. Lacey, Plenum Press, 1974, 15 et seq.).

Nicméně i když je transport peptidové účinné látky skrze polyester Fickianovou difuzí v podstatě nemožný pro peptidy s molekulovou hmotností vyšší než asi 500, přesto bylo dosaženo kontinuálního uvolňování polypeptidů. V evropském patentu EP 58 481 je uvedeno, že lze

kontinuálního uvolňování peptidové účinné látky z polyesteru dosáhnout za použití velmi odlišných vlastností obou makromolekul, přičemž peptidy jsou hydrofilní a ve vodě rozpustné a polyestery jsou hydrofobní a ve vodě nerozpustné. U formulací popsanych v uvedeném patentu se uvolňování peptidové účinné látky dosahuje především skrze vodní póry, které se prvotně vytvoří pouhým vyloužením peptidu z domén při povrchu formulace nebo z domén peptidové účinné látky, které jsou souvislé nebo přilehlé k povrchu formulace. Toto loužení umožňuje počáteční fázi uvolňování peptidové účinné látky, načež následuje komplexní hydrolytická degradace polyesteru, která má za následek vytvoření dalších pórů v polyesteru, skrze které dochází k dalšímu uvolňování peptidu regulovanému degradací a erozí polyesteru. V případě, že uvedené vytvoření následných pórů hydrolytickou degradací polyesteru neprobíhá dostatečně rychle, je prvotní uvolňování mechanismem loužení ukončeno dříve, než dojde k vytvoření dostatečného množství pórů degradací polyesteru, což má za následek diskontinuální uvolňování peptidu. Parametry formulací popsanych v patentu EP 58 481 jsou proto zvoleny tak, aby k hydrolytické degradaci polyesteru došlo ve správný čas v relaci s prvotní fází uvolňování loužením, čímž se zajistí, že obě uvolňování se přerývají a to má zase za následek, že dochází ke kontinuálnímu uvolňování peptidové účinné látky.

Avšak, zatímco Fickianův difuzní transport peptidu skrze polyesterovou fázi je nemožný v případě uvedených jednoduchých peptid-polyesterových směsí, dochází ke zcela odlišné situaci v případě formulací peptid-polyesterových solí podle vynálezu, případně v přítomnosti volného polymeru. Ve formulacích obsahujících tyto látky neexistuje žádná separátní fáze tvořená samotným polyesterem. Kontinuální fáze, která reguluje uvolňování peptidu, je zde zcela částečně tvořena peptid-polyesterovou solí. Volný peptid je v této fázi peptid-polyesterové soli do určité míry rozpustný a tak je v těchto formulacích možná pravá Fickianova difuze peptidu v případě, že jsou splněny ostatní nezbytné předpoklady, mezi které patří například dostatečně účinný volný objem.

Vzhledem k tomu, že peptid-polyesterová sůl obsahuje vysoce hydrofilní segment, má formulace peptid-polyesterové soli mnohem vyšší absorpci vody než samotný polyester. Kromě toho je absorpce vody u těchto formulací ještě zvýšena v důsledku iontového charakteru peptid-polyesterové interakce a solvace iontů nebo iontových párů v makromolekulární soli vodou. To v podstatě znamená hydrogelový charakter peptid-polyesterové soli a zajišťuje zvýšení stupně mobility makromolekulárních segmentů v komplexu polykation-polyanion. To dále znamená, že se zvětší účinný volný objem matricového materiálu, který může takto vyhovovat průchod makromolekulárního peptidu.

Výsledným účinkem těchto vlastností peptid-polyesterové soli (případně v přítomnosti volného polymeru) je to, že je takto umožněn Fickianův difuzní transport makromolekulárního peptidu skrze matici peptid-polyesterové soli nebo skrze matici tvořenou směsí uvedené soli a volné polymerní fáze. To je zcela odlišná situace, než k jaké dochází v případě samotného polyesteru nebo v případě jednoduchých směsí peptidů a polyesterů a matrice nebo membrány s prolongovaným uvolňováním účinné látky, založené na zvýšené permeabilitě způsobené použitím peptid-polyesterové soli, tvoří základ formulací s prolongovaně regulovaným uvolňováním peptidů, které jsou dále popsány v této patentové přihlášce.

Peptid-polyesterové soli podle vynálezu takto poskytují nové a neočekávané výhody v oblasti parenterálních systémů uvolňujících účinnou látku na bázi roztoků nebo disperzí používajících různých směsí volných peptidových účinných látek, volných polyesterů a peptid-polyesterové soli a to jak ve vodných, tak i v nevhodných farmaceuticky přijatelných injekčních nosičích, a založených na podkožních implantátech, které mohou být injikovány intramuskulárně nebo subkutánně nebo implantovány a to vzhledem k nové a neočekávané rozpustnosti těchto peptid-obsahujících zbytků v lipofilních rozpouštědlech. Kromě toho mohou být formulace založené na těchto peptid-polyesterových solích, zejména formulace využívající vysoce lipofilní polyestery, rovněž podány i jinou cestou. Obzvláště důležité je perorální podání, při kterém mohou být za účelem dosažení dobrého výsledku použity různé kombinace peptid-polyesterové soli nebo/a

volné peptidové účinné látky nebo/a volného polyesteru. V mnoha případech je při perorálním podání výhodné použít farmaceuticky přijatelný nosič, jakým je rostlinný olej nebo jeho obměna, včetně mono-, di- a triglyceridů buď samotných nebo ve směsi s ostatními oleji.

- 5 Kromě evropského patentu EP 58 481, jsou výše uvedené publikace autorů Lawter a kol. a Okada a kol. jediným známým stavem techniky, který je autorům této patentové přihlášky znám a který se týká možnosti získání peptid-polyesterových solí, avšak obě uvedené publikace mají spekulativní charakter a neuvádím, jakým způsobem by tato předpokládaná interakce mohla být realizována nebo použita, Je dalším cílem vynálezu poskytnout farmaceutické formulace
10 s prodlouženým uvolňováním účinné látky obsahující různé kombinace peptid-polyesterové soli nebo/a volné peptidové účinné látky nebo/a volného polyesteru v různých množstvích za účelem získání alespoň tří různých profilů regulovaného uvolňování účinné látky.

- 15 V rámci dalšího znaku vynálezu je zde tedy poskytnuta farmaceutická kompozice obsahující peptid-polyesterovou sůl výše uvedeného typu nebo/a volnou peptidovou účinnou látku nebo/a volný polyester a případně další farmaceutickou pomocnou látku nebo další farmaceutické pomocné látky.

- 20 Koncepce farmaceutických kompozic podle vynálezu je založena na následujících aspektech. Zatímco samotná peptidová účinná látka je normálně rozpustná ve vodě, jsou jak její sůl s polyesterem, tak i volný polyester samotný normálně naprosto nerozpustné ve vodě (i když je známo, že velmi nízké oligomerní formy polyesterů a kopolyesterů, jakkoliv mohou být samy o sobě ve vodě nerozpustné, mohou být ve vodě rozpustné, jsou-li ve formě peptid-polyesterové soli). Avšak inkubace směsi peptidové účinné látky a polyesteru, ve které je veškerý peptid nebo
25 jeho část přítomen, resp. přítomna jako peptid-polyesterová sůl, ve vodných fyziologických tekutinách má za následek určitou degradaci polyesteru. Jestliže jsou vytvořené degradační produkty ve vodě nerozpustné, potom i degradující peptid-polyesterová sůl zůstane i nadále nerozpustná. Na druhé straně, jestliže polyester má prvotně dostatečně nízkou molekulovou hmotnost nebo obsahuje-li polymerní složku se stejně nebo obdobně nízkou molekulovou
30 hmotností, takže vznikají ve vodě rozpustné od polyesteru odvozené kyselé fragmenty, potom jsou tyto fragmenty (jako anionty) společně transportovatelné s polypeptidovým kationtem. Pro kompozice podle vynálezu s novou peptid-polyesterovou solí bylo prokázáno, že okamžitost uvolňování účinné látky je silně závislá na molekulové hmotnosti a distribuci molekulových hmotností uvedené polyesterové složky.

- 35 Distribuce molekulových hmotností je definována jako

$$40 \quad \frac{M_w}{M_n},$$

přičemž

$$45 \quad M_w \text{ (hmotnostní střední molekulová hmotnost)} = \frac{\sum w_i \cdot M_i}{w_i} = \frac{\sum n_i \cdot M_i^2}{n_i \cdot M_i}$$

$$a \quad M_n \text{ (číselná střední molekulová hmotnost)} = \frac{\sum n_i \cdot M_i}{\sum n_i}$$

- 50 kde

w_i znamená hmotnostní frakci polymerních molekul majících molekulovou hmotnost M_i a

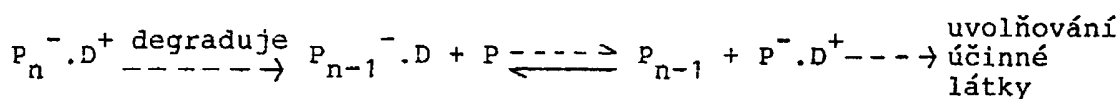
- 55 n_i znamená počet polymerních molekul majících molekulovou hmotnost M_i .

Distribuce molekulových hmotností bývá mnohdy označována jako polydisperzita a jsou velmi dobře známé hodnoty pro úzkou, normální nebo nejpravděpodobnější a širokou distribuci (viz například „polymer Handbook“, 2. vyd., J. Wiley 1975, IV-3). Je obecně přijato, že polydisperzita menší než 1,8 odpovídá úzké distribuci nebo nízké polydisperzitě, polydisperzita v rozmezí od 1,8 do 2,2 odpovídá normální nebo nejpravděpodobnější distribuci nebo normální polydisperzitě a polydisperzita vyšší než přibližně 2,2 odpovídá široké distribuci nebo vysoké polydisperzitě.

Pro podání peptidových účinných látek parenterální cestou, jakou je intramuskulární nebo subkutánní injekce nebo podkožní implantace depotního nebo uvolňovacího systému, jsou výhodné polyestery mající číselnou střední molekulovou hmotnost vyšší než 2000 nebo vnitřní viskozitu 1% (hmotn./obj.) roztoku v chloroformu při teplotě 25 °C vyšší nebo rovnou 0,08 dl/g a činicí až 4,0 dl/g (včetně). Pro jiné způsoby podání, například pro perorální podání, jsou výhodné číselné střední molekulové hmotnosti v rozmezí od 500 do 5000.

Z výše uvedené rozvahy, která byla zcela ignorována v rámci dosavadního stavu techniky, je zřejmé, že degradace polyesterů, zejména v přítomnosti bazického peptidu, za účelem získání dokonce i malé frakce ve vodě rozpustných odvozených fragmentů, jakož i časový interval pro její průběh budou regulovány molekulovou hmotností a distribucí molekulových hmotností. K podstatě bezprostřední degradaci na ve vodě rozpustné fragmenty dochází za použití úzké a normální distribuce polyesterů, majících hmotnostní střední molekulové hmotnosti nižší než asi 10 000, resp. nižší než asi 15 000 (v závislosti na typu distribuce molekulových hmotností), přičemž obecně platí, že čím nižší je polydisperzita polyesteru, tím nižší se požaduje hmotnostní střední molekulová hmotnost za účelem dosažení bezprostřední degradace na ve vodě rozpustné fragmenty. V případě polyesterů s hmotnostní střední molekulovou hmotností vyšší než 15 000 se vyžaduje normální nebo široká distribuce. I když to opět částečně na povaze a typu distribuce molekulových hmotností, obecně platí, že čím vyšší je hmotnostní střední molekulová hmotnost, tím vyšší musí být polydisperzita, aby se dosáhlo brzké degradace na ve vodě rozpustné fragmenty.

Pro kompozice obsahující polyester nebo kopolyester a peptid, ve kterých je část peptidu nebo veškerý peptid obsažen ve formě peptid-polyesterové soli a které případně obsahují volný polyester, mohou být získány tři různé profily uvolňování účinné látky. První z těchto profilů se získá v případě, kdy dojde k degradaci polyesteru za účelem dosažení v podstatě bezprostřední tvorby kyselých ve vodě rozpustných nebo hydrofilních fragmentů, v důsledku čehož dochází k bezprostřednímu uvolňování peptidu podle následujícího mechanismu:



sůl polymeru a účinné látky, která je zcela nerozpustná ve vodě

kde P znamená degradovaný ve vodě rozpustný nebo hydrofilní fragment, však $P_{n-1}^- \cdot D^+$ je ve vodě nerozpustný

kde $P^- \cdot D^+$ je ve vodě rozpustný účinný materiál a P_{n-1} je ve vodě nerozpustný degradovaný polymer

(P = ve vodě rozpustný degradovaný polyesterový fragment nebo ve vodě nerozpustný degradovaný polyesterový fragment, který je učiněn ve vodě rozpustným v případě, že je přítomen ve formě soli s bazickým peptidem, a

D = bazický peptid).

V tomto prvním případě kompozice buď může obsahovat veškerou účinnou látku ve formě peptid–polyesterové soli nebo může obsahovat vedle určitého podílu peptid–polyesterové soli i určitý podíl volné, nevázané účinné látky, přičemž v obou případech může být v kompozici případně přítomen také volný polymer. Nicméně polymer degraduje na ve vodě rozpustné fragmenty v přítomnosti peptidu téměř bezprostředně, což má za následek, že započne téměř bezprostředně pravidelné a plynulé uvolňování peptidu. Je třeba poznamenat, že difuze volného ve vodě rozpustného peptidu skrze degradující kompozici je usnadněna zvýšenou permeabilitou matrice v důsledku přítomnosti peptid–polyesterové soli v kontinuální fázi, což moduluje uvolňování účinné látky.

Ke druhému z uvedených uvolňovacích profilů dochází v případě, že peptidová účinná látka je přítomna jako peptid–polyesterová sůl (případně v přítomnosti volného polyesteru), avšak polyester nedegraduje bezprostředně na ve vodě rozpustné fragmenty. To má za následek určitý počáteční interval, v průběhu kterého nedochází k žádnému uvolňování peptidové účinné látky. I když peptid–polyesterová sůl zvyšuje permeabilitu matrice pro difuzi volného peptidu, k difuzi nedochází, neboť zde není k dispozici žádný volný peptid, který by mohl takto difundovat skrze matrici. Veškerý peptid je zde ve formě ve vodě nerozpustné peptid–polyesterové soli a teprve po určité významně dlouhé časové periodě dochází k degradaci polyesteru na ve vodě rozpustné fragmenty a k poskytnutí volné a transportovatelné účinné látky. To má za následek prodlouženou indukční periodu, v průběhu které zpočátku nedochází k žádnému uvolňování peptidu, a k uvolňování účinné látky dochází až po uplynutí této indukční periody. Tento druhý případ je ideální pro časované a pulzní uvolňování rozpustných vakcín a peptidů.

Ke třetímu profilu uvolňování účinné látky dochází v případě, kdy se formulace založená na systému peptid–polyesterové soli, který obsahuje peptidovou účinnou látku jak ve volné formě, tak i ve formě peptid–polyesterové soli a případně volný polyester, a ve které má polyester hmotností střední molekulovou hmotnost vyšší než asi 15 000 (a výhodně vyšší než asi 30 000) a úzkou nebo nepravděpodobnější distribuci molekulových hmotností, zavede do fyziologického prostředí, jaké lze nalézt v intramuskulárních a subkutánních injekčních místech, v důsledku čehož může dojít k diskontinuálnímu uvolňování účinné látky. V první fázi dojde k uvolňování v důsledku přítomnosti volné peptidové účinné látky a její transportovatelnosti skrze permeabilnější systém na bázi peptid–polyesterové soli. Jestliže je tato první fáze uvolňování volné peptidové účinné látky ukončena ještě dříve, než v peptid–polyesterové soli dojde k degradaci polyesteru a takto k získání dalšího podílu volné peptidové účinné látky, potom bude mít uvolňování účinné peptidové látky diskontinuální charakter.

Je samozřejmé, že jestliže zde nebude existovat žádný interval, ve kterém by byla volná peptidová účinná látka v kompozici v průběhu její degradace nepřítomna, potom bude dosaženo kontinuálního uvolňování účinné látky. Tento profil uvolňování je podobný profilu popsanému v evropském patentu EP 58 481, avšak mechanismus uvolňování účinné látky a látky použité v evropském patentu EP 58 481 (není zde použita peptid–polyesterová sůl) jsou zcela odlišné od mechanismu a látek definovaných v této patentové přihlášce. V závislosti na profilu uvolňování jsou tyto směsi ideální pro kontinuální uvolňování peptidů, proteinů a rozpustných vakcín.

Jak již bylo uvedeno výše jsou tyto systémy na bázi peptid–polyesterové soli, jejich fyzikálně-chemické charakteristiky a mechanismus, jakým u nich dochází k uvolňování peptidu zcela odlišné od systémů popsaných v evropském patentu EP 58 481 a v evropském patentu EP 52 510, jakož i dalších publikacích vztahujících se k uvolňování peptidu z homo– a kopolymerů kyseliny mléčné a kyseliny glykolové. Ze všech těchto publikací jsou pouze v evropském patentu EP 58 481 a ve výše uvedených publikacích autorů Lawtera a kol. a Okada a kol. učiněny zmínky o tvorbě soli rezultující z iontové interakce skupin polyesterkarboxylových kyselin a bazických aminokyselin v peptidech, avšak zde popsané kompozice neobsahují sůl tvořenou peptidovou účinnou látkou a polyesterem. Tyto publikace dosavadního stavu techniky však mají spekulativní obsah, neboť jednoznačně netvrdí, že k uvedené interakci může skutečně dojít, ani nedemonstrují, jak mohou být takové peptid–polyesterové soli připraveny a izolovány a potom

použity za účelem uvolňování peptidů na základě jejich neočekávané rozpustnosti v lipofilních organických rozpouštědlech.

Z vlastností peptid–polyesterových směsí, které předurčují uvolňování účinné látky a které až dosud nebyly nikde uvedeny, lze jmenovat počet bazických funkčních skupin v peptidu a počet karboxylových skupin v polyesteru. Výše uvedené publikace rovněž mlčí, pokud jde o pozoruhodné a neočekávatelné účinky vyplývající z použití peptid–polyesterových solí a překvapivě vysokou permeabilitu systému obsahujícího zcela nebo částečně peptid–polyesterovou sůl ve srovnání s permeabilitou polyesteru samotného nebo směsí, ve kterých jsou obě složky pouze smíšený a které tudíž neobsahují žádnou peptid–polyesterovou sůl.

Tento rozdíl permeabilit může být demonstrován jednoduchým experimentem v difuzní komůrce, ve které kontinuální a defektů prostá polyesterová membrána, dělicí komůrku na dvě oddělení, z nichž jedno obsahuje vodný roztok peptidu a druhé obsahuje samotnou vodnou fázi, neumožňuje transport peptidu skrze tuto membránu dříve, než dojde k výrazné degradaci polyesteru tvořícího membránu. Na rozdíl od toho umožňuje membrána obsahující zcela nebo částečně peptid–polyesterovou sůl transport peptidové účinné látky skrze sůl–obsahující membránu partitně dependentní difuzní a to dokonce i v případě, kdy peptid má molekulovou hmotnost vyšší než 500.

Peptid–polyesterové soli podle vynálezu mají mnoho dalších překvapujících a užitečných výhodných vlastností, které byly neznámé u všech obdobných dosud známých materiálů, které jsou obzvláště užitečné při koncepci a při výrobě farmaceutických systémů uvolňujících účinnou látku. Jednou z nejvyužitelnějších z těchto vlastností je dobrá rozpustnost peptidu v případě, že se nachází ve formě polyesterové soli, v organických rozpouštědlech, ve kterých jsou peptidy normálně naprosto nerozpustné. V oblasti farmaceutického průmyslu tato skutečnost poskytuje mnoho výhod a umožňuje použití nových způsobů a postupů při výrobě farmaceutických systémů umožňujících prodloužené uvolňování farmakologicky účinných látek. Zejména je takto usnadněna aseptická příprava uvedených farmaceutických kompozic. Tyto způsoby a postupy, jakož i látky při nich použité jsou zcela odlišné od materiálů a postupů použitých v rámci dosavadního stavu techniky.

Roztoky peptid–polyesterové soli, které případně obsahují volný polymer nebo/a volný peptid v rozpuštěné nebo dispergované formě, mohou být takto podrobeny sterilizující filtrací, čímž jsou eliminovány problémy normálně spojené se sterilní přípravou pevných nebo suspenzních peptidových formulací. Roztok peptid–polyesterové soli podrobený sterilizující filtrací může být proto vystaven různým farmaceutickým sušicím postupům v aseptickém prostředí. Výhodnými postupy, které mohou být snadno prováděny za aseptických podmínek, jsou sušení rozprašováním, vymrazovací rozprašování a ostatní sušicí techniky, které poskytují pevné částice.

Obzvláště užitečná je tvorba mikročastic, jejichž velikost leží v rozmezí od 0,2 do 500 μm a které mohou být suspendovány ve farmaceuticky přijatelné injekčním nosiči. Takové mikročástice mohou být suspendovány bezprostředně před aplikací ve vodném injekčním prostředí, nebo mohou být alternativně suspendovány v organickém injekčním nosiči, který nerozpouští použité látky. Pro systémy s prodlouženým uvolňováním účinných látek založené na homo– nebo kopolymerech kyseliny mléčné a kyseliny glykolové jsou vhodnými organickými nosiči vysoce lipofilní olejem, jakými jsou (následující výčet nemá omezující charakter) ethyleoleát, izopropylmyristát, rostlinné oleje a různé mastné glyceridy. Za určitých okolností je výhodné použít směsi uvedených lipofilních nosičů.

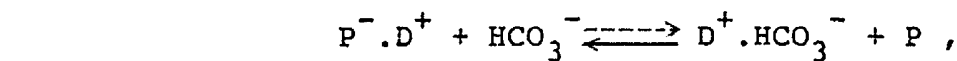
Jakkoliv jsou takové lipofilní nosiče látkami, které nerozpouští uvedené systémy na bázi kyseliny mléčné a kyseliny glykolové, jsou tyto nosiče nevhodné pro použití ve spojení s vysoce lipofilními polyesterami, jakými jsou polyesterami na bázi hydroxy–kyselin s dlouhým řetězcem, například na bázi kyseliny hydroxystearové. Pro takové vysoce lipofilní polyesterami nebo kopolyesterami jsou výhodné hydrofilní organické injekční nosiče, jakými jsou (následující výčet

nemá omezující charakter) propylenglykol a polyethylenglykol s nízkou molekulovou hmotností. Pro systémy s prolongovaným uvolňováním účinné látky na bázi lipofilnějších polymerů jsou zřejmě vhodné i vodné injekční nosiče.

- 5 Alternativní způsob přípravy mikročastic využívá další neočekávanou a výhodnou vlastnost peptid–polyesterové soli podle vynálezu. Tato peptid–polyesterová sůl je tvořena hydrofilním peptidem, který by termodynamicky preferoval existenci nebo rozpouštění ve vodném nebo polárním prostředí nebo ve vodné nebo polární fázi, a polyesterovým řetězcem, který je hydrofilní a který by termodynamicky preferoval rozpouštění v hydrofobní fázi. To znamená, že peptid–polyesterová sůl má obojetný charakter a povrchově aktivní vlastnosti, které nejsou k dispozici u samotných peptidových solí. Tato povrchová aktivita má za následek, že peptid–polyesterová sůl preferuje existenci na fázovém rozmezí, přičemž vzhledem k obecnému charakteru soli (podíl a délka hydrofobního řetězce), je pro peptid–polyesterovou sůl termodynamicky nejstabilnějším typem disperze ve výrazně vodné fázi existence ve formě disperze ve vodě (poněvadž kritická micelární koncentrace je velmi nízká a ne všechna sůl může existovat při mnoha situacích na fázovém rozmezí).

Lze tudíž uvést, že peptid–polyesterová sůl je extrémně účinným dispergačním činidlem pro přípravu a udržování stability vodných disperzí. Při tomto druhém způsobu přípravy mikroparticulárních farmaceutických formulací se peptid–polyesterový roztok (například v dichlormethanu) jednoduše disperguje ve vodné fázi, která může případně obsahovat viskozitu-zvyšující polymer, jakým je (uvedený příklad nemá omezující charakter) polyvinylalkohol, přičemž se využívá povrchově aktivních vlastností peptid–polyesterové soli. I když některé organické roztoky obsahující takové peptid–polyesterové soli dispergují spontánně, obecně platí, že je při přípravě vodné disperze zapotřebí použít určitý typ míchání nebo mechanismus vyvolávající stříhové namáhání.

Jak již bylo uvedeno výše, je dalším výhodným znakem tohoto způsobu, že se operace, jako uvedené dispergování ve vodě, účinně provádějí v nepřítomnosti oxidu uhličitého a v inertní atmosféře. Dále je výhodné, jestliže je organický roztok peptid–polyesterové soli prostý oxidu uhličitého, neboť koncentrace oxidu uhličitého ve vzduchu a ve vodě za normálních podmínek je ve srovnání s koncentrací karboxylových skupin kyseliny polyesterkarboxylové natolik vysoká, že by oxid uhličitý mohl takto vzhledem k uvedenému přebytku reagovat v rámci konkurenční tvorby soli podle rovnice:



kde P znamená polyester a D znamená peptidovou účinnou látku. Získané vodné disperze mohou být potom vysušeny různými postupy, například odstraněním organického rozpouštědla za vakua a následnou lyofilizací nebo přímým odstraněním rozpouštědla i vody v jediném lyofilizačním kroku. Získaný produkt může být potom použit výše uvedeným způsobem pro přípravu farmaceutického přípravku pro injekce.

Další alternativní způsob přípravy mikroparticulárních farmaceutických formulací používá v podstatě suchý roztok peptid–polyesterové soli, obsahující koloidně dispergovaný volný peptid, ve vhodném organickém rozpouštědle nebo nosiči (výraz „v podstatě suchý“ je zde použit proto, že je z principu nemožné odstranit veškeré stopy vody z peptidu a dále tento výraz znamená, že žádná z účinných látek neexistuje jako vodný roztok v separátní vodné fázi). Finální forma se získá po přidání rozpouštědla nerozpouštějícího polymer za intenzivního míchání, následném přidání peptid–polyesterové soli z bobtnaté rozpouštědlem (která případně obsahuje volný polymer a která případně obsahuje volnou účinnou látku) k velkému objemu druhého ne–rozpouštědla za účelem dalšího vytvrzení a stabilizování vysrážených mikročastic. Je zřejmé, že za vhodných podmínek nebo v přítomnosti vhodných povrchově aktivních činidel, jakými jsou

(následující výčet nemá omezující charakter) estery mastných kyselin a sorbitolu, může být vysrážení mikročástic provedeno za použití jediného ne-rozpouštědla polyesteru, jakým je např. parafinický uhlovodík, jakým je hexan.

- 5 Mikročástice získané různými výše popsány postupy jsou strukturně zcela odlišné od mikrokapslí připravených způsobem popsány v evropských patentech EP 52 510 (Syntex) a EP 145 240 (Takeda), při kterých jsou peptidy zapouzdřeny do fáze samotného polyesteru. Mikrokapule jsou definované jako jedno nebo několik jader sloučeniny nebo látky v kontinuální druhé fázi, takže kontinuální povlak z materiálu druhé fáze zcela uzavírá nebo mikrozapouzdřuje
- 10 materiál jader, takže žádný z materiálů jader se nenachází na povrchu mikrokapslí, přičemž si mikrozapouzdřený materiál jader zachovává ve všech ohledech fyzikálně-chemické a termodynamické vlastnosti sloučeniny nebo materiálu nezapouzdřené, resp. nezapouzdřeného v kontinuální fázi.
- 15 V evropském patentu EP 52 510 se k ovrstvení kapiček zředěného vodného roztoku peptidu používá fázově-separačního koacervačního postupu, přičemž samotný polymer tvoří okolo vodných kapiček kontinuální povlak. To znamená, že se jedná o pravé mikrokapsle, které mají geometrii a tvar mikrokuliček. Po izolaci vysrážených mikrokapslí a jejich vytvrzení a vysušení se získá produkt, ve kterém peptidová účinná látka existuje ve formě diskrétního jádra nebo
- 20 diskrétních jader uvnitř polymerního obalu. Vzhledem k obsahu vody uvnitř mikrokapsle přes sušením, může mít odstranění vody v průběhu dehydratačního procesu při teplotě nižší, než je teplota přechodu do skelného stavu polymeru, za následek vytvoření částice, která je značně perforována. V žádném stupni nezahrnují způsob a materiály použité a popsané v evropském patentu EP 52 510 peptid-polyesterovou sůl a v uvedeném patentu popsány způsob neumožňuje
- 25 sterilizující filtraci peptid-polyesterového roztoku nebo peptid-polyesterové suspenze v případě, kdy je žádoucí získat aseptický produkt.

Kromě toho popisuje uvedený patentový dokument specifické použití polyesterů založených na kyselině mléčné nebo/a glykolové, popsány v patentu US 3 773 919 (Boswell), které jsou

30 v tomto patentovém dokumentu popsány jako produkty rozpustné v benzenu při teplotě 25 °C. V rámci vynálezu jsou uváděny jako výhodné polyestery odvozené od kyseliny mléčné nebo/a kyseliny glykolové, které jsou nerozpustné v benzenu, avšak rozpustné v chloroformu, a to vzhledem k relativně krátkým uvolňujícím periodám, tj. periodám kratším než dva měsíce.

- 35 V evropském patentu EP 190 833 (Takeda) je popsán peptid fixovaný ve formě zgelovatělého vodného roztoku účinné látky, přičemž tato vodná zgelovatělá fáze se disperguje v polymerním roztoku. Tato disperze typu voda(vodný gel účinné látky)-v-oleji (polymerní roztok) se potom zase disperguje při aplikaci stříhového napětí ve vodě za vzniku dvojnásobné disperze typu voda-v-oleji-ve-vodě. Po odstranění organického rozpouštědla za vakua a lyofilizaci se získají
- 40 mikrokapsle, ve kterých je systém účinná látka/želatizační činidlo zapouzdřen samotným polymerem. Produkty tohoto způsobu obsahují účinnou látku ve formě jednoduché soli a nikoliv ve formě polymerní soli peptidu, Farmaceutické formulace podle vynálezu mají tedy strukturu, fyzikálně-chemické vlastnosti a termodynamické vlastnosti, které jsou zcela odlišné od parametrů produktů popsány v evropských patentových spisech EP 52 510, EP 145 240
- 45 a EP 190 833, ve kterých jsou uváděny mikrokapsle mající tvar a geometrii mikrokuliček, ve kterých jsou jádro nebo jádra tvořená účinnou látkou zcela uzavřena samotným polymerem.

Produkty podle vynálezu mohou mít (i když nemusí) také geometrii a tvar mikrokuliček, avšak vůbec nejsou mikrokapslemi ve výše definovaném smyslu a jsou spíše roztoky

50 peptid-polyesterové soli (které případně také obsahují volný polymer), nebo jsou mikrokapslemi, ve kterých je volná peptidová účinná látka zapouzdřena v kontinuální fázi nebo povlaku tvořeném, resp. tvořeném solí polymer-účinná látka, přičemž i zde může být případně obsažen volný polymer. Jak již bylo uvedeno výše, jsou permeabilitní vlastnosti také v soli polymer-účinná látka zcela odlišné od permeabilitních vlastností samotného polymeru, takže produkty podle

55 vynálezu uvolňují jejich obsah peptidové účinné látky způsobem, který je zcela odlišný od

způsobu popsaného v evropských patentech EP 52 510, EP 145 240 a EP 190 833, které spadají do dosavadního známého stavu techniky.

- 5 Další provedení vynálezu takto zahrnuje buď přípravu mikrosfér (mikrokuliček), které nejsou mikrokapslemi za použití roztoku peptid–polyesterové soli, případně obsahující volný polymer, nebo přípravu mikrosfér, které jsou mikrokapslemi, avšak které obsahují volnou účinnou látku zapouzdřenou fází nebo povlakem tvořenou, resp. tvořeným peptid–polyesterovou solí, obsahující případně volný polymer.
- 10 Takové různé částice mohou být připraveny různými odlišnými způsoby, jakými jsou srážení, fázově separační koacervace, sušení rozprašováním a vymrazovací rozprašování. Výhodná velikost částic se pohybuje od 0,2 do 500 μm a uvedené částice mohou být injikovány ve formě suspenze ve vhodném injekčním nosiči.
- 15 Obzvláště účinné a užitečné parenterální farmaceutické formulace peptidových účinných látek mohou být rovněž připraveny ve formě roztoků účinná látka–polyesterové soli, rovněž případně obsahujících volný polyester a rovněž případně obsahujících dispergovanou nebo rozpuštěnou volnou účinnou látku, v rozpouštědle, které rozpouští volný polyester, avšak které nerozpouští peptidy a jejich jednoduché soli, jakými jsou například chloridy a acetáty.
- 20 Předmětem vynálezu je proto farmaceutická kompozice s prolongovaným uvolňováním účinné látky obsahující peptidovou účinnou látku a polyester, jejíž podstata spočívá v tom, že má formu roztoku obsahujícího
- 25 a) bazickou peptidovou účinnou látku výše definovaného typu, mající molekulovou hmotnost rovnou alespoň 300 a výhodně rovnou alespoň 800, přičemž tato bazická peptidová účinná látka je ve formě soli s polyesterem a tato sůl obsahuje kation bazického peptidu a anion polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou,
- 30 b) farmaceuticky přijatelné organické rozpouštědlo, které je rozpouštědlem pro volný polyester a které však není rozpouštědlem pro volný peptid,
- c) přebytek polyesteru a případně
- 35 d) přebytek volné peptidové účinné látky v rozpuštěné nebo koloidně dispergované formě.

Vhodnými bazickými peptidy a polyestery ukončenými karboxylovou skupinou jsou peptidy a polyestery, které již byly definovány výše, přičemž obzvláště výhodnými peptidy jsou syntetické výše definované LHRH–analogy.

- 40 Vhodná farmaceuticky přijatelná organická rozpouštědla pro soli polyester–peptidová účinná látka, ve kterých je polyester založen na homo– a kopolymerech kyseliny mléčné a kyseliny glykolové, jsou (následující výčet nemá omezující charakter) benzylbenzoát, benzylalkohol, ethyllaktát, glyceryltriacetát, estery kyseliny citronové, polyethylenglykoly s nízkou molekulovou hmotností (nižší než 1000), alkoxyethylenglykoly a polyethylenglykolacetáty a podobně,
- 45 přičemž výhodnými rozpouštědly jsou benzylbenzoát a benzylalkohol, zejména benzylbenzoát.

- Jediným požadavkem kladeným na takové organické rozpouštědlo je, aby bylo farmaceuticky přijatelné a aby v něm byla rozpustná polyester–peptidová sůl. O tom, zda má být použito jediné
- 50 takové rozpouštědlo nebo zda má být použita směs takových rozpouštědel a zda jsou použita rozpouštědla vhodná, se lze přesvědčit jednoduchými rutinními experimenty. Homo– a kopolymery kyseliny mléčné a kyseliny glykolové patří mezi nejpolárnější a nejlipofilnější polyestery a tak se nebudou rozpouštět v takových organických injekčních rozpouštědlech, jakými jsou ethyleléát, rostlinné oleje a ostatní lipofilní nosiče, avšak homo– a kopolymery na bázi lipofilních mono-

merů a komonomerů nebo lipofilních hydroxy-kyselin, jakou je kyselina hydroxy-stearová, jsou rozpustné v takových lipofilních injekčních nosičích.

5 Poměr peptidové účinné látky k polyesteru, pokud jde o pevné podíly, které se rozpustí za vzniku roztokové kompozice podle vynálezu, se bude přirozeně měnit v závislosti na potenci peptidové účinné látky, na charakteru použitého polyesteru a na požadované periodě uvolňování peptidové účinné látky.

10 Výhodná koncentrace peptidové látky se pohybuje od 0,1 do 30 % (hmotn./obj.). Obecně je optimální obsah účinné látky závislý na molekulové hmotnosti polyesteru a na jeho distribuci molekulových hmotností, na požadované periodě uvolňování účinné látky a na potenci peptidové účinné látky. Je zřejmé, že v případě relativně málo potentní účinné látky bude zapotřebí, aby tato účinná látka byla inkorporována ve vyšší koncentraci.

15 Absorpce vody kompozicí je důležitým faktorem, pomocí kterého lze kontrolovat rychlost hydrolytického štěpení polyesteru, přičemž rychlost absorpce vody je do určité míry dána obsahem účinné látky v kompozici. V případech, kdy je žádoucí dosáhnout relativně rychlého uvolňování účinné látky v průběhu relativně krátké časové periody, tzn. v průběhu tří měsíců, může být vhodné použít obsah účinné peptidové látky rovný až 30 %.

20 Monomerní složení kopolyesteru, například poměr laktidu ke glykolidu v laktid-glykolidovém polyesteru, je rovněž důležité pro stanovení rychlosti degradace polyesteru a uvolňování peptidové účinné látky. Doba trvání uvolňování je rovněž částečně určena hmotnostní střední molekulovou hmotností polyesteru, avšak množství peptidové účinné látky, které může být inkorporováno ve formě soli účinná látka-polyesteru, je určeno číselnou střední molekulovou hmotností. To znamená, že polydisperzita (tj. poměr hmotnostní střední molekulové hmotnosti k číselné střední molekulové hmotnosti) je důležitým parametrem.

30 Tak pro doby trvání uvolňování peptidové účinné látky od jednoho do pěti měsíců jsou výhodné kompozice obsahující polyestery s hmotnostní střední molekulovou hmotností od 4000 do 20 000 s polydisperzity od 1,2 do 2,2 a obsahy peptidové účinné látky od 0,1 do 30 %. Obecně platí, že čím nižší je obsah účinné látky, tím nižší musí být hmotnostní střední molekulová hmotnost a tím vyšší musí být polydisperzita polyesteru. Pro delší časové periody uvolňování účinné látky, tj. pro periody od dvou do šesti měsíců, je výhodné použít obsahy peptidové účinné látky od 0,1 do 20 % a polyestery mající hmotnostní střední molekulové hmotnosti od 8000 do 20 000 a polydisperzity od 1,5 do více než 2,2. Pro časové periody uvolňování účinné látky delší než 6 měsíců jsou výhodné obsahy peptidové účinné látky od 0,1 do 10 % a polyestery mající hmotnostní střední molekulové hmotnosti od 20 000 do 50 000 a polydisperzity vyšší než 1,8.

40 Míra inkorporace celkového peptid-polyesterového pevného podílu v kompozici se bude přirozeně měnit v závislosti na potenci peptidové složky, na požadované časové periodě, v průběhu které má docházet k uvolňování peptidové účinné látky, na rozpustnosti všech pevných složek ve zvoleném rozpouštědle a na objemu a viskozitě roztokové kompozice, která má být aplikována.

45 Viskozita roztokové kompozice podle vynálezu je určena molekulovou hmotností polyesteru a obsahem peptidové účinné látky. Obecně jsou roztoky obsahující více než asi 40 % (hmotn./obj.) směsi soli peptidová účinná látka-polyester, volné účinné látky a volného polymeru, kde polyester má hmotnostní střední molekulovou hmotnost vyšší než 8 000, obtížně aplikovatelné injekcí kvůli jejich viskozitě. Pro tyto polyestery jsou tedy výhodné roztokové kompozice s obsahem výše uvedené směsi menším nebo rovným 40 % (hmotn./obj.). Pro roztokové kompozice obsahující polyestery s hmotnostní střední molekulovou hmotností od asi 8000 do asi 20 000 jsou výhodné koncentrace výše uvedené směsi menší nebo rovné 30 % (hmotn./obj.) a pro roztokové kompozice obsahující polyestery s molekulovou hmotností od asi 20 000 do asi 50 000 jsou výhodné koncentrace nižší nebo rovné 20 % (hmotn./obj.). Za

určitých okolností, například v případě, kdy je žádoucí injikovat kompozici za použití velmi tenké jehly, mohou být výhodné roztoky s velmi nízkou viskozitou a uvedená koncentrace by mohla být snížena na 2 % (hmotn./obj.) nebo by mohlo být použito ještě nižší koncentrace, přičemž zde bude ovšem rovnováha mezi snížením viskozity a zvýšením objemu, který má být injikován.

V rámci dalšího znaku vynálezu je zde poskytnut způsob přípravy kompozice podle vynálezu, který zahrnuje:

- 1) rozpuštění dokonale promísené směsi bazické peptidové účinné látky a polyesteru ve farmaceuticky přijatelném rozpouštědle nebo
- 2) pomalé přidávání roztoku peptidové účinné látky v alkanolu obsahujícím 1 až 6 uhlíkových atomů k roztoku polyesteru v rozpouštědle vhodném pro injekci, načež se v případě, že alkanolové rozpouštědlo není farmaceuticky přijatelné pro injekci, toto rozpouštědlo odstraní odpařením, nebo v případě, že toto alkanolové rozpouštědlo je farmaceuticky přijatelné pro injekci, nemusí být toto rozpouštědlo nezbytně odstraněno.

Dokonale promísená směs bazické peptidové účinné látky a polyesteru, použitá při výše uvedeném způsobu 1), se výhodně získá rozpouštěním bazického peptidu a polyesteru v rozpouštědle nebo ve směsi rozpouštědel, která jsou schopná rozpustit jak bazickou peptidovou účinnou látku, tak i polyester a která jsou schopná lyofilizace. Vhodnými příklady takových rozpouštědel nebo rozpouštědlových směsí jsou ledová kyselina octová a směsi dioxanu a vody. Následuje lyofilizace takto získaného roztoku. Alternativně mohou být obě složky rozpuštěny například v dimethylsulfoxidu, načež se rozpouštědlo odstraní.

Uvedená dokonale promísená směs může být také získána rozpuštěním peptidové účinné látky v hydroxylovém rozpouštědle, například v methanolu, a přidáním získaného roztoku k roztoku polyesteru například v dichlormethanu, načež následuje odstranění rozpouštědel například odpařením.

Alternativně může být vodný roztok peptidové účinné látky ve formě chloridové soli přidán k vodnému roztoku nebo disperzi sodné soli polyesteru, načež se získaná směs lyofilizuje za vzniku směsi soli peptidová účinná látka–polyester a chloridu sodného. Posledně uvedená látka může být případně odstraněna rozmícháním produktu v organickém rozpouštědle a odfiltrováním nerozpuštěného chloridu sodného.

Při způsobu 1) může být rozpouštění dokonale promísené směsi ve farmaceuticky přijatelném rozpouštědle urychleno zahříváním nebo/a mícháním reakční směsi.

Při způsobu 2) je vhodným alkanolovým rozpouštědlem pro peptid například methanol, ethanol nebo propylen-1,2-diol.

Hlavní výhodou farmaceutických produktů s obsahem peptidové účinné látky ve formě roztoků soli tvořené polyesterem a peptidovou účinnou látkou, obsahujících případně volnou účinnou látku nebo/a volný polyester, je to, že příprava injikovatelného produktu ve sterilní formě pro bezprostřední použití bez nutnosti předběžného směřování před podáním pacientovi může být provedena za použití sterilizující filtrace. Tato filtrace je mnohem jednodušší zpracovatelskou operací než sterilizace pevného nebo suspenzního produktu. Alternativní způsob přípravy sterilních injikovatelných roztoků spočívá v tom, že se rozpustí sterilní sůl tvořená polyesterem a peptidovou účinnou látkou, případně obsahující volnou účinnou látku nebo/a volný polyester, ve farmaceuticky přijatelném organickém injekčním nosiči.

Jakkoliv jsou těmito formulacemi převážně formulace pro parenterální podání, může být sůl tvořená polyesterem a účinnou látkou podle vynálezu použita i pro přípravu perorálně aplikovatelných formulací.

- 5 Zcela odlišným typem formulace, která může být injikována nebo implantována podkožně, je systém uvolňující účinnou látku na bázi implantátů nebo směsi různých typů implantátů. Tyto systémy mohou být připraveny ze solí tvořených polyesterem a peptidovou účinnou látkou podle vynálezu, obsahujících případně volnou účinnou látku nebo/a volný polyester, za použití konvenčních technik pro zpracování polymeru v tavenině, jakými jsou (následující výčet nemá omezující charakter) vytlačování, lisování a vstřikovací tváření, při kterých se používají zvýšené teploty (výhodně nižší než 100 °C) za účelem roztavení solí tvořené polyesterem a účinnou látkou při přípravě implantátu. Příprava takových implantátů může být provedena za aseptických podmínek nebo mohou být alternativně připravené implantáty nakonec sterilizovány ozářením za použití (avšak nikoliv pouze) gama-paprsků nebo rentgenových paprsků. Tyto pevné dávkovací formy mohou být redukovány do partikulárních forem rozetřením nebo rozemletím. Výhodná velikost takových částic se může pohybovat od 1 do 500 μm a tyto mikropartikulární uvolňovací systémy (které nejsou ani mikrosférami ani mikrokapslemi) mohou být suspendovány ve vhodném konvenčním farmaceuticky přijatelném injekčním nosiči.
- 10
- 15
- 20 Uvedená zpracování solí tvořené peptidovou účinnou látkou a polyesterem ilustrují nejvýznamnější a nejdůležitější rozdíl mezi fyzikálně-chemickými a termodynamickými vlastnostmi solí obsahujících peptidovou účinnou látku a polyester podle vynálezu a vlastnostmi volných peptidů a jednoduchých solí. Peptid-polyesterové soli totiž v mnoha případech tají a tekou na rozdíl od volných peptidů a jejich solí, jakými jsou chloridy a acetáty, které netají a při zvýšené teplotě se rozkládají.
- 25

Degradace polyesterů je částečně závislá na jejich molekulové hmotnosti a polydisperzitě. Je samozřejmé, že aby mohlo dojít k uvedené degradaci převážně probíhající mechanismem hydrolytického štěpení esterových skupin, musí polyester nebo farmaceutická formulace obsahující polyester absorbovat vodu. U systémů, ve kterých matrice nebo membrána regulující uvolňování účinné látky obsahuje částečně nebo zcela sůl tvořenou peptidovou účinnou látkou a polyesterem, bude vyšší absorpce vody regulační maticí toho degradují kontinuální maticové fáze nebo membrány obsahující sůl tvořenou polyesterem a účinnou látkou jiným způsobem než kontinuální maticové fáze nebo membrány založené na samotném polyesteru. Je třeba chápat, že rychlost difuze vody nebo fyziologických tekutin do takových polyesterových matic nebo membrán regulujících uvolňování účinné látky bude částečně regulovat rychlost degradace. Tato difuze vody nebo fyziologických tekutin je rovněž určována rozměry a tvarem formulace a tak uvolňování účinné látky z kompozice obsahující polymerní soli peptidů a polyesterů je rovněž závislé na těchto faktorech.

30

35

40

Obzvláště zajímavými polyesterovými složkami peptid-polyesterových solí podle vynálezu jsou polyesterové složky na bázi homo- nebo kopolymerů kyseliny mléčné a kyseliny glykolové, kde se kyselina mléčná může vyskytovat v jedné nebo několika z jejích opticky aktivních nebo racemických forem. Polyesterů tohoto obecného typu jsou již známé mnoho let a byly detailně studovány v různých systémech s regulovaným uvolňováním účinné látky (viz například: „Controlled Release od Bioactive Agents from Lactide/Glycolic Polymers“, D. H. Lewis v „Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems“, vyd. M. Chasin a R. Langer, Marcel Dekker).

45

Tak například v US 3 773 919 se uvádí velmi obecně, že lze připravit farmaceutické kompozice s regulovaným uvolňováním účinné látky na bázi laktidových polyesterů nebo laktidových kopolyesterů obsahující antimikrobiální polypeptidy. Avšak tyto zde popsané antimikrobiální peptidy jsou neuspokojivé pro tvorbu polyesterové soli, neboť se buď vyskytují jako sulfáty nebo mají jiné vlastnosti, které inhibují nebo brání vytvoření soli tvořené polyesterem a peptidovou účinnou látkou. A opravdu, jestliže se postupuje podle příkladů provedení uvedených ve

50

55

zmíněném patentu, potom při mísení peptidové účinné látky bez ohledu na její charakter, s polymerem za uvedené zvýšené teploty dojde ke katastrofálnímu rozkladu peptidové účinné látky.

5 Obdobně je v evropském patentu EP 25 698 uveden colistin jako jedna ze seznamu mnoha zde uvedených sloučenin, které jsou údajně schopné formulace s polylaktidem, avšak i zde má tato sloučenina strukturní znaky, které brání tvorbě soli s koncovými karboxylovými skupinami polyesteru. Colistin je farmaceuticky používán pouze jako colistin-sulfát nebo colistin-sulfomethát sodný přičemž žádná z těchto forem neumožňuje přípravu obojetné soli s polyestery podle vynálezu. Dalšími dokumenty spadajícími do dosavadního stavu techniky, které popisují použití polypeptidů s biologicky odbouratelnými polymery na bázi homo- a kopolymerů kyseliny mléčné a kyseliny glykolové, jsou již výše uvedené evropské patenty EP 52 510, EP 58 481, EP 145 240 a EP 190 833.

15 Ačkoliv kopolymery kyseliny mléčné a kyseliny glykolové jsou známé již mnoho let, nebyly dosud v rámci dosavadního stavu techniky brány v úvahu složitost jejich struktury, pokud jde o distribuci komonomerních jednotek a délku jejich následných sekvencí (výskyt některé individuální komonomerní jednotky, která se v kopolymeru opakuje, a jejíž opakování je jiné než nahodilé), a účinek takových strukturních variací v případě, že jsou takové kopolymery použity jako matrice regulující uvolňování účinné látky. Tato kopolymerní strukturu částečně určuje jak rozpustnost, tak i bobtnatelnost polymeru. Tato korelace byla poprvé oznámena Hutchinsonem (evropský patent 58 481, avšak byla šířeji a do detailů prostudována v rámci tohoto vynálezu.

25 Za účelem ilustrace této skutečnosti uvádí US 3 773 919 některé formulace s regulovaným uvolňováním účinné látky, obsahující 50/50-kopolyestery kyseliny mléčné a kyseliny glykolové, které jsou rozpustné v benzenu a tento US patent je skutečně specificky omezen (pokud jde o kopolymery kyseliny mléčné a kyseliny glykolové) na takové polyestery, které jsou rozpustné v benzenu. Užitečnost těchto v benzenu rozpustných kopolyesterů byla dále posílena jejich specifickým použitím popsáním v evropském patentu EP 52 510. Nicméně dřívější US 2 703 316 (který má stejného přihlašovatele jako US 3 773 919) popisuje 50/50-laktido-glykolidové kopolyestery, které jsou nerozpustné v benzenu. Vzhledem k tomu, že oba uvedené US patenty mají stejného majitele (duPont), lze z této skutečnosti odvodit to, že v rámci vynálezu nárokováném v posledně uvedeném US patentu bylo použití kopolymerů nerozpustných v benzenu v některých ohledech horší než použití polymerů, které jsou v benzenu rozpustné. Toto tvrzení je posíleno evropským patentovým spisem EP 52 510, které popisuje použití pouze kopolymerů z US 3 773 919, které jsou rozpustné v benzenu.

40 Dosavadní stav techniky s výjimkou našeho vlastního evropského patentu EP 58 481 zatím ignoroval účinek, který má struktura kopolyesterů kyseliny mléčné a kyseliny glykolové na rozpustnost a odbouratelnost těchto kopolyesterů. Nyní bylo nově zjištěno, že v případě polyesterů se stejnou molekulovou hmotností a stejnou distribucí molekulových hmotností ve většině případů platí následující obecná závislost (pro polyestery, které jsou rozpustné v chloroformu při teplotě 25 °C):polyestery nerozpustné v benzenu degradují rychleji než polyestery, které jsou benzenem pouze nabobtnány a nikoliv rozpuštěny a takové benzenem nabobtnatelné polyestery zase degradují rychleji než polyestery, které jsou volně rozpustné v benzenu, což platí v případě, že odpovídající degradační experimenty jsou prováděny ve vodných fyziologických tekutinách nebo v pufru při pH 7,4 při 37 °C. Vzhledem k tomu je k dosažení kontinuálního uvolňování peptidů z parenterálních formulací v průběhu relativně krátké časové periody, tj. v průběhu jednoho týdne až dvou měsíců, obzvláště vhodné použít polyestery, které jsou nerozpustné v benzenu.

55 Pro kompozice, které mohou obsahovat od 0,1 až do 75 % (hmotn./obj.) peptidu je dále uvedena rozvaha týkající se polyesterové kompozice a jejich vztahů ke struktuře, viskozitě a polydisperzitě.

Pro přípravu solí tvořených peptidovou účinnou látkou a polyesterem, které mohou být formulovány v souladu s vynálezem do systémů pro kontinuální uvolňování účinné látky v průběhu časové periody od jednoho týdne do dvou měsíců, výhodně mají takové v benzenu rozpustné polyestery, které mají výhodně normální až širokou polydisperzitu, následující složení: 60 % kyseliny glykolové (nebo glykolidu)/ 40 % kyseliny mléčné (nebo laktidu) až asi 25 % kyseliny glykolové (nebo glykolidu)/ 75 % kyseliny mléčné (nebo laktidu), přičemž takové polyestery mají výhodně vnitřní viskozitu 1 % (hmotn./obj.) roztoku v chloroformu při teplotě 25 °C od 0,08 do 4,0 dl/g.

Vhodnou volbou parametrů polyesterů, včetně molekulové hmotnosti a distribuce molekulových hmotností, je rovněž možné dosáhnout kontinuálního uvolňování polypeptidů v průběhu časové periody jednoho týdne až dvou měsíců z formulací podle vynálezu za použití homopolymeru kyseliny polymléčné nebo kopolyesterů majících molární složení: 35 % kyseliny glykolové (nebo glykolidu) / 65 % kyseliny mléčné (nebo laktidu) až 10 % kyseliny glykolové (nebo glykolidu) / 90 % kyseliny mléčné (nebo laktidu), které jsou rozpustné v benzenu, mají vnitřní viskozitu 1% roztoku v chloroformu při teplotě 25 °C od 0,08 do 0,5 dl/g a mají úzkou až širokou polydisperzitu.

Kontinuálního uvolňování peptidů z formulací podle vynálezu v průběhu další časové periody, tj. v průběhu 2 až 6 měsíců, může být dosaženo za použití homopolymeru kyseliny polymléčné nebo kopolyesterů majících molární složení: 35 % kyseliny glykolové (nebo glykolidu) / 65 % kyseliny mléčné (nebo laktidu) až 0 % kyseliny glykolové (nebo glykolidu) / 100 % kyseliny mléčné (nebo laktidu), které jsou rozpustné v benzenu, mají vnitřní viskozitu 1% roztoku (hmotn./obj.) v chloroformu při teplotě 25 °C od 0,08 do 0,8 dl/g a mají úzkou až širokou polydisperzitu.

Kontinuálního uvolňování z formulací podle vynálezu v průběhu velmi dlouhé časové periody, tj. časové periody do dvou let, může být dosaženo za použití homopolymeru kyseliny polymléčné nebo kopolyesterů mající molární složení: 25 % kyseliny glykolové (nebo glykolidu) / 75 % kyseliny mléčné (nebo laktidu) až 0 % kyseliny glykolové (nebo glykolidu) / 100 % kyseliny mléčné (nebo laktidu), které jsou rozpustné v benzenu, mají vnitřní viskozitu 1% (hmotn./obj.) roztoku v chloroformu při teplotě 25 °C od 0,2 do 4,0 dl/g a normální až vysokou polydisperzitu.

Časovaného nebo pulzního uvolňování (s indukční periodou před vlastním uvolňováním) nebo diskontinuálního uvolňování (nejdříve uplyne prvotní fáze uvolňování, která je následována periodou, v průběhu které nedochází k uvolňování účinné látky nebo dochází pouze k neúčinnému uvolňování účinné látky, načež následuje sekundární fáze uvolňování) v průběhu relativně krátké časové periody, tj. v průběhu až 2 měsíců, může být dosaženo použitím formulace podle vynálezu, obsahující v benzenu nerozpustné polymery, které mají úzkou až nejpravděpodobnější distribuci molekulové hmotnosti a vnitřní viskozitu 1% (hmotn./obj.) roztoku v chloroformu při teplotě 25 °C od 0,3 do 4,0 dl/g.

Ještě dalším znakem vynálezu, který je nový a který odlišuje vynález od všech ostatních dříve popsaných systémů s regulovaným uvolňováním účinné látky založených na polyesterech nebo kopolyesterech, a který dále reguluje rychlost uvolňování, je míra inkorporace peptidu ve formě polyesterové soli (případně v přítomnosti volné účinné látky nebo/a volného polymeru). Tento další regulační znak se zcela odlišuje od parametrů, které mají za následek zvýšenou rychlost uvolňování ve většině konvenčních systémů s regulovaným uvolňováním účinné látky na bázi polyesterů, které jsou směřovány na uvolňování vysoce lipofilních účinných látek majících relativně nízkou rozpustnost ve vodě, jakými jsou steroidy. V těchto případech lze při rostoucí míře inkorporace účinné látky obecně pozorovat rostoucí rychlost uvolňování a to dokonce tehdy, kdy je redukována absorpce vody takového systému v důsledku rostoucího fázového objemu lipofilní účinné látky. Ve skutečnosti jsou takové zvýšené rychlosti uvolňování účinných látek, jakými jsou steroidy závislé na účinné látce zachovávající si svou termodynamickou identitu a na jednoduché Fickianově difuzní kinetice (viz Baker a Lonsdale, již citováno). to znamená, že

v případě účinných látek, jakými jsou steroidy, s rostoucím obsahem účinné látky a za předpokladu, že lipofilní účinná látka je do určité míry rozpustná v lipofilním polymeru, vzrůstá i rychlost samotné Fickianovy difuze.

5 Ke zcela odlišné situaci však dochází u produktů podle vynálezu. Nyní bylo zjištěno, že hlavním mechanismem degradace polyesterů a kopolyesterů je hydrolyza esterových skupin a rychlost, kterou tato hydrolyza probíhá je závislá na absorpci vody (viz Pitt a Thong-wei Gu, J. Controlled Release, 4, 283-292 (1987); Hutchinson and Furr, tamtéž, 13, 279-294 (1990)). Peptidy jsou hydrofilní a jejich tvorba solí s polyestery probíhá za vzniku fáze obsahující sůl tvořenou
10 polyesterem a účinnou látkou, která má vyšší absorpci vody než samotný polyester. To znamená, že polyesterový řetězec v této soli může degradovat rychleji než samotný volný polyester, který má obdobné složení, obdobnou molekulovou hmotnost a obdobnou polydisperzitu. Uvolňování peptidu je silně závislé na degradaci a uvolňování účinné látky je tudíž částečně řízeno jak mírou inkorporace soli tvořené polyesterem a peptidovou účinnou látkou v kompozici, tak množstvím
15 peptidu v uvedené soli. Pro polyestery nebo kopolyestery mající stejné složení a stejnou strukturu má vzrůst jednoho z těchto dvou parametrů za následek zvýšenou rychlost uvolňování účinné látky, což může zase za určitých okolností zkrátit časovou periodu, které je účinná látka uvolňována. Míra inkorporace peptidové účinné látky buď v soli tvořené polyesterem a účinnou látkou nebo v kombinaci tvořené solí polyester-účinná látka a volným peptidem výhodně činí od
20 0,1 % do 75 % hmotnosti ve formulaci obsahující polyester a účinnou látku.

Obsah peptidové účinné látky v kompozici podle vynálezu a jeho variace s molekulovou hmotností a polydisperzitou polyesteru jsou diskutovány v další části popisu. Pro kontinuální uvolňování peptidu v průběhu velmi dlouhých časových period, tj. v průběhu až 2 let, jsou
25 výhodné nízké míry inkorporace účinné látky od 1,0 do 20 % hmotnosti a to za použití polyesterů, které mají výhodně hmotnostní střední molekulovou hmotnost 20 000 nebo vyšší a polydisperzitu vyšší než 2,2 a výhodně vyšší než 3,5. Tyto parametry pro velmi dlouhou dobu uvolňování účinné látky rovněž závisí částečně na ostatních parametrech formulace s obsahem účinné látky, jakými jsou složení komonomerů, struktura rozpustnost/nerozpustnost v benzenu
30 a geometrie a rozměry dávkovací formy. Polyester s hmotnostní střední molekulovou hmotností asi 20 000 má vnitřní viskozitu asi 0,2 a to v závislosti na jeho struktuře, složení a polydisperzitě.

Pro kontinuální uvolňování účinné látky v průběhu relativně dlouhé časové periody, tj. v průběhu až 6 měsíců, se výhodná míra inkorporace peptidové účinné látky pohybuje od 0,5 do 35 %
35 hmotnosti a to za použití polyesterů nebo kopolyesterů majících hmotnostní střední molekulovou hmotnost výhodně rovnou 10 000 nebo ještě vyšší a polydisperzitu vyšší než 1,8 a výhodně vyšší než 2,2 v závislosti na všech ostatních parametrech, jakými jsou složení, struktura, rozpustnost/nerozpustnost v benzenu a geometrie a rozměry dávkovacích forem.

40 Pro kontinuální uvolňování účinné látky v průběhu relativně krátkých časových period, tj. v průběhu až dvou měsíců, se výhodná míra inkorporace peptidové účinné látky pohybuje od 0,1 do 75 % hmotnosti a to za použití polyesterů majících výhodně hmotnostní střední molekulovou hmotnost rovnou 2000 nebo ještě vyšší a polydisperzitu vyšší než 1,25 v závislosti na všech ostatních parametrech, jakými jsou složení, struktura, rozpustnost/nerozpustnost
45 v benzenu a geometrie a rozměry dávkovacích forem.

Dalším parametrem, který dále reguluje uvolňování peptidové účinné látky z formulací podle vynálezu a který je nepřítomen u systémů s regulovaným uvolňováním účinné látky, náležejících do dosavadního stavu techniky a založených na homo- a kopolymerech kyseliny mléčné
50 a kyseliny glykolové, je funkčnost peptidu, pokud jde o počet bazických skupin, jakými jsou argininové a lysinové zbytky, v molekule peptidové účinné látky a funkčnost polyesteru nebo kopolyesteru, pokud jde o střední počet karboxylových skupin obsažených v průměrném polymerním nebo kopolymerním řetězci. Obecně pro kontinuální uvolňování peptidové účinné látky platí, že čím vyšší je míra takové polyfunkční interakce v polyelektrolytickém komplexu

peptid–polyester, tím vyšší musí být polydisperzita. Na rozdíl od toho jsou pro diskontinuální nebo pulzní uvolňování účinné látky žádoucí polydisperzity nižší než 2,2.

5 Jedním z relativně řídkých případů vzájemné slučitelnosti nebo rozpustnosti dvou polymerních typů majících odlišné chemické struktury jsou směsi polyesterů založených na homo- nebo kopolymerech kyseliny mléčné a kyseliny glykolové s nízkomolekulárními polyoxyethyleny a zejména s nízkomolekulárními polyethylenglykoly. Tato slučitelnost byla zhodnocena v solích tvořených polyesterem a peptidovou účinnou látkou a v jejich kompozicích podle vynálezu novým a neočekávatelným způsobem. Je známo, že některé farmakologicky účinné peptidy 10 mohou být „pegylvány“, tj. konjugovány s polyethylenglykolem nebo alkoxyethylenglykolem takovým způsobem, že si peptid zachová svou farmakologickou účinnost. Přítomnost konjugovaného polyoxyethylenového řetězce v molekule pegylovaného peptidu činí pegylovaný peptid částečně kompatibilním s polyesterem nebo kopolyesterem.

15 Za předpokladu, že zbývající lysinové nebo argininové zbytky v pegylovaném peptidu se vyskytují ve formě solí slabých kyselin, usnadňuje tato slučitelnost přípravu soli tvořené polyesterem a peptidovou účinnou látkou a představuje další regulační prvek uvolňování účinné látky. Rovněž užitečné jsou farmakologicky účinné konjugáty peptidů s ostatními ve vodě rozpustnými polymery, jakými jsou polysacharidy, syntetické polypeptidy a polyvinylpyrrolidon, avšak tyto 20 konjugáty jsou méně výhodné, neboť žádný z těchto ve vodě rozpustných polymerů není rozpustný v polyesteru nebo kopolyesteru nebo není s těmito polyesterem slučitelný.

Tento vynález lze výhodně použít v souvislosti s farmakologicky účinnými látkami obsahujícími bazické funkční skupiny. Nicméně může být také použit v případě peptidů, které jsou 25 farmakologicky účinné a které jsou buď neutrální nebo mají tendenci existovat ve velké míře jako polyanionty (polypeptidy mající přebytek karboxylových skupin).

V prvním z těchto případů (farmakologicky účinný neutrální polypeptid neobsahující ani kyselé ani zásadité zbytky) se použije sůl syntetického polypeptidu, která obsahuje bazické funkční 30 skupiny a která je farmakologicky neúčinná, a polyester. Taková sůl farmakologicky neúčinného syntetického polypeptidu a polyesteru nebo kopolyesteru je rovněž obojetná a působí tudíž jako dispergační činidlo při solubilizaci nebo koloidním dispergování farmakologicky účinného, avšak neutrálního peptidu v organické fázi.

35 Ve druhém z uvedených případů (kdy farmakologicky účinný polypeptid obsahuje zbytkové karboxylové funkční skupiny) se použije sůl syntetického polypeptidu majícího alespoň dvě bazické skupiny v syntetickém polypeptidovém řetězci, přičemž tento polypeptid je farmakologicky neúčinný, a polyesteru nebo kopolyesteru. V tomto druhém případě je v soli syntetického polypeptidu a polyesteru koncentrace bazických funkčních skupin v soli vyšší než 40 koncentrace karboxylových skupin v kyselém, farmakologicky účinném peptidu. Tento přebytek bazických funkčních skupin v soli může mít potom za následek další tvorbu soli s karboxylovými skupinami kyselého farmakologicky účinného peptidu. Rezultující komplexní soli mohou být potom rozpuštěny nebo dispergovány v organickém rozpouštědle nebo v organické fázi, které, popř. která je normálně totálním ne–rozpouštědlem pro použitý peptid, avšak která je 45 rozpouštědlem pro polyester nebo kopolyester, a to způsobem popsaným výše pro ostatní polyester–peptidové soli.

Protože soli peptidů obsahující bazické funkční skupiny s polyesterem nebo kopolyestery obsahujícími karboxylové funkční skupiny jsou obojetné, mohou být jejich povrchově aktivní 50 vlastnosti využity k usnadnění dispergování jiných hydrofilních účinných látek nebo vodných suspenzí takových účinných látek v organickém rozpouštědle nebo organické fázi, obsahujícím, popř. obsahujícím polyester–peptidovou sůl. Použití takových obojetných solí peptidů s polyesterem nebo kopolyestery ve funkci dispergačních nebo solubilizačních činidel představuje další znak vynálezu.

V následující části popisu bude vynález blíže objasněn pomocí konkrétních případů jeho provedení, přičemž tyto příklady mají pouze ilustrační charakter a nikterak neomezují rozsah vynálezu, který je jednoznačně definován formulací patentových nároků.

5

Příklady provedení vynálezu

Měření viskozit a jejich vztah k různým středním molekulovým hmotnostem jsou diskutovány v Sorensen a Campbell, „Preparative Methods of Polymer Chemistry“, 2. vyd., 1968, Interscience Division of John Wiley, str. 43–50. V dále popsáných příkladech byl použit Ubbelohdeův viskozimetr, vykazující dobu průtok pro samotný chloroform asi 100 sekund. jako rozpouštědlo byl použit chloroform, neboť chloroform rozpouští v udaném rozmezí složení jak ve vodě rozpustné, tak i ve vodě nerozpustné polymery.

Molekulové hmotnosti a distribuce molekulových hmotností polyesterů popsáných v této přihlášce a majících molekulovou hmotnost vyšší asi 20 000, byly stanoveny dimenzně–exkluzivní chromatografií vzhledem k polystyrenovým standardům za použití 3 x 30 cm směsných B–kolon (PL Gel, 10 μm, Polymer Laboratoires, Church Stretton, Shropshire, GB), zapojených do sérií a vybavených 10 μm zajišťovací kolonou. Jako rozpouštědlo byl použit tetrahydrofuran s nominálním průtokem při teplotě 25 °C 1 ml za minutu. Molekulární hmotnostní charakteristiky byly vypočteny za použití GPC–sofwarzu Data Analysis Package Perkin–Elmer 7700 Professional Computer.

Pro měření molekulové hmotnosti nižší než asi 20 000 nepředstavuje uvedená dimenze–exkluzní chromatografie výhodnou metodou pro stanovení molekulové hmotnosti a namísto ní může být použita nevodná potenciometrická titrace za účelem získání buď molekulové hmotnosti nebo ekvivalentní hmotnosti polyesteru přímým měřením obsahu karboxylové kyseliny v polyesteru nebo kopolyesteru. Nevodné potenciometrické titrace se obecně provádí za použití známé hmotnosti polyesteru nebo kopolyesteru rozpuštěného v acetonu obsahujícím 10 % objemu vody. Titrace se provádí za použití zředěných roztoků hydroxidu sodného a za použití zařízení dodaného firmou Radiometer (Kodaň, Dánsko). Toto zařízení sestává z titrátoru (TTT 80) a autoburety (ABU 80), pH–metru a elektrody Russel CMAWK. Průběh titrace se vynáší na zařízení Servograpg (REC 80), přičemž molekulová hmotnost polymeru je rovna

$$\frac{w \times 1000 \times f}{v \times n},$$

kde

- w znamená hmotnost použitého polymeru,
- f znamená střední počet karboxylových skupin v polymerním řetězci,
- v znamená objem použitého roztoku hydroxidu sodného a
- n normalitu použitého roztoku hydroxidu sodného.

45

Příklad 1

Goserelin–acetát (100,6 mg, toto množství je ekvivalentní asi 86 mg peptidu ve formě volné báze) a D,L–laktid/glykolidový kopolymer (300,3 mg, 50/50 mol. %), obsahující jednu koncovou karboxylovou kyselinu na každý polymerní řetězec a mající hmotností střední molekulovou hmotnost 4300 a vnitřní viskozitu 1% (hmotn./obj.) roztoku v chloroformu při teplotě 25 °C 0,08 dl/g, přičemž tento kopolymer je rozpustný v benzenu, se rozpustí v ledové kyselině octové prosté anhydridu (3 ml). Takto získaný roztok účinné látky a polymeru v kyselině octové se potom po kapkách přidá ke kapalnému dusíku a zmražené kapičky se lyofilizují za vakua po

dobu 24 hodin. Lyofilizovaný produkt se potom dosuší za vakua při teplotě 50 °C po dobu 24 hodin za vzniku směsi tvořené polyesterem a účinnou látkou, která nominálně obsahuje asi 25 % hmotnosti goserelin-acetátu (toto množství je ekvivalentní asi 22,3 % hmotnosti peptidu ve formě volné báze).

5

Vysušená směs polyesteru a účinné látky (400 mg) se přidá k dichlormethanu a objem se doplní na 4 ml. Nejdříve se získá zakalená koloidní směs, přičemž v průběhu jedné hodiny se tato směs postupně vyčirí za vzniku čirého roztoku. Tento roztok se odlije do tvaru fólie, která se ponechá vyschnout při okolní teplotě po dobu asi 6 hodin a potom ještě po dobu 20 hodin při teplotě 50 °C a za hlubokého vakua. Získá se čirý transparentní fólie obsahující sůl tvořenou polyesterem a účinnou látkou.

10

i) Takto získaná čirá transparentní fólie (100 mg) se roztaví a tlakově tvaruje při teplotě 80 °C za vzniku transparentní fólie o tloušťce asi 0,02 cm. Po ponoření do vody teplé 37 °C po dobu 24 hodin vzroste hmotnost hydratované fólie tvořené účinnou látkou a polymerem na 225 mg. Na rozdíl od toho vzroste hmotnost stejně zpracovaného samotného polyesteru (100 mg) pouze na 126 mg a fólie obsahující pouhou směs goserelin-acetátu (25 mg) a polymeru (75 mg) (připravená přidáním účinné látky k roztoku polymeru v dichlormethanu, odstraněním rozpouštědla a lisováním získaného materiálu za vzniku fólie mající tloušťku asi 0,02cm) má hmotnost po 24 hodinovém ponoření do vody teplé 37 °C pouze 137 mg. Z tohoto experimentu je zřejmé, že kompozice obsahující sůl tvořenou polyesterem a účinnou látkou je výrazně hydrofilnější a má vyšší absorpci vody než samotný polyester a než pouhá směs účinné látky a polyesteru.

15

20

V rámci uvedené pouhé směsi účinné látky a polymeru v dichlormethanu nevykazuje účinná látka náznak rozpouštění dokonce ani po 1 měsíci a když se vysuší a vylisuje, poskytuje tato směs opakní fólii. Nicméně v dalším experimentu se výše uvedeným způsobem získání čirá transparentní fólie (100 mg) rozpustí v dichlormethanu (1 ml) za vzniku čirého transparentního roztoku polyesteru a drogy. K tomuto roztoku se přidá kyselina trifluoroctová (50 µl) a získaná směs se intenzivně míchá. V podstatě bezprostředně zde dochází k vysrážení goserelinu ve formě trifluoracetátové soli.

25

30

Tyto dva experimenty ukazují, že čirá transparentní fólie, obsahující sůl tvořenou polyesterem a účinnou látkou a získaná výše uvedeným způsobem, může být zpracována na tvarovaný systém s regulovaným uvolňováním účinné látky za použití konvenčního zpracování polymerní taveniny. Kromě toho tento produkt fakticky neobsahuje kyselinu octovou ani acetátový anion a účinná látka musí takto existovat ve formě polyesterové soli. K tvorbě soli tvořené polyesterem a účinnou látkou dochází proto, že koncové skupiny kyseliny mléčné nebo kyseliny glykolové na kopolymeru jsou silnějšími kyselinami než kyselina octová a slabší kyselina je vytěsněna polymerem. Polymerní karboxylová kyselina v soli tvořené polyesterem a účinnou látkou a rozpustné v dichlormethanu může být zase vytěsněna mnohem silnější karboxylovou kyselinou, jakou je kyselina trifluoroctová. V případě, že k tomu dojde, vznikne trifluoracetátová sůl peptidu, která se vysráží, jelikož není rozpustná v dichlormethanu.

35

40

ii) Čirá transparentní fólie získaná výše uvedeným způsobem (50 mg) a obsahující sůl tvořenou polyesterem a účinnou látkou se tvaruje do tvaru fólie mající tloušťku 0,02 cm. Tento film se potom inkubuje v pufrované solance (obsahující 0,02 % azidu sodného) při pH 7,4 a teplotě 37 °C, přičemž se pufrovaný roztok periodicky analyzuje ultrafialovým zářením za účelem stanovení uvolněného množství goserelinu. Tento tvarovaný produkt uvolňoval plynule goserelin v průběhu asi 2 týdnů a v průběhu třetího týdne fakticky došlo k jeho úplné degradaci a k vymizení z inkubačního prostředí.

45

50

Tento experiment demonstruje použitelnost polymerů s velmi nízkou molekulovou hmotností a nerozpustných v benzenu pro uvolňování účinné látky v průběhu velmi krátkého časového intervalu.

55

Obdobné tvarované formulace mohou být připraveny nahrazením goserelin-acetátu buď přirozeně se vyskytujícími hormony uvolňujícími gonadotropin nebo dalšími vysoce potentními syntetickými analogy (agonisté nebo antagonisté) hormonu uvolňujícího gonadotropin, jakými jsou pryporelin, leuprorelin, busserelin a nafarelin, výhodně ve formě acetátových solí nebo solí s dalšími slabými kyselinami, nebo libovolným dalším hormonem, který reguluje sekreci intaktního gonadotropinu nebo obou gonadotropinových podjednotek.

Příklad 2

Čirý transparentní fóliový produkt získaný ve výše uvedeném příkladu 1 (100 mg) a D,L-laktid-glykolidový kopolymer (molární zastoupení 50/50, 1,05 g), který má hmotnostní střední molekulovou hmotnost 121 000 a vnitřní viskozitu 1% (hmotn./obj.) roztoku v chloroformu při teplotě 25 °C 0,84 dl/g a který je nerozpustný v benzenu, se rozpustí v dichlormethanu (100 ml). Získaný roztok se intenzivně míchá při rychlosti míchadla 1000 otáček za minutu a v průběhu jedné hodiny se pomalu přidá silikonový olej (50 ml) za účelem vysrážení jak soli tvořené polyesterem a účinnou látkou, tak i volného polyesteru. Po jedné hodině se částečně vysrážená směs soli tvořené polyesterem a účinnou látkou, volného polyesteru, silikonového oleje a dichlormethanu přidá k intenzivně míchanému hexanu (2 litry) za účelem vytvrzení mikročástic soli tvořené polyesterem a účinnou látkou a volného polyesteru. Tato směs se míchá po dobu dvou hodin, načež se ponechá usadit a hexanová vrstva se odlije. Mikročástice (obsahující asi 1,95 % hmotnosti goserelinu ve formě volné báze) se třikrát promyjí čerstvým hexanem (500 ml) a nakonec se izolují filtrací a vysuší při teplotě 35 °C za hlubokého vakua v průběhu 24 hodin. Střední velikost přibližně sférických mikročástic, které obsahují roztok soli tvořené polyesterem a účinnou látkou, je rovna asi 30 µm.

Část tohoto produktu (250 ml) se inkubuje ve fosfátem pufované solance (obsahující 0,02 % azidu sodného) při pH 7,4 a teplotě 37 °C, přičemž se pufovaný roztok periodicky analyzuje ultrafialovým zářením za účelem stanovení množství uvolněného goserelinu. Uvedené mikročástice uvolňují účinnou látku po dobu asi pěti týdnů, přičemž během sedmého týdne zcela vymizí z inkubačního prostředí.

Polymerní kompozice použitá při tomto experimentu je tvořena směsí dvou kopolymerů stejného laktido-glykolidového složení, které však mají značně odlišné molekulové hmotnosti a které ve formě výše uvedené směsi jsou nerozpustné v benzenu a mají hmotnostní střední molekulovou hmotnost 108 000, d polydisperzitu 5,1 a vnitřní viskozitu 1% (hmotn./obj.) roztoku v chloroformu při teplotě 25 °C rovnou 0,72 dl/g.

Tyto experimenty ilustrují použitelnost v benzenu nerozpustných polyesterů, majících vysokou molekulovou hmotnost a vysokou polydisperzitu, pro uvolňování goserelinu v průběhu relativně krátké časové periody 5 až 7 týdnů.

Obdobné mikroparticulární formulace mohou být připraveny nahrazením goserelin-acetátu buď přirozeně se vyskytujícími analogy hormonů uvolňujícími gonadotropin nebo dalšími vysoce potentními syntetickými analogy (agonisté nebo antagonisté) hormonu uvolňujícího gonadotropin, jakými jsou tryptorelin, leuprorelin, busserelin nebo nafarelin, výhodně ve formě acetátových solí nebo solí s dalšími slabými kyselinami, nebo libovolným dalším polypeptidovým hormonem, který reguluje nebo moduluje sekreci intaktních gonadotropinů nebo obou individuálních gonadotropinových podjednotek.

Příklad 3

Goserelin-acetát (101 mg, toto množství je ekvivalentní asi 86 mg goserelinu ve formě volné báze) a kyselina poly-D,L-mléčná (100 mol. %, 299,7 mg), která je rozpustná v benzenu a má

hmotnostní střední molekulovou hmotnost rovnou asi 5400, vnitřní viskozitu 1% (hmotn./obj.) roztoku v chloroformu při teplotě 25 °C rovnou 0,08 dl/g a polydisperzitu rovnou 1,8, se rozpustí v ledové kyselině octové (4 ml) prosté anhydridu. Získaný roztok goserelinu a polyesteru v kyselině octové se po kapkách přidá ke kapalnému dusíku, načež se zmrazené kapičky izolují a lyofilizují za vakua po dobu 24 hodin a potom se dosuší při teplotě 55 °C po dobu 24 hodin.

i) Získaný vysušený produkt se přidá k dichlormethanu (4 ml) za vzniku zprvu zakalené směsi, jejíž zákal se rychle rozpouští za vzniku čirého roztoku, který se zfiltruje skrze 0,2 µm nylonový sterilizující filtr.

Tento experiment ukazuje, že roztoky polyesterové soli goserelinu mohou být sterilizačně zfiltrovány a to na rozdíl od směsí nebo disperzí pouhých solí účinné látky v organickém roztoku polyesteru.

ii) K čirému dichlormethanovému roztoku (1 ml), získanému ve výše uvedeném stupni i) se za intenzivního míchání přidá kyselina trifluoroctová (50 µl). Dochází k bezprostřednímu vysrážení goserelinu ve formě jeho trifluoracetátové soli, což ukazuje, že goserelin byl přítomen v dichlormethanovém roztoku ve formě soli s polyesterem ukončeným karboxylovou skupinou.

Obdobné sterilní roztokové formulace mohou být připraveny nahrazením goserelin-acetátu buď přirozeně se vyskytujícími hormony uvolňujícími gonadotropin nebo dalšími vysoce potentními syntetickými analogy (agonisté nebo antagonisté) hormonu uvolňujícího gonadotropin, jakými tryptorelin, leuprorelin, buserelin nebo nafarelin, výhodně ve formě acetátových solí nebo solí s dalšími slabými kyselinami, nebo libovolným dalším polypeptidovým hormonem, který reguluje nebo moduluje sekreci intaktních gonadotropinů nebo obou individuálních gonadotropinových podjednotek.

Příklad 4

Dichlormethanový roztok goserelin-polyester získaný v příkladu 3 (2 ml) se zředí větším množstvím dichlormethanu a doplní na 10 ml. Tento roztok se nastříkuje do intenzivně míchaného hexanu (1 litr) za vzniku mikročastic, které mají po izolaci a vysušení za vakua při teplotě 45 °C po dobu 24 hodin velikost asi 2 µm až asi 30 µm a průměrnou velikost částic rovnou asi 10 µm. Obsah goserelinu v těchto mikročasticích je ekvivalentní obsahu volné báze asi 22 %.

Tyto mikročastice se inkubují ve fosfátem pufrované solance při pH 7,4 a teplotě 37 °C, přičemž supernatant se periodicky analyzuje ultrafialovým světlem na obsah goserelinu. Goserelin byl uvolňován kontinuálně, přičemž toho uvolňování bylo v podstatě ukončeno v asi 8. týdnu, zatímco v 11. týdnu mikročastice zcela degradovaly a vymizely z inkubačního prostředí. Tento experiment ukazuje použitelnost v benzenu rozpustných polyesterů s velmi nízkou molekulovou hmotností pro zajištění uvolňování účinné látky v průběhu asi dvou měsíců.

Jestliže se ve při výše uvedených experimentech goserelin-acetát nahradí trifluoracetátovou solí, potom se nezíská čirý roztok, avšak namísto toho obsahuje polyesterový roztok v dichlormethanu v podstatě disperzi goserelin-trifluoracetátu. Tato směs neprochází skrze 0,2 µm filtr a v důsledku toho nemůže být ani sterilizačně filtrována, přičemž tato disperze goserelin-trifluoracetátu v polyesterovém roztoku poskytuje při nastříkání do míchaného hexanu nikoliv mikročastice, nýbrž sraženou vločkovitou hmotu.

Goserelin-polyesterová sůl má tedy vlastnosti, které ji činí mnohem snadněji formulovatelnou do tvaru mikročastic, než je tomu v případě směsí pouhé jednoduché soli v roztoku polymeru s velmi nízkou molekulovou hmotností.

Obdobné mikročástice mohou být připraveny nahrazením goserelin-acetátu buď přirozeně se vyskytujícími hormony uvolňujícími gonadotropin nebo jinými vysoce potentními syntetickými analogy (agonisté nebo antagonisté) hormonu uvolňujícího gonadotropin, jakými jsou tryptorelin, leuprorelin, buserelin nebo nafarelin, výhodně ve formě acetátových solí nebo solí s dalšími slabými kyselinami, nebo libovolným peptidovým hormonem, který reguluje nebo moduluje sekreci intaktních gonadotropinů nebo obou individuálních gonadotropinových podjednotek.

Příklad 5

Goserelin-acetát (304 mg, toto množství je ekvivalentní asi 248 mg goserelinu ve formě volné báze) a kyselina poly-D,L-mléčná (102 mg, 100 mol. %), která má hmotnostní střední molekulovou hmotnost asi 5400, vnitřní viskozitu 1% (hmotn./obj.) roztoku v chloroformu při teplotě 25 °C rovnou 0,08 dl/g a polydisperzitu 1,8, se rozpustí v ledové kyselině octové (2 ml) prosté anhydridu. Roztok goserelinu a polyesteru v kyselině octové se potom po kapkách přidá ke kapalnému dusíku a získané zmražené kapičky se izolují, lyofilizují za hlubokého vakua po dobu 24 hodin a potom vysuší za vakua při teplotě 55 °C po dobu 24 hodin.

Získaný produkt se přidá k dichlormethanu (2 ml) za vzniku zakalené koloidní směsi, která se v průběhu času zcela nevyčeří. Tato směs v dichlormethanu je v podstatě tvořena disperzí goserelin-acetátu v goserelin-polyesterové soli.

Tato disperze goserelin-acetátu v methylenchloridovém roztoku polyester-goserelinové soli se formuluje do mikroparticulární formy, obsahující goserelin v množství, které je ekvivalentní asi 72 % hmotnosti volné báze, přičemž volný goserelin-acetát je zde dispergován v kontinuální fázi goserelin-polyesterové soli a uvedené převedení do particulární formy se provádí sušením rozprašováním, nástřikem do zmrazovacího média, jednoduchým srážením nebo fázově separační koacervací.

Obdobné mikročásticové formulace mohou být připraveny nahrazením goserelin-acetátu buď přirozeně se vyskytujícími hormony uvolňujícími gonadotropin nebo ostatními vysoce potentními syntetickými analogy (agonisté nebo antagonisté) hormonů uvolňujících gonadotropin, jakými jsou tryptorelin, leuprorelin, buserelin nebo nafarelin, výhodně ve formě acetátových solí nebo solí s dalšími slabými kyselinami, nebo libovolným dalším polypeptidovým hormonem, který reguluje nebo moduluje sekreci intaktních gonadotropinů nebo obou jeho individuálních podjednotek.

Příklad 6

Kopolyester kyseliny D,L-mléčné a kyseliny glykolové, který molárně obsahuje 78 % kyseliny D,L-mléčné a 22 % kyseliny glykolové, se připraví kopolykondenzací obou hydroxy-kyselin. Po přečištění získaného kopolymeru přidáním roztoku kopolyesteru v acetonu k methanolu za účelem vysrážení kopolyesteru a separaci a vysušení vysráženého materiálu má kopolyester hmotnostní střední molekulovou hmotnost asi 11 000, číselnou střední molekulovou hmotnost (která byla stanovena nevodnou potenciometrickou titrací, přičemž bylo stanoveno, že každý kopolyesterový řetězec obsahuje pouze jednu karboxylovou kyselinu) 6100 a tudíž polydisperzitu rovnou 1,6 a vnitřní viskozitu 1% (hmotn./obj.) roztoku v chloroformu při teplotě 25 °C rovnou 0,15 dl/g.

Goserelin-acetát (228,9 mg, toto množství je ekvivalentní asi 200 mg goserelinu ve formě volné báze) a výše popsany kopolyester (1,8 g) se rozpustí v ledové kyselině octové (10 ml) prosté anhydridu. Takto získaný goserelin-polyesterový roztok se po kapkách přidá ke kapalnému dusíku a zmražené kapičky se izolují, lyofilizují po dobu 24 hodin a nakonec vysuší při teplotě 50 °C za vakua v průběhu 24 hodin.

Vysušená goserelin–polyesterová směs se přidá k dichlormethanu (10 ml) za vzniku zprvu zakalené koloidní směsi, která však po 24 hodinách přejede na čirý roztok, který může být filtrován skrze 0,2 µm nylonový sterilizující filtr.

5

Jestliže se k malému alikvotu tohoto čirého roztoku přidá kyselina trifluoroctová, dochází k bezprostřednímu vysrážení goserelinu ve formě jeho trifluoracetátové soli, což ukazuje na to,, že v čirém transparentním dichlormethanovém roztoku je goserelin v goserelin–polyesterové směsi převážně nebo zcela přítomen ve formě polyesterové soli.

10

Dichlormethanový roztok goserelin–polyesterové soli se odpaří k suchu a získaný pevný podíl se suší při okolní teplotě po dobu 6 hodin a potom při teplotě 55 °C po dobu 20 hodin za vakua za vzniku čiré odlité fólie obsahující goserelin–polyesterovou sůl.

15

Vysušená goserelin–polyesterová směs, připravená výše uvedeným způsobem (1 g), se rozpustí v 8 ml dichlormethanu. Získaný roztok se zavede do 250–ml vícehrdlé baňky s kulatým dnem, načež se roztokem probublává proud dusíku za účelem odstranění veškerého vzduchu a vytvoření atmosféry prosté oxidu uhličitého. Do baňky se zavede voda (90 ml), která byla předběžně odplyněna za účelem odstranění veškerého oxidu uhličitého a potom skladována pod atmosférou dusíku prostého oxidu uhličitého, a směs se intenzivně míchá při rychlosti otáčení míchadla asi 500 otáček za minutu pod atmosférou, která je v podstatě prosta oxidu uhličitého. Dichlormethanový roztok goserelin–polyesterové soli rychle disperguje za vzniku stabilní disperze typu (dichlormethanový roztok soli účinné látky a polymeru)–ve–vodě. Zatímco se disperze dále míchá při rychlosti otáčení míchadla 200 otáček za minutu, vystavuje se postupně vakuu, přičemž podstatné množství dichlormethanu se takto odpaří za vakua za vzniku disperze goserelin–polyesterové soli ve vodě. Lyofilizací této disperze se získají mikročástice, ve kterých je goserelin přítomen ve formě goserelin–polyesterové soli mající střední velikost částic rovnou asi 20 µm a ze kterých se uvolňuje goserelin v průběhu asi 6 týdnů v případě, že se tyto mikročástice inkubují v solance pufrované fosfátem na pH 7,4 při teplotě 37 °C a supernatant se periodicky analyzuje ultrafialovým světlem za účelem stanovení uvolněného goserelinu.

20

25

30

Obdobné mikročástice mohou být připraveny inkorporací do činidel ve vodné fázi, o kterých je známo, že zlepšují stabilitu polypeptidů, a jejichž příkladem je mannitol. I když je výhodně provádět výše uvedený způsob v atmosféře, která je prosta oxidu uhličitého, je nicméně možné provádět výše uvedený způsob při dosažení uspokojivých výsledků v přítomnosti stop oxidu uhličitého a to v závislosti na molekulové hmotnosti polyesteru a na obsahu účinné látky.

35

Obdobné formulace na bázi sterilního roztoku, odlité fólie a mikročástic mohou být připraveny nahrazením goserelin–acetátu buď přírodními vysoce potentními syntetickými analogy (agonisté nebo antagonisté), jakými jsou tryptorelin, leuprorelin, buserelin nebo nafarelin, výhodně ve formě acetátových solí nebo solí s dalšími slabými kyselinami, nebo libovolným dalším polypeptidovým hormonem, který může regulovat nebo modulovat sekreci intaktních gonadotropinů nebo obou jejich podjednotek.

40

Příklad 7

45

50

Opakuje se postup podle příkladu 5 za vzniku čiré transparentní fólie a tato fólie (1 g) se rozpustí v dichlormethanu (4 ml). Získaný roztok se zahřeje na teplotu asi 35 °C, načež se k dichlormethanovému roztoku goserelin–polyesterové soli přidá vodný roztok purifikované želatiny (15 mg) ve vodě (100 µl) o teplotě asi 40 °C a získaná směs se intenzivně míchá při teplotě asi 35 °C za vzniku extrémně jemné disperze vodného želatinového roztoku v dichlormethanovém roztoku goserelin–polyesterové soli. Po ochlazení na okolní teplotu si směs zachovává koloidní charakter suspenze.

55

Tento experiment demonstruje, že goserelin–polyesterová sůl má povrchově aktivní vlastnosti a že může být použita pro získání stabilních disperzí v olejové fázi, jakou je dichlormethan, vodných roztoků nebo jiných ve vodě rozpustných činidel, jakými jsou želatina, polysacharidy a další hydrofilní polymery, nebo obráceně.

5

Opakuje se postup podle příkladu 6 za použití výše popsané disperze vodné želatiny v dichlormethanovém roztoku goserelin–polyesterové soli za vzniku mikrokapslového produktu, který obsahuje jak želatinu, tak i goserelin–polyesterovou sůl.

10

Ve vodné polymerní fázi mohou být inkorporovány i další nízkomolekulární sloučeniny. Zejména je někdy užitečné použít sloučeniny jako mannitol, o kterých je známo, že zvyšují stabilitu peptidů. Alternativně mohou být tato stabilizační činidla inkorporována v obou vodných fázích komplexní disperze typu voda–v–oleji–ve–vodě, obsahující vodnou želatinu dispergovanou v dichlormethanovém roztoku goserelin–polyesterové soli, přičemž získaná disperze typu voda–v–oleji je zase dispergována ve vodě.

15

Obdobné suspenzní a mikroparticulární formulace mohou být připraveny nahrazením goserelin–acetátu jinými vysoce potentními analogy (agonisté nebo antagonisté) hormonu uvolňujícího gonadotropin, jakými jsou tryptorelin, leuprorelin, busserelin nebo nafarelin, výhodně ve formě acetátových solí nebo solí s ostatními slabými kyselinami, nebo libovolným dalším polypeptidovým hormonem, který může regulovat nebo modulovat sekreci intaktních gonadotropinů nebo obou jejich podjednotek.

20

25 Příklad 8

Goserelin–acetát (771 mg, toto množství je ekvivalentní asi 670 mg goserelinu ve formě volné báze), kopolymer kyseliny D,L–mléčné a kyseliny glykolové (D,L–laktido–glykolidový kopolymer, 1,8 g, molárně 95/5), který má hmotnostní střední molekulovou hmotnost asi 3 600 a vnitřní viskozitu 1% (hmotn./obj.) chloroformového roztoku při teplotě 25°C rovnou 0,08 dl/g, a D,L–laktido–glykolidový kopolymer, který má hmotnostní střední molekulovou hmotnost asi 15 000 a vnitřní viskozitu 1% (hmotn./obj.) chloroformového roztoku při teplotě 25 °C 0,17 dl/g (4,2 g) se rozpustí v ledové kyselině octové (70 ml) prosté anhydridu. Kombinované polymery mají hmotnostní střední molekulovou hmotnost asi 12 300 a polydisperzitu asi 2,6. Získaný goserelin–polyesterový roztok se po kapkách přidá do kapalného dusíku a zmrazené kapičky se izolují a lyofilizují za hlubokého vakua po dobu asi 18. Produkt tvořený směsí účinné látky a polymeru se nakonec suší za hlubokého vakua při teplotě 55 °C po dobu 24 hodin.

30

35

Vysušená směs účinné látky a polymeru (6 g) se přidá k dichlormethanu (60 ml) za vzniku zakalené koloidní směsi, která se v průběhu jedné hodiny postupně vyčeří za vzniku čirého roztoku goserelin–polyesterové soli v dichlormethanu.

40

Tento roztok se potom vysuší rozprašením za použití Buchiho rozprašovací sušárny, přičemž vstupní teplota činí 60 °C a výstupní teplota činí 35 °C a získají se přibližně sférické mikročástice mající průměr od asi 1 do asi 10 μm.

45

V těchto mikročásticích je účinná látka přítomna v podstatě zcela jako goserelin–polyesterová sůl v případě, že obsah kyseliny octové vyjádřený jako volná kyselina nebo jako anion je nižší nebo rovný 0,06 % a to na rozdíl od příkladu, kdy by bylo žádoucí, aby goserelin byl přítomen ve formě acetátové soli a kdy by uvedený obsah činil 0,6 až 0,7 %.

50

Tyto mikročástice po zpracování lisováním při teplotě 80 °C poskytnou čirou, transparentní a křehkou fólii.

Tento experiment demonstruje užitečnost peptidových solí s nízkomolekulárními polyestery rozpustnými v benzenu, které mají případně vysokou polydisperzitu.

5 Obdobné roztokové, mikroparticulární a tvářené formulace mohou být připraveny nahrazením goserelin-acetátu buď přirozeně se vyskytujícími hormony uvolňujícími gonadotropin nebo
dalšími vysoce potentními syntetickými analogy (antagonisty nebo agonisty) hormonu uvolňujícího gonadotropin, jakými jsou tryptorelin, leuprorelin, buserelin nebo nafarelin, výhodně ve
formě acetátových solí nebo solí s dalšími slabými kyselinami, nebo libovolným dalším polypeptidovým hormonem, který reguluje sekreci intaktních gonadotropinů nebo obou jejich
10 podjednotek.

Příklad 9

15 Goserelin-acetát a další vysoce potentní syntetická agonizující činidla hormonu uvolňujícího gonadotropin jsou selektivními chemickými kastročnými činidly, která se používají při léčení hormonově dependentních rakovin, mezi které patří rakovina prostaty u mužů a premenopauzální rakovina prsu u žen. Tyto účinné látky jsou rovněž užívány pro léčení nemaligních gynekologických stavů u žen, přičemž mechanismus jejich působení spočívá v konečném potlačení sekrecí gonadotropinů hlenem, což zase vede k potlačení pohlavních hormonů, jakými jsou estrogen u žen a testosteron u mužů.

Kontinuální pravidelné uvolňování takových účinných látek může být takto výhodně
25 vyhodnoceno u normálních dospělých krysích samic majících normální cykly sekrece estrogenu. U těchto zvířat má takový cyklus délku asi 4 dnů a existence pozitivní sekrece estrogenu může být detekována přítomností pouze zrohovatělých buněk ve vaginálním výtěru, provedeném v den oestru. Jestliže je zvíře chemicky kastrováno účinnou látkou, jakou je goserelin, potom k oestru nedochází, což zase vede k absenci uvedených zrohovatělých buněk ve vaginálním výtěru. U pokusných zvířat došlo k proloužené periodě potlačení sekrece pohlavního hormonu, indukované chemickou kastrací, přičemž toto potlačení produkce pohlavního hormonu bylo udržováno tak dlouho, pokud docházelo k uvolňování účinného množství účinné látky.

35 i) Mikročástice získané v případě 8 (450 mg) se dispergují ve vodě obsahující 2 % (hmotn./obj.) natriumkarboxymethylcelulózy a 0,2 % (hmotn./obj.) produktu polysorbate 80 a objem disperze se doplní vodou na 3 ml, 0,2 ml (toto množství je ekvivalentní asi 3 mg goserelinu ve formě volné báze) se subkutánně injikuje 10 normálním dospělým krysím samicám, majícím pravidelný cyklus sekrece pohlavního hormonu, přičemž účinek účinné látky na uvedený cyklus se vyhodnocuje mikroskopickým zkoumáním vaginálních výtěrů. Pokusná
40 zvířata vstoupila do kontinuální fáze dioestru, tj. chemické kastrace, trvající 95 ± 3 dny.

Tento experiment ukazuje, že vodná suspenzní formulace goserelin-polyesterové soli na bázi nízkomolekulárního polyesteru rozpustného v benzenu poskytuje relativně dlouhou periodu regulovaného uvolňování po dobu asi tří měsíců peptidové účinné látky, která má metabolický
45 poločas pouze asi 4 až 6 dnů.

ii) Mikročástice získané v příkladu 8 (450 mg) se dispergují v ethyloleátu a objem disperze se doplní na 3 ml. 0,2 ml této formulace se subkutánní injekcí podá šesti krysím samicám majícím pravidelný cyklus sekrece pohlavního hormonu, Pokusná zvířata vstoupila do kontinuální fáze dioestru trvající 81 ± 3 dny.

Tento experiment ukazuje, že rozvodová formulace goserelin-polyesterové soli v organickém injekčním nosiči, který nerozpouští samotný polyester, poskytuje relativně dlouhou periodu regulovaného uvolňování peptidové účinné látky.

55

Příklad 10

5 Leuprorelin-acetát (50,3 mg) a kopolyester obsahující 78 mol. % kyseliny D,L–mléčné a 22 mol. % kyseliny glykolové (453,2 mg) a popsaný ve výše uvedeném příkladu 6 se rozpustí v ledové kyselině octové (5 ml) prosté anhydridu. Získaný roztok se po kapkách přidá ke kapalnému dusíku a zmrazené kapičky se lyofilizují za hlubokého vakua po dobu 22 hodin, načež se suší za hlubokého vakua při teplotě 55 °C po dobu 24 hodin.

10 Získaný produkt (500 mg) se rozpustí v redestilovaném acetonu (10 ml) ve 100–ml baňce s kulatým dnem za vzniku zprvu zakalené koloidní směsi, která se postupně vyčirí za vzniku transparentního roztoku. Aceton se odpaří za vakua a získaná čirá fólie se suší za hlubokého vakua při teplotě 55 °C po dobu 4 hodin. Tato fólie leuprorelin–polyesterové soli se opět rozpustí v acetonu (10 ml) a získaný roztok se odplyní a propláchně dusíkem.

15 Čerstvě destilovaná voda (200 ml) se intenzivně míchá pod atmosférou dusíku, načež se do takto míchané vody nastříká uvedený acetonový roztok leuprorelin–polyesterové soli. Když byl na povrch vody nastříkán veškerý acetonový roztok, v míchání se pokračuje ještě po dobu jedné hodiny, načež se směs ponechá usadit. Mikročástice leuprorelin–polyesterové soli se usadí u dna
20 baňky a vodný supernatant se odlije. Izolované mikročástice se opětovně resuspendují v dalším podílu (asi 200 ml) vody prosté oxidu uhličitého a získaná suspenze se míchá pod atmosférou dusíku po dobu jedné hodiny. Mikročástice se oddělí nejdříve dekantací vodné vrstvy po usazení mikročástic a potom zfiltrováním zbytku za účelem oddělení mikročástic od přebytku vody. Tyto mikročástice se potom suší za vakua při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin za vzniku produktu,
25 který má střední velikost částic asi 15 µm.

Tato mikroparticulární formulace leuprorelin–polyesterové soli se inkubuje v solance pufované fosfátem na pH 7,4 při teplotě 37 °C, přičemž se supernatant periodicky analyzuje ultrafialovým světlem za účelem stanovení uvolněného leuprorelinu. Tento leuprorelin byl kontinuálně
30 uvolňován po dobu asi 5 týdnů, přičemž v průběhu této časové periody došlo k úplnému odborní formulace.

Obdobné mikroparticulární formulace mohou být připraveny nahrazením leuprorelinu buď
35 přirozeně se vyskytujícími hormony uvolňujícími gonadotropin nebo jinými vysoce potentními syntetickými analogy (agonisty nebo antagonisty) hormonu uvolňujícího gonadotropin, jakými jsou tryptorelin, goserelin, buserelin nebo nafarelin, výhodně ve formě acetátových solí nebo dalších solí se slabými kyselinami, nebo libovolným jiným polypeptidovým hormonem, který reguluje sekreci intaktních gonadotropinů nebo obou gonadotropinových podjednotek.

40

Příklad 11

i) Goserelin-acetát (2,28 g, toto množství je ekvivalentní asi 2,00 g goserelinu ve formě volné báze) se rozpustí v ledové kyselině octové (60 ml) prosté anhydridu. Směs dvou kopolymerů
45 kyseliny D,L–mléčné a kyseliny glykolové (molárně 95/5) (12,6 g kopolymeru s hmotnostní střední molekulovou hmotností 15 846 a polydisperzitou 1,38 a 5,4 g kopolymeru s hmotnostní střední molekulovou hmotností 3 896 a polydisperzitou 1,78) poskytující přebytek kopolymer-
ních koncových karboxylových skupin vzhledem k bazické účinné látce, se rozpustí za míchání v ledové kyselině octové (150 ml) za vzniku čirého roztoku. Roztok účinné látky se přidá
50 k roztoku kopolymeru a směs se intenzivně promíchá. Tato směs se potom po kapkách přidá ke kapalnému dusíku a zmrazené částice ve formě malých perliček se potom lyofilizují po dobu dvou dnů v Edwardsově hlubokovakuové lyofilizační aparatuře. Takto vysušený materiál se potom dosušuje za vakua při teplotě 50 až 55 °C ve vakuové sušárně po dobu 24 hodin.

Takto vysušený produkt se potom přidá (100 mg) k dichlormethanu (1 ml), přičemž v průběhu 2 hodin dojde k jeho rozpuštění za vzniku čirého roztoku. V tomto příkladu je ukázáno, že tvorbou polyester–goserelinové soli se dosáhne tak dobré rozpustnosti účinné látky, že tato může být rozpuštěna v nepolárním rozpouštědle.

5

ii) Goserelin–acetát (2,28 g, toto množství je ekvivalentní asi 2,00 g goserelinu ve formě volné báze) se rozpustí v ledové kyselině octové (60 ml) prosté anhydridu. Směs dvou 100 mol. % polymerů kyseliny D,L–mléčné (12,6 g polymeru s hmotnostní molekulovou hmotností 15 178 a polydisperzitou 1,27 a 5,5 g polymeru s hmotností molekulovou hmotností 4204 a polydisperzitou 1,84), poskytující přebytek polymerních koncových karboxylových skupin vzhledem k bazické účinné látce, se za míchání rozpustí v ledové kyselině octové (150 ml) prosté anhydridu za vzniku čirého roztoku. K tomuto roztoku polymeru se přidá roztok účinné látky a směs se důkladně promíchá, načež se po kapkách přidá ke kapalnému dusíku a získané mražené perličky se potom lyofilizují po dobu dvou dnů za použití Edwardsovy hlubokovakuové lyofilizační aparatury, načež se takto vysušený materiál dosuší ve vakuové sušárně při teplotě 50 až 55 °C po dobu 24 hodin.

Takto vysušený produkt (100 mg) se potom přidá k dichlormethanu (1 ml), přičemž se veškerý pevný produkt zcela rozpustí v průběhu dvou hodin za vzniku čirého roztoku. V tomto příkladu je demonstrováno, že tvorba polyester–goserelinové soli činí účinnou látku do té míry rozpustnou, že tato látka může být rozpuštěna v nepolárním rozpouštědle.

iii) Goserelin–acetát (2,28 g, toto množství ke ekvivalentní asi 2,00 g goserelinu ve formě volné báze) se rozpustí v ledové kyselině octové (60 ml) prosté anhydridu. Směs kopolymeru kyseliny D,L–mléčné a kyseliny polyglykolové (80/20 mol. %, 12,6 g kopolymeru s hmotnostní střední molekulovou hmotností 160 510 a polydisperzitou 2,27) a kopolymeru kyseliny D,L–mléčné a kyseliny glykolové (95/5 mol. %, 5,4 g kopolymeru s hmotnostní střední molekulovou hmotností 3896 a polydisperzitou 1,78), poskytující přebytek kopolymerních koncových karboxylových skupin vzhledem k bazické účinné látce, se rozpustí za míchání v ledové kyselině octové (150 ml) prosté anhydridu za vzniku čirého roztoku. Roztok účinné látky se přidá k roztoku kopolymeru a směs se důkladně promíchá. Tato směs se potom po kapkách přidá ke kapalnému dusíku a získané zmražené malé perličky se potom lyofilizují v Edwardsově vakuové lyofilizační aparatuře a pak za vakua při teplotě 50 až 55 °C (ve vakuové sušárně) po dobu 24 hodin.

Tento vysušený produkt (100 mg) se přidá k dichlormethanu (1 ml), přičemž se veškerý pevný podíl zcela rozpustí v průběhu dvou hodin za vzniku čirého roztoku. Tímto příkladem je demonstrována skutečnost, že tvorba polyester–goserelinové soli činí účinnou látku tak dobře rozpustnou, že může být rozpouštěna v nepolárním rozpouštědle.

iv) Goserelin–acetát (2,17 g, toto množství je ekvivalentní asi 190 g goserelinu ve formě volné báze) se rozpustí v kyselině octové (ledové) prosté anhydridu (60 ml). Směs dvou kopolymerů kyseliny D,L–mléčné a kyseliny polyglykolové (67/33 mol. %) (12,0 g kopolymerů s hmotnostní střední molekulovou hmotností 35 833 a polydisperzitou 1,83 a 5,15 g kopolymeru s hmotnostní střední molekulovou hmotností 4116 a polydisperzitou 1,86), poskytující přebytek polymerních koncových karboxylových skupin vzhledem k bazické účinné látce, se rozpustí za míchání v ledové kyselině octové (150 ml) prosté anhydridu za vzniku čirého roztoku. Roztok účinné látky se přidá k roztoku kopolymeru a směs se důkladně promíchá. Tato směs se potom po kapkách přidá do kapalného dusíku, přičemž se získají zmražené malé perličky, které se lyofilizují po dobu dvou dnů za použití Edwardsovy vysokovakuové lyofilizační aparatury a takto vysušený materiál se potom dosuší za vakua při teplotě 50 až 55 °C ve vakuové sušárně v průběhu 24 hodin.

Tento vysušený produkt (100 mg) se přidá k dichlormethanu (1 ml), přičemž se veškerý pevný podíl rozpustí v průběhu 10 minut za vzniku čirého roztoku. Tímto příkladem je demonstrována

skutečnost, že tvorba polyester goserelinové soli činí účinnou látku tak dobře rozpustnou, že tato účinná látka může být rozpuštěna v nepolárním rozpouštědle.

5 Srovnávací příklad

Goserelin-acetát (2,28 g, toto množství je ekvivalentní asi 2,00 g goserelinu ve formě volné báze) se rozpustí v kyselině octové (60 ml) prosté anhydridu. Kopolymer kyseliny D,L–mléčné a kyseliny polyglykolové (50/50 mol. %, 18,0 g polymeru s hmotnostní střední molekulovou hmotností 22 307 a polydisperzitou 2,07), poskytující přibližně stechiometrický ekvivalent kopolymerních koncových karboxylových skupin vzhledem k bazické účinné látce, se za míchání rozpustí v ledové kyselině octové (150 ml) prosté anhydridu za vzniku čirého roztoku. Roztok účinné látky se přidá k roztoku polymeru a směs se důkladně promíchá. Tato směs se potom po kapkách přidá do kapalného dusíku za vzniku malých zmražených perliček, které se potom lyofilizují po dobu dvou dnů za použití Edwardsovy vysokovakuové lyofilizační aparatury a takto vysušený materiál se potom dosušuje ve vakuové sušárně při teplotě 50 až 55 °C po dobu 24 hodin.

Tento vysušený produkt (100 mg) se přidá k dichlormethanu (1 ml), přičemž ani po 4 hodinách se veškerý pevný podíl nerozpustí a k úplnému rozpuštění dojde teprve po 4 dnech a to za vzniku čirého roztoku. Tímto příkladem je demonstrována skutečnost, že tvorbou polyester–goserelinové soli se tak dobré rozpustnosti účinné látky, aby tato látka mohla být rozpuštěna v nepolárním rozpouštědle, dosáhne mnohem snadněji v případě, kdy jsou kopolymerní koncové karboxylové skupiny přítomny v přebytku vzhledem k bazické účinné látce.

Vysušené produkty i) až iv) se rozpustí v dichlormethanu a získané roztoky se vysuší rozprašováním v Buchiho laboratorní rozprašovací sušárně (Buchi 190) v souladu s údaji uvedenými v následující tabulce:

Produkt	Poměr produktu k rozpouštědlu (%)	Vstupní teplota (°C)	Výstupní teplota (°C)
i)	10	48	32
ii)	10	58	38
iii)	2	58	44
iv)	10	55	35

Sušení rozprašováním produktů i) až iv) poskytne malé částice s průměrem přibližně 1 až 10 µm, přičemž tyto rozměry byly zjištěny elektronovým skanovacím mikroskopem.

Finální částice se analyzují plynovým chromatografem s mezní detekcí přibližně rovnou 0,03 % za účelem stanovení obsahu kyseliny octové. Za použití tohoto detekčního vybavení nebyla v těchto formulacích stanovena žádná kyselina octová, což demonstruje, že účinná látka je přítomna jako polyesterová sůl a nikoliv jako acetátová sůl, neboť při existenci acetátové soli by bylo nutné očekávat obsah kyseliny octové přibližně rovný 0,5 %.

Částice získané sušením rozprašováním (50 mg) i) až iv) se rozpustí v dichlormethanu (0,5 ml) za vzniku čirého roztoku. Ke každému roztoku se přidá kapička kyseliny trifluoroctové, což má ve všech případech za následek tvorbu bílé sraženiny. Vzorky se odstředí za účelem izolace sraženin, které se potom promyjí dichlormethanem. Analýza provedená tlakovou kapalinovou, chromatografií (HPLC) ukazuje, že vysráženou látkou je goserelin. Tyto příklady ukazují, že účinná látka může být vytěsněna z její soli s polyesterem v roztoku v nepolárním rozpouštědle přidáním silné kyseliny a že je to způsobeno tím, že rozpustnost účinné látky v nepolárním rozpouštědle se vrátí k očekávané rozpustnosti soli peptidové účinné látky s kyselinou (tato sůl je nerozpustná).

Příklad 12

Částice získané sušením rozprašováním i) až iv) v příkladu 11 se dispergují (18 % mol./obj.) ve vhodném vodném nosiči pro injekce (% natriumkarboxymethylcelulózy, Fluka, střední viskozita, 0,2 % produktu polysorbát 80, Fluka).

Částice získané sušením rozprašováním v příkladu 11, dispergované ve výše uvedeném injekčním nosiči, se injikují deseti krysím samičkám Wistar. Z ocasů pěti kryš se 7., 14. a 28. den odeberou krevní vzorky a tyto krevní vzorky se analyzují za účelem stanovení obsahu goserelinu za použití radiačně–imunitního stanovení provedeného na bázi známé specifické reakce s účinnou látkou a prokázané absence reaktivity za vzniku metabolitů.

Výsledky těchto experimentů ukazují, že tato formulace poskytuje měřitelné hladiny goserelinu v krvi po dobu alespoň 4 týdnů.

Příklad 13

Produkt ii) získaný sušením rozprašováním v příkladu 11 se disperguje v následujících vodných nosičích pro injekce:

- a) natriumkarboxymethylcelulóza (produkt se střední viskozitou, Fluka) 1,0 % a polysorbát 80 (Tween) 0,75 %,
- b) methylcelulóza (15 mPa.s, Fluka) 0,75 % a polysorbát 80 (Tween) 0,75 %.

Uvedené formulace dobře dispergované v těchto nosičích jsou vhodné pro parenterální podání.

Příklad 14

Produkt ii) získaný sušením rozprašováním v příkladu 11 (400 mg) se rozpustí v dichlormethanu (4 ml). Takto získaný roztok se za použití injekční stříkačky přidá k 0,25% roztoku polyvinylalkoholu ve vodě (Aldrich, ze 75 % hydrolyzovaný produkt, molekulová hmotnost 2000), míchanému při rychlosti otáčení míchadla 2500 otáček za minutu. Po dvou minutách míchání se rychlost míchání sníží na 800 otáček za minutu a v míchání se pokračuje ještě po dobu 30 minut. Potom se míchání přeruší a vytvořené částice se ponechají usadit. Polyvinylalkoholový roztok se dekantuje a částice se dvakrát promyjí ledově chladnou vodou a izolují odstředěním. Částice se nakonec vysuší lyofilizací a finálním produktem je jemný partikulární produkt obsahující goserelin.

Příklad 15

Produkt iv) získaný sušením rozprašováním v příkladu 11 se při teplotě 82 °C vytlačuje za vzniku válcového extrudátu, majícího průměr přibližně jeden milimetr. Tento extrudát se nařeže na úseky mající hmotnost asi 36 mg a obsahující přibližně 3,6 mg goserelinu. Tento extrudát je zcela prostupný pro světlo a nemá tudíž bílou barvu, která je typická pro jednoduché směsi účinné látky a polymeru, připravené bez tváření, kterého je použito při tváření soli peptidu s polyesterem. Toto bílé zbarvení má například komerčně dostupný depotní Zoladex (Zoldex je ochrannou známkou). Čiřost získaného extrudátu indikuje, že peptidový goserelin je slučitelný s polyesterovou fází a že vzhledem k ní netvoří separátní fázi, ve které by docházelo k rozptylu světla a tudíž ke vzniku bílého zbarvení. K této slučitelnosti může dojít pouze v případě, jestliže je peptid ve stejné fázi jako polymer, tj. kdy je přítomen ve formě soli s polyesterem.

Každá takováto 3,6mg depotní forma byla implantována pod anestézií 21 krysám Wistar. Po uplynutí určitých časových úseků byly vždy tři krysy utráceny a uvedené depotní formy byly opět vyoperovány. Takto získané depotní formy byly rozpuštěny v ledové kyselině octové v odměrné
 5 baňce a polymer byl vysrážen přidáním přebytku vody. Polymer byl potom odfiltrován (přes filtr Millex 0,5 µm) a filtráty byly analyzovány tlakovou kapalinovou chromatografií (HPLC) za účelem stanovení obsahu účinné látky. Vypočte se profil uvolňování účinné látky z depotních forem a výsledky se vztáhnou k obsahu účinné látky v depotní formě, která nebyla implantována a která byla analyzována stejným způsobem. Uvedené depotní formy soli účinné látky s poly-
 10 esterem poskytují pravidelné uvolňování goserelinu in vivo po dobu alespoň 4 týdnů.

Příklad 16

15 i) Laktid/glykolidový kopolymer (95/5) s jednou koncovou karboxylovou skupinou (8,87 g, molekulová hmotnost $M_w = 5\,750$, molekulová hmotnost stanovená titrací koncové skupiny = $2\,516$ g/mol, polydisperzita = 1,5, vnitřní viskozita 1% (hmotn./obj.) roztoku v chloroformu = 0,10 dl/g) se rozpustí v dichlormethanu (50 ml) za míchání. K takto získanému roztoku se přidá 1,13 g goserelin-acetátu za vzniku kalné suspenze. Za míchání se přidá methanol (5 ml),
 20 přičemž po 30 minutách se směs zcela vyčeří. Rozpouštědlo se potom odstraní v rotační odparce za vzniku jasného produktu. Tento produkt se opětovně rozpustí v dichlormethanu (50 ml) a rozpouštědlo se opětovně odstraní v rotační odparce. Toto opětovné rozpuštění a odpaření rozpouštědla se opakuje ještě dvakrát za vzniku velmi viskózní tekutiny, která se vysuší za hlubokého vakua za vzniku bílé pěny. Tato pěna se rozetře a vysuší za vakua v průběhu 24 hodin
 25 při okolní teplotě, přičemž se jako finální produkt získá jemný amorfní pevný produkt.

ii) Postup popsáný v odstavci i) se opakuje za použití laktido/glykolidového kopolymeru (75/25) s jedinou koncovou karboxylovou skupinou (8,87 g, $M_w = 10\,900$, polydisperzita = 1,85, molekulová hmotnost stanovená titrací koncové skupiny = $3\,210$ g/mol, vnitřní viskozita 1% (hmotn./obj.) v chloroformu = 0,14 dl/g), přičemž se získá jediný amorfní pevný produkt.
 30

Formulace 1

35 Goserelin-laktido/glykolidový polymer z odstavce i) (1 g) se přidá k benzylbenzoátu (99%, od firmy Janssen, 2 ml) a směs se zahřívá za použití ručně drženého foukače horkého vzduchu až do okamžiku, kdy se směs za míchání rozpustí. 110 µl takto získané roztokové formulace obsahuje 3,6 mg goserelinu.

Formulace 2

40 Tato formulace je stejná jako formulace 1 s výjimkou spočívající v tom, že se jako rozpouštědlo použije směs (1,7 ml) 67 % benzylbenzoátu (99% od firmy Janssen) a 33 % benzylalkoholu (99%, bezvodý, od firmy Aldrich). 100 µl této roztokové formulace obsahuje 3,6 mg goserelinu.

Formulace 3

45 Tato formulace je stejná jako formulace 1 s výjimkou spočívající v tom, že se jako rozpouštědlo použije benzylalkohol (1,7 ml, bezvodý, 99% od firmy Aldrich). 100 µl této roztokové formulace obsahuje 3,6 mg goserelinu.
 50

Formulace 4

55 Tato formulace je stejná jako formulace 1 s výjimkou spočívající v tom, že se použije goserelin-laktido/glykolido-polymerní sůl z výše uvedeného odstavce ii) (1 g) a 3 ml benzylbenzoátu. 150 µl této roztokové formulace obsahuje 3,6 mg goserelinu.

Formulace 5

5 Tato formulace je stejná jako formulace 4 s výjimkou spočívající v tom, že se použije rozpouštědlová směs z formulace 2.

Formulace 6

10 Tato formulace je stejná jako formulace 4 s výjimkou spočívající v tom, že se použije rozpouštědlo z formulace 3. 100 µl této roztokové formulace obsahuje 3,6 mg goserelinu.

Biologické vyhodnocení

15 Uvolňování goserelinu z výše uvedených formulací 1 až 6 in vivo se vyhodnotí zkoumáním denních vaginálních výtěrů krysích samic, kterým byly podány uvedené formulace. Normální cyklus oestru (oestrus, met-oestrus, pro-oestrus) může být sledován podle množství různých buněčných typů (leukocyty, epiteliální buňky a zrohovatělé buňky) ve vaginálním výtěru samic. V případě, že je uvolňování účinné látky z formulací plynulé, potom dojde k přerušení normálního cyklu oestru a krysí samice zůstanou v dioestru tak dlouho, pokud pokračuje
20 uvolňování goserelinu.

Formulace 1 až 6 byly podány skupinám (n = 6) krysích samic s pravidelným cyklem oestru v dávce 3,6 mg goserelinu na každou kysu. Pro subkutánní dávkování uvedených formulací byla
25 použita injekční stříkačka s jehlou kalibru 20. Jako kontrolní skupina 5 pokusných zvířat byla použita skupina 5 myší, kterým účinná látka podána nebyla. Krysím samicám byly denně odebrány vaginální výtěry a tyto byly zkoumány za účelem určení stádia oestru pokusných zvířat přičemž získané výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

Číslo formulace	Průměrná doba trvání dioestru (dny) (\pm standardní odchylka)
1	100 \pm 2,7
2	120 \pm 6,3
3	69 \pm 5,9
4	59 \pm 1,2
5	61 \pm 2,1
6	53 \pm 3,7

30 Z těchto výsledků je zřejmé, že všech šest formulací poskytuje časovou periodu uvolňování goserelinu delší než 6 týdnů, přičemž formulace 1 a formulace 2 uvolňují goserelin dokonce po dobu tří měsíců nebo po dobu ještě delší. Z těchto výsledků je dále patrné, že formulace goserelin-polyesterové soli mohou existovat ve formě roztoků, které mohou být snadněji podány
35 parenterálně za použití injekčních jehel úzkých kalibrů a že takové formulace jsou vhodné pro léčení hormonově dependentních nádorů u lidí.

Příklad 17

Formulace 1

40

Tato formulace je stejná jako formulace z příkladu 16

Formulace 2

Opakuje se postup popsáný v příkladu 16 i) za použití poly-laktidového homopolymeru s jedinou koncovou karboxylovou skupinou ($M_w = 5\,092$, polydisperzita = 1,44, molekulová hmotnost stanovená titrací koncové skupiny = 2 270 g/mol) a goserelin-acetátu (0,46 g). Obsah kyseliny octové v tomto amorfním pevném produktu se stanoví plynovou chromatografií a činí 0,14 %.

Tato goserelin-laktido polymerní sůl (1 g) se přidá k benzylbenzoátu (99%, od firmy Janssen, 2 ml) a směs se zahřívá ručně drženým foukačem horkého vzduchu za míchání až do okamžiku, kdy se veškerý pevný podíl rozpustí. 110 μ l této roztokové formulace obsahuje 3,6 mg goserelinu.

Formulace 3

Laktido/glykolidový kopolymer (95/5) s jedinou koncovou karboxylovou skupinou (7,86 g, $M_w = 5\,750$, polydisperzita = 1,50, molekulová hmotnost stanovená titrací koncové skupiny = 2 516 g/mol) a goserelin-acetát (0,98 g) se rozpustí v ledové kyselině octové (100 ml). Získaný roztok se po kapkách zavádí do kapalného dusíku, načež se získané zmražené kapičky lyofilizují po dobu dvou dnů. Rezultující pevný podíl se potom dosuší v průběhu 24 hodin při teplotě 40 °C. Plynovou chromatografií se stanoví obsah kyseliny octové v produktu získaném po lyofilizaci, přičemž tento obsah činí 0,17 %.

Tato goserelin-laktido/glykolidová kopolymerní směs (1 g) se přidá k benzylbenzoátu (2 ml, 99% od firmy Janssen) a získaná směs se zahřívá ručně drženým foukačem horkého vzduchu za míchání až do okamžiku, kdy dojde k rozpuštění pevného podílu. 110 μ l této roztokové formulace obsahuje 3,6 mg goserelinu.

Je zřejmé, že formulace goserelinu ve formě polyesterové soli činí rozpustnost účinné látky natolik dobrou, že tato látka může být rozpuštěna v lipofilních rozpouštědlech, jakým je benzylbenzoát, ve kterém je samotný goserelin-acetát nerozpustný.

Biologické vyhodnocení

Formulace 1 až 3 se podají skupinám ($n = 10$) krysích samic s pravidelným cyklem oestru v dávce 3,6 mg goserelinu každé kryse, jak je to popsáno v příkladu 16. Po podání formulací bylo zjištěno, že pokusná zvířata vstoupila do periody kontinuálního dioestru, což indikuje plynulé uvolňování goserelinu. V následující tabulce je uvedena střední doba trvání dioestru pro každou skupinu krys. Z výsledků uvedených v této tabulce je zřejmé, že všechny tři formulace poskytují periody uvolňování goserelinu delší než čtrnáct týdnů.

Číslo formulace	Střední doba trvání dioestru (dny) (\pm standardní odchylka)
1	104 (\pm 5,4)
2	99 (\pm 3,9)
3	101 (\pm 2,8)

Z těchto příkladů je dále zřejmé, že formulace goserelin-polyesterové soli může být ve formě roztoků, které mohou být snadno podány parenterálně za použití injekční jehly úzkého kalibru a že tyto formulace jsou vhodné pro léčení hormonově dependentních nádorů u lidí.

Příklad 18

Formulace 1

5

Laktido/glykolidový kopolymer (95/5) s jedinou koncovou karboxylovou skupinou (4,5 g, $M_w = 6\ 806$, polydisperzita = 1,55, molekulová hmotnost stanovená titrací koncové skupiny 3027 g/mol, vnitřní viskozita 1% (hmotn./obj.) roztoku v chloroformu = 0,108 dl/g) se rozpustí v ledové kyselině octové (50 ml). K tomuto roztoku se přidá goserelin-acetát (0,56 g, 10 toto množství je ekvivalentní 0,5 g goserelinu) a získaná směs se míchá po dobu 10 minut za vzniku čirého bezbarvého roztoku. Tento roztok se po kapkách přidá ke kapalném dusíku a získané zmražené kapičky se lyofilizují po dobu dvou dnů. Získaný pevný produkt se potom dosuší při teplotě 40 °C v průběhu 24 hodin. Plynovou chromatografií se stanoví obsah kyseliny octové, přičemž tento obsah činí 0,3 %.

15

Tato goserelin-laktido/glykolido-kopolymerní směs (1,0 g) se přidá k benzylbenzoátu (2,0 ml) (2,0 ml, 99% od firmy Janssen) a rozpustí za míchání a zahřívání. Získaný roztok obsahuje 3,67 mg goserelinu ve 110 μ l, přičemž obsah goserelinu ve finálním produktu činí 10,0 % hmotnosti.

20

Formulace 2

Opakuje se postup popsaný pro výše uvedenou formulaci 1 za použití laktido/glykolidového kopolymeru (95/5) s jedinou koncovou karboxylovou skupinou (4,0 g, $M_w = 6\ 011$, polydisperzita = 1,56, molekulová hmotnost stanovená titrací koncové skupiny = 2700 g/mol, vnitřní viskozita 1% (hmotn./obj.) roztoku v chloroformu = 0,099 dl/g) a 1,12 g goserelin-acetátu (toto množství je ekvivalentní 1,0 g goserelinu). Plynovou chromatografií se stanoví obsah kyseliny octové ve vysušeném pevném podílu získaném po lyofilizaci, přičemž tento obsah činí 0,83 % a obsah goserelinu ve finálním produktu činí 19,46 % hmotnosti.

30

Tato goserelin-laktido/glykolidokopolymerní směs (0,54 g) se přidá k benzylbenzoátu (2,46 ml, 99% od firmy Janssen) a pevný podíl se rozpustí zahříváním a mícháním. Finální roztok obsahuje 3,50 mg goserelinu ve 110 μ l.

35 Formulace 3

Opakuje se postup, který byl popsán výše pro formulaci 2, za použití 2,1 g laktido/glykolidového kopolymeru a 1,0 g goserelin-acetátu (toto množství je ekvivalentní 0,9 g goserelinu). Plynovou chromatografií se stanoví obsah kyseliny octové v produktu vysušeném lyofilizací, přičemž tento obsah činí 1,14 % a obsah goserelinu ve finálním produktu činí 28,91 % hmotnosti.

40

Tato goserelin-laktido/glykolido-kopolymerní směs (0,36 g) se přidá k benzylbenzoátu (2,64 ml, 99% od firmy Janssen) a pevný podíl se rozpustí zahříváním a mícháním. Finální roztok obsahuje 3,47 mg goserelinu ve 110 μ l.

45

Formulace 4

Opakuje se postup, který byl popsán výše pro formulaci 1, za použití laktido/glykolidového kopolymeru (95/5) s jedinou koncovou karboxylovou skupinou (8,66 g, $M_w = 5\ 604$, polydisperzita = 1,71, molekulová hmotnost stanovená titrací koncové skupiny = 1 960 g/mol, vnitřní viskozita 1% (hmotn./obj.) roztoku v chloroformu = 0,094 dl/g) a 1,08 g goserelin-acetátu (toto množství je ekvivalentní 0,96 g goserelinu). Plynovou chromatografií se stanoví obsah kyseliny octové v pevném produktu vysušeném lyofilizací, přičemž tento obsah činí 0,08 % a obsah goserelinu ve finálním produktu činí 9,90 % hmotnosti.

55

Tato goserelin–laktido/glykolido–kopolymerní směs (1,0 g) se přidá k benzylbenzoátu (2,0 ml, 99% od firmy Janssen a rozpustí zahříváním a mícháním. Finální roztok obsahuje 3,67 mg goserelinu ve 110 µl.

5 Biologické vyhodnocení

Formulace 1 až 4 byly podány skupinám (n = 9 nebo 10) krysích samic s pravidelným cyklem oestru v dávce 3,6 mg každému pokusnému zvířeti, jak je to popsáno v příkladu 16. po podání této dávky bylo zjištěno, že krysí samičky vstoupily do periody kontinuálního dioestru, což svědčí o plynulém uvolňování goserelinu-. Střední doby trvání periody dioestru pro každou skupinu krys jsou uvedeny v následující tabulce. Z výsledků uvedených v této tabulce je zřejmé, že všechny tři formulace poskytují periody uvolňování goserelinu asi 3 měsíce nebo ještě delší.

Formulace č.	Střední doba trvání dioestru (dny) (\pm standardní odchylka)
1	114 \pm 1,8
2	94 \pm 4,6
3	97 \pm 5,3
4	83 \pm 4,3

15 Z těchto příkladů je dále zřejmé, že formulace obsahující sůl tvořenou účinnou látkou a polyesterem mohou mít formu roztoků, které mohou být snadno podávány parenterálně za použití injekční jehly úzkého kalibru a že takové formulace jsou vhodné pro léčení hormonově dependentních nádorů u lidí.

20

Příklad 19

Goserelin–polyesterová sůl ii) z příkladu 16 (3,75 g) se rozpustí v dichlormethanu (50 ml), který byl předběžně zfiltrován přes 0,45 µm filtr. Získaný roztok se zfiltruje přes 0,5 µm teflonovou filtrační membránu (Whatman WTP) do baňky, která byla sterilizována za použití autoklávu. Rozpouštědlo se odstraní v rotační odparce za vzniku viskózní fáze, načež se vzduch do rotační odparky potom připouští skrze 0,5 µm filtr. Získaná viskózní kapalina se vysuší zahříváním za vakua za vzniku bílé pěny, která se odváží do ampulí se zúženým hrdlem, přechovávaných v autoklávu s laminárním prouděním, načež se do ampulí přidají čerstvě destilovaná rozpouštědla za vzniku roztokových formulací goserelin–polyesterové soli, které jsou v podstatě prosté podílu suspendovaných částic.

30

Formulace 1

35 1 g pevného podílu se přidá k benzylbenzoátu (destilovaný, teplota varu 106 °C/30 Pa, 3 ml) a získaná směs se zahřívá generátorem horkého vzduchu až do okamžiku, kdy se rozpustí pevný podíl. 245 µl této roztokové formulace obsahuje 3,6 mg goserelinu.

40

Formulace 2

1 g pevného podílu se přidá k benzylalkoholu (destilovanému, teplota varu 44 °C/30 Pa) a pevný podíl se rozpustí zahříváním prostřednictvím generátoru horkého vzduchu. 100 µl této roztokové formulace obsahuje 3,6 mg goserelinu.

Biologické vyhodnocení

Dvěma skupinám po deseti krysích samičkách byly podány subkutánně formulace 1 a 2 za použití injekční jehly s kalibrem 20. Po uplynutí určitých časových úseků (1 týden (n=4), 4 týdny (n=3 a 6 týdnů (n=3)) byly pokusným zvířatům odebrány terminální krevní vzorky. Tyto krevní vzorky byly analyzovány za použití radiačně–imunologického stanovení za účelem stanovení obsahu goserelinu. U obou formulací byly zjištěny měřitelné obsahy goserelinu v krvi, což ukazuje na skutečnost, že roztokové formulace poskytují pravidelné uvolňování účinné látky po dobu několika týdnů. Bylo zjištěno, že profil uvolňování formulace 1 má maximum asi po čtyřech týdnech, zatímco k maximu profilu uvolňování formulace 2 dochází v prvním týdnu, načež bylo zjištěno, že obsah goserelinu v krvi postupně klesá s časem. Profil uvolňování formulace 1 je považován za příznivější než profil uvolňování formulace 2, neboť za použití benzyloctoátu jako rozpouštědla ve formulaci 1 se dosáhne konstantnější hladiny goserelinu v krvi s časem.

Z těchto příkladů je dále patrné, že formulace obsahují sůl tvořenou účinnou látkou a polyesterem mohou být ve formě roztoků, které mohou být snadno aplikovány parenterálně za použití injekční jehly s úzkým kalibrem a že jsou takové formulace vhodné pro léčení hormonově dependentních nádorů u lidí.

Příklad 20

Laktido/glykolidový kopolymer (95/5) s jedinou koncovou karboxylovou skupinou (9,0 g, $M_w = 6\ 011$, polydisperzita = 1,56, molekulová hmotnost stanovená titrací koncové skupiny = 2700 g/mol, vnitřní viskozita 1% (hmotn./obj.) roztoku v chloroformu = 0,099 dl/g) se rozpustí v dichlormethanu (100 ml). K získanému roztoku se přidá goserelin–acetát (1,124 g, toto množství je ekvivalentní 1 g goserelinu) za míchání, načež se přidá methanol (10 ml). Získaná kalná suspenze se míchá při okolní teplotě po dobu asi jedné hodiny až do okamžiku, kdy se získá čirý roztok. Rozpouštědlo se odstraní za použití rotační odparky za vzniku čiré viskózní kapaliny. Tato kapalina se potom opětovně rozpustí v dichlormethanu a jako dříve opět vysuší. Tento stupeň se opakuje dvakrát a získaná viskózní kapalina se nakonec vysuší za vakua za tvorby bílé pěny, která se dále suší za vakua přes noc. Pěna se rozdrťí na jemný prášek, který se suší za vakua při okolní teplotě po dobu jednoho dne. K tomuto prášku se potom přidá benzyloctoát (20 ml, 99% od firmy Janssen) a získaná směs se za míchání mírně zahřívá za vzniku roztoku.

Biologické vyhodnocení

Tato roztoková formulace goserelinu se za použití injekční jehly s kalibrem 20 subkutánně podá každé ze 45 krysích samiček (220 μ l, toto množství je ekvivalentní 7,3 mg goserelinu). Pokusná zvířata byla rozdělena do skupin po pěti a pokusným zvířatům byly odebírány vzorky krve 1 a 4 dny a 1, 3, 5, 7, 9, 11 a 13 týdnů po podání. Kromě toho byly pokusným zvířatům odebírány vzorky krve z ocasní žíly (skupinám po pěti pokusných zvířatech), 2, 4, 6, 8, 10 a 12 týdnů po podání formulace goserelinu. Tyto vzorky byly analyzovány radiačně–imunologickým stanovením za účelem zjištění obsahu goserelinu a získané výsledky ukazují, že se za použití kapalné formulace goserelin–polyesterové soli získají měřitelné obsahy účinné látky v krvi ještě asi 11 týdnů po podání formulace účinné látky a že uvedené formulace poskytují pravidelné uvolňování goserelinu in vivo.

Z těchto příkladů je dále patrné, že formulace obsahující sůl účinné látky a polyesteru mohou být ve formě roztoků, které mohou být snadno podány parenterálně za použití injekční jehly s úzkým kalibrem a že takové formulace by byly vhodné pro léčení hormonově dependentních nádorů u člověka.

Příklad 21

Peptid známý jako Látka P ve formě jeho acetátové soli (od firmy Sigma, 2 mg) se přidá k dichlormethanu (3 ml) a směs se důkladně promíchá. Uvedený peptid nevykazuje žádnou známku toho, že by se rozpouštěl v uvedeném rozpouštědle a vytváří v tomto rozpouštědle kalnou suspenzi.

Laktido/glykolidový kopolymer (70/30) s jedinou koncovou karboxylovou skupinou (225 mg, $M_w = 9755$, polydisperzita = 1,52, molekulová hmotnost stanovená titrací koncové skupiny = 1800) se přidá k dichlormethanu (25 ml). Směs se míchá po dobu 15 minut za vzniku čirého bezbarvého roztoku. K tomuto roztoku se přidá roztok Látky P (25 mg) v methanolu (0,5 ml). Rezultující kalná suspenze se míchá po dobu jedné hodiny a po uplynutí této doby se získá zcela čirý roztok. Rozpouštědlo se odstraní v rotační odparce a získaný čirý sklovitý pevný produkt se opětovně rozpustí v dichlormethanu (5 ml) a roztok se opětovně odpaří. To se opakuje dvakrát. Finální pevný podíl se opětovně rozpustí v dichlormethanu (3 ml) a získaný roztok se pomalu nakape na PTFE-ovrstvenou tkaninu, umožňující opaření rozpouštědla a vytvoření tenké fólie čirého bezbarvého sklovitého pevného produktu (obsah peptidu = 9,1 % hmotnosti).

Tato fólie (96,8 mg) se uloží do malé lékovky, načež se do lékovky přidá fosfátem pufovaná solanka (2 ml, pH 7,4) (pufr byl předběžně zfiltrován přes 0,2 μm filtr a obsahuje 0,02 % azidu sodného ve funkci konzervačního činidla). Lékovka se potom uloží do inkubátoru při teplotě 37 °C a pufr se periodicky odstraňuje a znovu dodává. Pufr, který byl odstraněn, se analyzuje za použití UV-spektrofotometru (Hewlett Packard 8452A) při 210 nm proti standardním roztokům Látky P za účelem stanovení uvolňování Látky P. Výsledky ukazují, že Látka P může být rozpuštěna v dichlormethanu v případě, že má formu soli kopolymeru kyseliny mléčné a kyseliny glykolové ukončeného karboxylovou skupinou a že může být za použití tohoto rozpouštědla zpracována na tenký film, který poskytuje kontinuální uvolňování peptidu po časovou periodu asi 4 týdnů.

30

Příklad 22

Vodný roztok leuprolid-acetátu (jinak známého jako leuprorelin-acetát) (300 μl roztoku o koncentraci 330 mg/ml) se za intenzivních stříhových podmínek přimíchá ke 20 ml 10% (hmotn./hmotn.) roztoku kyseliny polyhydroxystearové, mající číselnou střední molekulovou hmotnost asi 2000, v produktu Miglyol 812 (triglyceridy nasycených mastných kyselin se středním řetězcem včetně kyseliny linolenové, Dynamit Nobel, GB) za vzniku, částečně na rozmezí olejové a vodné fáze, leuprolid-polymerní soli, která stabilizuje vytvořenou koloidní suspenzi typu voda-v-oleji. Voda se potom odstraňuje při teplotě 50 °C a za míchání a za hlubokého vakua až do okamžiku, kdy směs již nepění a neublá, přičemž se získá olejovitá kompozice, která je velmi jemně zakalena a která je vhodná pro perorální podání.

Příklad 23

45

Lys⁸-vasopresin-acetátová sůl se přidá (2 mg, od firmy Sigma) k dichlormethanu a získaná směs se míchá. Peptid nevykazuje žádnou známku toho, že by se rozpouštěl v uvedeném rozpouštědle a zůstává ve formě kalného suspendovaného podílu.

Laktido-glykolidový kopolymer (70/30) s jedinou koncovou karboxylovou skupinou (225 mg, $M_w = 9755$, polydisperzita = 1,52, molekulární hmotnost stanovená titrací koncové skupiny = 1800) se přidá k dichlormethanu (5 ml). Tato směs se míchá po dobu 15 minut za vzniku čirého bezbarvého roztoku. K tomuto roztoku se přidá Lys⁸-vasopresin (25 mg, od firmy Sigma) a methanol (0,5 ml). Získaná kalná suspenze se míchá po dobu jedné hodiny a v průběhu této doby se vytvoří naprosto čirý roztok. Rozpouštědlo se odstraní v rotační odparce a získaný

55

čirý sklovitý pevný produkt se opětovně rozpustí v dichlormethanu (5 ml) a znovu odpaří. To se opakuje dvakrát. Finální pevný produkt se rozpustí v dichlormethanu (3 ml) a roztok se pomalu nakape na PTFE-ovrstvenou tkaninu, umožňující odpaření rozpouštědla a vytvoření tenkého filmu čirého bezbarvého sklovitého pevného produktu (obsah Lys⁸-vasopresinu činí 10 % hmotnosti).

Tento film (97,31 mg) se uloží do malé lékovky, do které se přidá fosfátem pufovaná solanka (2 ml, pH 7,4) (pufr byl předběžně zfiltrován skrze 0,2 µm filtr a obsahuje 0,02 % azidu sodného ve funkci konzervačního činidla). Lékovka se uloží do inkubátoru při teplotě 37 °C a pufr se periodicky odstraňuje a dodává. Odebraný pufr se analyzuje v UV-spektrofotometru (Hewlett Packard 8452A) při 210 nm proti standardním roztokům Lys⁸-vasopresinu. Výsledky tohoto testu jsou uvedeny v následující tabulce. Experiment ukazuje, že Lys⁸-vasopresin může být rozpuštěn v případě, že je ve formě soli laktido-glykolidového kopolymeru ukončeného karboxylovou skupinou a že získaná směs poskytuje kontinuální uvolňování peptidu po časovou periodu alespoň čtyř týdnů.

Uvolňování Lys⁸-vasopresinu in vitro

Čas (dny)	Uvolněné množství Lys ⁸ -vasopresinu z filmu (%)
1	4,11
4	5,45
7	5,55
14	5,75
21	26,82
28	47,27

Příklad 24

Dvě formulace Zeneca ZD6003 (/Met⁻¹, Arg¹¹, Ser^{17,27,6,65}/-lidský G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) modifikovaný polyethylenglykolem 5000 způsobem popsaným v referenčním příkladu 4 nebo 7 evropské patentové přihlášky EP 0 473 268) v laktido-glykolidovém kopolymeru se připraví následujícím způsobem.

i) Dichlormethan (4 ml) se přidá k lyofilizovanému přípravku (39,72 mg). Takto se vytvoří opakní disperze účinné látky v rozpouštědle. Přidá se laktido-glykolidový kopolymer (75/25) s jedinou koncovou karboxylovou skupinou (363,6 mg, Mw = 9963, polydisperzita = 2,19, molekulová hmotnost stanovená titrací koncové skupiny = 2815 a vznikne čirý roztok.

Tento roztok se přidá k roztoku (400 ml) methylcelulózy (0,25% (hmotn./obj.) Methocel, 15 mPa.s od firmy Fluka) e vodě za stříhového namáhání (mixér Heidolph RZR50, 2150 otáček za minutu). Po 3-minutovém míchání touto rychlostí otáčení mixéru se rychlost míchání sníží na 800 otáček za minutu. Získané částice se potom ponechají usadit (gravitačně) po dobu 30 minut, zatímco se směs chladí ledem. Supernatant se odlije a částice se promyjí resuspendováním v ledově chladné destilované vodě (50 ml) a odstředěním při 1000 otáčkách za minutu. to se opakuje čtyřikrát a částice se nakonec lyofilizují.

Částice připravené tímto způsobem mají dobrou kvalitu, přičemž jsou sférické a mají střední velikost částic 32 µm, což bylo stanoveno obrazovou analýzou pod optickým mikroskopem. Obsah účinné látky v těchto částicích byl stanoven extrakcí a následnou podtlakovou kapalinovou chromatografií, přičemž činí 9,45 %, čímž znamená 96% účinnost inkorporace účinné látky použité k vytvoření mikročástic.

ii) Dichlormethan (4 ml) se přidá k lyofilizovanému přípravku ZD6003 (44,18 mg). Takto se získá opakní disperze účinné látky v rozpouštědle. Přidá se laktido-glykolidový kopolymer (75/25, 364,1 mg, $M_w = 16\ 800$ (stanoveno dimenzně exkluzní chromatografií, polydisperzita = 2,2, od firmy Boehringer Ingelheim). Byl učiněn pokus stanovit molekulovou hmotnost polymeru titrací koncové skupiny, avšak nebylo to možné vzhledem k velmi nízké koncentraci titrovatelných zbytků, což znamená, že polymer nemá koncovou karboxylovou skupinu. Směs roztoku účinné látky a polymeru se nevyčeřila po přidání polymeru a zůstala kalnou disperzí, což ukazuje, jak bylo ostatně očekáváno, že v případě nepřítomnosti koncových karboxylových skupin v polymeru nemůže být vytvořena peptid-polyesterová sůl.

Tato směs se přidá k roztoku (400 ml) methylcelulózy (0,25% (hmotn./obj.) Methocel. 15 mPa.s, od firmy Fluka) ve vodě za stříhového namáhání (mixér Heindolph RZR50, 2150 otáček za minutu). Po 30 minutovém míchání při této rychlosti se rychlost míchání sníží na 800 otáček za minutu. Rezultující částice se potom ponechají gravitačně usadit po dobu 30 minut, zatímco se směs chladí na ledu. Supernatant se odlije a částice se promyjí resuspendováním v destilované vodě (50 ml) a odstředěním při 1000 otáčkách za minutu. To se opakuje čtyřikrát, načež se částice nakonec lyofilizují.

Částice připravené tímto způsobem mají podřadnou kvalitu ve srovnání s částicemi získanými ve výše uvedeném odstavci a), přičemž některé mají nepravidelný tvar a jejich střední velikost je 40 μm , což bylo stanoveno obrazovou analýzou pod optickým mikroskopem. Obsah účinné látky v těchto částicích by stanoven extrakcí a potom tlakovou kapalinovou chromatografií, přičemž činí 2,05 %, což znamená 19% účinnost inkorporace účinné látky použité k vytvoření mikročástic.

Výše uvedený příklad ukazuje, že ZD6003 může být rozpuštěn v dichlormethanu v případě přítomnosti polymeru s jedinou koncovou karboxylovou skupinou a to vzhledem k tomu, že samotný dichlormethan účinnou látku nerozpouští. Kromě toho takový roztok může být k vytvoření mikročástic účinné látky a polymeru s velmi vysokou mírou inkorporace účinné látky. Na rozdíl od toho výše uvedený příklad také ukazuje, že ZD6003 nemůže být rozpuštěn v dichlormethanu v přítomnosti polymeru v případě, kdy polymer nemá koncovou karboxylovou skupinu. V tomto případě se vytvoří pouze kalná disperze. Navíc taková kalná disperze produktu ZD6003 v roztoku polymeru s žádnou koncovou karboxylovou skupinou má za následek nízkou míru inkorporace účinné látky při zpracování do formy mikročástic.

Příklad 25

i) Goserelin-acetát (22,47 mg, toto množství je ekvivalentní 19,99 mg goserelinu) se přidá k benzylbenzoátu (2,21 g, 99% od firmy Janssen). Tato směs se zavede do inkubátoru při teplotě 40 °C a kontinuálně se míchá po dobu 9 dnů za použití magnetického míchadla. Po 2 a 9 dnech se odeberou alikvotní podíly, které se odstředí po dobu 15 minut při 13 000 otáčkách za minutu, přičemž se získá peleta nerozpuštěné účinné látky. Alikvoty supernatantu se přesně odváží (okolo 100 mg) do 50-ml odměrných baněk. Do každé baňky se přidá ledová kyselina octová (2 ml), načež se doplní objem vodným 0,5% (obj./obj.) roztokem kyseliny trifluoroctové. Část tohoto roztoku se uloží do odstředivkové kyvety a takto se odstředí po dobu 15 minut při 13 000 otáčkách za minutu za účelem oddělení suspendovaného podílu. Supernatant se potom analyzuje za účelem stanovení obsahu goserelinu za použití tlakové kapalinové chromatografie. V žádném vzorku nebyl detekován goserelin. Detekční mez při tomto chromatografickém stanovení je 0,2 $\mu\text{g/ml}$ goserelinu, přičemž kvantifikační mez činí 0,5 $\mu\text{g/ml}$ goserelinu. Z výše uvedeného může být stanovena rovnovážná rozpustnost (při teplotě 40 °C) goserelinu v benzylbenzoátu, která činí 0,2 $\mu\text{g/mg}$.

ii) Laktido-glykolidový kopolymer (95/5) s jedinou koncovou karboxylovou skupinou (291,9 mg, $M_w = 6\ 742$, polydisperzita = 1,61, molekulová hmotnost stanovená titrací koncové

skupiny = 2565 g/mol, vnitřní viskozita 1% (hmotn./obj.) roztoku v chloroformu = 0,103 dl/g) se přidá k benzylbenzoátu (3,38 g, 99% od firmy Janssen) za vzniku roztoku. K tomuto roztoku se přidá goserelin-acetát (22,52 mg, toto množství je ekvivalentní 20,03 mg goserelinu). Tato směs se inkubuje a její vzorky se zpracují postupem popsaným ve výše uvedeném odstavci i).
 5 V benzylbenzoátu nebylo možné po dvou dnech detekovat žádný goserelin, avšak devátý den byla detekována hladina přibližně 0,2 µg goserelinu na miligram benzylbenzoátu. detekční mez pro goserelin při tomto stanovení za použití tlakové kapalinové chromatografie (HPLC) je stejná jako je uvedena v předcházejícím odstavci i). Z tohoto lze určit, že rovnovážná rozpustnost (při teplotě 40 °C) goserelinu v benzylbenzoátu v případě, že je přítomen ve formě pouhé směsi
 10 s laktido-glykolidovým kopolymerem, může být stanovena jako hodnota pohybující se od 0,2 do 0,5 µg/mg.

iii) Laktido-glykolidový kopolymer (95/5) s jedinou koncovou karboxylovou skupinou (9,0 g, Mw = 6 011, polydispersita = 1,56, molekulová hmotnost stanovená titrací koncové skupiny 2 700 g/mol, vnitřní viskozita 1% (hmotn./obj.) roztoku v chloroformu = 0,099 dl/g) se rozpustí v dichlormethanu (100 ml). K získanému roztoku se přidá goserelin-acetát (1,124 g, toto množství je ekvivalentní 1 g goserelinu) za míchání, načež se přidá methanol (10 ml). Získaná kalná suspenze se potom míchá při okolní teplotě po dobu asi jedné hodiny až do okamžiku, kdy se získá čirý roztok. Rozpouštědlo se odstraní za použití rotační odparky za vzniku čiré viskózní kapaliny. Tato kapalina se potom opětovně rozpustí v dichlormethanu a vysuší jako v předchozím případě. Tento krok se opakuje potom dvakrát a nakonec získaná viskózní kapalina se vysuší za vakua za vzniku bílé pěny, která se dosuší za vakua přes noc. Tato pěna se rozdrťí na jemný prášek, který se suší za vakua při okolní teplotě po dobu jednoho dne. Tento prášek se přidá k benzylbenzoátu (20 ml, 99% od firmy Janssen) a získaná směs se mírně zahřívá za míchání za
 25 vzniku roztoku.

Tento roztok se intenzivně promíchá a 1 ml vzorek tohoto roztoku se uloží do odstředivkové kyvety a odstředí se při 14 000 otáčkách za minutu po dobu 30 minut. Opatrně se odebere alikvot supernatantu, který se odváží do 50-ml odměrné baňky. Vzorek se analyzuje na obsah goserelinu postupem popsaným v odstavci i). Byl stanoven obsah goserelinu v tomto roztoku 24,6 µg/mg benzylbenzoátu.
 30

Tento příklad ukazuje, že benzylbenzoát je velmi špatným rozpouštědlem pro goserelin-acetát. Kromě toho přidání laktido-glykolidového polymeru za vzniku pouhé směsi s goserelin-acetátem v benzylbenzoátu nevede k výraznému zvýšení rovnovážné rozpustnosti goserelin-acetátu v benzylbenzoátu. Nicméně goserelin-polyesterová sůl může být rozpuštěna v benzylbenzoátu za vzniku roztoku obsahujícího goserelin v koncentraci mnohem vyšší, než je rovnovážná rozpustnost volného goserelinu v tomto rozpouštědle.
 40

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Farmaceutická kompozice, vyznačená tím, že jako účinnou látku obsahuje farmaceutiky přijatelnou sůl tvořenou kationtem peptidu obsahujícího alespoň jednu bazickou skupinu a aniontem polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou a má formu roztoku nebo disperze soli v rozpouštědle, které je rozpouštědlem volného polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou, avšak není rozpouštědlem volného peptidu obsahujícího alespoň jednu bazickou skupinu, přičemž velikost částic soli v disperzi je menší než 5 mikrometrů a výhodně menší než 0,2 mikrometru, nebo má formu mikročástic nebo implantátu pro injekci nebo podkožní implantaci.
 45
 50

2. Farmaceutická kompozice podle nároku 1, **v y z n a ě n á t í m**, že peptid obsahující alespoň jednu bazickou skupinu je farmakologicky účinným peptidem zvoleným z množiny zahrnující oxytocin, vasopresin, adrenokortikotrofní hormon ACTH, epidermální růstový faktor EGF, prolaktin, luteinizující hormon, folikul–stimulující hormon, luliberin nebo hormon uvolňující luteinizující hormon LHRH, inzulin, somatostatin, glukagon, interferon, gastrin, tetragastrin, pentagastrin, urogastron, sekretin, kalcitonin, enkefaliny, endorfiny, kyotorfin, taftsín, thymopoietin, thymosin, thymostimulin, brzlíkový humorální faktor, sérový brzlíkový faktor, faktor nádorové nekrózy, kolonie stimulující faktory, motilin, bomnbesin, dinorfin, neurotensin, cerulein, bradykinin, urokinázu, kallikrein, analogy a antagonisty látky P, angiotensin, nerovový růstový faktor, krevní koagulační faktory VII a IX, lysozym–chlorid, renin, tyrocidin, gramicidiny, růstové hormony, melanocyty stimulující hormon, hormon uvolňující hormon štítné žlázy, štítnou žlázu stimulující hormon, parathyroidní hormon, pankreozymín, cholecystokinín, lidský placentální laktogen, lidský chorionní gonadotropín, peptid stimulující syntézu proteinu, gastrický inhibiční peptid, vasoaktivní intestinální peptid, růstový faktor odvozený z krevních destiček, faktor uvolňující růstový hormon, kostní morfogenní protein a syntetické analogy a modifikace a farmakologicky účinné fragmenty těchto látek.
3. Farmaceutická kompozice podle nároku 1, **v y z n a ě n á t í m**, že peptid obsahující alespoň jednu bazickou skupinu je farmakologicky neúčinným peptidem zvoleným z množiny zahrnující polyarginin, polylysin a kopolymer argininu a lysinu, kopolymery neutrálních aminokyselin v D– L– nebo DL–formě s argininem nebo/a lysinem ve formě D nebo L nebo v racemické formě a peptidy nebo kopolypeptidy, ve kterých jsou peptidové řetězce zcela nebo částečně ukončeny na N–konci bazickou skupinou a základní řetězec je tvořen neutrálními aminokyselinovými zbytky.
4. Farmaceutická kompozice podle nároku 1, **v y z n a ě n á t í m**, že polyester ukončený karboxylovou skupinou je zvolen z množiny zahrnující polyestery odvozené od hydroxy–kyselin a polyestery odvozené z polykondenzace diolů nebo/a polyolů s karboxylovými kyselinami nebo/a polykarboxylovými kyselinami.
5. Způsob přípravy farmaceutické kompozice podle nároku 1, **v y z n a ě n ý t í m**, že se roztok nebo disperze soli získá tím, že se peptid obsahující alespoň jednu bazickou aminokyselinu ve formě volné báze nebo soli se slabou kyselinou a polyester ukončený karboxylovou skupinou rozpustí v neutrálním polárním rozpouštědle, ve kterém jsou peptid a polyester rozpustné, načež se rozpouštědlo odstraní a zbývající koncentrovaný roztok se přidá k rozpouštědlu, které není rozpouštědlem vytvořené peptid–polyesterové soli, nebo se peptid obsahující alespoň jednu bazickou aminokyselinu ve formě volné báze nebo soli se slabou kyselinou a polyester ukončený karboxylovou skupinou rozpustí v rozpouštědle, ve kterém je peptid a polyester rozpustný a které je odstranitelné lyofilizací, načež se získaný roztok mžikově zmrazí, získaná zmrazená směs se lyofilizuje, zbytek po lyofilizaci se disperguje v rozpouštědle polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou a vytvořená peptid–polyesterová sůl se ponechá rozpustit, nebo se uvede v reakci peptid obsahující alespoň jednu bazickou aminokyselinu ve formě soli se silnou kyselinou a polyester, který je zcela nebo částečně ve formě soli karboxylové kyseliny mající kation tvořený alkalickým kovem nebo kovem alkalických zemin.
6. Farmaceutická kompozice podle nároku 1, **v y z n a ě n á t í m**, že je určena pro prolongované uvolňování peptidu obsahujícího alespoň jednu bazickou skupinu a že obsahuje farmaceuticky přijatelnou sůl tvořenou kationtem peptidu obsahujícího alespoň jednu bazickou skupinu a aniontem polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou a má formu mikročástic o průměru 0,2 až 500 mikrometrů suspendovaných v dodatečném farmaceuticky přijatelném injekčním nosiči.
7. Farmaceutická kompozice podle nároku 6, **v y z n a ě n á t í m**, že dodatečným farmaceutickým přijatelným nosičem je vodný nebo organický nosič, který není rozpouštědlem látek

tvořících kompozici nebo je tímto nosičem hydrofilní organický injekční nosič v případě použití vysoce lipofilního polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou.

8. Farmaceutická kompozice podle nároku 1, **v y z n a ě n á t í m**, že obsahuje farmaceuticky přijatelnou sůl tvořenou kationtem farmakologicky účinného peptidu obsahujícího alespoň jednu bazickou skupinu a aniontem polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou a vykazuje prolongované uvolňování peptidu obsahujícího alespoň jednu bazickou skupinu, přičemž má formu farmaceuticky přijatelného roztoku obsahujícího
- 10 – peptid obsahující alespoň jednu bazickou aminokyselinu a mající molekulovou hmotnost alespoň 300, který je ve formě soli s polyesterem ukončeným karboxylovou skupinou, přičemž tato sůl je tvořena kationtem peptidu obsahujícího alespoň jednu bazickou skupinu a aniontem polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou,
 - 15 – rozpouštědlo, které je rozpouštědlem volného polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou, avšak které není rozpouštědlem volného peptidu obsahujícího alespoň jednu bazickou skupinu,
 - přebytek polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou a
 - případně podíl peptidu obsahujícího alespoň jednu bazickou skupinu v solubilizované nebo koloidně dispergované formě.
- 20 9. Farmaceutická kompozice podle nároku 8, **v y z n a ě n á t í m**, že peptidem obsahujícím alespoň jednu bazickou skupinu je syntetický analog hormonu uvolňujícího luteinizující hormon zvolený z množiny zahrnující busorelin ([D-Ser(Bu)⁶, des-Gly-NH₂¹⁰]-LHRH(1-9)NH₂), deslorelin ([D-Trp⁶, des-Gly-NH₂¹⁰]-LHRH(1-9)NH₂), fertorelin ([D, des-Gly-NH₂¹⁰]-LHRH(1-9)-NH₂), goserelin ([D-Ser(Bu)⁶, Azgly¹⁰]-LHRH), histrelin ([D-His(Bzl)⁶, des-Gly-NH₂¹⁰]-LHRH(1-9)NH₂), leuprorelin ([D-Leu⁶, des-Gly-NH₂¹⁰]-LHRH(1-9)NH₂), lutrelin ([D-Trp⁶, MeLeu⁷, des-Gly-NH₂¹⁰]-LHRH(1-9)NH₂), nafarelin ([D-Nal⁶]-LHRH), tryptorelin ([D-Nal⁶]-LHRH) a jejich farmakologicky účinné soli.
- 30 10. Farmaceutická kompozice podle nároku 8, **v y z n a ě n á t í m**, že rozpouštědlo je zvoleno z množiny zahrnující benzylbenzoát, benzylalkohol, ethyllaktát, glyceryltriacetát, estery kyseliny citronové a polyethylenglykoly, alkoxyethylenglykoly a polyethylenglykolacetáty s molekulovou hmotností nižší než 1000.
- 35 11. Farmaceutická kompozice podle nároku 8, **v y z n a ě n á t í m**, že poměr soli tvořené kationtem peptidu obsahujícího alespoň jednu bazickou skupinu a aniontem polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou k volnému polyesteru ukončenému karboxylovou skupinou je roven 1:0 až 0,1:10.
- 40 12. Farmaceutická kompozice podle nároku 8, **v y z n a ě n á t í m**, že poměr celkového pevného podílu k rozpouštědлу je roven 2 až 40 % (hmotn./obj.).
- 45 13. Způsob farmaceutické kompozice podle nároku 8, **v y z n a ě n á t í m**, že se homogenně promísená směs peptidu obsahujícího alespoň jednu bazickou skupinu a polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou rozpustí ve farmaceuticky přijatelném rozpouštědlem, nebo se roztok peptidu obsahujícího alespoň jednu bazickou skupinu v alkoholu obsahujícím 1 až 6 uhlíkových atomů pozvolna přidá k roztoku polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou v rozpouštědle vhodném pro injekci, načež se v případě, že rozpouštědlo přítomné ve výchozím roztoku peptidu není farmaceuticky přijatelné, toto rozpouštědlo odstraní.

50

Konec dokumentu
