

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

4340-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **01. 07. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **03.07.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/022699**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14. 04. 99**
(Věstník č. 4/99)

(86) PCT číslo: **PCT/US97/11450**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 98/00158**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁶:

A 61 K	38/04
A 61 K	38/08
A 61 K	38/09
A 61 K	38/24
A 61 K	47/08
A 61 K	47/16
A 61 K	47/18
A 61 K	47/20

(71) Přihlášovatel:

ALZA CORPORATION, Palo Alto, CA, US;

(72) Původce:

Stevenson Cynthia L., Mountain View, CA,
US;

Prestrelski Steven J., Mountain View, CA,
US;

(74) Zástupce:

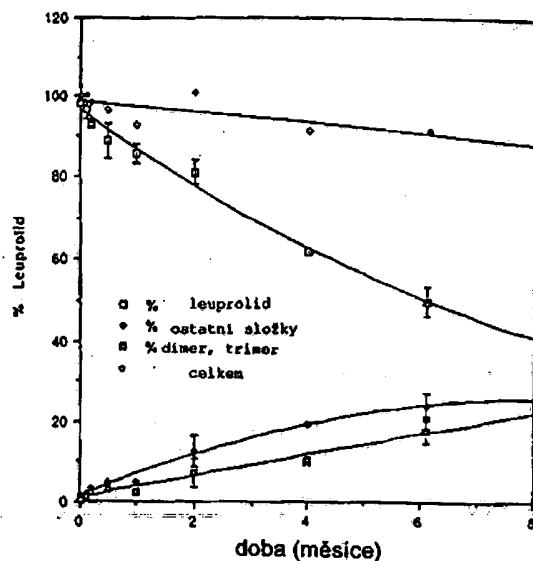
Guttmann Michal JUDr. Ing., Nad Štolou
12, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Nevodné polární aprotické peptidové
formulace**

(57) Anotace:

Toto řešení se týká stabilních nevodných polárních aprotických formulací peptidových sloučenin. Tyto stabilní formulace zahrnují peptidy v nevodných polárních aprotických rozpouštědlech. Mohou se dlouhodobě skladovat za zvýšených teplot a zvláště jsou vhodné pro implantovatelné depotní systémy dlouhodobě uvolňující léčivé látky.



CZ 4340-98 A3

Nevodné polární aprotické peptidové formulace

Odkaz na příbuzné přihlášky

Tato přihláška nárokuje prioritu podle 35 U.S.C. 119(e) k patentové přihlášce USA číslo 60/022.699 z 3.7.1996, jejíž popis je zde zahrnut odkazem.

Oblast techniky

Tento vynález se vztahuje ke stabilním nevodným aprotickým formulacím peptidových sloučenin a zvláště k formulacím peptidových sloučenin při vyšších koncentracích.

Odkazy:

Následující odkazy jsou uváděny čísla v závorkách ([]) v příslušné části specifikace.

1. Zoladex (goserelinacetátový implantát), Physician's Desk Reference, 50. edice, s. 2858-2861, r. 1996.
2. Patent USA č. 3,914.412, vydaný 21.10.1975.
3. Patent USA č. 4,547.370, vydaný 15.10.1985.
4. Patent USA č. 4,661.472, vydaný 28.4.1987.
5. Patent USA č. 4,689.396, vydaný 25.8.1987.
6. Patent USA č. 4,851.385, vydaný 25.7.1989.
7. Patent USA č. 5,198.533, vydaný 30.3.1993.
8. Patent USA č. 5,480.868, vydaný 2.1.1996.
9. WO 92/20711, zveřejněný 26.11.1992.
10. WO 95/00168, zveřejněný 5.1.1995.
11. WO 95/04540, zveřejněný 6.2.1995
12. "Stabilita gonadorelinu a triptorelinu ve vodném roztoku", V.J.Helm, B.W.Muller, Pharmaceutical Research, 7/12, s. 1253 - 1256, r. 1990.
13. "Nový degradační produkt Des-Gly¹⁰-NH₂-LH-RH-ethylamidu (fertirelinu) ve vodném roztoku", J.Okada, T.Seo, F.Kasahara, K.Takeda, S.Kondo, J. of Pharmaceutical

- Sciences, 80/2, s. 167-170, r. 1991.
14. "Charakterizace produktu rozpouštědlové degradace histrelinu, agonisty spouštěcího hormonu luteinizačního hormonu (LHRH)", A.R.Oyler, R.E.Naldi, J.R.Lloyd, D.A.Graden, C.J.Shaw, M.L.Cotter, J. of Pharmaceutical Sciences, 80/3, s. 271-275, r. 1991.
15. "Parenterální peptidové formulace: chemické a fyzikální vlastnosti nativního spouštěcího hormonu luteinizačního hormonu (LHRH) a hydrofobních analogů ve vodném roztoku", M.F.Powell, L.M.Sanders, A.Rogerson, V.Si, Pharmaceutical Research, 8/10, s. 1258 - 1263, r. 1991.
16. "Degradace LHRH analogu nafarelinacetátu ve vodném roztoku", D.M.Johnson, R.A.Pritchard, W.F.Taylor, D.Conley, G.Zuniga, K.G.McGreevy, Intl. J. of Pharmaceutics, 31, s. 125-129, r. 1986.
17. "Podpora perkutánní absorpce leuprolidu", M.Y.Fu Lu, D.Lee, G.S.Rao, Pharmaceutical Research, 9/12, s. 1575-1576, r. 1992.
18. Lutrepulse (IV [intravenózní] injekce gonadorelinacetátu). Physician's Desk Reference, 50. edice, s. 980-982, r. 1996.
19. Faktrel (gonadorelinhydrochlorid pro subkutánní nebo IV injekci), Physician's Desk Reference, 50. edition, s. 2877-2878, r. 1996.
20. Lupron (leuprolidacetát pro subkutánní injekci), Physician's Desk Reference, 50. edition, s. 2555-2556, r. 1996.
21. Depotní lupron (leuprolid acetát pro depotní suspenzi), Physician's Desk Reference, 50. edition, s. 2556-2562, r. 1996.
22. "Farmaceutický zásah pro zlepšení klinické účinnosti leuprorelinacetátu", H.Toguchi, J. of Intl. Medical

Research, 18, s. 35-41, r. 1990.

23. "Dlouhodobá stabilita vodného roztoku spouštěcího hormonu luteinizačního hormonu hodnocená biotestem in vitro a kapalnou chromatografií", Y.F.Shi, R.J.Sherins, D.Brightwell, J.F.Gallelli, D.C.Chatterji, J.of Pharmaceutical Sciences, 73/6, s. 819-821, r. 1984.
24. "Peptidové kapalně krystaly: inverzní korelace kinetiky tvorby a thermodynamické stability ve vodném roztoku", M.F.Powell, J.Fleitman, L.M.Sanders, V.C.Si, Pharmaceutical Research, 11/9, s. 1352-1354, r. 1994.
25. "Průběh rozpouštění leuprolidacetátu, antagonisty LHRH, stanovený spektroskopii cirkulárního dichroismu ", M.E.Powers, A.Adejei, M.Y.Fu Lu, M.C.Manning, Int. J. Pharmaceutics, 108, s. 49-55, r. 1994.
26. "Příprava depotních injikovatelých mikrokuliček leuprorelinacetátu pro tříměsíční depozici s použitím biodegradovatelných polymerů", Pharmaceutical Research, 11/8, s. 1143-1147, r. 1994.

Popis obsažený v každé z těchto publikací, patentů nebo patentových přihlášek je zde těmito odkazy celý zahrnut ve stejném rozsahu, jako kdyby znění každé jednotlivé publikace, patentu nebo patentové přihlášky bylo v odkazu specificky a individuálně obsaženo.

Spouštěcí hormon luteinizačního hormonu (LHRH), známý také jako spouštěcí hormon gonadotropinu (GnRH) je dekapeptid se strukturou:

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂.

Je vylučován hypothalamem a váže se na receptory hypofýzy, přičemž uvolňuje luteinizační hormon (LH) a hormon stimulující folikul (FSH). LH a FSH stimulují gonády k syntéze steroidních hormonů. Jsou známy četné analogy LHRH včetně peptidů příbuzných LHRH, které fungují jako agonisty

a takové, které fungují jako antagonisty (1-15). LHRH analogy jsou známy tím, že jsou použitelné při léčbě nemocí na hormonech závislých jako je rakovina prostaty, benigní zbytnění prostaty, endometrióza, hysteromyom, metrofibrom, předčasná puberta, rakovina prsu a jako antikoncepční prostředek^(p). Podávání léku s dlouhodobým uvolňováním je výhodné jak pro sloučeniny příbuzné agonistům LHRH, které při opakovaném podávání snižují počet dosažitelných receptorů takže produkce steroidních hormonů je potlačena, tak pro sloučeniny příbuzné antagonistům LHRH, které je třeba kontinuálně podávat pro trvalou inhibici vzniku endogenního LHRH. (8).

Trvalé parenterální uvolňování léčiv, zvláště léčiv na bázi peptidů, má mnohé výhody. Odborníkům je dobře známé použití implatovatelných zařízení pro dlouhodobé uvolňování velkého množství léčiv nebo jiných příznivě působících činidel. Typické přístroje jsou popsány například v patentech USA č. 5,034.229, 5,057.318 a 5,110.596. Popis každého z těchto patentů je zde nahrazen odkazem.

Všeobecně platí že biologická dostupnost peptidů orální cestou, včetně sloučenin příbuzných LHRH, je nízká (16-17).

Dosavadní stav techniky

V současné době komerčně nabízené formulace LHRH, jejich analogy a příbuzné sloučeniny používané pro parenterální injekce jsou vodné roztoky, které obsahují relativně nízké koncentrace sloučenin příbuzných LHRH (0,05 až 5 mg/ml) a rovněž mohou obsahovat přísady jako mannit nebo laktózu (18-20). Takové formulace sloučenin příbuzných LHRH je třeba skladovat buď zmrazené nebo při pokojové teplotě, ale jen krátkou dobu.

Komerčně dosažitelné depotní formulace sloučenin

příbuzných LHRH podávané za účelem dlouhodobého uvolňování po dobu 1-3 měsíců sestávají z 15 % sloučeniny příbuzné LHRH dispergované v matrici z kopolymeru D,L-mléčné kyseliny a glykolové kyseliny v podobě válečku pro subkutánní injektování (1) a z formulace sestávající z mikročástic obsahujících jádro (střed) ze sloučeniny příbuzné LHRH a želatiny, jež je obklopeno pláštěm z kopolymeru D,L-mléčné kyseliny a glykolové kyseliny. Tyto ^{m. k.}částice jsou suspendovány v rozpouštědle pro subkutánní nebo intramuskulární injektování (21,26). Tyto výrobky se musí skladovat při pokojové nebo nižší teplotě. O vodných formulacích sloučenin příbuzných LHRH je známo, že vykazují chemickou i fyzikální nestabilitu a degradaci po ozáření (12-16, 22-25).

Stabilitu (t_{90} asi 5 let) prokázaly formulace typu vodných roztoků s velmi nízkou koncentrací (25 $\mu\text{g/ml}$) obsahující ústoj (10 mM, iontová síla 0,15) a skladované při teplotách do 25 °C (teplota místnosti) (15).

Trvá potřeba stabilních peptidových formulací.

Podstata vynálezu

Tento vynález nabízí stabilní nevodné formulace v podobě roztoků peptidových sloučenin v polárních aprotických rozpouštědlech. Tyto formulace peptidových sloučenin mají koncentrace nejméně ca 10 %. Tyto stabilní formulace lze dlouhodobě skladovat při zvýšených teplotách (například 37 °C) a jsou zvláště vhodné pro implantované systémy pro dlouhodobé uvolňování léku (například 1-12 měsíců a více).

V jednom ohledu vynález popisuje stabilní nevodné formulace peptidových sloučenin, které obsahují alespoň jednu peptidovou sloučeninu v alespoň jednom polárním aprotickém rozpouštědle. V jednom výhodném provedení

formulace obsahuje nejméně 10 % hmotnostních peptidové sloučeniny.

V jiném ohledu vynález nabízí způsoby přípravy stabilních nevodných formulací peptidových sloučenin, jež zahrnují rozpuštění nejméně jedné peptidové sloučeniny v nejméně jednom polárním aprotickém rozpouštědle. Výhodné formulace obsahují alespoň asi 10 % hmotnostních peptidových sloučenin.

V dalším ohledu vynález poskytuje způsoby léčby pacienta trpícího zhoršeným zdravotním stavem, který může být zlepšen podáním peptidové sloučeniny, přičemž uvedené způsoby zahrnují podávání tomuto pacientovi účinného množství stabilní nevodné formulace obsahující alespoň jednu peptidovou sloučeninu v nejméně jednom polárním aprotickém rozpouštědle.

Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1 ukazuje stabilitu 40% (hmot.) roztoku leuprolidacetátu v dimethylsulfoxidu (methylsulfoxid nebo DMSO) po dvou měsících při 80 °C zjišťovanou vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s převrácenými fázemi (RP-HPLC).

Obrázek 2 ukazuje tentýž vzorek jako v obrázku 1 injektovaný při vylučovací chromatografii (SEC). Z obrázku vyplývá, že k agregaci dochází jen v malé míře a toto nevelké shlukování sestává z dimerních a trimerních produktů a žádná agregace vyššího řádu neexistuje.

Obrázek 3 ukazuje Arrheniův graf úbytku leuprolidu z 40% roztoků leuprolidacetátu v dimethylsulfoxidu (DMSO).

Obrázek 4 ilustruje chemickou a fyzikální stabilitu 40% roztoku leuprolidu v DMSO po 6 měsících při 80 °C.

Obrázek 5 ilustruje ztrátu leuprolidu z 40% roztoku leuprolidacetátu v DMSO po 6 měsících při 37 °C, 50 °C, 65 °C

nebo 80 °C.

Obrázek 6 ilustruje chemickou stabilitu 40% roztoku leuprolidacetátu v DMSO po 9 měsících při 37 °C.

Obrázek 7 dokazuje, že zvýšení koncentrace roztoku peptidu leuprolidu v DMSO zvýšilo jeho stabilitu při 80 °C.

Obrázek 8 dokazuje, že zvýšení obsahu vlhkosti v 40% formulacích leuprolidu v DMSO mělo za následek sníženou stabilitu při 80 °C.

Obrázek 9 ukazuje, že ve formulacích z obrázku 8 rostlo množství degradačních produktů s rostoucí vlhkostí.

Podrobný popis vynálezu

Tento vynález se vztahuje k nečekanému objevu, že při rozpuštění peptidových sloučenin v nevodných polárních aprotických rozpouštědlech vznikají stabilní formulace. Již známé formulace peptidových sloučenin, což jsou zředěné pufrované vodné roztoky obsahující přísady jako je EDTA nebo askorbová kyselina, které se musí skladovat při nízkých teplotách (4-25 °C), tvoří degradační produkty po degradačních liniích jako je kysele nebo bazicky katalyzovaná hydrolýza, deamidace, racemizace a oxidace. Naproti tomu formulace uvedené v těchto patentových nárocích stabilizují peptidové sloučeniny při zvýšených teplotách (například 37 až 80 °C) a při vysokých koncentracích (tj. nejméně asi 10 %).

Standardní peptidové a proteinové formulace jsou zředěné vodné roztoky. Stabilitu léků se obvykle docílí změnou jednoho nebo více z následujících parametrů: pH, druhu ústoje, iontové síly, excipientů (EDTA, askorbové kyseliny ap.) V těchto formulacích nelze plně stabilizovat degradační procesy způsobené vodným prostředím (jako je hydrolýza, deamidace, racemizace). Naopak se v tomto

14.01.99

vynálezu dokazuje, že peptidy formulované v nevodném prostředí jako je dimethylsulfoxid (DMSO) a dimethylformamid (DMF) jsou chemicky a fyzikálně stabilnější než peptidy formulované ve vodě. DMSO a DMF jsou považovány za polární aprotická rozpouštědla. Od aprotických rozpouštědel by se očekávalo, že zpomalí degradaci, protože nemohou dodávat protony do degradačních pochodů. Naopak by se očekávalo od rozpouštědel, jež jsou polárnější než voda (dipól^{ový} moment vody je 1,85, DMF 3,82 a DMSO 3,96), že urychlí degradaci, protože mohou pomoci stabilizovat stupeň určující tuto rychlost a tím zvýšit rychlost degradace. Nicméně jsme zjistili, že celkový účinek polárních aprotických rozpouštědel všeobecně spočíval ve stabilizaci roztoků peptidů.

Vynález se týká užití nevodných aprotických rozpouštědel jako je DMSO nebo DMF pro stabilizaci peptidových formulací proti jak chemické, tak fyzikální degradaci. Tento objev se zakládá na zjištění, že použití DMSO nebo DMF zlepšuje celkovou stabilitu peptidů v širokém rozsahu podmínek formulace, včetně vysokých koncentrací a zvýšených teplot, což umožňuje uvolňování peptidů z dlouhodobě implantovaných systémů, které by jinak nebylo proveditelné.

A. Definice

Zde použité termíny mají tento význam:

Termín "chemická stabilita" znamená, že po linii chemických změn jako je oxidace nebo hydrolýza vzniká pouze přijatelné množství degradačních produktů. Konkrétně je formulace považována za stabilní, když po dvou měsících při 37 °C nevznikne víc než asi 20 % degradačních produktů.

Termín "fyzikální stabilita" znamená, že vzniká pouze přijatelné množství agregátů (například dimerů, trimerů a

14.01.99

větších shluků). Specificky je formulace považována za fyzikálně stabilní, když po dvou měsících při 37 °C nevznikne víc než 15 % agregátů.

Termín "stabilní formulace" znamená, že po dvou měsících při 37 °C (nebo ekvivalentních podmínkách při zvýšené teplotě) zbude nejméně asi 65 % chemicky a fyzikálně stabilních peptidových sloučenin. Zvláště výhodnými formulacemi jsou takové, které udrží v těchto podmínkách alespoň 80 % chemicky a fyzikálně stabilních peptidů. Speciálně preferovanými stabilními formulacemi jsou takové, u kterých nedochází k degradaci ani po sterilizaci ozářením (například paprsky gama, beta nebo svazkem elektronových paprsků.)

Termín "peptid" a/nebo "peptidová sloučenina" znamená polymerní sloučeniny složené z až 50 zbytků aminokyselin spojených amidovými (CONH) vazbami. V těchto termínech jsou zahrnuty i analogy, deriváty, agonisty, antagonisty a jejich farmaceuticky přijatelné soli. Tyto termíny rovněž zahrnují peptidy a/nebo peptidové sloučeniny, které obsahují jako strukturní složku D-aminokyseliny, modifikované, derivatizované nebo v přírodě se nevyskytující aminokyseliny v D- nebo L-konfiguraci a/nebo peptomimetické jednotky.

Termín "sloučeniny příbuzné LHRH" znamená spouštěcí hormon luteinizačního hormonu (LHRH), jeho analogy a farmaceuticky přijatelné soli. Agonisty a antagonisty LHRH typu okta-, nona- a dekapeptidů jsou obsaženy v termínu sloučeniny příbuzné LHRH stejně jako nativní LHRH. Zvláště preferované sloučeniny příbuzné LHRH zahrnují LHRH, leuprolid, goserelin, nafarelin a ostatní známé aktivní agonisty a antagonisty (1-21).

Termín "vysoká koncentrace" znamená alespoň 10 % hmotnostních a koncentraci limitovanou maximální rozpustností

toho konkrétního peptidu.

Termín "excipient" znamená více nebo méně inertní sloučeninu ve formulaci, která je přidána jako ředidlo nebo vehikulum nebo pro vytvoření formy nebo konzistence. Excipienty se odlišují od rozpouštědel jako je ethylalkohol, používaný k rozpouštění léků ve formulacích a od neionogenních povrchově aktivních prostředků jako je Tween 20, používaný k solubilizaci léků ve formulacích a od konzervačních prostředků jako jsou benzylalkoholy nebo methyl- nebo propylparabeny, používané pro prevenci nebo inhibici růstu mikrobů.

Termín "polární aprotické rozpouštědlo" znamená polární rozpouštědlo, které neobsahuje kyselý vodík a není donorem vodíkové vazby. Příklady polárního aprotického rozpouštědla jsou dimethylsulfoxid (DMSO), dimethylformamid (DMF), hexamethylfosfortriamid (HMPT) a n-methylpyrrolidon.

Termín "nevodné protické rozpouštědlo" znamená nepolární rozpouštědlo obsahující vodík vázaný na kyslík nebo dusík, takže je schopen vytvářet vodíkové vazby nebo být donorem protonu. Příklady nepolárních protických rozpouštědel představují polyethylenglykoly (PEG), propylenglykol (PG), polyvinylpyrrolidon (PVP), methoxypropylenglykol (MPEG), glycerin a glykofurol.

Příprava formulací

Tento vynález se vztahuje k nevodným formulacím peptidových sloučenin v polárním aprotickém rozpouštědle, jež jsou stabilní po dlouhou dobu při zvýšených teplotách. Standardní zředěné vodné peptidové a proteinové formulace vyžadují pro dosažení stability zvláštních podmínek týkajících se ústoje, iontové síly, pH a excipientů (například EDTA a askorbové kyseliny). Naproti tomu patentem

nárokované formulace dosahují stability peptidových sloučenin použitím nevodných polárních aprotických rozpouštědel. Především bylo formulacemi podle tohoto vynálezu dosaženo stability v případě vysokých koncentrací (nejméně asi 10 % hmotnostních).

Příklady peptidů a peptidových sloučenin, jež lze formulovat na základě tohoto vynálezu, zahrnují takové peptidy, které mají biologickou aktivitu, nebo které lze použít pro léčbu nemocí nebo jiných patologických stavů. Zahrnují, aniž by se na ně omezovaly, adrenokortikotropní hormon, angiotensin I a II, atriální natriuretický peptid, bombesin, bradykinin, kalcitonin, cerebellin, dynorfin A, alfa a beta endorfin, endothelin, enkefalin, epidermální růstový faktor, fertirelin, spouštěcí peptid folikulárního gonadotropinu, galanin, glukagon, gonadorelin, gonadotropin, goserelin, spouštěcí peptid růstového hormonu, histrelin, inzulin, leuprolid, LHRH, motilin, nafarelin, neurotensin, oxytocin, somatostatin, substanci P, faktor nekrotického tumoru, triptorelin a vasopresin. Jejich analogy, deriváty, antagonisty, agonisty a farmaceuticky přijatelné soli lze použít rovněž.

Peptidové sloučeniny použitelné v těchto formulacích a způsoby podle tohoto vynálezu lze použít ve formě soli, nejraději farmaceuticky přijatelné soli. Použitelné soli jsou známy odborníkům a zahrnují soli anorganických kyselin, organických kyselin, anorganických bází nebo organických bází. Výhodnými solemi jsou acetáty.

Peptidy a peptidové sloučeniny dobře rozpustné v nevodných polárních aprotických rozpouštědlech jsou pro použití v tomto vynálezu preferovány. Odborník snadno určí, které sloučeniny jsou použitelné na základě jejich rozpustnosti, což znamená, že sloučenina musí být v daném

14.01.99

nevodném polárním aprotickém rozpouštědle rozpustná v alespoň přijatelném množství. Přednost se dává rozpustnostem alespoň asi 10 % hmotnostních. Zvláště výhodné peptidové sloučeniny jsou sloučeniny příbuzné LHRH včetně leuprolidu a leuprolid acetátu.

Podíl peptidu může kolísat v závislosti na sloučenině a zdravotním stavu léčeného, rozpustnosti sloučeniny, předpokládané dávce a době podávání. (Viz například Gilman a další, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 7. edition, 1985) a Remington, *Pharmaceutical Sciences*, 18. edition, 1990, jejichž závěry jsou zde zahrnuty odkazy). Koncentrace peptidu ve formulacích s vysokou koncentrací se může pohybovat od asi 10 % hmotnostních do maximální rozpustnosti sloučeniny. Výhodné rozpětí je od asi 20 do asi 60 % hmotnostních. V současné době je více preferován koncentrační rozsah od asi 30 do asi 50 % hmotnostních a nejvhodnější je rozsah od asi 35 do asi 45 % hmotnostních.

Mimo očekávání bylo zjištěno, že při zvyšování koncentrace peptidu rozpuštěného v nevodném polárním aprotickém rozpouštědle se stabilita peptidové formulace může zvyšovat. Například, jak ukazuje obrázek 7, když roztoky 5, 10, 20 a 40 % leuprolidu v DMSO byly 8 měsíců skladovány při 80 °C a periodicky byly odebírány vzorky a analyzovány pro zjištění zbývajících koncentrací leuprolidu, formulace s vyššími koncentracemi leuprolidu byly shledány stabilnějšími než formulace s nižšími koncentracemi leuprolidu.

Všeobecně platí, že stabilní formulace podle tohoto vynálezu se mohou připravit jednoduchým rozpuštěním potřebného množství (což může být terapeuticky účinné množství) příslušné peptidové formulace ve zvoleném nevodném polárním aprotickém rozpouštědle. Výhodná polární aprotická

rozpouštědla představují DMSO a DMF.

Zvýšení podílu vody obsažené v peptidových formulacích podle tohoto vynálezu zvyšuje stupeň degradace peptidu, jak ukazuje obrázek 8. Tento vzrůst je zřejmě způsoben hlavně růstem produktů chemické degradace, přičemž shlukování (agregace) zůstává poměrně konstantní (obrázek 9).

Bylo též zjištěno, že nevodná protická rozpouštědla jako PEG, PG a PVP lze podle přání přidávat k těmto formulacím podle nároků vynálezu.

C. Metodologie

Zjistili jsme, že se stabilní nevodné formulace peptidových sloučenin mohou připravit rozpuštěním zvolené peptidové sloučeniny v nevodném polárním aprotickém rozpouštědle.

Tyto formulace peptidových sloučenin, specificky formulace sloučeniny příbuzné LHRH leuprolidu, jsme zkoušeli z hlediska stability jejich urychleným stárnutím za zvýšené teploty a měřením jejich chemické a fyzikální stability. Výsledky těchto zkoušek (uvedené například v tabulce II a obrázcích 1,2,4 a 6) ukazují, že tyto formulace byly stabilní za podmínek, jež se blíží nebo překračují skladování po dobu jednoho roku při teplotě 37 °C.

Rovněž jsme testovali stabilitu formulací peptidových sloučenin připravených jak je zde popsáno po gama ozáření (2,5 Megarad). Výsledky uvedené v tabulce III ukazují, že tyto formulace zůstaly chemicky a fyzikálně stabilní i po takovémto ozáření.

Jak je ukázáno v tabulce I, zkoušeli jsme stabilitu širokého spektra peptidových formulací, zvláště leuprolidu, goserelinu, LHRH, angiotensinu I, bradykininu, kalcitoninu, enkefalinu, inzulinu, neurotensinu, substance P,

trypsinogenu a vasopresinu jejich rozpouštěním (nebo snahou je rozpustit) v nevodném polárním aprotickém rozpouštědle DMSO a pak jejich urychleným stárnutím při zvýšených teplotách. Stabilita formulací se měřila. Výsledky jsou uvedeny v tabulce I jako poločas při 37 °C za předpokladu, že $E_a = 22,2$ kcal/mol. Značné množství testovaných peptidů bylo v DMSO rozpustných a za zkušebních podmínek zůstaly stálé. Rozpustnost určitého peptidu v určitém nevodném polárním aprotickém rozpouštědle a stabilita výsledného roztoku se snadno stanoví užitím rutinních postupů známých odborníkům.

Tabulka I: Stabilita peptidů formulovaných v DMSO

Formulace	Poločas* (Teplota)
40% leuprolid	29,8 let (37 °C)
40% goserelin	5,0 let (80 °C)
20% LHRH	8,2 roku (65 °C)
20% angiotensin I	4,2 roku (65 °C)
5% angiotensin I	4,1 měsíce (50 °C)
20% bradykinin	2,9 měsíce (65 °C)
40% kalcitonin	nerozpustný (80 °C)
20% kalcitonin	2,4 měsíce (80 °C)
5% kalcitonin	100% stabilita 2 měs. (50 °C)
10% enkefalin	1,9 měsíce (80 °C)
5% enkefalin	2,6 měsíce (50 °C)
20% inzulin	nerozpustný gel (65 °C)
5% neurotensin	5,0 měsíce (50 °C)
5% substance P	3,0 měsíce (50 °C)
40% trypsinogen	nerozpustný krystal/gel (65 °C/80 °C)
20% trypsinogen	nerozpustný gel (65 °C)
5% trypsinogen	5,9 měsíců (50 °C)

40% vasopresin	degradace (80 °C)
20 % vasopresin	11,8 dní (65 °C)
*Poločas při 37 °C; předpoklad: $E_a = 22,2$ kcal/mol	

Formulace 40% peptidu v DMSO skladované šest měsíců při teplotě 37 °C, 50 °C, 65 °C a 80 °C vykázaly nelineární průběh Arrheniovy kinetické rovnice při měření celkové ztráty peptidu z roztoku, ilustrující stabilitu této formulace při zvýšených teplotách. Rozbor údajů zjištěných při 37 °C ukázal t_{90} 14,4 měsíců, což dokazuje, že stabilita při 37 °C je velmi dobrá.

Zdá se, že teplota ovlivňuje jak rychlost degradace, tak podíl degradačních produktů formulací podle tohoto vynálezu. Studium formulací leuproliid-DMSO ukázalo, že při 65 °C a 80 °C je zřejmě oxidace hlavní formou chemické degradace. Naopak se zdá, že při 37 °C a 50 °C je dominantní cestou degradace těchto formulací hydrolýza a isomerace.

Neočekávaně jsme rovněž shledali, že určité peptidové formulace podle tohoto vynálezu jsou bakteriostatické (tj. inhibují růst bakterií), baktericidní (tj. usmrcují bakterie) a sporicidní (tj. usmrcují spory). Zvláště formulace leuproliidu v koncentraci 50-400 mg/ml vykazovaly bakteriostatické, baktericidní a sporicidní účinky. Stabilitu vzorků neovlivnilo injektování bakterií, což naznačuje, že enzymy uvolňované z usmrcených a lyzovaných bakterií neovlivňovaly záporně stabilitu produktu. Toto ukazuje, že tyto formulace nepodporovaly aktivitu enzymů.

Je známo, že některé peptidy, například kalcitonin a leuproliid, jsou fyzikálně nestabilní, protože u nich dochází k agregaci, gelaci, fibrilaci, formulují-li se ve vodných

roztocích. Zlepšení fyzikální stability může zvýšit biologickou dostupnost, usnadnit senzibilizaci a imunitní odezvu a umožnit snazší parenterální podávání včetně podávání s užitím implantovatelných systémů pro dlouhodobé uvolňování léků.

Mimo očekávání bylo zjištěno, že určité peptidy jako leuprolid, goserelin a kalcitonin formulované v nevodných polárních aprotických rozpouštědlech podle tohoto vynálezu negelují. Ani po 12 měsících při 37 °C nebyla zjištěna žádná gelace. Je to zřejmě proto, že nevodná aprotická polární rozpouštědla nutí peptidy vytvářet prostorová uspořádání (konformace) typu nepravidelná spirála/ α -helix, která zpětně nevytvářejí ploché β -struktury skládaného listu a proto nedochází ke gelaci. Proto mají tato rozpouštědla antigelační účinek.

Závažnější aspekt tohoto vynálezu je ten, že nevodné roztoky obsahující peptidové sloučeniny v polárních aprotických rozpouštědlech jsou chemicky a fyzikálně stabilní při vysokých teplotách po dlouhou dobu. Takové formulace jsou stabilní i při vysokých koncentracích. Proto jsou tyto formulace výhodné tím, že mohou být dopravovány nebo skladovány při teplotách místnosti a vyšších po dlouhou dobu. Jsou také vhodné pro použití v implantovatelných systémech pro dlouhodobé uvolňování léku.

Příklady provedení vynálezu

Při realizaci výzkumu následujícími příklady bylo použito těchto způsobů:

1. Příprava roztoků leuprolidacetátu

Leuprolidacetát získaný například od firmy Mallinckrodt, St. Louis, Missouri, se navážil a ve vhodné

koncentraci se za míchání nebo centrifugace rozpustil ve vehikulu jako například DMSO, DMF, DMSO/PEG, DMSO/PG nebo DMSO/PVP. Termín bezvodý DMSO se týká formulací s DMSO připravených v bezvodém prostředí, to znamená v suché dusíkové atmosféře.

Pokud není uvedeno jinak, obsah volné báze leuprolidu se vypočítal z proklamovaného chemického složení (čistoty) komerčního výrobku jako 37 % volné báze. Šlo tedy o 40% leuprolidacetát, pokud není uvedeno jinak.

2. Příprava kontejnerů

Kontejnery depotních systémů pro dlouhodobé uvolňování léků (popsané v patentové přihlášce USA č. 08/595.761 a v této přihlášce zahrnuté odkazem) se naplnily vhodnými roztoky leuprolidacetátu. Formulace se plnily do titanových nebo polymerních kontejnerů uzavřených na každém konci polymerní zátkou. Naplněné kontejnery se potom zapečetily do sáčků z vícevrstvé folie a umístily ve vyhřívaném prostoru (zkušební pícce) pro testování stability.

Je třeba poznamenat, že formulace jsou v kontejnerech těchto systémů dokonale izolovány od vnějšího prostředí.

3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s převrácenými fázemi (RP-HPLC)

Všechny vzorky pro testování stability se analyzovaly na koncentraci leuprolidu a plochy píků v procentech s použitím gradientové eluční vysokoúčinné kapalinové chromatografie s převrácenými fázemi za pomoci chlazeného automatického dávkovače (4 °C) pro snížení degradace vzorků. Podmínky chromatografování jsou uvedeny níže.

Podmínky chromatografie RP-HPLC

Popis	Parametr
Kolona	HaiSil C 18, 4,6 x 250 mm, S/N 5103051
Průtok	0,8 ml x min ⁻¹
Vstřikovaný objem	20 µl
Detekce	210 nm
Retenční čas leuprolidu	25 až 30 minut
Mobilní fáze	A = 100 mM fosforečnanu sodného, pH 3,0 B = 90% acetonitril/voda
Gradient	Minuty: 0 5 25 40 41 46 46,1 50 %B: 15 26,5 26,5 65 85 85 15 15

Standardy leuprolidu ve vodě procházely kolonou při 4 až 6 různých koncentracích, typicky v rozmezí 0,1 - 1,2 mg/ml, společně se vzorky testovanými na stabilitu. Testované vzorky byly obklopeny (ohraňovány) soubory standardů, přičemž mezi soubory standardů nebylo více testovaných vzorků než 40. Všechny píky mezi vnějším objemem a 45 minutami průchodu byly integrovány. Integrované plochy píků standardů leuprolidu byly graficky vynášeny jako funkce koncentrace. Pomocí lineární regrese byly potom vypočítány koncentrace leuprolidu ve vzorcích testovaných na stabilitu. Rovněž byly zaznamenány plochy píků leuprolidového píku, sumy všech píků eluovaných před leuprolidem (označena "jiné") a sumy všech píků eluovaných za leuprolidem (označena "agregáty") a vyneseny do diagramu jako funkce časového průběhu eluce vzorku.

4. Vylučovací chromatografie SEC

Pro vybrané vzorky určené pro zkoušky stability se zjišťovaly plochy píků v procentech a molekulové hmotnosti isokratickou vylučovací chromatografií SEC za použití chlazeného automatického dávkovače (4 °C). Užití chromatografické podmínky jsou uvedeny níže.

Podmínky chromatografie SEC

Popis	Parametr
Kolona	Pharmacia Peptide, HR 10/30, 10 x 300 mm
Průtok	0,5 ml x min ⁻¹
Vstřikovaný objem	20 µl
Detekce	210 nm
Retenční čas leuprolidu	asi 25 minut
Mobilní fáze	100 mM fosforečnanu sodného, pH 2,0, 200 mM chloridu sodného, 30% acetonitril

Znalost vnějšího objemu a celkového objemu kolony SEC byly pro výpočet molekulových vah nezbytné. Pro stanovení vnějšího objemu a celkového objemu se použilo vysokomolekulárního standardu BioRad a 0,1% acetonu. Zaznamenávaly se retenční časy pro první pík standardu BioRad a acetonový pík a konvertovaly se na objemové jednotky níže uvedenými rovnicemi. Protože tyto hodnoty jsou pro určitou kolonu SEC a určitý systém HPLC konstantní, bylo třeba vnější a celkový objem nově určit kdykoliv došlo ke změně na koloně SEC nebo systému HPLC. Potom byly chromatografovány standardy a po nich následovaly vzorky testované na stabilitu. Směs standardů obsahovala přibližně 0,2 mg/ml následujících peptidů: bursin (molekulová hmotnost 449), WLFR peptid (molekulová hmotnost 619), angiotensin

(molekulová hmotnost 1181), GRF (molekulová hmotnost 5108) a cytochrom C (molekulová hmotnost 12394). Tyto standardy byly zvoleny, protože jejich molekulové hmotnosti ohraničovaly (byly blízké - vyšší i nižší) molekulové hmotnosti leuprolidu a všechny měly bazické pI 9,8 až 11,0 podobně jako leuprolid.

Plochy píků v procentech byly zaznamenány pro všechny píky. Molekulové hmotnosti izolovaných sloučenin byly vypočteny za pomoci níže uvedených rovnic.

$$V_s = \text{průtok (ml/min)} \times \text{retenční čas píku vzorku (min)}$$

$$V_o = \text{průtok (ml/min)} \times \text{retenční čas píku vnějšího objemu (min)}$$

$$V_t = \text{průtok (ml/min)} \times \text{retenční čas píku celkového objemu (min)}$$

$$K_d = \frac{V_s - V_o}{V_t - V_o}$$

kde:

V_s = objem standardu nebo vzorku

V_o = vnější objem

V_t = celkový objem

Pro každý pík peptidového standardu byl vypočítán V_s . S použitím hodnot pro V_t a V_o vypočítaných dříve byl potom pro každý peptidový standard vypočítán K_d . Pro stanovení molekulových hmotností každého píku vzorků testovaných na stabilitu se užilo křivky lineární regrese v diagramu log molekulová hmotnost proti K_d^{-1} . Rovněž byly zaznamenány plochy píků vzorků testovaných na stabilitu.

5. Přístroje a materiály

Pro chromatografické analýzy RP-HPLC a SEC se použilo

následujících přístrojů a materiálů:

HPLC systém spol. Waters Millennium sestávající z automatického dávkovače 717, čerpadla 626, regulátoru 6000S, detektoru 900 typu fotodiode "array" (napojeného na počítač), refraktometrického detektoru 414 od spol. Waters Chromatography, Milford, Ma),

trubičky pro HPLC (pozice 48 a 96) spol. Waters Chromatography, Milford, Ma),

HaiSil C 18, 120 A, 5 μ m, kolona 4,6 x 250 mm HPLC od spol. Higgins Analytical, Mountain View, Ca)

Pharmacia Peptide, HR 10/30 SEC kolona od spol. Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)

Následující příklady podáváme pro ilustraci tohoto vynálezu, ale v žádném případě nemají limitovat rozsah jeho platnosti.

Příklad 1

Urychlená zkouška stability formulací leuprolidacetátu

Podle výše uvedeného popisu byly připraveny formulace obsahující 40 % hmotnostních leuprolidacetátu (což je ekvivalent asi 37 % volné báze) ve vehikulu, a potom jimi byly naplněny kontejnery implantovatelných systémů pro dlouhodobé uvolňování léčiv, rovněž výše popsanych. Všechny kontejnery byly z titanu.

Tyto systémy s naplněnými kontejnery byly podrobeny urychlenému stárnutí inkubací v pícce (spol. Precision Scientific nebo Thelco) při zvýšené teplotě 80 °C po dobu sedmi dnů. To odpovídá skladování při 37 °C během asi 1,5 roku nebo při pokojové teplotě (25 °C) asi čtyři roky.

Tyto vzorky byly analyzovány výše popsányi chromatografickými metodami RP-HPLC a SEC pro stanovení chemické a fyzikální stability formulací při urychleném

stárnutí.

Výsledky uvedené v tabulce II ukazují, že tyto formulace byly schopny zachovat stabilitu LHRH příbuzné sloučeniny leuprolidu. Vždy se zachovalo nejméně 65 % leuprolidu.

Tabulka II

Stabilita formulací leuprolidacetátu v polárním aprotickém rozpouštědle po 7 dnech při 80 °C v titanovém kontejneru

Formulace	% leuprolidu 7. dne
40 % v DMSO	92
40 % v DMSO/PEG (50/50)	90
40 % v DMSO/PG (50/50)	86
40 % v DMSO/PVP (50/50)	93
40 % v DMF	91
40 % v bezvodém DMSO	89

Příklad 2

Zkouška stability ozářených formulací leuprolidacetátu

Formulace 40% (hmot.) leuprolidacetátu v DMSO byly připraveny jak popsáno výše a plněny do kontejnerů systémů pro dlouhodobé uvolňování léků, rovněž stejně jak popsáno výše. Všechny kontejnery byly vyrobeny z titanu.

Naplněné systémy byly zaslány spol. Sterigenics (Tustin, Kalifornie), kde byly ozářeny paprsky gama (2,5 Megarad) použitím kobaltu 60 v centrální komoře fy Sterigenics (Tustin) k ozáření typu "tote box" na 3. stupni. Vzorky označené v tabulce III "studené" byly dopraveny a ozářeny na suchém ledu. Potom byly vzorky podrobeny urychlenému stárnutí jako v příkladu 1. Vzorky byly odebírány nultý a sedmý den, analyzovány chromatografickými

Tabulka III

Stabilita polárních aprotických formulací 40% (hmot.) leuprolidacetátu po ozáření gama (2,5
Megarad) v titanových kontejnerech

Formulace	Ozáření	% leuprolidu 7. den (RP-HPLC)	SEC					
			0. den			7. den		
			% monomeru	dimeru/trimeru %	dimeru/trimeru %	% monomeru	dimeru/trimeru %	
40% v DMSO	ano	100	98,1	0,5		97,7		1,9
40% v DMSO	ne	90	100	0		98,5		1,1
40% v DMSO	studený	99	99,1	0,2		98,3		1,4
40% v DMSO	ano	95	99,1	0,8		95,3		2
40% v DMSO	ne	N.D.	100	0		106,1		0
40% v DMSO	ano	90	99,4	0,6		99,4		2,2
40% v DMSO	ne	100	100	0		104		1
40% v DMSO	ano	88	99,5	0,5		97,7		1,8
40% v DMSO	ano	83	99,5	0,5		91,7		1,5

způsoby RP-HPLC a SEC jak popsáno výše pro zjištění chemické a fyzikální stability ozářených formulací.

Výsledky uvedené v tabulce III ukazují, že tyto formulace leuprolidacetátu byly po ozáření stálé. Ve všech případech se zachovalo alespoň 65 % leuprolidu při nízké tvorbě agregátů.

Příklad 3

Urychlené zkoušky dlouhodobé stability formulací leuprolidacetátu.

Byly připraveny roztoky 40% (hmot.) leuprolidacetátu v DMSO, naplněny do kontejnerů, skladovány 2 měsíce při 80 °C a analyzovány jak popsáno výše. Výsledky prezentované v obrázcích 1 (RP-HPLC) a 2 (SEC) ukazují, že se zachovalo 81,1 % leuprolidu, pouze 14,6 % se změnilo chemickou degradací a 5,1 % fyzikální agregací.

Roztoky leuprolidacetátu se připravily, plnily do kontejnerů, skladovaly při 80 °C 6 měsíců a analyzovaly jak popsáno výše. Obrázek 4 ukazuje graf leuprolidu a produktů jeho chemické a fyzikální degradace evidovaných po šesti měsících, z kterého vyplývá, že se dohledal všechen peptidický materiál s nímž se pokus začal a že tyto formulace vykázaly dobrou stabilitu při 80 °C. Suma všech tří těchto složek se zde prezentuje jako „celkem“. Obrázek 5 je diagram přirozeného logaritmu těchto údajů a ukazuje, že tyto formulace vykazovaly v celém testovaném teplotním rozsahu lineární kinetiku.

V obrázku 6 se ukazuje chemická stabilita roztoků 40% leuprolidacetátu připravených a analyzovaných jak popsáno výše. Po devíti měsících při 37 °C se zachovalo více než 90 % (93,5 %) leuprolidu a vzniklo méně než 5 % (2,9 %) produktů chemické degradace (v obrázku označených "early") a

méně než 5 % (2,3 %) produktů fyzikální degradace (označených jako "late") zjištěných způsobem RP-HPLC ale v dobré shodě s výsledky chromatografie SEC.

Byly připraveny roztoky 40% (hmot.) leuprolidacetátu v DMSO, umístěny v kontejnerech, skladovány při 37 °C, 50 °C, 65 °C a 80 °C a analyzovány s použitím výše popsaného způsobu RP-HPLC. Výsledky byly vypočítány a popsány v: Physical Pharmacy: Physical Chemical Principles in the Pharmaceutical Sciences, 3. edition, Martin a další, kapitola 14 (1983) a dokázaly, že úbytek leuprolidu z formulací v DMSO byl nelineární. Údaje jsou uvedeny níže a v obrázku 3 se prezentují jako Arrheniův graf.

Protože Arrheniovy grafy formulací v DMSO skladovaných při 80 °C ukázaly, že úbytek leuprolidu byl nelineární, použilo se pro výpočet t_{90} těchto formulací pro 14,4 měsíce při 37 °C údajů o stabilitě získaných při 37 °C.

DMSO		
°C	Kobs (měsíce ⁻¹)	$t_{1/2}$ (měsíce)
37	$7,29 \times 10^{-3}$	95,1
50	$9,74 \times 10^{-3}$	71,2
65	$2,48 \times 10^{-2}$	27,9
80	0,108	6,4

E_a = nelineární

Příklad 4

Zkouška stability formulací leuprolidacetátu v DMSO/voda

Formulace 40% (hmot.) leuprolidacetátu v DMSO, DMSO/voda (95:5, 90:10, 70:30, 50:50 a 30:70) a ve vodě byly připraveny jak popsáno výše a sedm dní inkubovány při 80 °C. V nultém a sedmém dni byla provedena analýza IČ

14.01.99

spektrometrem vybaveným Fourierovou transformací signálu jako detektorem (FTIR).

Výsledky ukázaly, že toto urychlené stárnutí způsobilo u všech zkoušených formulací jen velmi malé změny strukturální konformace leuprolidu. Všeobecně platí, že ve formulacích s DMSO měly peptidové struktury převážně charakter nepravidelné spirály nebo α -helix, zatímco ve vodných formulacích měly převážně ploché β -struktury skládaného listu.

Modifikace výše uvedených způsobů realizace různých provedení tohoto vynálezu budou odborníkům na základě v tomto vynálezu uvedených poučení zřejmé. Výše uvedené příklady nemají omezující charakter, ale pouze představují příklady vynálezu, jehož rozsah je definován následujícími nároky.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

(Změněné nároky)

1. Stabilní nevodná formulace peptidové sloučeniny, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:
 - a) nejméně jednu peptidovou sloučeninu; a
 - b) nejméně jedno polární aprotické rozpouštědlo, přičemž uvedená formulace je stabilní při 37 °C nejméně 3 měsíce.
2. Formulace podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje nejméně asi 10 % hmotnostních peptidové sloučeniny.
3. Formulace podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje nejméně asi 30 % hmotnostních peptidové sloučeniny.
4. Formulace podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená peptidová sloučenina je sloučenina příbuzná LHRH.
5. Formulace podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená peptidová sloučenina se vybere ze skupiny sestávající z leuprolidu, LHRH, nafarelinu a goserelinu.
6. Formulace podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je při 80 °C stabilní nejméně 2 měsíce.
7. Formulace podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je při 37 °C stabilní nejméně jeden rok.
8. Formulace podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je přizpůsobena pro aplikaci v implantovatelných

systémech pro dlouhodobé uvolňování léku.

9. Formulace podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že rovněž obsahuje nevodné protické rozpouštědlo.

10. Formulace podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedené polární aprotické rozpouštědlo se vybere ze skupiny sestávající z DMSO a DMF.

11. Formulace podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedené polární aprotické rozpouštědlo vykazuje antigelační efekt.

12. Formulace podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sestává hlavně z asi 30 až asi 50 % hmotnostních z leuprolidacetátu, sloučeniny příbuzné LHRH, v DMSO.

13. Formulace podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sestává hlavně z leuprolidu a DMSO v množství 370 mg leuprolidu v 1 ml DMSO.

14. Formulace podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je po ozáření stabilní.

15. Způsob přípravy stabilní nevodné formulace podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje rozpuštění nejméně jedné peptidové sloučeniny v nejméně jednom polárním aprotickém rozpouštědle.

16. Způsob podle nároku 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že při něm nejméně asi 10 % hmotnostních peptidové sloučeniny přejde do roztoku.

17. Způsob podle nároku 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že při něm nejméně asi 30 % hmotnostních peptidové sloučeniny přejde do roztoku.

18. Způsob podle nároku 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená peptidová sloučenina je sloučenina příbuzná LHRH.

19. Způsob podle nároku 18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená peptidová sloučenina se vybere ze skupiny sestávající z leuprolidu, LHRH, nafarelinu a goserelinu.

20. Způsob podle nároku 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že rovněž zahrnuje stupeň, v němž se přidá nevodné protické rozpouštědlo.

21. Způsob podle nároku 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že asi 30 % až asi 50 % hmotnostních leuprolidacetátu, sloučeniny příbuzné LHRH, je rozpuštěno v DMSO.

22. Způsob podle nároku 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se při něm 370 mg leuprolidu rozpustí v 1 ml DMSO.

23. Způsob léčby osoby trpící potížemi, v y z n a č u j í c í m s e t í m, že jej lze ulehčit podáním peptidové sloučeniny zahrnujícím poskytnutí uvedené osobě účinného množství formulace podle nároku 1.

24. Způsob podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že toto podávání léku je parenterální podávání.

25. Způsob podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedené podávání léku je kontinuální a dlouhodobé.

26. Způsob podle nároku 25, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedené podávání se provádí s použitím implantovatelných systémů pro dlouhodobé uvolňování léku.

27. Způsob podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedené potíže představuje rakovina prostaty a uvedená peptidová sloučenina je leuprolid.

28. Způsob podle nároku 27, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se denně podává nejméně asi 80 mikrogramů leuprolidu.

29. Způsob podle nároku 28, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedené denní podávání se děje po dobu vybranou ze skupiny složené ze 3 měsíců, 6 měsíců a 12 měsíců.

30. Způsob podle nároku 29, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedené denní podávání po uvedenou dobu je kontinuální podávání uskutečněné za použití implantovatelného systému pro dlouhodobé uvolňování léku.

31. Způsob podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedené potíže představuje rakovina prostaty a uvedená peptidová sloučenina je antagonist LHRH.

32. Stabilní nevodná formulace peptidové sloučeniny v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:

- a) nejméně jednu peptidovou sloučeninu; a
- b) nejméně jedno polární aprotické rozpouštědlo,

příčemž tato formulace je stabilní při 37 °C nejméně 3 měsíce za předpokladu, že uvedená formulace neobsahuje složky obsahující přidanou vodu.

33. Způsob přípravy stabilní nevodné formulace podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje rozpuštění nejméně jedné peptidové sloučeniny v nejméně jednom polárním aprotickém rozpouštědle za předpokladu, že uvedená formulace neobsahuje složky obsahující přidanou vodu.

34. Způsob podle nároku 33, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se uskutečňuje v atmosféře inertního plynu.

35. Způsob podle nároku 34, v y z n a č u j í c í s e t í m, že tuto atmosféru představuje suchý dusík.

36. Stabilní nevodná formulace peptidové sloučeniny v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:

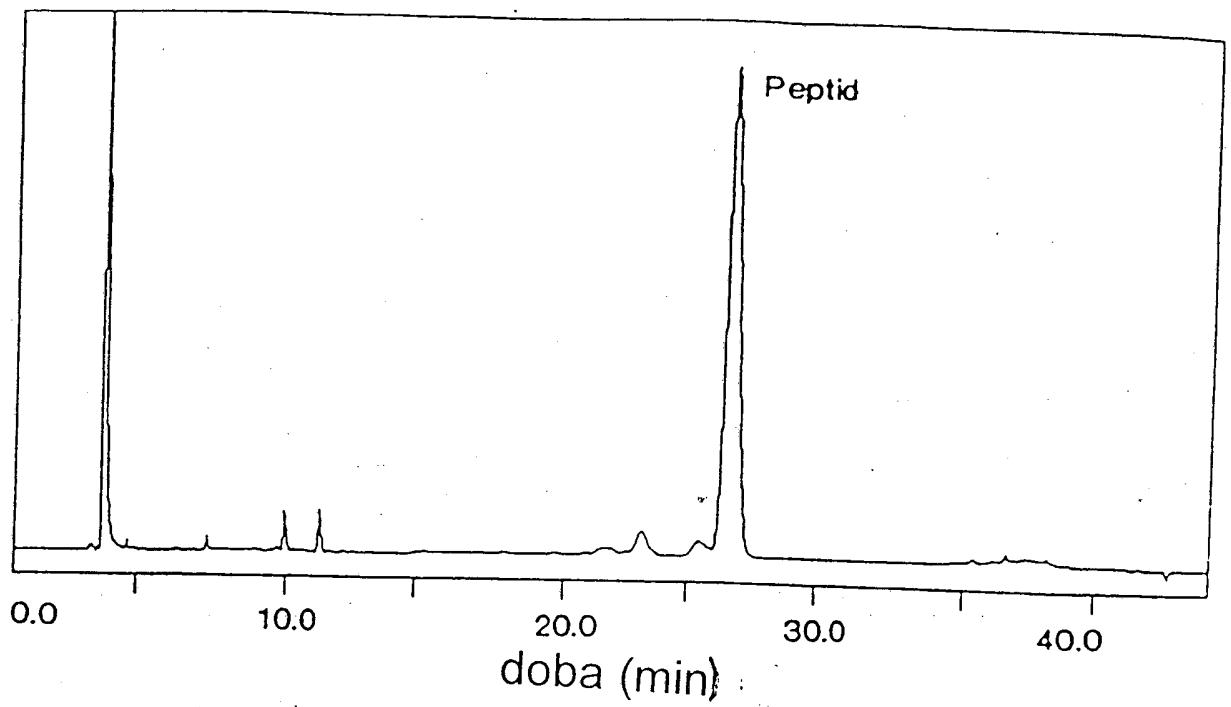
- a) nejméně jednu peptidovou sloučeninu; a
- b) nejméně jedno polární aprotické rozpouštědlo, přičemž uvedená formulace vykazuje bakteriostatické, baktericidní nebo sporicidní účinky aniž by bylo použito běžných bakteriostatických, baktericidních nebo sporicidních činidel.

37. Způsob přípravy stabilních nevodných formulací podle nároku 36, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje rozpuštění nejméně jedné peptidové sloučeniny v nejméně jednom polárním aprotickém rozpouštědle za předpokladu, že do uvedené formulace se nepřidává žádná běžná bakteriostatická, baktericidní nebo sporicidní činidla.

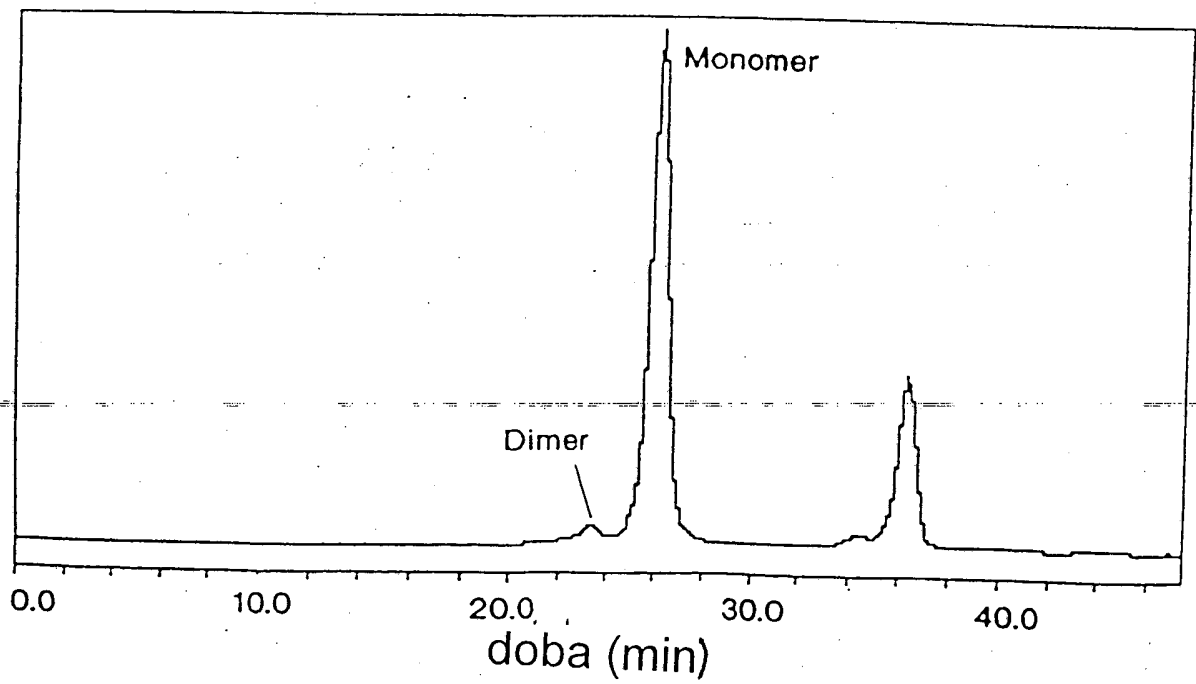
38. Způsob léčby osoby trpící potížemi,
v y z n a č u j í c í m s e t í m, že jej lze ulehčit
podáním peptidové sloučeniny zahrnujícím poskytnutí uvedené
osobě účinného množství formulace podle nároku 36.

14-01-99
4340-98

1 / 8



Obr. 1

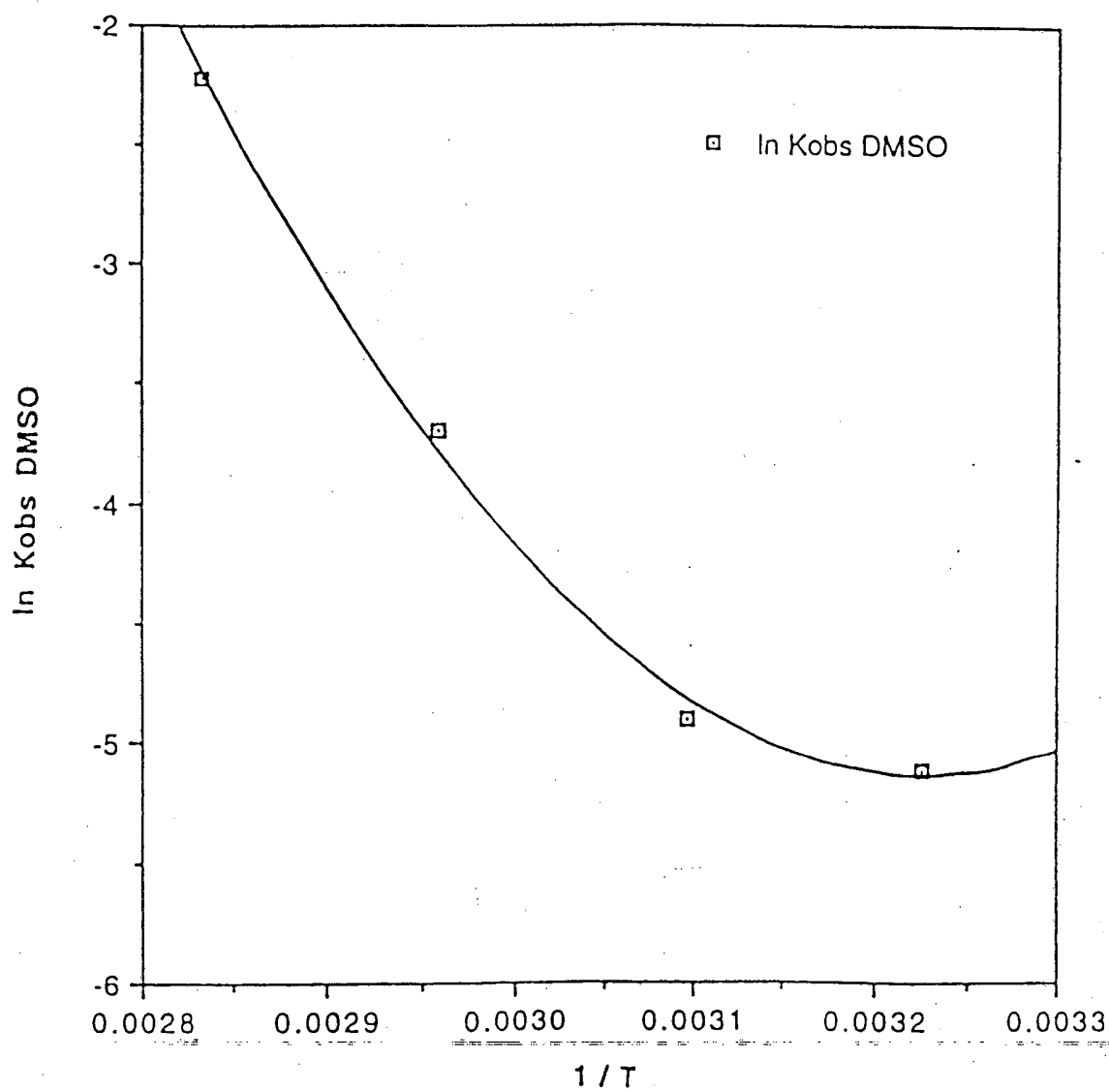


Obr. 2

14-0199

4340-98

2 / 8

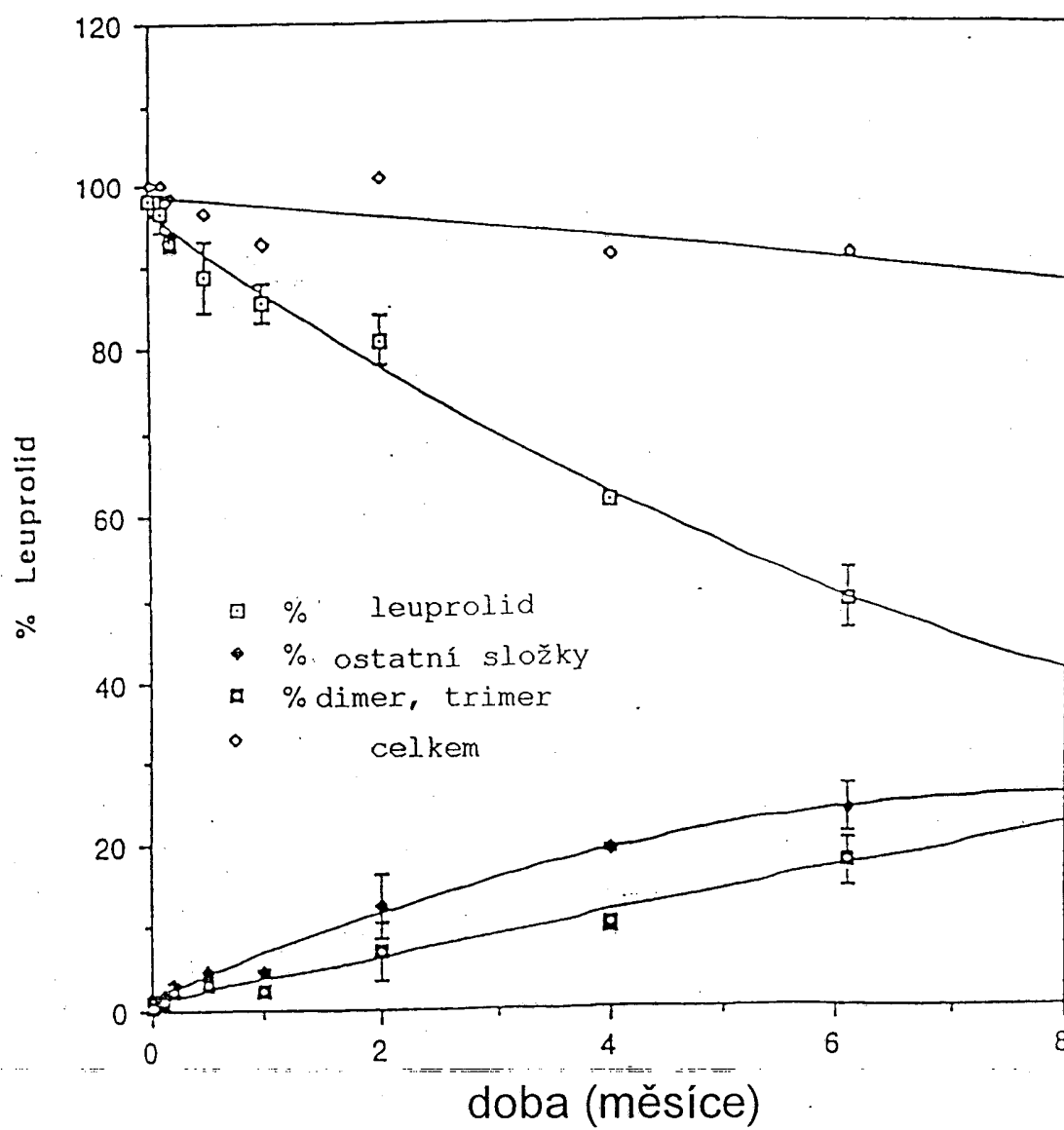


Obr. 3

14.01.99

4340-98

3/8

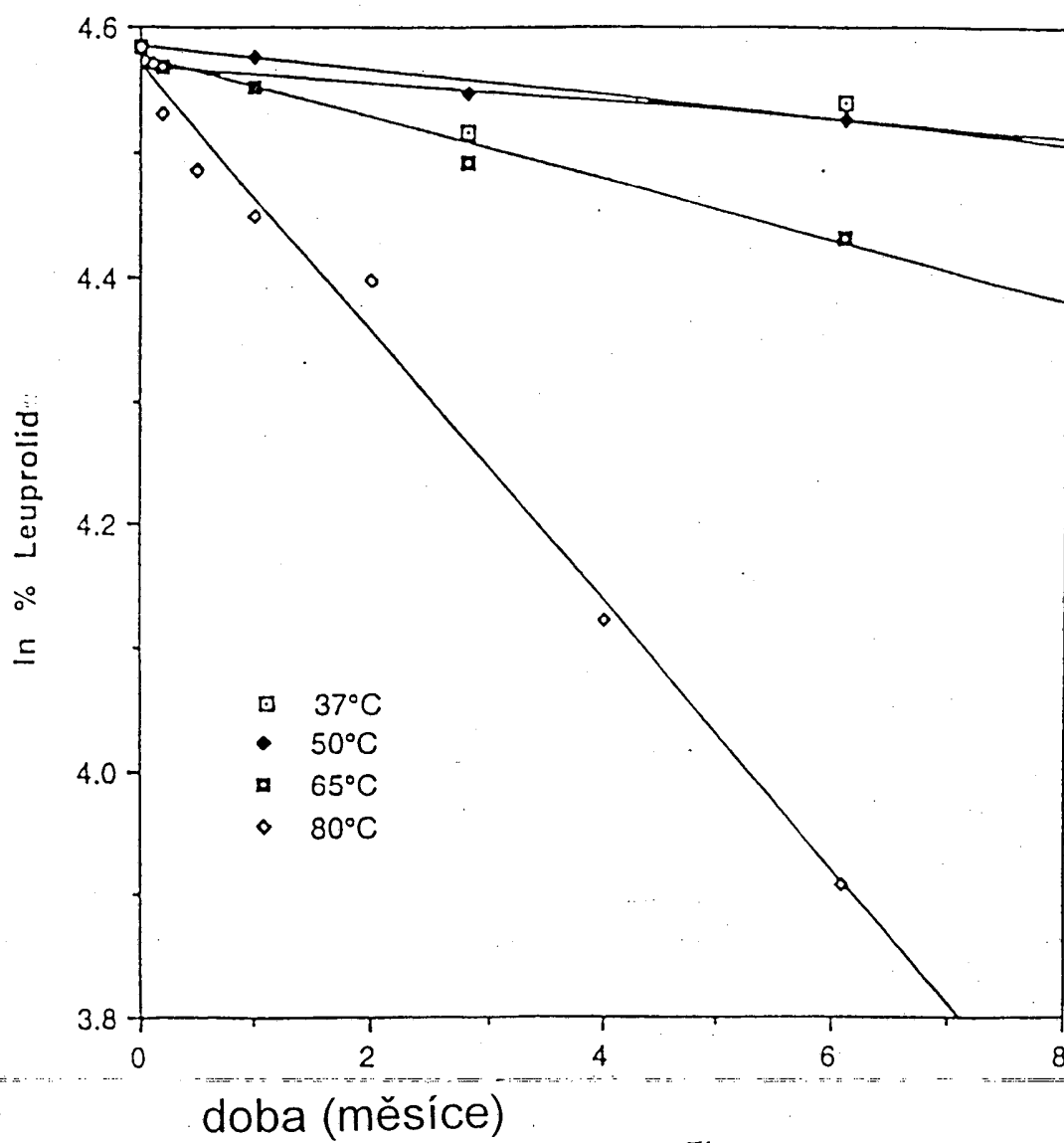


Obr. 4

14.01.99

4340-98

4 / 8



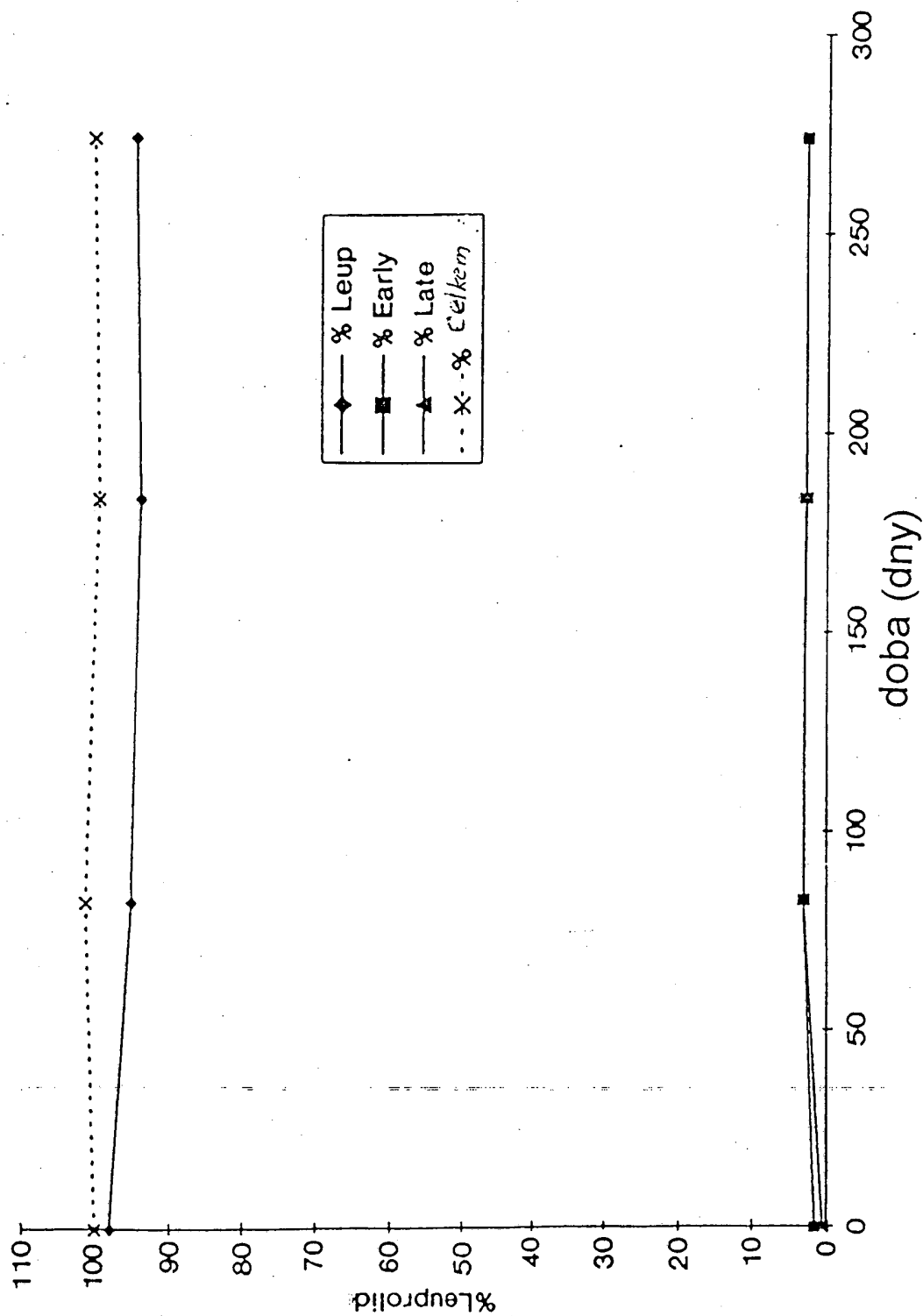
Obr. 5

14.01.99

4340-98

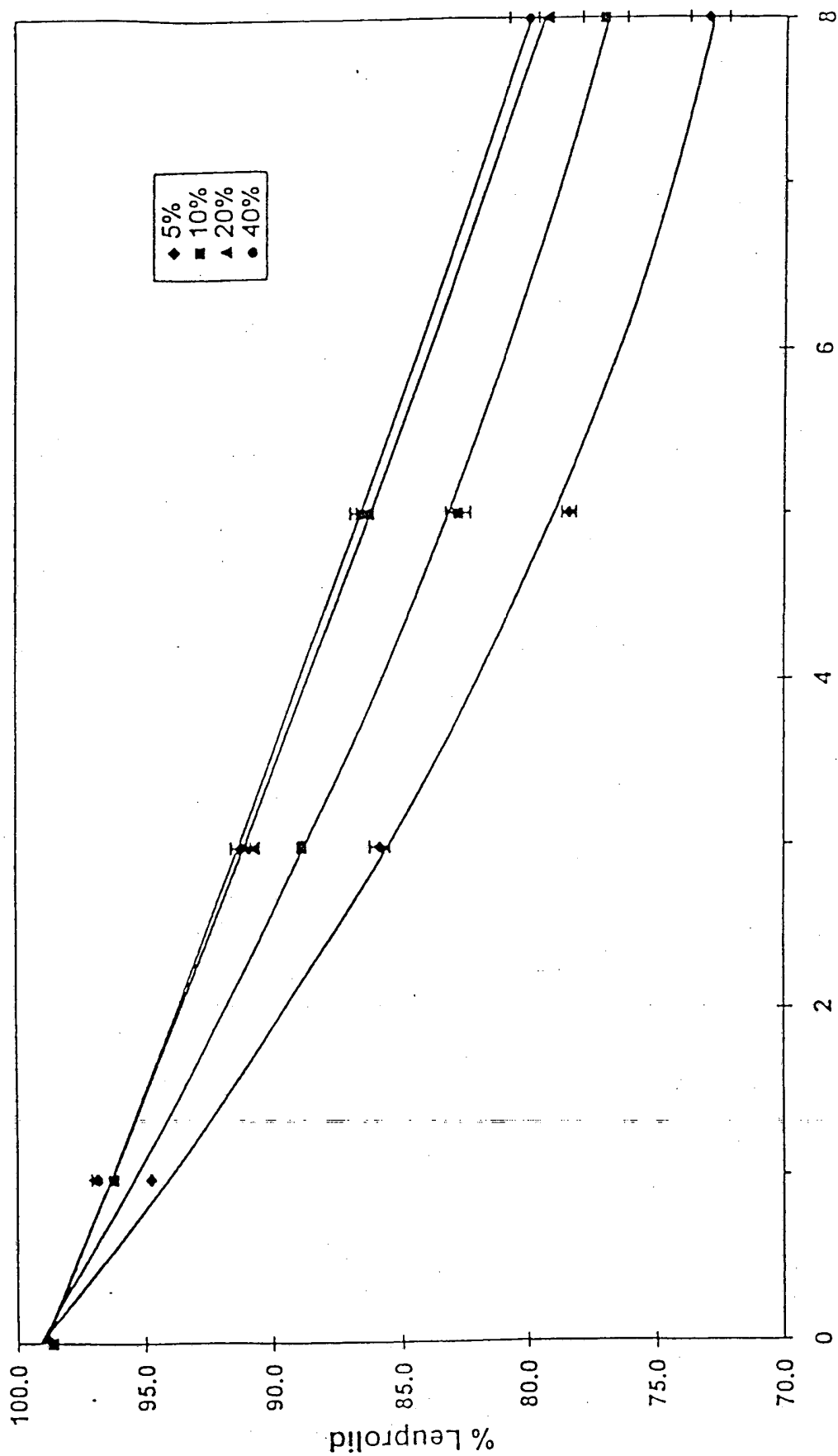
5 / 8

Leup - leuprolid
 Early - produkty chemické degradace
 Late - produkty fyzikální degradace



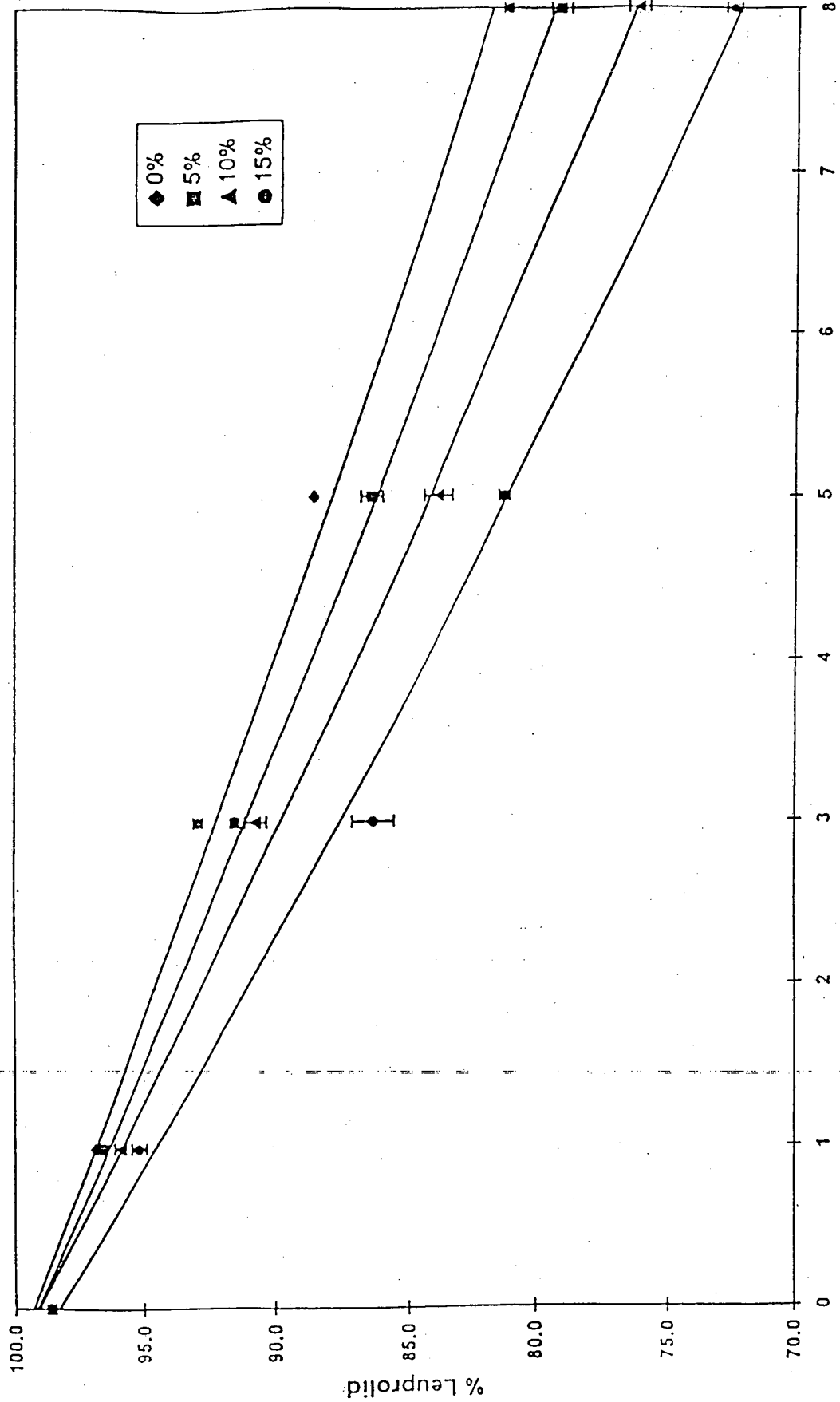
Obr. 6

6 / 8

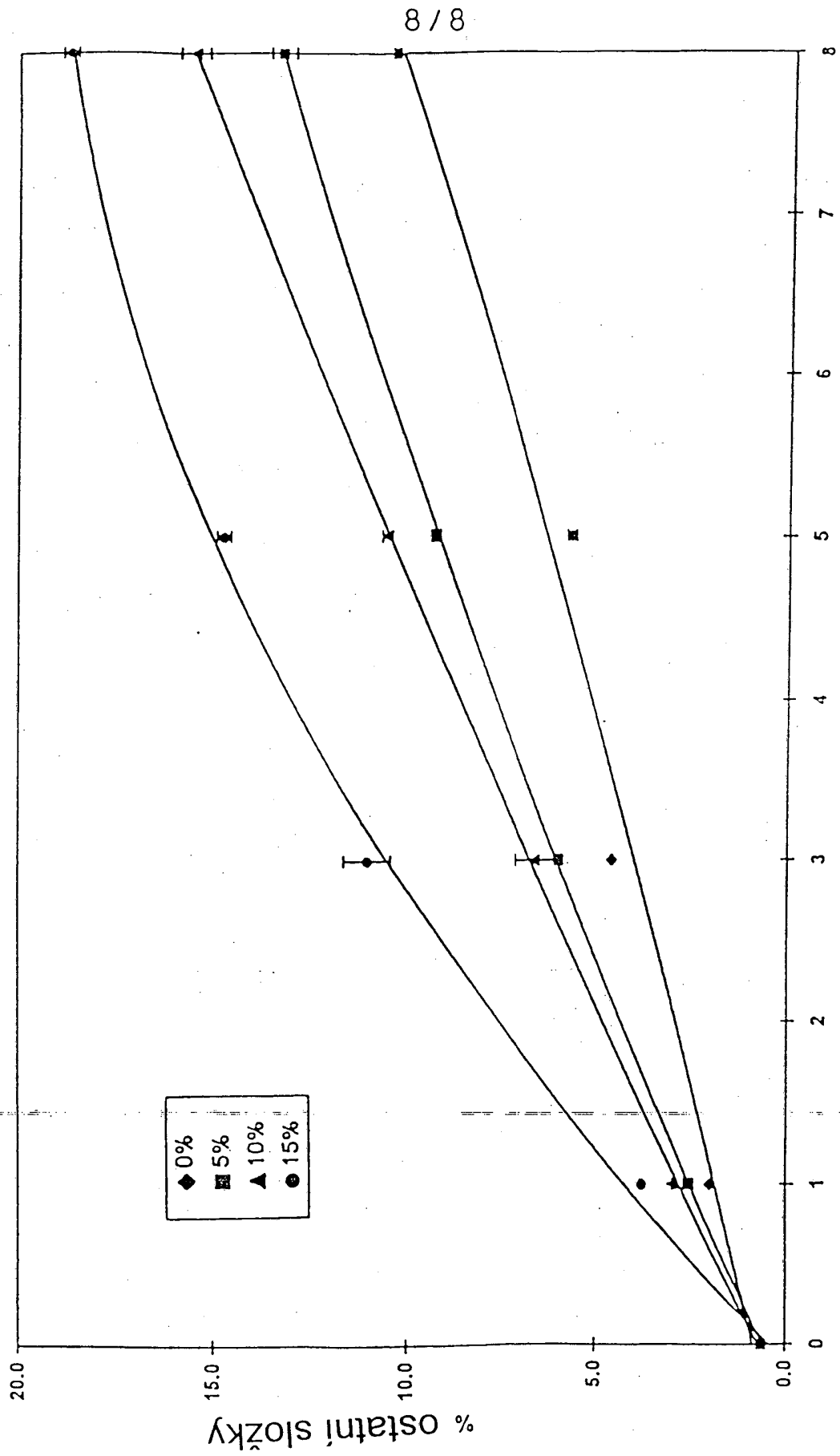


doba (týdny)
Obr. 7

7/8



Obr. 8



Obr. 9