

P 04 02099

78.366/SZE

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A2

Eljárás Mikrokristályos peptid-szuszpenziók előállítására gélképzés
nélkül

KIVONAT

A találmány tárgya eljárás hidrofób peptidek gélképzésének megakadályozására, ami abból áll, hogy a hidrofób peptidet egy ellenionnal hozzák érintkezésbe, olyan mennyiségben és mól-arányban, ami elég ahhoz, hogy biztosítsa a peptid folyékony, tejes mikrokristályos szuszpenziójának előállítását, gél képződése nélkül. A találmány tárgyát képezi továbbá egy hidrofób peptid és az ellenion folyékony, tejes mikrokristályos szuszpenziója vízben, amiben a peptid és az ellenion olyan mennyiségben és mól-arányban van jelen, hogy keveréssel szuszpenzió keletkezzen, és ne keletkezzen gél.

PK

A2

12:174

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Eljddis mikrokristályos peptid-szuszpenziók előállítására gélképzés nélkül

Gyakran szükség van arra, hogy biológiailag aktív peptideket állatoknak és embereknek olyan kiszerezési formában juttassunk be, ami az aktív adalékanyag folyamatos felszabadulását biztosítja. Az ilyen készítményeket úgy állíthatjuk elő, hogy az aktív adalékanyagot biológiailag lebomló és biológiailag kompatibilis polimerekbe vesszük be, mikrokapszulák, mikrogranulátumok vagy beépíthető pálcák formájában, vagy egy másik változat szerint mechanikai berendezéseket, azaz például mikropumpákat vagy biológiailag nem lebomló konténereket használunk. Ha a peptid erősen oldódik vizes közegben, akkor nem-lebomló polimerekkel, azaz például cellulóz-származékokkal képzett komplex formájában szerelhetjük ki, vagy polimer oldatokkal keverhetjük össze, amik a parenterális injekció hatására gél képeznek, amiből az aktív peptid lassan felszabadul.

Mindegyik előzőekben említett kiszerezési formának megvan a hátrányai és korlátjai, azaz például a szuszpendáló folyadék nagy térfogata, vagy az, hogy a nem-lebomló berendezést el kell távolítani. A gélképző peptidek esetében gyakran probléma a gyenge biológiai hozzáférhetőség, ami zavarja az aktív adalékanyag kívánt folyamatos felszabadulását.

A peptidek fiziko-kémiai aspektusainak néhány problémáját a szakirodalomban korábban ismertették [R. Deghenghi

„Antarelix” in Treatment with GnRH Analogs: Controversions and Perspectives”, 89-91. oldal, szerk.: M. Filicori és C. Flamigni, The Parthenon Publishing Group, New York és London (1996)]. A további problémákat J. Rivier és más kutatók írtak le [J. Rivier „GnRH analogues towards the next millenium”, GnRH Analogues, 31-45. oldal, szerk.: B. Lunenfeld, The Parthenon Publishing Group, New York és London (1999); M.F. Powell és mtsai: „Parenteral Peptide Formulations: Chemical and Physical Properties of Native LHRH and Hydrophobic Analogues in Aqueous Solution”, Pharmaceutical Research 8, 1258-1263 (1991)].

Ennek megfelelően szükség van új kiszerezési formákra és beadási módszerekre, amik elkerülik ezeket a problémákat, és a jelen találmányban ezt az igényt célozzuk meg.

A jelen találmány tárgya eljárás arra, hogy egy hidrofób peptid ne képezzen gél. Az eljárás előnyösen magában foglalja a hidrofób peptid érintkezésbe hozását egy ellenionnal, olyan mennyiségben és molarányban, ami elég ahhoz, hogy biztosítsuk a peptid folyékony, mikrokristályos vizes szuszpenzióját, gélképződés nélkül.

A jelen találmány tárgya továbbá egy hidrofób peptid és egy ellenion folyékony, mikrokristály szuszpenziójának biztosítása vízben, amiben a peptid és az ellenion olyan mennyiségben és molarányban van jelen, ami elég ahhoz, hogy keveréssel szuszpenziót kapjunk, gélképződés nélkül.

A gélképződés elkerülése lehetővé teszi, hogy injekciós kiszerezési formát állítsunk elő. Amikor ezeket a vizes szuszpenziókat parenterálisan (azaz például szubkután vagy intramuszkulárisan) injekciózzuk egy emlősbe, azaz például emberbe, akkor a hidrofób peptid időben folyamatos felszabadulását kapjuk.

Az ellenion előnyösen egy erős sav, azaz például trifluoracettsav vagy kénsav sója. Emellett, a hidrofób peptid lehet egy GnRH analóg, előnyösen egy GnRH antagonistá. Még előnyösebb, ha a GnRH antagonistát a következő csoportból választjuk ki: Azaline B, Abarelix, Antide, Ganirelix, Cetrorelix vagy FE 200486, erős sav, azaz például trifluoracetát vagy szulfát sója formájában. Az Ac-D-Nal-D-Cpa-D-Pal-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Ilys-Pro-D-Ala-NH₂ trifluoracetát és az Ac-D-Nal-D-Cpa-D-Pal-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Ilys-Pro-D-Ala-NH₂ szulfát a leginkább előnyben részesített vegyület.

A hidrofób peptid sóját előnyösen vizes közegben szuszpendáljuk, olyan koncentrációban, ami azonos vagy magasabb 25 mg/ml-nél, és a sav:peptid molaránya legalább 1,6:1. A peptidsó legalább részben tű formájában van jelen, részecskemérete körülbelül 5-150 µm között van.

Ha szükséges, akkor a vizes szuszpenzió tartalmazhat izotóniás ágenst, azaz például mannitot. Emellett, a vizes szuszpenzió tartalmazhat gyógyászatilag elfogadható töltőanyagot. A szuszpenziót előnyösen liofilezett állapotban szárítjuk meg, amit vízzel vagy pufferoldattal lehet helyreállítani. Ezek a szárított

szuszpenziók, valamint a szárított szuszpenziók előállítási eljárásai a jelen találmány további megvalósítási módjait jelentik.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a mellékelt ábrákat.

Az 1. ábra egy grafikon, ami a farmakodinámiás hatást illusztrálja (tesztoszteron szuppresszió), amit úgy kapunk, hogy egy jelen találmány szerinti teverelix trifluoracetát szuszpenziót patkányokba szubkután injekciózunk; és

a 2. ábra egy grafikon, ami a teverelix peptid folyamatos felszabadulását illusztrálja, több hétig, a jelen találmány szerinti teverelix trifluoracetát szuszpenzióval injekciózott patkányokban.

Azt a meglepő felfedezést tettük, hogy az Ac-D-Nal-D-Cpa-D-Pal-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala-NH₂ peptid (teverelix, egy GnRH antagonista) trifluoracetát (TFA) vagy szulfát sójának erősen koncentrált vizes szuszpenziója nem képez gél, amint az várható a hidrofób karakteréből kifolyólag, hanem ehelyett mikrokristályos tejes szuszpenziót képez, amit könnyen lehet parenterálisan injekciózni állatokba vagy emberekbe, és amiből az aktív adalékanyag több hét alatt szabadul fel (lásd az 1. és 2. ábrát). Az ilyen viselkedést nem váltják ki más sók, azaz például az acetát, ami a gélek várt, de nem kívánt képződéséhez vezet, a gyenge *in vivo* biológiai hozzáférhetőséggel.

Találmányunk egyszerű és elegáns megoldást ad arra a problémára, hogy miként nyomjuk el a hidrofób peptidek gélesedését, miközben az ilyen peptidek meghosszabbított, folyamatos bejuttatását érjük el, mikrokristályos, erősen koncentrált szuszpenziók formájában.

Felfedezésünk egy további előnye az ilyen szuszpenziók kis térfogata, ami lehetővé teszi a parenterális injekciózást egy finom tűvel, és ez javítja a beinjekciózott anyaggal szemben mutatott lokális toleranciát. Az ilyen injekciókban a peptid mennyisége körülbelül 0,1-5 mg per testsúlykg az emlősben, amibe a szuszpenziót be kell adni.

Az ellenion mennyisége előnyösen annyi, hogy a sóképzéshez viszonyítva főlegben legyen. Ez a mennyiség tipikus esetben legalább 1,6 mó sav/mól peptid, előnyösen 2 mól/mól, vagy nagyobb. Emellett az injekciózható szuszpenziót töményíteni kell, hogy a leginkább kívánt felszabadulási profilt kapjuk. A töményített szakkifejezés ebben a leírásban azt jelenti, hogy a peptid mennyiségének a teljes kisserelési formára számítva 2,5 tömegszázalék fölött kell lennie.

A szuszpenziókat fagyasztva száríthatjuk, vagy porlasztva száríthatjuk, ezzel olyan liofilezett készítményeket kapunk, amiket tárolni lehet, és vízzel vagy pufferoldatokkal helyre lehet állítani, ha injekciózható készítményeket kell előállítani.

Példák

1. Példa

200 µl 5%-os mannitot adunk körülbelül 15 mg teverelix trifluoracetát LHRH antagonistához. A keveréket egy percig vortexeljük, ekkor folyós tejes gyöngyszuszpenziót kapunk. A szuszpenzióban a mikrokristályok körülbelül 10 µm hosszúak. A mikrokristályok össze tudnak tapadni, hogy sünszerű struktú-

rákat hozzanak létre. A szuszpenziókat (1 mg) szubkután patkányokba injekciózzuk, így kapjuk több mint 45 napig a tesztoszteron szuppresszió farmakodinámiás hatását (1. ábra). A farmakokinetikai elemzés a peptid folyamatos felszabadulását mutatja több hétig (2. ábra).

2. Példa

200 μ l vizet adunk körülbelül 15 mg teverelix trifluoracetát LHRH antagonistához. A keveréket egy percig vortexeljük, ekkor folyós tejes gyöngyszuszpenziót kapunk.

3. Példa

200 μ l vizet adunk körülbelül 15 mg teverelix acetát LHRH antagonistához. A keveréket egy percig vortexeljük, ekkor transzparens gél kapunk. 20 μ l TFA (3 mól/mól) hozzáadása a gélhez egy folyós tejes gyöngyszuszpenzió képződését eredményezi.

4. Példa

200 μ l 100 mM-os trifluorecetsavat adunk körülbelül 15 mg teverelix acetát LHRH antagonistához (2 mól/mól), hogy folyós tejes gyöngyszuszpenziót kapjunk. Emellett 200 μ l 75 mmol/l trifluorecetsavat 15 mg teverelix acetát LHRH antagonistával (1,5 mól/mól) keverünk össze, ekkor kevertetés után transzparens gél kapunk. Egy másik vizsgálatban 100 μ l, különböző koncentrációjú TFA-t adunk 7,5 mg teverelix acetát LHRH antagonis-

tához, amikor a TFA/Teverelix molaránya 1-3 között változik. Egy folyós tejes gyöngyszuszpenziót kapunk, amiben a molarány $\geq 1,6$, míg más molarányokkal géleket kapunk.

5. Példa

200 μ l 150 mmol/l trifluorecetsavat adunk a teverelix acetát LHRH antagonistához, aminek a mennyisége 5-30 mg (a koncentráció 25-150 mg/ml) között változik. Egy folyós tejes gyöngyszuszpenziót kapunk, 100 mg/ml koncentrációig.

6. Példa

200 μ l 150 mmol/l trifluorecetsavat adunk körülbelül 15 mg teverelix acetát LHRH antagonistához (3 mól/mól), és kevertetés után folyós tejes gyöngyszuszpenziót kapunk. A szuszpenziót éjszakán át liofilezzük. 200 ml vizet vagy 5% mannitot adunk a liofilizátumhoz, és folyós tejes gyöngyszuszpenziót kapunk kevertetés és helyreállítás után.

7. Példa

1 ml 150 mmol/l trifluorecetsavat adunk körülbelül 75 mg teverelix acetát LHRH antagonistához (3 mól/mól), és kevertetés után folyós tejes gyöngyszuszpenziót kapunk. A szuszpenziót éjszakán át liofilezzük. 1 ml vizet és 0,2 mol/l acetát puffert (pH=4,0) adunk a liofilizátumhoz, és folyós tejes gyöngyszuszpenziót kapunk kevertetés és helyreállítás után. Ezek a szuszpenziók legalább 3 napig stabilak szobahőmérsékleten.

8. Példa

100 μ l 250 mmol/l H_2SO_4 -et adunk 7,5 mg teverelix acetát LHRH antagonistához (5 mól/mól), és kevertetés után folyós tejes gyöngyszuszpenziót kapunk. A szuszpenzió körülbelül 100 μ m hosszúságú mikrokristályokból áll. A mikrokristályok sündisznó-szerű struktúrákká állhatnak össze. A szuszpenziót éjszakán át fagyasztva szárítjuk. 100 ml vizet vagy 5% mannitot adunk a liofilizátumhoz, és folyós tejes gyöngyszuszpenziót kapunk kevertetés és helyreállítás után.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás egy hidrofób peptid gélképzésének megakadályozására, azzal jellemezve, hogy a hidrofób peptidet egy erős savból származó ellenionnal hozzuk érintkezésbe, olyan mennyiségben és mólarányban, ami elég ahhoz, hogy a peptid folyékony, tejes mikrokristályos vizes szuszpenzióját kapjuk, gélképződés nélkül.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az ellenion trifluorecetsav vagy kénsav sója.
3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hidrofób peptid egy GnRH analóg.
4. A 3. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a GnRH analóg egy GnRH antagonistája.
5. A 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a GnRH antagonistája az Ac-D-Nal-D-Cpa-D-Pal-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Ilys-Pro-D-Ala-NH₂ trifluoracetát.
6. A 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a GnRH antagonistája Ac-D-Nal-D-Cpa-D-Pal-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Ilys-Pro-D-Ala-NH₂ szulfát.
7. A 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a GnRH antagonistát a következő csoportból választjuk ki: Azaline B, Abarelix, Antide, Ganirelix, Cetrorelix vagy FE 200486, trifluoracetát vagy szulfát sója formájában.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hidrofób peptidsót vizes közegben szuszpendáljuk, 25 mg/ml, vagy annál magasabb koncentrációban.
9. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a vizes szuszpenzió egy izotóniás ágenst tartalmaz.
10. A 9. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az izotóniás ágens mannit.
11. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a vizes szuszpenzió egy gyógyászatilag elfogadható töltőanyagot tartalmaz.
12. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a vizes szuszpenziót helyben állítjuk elő egy liofilezett peptidsóból.
13. Egy hidrofób peptid és egy erős savból származó ellenion folyékony, tejes mikrokristályos szuszpenziója vízben, amiben a peptid és az ellenion olyan mennyiségben és mólarányban van jelen, hogy keverésre szuszpenzió keletkezzen, gélképződés nélkül.
14. A 13. igénypont szerinti szuszpenzió, amiben az ellenanyag trifluorecetsav vagy kénsav sója.
15. A 13. igénypont szerinti szuszpenzió, amiben a hidrofób peptid egy GnRH analóg.
16. A 15. igénypont szerinti szuszpenzió, amiben a GnRH analóg egy GnRH antagonist.

17. A 16. igénypont szerinti szuszpenzió, amiben a GnRH antagonistá az Ac-D-Nal-D-Cpa-D-Pal-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Ilys-Pro-D-Ala-NH₂ trifluoracetát.

18. A 16. igénypont szerinti szuszpenzió, amiben a GnRH antagonistá Ac-D-Nal-D-Cpa-D-Pal-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Ilys-Pro-D-Ala-NH₂ szulfát.

19. A 16. igénypont szerinti szuszpenzió, amiben a GnRH antagonistát a következő csoportból választjuk ki: Azaline B, Abarelix, Antide, Ganirelix, Cetrorelix vagy FE 200486, trifluoracetát vagy szulfát sója formájában.

20. A 13. igénypont szerinti szuszpenzió, amiben a hidrofób peptidsót vizes közegben szuszpendáljuk, 25 mg/ml, vagy annál magasabb koncentrációban.

21. A 13. igénypont szerinti szuszpenzió, amiben a vizes szuszpenzió egy izotóniás ágenst tartalmaz.

22. A 21. igénypont szerinti szuszpenzió, amiben az izotóniás ágens mannit.

23. A 21. igénypont szerinti szuszpenzió, amiben a vizes szuszpenzió egy gyógyászatilag elfogadható töltőanyagot tartalmaz.

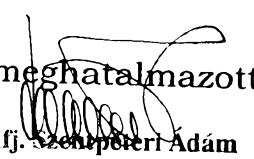
24. A 13. igénypont szerinti szuszpenzió, amiben a mikrokristályok tűk formájában vannak jelen, amiknek részecskemérete körülbelül 5-150 µm.

25. Liofilezett készítmény, ami a 13. igénypont szerinti szárított szuszpenziót tartalmazza.

26. Ac-D-Nal-D-Cpa-D-Pal-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Ilys-Pro-D-Ala-NH₂ trifluoracetát.
27. Ac-D-Nal-D-Cpa-D-Pal-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Ilys-Pro-D-Ala-NH₂ szulfát.
28. Eljárás egy hidrofób peptid szabályozott felszabadulású készítményének előállítására, azzal jellemezve, hogy a hidrofób peptidet egy erős savból származó ellenionnal hozzuk érintkezésbe, olyan mennyiségben és molarányban, ami elég ahhoz, hogy szuszpenzióját kapjunk, gélképződés nélkül.
29. A 28. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az ellenion trifluorecetsav vagy kénsav sója.
30. A 28. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hidrofób peptid egy GnRH analóg.
31. A 3. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a GnRH analóg egy GnRH antagonistá.
32. A 31. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a GnRH antagonistá az Ac-D-Nal-D-Cpa-D-Pal-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Ilys-Pro-D-Ala-NH₂ trifluoracetát.
33. A 31. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a GnRH antagonistá Ac-D-Nal-D-Cpa-D-Pal-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Ilys-Pro-D-Ala-NH₂ szulfát.
34. A 31. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a GnRH antagonistát a következő csoportból választjuk ki: Azaline B, Abarelix, Antide, Ganirelix, Cetrorelix vagy FE 200486, trifluoracetát vagy szulfát sója formájában.

35. A 28. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hidrofób peptidsót vizes közegben szuszpendáljuk, 25 mg/ml, vagy annál magasabb koncentrációban.
36. A 28. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a vizes szuszpenzió egy izotóniás ágenst tartalmaz.
37. A 36. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az izotóniás ágens mannit.
38. A 28. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a vizes szuszpenzió egy gyógyászatilag elfogadható töltőanyagot tartalmaz.
39. A 28. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a vizes szuszpenziót helyben állítjuk elő egy liofilezett peptidsóból.
40. Eljárás a 25. igénypont szerinti liofilezett készítmény előállítására, azzal jellemezve, hogy az 1. igénypont szerinti eljárást alkalmazzuk, majd fagyasztva szárítást, vagy porlasztva szárítást alkalmazva kapjuk a készítményt.
41. Eljárás egy hidrofób peptid injekciózható folyadék, mikrokristályos szuszpenziójának előállítására, azzal jellemezve, hogy a 25. igénypont szerinti liofilezett készítményt vízzel vagy pufferoldattal regeneráljuk.

A meghatalmazott:


ifj. Szendrői Adám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Szabadalmi Ügyvivői Iroda
tagja
H-1062 Budapest, Andrásy út 113.
Telefon: 461-1000 Fax: 461-1099

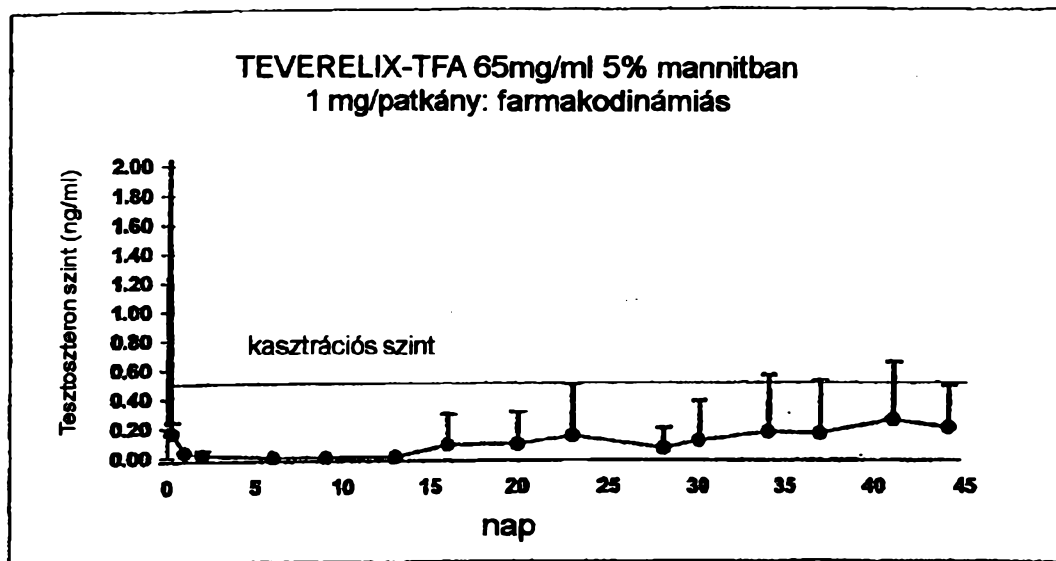
Adám Szendrői

2004. 11. 19. PK

P04 02099

1. ábra

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



2. ábra

