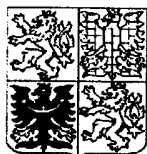


PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

288 568

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1998 - 950

(22) Přihlášeno: 27.03.1998

(40) Zveřejněno: 13.10.1999
(Věstník č. 10/1999)

(47) Uděleno: 17.05.2001

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 11.07.2001
(Věstník č. 7/2001)

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.⁷:

A 61 K 38/09

A 61 K 47/48

A 61 P 15/08

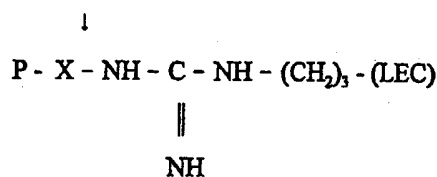
(73) Majitel patentu:

ÚSTAV MAKROMOLEKULÁRNÍ CHEMIE AV
ČR, Praha, CZ;
BIOPHARM, VÝZKUMNÝ ÚSTAV
BIOFARMACIE A VETERINÁRNÍCH LÉČIV,
A. S., Jílové u Prahy, CZ;

kontracepce, regulaci předčasného nástupu puberty, léčbu
endometrióz a hormonálních disbalancí pohlavních steroidů,
léčbu steroidodependentních novotvarů a léčbu
gonádotropních dysfunkcí hospodářských zvířat, zvláště pak
krav, ovcí a koz.

(72) Původce vynálezu:

Ulbrich Karel Ing. CSc., Praha, CZ;
Šubr Vladimír Ing. CSc., Mělník, CZ;
Lidický Jan MVDr. CSc., Praha, CZ;
Sedlák Libor MVDr., Jílové u Prahy, CZ;
Pícha Josef Ing. CSc., Vlachovo Březí, CZ;



(54) Název vynálezu:

**Polymerní konjugáty lecirelinu s
protrahovaným účinkem a jejich použití**

(57) Anotace:

Řešení se týká polymerních konjugátů lecirelinu s
protrahovaným účinkem vzorce I, kde P je polymer, LEC je
lecirelin a X je α nebo ϵ aminokyselina nebo oligopeptid,
sestavějící z polymerního nosiče obsahujícího 30 až 1000
monomerních jednotek spojených do polymerního řetězce z
nichž je 60 až 98 % jednotek N-(2-
hydroxypropyl)methakrylamidu, 0 až 38 % jednotek kyseliny
akrylové nebo methakrylové ve formě sodných solí a 1 až
40 % jednotek methakryloylovaných α nebo ϵ aminokyselin
nebo oligopeptidů s terminálně kovalentní vazbou připojeným
lecirelinem. Řešení zahrnuje použití polymerních konjugátů
lecirelinu s protrahovaným účinkem jako veterinárních léčiv
pro ovlivňování reprodukčního cyklu hospodářských zvířat,
jako prostředek pro ovlivnění růstu a zrání ovariálních
folikulů, indukci ovulace, regulaci stroidogeneze, podporu
luteinizace ovariálních struktur, přerušování anestrů, start
ovariální aktivity, léčbu atresie ovarií, formování luteální
tkáně při patologických procesech na ovariích, regulaci
androgenní aktivity, spermatogeneze, ovulace, koncepce a

CZ 288568 B6

Polymerní konjugáty lecirelinu s protražovaným účinkem a jejich použití

Oblast techniky

5

Vynález se týká polymerních konjugátů lecitinu s protražovaným účinkem, jejich použití jako veterinárních léčiv pro ovlivňování reprodukčního cyklu hospodářských zvířat a farmaceutických veterinárních přípravků je obsahujících.

10

Dosavadní stav techniky

Uvolňování hypofyzárních gonadotropinů je regulováno dekaeptidem tvořeným v paraventrikulárních jádrech hypothalamu. Tento neurohormon je označován jako gnRH, resp. LH–RH. Největší koncentrace gnRH se nachází v rostrální části preoptické oblasti hypothalamu, mezi supreoptickým a preoptickým jádrem. Vysoké koncentrace gnRH byly zároveň nalezeny v oblasti lokalizované nad mamilárním tělískem (procesus mamilaris) v bazálním hypothalamu. Uvolňování gnRH do hypofyzárního krevního oběhu probíhá pulzativně a po dosažení sekrečních buněk předního laloku hypofýzy dochází k jeho navázání na jejich receptorový systém. Po navázání gnRH je spuštěn celý mechanismus signální transdukce. Tento mechanismus spustí systém tvorby obou gonadotropinů (LH – luteinizačního hormonu, i FSH – folikuly stimulujícího hormonu). Nízké intermitentní dávky gnRH vedou k vylévání gonadotropinů ze sekrečních buněk adenohypofýzy, zatímco dlouhodobá expozice těchto sekrečních buněk vysokými dávkami gnRH vede k zastavení jejich sekreční aktivity. Sensitivita hypofýzy k působení gnRH se zvyšuje při její estrogenizaci.

Zvýšení sekreční amplitudy a frekvence píků LH vede u samic ke stimulaci ovulace a formování žlutého tělíska (CL – corpus luteum), popř. formování luteální tkáně v případě patologických stavů na ovariích samic (ovariální cysty). U samců vede k zvýšení androgenní sekrece. Zvýšený pulsativní výdej FSH stimuluje růst a vývoj ovariálních folikulů samic a spermatogenezi samců. Podaří-li se zajistit působení gnRH v organismu po dostatečně dlouhou dobu, lze podáním různých dávek gnRH prakticky ovlivnit celou hierarchii osy pohlavního systému jak samic, tak samců. Podáním gnRH lze tedy stimulovat, nebo potlačit stereidogenezi, ovulaci a spermatogenezi, koncepci a kontracepci, léčebně nástup předčasné puberty, endometriózy, steroidodependentní tumory (prostaty, resp. prsu), luteinizaci ovariálních cyst, start růstu ovariálních folikulů a jejich zrání při atreziích ovarií, resp. v průběhu sezónních anestríí.

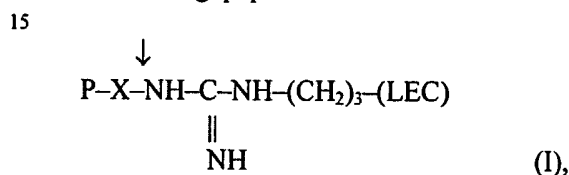
Primární struktura gnRH izolovaného z prasete je známá od roku 1971. V průběhu 70. a 80. let bylo syntetizováno mnoho analogů gnRH a zároveň byly zaváděny léčebné přípravky na jejich bázi. Mezi nejúčinnější analoga gnRH patří lecirelin. Podání lecirelinu má stejný účinek jako podání přirozeného dekaeptidu, avšak jeho potřebné aplikační množství je výrazně nižší. Indikační pole pro tento i jiné superanalogy zůstává v podstatě shodné s indikačním polem přirozených gnRH.

Navázáním peptidu na vodorozpustný vysokomolekulární polymerní nosič je v principu možné ovlivnit jak dobu jeho setrvání, tak i biologickou stabilitu v živém organismu, tedy jeho farmakodynamiku a farmakokinetiku. Vazbou na polymerní nosič je totiž možné peptid ochránit před účinkem proteolytických enzymů a zároveň také zamezit jeho vyloučení např. glomerulární filtrací. Tímto způsobem je tedy možné získat nové výhodnější vlastnosti hormonu, zvýšit specifitu jeho účinku a zároveň zvýšit i jeho stabilitu a tedy i využitelnost v organismu. Není nám známo, že by za tímto účelem byly dříve polymerní formy lecirelinu připraveny a použity ve veterinární medicíně.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou polymerní konjugáty lecirelinu s protražovaným účinkem sestávající z polymerního nosiče obsahujícího 30 až 1000 monomerních jednotek spojených do polymerního řetězce, z nichž je 60 až 98 % jednotek N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA), 0 až 38 % jednotek kyseliny akrylové nebo methakrylové ve formě sodných solí a 2 až 40 % jednotek methakryloylovaných α nebo ϵ aminokyselin nebo oligopeptidů s terminálně chemickou vazbou připojeným lecirelinem.

Význakem polymerních konjugátů lecirelinu s protražovaným účinkem podle předloženého vynálezu je, že lecirelin je v konjugátech vázán k polymeru přes spojku hydrolyticky nestálou vazbou, vzniklou acylací guanidinové skupiny argininu, jedné z aminokyselin tvořící biologicky aktivní oligopeptid lecirelinu vzorce I



kde P je polymer, LEC je zbytek molekuly lecirelinu bez postranního substituentu u argininu a X je α nebo ϵ aminokyselina nebo oligopeptid.

Lecieline je tedy vázán k nosiči přes spojku vazbou vzniklou acylací guanidinové skupiny argininu, jedné z aminokyselin tvořící biologicky aktivní oligopeptid lecirelin. Tato vazba je hydrolyticky nestálá a umožňuje v prostředí organismu pozvolné uvolňování účinné látky z nosiče. Rychlost tohoto uvolňování může být ovlivněna změnami ve struktuře, především hydrofobicitě či hydrofilitě použitého „spaceru“.

Příprava polymerní formy lecirelinu podle vynálezu probíhá ve dvou krocích a spočívá v syntéze monomerů a jejich kopolymerizaci za vzniku polymerního prekurzoru obsahujícího postranní řetězce zakončené karboxylovou nebo reaktivní esterovou (například 4-nitrofenoxi nebo oxysukcinimidovou) skupinou a jeho následné reakce s guanidinovou skupinou lecirelinu za vzniku chemické vazby. Polymerní prekurzor může být připraven kopolymerizací N-(2-hydroxypropyl)-methakrylamidu (HPMA) s methakryloylovanými aminokyselinami nebo oligopeptidy, případně jejich reaktivními estery a případně s kyselinou akrylovou nebo methakrylovou. Vazba lecirelinu může být provedena buď přímou reakcí polymerních reaktivních esterů s lecirelinem, nebo reakcí karboxylové skupiny do polymeru zabudované kyseliny, aminokyseliny či oligopeptidu s guanidinovou skupinou argininu v lecirelinu, katalyzovanou dicyklohexylkarbodiimidem, nebo jinými, např. vodorozpustnými karbodiimidy.



V lékové formě podle vynálezu je biologicky aktivní látka, oligopeptid lecirelin (LEC), vázána na vodorozpustný polymer pomocí chemické vazby. Dostatečně vysoká molekulová váha polymeru snižuje rychlost glomerulární filtrace látky z organismu a zajišťuje tedy podstatné prodloužení doby setrvání účinné látky v krevním řečišti. Zároveň dlouhý řetězec polymeru ochrání oligopeptid před účinkem proteolytických enzymů a zvýší stabilitu účinné látky v prostředí živého organismu. Oba tyto efekty zajistí podstatné zlepšení účinku léčiva a možnosti ovlivnění celé osy pohlavního systému samic i samců hospodářských zvířat.

Významem předloženého vynálezu je také použití polymerních konjugátů lecirelinu s protražovaným účinkem jako veterinárních léčiv pro ovlivňování reprodukčního cyklu hospodářských zvířat.

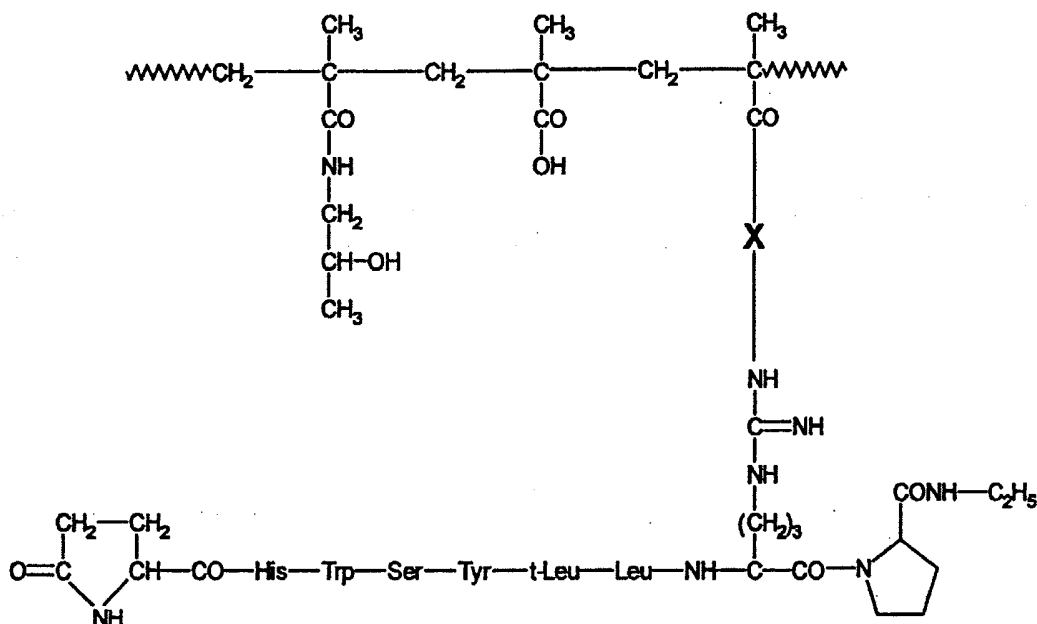
5

Předložený vynález dále zahrnuje použití polymerních konjugátů lecirelinu s protražovaným účinkem ve veterinární medicíně jako prostředek pro ovlivnění růstu a zrání ovariálních folikulů, indukci ovulace, regulace steroidogeneze, podporu luteinizaci ovariálních struktur, přerušení anestrů, start ovariální aktivity, léčbu atrezie ovarii, formování luteální tkáně při patologických procesech na ováriích, regulaci androgenní aktivity, spermatogeneze, ovulace, koncepce a kontracepce, regulaci předčasného nástupu puberty, léčbu endometrióz a hormonálních disbalancí pohlavních steroidů, léčbu steroidodependentních novotvarů a léčbu gonádotropních dysfunkcí hospodářských zvířat, zvláště pak krav, ovcí a koz.

15 Předmětem předloženého vynálezu jsou také farmaceutické veterinární přípravky obsahující jako účinnou látku polymerní konjugáty lecirelinu s protražovaným účinkem.

Na obr. 1 je znázorněna struktura příkladu polymerních konjugátů lecirelinu, kde X může být – Ala, –β-Ala, –Akap–, –Gly–D, L–PheLeuGly–, –GlyGly–

20



Obr. 1

Příklady provedení

25

Příklady syntézy a biologických účinků polymerních konjugátů lecirelinu

Příklad 1

Syntéza monomerů a polymerních prekurzorů:

5 Příprava p-nitrofenylového esteru N-methakryloyl- β -alaninu (Ma- β -Ala-ONp)

N-Methakryloyl- β -alanin byl připraven Schotten-Baumanovou reakcí methakryloylchloridu s β -alaninem v přítomnosti vodného roztoku hydroxidu sodného.

- 10 V trojhrdlé baňce byl rozpuštěn β -alanin (5 g, 0,056 mol) v roztoku hydroxidu sodného (2,35 g, 0,057 mol) v 20 ml vody. Po rozpuštění bylo přidáno 50 ml dichlormethanu a pak byl roztok ochlazen na 0 °C. K ochlazenému roztoku byl zároveň přikapán methakryloylchlorid (5,7 ml, 0,057 mol) a roztok NaOH (2,35 g, 0,057 mol) v 20 ml vody. Reakční směs byla udržována ještě 0,5 hod při 0 °C a pak 1 h při laboratorní teplotě. Vrstva dichlormethanu byla oddělena a po
- 15 okyselení roztoku na pH = 2 až 3 byl produkt vytřepán octanem ethylnatým. Organická vrstva byla usušena MgSO₄ a vakuově zahuštěna. Produkt byl krystalován ze směsi octan ethylnatý-diethylether. Bylo získáno 5 g Ma- β -Ala-OH. Teplota tání 76 až 80 °C.

- 20 N-Methakryloyl- β -alanin-p-nitrofenylester (MA- β -Ala-ONp) byl připraven reakcí Ma- β -Ala-H s p-nitroenolem v THF v přítomnosti dicyklohexylkarbodiimidu. Ma- β -Ala-OH (3,3 g, 0,021 mol) a p-nitrofenol (3,2 g, 0,023 mol) byly rozpuštěny ve 25 ml THF, roztok ochlazen za míchání na -15 °C a pak přidán roztok dicyklohexylkarbodiimidu (DCC) (5,1 g, 0,024 mol) v 18 ml THF. Reakční směs byla udržována 10 h při 0 °C, vyloučená dicyklohexylmočovina byla
- 25 odfiltrována a produkt byl přečištěn na koloně 3 x 30 cm naplněné silikagelem (Kieselgel 60, Fluka). Jako mobilní fáze byl použit octan ethylnatý. Produkt byl izolován, octan ethylnatý byl vakuově odpařen a produkt byl krystalován z diethyletheru. Bylo získáno 2,6 g Ma- β -Ala-ONp.

Příprava p-nitrofenylového esteru N-methakryloyl- ϵ -aminokapronové kyseliny (Ma-Akap-ONp)

- 30 N-Methakryloyl- ϵ -aminokapronová kyselina byla připraven Schotten-Baumanovou reakcí methakryloylchloridu s ϵ -aminokapronovou kyselinou v přítomnosti vodného roztoku hydroxidu sodného obdobně, jako v případě methakryloyl- β -alaninu.

- 35 V trojhrdlé baňce byla rozpuštěna kyselina ϵ -aminokapronová (5 g, 0,056 mol) v roztoku hydroxidu sodného (2,35 g, 0,058 mol) v 20 ml vody. Po rozpuštění bylo přidáno 50 ml dichlormethanu a pak byl roztok ochlazen na 0 °C. K ochlazenému roztoku bylo zároveň přidán methakryloylchlorid (5,7 ml, 0,057 mol) a roztok hydroxidu sodného (2,35 g, 0,058 mol) a 20 ml vody. Reakční směs byla udržována ještě 0,5 h při 0 °C a 1 h při laboratorní teplotě. Vrstva
- 40 dichlormethanu byla oddělena a po okyselení roztoku na pH = 2 až 3 byl produkt vytřepán octanem ethylnatým. Organická vrstva byla usušena MgSO₄ a vakuově zahuštěna. Produkt byl krystalován ze směsi octan ethylnatý - diethylether.

- 45 p-Nitrofenylový ester N-methakryloyl- ϵ -aminokapronové kyseliny (Ma-Akap-ONp) byl připraven reakcí s p-nitrofenolem v THF v přítomnosti dicyklohexylkarbodiimidu. Ma-Akap-OH (4 g, 0,020 mol) a p-nitrofenol (3,06 g, 0,022 mol) byly rozpuštěny ve 30 ml THF, roztok ochlazen za míchání na -15 °C a pak přidán roztok DCC (4,9 g, 0,024 mol) v 15 ml THF. Reakční směs byla udržována 10 h. při 0 °C, vyloučená dicyklohexylmočovina byla odfiltrována a produkt byl překrystalován ze směsi chloroform-hexan. Vyloučené krystaly byly odfiltrovány,
- 50 promyty směsí diethylether-petrolether (1:1) a usušeny. Bylo získáno 4,5 g Ma-Akap-ONp.

Příprava p-nitrofenylového esteru N-methakryloylglycylglycinu (Ma-Gly-Gly-ONp)

N-Methakryloylglycylglycin byl připraven Schotten–Baumanovou reakcí methakryloylchloridu s glycylglycinem ve vodném roztoku hydroxidu sodného.

- 5 Glycylglycin (33,5 g) byl rozpuštěn v 92 ml 3M vodném roztoku NaOH a za intenzivního míchání a při teplotě 0 °C současně přikapáno 27,1 ml methakryloylchloridu a 92 ml 3M roztoku NaOH. Po 3 h reakce byla reakční směs přefiltrována, okyselena zředěnou HCl na pH 3, vyloučená sraženina byla promyta chlazeným ethanolem a diethyletherem. Produkt byl překrystalován ze směsi etanol – voda 1 : 1. Teplota tání: 194 až 196 °C.
- 10 N-Methakryloyl-glycylglycin (21,2 g) a p-nitrofenol (14,7 g) byly rozpuštěny v 200 ml DMF a po ochlazení na -10 °C byl přikapán dicyklohexylkarbodiimid (24 g) rozpuštěný v 30 ml DMF. Roztok byl míchán 8 h při teplotě -10 °C, pak 16 h při 0 °C a nakonec 1 h při laboratorní teplotě. Vyloučená dicyklohexylmočovina byla odfiltrována a roztok zahuštěn na vakuové odparce. Z viskózního olejovitého zbytku se po 1 h stání vyloučil krystalický produkt, který byl promyt
- 15 diethyletherem a překrystalován ze směsi etanol – voda (1:1).

Příprava p-nitrofenylového esteru N-methakryloylglycyl-D,L-fenylalanyl-leucyl-glycinu (MA-Gly-D,L-PheLeuGly-ONp)

- 20 N-Methakryloyl-glycylfenylalanin byl připraven Schotten–Baumanovou reakcí methakryloylchloridu s glycylfenylalaninem v přítomnosti vodného roztoku hydroxidu sodného obdobně, jako v případě methakryloyl-β-aminu. Surový produkt byl po reakci a okyselení reakční směsi na pH 2 až 3 izolován z vodné fáze extrakcí do octanu ethylnatého a po vysušení roztoku (bezv. Na₂SO₄) a zahuštění byl krystalován z roztoku octanu ethylnatého. Rekrystalizace byla
- 25 provedena ze směsi methanol – diethylether. Teplota tání: 140 až 142 °C.

N-Methakryloyl-glycylfenylalanin-p-nitrofenylester (MA-GlyPhe-ONp) byl připraven reakcí s p-nitrofenolem v THF v přítomnosti dicyklohexylkarbodiimidu.

- 30 K roztoku MA-GlyPhe-ONp (4,11 g) v 75 ml dioxanu byl přidán za míchání roztok obsahující L-leucylglycin (2,06 g) a NaHCO₃ (0,92 g) v 60,0 ml vody a reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 14 h. Po odpaření dioxanu a filtraci roztoku byla reakční směs okyselena na pH 2 až 3, produkt byl izolován extrakcí do octanu ethylnatého a přečištěn krystalizací ze směsi octan ethylnatý – diethylether. Výtěžek MA-Gly-D,L-PheLeuGly-OH: 3,2 g, teplota tání: 148
- 35 až 153 °C.

- MA-Gly-D,L-PheLeuGly-OH (2,3 g) a p-nitrofenol (0,77 g) byly rozpuštěny ve 40 ml THF, ochlazeno za míchání na -15 °C a přidán roztok DCC (1,13 g) ve 4 ml THF. Reakční směs byla udržována 10 h při 0 °C, vyloučená dicyklohexylmočovina byla odfiltrována a produkt izolován
- 40 vysrážením do diethyletheru. Výtěžek: 2,1 g.

Příprava polymerních prekurzorů

Obecný předpis

- 45 Kopolymery N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu s N-methakryloylovanými aminokyselinami, oligopeptidy nebo jejich p-nitrofenylovými estery byly připraveny radikálovou srážecí kopolymerizací v acetonu podle obecného předpisu:

- 50 Polymerizační směs o složení 86,9 % hmotn. acetonu, 12,5 % hmotn. monomerů v odpovídajícím molárním poměru složek (HPMA, methakryloylované aminokyseliny, oligopeptidy nebo jejich -ONp ester a případě kyselina akrylová nebo kyselina methakrylová) a 0,6 % hmotn. iniciátoru (AIBN) byla po probublání žárovkovým dusíkem zatavena v polymerizačních ampulích a polymerizována při 50 °C po dobu 24 h. Vyloučený polymer byl odfiltrován, promyt
- 55 acetonem, diethyletherem a usušen za vakua.

- Připravené polymerní prekurzory byly charakterizovány titrací COOH skupin (u kopolymerů s kyselinami) UV spektrofotometrií (obsah postranních oligopeptidických řetězců zakončených p-nitrofenoxyskupinami) a po případné aminolýze -ONp skupin 1-amino-2-propanolem gelovou permeační chromatografií (M_w , M_n , M_w/M_n).

Příklad 2

10 Příprava konjugátů lecirelinu

Příprava konjugátu P-β-Ala-LEC

- 50 mg polymerního prekurzoru P-β-Ala-ONp (4,60 mol % ONp, $M_w = 35\,900$, $M_w/M_n = 1,33$) bylo rozpuštěno ve 1,0 ml 0,15N NaCl a k tomuto roztoku bylo při 4 °C za míchání přidáno 5 mg lecirelinu. Reakce byla prováděna při 9 °C a konstantní hodnotě pH 7,5, která byla udržována přidávkem nasyceného roztoku tetraboritanu sodného na pH státu (Radiometer) po dobu 6 h a po dobu dalších 12 h na hodnotě pH 8,0. Reakce byla ukončena přidávkem 3 μl 1-amino-2-propanolu. Produkt byl vyčištěn od nízkomolekulárních příměsí (reakcí uvolněného 4-nitroenolu, nenavázaného lecirelinu, NaCl a tetraboritanu sodného) dvojnásobnou gelovou chromatografií na kolonce PD-10 (Pharmacia) naplněné Sephadexem g-25. Jako mobilní fáze byla použita destilovaná voda. Vyčištěný polymerní konjugát lecirelinu byl zmrazen a lyofilizován. Bylo získáno 45 mg polymerního konjugátu lecirelinu.

25 Příprava konjugátu P-Akap-LEC

- 50 mg polymerního prekurzoru P-Akap-ONp (3,67 mol % ONp, $M_w = 28\,800$, $M_w/M_n = 1,37$) bylo rozpuštěno ve 1,0 ml 0,15M NaCl a k tomuto roztoku bylo při 4 °C za míchání přidáno 5 mg lecirelinu. Reakce byla prováděna při 9 °C a konstantní hodnotě pH 7,5, která byla udržována přidávkem nasyceného roztoku tetraboritanu sodného na pH státu (Radiometer) po dobu 6 h a po dobu dalších 12 h na hodnotě pH 8,0. Reakce byla ukončena přidávkem 3 μl 1-amino-2-propanolu. Produkt byl vyčištěn od nízkomolekulárních příměsí (reakcí uvolněného 4-nitrofenolu, nenavázaného lecirelinu, NaCl a tetraboritanu sodného) dvojnásobnou gelovou chromatografií na kolonce PD-10 (Pharmacia) naplněné Sephadexem g-25. Jako mobilní fáze byla použita destilovaná voda. Vyčištěný polymerní konjugát lecirelinu byl zmrazen a lyofilizován. Bylo získáno 48 mg polymerního konjugátu lecirelinu.

Příprava konjugátu P-Gly-D,L-PheLeuGly-LEC

- 150 mg polymerního prekurzoru P-Gly-D,L-PheLeuGly-ONp (5,69 mol % ONp, $M_w = 25\,100$, $M_w/M_n = 1,34$) bylo rozpuštěno v 1,5 ml 0,15N NaCl a k tomuto roztoku byl při 4 °C za míchání přidán roztok 19 mg lecirelinu v 1 ml 0,15N NaCl. Reakce byla prováděna při 9 °C a konstantní hodnotě pH 7,5, která byla udržována přidávkem nasyceného roztoku tetraboritanu sodného na pH státu (Radiometer) po dobu 6 h a po dobu dalších 12 h na hodnotě pH 8,0. Reakce byla ukončena přidávkem 10 μl 1-amino-2-propanolu. Produkt byl vyčištěn od nízkomolekulárních příměsí (reakcí uvolněného 4-nitrofenolu, nenavázaného lecirelinu, NaCl a tetraboritanu sodného) dvojnásobnou gelovou chromatografií na koloně o rozměrech 3 x 30 cm naplněné Sephadexem g-25.

50 Příprava konjugátu P-Gly-D,L-PheLeuGly-LEC z P-Gly-D,L-PheLeuGly-OH

P-GlyPheLeu-OH (0,30 g) bylo rozpuštěno v 4 ml vody při teplotě 4 °C. Za stálého míchání byl přidán lecirelin (40 mg). Zředěnou HCl bylo upraveno pH roztoku na hodnotu 6,5 a za míchání byl přidán N-ethyl-N'-(3-dimethyl-aminopropyl)karbodiimid hydrochlorid (1,3 g). Reakční

směs byla míchána 4 h při teplotě 4 °C a pH bylo udržováno na konstantní hodnotě 6,5. Reakční směs byla ponechána v klidu stát při 4 °C po dobu 20 hod. Po filtraci byl filtrát zbaven nízkomolekulárních příměsí na gPC koloně o rozměrech 6 x 20 cm naplněné Sephadexem g 25 při použití vody jako eluentu. Pevný produkt byl získán lyofilizací.

Příklad 3

Farmakokinetika protrahované formy lecirelinu.

Provedení experimentu:

Farmakokinetika protrahované formy lecirelinu byla sledována na čtyřech dospělých merinových ovcích o hmotnosti asi 45 kg. Aplikováno bylo 40 µg účinné látky lecirelinu v polymerní protrahované formě, aplikace byla provedena intramuskulárně (i.m). Pro doplnění je uvedena i farmakokinetika protrahované formy lecirelinu u prasnic (prasničky o průměrné hmotnosti 110 kg, pohlavně dospělé, cyklující). Protrahovaná forma lecirelinu byla aplikována hluboko do krční svaloviny (i.m.).

Výsledky a zhodnocení experimentu:

Časová závislost koncentrace z polymeru uvolněného lecirelinu je znázorněna na grafu 1. První vlna zvýšení koncentrace nastupuje bezprostředně po aplikaci a kulminuje po 8. hodině (473,6 pg.ml⁻¹). Tato vlna prakticky končí mezi 36. a 40. hodinou po aplikaci. Několik píků mezi první a druhou výraznou vlnou, která se objevuje mezi 180. a 216. hodinou po aplikaci, je zatíženo velkou variabilitou. V grafu zachycujícím farmakokinetiku lecirelinu u ovcí jsou pro srovnání uvedena stanovení lecirelinu v krevní plazmě kontrolních, neaplikovaných ovcí. Ze srovnání průběhu obou křivek vyplývá, že druhá vlna vyplavení lecirelinu může být artefaktem, nebo je způsobena rozrušením amidických vazeb ve „spaceru“ biodegradabilního polymeru. Z průběhu koncentrace lecirelinu byly vypočítány farmakokinetické parametry, které uvádíme v tabulce níže. Srovnáním farmakokinetických parametrů obou forem lecirelinu u ovcí zjistíme, že biologická dostupnost (vyjádřená hodnotou AUC) je 38krát vyšší a parametr eliminace ($t_{1/2e}$) je 109,9krát delší u polymerní protrahované formy lecirelinu, než u formy neprotrahované.

Srovnání farmakokinetických studií protrahované a neprotrahované formy lecirelinu

Aplikační forma	druh zvířete (dávka)	$t_{1/2e}$ hod.	C_{max} pg.ml ⁻¹	T_{max} hod	AUC pg.ml ⁻¹ .hod.
neprotrahovaná	ovce (10 mg)	0,84	829,0	0,16	545,00
protrahovaná	ovce (40 mg)	91,20	473,60	4,0	20 723
protrahovaná	prase (100 mg)	16,90	1781,0	5,00	38 141,0

$t_{1/2e}$ – poločas eliminace

T_{max} – čas, ve kterém bylo dosaženo C_{max}

C_{max} – nejvyšší dosažená koncentrace

AUC – vyjádření plochy pod křivkou

Příklad 4

Studium účinnosti protrahované formy lecirelinu:

1) Vliv podání protrahované formy lecirelinu na sekreci luteinizačního hormonu.

Provedení experimentu:

Do experimentu bylo zařazeno 10 pohlavně dospělých ovcí. Protrahovaná forma lecorelinu byla i.m. aplikována šesti ovcím v dávce 40 µg účinné látky pro toto, čtyřem kontrolním ovcím byl i.m. aplikován fyziologický roztok v množství 3,0 ml pro toto. V krevní plazmě ovcí byla provedena endokrinologická RIA vyšetření.

Výsledky a zhodnocení experimentů:

Kinetika vyplavování lecorelinu a sekreční odpověď LH je uvedena v grafu 2. Nejvyšší koncentrace lecorelinu v krevní plazmě byla zaznamenána za 4 hodiny a postupně se snižuje do asi 50. hodiny po aplikaci. Ovce odpověděly na podání protrahované formy lecorelinu vylitím LH do krevního řečiště v trvání asi 4 hodin. Druhé zvýšení koncentrace LH, které je zachyceno 72. hodinu po aplikaci, je pravděpodobně preovulační pík LH a souvisí s fyziologickým růstem a zráním folikulů.

2) Inhibiční účinek lecorelinu v protrahované formě na steroidní aktivitu samců.

Provedení experimentu:

Experiment byl proveden na dvaceti pohlavně dospělých samcích laboratorního potkana o průměrné hmotnosti 246,4 g. Potkani byli rozděleni do pokusné a kontrolní skupiny. Pokusná skupina byla i.m. aplikována protrahovanou formou lecorelinu v týdenních intervalech dávkou 16,8 µg účinné látky na kg živé hmoty. V kontrolní skupině bylo v týdenních intervalech podáváno 0,25 ml fyziologického roztoku.

První, třicátý, šedesátý a devadesátý den pokusu byly zvířatům odebírány krevní vzorky a sonograficky vyšetřována prostata a velikost varlat. Devadesátý den pokusu byla všechna pokusná zvířata utracena a pitvána. Byla sledována hmotnost varlat a přídatných pohlavních žláz. Z krevní plazmy a varlat byly stanoveny koncentrace 17β-estradiolu a testosteronu. V průběhu pokusu byly sledovány též přírůstky a konverze krmiva.

Výsledky a zhodnocení experimentu:

V průměrné měsíční spotřebě krmiva nebyly zaznamenány statisticky průkazné rozdíly mezi skupinami. Přírůstek hmotnosti od začátku do konce pokusu byl statisticky významně vyšší u potkanů ošetřených protrahovanou formou lecorelinu než u kontrolní skupiny. Od 30. dne až do ukončení experimentu byl sonograficky zjišťován statisticky vysoce průkazný nižší objem varlat u aplikované skupiny proti skupině kontrolní. Hmotnosti varlat a nadvarlat byly u pokusných potkanů statisticky vysoce nižší, než u kontrolních potkanů. Neprůkazné byly rozdíly mezi hmotnostmi prostaty, Cowperových žláz a semenných váčků. Koncentrace 17β-estradiolu v plazmě byla 30. den pokusu vyšší u aplikovaných potkanů, v dalším období nebylo zvýšení jeho koncentrace pozorováno, stejně jako při stanovení ve tkáni varlat. Od 30. dne byly u aplikovaných potkanů koncentrace testosteronu nižší v porovnání s kontrolními potkany, 30. a 60. den byla zaznamenána statistická průkaznost. Koncentrace testosteronu ve tkáni varlat byla při ukončení pokusu zjištěna také statisticky průkazně nižší. Dlouhodobým podáním vysokých dávek protrahované formy lecorelinu bylo prokázáno snížení pohlavní aktivity samců laboratorního potkana.

3) Terapie chirurgicky vyvolané endometriózy u samic laboratorního potkana.

Provedení experimentu:

- 5 Do experimentu bylo zařazeno 27 samic laboratorního potkana, u kterých byla chirurgickým zákrokem vyvolána endometrióza. Aplikace protrahované formy lecirelinu byla provedena subkutánně dvakrát v týdenním intervalu v jednotlivé dávce 2,5 µg pro toto.

Výsledky a zhodnocení experimentu:

10

Plazmatické koncentrace hormonů po aplikaci protrahované formy lecirelinu jsou uvedeny v tabulce.

Skupina	n zvířat	progesteron ng.ml ⁻¹	17b-estradiol pg.ml ⁻¹	testosteron pg.ml ⁻¹
Kontrolní	7,0	9,9±4,0	381,9±7,8	581,8±115,1
Pokusná	20,00	16,9±0,8	138,1±6,9**	476,3±45,6

** statisticky vysoce průkazný rozdíl

15

Průkazný pokles koncentrace 17b-estradiolu byl zaznamenán u krys pokusné skupiny. Hyperestrogenní, hyperandrogenní a hypogestagenní stav navozený chirurgickým zásahem byl po aplikaci protrahované formy lecirelinu u krys normalizován.

20

4) Použití protrahované formy lecirelinu při léčbě poporodní anestríe krav.

Provedení experimentu:

- 25 Do experimentu byly zařazeny dojnice různého plemene a stáří s diagnostikovanou anestríí po 60. dnu po porodu. V anamnéze dojnice byla uvedena neřijivost, dojnice nebyla v období do 60. dnu po porodu inseminována. Při palpačním vyšetření ovarií nebyly na ováriích nalezeny patrné ovariální struktury, ovaria byla hladká, popř. drobně zrnitá, atretická. Při ultrasonografickém vyšetření byly diagnostikovány folikuly do velikosti 0,3 až 0,5 cm v různém stupni luteinizace. Protrahovaná forma lecirelinu byla aplikována i.m. v dávce 0,2 mg lecirelinu pro toto.
- 30 kontrolní skupiny byly zařazeny dojnice ošetřené neprotahovanou formou lecirelinu – Supergestranem inj. v dávce 0,1 mg i.m. pro toto.

Výsledky a zhodnocení experimentu:

35

Výsledky pokusu jsou uvedeny v následující tabulce.

Terapie postpartální anestríe krav

Pokusná skupina – protrahovaná forma				
počet		čas (dny) od aplikace do		
ošetřených	vyléčených	vyléčení (nálezu ovariál. struktur)	1. inseminace	zabřeznutí
21,00	20 = 95 %	10,5 ± 6,26 (n=12)	20,87 ± 15,88 (n=15)	27,6 ± 39,38 (n = 5)
Kontrolní skupina – neprotahovaná forma				
25,00	25 = 100 %	15,13 ± 10,74 (n = 15)	27,13 ± 20,05 (n = 23)	65 ± 45,33 (n = 10)

Do vyhodnocení experimentu byly zařazeny dojnice, u kterých se v provozních podmínkách podařilo získat reprodukční ukazatele, ale ze zkráceného přehledu jsou patrné kratší intervaly ve všech sledovaných ukazatelích.

5) 5) Terapie ovariálních cyst u krav.

Provedení experimentu:

Do experimentu bylo zařazeno celkem 76 dojníc, u kterých byly diagnostikovány ovariální cysty folikulárního typu. K léčbě byla použita protrahovaná forma lecirelinu v dávce 0,2 mg úč. látky pro toto a byla srovnána s neprotrahovanou formou lecirelinu (Supergrestran inj.) v dávce 0,1 mg lecirelinu pro toto.

Výsledky a zhodnocení experimentu:

Srovnatelné osu počty vyléčených zvířat celkem, vyšší terapeutická účinnost protrahované formy lecirelinu se však projevuje ve všech ostatních reprodukčních ukazatelích. Srovnání účinností obou preparátů je uvedeno v následující tabulce.

20) Terapie ovariálních cyst u skotu

Pokusná skupina – protrahovaná forma					
počet		čas (dny) od aplikace do			
aplik.	z toho vyléčených	vyléčení (bez pat. nálezu)	1. říje	1. inseminace	zabřeznutí
43	34 = 79 % po 1 apl. 32 = 74 %	11,8 ± 5,17 (n = 25)	18,31 ± 10,04 (n = 13)	28,28 ± 17,9 (n = 18)	49,5 ± 57,2 (n = 12)
Kontrolní skupina – neprotrahovaná forma					
33	27 = 81 % po 1 apl. 17 = 52 %	14,79 ± 7,72 (n = 14)	20,45 ± 10,99 (n = 11)	46,13 ± 26,01 (n = 23)	93,04 ± 69,3 (n = 10)

6) Indukce ovulace u ovcí.

Provedení experimentu:

Ovulace byla indukována u šestnácti superovulovaných ovcí. Ovce byly superovulovány přípravkem na bázi pFSH po předchozí zástavě pohlavního cyklu poševními tampóny s gestagenní aktivitou. Superovulované ovce byly rozděleny do dvou skupin po osmi kusech. Pokusná skupina byla ošetřena protrahovanou formou lecirelinu v dávce 5 µg účinné látky pro toto. Ovcím byl aplikován lecirelin (obě formy) v intervalech 24, resp. 32 hodin před porážkou. Po aplikacích byly sledovány koncentrace lecirelinu a LH v krvi experimentálních zvířat.

Výsledky a zhodnocení experimentu:

V průběhu experimentu nebyl prokázán rozdíl mezi aplikací obou forem lecirelinu. Na vaječnicích ovcí aplikovaných LH–RH 32 hodin před porážkou byly pozorované zkolabované folikuly těsně po ovulaci (do 2 hodin), zároveň byly zjištěny i folikuly ještě neovulované. U skupin pokusných zvířat, kterým byl aplikován LH–RH 24 hodin před porážkou, ovulační body nalezeny nebyly. K ovulaci grafových folikulů u superovulovaných ovcí dochází kolem 32. hodiny po aplikaci indukční dávky lecirelinu.

Vrchol koncentrace obou přípravků byly pozorovány za 2 hodiny po aplikaci. Absolutní hodnoty koncentrace LH–RH po aplikaci Supergestranu byly o 75 % nižší, než po aplikaci polymerní

formy lecirelinu. Hladina LH–RH uvolňovaného z polymerní formy lecirelinu přetrvávala v krevní plazmě o 20 hodin déle, než po aplikaci Spergestranu. Terapeutický efekt byl u obou preparátů srovnatelný.

- 5 7) Použití protrahované formy lecirelinu na přerušení sezónní anestrie malých přežvýkavců.

Úvod:

- 10 Ovce a kozy se vyznačují výraznou pohlavní sezónností. Pohlavní cyklus probíhá se zřetelem ke klimatickým podmínkám a plemenné příslušnosti u ovcí většinou v období pozdního léta a na podzim. Jen asi u 10 až 20 % ovcí se říje objeví na jaře a v létě. Délka pohlavního cyklu se pohybuje mezi 14 až 21 dny, vlastní říje trvá 24 a až 36 hodin, příznaky říje jsou málo zřejmé a obtížně rozeznatelné. K vyhledání a rozpoznání říjících se ovcí se využívají beraní prubíři. U koz pohlavní cykly probíhají především od poloviny září do prosince, méně často i na jaře. Délka pohlavního cyklu je 19 až 22 dny, říje trvá zpravidla 24 hodin, příznaky říje jsou relativně zřejmé. Protrahovaná forma lecirelinu nám dává možnost tento sezónní anestrus přerušit a vyvolat fyziologickou říji.

Provedení experimentů:

- 20 Možnost přerušení sezónního anestru, popřípadě možnost synchronizace pohlavního cyklu i.m. podáním 40 µg protrahované formy lecirelinu byla ověřována v 11 experimentech na 60 ovcích a 26 kozách. V kontrolních skupinách bylo zařazeno 14 ovcí a 7 koz. V experimentech na ovcích byly použity ovce merinového typu, ovce východofřížského plemene a kříženky merinových ovcí s plemenem Kent (Oxford – down). V experimentech na kozách bylo použito plemeno kozy bílé, resp. jeho kříženky tohoto plemene.

- 30 U všech pokusných zvířat byla před aplikací provedena laparoskopická kontrola ovarií, v experimentech, kde nebyla přesvědčivě vyjádřena anestrie (u koz v roce 1994) byly pokusy provedeny u zvířat po předchozí zástavě cyklu. Aplikace přípravků byla provedena intramuskulárně hluboko do šíjové svaloviny v dávce 0,04 mg účinné látky pro toto. Podáním podprahových dávek estrogenů – 0,25 mg estradiolu ve specialitě Agofollin inj. ad us. vet. spolu s aplikací polymerní protrahované formy lecirelinu, byl proveden pokus o sensibilizaci hypofýzy pokusných zvířat k působení lecirelinu u zvýšení celkové estrogenizace organismu. Účinnost preparátu byla ověřována opětovným laparoskopickým vyšetřením. Nástup ovariální cyklicity byl charakterisován nálezem preovulačních folikulů nebo žlutých tělísek.

Výsledky a zhodnocení experimentů:

- 40 Účinnost ošetření se pohybovala od 40 do 100 % ošetřených zvířat. Příznaky říje, zejména u ovcí, byly u indukovaných říjí nevýrazné. Beraní prubíři projevovali zájem o pokusné ovce, u těch však nebyl vyjádřen reflex stání a nebylo možné připuštění. K nastartování fyziologického pohlavního cyklu došlo u 44 ovcí z 60 pokusných, tj. 73 % a 21 koz z 26 pokusných, tj. 81 %. Plnohodnotná ovulace byla laparoskopicky diagnostikována u 34 ovcí a 17 koz, tj. 57 a 65 %, u zbývajících 10 ovcí a 4 koz byly nalezeny preovulační folikuly. U kontrolních skupin byl pozorován nástup říjových změn na ováriích u 1 ze 14 ovcí, tj. 7,14 % a 4 ze 7 koz, tj. 57 %. Nulové výsledky v experimentu na ovcích v srpnu 1995 byly pravděpodobně způsobeny plemenou příslušností ovcí. Do experimentu byly zařazeny ovce východofřížského plemene, u kterých je velmi silně vyjádřen mimo sezónní i laktační anestrus. Podáním podprahových dávek estrogenů – 0,25 mg estradiolu ve specialitě Agofollin inj. ad us. vet. spolu s aplikací konjugátu lecirelinu jsme u ovcí dosáhli zvýraznění sexuálního chování. U kontrolní skupiny, které byl podán pouze estradiol, se říjové chování nedostalo a laparoskopicky byla nalezena anestrická ovaria. Obdobný pokus byl proveden u koz se zástavou cyklu, kde se však říjové chování dostavilo u všech zvířat pokusné i kontrolní skupiny. Při těchto kombinovaných ošetřeních ke zlepšení zevních příznaků říje, reflex stání se dostavil u 12 z 15 pokusných ovcí a u 4 ze 4 pokusných koz.

Souhrnné výsledky účinnosti aplikace protrahované formy lecirelinu při přerušení sezónní anestrie u malých přežvýkavců protrahovanou formou LH–RH

druh zvířete	celkový počet	nástup ovariální aktivity	nález CL
ovce	60	44 = 73 %	34 = 57 %
kozy	26	21 = 81 %	17 = 65 %

5

Přehled jednotlivých experimentů uvádíme v následujících tabulkách.

Přehled experimentů – přerušení sezónní anestrie malých přežvýkavců – 1994

číslo pokusu	č. skupiny aplikace	počet zvířat	laparoskopický nález	účinnost
pokus č. 1 10 ovcí (březen)	p-lec	6	3 ovce Cl 2 ovce pF 1 ovce atrofie ovarií	účinnost 83%
	fyziol. roztok	4	1 ovce pF 3 ovce anestrická ovaria	neúplná anestrie
pokus č. 2 15 ovcí (červen)	p-lec + E ₂	5	3 ovce Cl 2 ovce pF	účinnost 100% reflex stání 3 zv.
	p-lec	5	3 ovce CL 2 ovce pF	účinnost 100 %
	E ₂	5	5 ovcí anestrická ovaria	účinnost 0%
pokus č. 3 14 ovcí (srpen)	p-lec	9	6 ovcí Cl 3 ovce anestrická ovaria	účinnost 67%
	fyziol. roztok	5	5 ovcí anestrická ovaria	
pokus č. 4 10 ovcí (květen)	p-lec	10	3 ovce pF 1 ovce SOC	účinnost 40%
pokus č. 5 6 koz (květen)	p-lec	3	1 koza Cl 1 koza pF 1 koza anestrická ovaria	účinnost 67%
	fyziol. roztok	3	3 kozy anestrická ovaria	účinnost 0%
pokus č. 6 12 koz (květen)	p-lec + E ₂	4	3 kozy Cl 1 koza pF	účinnost 100% reflex stání 4 zv.
	p-lec	4	4 kozy Cl	účinnost 100% reflex stání 2 zv.
	E ₂	4	3 kozy Cl 1 koza pF	reflex stání 4 zv.

10

p-lec – protrahovaná forma lecirelinu
lec – neprotrahovaná forma lecirelinu
E₂ – přípravek na bázi estrogenů
tamp. – přípravek na bázi gestagenů

CL – žluté tělísko
pF – preovulační folikul
LF – luteinizovaný folikul

Přehled experimentů – přerušení sezónní anestrie malých přežvýkavců – 1995

číslo pokusu počet zvířat	č. skupiny apli- kovaná látka	počet zvířat	laparoskopický nález po aplikaci	účinnost
pokus č. 1 10 ovcí květen 95	p-lec + tampóny	5	4 ovce CI	účinnost 80% RS 5 zv., přip. 2 zv.
	p-lec	5	5 ovcí CL	účinnost 100 % RS u 2 zv.,
pokus č. 2 10 ovcí srpen 95	lec. (15 mg) + E2 (0,25 mg)	5	bez CI, atypický nález ovulace? u 1 zv. ovulace	přip. 4 z 5 neúčinná apl.?
	p-lec +E2 (0,25 mg)	5	bez CL, atypický nález ovulace? u 3 zvířat	přip. 5 zv. neúčinná apl.?
10 ovcí říjen 1995 srovnání 2 šarží Polygestranu	p-lec	5	5 ovcí CI	účinnost 100% připuš. 0 zv. RS 3 zv.
	p-lec	5	u 5 zvířat CL	účinnost 100% připuš. 0 zv. RS 3 zv.
pokus č. 4 Kozy duben 95	Polygestranu 0,05 mg LH–RH	5	z nepřipuštěných zv. 1 x ovulace 2x nezovulovaný pF	účinnost 100% 2 x přip., březost 0
pokus č. 5 Kozy srpen 95	Polygestranu 0,04 mg	10	z nepřipuštěných zvířat u 2 ovcí CL	účinnost 60% přip. 4 zv. 1 zv. přip. až 9. den

- 5 p-lec – protrahovaná forma lecorelinu
lec – neprotrahovaná forma lecorelinu
E2 – přípravek na bázi estrogenů
tamp. – přípravek na bázi gestagenů

CI – žluté tělísko
pF – preovulační folikul
LF – luteinizovaný folikul

Přehled indikačních oblastí pro využití protrahované formy gnRH:

10

Pro navozování endokrinní homeostázy v organismu zvířat se nám jeví jako nejvhodnější použít protrahovanou formu, která zabezpečí postupné uvolňování gnRH po dobu 2 až 4 dnů.

15

Protrahovaná forma s takovou dobou uvolňování je vhodná pro následující indikace:

Potlačení (vysoké dávky), resp. stimulace (nízké dávky):

20

Růst a zrání ovariálních folikulů, indukce ovulace, regulace steroidogeneze, podpora luteinizace ovariálních struktur, přerušení anestrů, start ovariální aktivity, léčba atrezie ovarií, formování luteální tkáně při patologických procesech na ovariích, regulace androgenní aktivity, spermatogeneze, ovulace, koncepce a kontracepce, nástup puberty, léčba endometrióz a hormonálních disbalancí pohlavních steroidů, léčba steroidodependentních novotvarů, léčba gonádotropních dysfunkcí.

Využitelnost vynálezu

Polymerní forma lecirelinu podle vynálezu může zajistit uvolňování účinné látky – lecirelinu z polymerního nosiče v průběhu několika dní. V této formě může být polymerní konjugát použit
5 především jako veterinární léčivo v následujících indikačních oblastech:

Ovlivnění růstu a zrání uvariálních folikulů, indukce ovulace, regulace steroidogeneze, podporu luteinizace ovariálních struktur, přerušení anestrů různé etiologie, start ovariální aktivity, léčba
10 atresie ovarií, formování luteální tkáně při patologických procesech na ovariích, regulace androgenní aktivity, spermatogeneze, regulace ovulace, koncepce a kontracepce, ovlivnění nástupu puberty, léčbu endometrióz a hormonálních disbalancí pohlavních steroidů, léčbu steroidodependentních novotvarů a léčbu gonádotropních dysfunkcí.

15

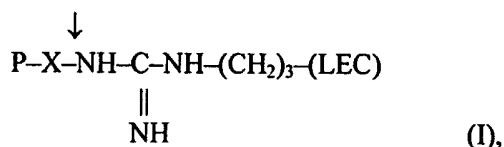
PATENTOVÉ NÁROKY

20 1. Polymerní konjugáty lecirelinu s protrahovaným účinkem sestávající z polymerního nosiče obsahujícího 30 až 1000 monomerních jednotek spojených do polymerního řetězce, z nichž je 60 až 98 % jednotek N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu, 0 až 38 % jednotek kyseliny akrylové nebo methakrylové ve formě sodných solí a 2 až 40 % jednotek methakryloylovaných α nebo ϵ aminokyseliny nebo oligopeptidů, s terminálně chemickou vazbou připojeným lecirelinem.

25

2. Polymerní konjugáty lecirelinu s protrahovaným účinkem podle nároku 1, **v y z n a ě n é t í m**, že lecirelin je v konjugátech vázán k polymeru přes spojku hydrolyticky nestálou vazbou, vzniklou acylací guanidinové skupiny argininu, jedné z aminokyselin tvořící biologicky aktivní oligopeptid lecirelin, vzorce I

30



35

kde P je polymer, LEC je zbytek molekuly lecirelinu bez postranního substituentu u argininu a X je α nebo ϵ aminokyselina nebo oligopeptid.

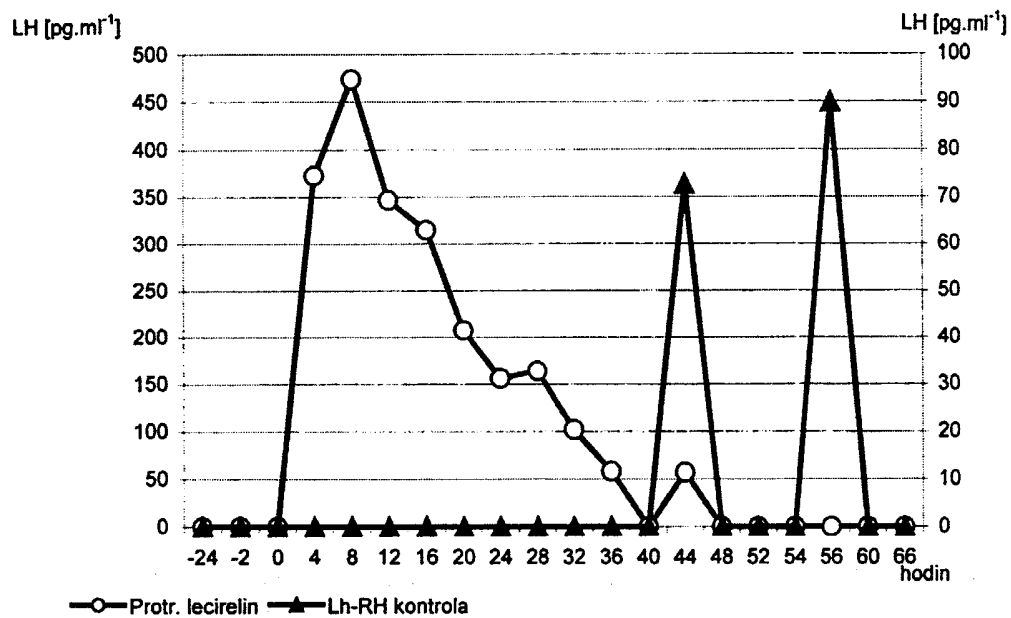
40 3. Polymerní konjugáty lecirelinu s protrahovaným účinkem podle nároku 1 a 2 pro použití při ovlivňování reprodukčního cyklu hospodářských zvířat.

4. Polymerní konjugáty lecirelinu s protrahovaným účinkem podle nároku 1 a 2 pro použití při ovlivnění růstu a zrání ovariálních folikulů, indukci ovulace, regulaci steroidogeneze, podporu luteinizace ovariálních struktur, přerušení anestrů, start ovariální aktivity, léčbě atresie ovarií, formování luteální tkáně při patologických procesech na ovariích, regulaci androgenní aktivity, spermatogeneze, ovulace, koncepce a kontracepce, regulaci předčasného nástupu puberty, léčbu endometrióz a hormonálních disbalancí pohlavních steroidů, léčbě steroidodependentních novotvarů a léčbě gonádotropních dysfunkcí hospodářských zvířat, zvláště pak krav, ovcí a koz.

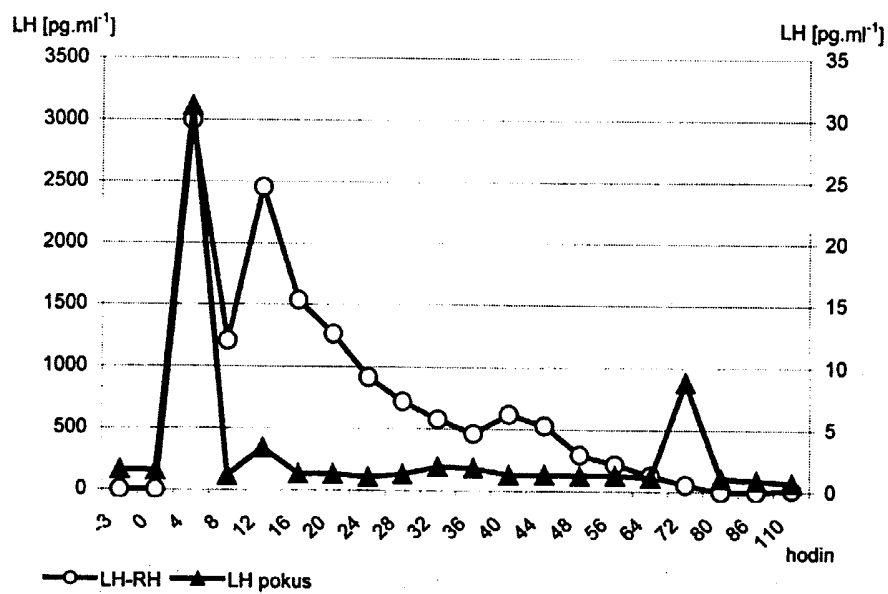
50 5. Farmaceutické veterinární přípravky, **v y z n a ě n é t í m**, že jako účinnou látku obsahují polymerní konjugáty lecirelinu s protrahovaným účinkem podle nároků 1 a 2.

55

2 výkresy



Graf 1. Kinetika protrahované formy lecorelinu po i.m. aplikaci 40 mg pro toto u ovcí



Graf 2. Kinetika protrahované formy leirelinu a sekreční odpověď LH v plazmě ovčí po i.m. aplikaci 40 mg pro toto

Konec dokumentu