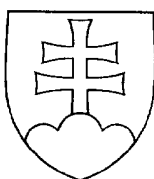


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

- (21) Číslo prihlášky: **1434-94**
(22) Dátum podania: **25.05.93**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **9211268.9**
(32) Dátum priority: **28.05.92**
(33) Krajina priority: **GB**
(40) Dátum zverejnenia: **11.07.95**
(45) Dátum zverejnenia udelenia vo Vestníku: **08.11.99**
(86) Číslo PCT: **PCT/GB93/01079, 25.05.93**

(11) Číslo dokumentu:

280 320

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶

A 61K 47/48

A 61K 9/20

A 61K 9/16

(73) Majiteľ patentu: **ZENECA LIMITED, London, GB;**

(72) Pôvodca vynálezu: **Hutchinson Francis Gowland, Lymm, Cheshire, GB;**

(54) Názov vynálezu: **Kompozícia obsahujúca soli peptidov s polyestermi s koncovou karboxylovou skupinou a spôsob jej prípravy**

(57) Anotácia:

Opisujú sa soli tvorené kationom, odvodeným od peptidu obsahujúceho aspoň jednu zásaditú skupinu, a aniónom, odvodeným od polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou, spôsob prípravy týchto solí a ich použitie na prípravu farmaceutických kompozícií s prolongovaným uvoľňovaním účinnej látky. Uvedené soli majú vlastnosti, ktoré sú využiteľné na formulovanie farmaceutických kompozícií s prolongovaným uvoľňovaním účinnej látky, pričom tieto soli môžu byť v čistej forme alebo v zmesi buď s prebytkom peptidu vo voľnej neviazanej forme, alebo s prebytkom voľného polyesteru.

Oblasť techniky

Vynález sa týka solí tvorených kationom odvodeným od peptidu obsahujúceho aspoň jednu zásaditú skupinu a aniónom odvodeným od polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou, spôsobov príprav týchto solí a použitia týchto solí pri výrobe farmaceutických kompozícií s prolongovaným uvoľňovaním účinnej látky. Soli podľa vynálezu majú množinu vlastností, ktoré sú vhodné na formulovanie farmaceutických kompozícií s prolongovaným uvoľňovaním účinnej látky, a to ako v prípade, keď sú tieto soli v čistej forme alebo v prípade, keď sa nachádzajú v zmesi buď s prebytkom peptidu v jeho voľnej, neviazanej forme, alebo s prebytkom voľného polyesteru. Takéto soli sú obojaké vzhľadom na to, že ich tvorí čiastočne peptid, ktorý je hydrofilný a lipofóbny, a čiastočne polyester, ktorý je hydrofóbny a lipofilný.

Výraz "peptid" sa tu používa v generickom zmysle a zahŕňa poly(aminokyseliny), ktoré sú normálne všeobecne označované ako "peptidy", "polypeptidy" alebo "proteíny", a "zásaditým peptidom" je peptid, ktorý má zásaditý charakter podmienený prebytkom zásaditých aminokyselín, akými sú napríklad arginín alebo lyzín, alebo podmienený N-koncom peptidu, alebo jednoducho peptid, ktorý obsahuje aspoň jednu zásaditú skupinu, prípadne v prítomnosti jednej alebo niekoľkých kyslých aminokyselinových skupín. Uvedený výraz tiež zahŕňa syntetické analógy peptidov, neprirodzené aminokyseliny, ktoré majú zásaditú funkčnosť alebo inú ľubovoľnú formu zavedenej bázy. Výraz "polyester" sa ďalej používa v zmysle, ktorý znamená polyester ukončený karboxylovou skupinou.

Doterajší stav techniky

V európskom patente 58 481 je naznačená možnosť špecifickej chemickej interakcie medzi koncovou karboxylovou skupinou polyesteru a zásaditou skupinou alebo zásaditými skupinami peptidu. Táto možnosť je tiež uvedená v Lawter a kol., Proc.Int.Symp.Control Rel. Bioact. Mater., 14, 19, (1987) a v Okada a kol., Pharmaceutical Research, 8, 584-587 (1991), ale tieto publikácie sa v tomto ohľade vyjadrujú len špekulatívne, lebo špecificky neopisujú žiadnu takúto jednotlivú peptid-polyesterovú soľ, nevádzajú akým spôsobom by sa takéto soli mohli pripraviť a neopisujú žiadny priaznivý účinok, ktorý by sa mohol dosiahnuť použitím týchto solí pri výrobe farmaceutických kompozícií.

Podstata vynálezu

Vynález však opisuje kompozíciu obsahujúcu alebo tvorenú soľou, ktorú tvorí kation odvodený od peptidu, obsahujúceho aspoň jednu zásaditú skupinu a anión odvodený od polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou. Táto kompozícia je vo forme roztoku alebo disperzie uvedenej soli v rozpúšťadle, ktoré je rozpúšťadlom pre voľný polyester, ale ktoré nie je rozpúšťadlom pre voľný peptid, pričom častice uvedenej soli v uvedenej disperzii sú menšie ako 5 μm a výhodne menšie ako 0,2 μm , alebo vo forme mikročastíc alebo implantátu pre injekciu, resp. podkožnú implantáciu.

Kationová zložka uvedenej soli sa môže odvodiť od zásaditého peptidu, ktorý je farmakologicky účinný, alebo od zásaditého peptidu, ktorý je farmakologicky neúčinný. V prípade, že zásaditý peptid je farmakologicky účinný, po-

tom sa môže do farmaceutickej kompozície s prolongovaným uvoľňovaním účinnej látky formulovať samotná soľ podľa vynálezu. V prípade, že zásaditý peptid je farmakologicky neúčinný, potom sa môže soľ podľa vynálezu použiť ako pomocná látka pri formulovaní kompozícií s prolongovaným uvoľňovaním účinnej látky, ktoré obsahujú farmakologicky účinné peptidy, ktoré majú buď kyslý charakter (obsahujú prebytok kyslých aminokyselín, akými sú kyselina asparágová a kyselina glutamová) alebo neutrálny charakter.

Ďalšou požiadavkou kladenou na formulácie peptidov s prolongovaným uvoľňovaním účinnej látky je samozrejme to, že peptid by mal byť vo formulácii v podstate stabilný počas predpokladaného času uvoľňovania účinnej látky. Výrazom "v podstate stabilný" sa tu rozumie, že v priebehu predpokladaného času použitia formulácie by nemalo dôjsť k nulovej rozpustnosti alebo denaturácii účinnej látky spojenej s úplnou stratou farmakologickej účinnosti.

Vhodné farmakologicky účinné peptidy majú molekulovú hmotnosť rovnajúcu sa aspoň 300 Da a výhodne rovnajúcu sa aspoň 800 Da. Príklady takýchto peptidov, ktoré môžu byť vo formuláciách s prolongovaným uvoľňovaním účinnej látky v podstate stabilné počas predpokladaného uvoľňovania účinnej látky a ktoré sa môžu použiť v kompozíciách podľa vynálezu, sú oxytocín, vazopresín, adrenokortikotropný hormón (ACTH), epidermálny rastový faktor (EGF), prolaktín, luteinizujúci hormón, hormón stimulujúci folikul, luliberín alebo luteinizujúci hormón uvoľňujúci hormón (LHRH), inzulín, somatostatín, glucagón, interferón, gastrín, tetragastrín, pentagastrín, urogastrón, sekretín, kalcitonín, enkefálny, endorfíny, kytorfín, taftsin, tymopoietín, tymozín, tymostimulín, brzlíkový humorálny faktor, sérový brzlíkový faktor, faktor nádorovej nekrózy, faktory stimulujúce bunkové kolónie, motilín, bombezín, dinorfín, neurotensín, ceruleín, bradykinín, urokináza, kallikreín, analógy a antagonisti látky P, angiotenzín II, nervový rastový faktor, krvný koagulačný faktor VII a IX, lyzozýmchlorid, renín, bradykinín, tyrocidín, gramicidín, rastové hormóny, hormón stimulujúci melanocyty, hormón uvoľňujúci hormón štítnej žľazy, hormón stimulujúci štítnu žľazu, paratyroidný hormón, pankreozymín, cholecystokinín, ľudský placentálny laktogén, ľudský chorionný gonadotropín, peptid stimulujúci syntézu proteínov, gastrický inhibičný peptid, vazodilátantný intestinálny peptid, rastový faktor odvodený z krvných doštičiek, faktor uvoľňujúci rastový hormón, kostný morfogénny proteín a syntetické analógy, modifikácie a farmakologicky účinné fragmenty uvedených látok.

Výhodnými peptidovými zložkami kompozícií podľa vynálezu sú syntetické analógy hormónu LHRH a tieto analógy neobmedzujúcim spôsobom zahŕňajú najmä: buserelín (/D-Ser(Bu)⁶, des-Gly-NH₂¹⁰-LHRH(1-9)NH₂), deslorelin (/D-Trp⁶, des-Gly-NH₂¹⁰-LHRH(1-9)NH₂), fertirelin (/des-Gly-NH₂¹⁰-LHRH(1-9)NH₂), goserelin (/D-Ser(Bu)⁶, Azgly¹⁰-LHRH), histrelín (/D-His(Bzl)⁶, des-Gly-NH₂¹⁰-LHRH(1-9)NH₂), leuporelin (/D-Leu⁶, des-Gly-NH₂¹⁰-LHRH(1-9)NH₂), lutelin (/D-Trp⁶, MeLeu⁷, des-Gly-NH₂¹⁰-LHRH(1-9)NH₂), nafarelin (/D-Nal⁶-LHRH), tryptorelin (/D-Trp⁶-LHRH) a ich farmakologicky účinné soli.

Vhodnými farmakologicky neúčinnými zásaditými peptidmi, ktoré sa môžu použiť v soliach podľa vynálezu, sú polyarginín, polylyzín a poly(arginín-ko-lyzín), kopolyméry neutrálnych aminokyselín vo forme D, L alebo DL s arginínom a/alebo lyzínom vo forme D alebo L, alebo v racemickej forme, alebo peptidy alebo kopolypeptidy, v kto-

rych sú peptidové reťazce celkom alebo čiastočne ukončené zásaditou skupinou na N-konci a v ktorých je základný reťazec tvorený neutrálnymi aminokyselinovými zvyškami.

Polyesterom ukončeným karboxylovou skupinou, ktorý sa používa ako zdroj aniónu soli podľa vynálezu môže byť homopolyester alebo ko-polyester. Takýmito výhodnými polyesterami sú polyestery, ktoré degradujú alebo sa odbúravajú vo vodnom fyziologickom prostredí, akým je prostredie vyskytujúce sa v intramuskulárnom alebo subkutánom tkanive, na vo vode rozpustné fragmenty s nízkou molekulovou hmotnosťou. V tomto prostredí je dominantným degradačným procesom jednoduchá hromadná hydrolýza, zahŕňajúca hydrolytické štiepenie esterových skupín a vedúca k homo-polyesterovým alebo ko-polyesterovým fragmentom s nízkou molekulovou hmotnosťou a nakoniec k vymiznutiu formulácie z miesta aplikácie. Predsa sa len pripúšťa, že v týchto injekčných alebo implantačných miestach, ako i v ostatných miestach v živom tkanive môže dochádzať i k uplatneniu iných degradačných mechanizmov, akými sú napríklad degradačné mechanizmy mediované enzýmami.

Vhodnými homo- a ko-polyesterami sú polyestery odvodené od hydroxy-kyselín alebo z polyokondenzácie diolov a/alebo polyolov, akými sú napríklad (nasledujúce vymenovanie však nemá obmedzujúci charakter) polyetylén-glykoly, polypropylénglykoly, alkylénglykoly s 2 až 10 atómami uhlíka, glycerol, trimetylolpropán a polyoxyetylované formy polyfunkčných alkoholov, akými sú glycerol, trimetylolpropán a cukry, s dikarboxylovými kyselinami a/alebo polykarboxylovými kyselinami, akými sú napríklad (nasledujúce vymenovanie však nemá obmedzujúci charakter) alkándikarboxylové kyseliny, v ktorých alkán obsahuje 1 až 10 atómov uhlíka, najmä kyselina malónová, kyselina jantárová, kyselina glutarová, kyseliny ftalové, kyselina melitová a kyselina pyromelitová, prípadne v prítomnosti hydroxykyseliny alebo hydroxy-kyselín a/alebo monoólov.

Výhodnými spôsobmi prípravy homo- a ko-polyesterov na báze hydroxy-kyselín sú polymerácie mechanizmom otvorenia kruhu cyklických dimérov kyselín alebo priama polykondenzácia alebo kopolykondenzácia hydroxy-kyselín alebo zmesí hydroxykyselín alebo laktónov odvodených od hydroxy-kyselín. Tieto polymerácie, a to tak na báze otvorenia kruhu, ako i polykondenzačného typu, sa výhodne uskutočňujú tak, aby rezultujúce homo- alebo ko-polyestery obsahovali, a to celkom alebo čiastočne, polymérne reťazce majúce funkčné skupiny karboxylových kyselín. Polykondenzácia mechanizmom otvorenia kruhu dimérov kyselín sa takto uskutočňuje v prítomnosti vhodného prenášača polymérneho reťazca alebo koiniciátora, ktorý reguluje tak molekulovú hmotnosť, ako i štruktúru rezultujúceho homo- alebo kopolyesteru. Vhodnými prenášačmi polymérneho reťazca sú voda, kyseliny hydroxykarboxylové, kyseliny monokarboxylové, kyseliny dikarboxylové a kyseliny polykarboxylové.

V prípade polyesterov pripravených polykondenzáciou alebo polykondenzáciou sa polymerácia uskutočňuje za podmienok, keď sa použije prebytok funkčných skupín kyseliny karboxylovej, t. j. keď je pomer $-COOH/$ k $-OH/$ rovnajúci sa alebo väčší ako 1. Štruktúra a molekulová hmotnosť polykondenzátu je daná charakterom použitých alkoholov (či sa použili monoóly, dioly alebo polyóly alebo ich zmesi), charakterom použitých kyselín (či sa použili mono-, di- alebo polykarboxylové kyseliny alebo ich zmesi) a mierou prebytku použitej karboxylovej kyseliny. Obzvlášť vhodné sú kyseliny zahrnuté v Krebsovom cykle.

Príklady vhodných hydroxy-kyselín alebo laktónov, ktoré sa môžu použiť pri príprave homo- alebo kopolyesterov užitočných v rámci vynálezu, zahŕňujú beta-propionolaktón, betabutyrolaktón, gama-butyrolaktón a pivalolaktón a kyselina alfa-hydroxymaslová, alfa-hydroxyizomaslová, alfa hydroxyvalerová, alfa-hydroxyizovalerová, alfa-hydroxykaprónová, alfa-hydroxyizokaprónová, alfa-hydroxy-beta-metylvalerová, alfa-hydroxyheptánová, alfa-hydroxydekánová, alfa-hydroxymyristová a alfa-hydroxystearová. Výhodnými takými homo- a ko-polyesterami sú polyestery odvodené od kyseliny mliečnej vo forme D, L alebo DL, od kyseliny glykolovej alebo zodpovedajúcich laktidových a glykolidových dimerov, pričom výhodným prípadným pre-rušovačom reťazca je kyselina mliečna.

Hoci môže makromolekulárna zásaditá peptidová účinná látka existovať celkom alebo čiastočne ako polymér-katión a polyester môže existovať celkom alebo čiastočne ako polyméranión, je tvorba soli, ku ktorej dochádza interakciou kyselina-zásada medzi takými polymérnymi subjektmi s použitím konvenčných spôsobov miešania alebo s použitím organických rozpúšťadiel, extrémne ťažké alebo dokonca nemožné. Tak napríklad miešanie oboch zložiek vo forme taveniny je nevhodné, pretože je veľmi dobre známe, že peptidy sa netopia normálne a že pri zvýšených teplotách, ktoré sa obvykle používajú na topenie polymérov, majú peptidy tendenciu k degradácii. Ale dokonca v prípade, že sú peptidy v roztopenom stave (čo je len teoretický predpoklad), boli by vzhľadom na nasledujúce termodynamické dôvody nezlúčiteľné s homo- alebo kopolyesterami alebo nerozpustné v homo- alebo polyesteroch.

Peptidy sú tvorené makromolekulami a majú takto mnoho typických vlastností konvenčných polymérov. Sú teda (pri absencii špecifických chemických alebo fyzikálnych interakcií) celkom nezlúčiteľné s ďalšími makromolekulami (alebo sú celkom nerozpustné v ďalších makromolekulách), ktoré majú odlišnú chemickú štruktúru základného polymérneho reťazca, lebo voľná energia miešania dvoch nesúrodých polymérnych typov je vysoko pozitívna a nie je teda termodynamicky priaznivá. V základnom stave sú peptidy tvorené vysoko polárnymi molekulami, ktoré sú značnou mierou viazané vodíkovými mostíkmi, čo má za následok, že entalpia miešania peptidov s homo- alebo kopolyesterami (ktoré sú zase relatívne nepolárne a buď pri nich neexistuje vodíková väzba alebo je slabá) je vysoko pozitívna, tzn. endotermná a termodynamicky nepriaznivá. Okrem toho sú makromolekuly, ako vyplýva z ich podstaty, veľké a tak majú nízku vnútornú entropiu, čo má za následok, že entropia miešania dvoch odlišných makromolekulárných subjektov je veľmi nízka alebo dokonca negatívna (o tom pozri napríklad: P.J.Florey, "Principles of Polymer Chemistry", Cornell University, 1953, 555; L.Bohn, "Polymer Handbook", 2.vyd., J.Wiley 1975, III-211; a L.Bohn, Rubber Chemistry and Technology, 1966, 493).

Vzhľadom na uvedené nedôjde pri miešaní peptidu s polyesterom pri zvýšenej teplote v roztavenom stave k miešaniu na molekulárnej úrovni, ktoré je potrebné na to, aby došlo k tvorbe soli. Pri čistom miešaní peptidu a polyesteru teda nedôjde k vytvoreniu požadovanej soli.

K podobným ťažkostiam dochádza pri pokusoch vytvoriť soľ peptidov a polyesterov s použitím organických rozpúšťadiel, pokiaľ nie je peptid aspoň do určitej miery v uvedenom rozpúšťadle rozpustný a pokiaľ nie je týmto rozpúšťadlom aspoň do určitej miery napuchnutý. Rozpustnosť polyesterov a peptidov je celkom odlišná. Rozpúšťadlá, ktoré rozpúšťajú peptidy, ako napríklad voda, vôbec nerozpúšťajú polyestery a všeobecne platí, že dobré rozpúšťadlá polyesterov, ako napríklad dichlórmetán, vôbec

nerozpúšťajú peptidy. Tie rozpúšťadlá, ktoré rozpúšťajú tak peptidy, ako i polyestery, ako napríklad dimetylsulfoxid, dimetylformamid, dimetylacetamid a N-metylpyrrolidón, majú zase nedostatky iného typu, pretože sú relatívne neprchavé a majú vysoké teploty varu a sú teda extrémne ťažko odstrániteľné, pričom niektoré z týchto rozpúšťadiel majú neprijateľnú toxicitu. Bolo by možné nájsť niektoré rozpúšťadlá oboch uvedených zložiek, ktoré sú prchavejšie a ktoré sú prijateľné i z hľadiska toxicity, ale takéto rozpúšťadlá majú zase iné nedostatky. Tak napríklad kyselina octová je rozpúšťadlom tak peptidov, ako i polyesterov, ale použitie veľkého množstva kyselinového rozpúšťadla predisponuje existenciu vo forme acétátovej soli (v dôsledku javu na báze hmotnostného prebytku), takže odstránenie kyseliny octovej pri teplote okolia (t. j. pri teplote 20 až 25 °C) alebo lyofilizáciou bude mať za následok fázové rozdelenie peptidu a polyesteru, takže reakčná zmes nebude mať tendenciu k tvorbe požadovanej soli.

Cieľom vynálezu je preto poskytnúť spôsob prípravy soli tvorenej kationom zásaditého peptidu a aniónom polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou.

Príprava peptid-polyesterovej soli podľa vynálezu sa môže uskutočniť s použitím homo- alebo kopolyesterov, ktoré obsahujú karboxylové skupiny a peptidy, v ktorých sa zásadité zvyšky vyskytujú ako voľná zásada alebo ako soli slabej kyseliny, výhodne prchavej kyseliny, ktorá má disociačnú konštantu kyseliny menšiu ako 10^{-3} alebo pK_a ($pK_a = -\log_{10}K_a$) kde K_a je disociačná konštanta kyseliny väčšia ako 3. Obzvlášť takouto výhodnou zásaditou peptidovou soľou je soľ s kyselinou octovou. Ale vzhľadom na inherentnú nezlučiteľnosť oboch uvedených makromolekulárnych subjektov sa musia použiť špecifické podmienky, pri ktorých môže dôjsť k tvorbe uvedených peptid-polyesterových soli.

Jedným z prostriedkov, ako to dosiahnuť, je použitie rozpúšťadla, ktoré rozpustí tak peptid, ako i polyester, pri vzniku roztoku, z ktorého sa môže priamo odstrániť rozpúšťadlo, pričom ostane buď po prvú obojaká soľ, alebo po druhé zmes polyesteru a peptidu vo fyzikálnom stave, ktorý predisponuje vytvorenie obojakej soli v prípade, že je uvedená zmes ďalej spracovaná.

Príkladom prvého prístupu je použitie rozpúšťadiel, akými sú (nasledujúce vymenovanie nemá obmedzujúci charakter) dimetylsulfoxid, dimetylformamid, dimetylacetamid a N-metylpyrrolidón, ktoré sú v podstate neutrálne a ktoré môžu byť rozpúšťadlá tak peptidu, ako i polyesteru. Ako už bolo uvedené, sú tieto rozpúšťadlá za normálnych okolností extrémne ťažko odstrániteľné, v dôsledku ich vysokej teploty varu a relatívnej neprchavosti. V prípade, že sa peptid (napríklad acétátová soľ) a polyester rozpustia v jednom z týchto rozpúšťadiel, má peptid tendenciu existovať ako soľ s polyesterom, pretože skupina oveľa silnejšej kyseliny mliečnej alebo kyseliny glykolyvej v polyestere vytlačí slabšiu kyselinu karboxylovú. Podstatné množstvo rozpúšťadla a uvoľnená kyselina octová (alebo iná slabá ale prchavá karboxylová kyselina) sa môže odstrániť vo vákuu, následne sa zvyšný roztok obsahujúci peptid-polyesterovú soľ pridá k destilovanej vode s cieľom vyzrážania nerozpustnej polymérnej soli.

Použitá destilovaná voda je výhodne bez oxidu uhličitého na účely zabránenia tvorby uhličitanových solí vytlačením polyesterového aniónu. Rozpúšťadlo, ktoré ostalo v peptid-polyesterovej soli sa môže potom odstrániť ďalším premytím vodou, ktorá je výhodne tiež bez oxidu uhličitého. V niektorých prípadoch sa môže polymérna soľ izolovať priamym vyzrážaním vo vode bez toho, aby bolo

predtým potrebné odstrániť rozpúšťadlo, pričom tento prístup je vhodný v prípade, keď sa peptid použije ako zásada.

Podľa ďalšieho znaku vynálezu je tu teda poskytnutý spôsob prípravy soli, ktorá obsahuje zásaditý peptid a polyester ukončený karboxylovou skupinou, ktorého podstata spočíva v tom, že sa zásaditý peptid vo forme voľnej zásady alebo vo forme soli so slabou kyselinou a polyester ukončený karboxylovou skupinou rozpustí v neutrálnom polárnom rozpúšťadle, v ktorom sú obidve zložky rozpustné, následne sa odstráni celé rozpúšťadlo alebo jeho podstatná časť a zvyšný koncentrovaný roztok sa pridá k prebytku rozpúšťadla, ktoré nerozpúšťa vytvorenú peptid-polyesterovú soľ.

Tiež druhý prístup je založený na použití rozpúšťadla, ktoré rozpúšťa tak peptid, ako i polyester, a toto rozpúšťadlo musí byť odstrániteľné zmrazením a konvenčnou lyofilizáciou (mrazovou sublimáciou) alebo sušením rozprašovaním. Základným rysom tohto spôsobu je odstránenie rozpúšťadla z peptid-polyesterovej zmesi extrémne rýchlo, t. j. takmer okamžite a výhodne pri teplote, ktorá je nižšia ako teplota prechodu do skleneného stavu polyesteru a peptidu. V tomto prípade môže byť rozpúšťadlo neutrálne alebo kyslé a výhodne je týmto rozpúšťadlom kyselina octová.

Takéto extrémne rýchle odstránenie rozpúšťadla z roztoku, ktorý v určitej miere má viskózný tok alebo má viskoelastické chovanie, má za následok fázovú separáciu obidvoch nezlučiteľných makromolekulárnych typov, ku ktorej dochádza v krajne malom koloidnom meradle. To znamená, že rezultujúca peptid-polyesterová zmes má extrémne vysokú povrchovú plochu a povrchovú energiu. V dôsledku toho sa v prípade, že sa k peptid-polyesterovej zmesi tohto typu v podstate bez rozpúšťadla pridá ďalšie odlišné rozpúšťadlo polyesteru, ktoré normálne nerozpúšťa peptid, spotrebuje uvedená vysoká povrchová energia na tvorbu soli a vymizne koloidný charakter peptidu v polyestere. Vhodné rozpúšťadlá na tento druhý prístup musia byť lyofilizovateľné a zahŕňajú (nasledujúce vymenovanie nemá obmedzujúci charakter) kyselinu octovú, zmesi dioxánu a vody a zmesi terc. butanolu a vody, alebo sa musia odstrániť v priebehu sušenia rozprašovaním.

V rámci ďalšieho znaku vynálezu sa uvádza spôsob prípravy soli, ktorá obsahuje zásaditý peptid a polyester ukončený karboxylovou skupinou, ktorého podstata spočíva v tom, že sa zásaditý peptid vo voľnej forme alebo vo forme soli so slabou kyselinou, napríklad s kyselinou octovou, a polyester ukončený karboxylovou skupinou rozpustí v rozpúšťadle, v ktorom sú obidve uvedené zložky rozpustné a ktoré sú odstrániteľné lyofilizáciou, následne sa získaný roztok veľmi rýchlo zmrazí, zmrazený roztok sa lyofilizuje, získaná zmes sa disperguje v rozpúšťadle polyesterovej zložky, následne sa zmes nechá rozpustiť v okamihu, keď sa vytvorila peptid-polyesterová soľ.

Predovšetkým sa pri tomto spôsobe pridá roztok peptidu a kyseliny polymliečnej alebo kopolyméru kyseliny mliečnej a kyseliny glykolyvej v kyseline octovej po kvapkách ku kvapalnému dusíku. To má za následok v podstate okamžité zmrazenie uvedeného roztoku v kyseline octovej a v podstate okamžitú tvorbu peptid-polyesterovej zmesi v podstate bez rozpúšťadla. Lyofilizácia vykonaná s cieľom odstrániť rozpúšťadlo, ktoré tvorí kyselina octová, poskytne peptid-polyesterový produkt zmiešaný na extrémne jemnej, koloidnej úrovni. Pri mnohých peptidoch sa koloidný charakter takéhoto materiálu demonštruje v prípade, keď sa pridá rozpúšťadlo polyesteru, napríklad dichlórmetán, a keď sa vytvorí extrémne jemná koloidná suspenzia, pričom za predpokladu, že tu existuje prebytok funkčných skupín karboxylovej kyseliny, môže sa po prípadnom státi získať

čírý roztok a prebytočná povrchová energia sa stratí po vytvorení peptid-polyesterovej soli. Namiesto prídania po kvapkách ku kvapalnému dusíku sa môžu viac-menej na okamžité zmrazenie zmesi peptidu, polyesteru a kyseliny octovej použiť aj iné postupy, napríklad prídanie uvedenej zmesi po kvapkách ku zmesi pevného oxidu uhličitého a hexánu.

Hypoteticky je však možné spraviť rozpustnou i celkom nerozpustnú zlúčeninu v prípade, keď sa môže táto zlúčenina previesť na častice s dostatočne malou strednou veľkosťou. Za predpokladu, že častica má guľový tvar s polomerom r , že má hustotu π a povrchovú energiu γ , potom takáto častica bude mať prídruženú povrchovú energiu $4\pi r^2\gamma$. Táto častica bude mať tiež hmotnosť $4/3\pi r^3$ a povrchová energia na jednotku hmoty sa bude tiež rovnáť $3\pi\gamma/\delta r$.

Uvažujme teraz dva prípady nasýtených roztokov:

i) prevažná časť pevného podielu je extrémne hrubá a má preto veľmi malú povrchovú energiu a nasýtený roztok má v tomto prípade koncentráciu C_s . Potom je Gibbsová voľná energia:

$$G^1_{\text{roztok}} = G_o + RT \ln C_s = G^1_{\text{pevna fáza}}$$

ii) prevažná časť pevného podielu je tvorená extrémne malými časticami s polomerom r . Gibbsová voľná energia roztoku, ktorý je v rovnováhe s extrémne malými časticami, je:

$$G^2_{\text{roztok}} = G_o + RT \ln C_s$$

ale pevná fáza má v tomto prípade Gibbsovú voľnú energiu:

$$G^1_{\text{pevna fáza}} + 3\pi\gamma/\delta r$$

$$\text{a } G^2_{\text{roztok}} = G_o + RT \ln C = G^1_{\text{pevna fáza}} + 3\pi\gamma/\delta r$$

$$\text{alebo } G^1_{\text{pevna fáza}} = G_o + RT \ln C - 3\pi\gamma/\delta r$$

Ale z i) vyplýva, že

$$G^1_{\text{pevna fáza}} = G_o + RT \ln C_s$$

a teda

$$G_o + RT \ln C - 3\pi\gamma/\delta r = G_o + RT \ln C_s$$

alebo

$$C = C_s \cdot e^{3\pi\gamma/\delta r}$$

takže, keď sa r zmenšuje, C (hypoteticky) vzrastá.

V obvyklom prípade má rozpustnosť, ktorá sa dosiahne v dôsledku malej veľkosti častíc a ktorá je vyššia ako normálna rozpustnosť, metastabilný charakter a dochádza k rastu veľkosti častíc, napríklad rozpúšťaním a rekryštalizáciou, takže je účinok vysokej povrchovej energie negovaný. Ale pri zmesiach peptid-polyester s malou veľkosťou častíc môže dôjsť k tvorbe soli a táto tvorba poskytuje alternatívny prostriedok na zníženie povrchovej energie koloidných častíc v dôsledku možnosti tvorby rozpustnej obojakej soli, ktorá vo forme roztoku predstavuje stav s najnižšou voľnou energiou.

Podľa ďalšieho znaku vynálezu je tu možné poskytnúť spôsob prípravy soli, ktorá obsahuje zásaditý peptid a polyester ukončený karboxylovou skupinou, ktorého podstata spočíva v tom, že sa uvedie do reakcie zásaditý peptid vo forme soli so silnou kyselinou, akou je chlorid alebo sulfát, s polyesterom, ktorý je čiastočne alebo celkom vo forme

soli karboxylovej kyseliny s vhodným alkalickým kovom alebo kovom alkalických zemín, akou je napríklad sodná, draselná, vápenatá alebo horečnatá soľ karboxylovej kyseliny (ktorá má hmotnostnú strednú hmotnosť menšiu ako asi 10 000), pričom soli s alkáliami sa môžu rozpustiť alebo veľmi jemne dispergovať vo vode. Prídanie takéhoto roztoku alebo disperzie k vodnému roztoku (výhodne bez oxidu uhličitého) peptidu má za následok vyžrážanie nerozpustnej obojakej peptid-polyesterovej soli vo vode.

Obdobne sú alebo môžu byť chloridové alebo sulfátové soli pegylovaných zásaditých peptidov (polyoxyetylénové konjugáty peptidov) čiastočne zlúčiteľné s rozpúšťadlami (alebo rozpustné v rozpúšťadlách), akým je napríklad dichlórmetán, pričom sodná alebo draselná soľ polyesterov ukončených karboxylovou skupinou môže byť tiež rozpustná v dichlórmetáne. V prípade, že sa teda dve takéto soli zmiešajú vo vhodných množstvách, vytvorí sa rozpustná peptid-polyesterová soľ za súčasného vyžrážania chloridu alebo síranu alkalického kovu.

Diskutovaná termodynamická nezlučiteľnosť rôznych makromolekúl je už známa veľa rokov, ale sa zriedka brala do úvahy v súvislosti s prolongovaným uvoľňovaním peptidových účinných látok s polyesterovej matrice. Nevyhnutným dôsledkom tejto termodynamickej nezlučiteľnosti alebo nerozpustnosti je to, že za normálnych okolností polyester celkom neprepúšťajú peptidové účinné látky. Aby mohlo dôjsť k partitnej dependentnej Fickianovej difúzii peptidovej účinnej látky do polyesteru, musí sa peptid do určitej miery rozpustiť v polyester. Ale vzhľadom na uvedené, táto rozpustnosť neexistuje a tak je transport peptidu cez polyester uvedenou Fickianovou difúziou nemožný.

Okrem toho i v prípade, keď je peptidová účinná látka alebo niektorý z jej syntetických analógov do určitej miery rozpustná v polyester alebo do určitej miery zlučiteľná s polyesterom, čo je teoretická argumentácia, ani potom by nebol možný transport cez polyesterovú fázu difúziou. Je už dlho známe, že voľný objem v polyester, ktorý existuje v dôsledku rotačnej a translačnej mobility polyesterových segmentov a ktorý by mal umožniť prechod difundujúcich molekúl, je nedostatočne veľký na to, aby umožnil difúziu makromolekúl s molekulovou hmotnosťou vyššou ako asi 500 Da (o tom pozri napríklad: R.W.Baker a H.K.Lonsdale, "Controlled Release: Mechanisms and Rates" in "Controlled Release of Biologically Active Agents, nakl. A.C.Tanquary a R.E.Lacey, Plenum Press, 1974, 15 et seq.).

Ale i keď je transport peptidovej účinnej látky cez polyester Fickianovou difúziou v podstate nemožný pre peptidy s molekulovou hmotnosťou vyššou ako asi 500 Da, predsa sa dosiahlo kontinuálne uvoľňovanie polypeptidov. V európskom patente 58,481 je uvedené, že sa dá kontinuálne uvoľňovanie peptidov účinnej látky z polyesteru dosiahnuť s použitím veľmi odlišných vlastností oboch makromolekúl, pričom peptidy sú hydrofilné a vo vode rozpustné a polyester sú hydrofóbne a vo vode nerozpustné.

Pri formuláciách opísaných v uvedenom patente sa uvoľňovanie peptidovej účinnej látky dosahuje predovšetkým cez vodné póry, ktoré sa prvotne vytvoria čistým vylúhovaním peptidu z domén pri povrchu formulácie alebo z domén peptidovej účinnej látky, ktoré sú súvislé alebo prifaľé k povrchu formulácie. Toto vylúhovanie umožňuje počiatočnú fázu uvoľňovania peptidovej účinnej látky, potom nasleduje komplexná hydrolytická degradácia polyesteru, ktorá má za následok vytvorenie ďalších pórov v polyester, cez ktoré dochádza k ďalšiemu uvoľňovaniu peptidu regulovanému degradáciou a eróziou polyesteru. V prípade, že uvedené vytvorenie následných pórov hydrolytickou degradáciou polyesteru neprebíha dostatočne rýchlo

le, je prvotné uvoľňovanie mechanizmom lúhovania ukončené skôr, ako dôjde k vytvoreniu dostatočného množstva pórov degradáciou polyesteru, čo má za následok diskontinuálne uvoľňovanie peptidu. Parametre formulácií opísaných v patente EP 58,481 sú preto zvolené tak, aby k hydrolytickej degradácii polyesteru prišlo v správny čas v relácii s prvotnou fázou uvoľňovania lúhovaním, čím sa zaistí, že obe fázy uvoľňovania sa prekrývajú a to má zase za následok, že dochádza ku kontinuálnemu uvoľňovaniu peptidovej účinnej látky.

Ale zatiaľ čo Fickianov difúzny transport peptidu cez polyesterovú fázu je nemožný v prípade uvedených jednoduchých peptid-polyesterových zmesí, dochádza k celkom odlišnej situácii v prípade formulácií peptid-polyesterových solí podľa vynálezu, prípadne v prítomnosti voľného polyméru. Vo formuláciách, ktoré obsahujú tieto látky, neexistuje žiadna separátne fáza tvorená samotným polyesterom. Kontinuálna fáza, ktorá reguluje uvoľňovanie peptidu, je tu celkom alebo čiastočne tvorená peptid-polyesterovou soľou. Voľný peptid je v tejto fáze peptid-polyesterovej soli do určitej miery rozpustný a tak je v týchto formuláciách možná pravá Fickianová difúzia peptidu v prípade, že sú splnené ostatné potrebné predpoklady, medzi ktoré patrí napríklad dostatočne účinný voľný objem.

Vzhľadom na to, že peptid-polyesterová soľ obsahuje vysoko hydrofilný segment, má formulácia peptid-polyesterovej soli oveľa vyššiu absorpciu vody ako samotný polyester. Okrem toho je absorpcia vody pri týchto formuláciách ešte zvýšená v dôsledku iónového charakteru peptid-polyesterovej interakcie a solvatacie iónov alebo iónových párov v makromolekulárnej soli vodou. To v podstate znamená hydrogélový charakter peptid-polyesterovej soli a zaisťuje zvýšenie stupňa mobility makromolekulárnych segmentov v komplexe polykation-polyanion. To ďalej znamená, že sa zväčší účinný voľný objem matricového materiálu, ktorý môže takto vyhovovať prechodu makromolekulárneho peptidu.

Výsledným účinkom týchto vlastností peptid-polyesterovej soli (prípadne v prítomnosti voľného polyméru) je to, že je takto umožnený Fickianov difúzny transport makromolekulárneho peptidu cez maticu peptid-polyesterovej soli alebo cez maticu tvorenú zmesou uvedenej soli a voľnej polymérnej fázy. To je celkom odlišná situácia, než k akej dochádza v prípade samotného polyesteru alebo v prípade jednoduchých zmesí peptidov a polyesterov a matrice alebo membrány s prolongovaným uvoľňovaním účinnej látky založenej na zvýšenej permeabilite spôsobenej použitím peptid-polyesterovej soli a tvorí základ formulácií s prolongovane regulovaným uvoľňovaním peptidov, ktoré sú ďalej opísané v tejto patentovej prihláške.

Peptid-polyesterové soli podľa vynálezu takto poskytujú nové a neočakávané výhody v oblasti parenterálnych systémov uvoľňujúcich účinnú látku na báze roztokov alebo disperzií používajúcich rôzne zmesi voľných peptidových účinných látok, voľných polyesterov a peptid-polyesterové soli a to tak vo vodných, ako i nevodných farmaceuticky prijateľných injekčných nosičoch, založených na podkožných implantátoch, ktoré sa môžu injikovať intramuskulárne alebo subkutánne, alebo implantované a to vzhľadom na novú a neočakávanú rozpustnosť týchto peptid-obsahujúcich zvyškov v lipofilných rozpúšťadlách. Okrem toho môže byť formulácia založená na týchto peptid-polyesterových soliach, najmä formulácie využívajúce vysoko lipofilné polyester, tiež podané i inou cestou. Obzvlášť dôležité je perorálne podanie, pri ktorom sa môžu s cieľom dosiahnuť dobrý výsledok použiť rôzne kombinácie peptid-polyesterovej soli a/alebo voľné peptidové účinne

látky a/alebo voľného polyesteru. V mnohých prípadoch je pri perorálnom podaní výhodné použiť farmaceuticky prijateľný nosič, akým je rastlinný olej alebo jeho obmena, vrátame mono-, di- a triglyceridov buď samotných, alebo v zmesi s ostatnými olejmi.

Okrem európskeho patentu 58 481 sú uvedené publikácie autorov Lawter a kol. a Okada a kol. jediným známym stavom techniky, ktorý je autorom tejto patentovej prihlášky známy a ktorý sa týka možnosti získať peptid-polyesterové soli, ale obe uvedené publikácie majú špekulatívny charakter a neuvádzajú, akým spôsobom by sa táto predpokladaná interakcia mohla realizovať alebo použiť. Ďalším cieľom vynálezu je poskytnúť farmaceutické formulácie s prolongovaným uvoľňovaním účinnej látky, ktorá obsahuje rôzne kombinácie peptid-polyesterovej soli a/alebo voľnej peptidovej účinnej látky a/alebo voľného polyesteru v rôznych množstvách na účely získania aspoň troch rôznych profilov regulovaného uvoľňovania účinnej látky.

V rámci ďalšieho znaku vynálezu je tu teda poskytnutá farmaceutická kompozícia, ktorá obsahuje peptid-polyesterovú soľ uvedeného typu a/alebo voľnú peptidovú účinnú látku a/alebo voľný polyester a prípadne ďalšiu farmaceutickú pomocnú látku alebo ďalšie farmaceutické pomocné látky.

Koncepcia farmaceutických kompozícií podľa vynálezu je založená na nasledujúcich aspektoch. Zatiaľ čo samotná peptidová účinná látka je normálne rozpustná vo vode, sú tak jej soľ s polyesterom, ako i voľný polyester samotný normálne naprosto nerozpustné vo vode (i keď je známe, že veľmi nízke oligomerné formy polyesterov a kopolyesterov, akokoľvek môžu byť samé vo vode nerozpustné, môžu byť vo vode rozpustné, ak sú vo forme peptid-polyesterovej soli). Ale inkubácia zmesi peptidovej účinnej látky a polyesteru, v ktorej je celý peptid alebo jeho časť prítomná, resp. prítomná ako peptid-polyesterová soľ, vo vodných fyziologických tekutinách má za následok určitú degradáciu polyesteru. Ak sú vytvorené degradačné produkty vo vode nerozpustné, potom i degrajuca peptid-polyesterová soľ zostane i naďalej nerozpustná. Na druhej strane, ak má polyester prvotnú dostatočne nízku molekulovú hmotnosť alebo ak obsahuje polymérnu zložku s rovnakou alebo obdobne nízkou molekulovou hmotnosťou, takže vznikajú vo vode rozpustné od polyesteru odvodené kyslé fragmenty, potom sú tieto fragmenty (ako anióny) spoločne transportovateľné s polypeptidovým kationom. Pre kompozície podľa vynálezu s novou peptid-polyesterovou soľou sa preukázalo, že okamžitosť uvoľňovania účinnej látky je silno závislá od molekulovej hmotnosti a distribúcie molekulových hmotností uvedenej polyesterovej zložky.

Distribúcia molekulových hmotností je definovaná ako

$$\frac{M_w}{M_n}$$

pričom

$$M_w \text{ (hmotnostná stredná molekulová hmotnosť) } = \frac{\sum W_i \cdot M_i}{\sum n_i \cdot M_i^2}$$

a

$$M_n \text{ (číselná stredná molekulová hmotnosť) } = \frac{\sum n_i \cdot M_i}{n_i}$$

kde

w_i znamená hmotnostnú frakciu polymérnych molekúl majúcich molekulovú hmotnosť M_i a

n_i znamená počet polymérnych molekúl majúcich molekulovú hmotnosť M_i .

Distribúcia molekulových hmotností býva mnohokrát označovaná ako polydisperzita a sú veľmi dobre známe hodnoty pre úzku, normálnu alebo najpravdepodobnejšiu a širokú distribúciu (pozri napríklad "polymér Handbook", 2. vyd., J.Wiley 1975, IV-3).

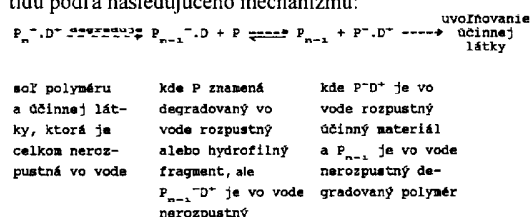
Všeobecne je prijatý názor, že polydisperzita menšia ako 1,8 zodpovedá úzkej distribúcii alebo nízkej polydisperzite, polydisperzita v rozmedzí od 1,8 do 2,2 zodpovedá normálnej alebo najpravdepodobnejšej distribúcii alebo normálnej polydisperzite a polydisperzita vyššia ako približne 2,2 zodpovedá širokej distribúcii alebo vysokej polydisperzite.

Na podanie peptidových účinných látok parenterálnou cestou, akou je intramuskulárna alebo subkutánna injekcia alebo podkožná implantácia depónneho alebo uvoľňovacieho systému, sú výhodné polyesterové majúce číselnú strednú molekulovú hmotnosť vyššiu ako 2000 Da alebo vnútornú viskozitu 1 % (hmotn./obj.) roztoku v chloroforme pri teplote 25 °C vyššiu alebo rovnajúcu sa 0,08 dl/g, ktorá je až 4,0 dl/g (vrátane). Na iné spôsoby podania, napríklad na perorálne podania, sú výhodné číselne stredné molekulové hmotnosti v rozmedzí od 500 do 5000 Da.

Z uvedenej úvahy, ktorá bola celkom ignorovaná v rámci doterajšieho stavu techniky, je zrejme, že degradácia polyesterov, najmä v prítomnosti zásaditého peptidu, na účely získania dokonca i malej frakcie vo vode rozpustných odvodených fragmentov, ako i časový interval pre jej priebeh budú regulované molekulovou hmotnosťou a distribúciou molekulových hmotností. K v podstate bezprostrednej degradácii na vo vode rozpustné fragmenty dochádza s použitím úzkej a normálnej distribúcie polyesterov, majúcich hmotnostné stredné molekulové hmotnosti nižšie ako asi 10 000 Da, resp. nižšie ako asi 15 000 Da (v závislosti od typu distribúcie molekulových hmotností), pričom všeobecne platí, že čím je nižšia polydisperzita polyesteru, tým nižšia sa požaduje hmotnostná stredná molekulová hmotnosť na účely dosiahnutia bezprostrednej degradácie na vo vode rozpustné fragmenty. V prípade polyesterov s hmotnostnou strednou molekulovou hmotnosťou vyššou ako 15 000 Da sa vyžaduje normálna alebo široká distribúcia.

I keď to opäť závisí od povahy a typu distribúcie molekulových hmotností, všeobecne platí, že čím vyššia je hmotnostná stredná molekulová hmotnosť, tým vyššia musí byť polydisperzita, aby sa dosiahla rýchla degradácia na vo vode rozpustné fragmenty.

Pre kompozície obsahujúce polyester alebo kopolyester a peptid, v ktorých je časť peptidu alebo celý peptid obsiahnutý vo forme peptid-polyesterovej soli a ktoré prípadne obsahujú voľný polyester, môžu sa získať tri rôzne profily uvoľňovania účinnej látky. Prvý z týchto profilov sa získa v prípade, keď dôjde k degradácii polyesteru na účely dosiahnutia v podstate bezprostrednej tvorby kyslých vo vode rozpustných alebo hydrofilných fragmentov, v dôsledku čoho dochádza k bezprostrednému uvoľňovaniu peptidu podľa nasledujúceho mechanizmu:



(P = vo vode rozpustný degradovaný polyesterový fragment alebo vo vode nerozpustný degradovaný polyesterový fragment, ktorý sa stane vo vode rozpustným v prípade, že je prítomný vo forme soli so zásaditým peptidom, a D = zásaditý peptid).

V tomto prvom prípade kompozícia buď môže obsahovať celú účinnú látku vo forme peptid-polyesterovej soli alebo môže obsahovať podľa určitého podielu peptid-polyesterovej soli i určitý podiel voľnej, neviazanej účinnej látky, pričom v oboch prípadoch môže byť v kompozícii prípadne prítomný tiež voľný polymér. Ak polymér degraduje na vo vode rozpustné fragmenty v prítomnosti peptidu temer bezprostredne, čo má za následok, že začne temer bezprostredne, pravidelné a plynulé uvoľňovanie peptidu. Je treba poznamenať, že difúzia voľného vo vode rozpustného peptidu cez degradujúcu kompozíciu je uľahčená zvýšenou permeabilitou matrice v dôsledku prítomnosti peptid-polyesterovej soli v kontinuálnej fáze, čo moduluje uvoľňovanie účinnej látky.

K druhému z uvedených uvoľňovacích profilov dochádza v prípade, že peptidová účinná látka je prítomná ako peptid-polyesterová soľ (prípadne v prítomnosti voľného polyesteru), ale polyester nedegraduje bezprostredne na vo vode rozpustné fragmenty. To má za následok určitý počiatočný interval, v priebehu ktorého nedochádza k žiadnemu uvoľňovaniu peptidovej účinnej látky. I keď peptid-polyesterová soľ zvyšuje permeabilitu matrice pre difúziu voľného peptidu, k difúzii nedochádza, lebo tu nie je k dispozícii žiadny voľný peptid, ktorý by mohol takto difundovať cez matricu. Celý peptid je tu vo forme vo vode nerozpustnej peptid-polyesterovej soli a až po určitej významne dlhšej časovej perióde dochádza k degradácii polyesteru na vo vode rozpustné fragmenty a k poskytnutiu voľnej a transportovateľnej účinnej látky. To má za následok prolongovanú indukčnú periódu, v priebehu ktorej spočiatku nedochádza k žiadnemu uvoľňovaniu peptidu, a k uvoľňovaniu účinnej látky dochádza až po uplynutí tejto indukčnej periódy. Tento druhý prípad je ideálny pre časované a pulzné uvoľňovanie rozpustných vakcín a peptidov.

K tretiemu profilu uvoľňovania účinnej látky dochádza v prípade, keď sa formulácia založená na systéme peptid-polyesterovej soli, ktorý obsahuje peptidovú účinnú látku tak vo voľnej forme, ako i vo forme peptid-polyesterovej soli a prípadne voľný polyester, a v ktorom má polyester hmotnostnú strednú molekulovú hmotnosť vyššiu ako asi 15 000 Da (a výhodne vyššiu ako asi 30 000 Da) a úzku alebo najpravdepodobnejšiu distribúciu molekulových hmotností, zavedie do fyziologického prostredia, aké sa dá nájsť v intramuskulárnych a subkutánnych injekčných miestach, v dôsledku čoho môže dôjsť k diskontinuálnemu uvoľňovaniu účinnej látky. V prvej fáze dôjde k uvoľňovaniu v dôsledku prítomnosti voľnej peptidovej účinnej látky a jej transportovateľnosti cez permeabilnejší systém na báze peptid-polyesterovej soli. Ak sa táto prvá fáza uvoľňovania voľnej peptidovej účinnej látky ukončí ešte skôr, ako v peptid-polyesterovej soli dôjde k degradácii polyesteru a takto sa získa ďalší podiel voľnej peptidovej účinnej látky, potom bude mať uvoľňovanie účinnej peptidovej látky diskontinuálny charakter.

Je samozrejme, že ak tu nebude existovať žiadny interval, v ktorom by bola voľná peptidová účinná látka v kompozícii v priebehu jej degradácie neprítomná, potom sa dosiahne kontinuálne uvoľňovanie účinnej látky. Tento profil uvoľňovania je podobný profilu, ktorý je opísaný v európskom patente 58,481, ale mechanizmus uvoľňovania účinnej látky a látky použitej v európskom patente 58,481 (tu nie je použitá peptid-polyesterová soľ) sú celkom odlišné

od mechanizmu a látok definovaných v tejto patentovej prihláške. V závislosti od profilu uvoľňovania sú tieto zmesi ideálne pre kontinuálne uvoľňovanie peptidov, proteínov a rozpustných vakcín.

Ako už bolo uvedené, sú tieto systémy na báze peptid-polyesterovej soli, ich fyzikálno-chemické charakteristiky a mechanizmus, akým pri nich dochádza k uvoľňovaniu peptidu celkom odlišné od systémov opísaných v európskom patente 58,481 a v európskom patente 52,510, ako i v ďalších publikáciách vzťahujúcich sa k uvoľňovaniu peptidu z homo- a kopolymérov kyseliny mliečnej a kyseliny glykolyvej. Zo všetkých týchto publikácií sú len v európskom patente 58,481 a v uvedených publikáciách autorov Lawtera a kol. a Okada a kol. zmienky o tvorbe solí rezultujúcich z iónovej interakcie skupín polyesterkarboxylových kyselín a zásaditých aminokyselín v peptidoch, ale tu opísané kompozície neobsahujú soľ tvorenú peptidovou účinnou látkou a polyesterom. Tieto publikácie doterajšieho stavu techniky však majú špekulatívny obsah, lebo jednoznačne netvrdia, že k uvedenej interakcii môže skutočne dôjsť, ani nedemonštrujú, ako sa takéto peptid-polyesterové soli môžu pripraviť a izolovať a potom použiť na účel uvoľňovania peptidov na základe ich neočakávateľnej rozpustnosti v lipofilných organických rozpúšťadlách.

Z vlastností peptid-polyesterových zmesí, ktoré predurčujú uvoľňovanie účinnej látky a ktoré až doteraz neboli nikdy uvedené, sa dá vymenovať počet zásaditých funkčných skupín v peptide a počet karboxylových skupín v polyesteru. Uvedené publikácie tiež mlčia, pokiaľ ide o pozoruhodné a neočakávateľné účinky vyplývajúce z použitia peptid-polyesterových solí a prekvapivo vysokú permeabilitu systému obsahujúceho celkom alebo čiastočne peptid-polyesterovú soľ v porovnaní s permeabilitou samotného polyesteru alebo zmesi, v ktorých sú obe zložky len zmiešané a ktoré teda neobsahujú žiadnu peptid-polyesterovú soľ.

Tento rozdiel permeabilit sa môže demonštrovať jednoduchým experimentom v difúznej komôrke, v ktorej kontinuálna a polyesterová membrána bez defektov, deliaca komôrku na dve oddelenia, z ktorých jedno obsahuje vodný roztok peptidu a druhé obsahuje samotnú vodnú fázu, neumožňuje transport peptidu cez túto membránu skôr, ako dôjde k výraznej degradácii polyesteru tvoriaceho membránu. Na rozdiel od toho umožňuje membrána obsahujúca celkom alebo čiastočne peptid-polyesterovú soľ transport peptidovej účinnej látky cez soľ-obsahujúcu membránu partitne dependentnou difúzou a to dokonca i v prípade, keď peptid má molekulovú hmotnosť vyššiu ako 500 Da.

Peptid-polyesterové soli podľa vynálezu majú mnoho ďalších prekvapujúcich a užitočných výhodných vlastností, ktoré boli neznáme pri všetkých obdobných doteraz známych materiáloch, ktoré sú obzvlášť užitočné pri koncepcii a pri výrobe farmaceutických systémov uvoľňujúcich účinnú látku. Jednou z najvyužívateľnejších z týchto vlastností je dobrá rozpustnosť peptidu v prípade, že sa nachádza vo forme polyesterovej soli, v organických rozpúšťadlách, v ktorých sú peptidy normálne naprosto nerozpustné. V oblasti farmaceutického priemyslu táto skutočnosť poskytuje mnoho výhod a umožňuje použitie nových spôsobov a postupov pri výrobe farmaceutických systémov umožňujúcich prolongované uvoľňovanie farmakologicky účinných látok. Uľahčená je takto najmä asepticky príprava uvedených farmaceutických kompozícií.

Roztoky peptid-polyesterovej soli, ktorá prípadne obsahuje voľný polymér a/alebo voľný peptid v rozpustenej alebo dispergovanej forme, sa môžu takto podrobiť sterilizujúcej filtrácii, čím sú eliminované problémy normálne

spojené so sterilnou prípravou pevných alebo suspenzných peptidových formulácií. Roztok peptid-polyesterovej soli podrobený sterilizujúcej filtrácii môže byť preto vystavený rôznym farmaceutickým sušiacim postupom v aseptickom prostredí. Výhodnými postupmi, ktoré sa môžu ľahko uskutočňovať za aseptických podmienok, sú sušenie rozprašovaním, vymrazovacie rozprašovanie a ostatné sušiace techniky, ktoré poskytujú pevné častice.

Obzvlášť užitočná je tvorba mikročastic, ktorých veľkosti sú v rozmedzí od 0,2 do 500 μm a ktoré sa môžu suspendovať vo farmaceuticky prijateľnom injekčnom nosiči. Takéto mikročastice sa môžu suspendovať bezprostredne pred aplikáciou vo vodnom injekčnom prostredí, alebo sa môžu alternatívne suspendovať v organickom injekčnom nosiči, ktorý nerozpúšťa použité látky. Pre systémy s prolongovaným uvoľňovaním účinných látok založené na homo- alebo kopolyméroch kyseliny mliečnej a kyseliny glykolyvej sú vhodnými organickými nosičmi vysoko lipofilné oleje, akými sú (nasledujúce vymenovanie nemá obmedzujúci charakter) etyloleát, izopropylmyristát, rastlinné oleje a rôzne mastné glyceridy. Za určitých okolností je výhodné použiť zmesi uvedených lipofilných nosičov.

Akokoľvek sú takéto lipofilné nosiče látkami, ktoré nerozpúšťajú uvedené systémy na báze kyseliny mliečnej a kyseliny glykolyvej, sú tieto nosiče nevhodné na použitie v spojení s vysoko lipofilnými polyesterami, akými sú polyester na báze hydroxy-kyselín s dlhým reťazcom, napríklad na báze kyseliny hydroxystearovej. Pre takéto vysoko lipofilné polyesteru lebo kopolyesteru sú výhodné hydrofilné organické injekčné nosiče, akými sú (nasledujúce vymenovanie nemá obmedzujúci charakter) propylénglykol a polyetylénglykol s nízkou molekulovou hmotnosťou. Pre systémy s prolongovaným uvoľňovaním účinnej látky na báze lipofilnejších polymérov sú zrejme vhodné i vodné injekčné nosiče.

Alternatívny spôsob prípravy mikročastic využíva ďalšiu neočakávanú a výhodnú vlastnosť peptid-polyesterovej soli podľa vynálezu. Táto peptid-polyesterová soľ je tvorená hydrofilným peptidom, ktorý by termodynamicky preferoval existenciu alebo rozpustenie vo vodnom alebo polárnom prostredí alebo vo vodnej alebo polárnej fáze, a polyesterovým reťazcom, ktorý je hydrofóbny a ktorý by termodynamicky preferoval rozpustenie v hydrofóbnej fáze. To znamená, že peptid-polyesterová soľ má obojaký charakter a povrchovo aktívne vlastnosti, ktoré nie sú k dispozícii pri samotných peptidových soliach. Táto povrchová aktivita má za následok, že peptid-polyesterová soľ preferuje existenciu na fázovom rozmedzí, pričom vzhľadom na všeobecný charakter soli (podiel a dĺžka hydrofóbneho reťazca), je pre peptid-polyesterovú soľ termodynamicky najstabilnejším typom disperzie vo výraznej vodnej fáze existencie vo forme disperzie vo vode (pretože kritická micelárna koncentrácia je veľmi nízka a nie všetka soľ môže existovať pri mnohých situáciách na fázovom rozmedzí).

Dá sa teda uviesť, že peptid-polyesterová soľ je extrémne účinným dispergačným činidlom na prípravu a udržiavanie stability vodných disperzií. Pri tomto druhom spôsobe prípravy mikroparticulárnych farmaceutických formulácií sa peptid-polyesterový roztok (napríklad v dichlórmetáne) jednoducho disperguje vo vodnej fáze, ktorá môže prípadne obsahovať polymér zvyšujúci viskozitu, akým je (uvedený príklad nemá obmedzujúci charakter) polyvinylalkohol, pričom sa využívajú povrchovo aktívne vlastnosti peptid-polyesterovej soli. I keď niektoré organické roztoky obsahujúce takéto peptid-polyesterové soli dispergujú spontánne, všeobecne platí, že je pri príprave vod-

nej disperzie potrebné použiť určitý typ miešania alebo mechanizmus vyvolávajúci strihovú namáhanie.

Ako už bolo uvedené, ďalším výhodným znakom tohto spôsobu je, že sa operácia, ako uvedené dispergovanie vo vode, účinne uskutočňujú v neprítomnosti oxidu uhličitého a v inertnej atmosfére. Ďalej je výhodné, ak je organický roztok peptid-polyesterovej soli bez oxidu uhličitého, lebo koncentrácia oxidu uhličitého vo vzduchu a vo vode za normálnych podmienok je v porovnaní s koncentráciou karboxylových skupín kyseliny polyesterkarboxylovej natoľko vysoká, že by oxid uhličitý mohol takto vzhľadom na uvedený prebytok reagovať v rámci konkurenčnej tvorby soli podľa rovnice:



kde P znamená polyester a D znamená peptidovú účinnú látku. Získané vodné disperzie sa môžu potom vysušiť rôznymi postupmi, napríklad odstránením organického rozpúšťadla vo vákuu a následnou lyofilizáciou alebo priamym odstránením rozpúšťadla i vody v jednom lyofilizačnom kroku. Získaný produkt sa môže potom použiť uvedeným spôsobom na prípravu farmaceutického prípravku pre injekcie.

Ďalší alternatívny spôsob prípravy mikroparticulárnych farmaceutických formulácií používa v podstate suchý roztok peptid-polyesterovej soli, obsahujúci koloidne dispergovaný voľný peptid vo vhodnom organickom rozpúšťadle alebo nosiči (výraz "v podstate suchý" sa tu používa preto, že je z princípu nemožné odstrániť všetky stopy vody z peptidu a ďalej tento výraz znamená, že žiadna z účinných látok neexistuje ako vodný roztok v separátnej vodnej fáze). Finálna forma sa získa po pridaní rozpúšťadla nerozpúšťajúceho polymér za intenzívneho miešania, následnom pridaní peptid-polyesterovej soli napučanej rozpúšťadlom (ktorá prípadne obsahuje voľný polymér a ktorá prípadne obsahuje voľnú účinnú látku) k veľkému objemu druhého ne-rozpúšťadla na účely ďalšieho vytvrdnutia a stabilizovania vyzrážaných mikročastíc. Je zrejme, že za vhodných podmienok alebo v prítomnosti vhodných povrchovo aktívnych činidiel, akými sú (nasledujúce vymenovanie nemá obmedzujúci charakter) estery mastných kyselín a sorbitolu, sa môže vyzrážanie mikročastíc uskutočniť s použitím jediného nerozpúšťadla polyesteru, akým je napr. parafínický uhľovodík, akým je hexán.

Mikročastice získané rôznymi opísanými postupmi sú štruktúrne celkom odlišné od mikrokapsúl pripravených spôsobmi opísanými v európskych patentoch 52,510 (Syntex) 145,240 (Takeda), pri ktorých sú peptidy zapuzdrené do fázy samotného polyesteru. Mikrokapsuly sú definované ako jedno alebo niekoľko jadier zlúčeniny alebo látky v kontinuálnej druhej fáze, takže kontinuálny povlak z materiálu druhej fázy celkom uzatvára alebo mikrozapuzdruje materiál jadier, takže žiadny z materiálov jadier sa nenachádza na povrchu mikrokapsúl, pričom si mikrozapuzdrený materiál jadier zachováva vo všetkých ohľadoch fyzikálno-chemické a termodynamické vlastnosti zlúčeniny alebo materiálu nezapuzdrenej, resp. nezapuzdreného v kontinuálnej fáze.

V európskom patente 52,510 sa na ovrstvenie kvapôčok zriedeného vodného roztoku peptidu používa fázovo-separačný koacervačný postup, pričom samotný polymér tvorí okolo vodných kvapiek kontinuálny povlak. To znamená, že ide o pravé mikrokapsuly, ktoré majú geometriu a tvar mikrogulôčok. Po izolácii vyzrážaných mikrokapsúl a ich vytvrdnutí a vysušení sa získa produkt, v ktorom peptidová účinná látka existuje vo forme diskretného jadra alebo

diskretných jadier vnútri polymérneho obalu. Vzhľadom na obsah vody vnútri mikrokapsuly napriek sušeniu, môže mať odstránenie vody v priebehu dehydratačného procesu pri teplote nižšej, ako je teplota prechodu do skleneného stavu polyméru, za následok vytvorenie častice, ktorá je značne perforovaná. V žiadnom stupni nezahŕňajú spôsob a materiály použité a opísané v európskom patente 52,510 peptid-polyesterovú soľ a v uvedenom patente opísaný spôsob neumožňuje sterilizujúcu filtráciu peptid-polyesterového roztoku alebo peptid-polyesterovej suspenzie v prípade, keď je potrebné získať aseptický produkt.

Okrem toho opisuje uvedený patentový dokument špecifické použitie polyesterov založených na kyseline mliečnej a/alebo glykolovej, opísaných v patente US 3,773,919 (Boswell), ktoré sú v tomto patentovom dokumente opísané ako produkty rozpustné v benzéne pri teplote 25 °C. V rámci vynálezu sú uvádzané ako výhodné polyestery odvodené od kyseliny mliečnej a/alebo kyseliny glykolovej, ktoré sú nerozpustné v benzéne, ale rozpustné v chloroforme, a to vzhľadom na relatívne krátke uvoľňovacie periody, t. j. periody kratšie ako dva mesiace.

V európskom patente 190,833 (Takeda) je opísaný peptid fixovaný vo forme zgelovateného vodného roztoku účinnej látky, pričom táto vodná zgelovatená fáza sa disperguje v polymérnom roztoku. Táto disperzia typu voda (vodný gél účinnej látky) -v-oleji (polymérny roztok) sa potom zase disperguje pri aplikácii strihového napätia vo vode za vzniku dvojnásobnej disperzie typu voda-v-oleji-vo-vode. Po odstránení organického rozpúšťadla vo vákuu a lyofilizáciou sa získajú mikrokapsuly, v ktorých je systém účinná látka/želatizačné činidlo zapuzdrený samotným polymérom. Produkty tohto spôsobu obsahujú účinnú látku vo forme jednoduchej soli a nie vo forme polymérnej soli peptidu. Farmaceutické formulácie podľa vynálezu majú teda štruktúru, fyzikálno-chemické vlastnosti a termodynamické vlastnosti, ktoré sú celkom odlišné od parametrov produktov opísaných v európskych patentových spisoch 52,510, 145,240 a 190,833, v ktorých sú uvádzané mikrokapsuly tvarom a geometriou mikrogulôčok, v ktorých sú jadro alebo jadrá tvorené účinnou látkou celkom uzatvorené samotným polymérom.

Produkty podľa vynálezu môžu mať (i keď nemusia) tiež geometriu a tvar mikrogulôčok, ale buď vôbec nie sú mikrokapsulami v definovanom zmysle a sú skôr roztokmi peptid-polyesterovej soli (ktoré prípadne tiež obsahujú voľný polymér), alebo sú mikrokapsulami, v ktorých je voľná peptidová účinná látka zapuzdrená v kontinuálnej fáze alebo povlaku tvorenej, resp. tvorenou soľou polymér-účinná látka, pričom i tu môže byť prípadne obsiahnutý voľný polymér. Ako už bolo uvedené, sú permeabilné vlastnosti takejto soli polymér-účinná látka celkom odlišné od permeabilných vlastností samotného polyméru, takže produkty podľa vynálezu uvoľňujú ich obsah peptidovej účinnej látky spôsobom, ktorý je celkom odlišný od spôsobu opísaného v európskych patentoch 52,510, 145,240 a 190,833, ktoré spadajú do doterajšieho známeho stavu techniky.

Ďalšie uskutočnenie vynálezu zahŕňa buď prípravu mikrosfér (mikrogulôčok), ktoré nie sú mikrokapsulami s použitím roztoku peptid-polyesterovej soli, prípadne obsahujúcej voľný polymér alebo prípravu mikrosfér, ktoré sú mikrokapsulami, ale ktoré obsahujú voľnú účinnú látku zapuzdrenú fázou alebo povlakom tvorenou, resp. tvoreným peptid-polyesterovou soľou, ktorá prípadne obsahuje voľný polymér.

Takéto rôzne častice sa môžu pripraviť rôznymi odlišnými spôsobmi, akými sú zrážanie, fázovo separačná koacervácia, sušenie rozprašovaním a vymrazovacie rozprašo-

vanie. Výhodná veľkosť častíc sa pohybuje od 0,2 do 500 µm a uvedené častice sa môžu injikovať vo forme suspenzie vo vhodnom injekčnom nosiči.

Obzvlášť účinné a užitočné parenterálne farmaceutické formulácie peptidových účinných látok sa môžu tiež pripraviť vo forme roztokov účinná látka-polyesterová soľ, prípadne tiež obsahujúcich voľný polyester a prípadne tiež obsahujúcich dispergovanú alebo rozpustenú voľnú účinnú látku, v rozpúšťadle, ktoré rozpúšťa voľný polyester, ale ktoré nerozpúšťa peptidy a ich jednoduché soli, akými sú napríklad chloridy a acetáty.

Predmety vynálezu je preto farmaceutická kompozícia s prolongovaným uvoľňovaním účinnej látky obsahujúca peptidovú účinnú látku a polyester, ktorej podstata spočíva v tom, že má formu roztoku obsahujúceho

- zásaditú peptidovú účinnú látku definovaného typu, ktorý má molekulovú hmotnosť rovnajúcu sa aspoň 300 Da a výhodne rovnajúcu sa aspoň 800 Da, pričom táto zásaditá peptidová účinná látka je vo forme soli s polyestrom a táto soľ obsahuje kation zásaditého peptidu a anión polyestru ukončeného karboxylovou skupinou,
- farmaceuticky prijateľné organické rozpúšťadlo, ktoré je rozpúšťadlom pre voľný polyester, ale ktoré nie je rozpúšťadlom pre voľný peptid,
- prebytok polyestru a prípadne
- prebytok voľnej peptidovej účinnej látky v rozpustenej alebo koloidne dispergovanej forme.

Vhodnými zásaditými peptidmi a polyestermi ukončenými karboxylovou skupinou sú peptidy a polyestery, ktoré sa už definovali, pričom obzvlášť výhodnými peptidmi sú syntetické definované LHRH-analógy.

Vhodné farmaceuticky prijateľné organické rozpúšťadlá pre soli polyester-peptidová účinná látka, v ktorých je polyester založený na homo- a kopolyméroch kyseliny mliečnej a kyseliny glykolovej, sú (nasledujúce vymenovanie nemá obmedzujúci charakter) benzylbenzoát, benzylalkohol, etylaktát, glyceryltriacetát, estery kyseliny citrónovej, polyetylén glykoly s nízkou molekulovou hmotnosťou (nižšou ako 1000), alkoxy polyetylén glykoly a polyetylén glykolacetáty a podobne, pričom výhodné rozpúšťadlá sú benzylbenzoát a benzylalkohol, najmä benzylbenzoát.

Jedinou požiadavkou, ktorá sa kladie na takéto organické rozpúšťadlo je, aby bolo farmaceuticky prijateľné a aby v ňom bola rozpustná polyester-peptidová soľ. O tom, či sa má použiť jedine takéto rozpúšťadlo alebo či sa má použiť zmes takýchto rozpúšťadiel a či sú použité rozpúšťadlá vhodné, sa dá presvedčiť jednoduchými rutinnými experimentami. Homo- a kopolyméry kyseliny mliečnej a kyseliny glykolovej patria medzi najpolárnejšie a najlipofóbnejšie polyestery a tak sa nebudú rozpúšťať v takýchto organických injekčných rozpúšťadlách, akými sú etyleolát, rastlinné oleje a ostatné lipofilné nosiče, ale homo- a kopolyméry na báze lipofilných monomérov a komonomérov alebo lipofilných hydroxy-kyselín, akou je kyselina hydroxystearová, sú rozpustné v takýchto injekčných nosičoch.

Pomer peptidovej účinnej látky k polyestru, pokiaľ ide o pevné podiely, ktoré sa rozpustia za vzniku roztokovej kompozície podľa vynálezu, sa bude prirodzene meniť v závislosti od potencie peptidovej účinnej látky, od charakteru použitého polyestru a od požadovanej periódy uvoľňovania peptidovej účinnej látky.

Výhodná koncentrácia peptidovej účinnej látky sa pohybuje od 0,1 do 30 % (hmotn./obj.). Všeobecne je optimálny obsah účinnej látky závislý od molekulovej hmotnosti polyestru a od jeho distribúcie molekulových hmotností, od požadovanej periódy uvoľňovania účinnej látky a od potencie peptidovej účinnej látky. Je zrejme, že v prípa-

de relatívne málo potentnej účinnej látky bude potrebné, aby sa táto účinná látka inkorporovala vo vyššej koncentrácii.

Absorpcia vody kompozíciou je dôležitým faktorom, pomocou ktorého sa dá kontrolovať rýchlosť hydrolytického štiepenia polyestru, pričom rýchlosť absorpcie vody je do určitej miery daná obsahom účinnej látky v kompozícii. V prípadoch, keď je žiaduce dosiahnuť relatívne rýchle uvoľňovanie účinnej látky v priebehu relatívne krátkej časovej periódy, tzn. v priebehu troch mesiacoch, môže sa vhodne použiť obsah účinnej peptidovej látky rovnajúcu sa až 30 %.

Monomérne zloženie kopolyestru, napríklad pomer laktidu ku glykolidu v laktid-glykolidovom polyestere, je tiež dôležité na stanovenie rýchlosti degradácie polyestru a uvoľňovanie účinnej látky. Čas trvania uvoľňovania je tiež čiastočne určený hmotnostnou strednou molekulovou hmotnosťou polyestru, ale množstvo peptidovej účinnej látky, ktorá sa môže inkorporovať vo forme soli účinná látka-polyester, je určené číselnou strednou molekulovou hmotnosťou. To znamená, že polydisperzita (t. j. pomer hmotnostnej strednej molekulovej hmotnosti k číselnej strednej molekulovej hmotnosti) je dôležitým parametrom.

Pre čas trvania uvoľňovania peptidovej účinnej látky od jedného do piatich mesiacov sú tak výhodné kompozície, ktoré obsahujú polyestery s hmotnostnou strednou molekulovou hmotnosťou od 4000 do 20000 s polydisperzitami od 1,2 do 2,2 a obsahmi peptidovej účinnej látky od 0,1 do 30 %. Všeobecne platí, že čím nižší je obsah účinnej látky, tým nižšia musí byť hmotnostná stredná molekulová hmotnosť a tým vyššia musí byť polydisperzita polyestru. Pre dlhšie časové periódy uvoľňovania účinnej látky, t. j. pre periódy od dvoch do šiestich mesiacov, je výhodné použiť obsahy peptidovej účinnej látky od 0,1 do 20 % a polyestery, ktoré majú hmotnostnú strednú molekulovú hmotnosť od 8000 do 20 000 a polydisperzity od 1,5 do viac ako 2,2. Pre časové periódy uvoľňovania účinnej látky dlhšie ako 6 mesiacov sú výhodné obsahy peptidovej účinnej látky od 0,1 do 10 % a polyestery, ktoré majú hmotnostné stredné molekulové hmotnosti od 20 000 do 50 000 a polydisperzity vyššie ako 1,8.

Miera inkorporácie celkového peptid-polyesterového pevného podielu v kompozícii sa bude prirodzene meniť v závislosti od potencie peptidovej zložky, na požadovanej časovej perióde, v priebehu ktorej má dochádzať k uvoľňovaniu peptidovej účinnej látky, na rozpustnosti všetkých pevných zložiek vo zvolenom rozpúšťadle a na objeme a viskozite roztokovej kompozície, ktorá sa má aplikovať.

Viskozita roztokovej kompozície podľa vynálezu je určená molekulovou hmotnosťou polyestru a obsahom peptidovej účinnej látky. Všeobecne sú roztoky obsahujúce viac ako asi 40 % (hmotn./obj.) zmesi soli peptidová účinná látka-polyester, voľnej účinnej látky a voľného polyméru, kde polyester má hmotnostnú strednú molekulovú hmotnosť vyššiu ako 8000, obtiažne aplikovateľné injekciou kvôli ich viskozite. Pre tieto polyestery sú teda výhodné roztokové kompozície s obsahom uvedenej zmesi menším alebo rovnajúcim sa 40 % (hmotn./obj.) Pre roztokové kompozície, ktoré obsahujú polyestery s hmotnostnou strednou molekulovou hmotnosťou od asi 8000 do asi 20000 sú výhodné koncentrácie uvedenej zmesi menšie alebo rovnajúce sa 30 % (hmotn./obj.) a pre roztokové kompozície, ktoré obsahujú polyestery s molekulovou hmotnosťou od asi 20 000 do asi 50 000 sú výhodné koncentrácie nižšie alebo rovnajúce sa 20 % (hmotn./obj.).

Za určitých okolností, napríklad v prípade, keď je žiaduce injikovať kompozíciu s použitím veľmi malej ihly, sú

výhodné roztoky s veľmi nízkou viskozitou a uvedená koncentrácia by sa mohla znížiť na 2 % (hmotn./obj.), alebo by sa mohla použiť ešte nižšia koncentrácia, pričom tu bude ale rovnováha medzi znížením viskozity a zvýšením objemu, ktorý sa má injikovať.

V rámci ďalšieho znaku vynález poskytuje spôsob prípravy kompozície podľa vynálezu, ktorý zahŕňa:

1. rozpustenie dokonale premiešanej zmesi zásaditej peptidovej účinnej látky a polyesteru vo farmaceuticky prijateľnom rozpúšťadle alebo
2. pomalé pridávanie roztoku peptidovej účinnej látky v alkanole obsahujúcom 1 až 6 atómov uhlíka k roztoku polyesteru v rozpúšťadle vhodnom pre injekciu, následne sa v prípade, že alkanolové rozpúšťadlo nie je farmaceuticky prijateľné pre injekciu, toto rozpúšťadlo odstráni, alebo v prípade, že toto alkanolové rozpúšťadlo je farmaceuticky prijateľné pre injekciu, nemusí nevyhnutne odstrániť.

Dokonale premiešaná zmes zásaditej peptidovej účinnej látky a polyesteru, použitá pri uvedenom spôsobe 1, sa výhodne získa rozpustením zásaditého peptidu a polyesteru v rozpúšťadle alebo v zmesi rozpúšťadiel, ktorá je schopná rozpustiť tak zásaditú peptidovú účinnú látku, ako i polyester a ktorá je schopná lyofilizácie. Vhodnými príkladmi takýchto rozpúšťadiel alebo rozpúšťadlových zmesí sú ľadová kyselina octová a zmesi dioxánu a vody. Nasleduje lyofilizácia takto získaného roztoku. Alternatívne sa môžu obe zložky rozpustiť napríklad v dimetylsulfoxide, následne sa rozpúšťadlo odstráni.

Uvedená dokonale premiešaná zmes sa môže tiež získať rozpustením peptidovej účinnej látky v hydroxylovom rozpúšťadle, napríklad v metanole, a pridaním získaného roztoku k roztoku polyesteru napríklad v dichlórmetáne, potom nasleduje odstránenie rozpúšťadiel napríklad odparením.

Alternatívne sa môže vodný roztok peptidovej účinnej látky vo forme chloridovej soli pridať k vodnému roztoku alebo disperzii sodnej soli polyesteru, následne sa získaná zmes lyofilizuje za vzniku zmesi soli peptidová účinná látka-polyester a chloridu sodného. Posledná uvedená látka sa môže prípadne odstrániť rozmiešaním produktu v organickom rozpúšťadle a odfiltrovaním nerozpusteného chloridu sodného.

Pri spôsobe 1 sa môže rozpustenie dokonale premiešanej zmesi vo farmaceuticky prijateľnom rozpúšťadle urýchliť zohrievaním a/alebo miešaním reakčnej zmesi.

Pri spôsobe 2 je vhodným alkanolovým rozpúšťadlom pre peptid napríklad metanol, etanol alebo propylén-1,2-diol.

Hlavnou výhodou farmaceutických produktov s obsahom peptidovej účinnej látky vo forme roztoku soli tvorenej polyesterom a peptidovou účinnou látkou, obsahujúceho prípadne voľnú účinnú látku a/alebo voľný polyester, je to, že príprava injikovateľného produktu v sterilnej forme pre bezprostredné použitie bez nutnosti predbežného zmiešania pred podaním pacientovi sa môže uskutočniť s použitím sterilizujúcej filtrácie. Táto filtrácia je omnoho jednoduchšou spracovateľskou operáciou ako sterilizácia pevného alebo suspenzného produktu.

Alternatívny spôsob prípravy sterilných injikovateľných roztokov spočíva v tom, že sa rozpustí sterilná soľ tvorená polyesterom a peptidovou účinnou látkou, prípadne obsahujúca voľnú účinnú látku a/alebo voľný polyester, vo farmaceuticky prijateľnom organickom injekčnom nosiči.

Hoci sú týmito formuláciami prevažne formulácie na parenterálne podania, môže sa soľ tvorená polyesterom a účinnou látkou podľa vynálezu použiť i na prípravu perorálne aplikovaných formulácií.

Celkom odlišným typom formulácie, ktorá sa môže injikovať alebo implantovať podkožne, je systém uvoľňujúci účinnú látku na báze implantátov alebo zmesi rôznych typov implantátov. Tieto systémy sa môžu pripraviť zo solí tvorených polyesterom a peptidovou účinnou látkou podľa vynálezu, obsahujúcich prípadne voľnú účinnú látku a/alebo voľný polyester, s použitím konvenčných techník pre spracovanie polymérov v tavenine, akými sú (nasledujúce vymenovanie nemá obmedzujúci charakter) vytlačovanie, lisovanie a vstrekovacie tvárnenie, pri ktorých sa používajú zvýšené teploty (výhodne nižšie ako 100 °C) na účely roztavenia soli tvorenej polyesterom a účinnou látkou pri príprave implantátu. Príprava takýchto implantátov sa môže uskutočniť za aseptických podmienok alebo sa môžu alternatívne pripraviť implantáty nakoniec sterilizované ožiaraním s použitím (ale nie len) gama-lúčov alebo röntgenových lúčov.

Tieto pevné dávkovacie formy sa môžu redukovať do partikulárnych foriem rozotrením alebo rozomletím. Výhodná veľkosť takýchto častíc sa môže pohybovať od 1 do 500 μm a tieto mikropartikulárne uvoľňovacie systémy (ktoré nie sú ani mikrosférami ani mikrokapsulami) sa môžu suspendovať vo vhodnom konvenčnom farmaceuticky prijateľnom injekčnom nosiči.

Uvedené spracovanie soli tvorenej peptidovou účinnou látkou a polyesterom ilustrujú najvýznamnejší a najdôležitejší rozdiel medzi fyzikálno-chemickými a termodynamickými vlastnosťami soli, ktoré obsahujú peptidovú účinnú látku a polyester podľa vynálezu a vlastnosťami voľných peptidov a jednoduchých soli. Peptid-polyesterové soli sa totiž v mnohých prípadoch topia a tečú na rozdiel od voľných peptidov a ich soli, akými sú chloridy a acetáty, ktoré sa netopia a pri zvýšenej teplote sa rozkladajú.

Degradácia polyesterov je čiastočne závislá od ich molekulej hmotnosti a polydisperzity. Je samozrejme, že na to, aby mohlo dôjsť k uvedenej degradácii prevažne prebiehajúcej mechanizmom hydrolytického štiepenia esterových skupín, musí polyester alebo farmaceutická formulácia obsahujúca polyester absorbovať vodu. Pri systémoch, v ktorých matrica alebo membrána regulujúca uvoľňovanie účinnej látky obsahuje čiastočne alebo celkom soľ tvorenú peptidovou účinnou látkou a polyesterom, bude vyššia absorpcia vody regulačnou maticou alebo membránou v porovnaní so samotným polyesterom. V dôsledku toho degradujú kontinuálne maticové fázy alebo membrány obsahujúce soľ tvorenú polyesterom a účinnou látkou iným spôsobom ako kontinuálne maticové fázy alebo membrány založené na samotnom polyester. Je treba chápať, že rýchlosť difúzie vody alebo fyziologických tekutín do takýchto polyesterových matric alebo membrán regulujúcich uvoľňovanie účinnej látky bude čiastočne regulovať rýchlosť degradácie. Táto difúzia vody alebo fyziologických tekutín je tiež určená rozmermi a tvarom formulácie a tak uvoľňovanie účinnej látky z kompozície obsahujúcej polymérne soli peptidov a polyesterov je tiež závislé od týchto faktoroch.

Zvlášť zaujímavými polyesterovými zložkami peptid-polyesterových soli podľa vynálezu sú polyesterové zložky na báze homo- alebo kopolymérov kyseliny mliečnej a kyseliny glykolovej, v ktorých sa kyselina mliečna môže vyskytovať v jednej alebo niekoľkých opticky aktívnych alebo racemických formách. Polyesterov tohto všeobecného typu sú už známe mnoho rokov a boli detailne skúmané v rôznych systémoch s regulovaným uvoľňovaním účinnej látky (pozri napríklad: "Controlled Release of Bioactive Agents from Lactide/Glycolic Polymers", D.H.Lewis v

"Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems", vyd. M. Chasin a R. Langer, Marcel Dekker).

Tak napríklad v US-patente 3,773,919 sa uvádza veľmi všeobecne, že sa dajú pripraviť farmaceutické kompozície s regulovaným uvoľňovaním účinnej látky na báze laktidových polyesterov alebo laktidových kopolyesterov obsahujúcich antimikrobiálne polypeptidy. Ale tieto tu opísané antimikrobiálne peptidy sú neuspokojivé na tvorbu polyesterovej soli, pretože buď sa vyskytujú ako sulfáty alebo majú iné vlastnosti, ktoré inhibujú alebo bránia vytvoreniu soli tvorenej polyesterom a peptidovou účinnou látkou. Ak sa postupuje podľa príkladov uskutočnenia uvedených v zmienenom patente, potom pri miešaní peptidovej účinnej látky bez ohľadu na jej charakter, s polymérom pri uvedenej zvýšenej teplote dôjde ku katastrofálnemu rozkladu peptidovej účinnej látky.

Obdobne je v európskom patente 25,698 uvedený colistín ako jedna zo zoznamu mnohých tu uvedených zlúčenín, ktoré sú údajne schopné tvoriť formulácie s polyaktidom, ale i tu má táto zlúčenina štruktúrne znaky, ktoré bránia tvorbe solí s koncovými karboxylovými skupinami polyesteru. Colistín je farmaceuticky používaný len ako colistín-sulfát alebo colistínsulfometát sodný, pričom žiadna z týchto foriem neumožňuje prípravu obojakej soli s polyesterom podľa vynálezu. Ďalšie dokumenty, ktoré spadajú do doterajšieho stavu techniky, ktoré opisujú použitie polypeptidov s biologicky odbúrateľnými polymérami na báze homo- a kopolymérov kyseliny mliečnej a kyseliny glykovej, sú už uvedené európske patenty 52,510, 58,481, 145,240 a 190,833.

Hoci kopolyméry kyseliny mliečnej a kyseliny glykovej sú známe už mnoho rokov, nebola doteraz v rámci doterajšieho stavu techniky braná do úvahy zložitosť ich štruktúry, pokiaľ ide o distribúciu komonomérnych jednotiek a dĺžku ich následných sekvencií (výskyt niektorej individuálnej komonomérnej jednotky, ktorá sa v kopolymére opakuje, a ktorej opakovanie je náhodné), a účinok takýchto štruktúrnych variácií v prípade, že sú takéto kopolyméry použité ako matrice regulujúce uvoľňovanie účinnej látky. Táto kopolyméerna štruktúra čiastočne určuje tak rozpustnosť, ako i schopnosť polyméru napučať v rozpúšťadlách, akým je benzén, a tiež rýchlosť degradácie polyméru. Táto korelácia bola po prvý raz zverejnená Hutchinsonom (európsky patent 58,481), ale bola do šírky a do detailov preštudovaná v rámci tohto vynálezu.

Na účely ilustrácie tejto skutočnosti uvádza US-patent 3,773,919 niektoré formulácie s regulovým uvoľňovaním účinnej látky, ktorá obsahuje 50/50-kopolyestery kyseliny mliečnej a kyseliny glykovej, ktoré sú rozpustné v benzéne a tento US-patent je skutočne špecificky obmedzený (pokiaľ ide o kopolyméry kyseliny mliečnej a kyseliny glykovej) na také polyster, ktoré sú rozpustné v benzéne. Užitočnosť týchto kopolyesterov rozpustných v benzéne je ďalej posilnená ich špecifickým použitím opísaným v európskom patente 52,510. Ale skorší US-patent 2,703,316 (ktorý má rovnakého prihlasovateľa ako US-patent 3,773,919) opisuje 50/50-laktido-glykolidové kopolyestery, ktoré sú nerozpustné v benzéne. Vzhľadom na to, že oba uvedené US-patenty majú rovnakého majiteľa (duPont), dá sa z tejto skutočnosti odvodiť to, že v rámci vynálezu nárokovanom v posledne uvedenom US-patente je použitie kopolymérov nerozpustných v benzéne v niektorých ohľadoch horšie ako použitie polymérov, ktoré sú v benzéne rozpustné. Toto tvrdenie je posilnené európskym patentovým spisom 52,510, ktorý opisuje použitie len kopolymérov z US-patentu 3,773,919, ktoré sú rozpustné v benzéne.

Doterajší stav techniky s výnimkou nášho vlastného európskeho patentu 58,481 zatiaľ ignoroval účinok, ktorý má štruktúra kopolyesterov kyseliny mliečnej a kyseliny glykovej na rozpustnosť a odbúrateľnosť týchto kopolyesterov. Teraz sa zistilo, že v prípade polyesterov s rovnakou molekulovou hmotnosťou a rovnakou distribúciou molekulových hmotností vo väčšine prípadov platí nasledujúca všeobecná závislosť (pre polyster, ktoré sú rozpustné v chloroforme pri teplote 25 °C):

polyster, ktoré sú nerozpustné v benzéne degradujú rýchlejšie ako polyster, ktoré sú v benzéne len napučané a nie sú rozpustené a takéto v benzéne napučané polyster zase degradujú rýchlejšie ako polyster, ktoré sú voľne rozpustné v benzéne, čo platí v prípade, že zodpovedajúce degradačné experimenty sa uskutočňujú vo vodných fyziologických tekutinách alebo v tlmivom roztoku pri pH 7,4 pri 37 °C. Vzhľadom na to je na dosiahnutie kontinuálneho uvoľňovania peptidov z parenterálnych formulácií v priebehu relatívne krátkej časovej periódy, t. j. v priebehu jedného týždňa až dvoch mesiacov, obzvlášť vhodné použiť polyster, ktoré sú nerozpustné v benzéne.

Pre kompozície, ktoré môžu obsahovať od 0,1 až do 75 % (hmotn./obj.) peptidu, je ďalej uvedená úvaha týkajúca sa polyesterovej kompozície a ich vzťahov ku štruktúre, viskozite a polydisperzite.

Na prípravu solí tvorených peptidovou účinnou látkou a polyesterom, ktoré sa môžu formulovať v súlade s vynálezom do systémov pre kontinuálne uvoľňovanie účinnej látky v priebehu časovej periódy od jedného týždňa do dvoch mesiacov, výhodne majú takéto v benzéne rozpustné polyster, ktoré majú výhodne normálnu až širokú polydisperzitu, nasledujúce zloženie:

60 % kyseliny glykovej (alebo glykolidu)/40 % kyseliny mliečnej (alebo laktidu) až asi 25 % kyseliny glykovej (alebo glykolidu)/75 % kyseliny mliečnej (alebo laktidu), pričom takéto polyster majú výhodne vnútornú viskozitu 1 % (hmotn./obj.) roztoku v chloroforme pri teplote 25 °C od 0,08 do 4,0 dl/g.

Vhodnou voľbou parametrov polyesterov, vrátane molekulovej hmotnosti a distribúcie molekulových hmotností, je tiež možné dosiahnuť kontinuálne uvoľňovanie peptidov v priebehu časovej periódy jedného týždňa až dvoch mesiacov z formulácií podľa vynálezu s použitím homopolyméru kyseliny polymliečnej alebo kopolyesterov, ktoré majú molárne zloženie: 35 % kyseliny glykovej (alebo glykolidu)/65 % kyseliny mliečnej (alebo laktidu) až 10 % kyseliny glykovej (alebo glykolidu)/90 % kyseliny mliečnej (alebo laktidu), ktoré sú rozpustné v benzéne, majú vnútornú viskozitu 1 % roztoku v chloroforme pri teplote 25 °C od 0,08 do 0,5 dl/g a majú úzku až širokú polydisperzitu.

Kontinuálne uvoľňovanie peptidov z formulácií podľa vynálezu v priebehu dlhšej časovej periódy, t. j. v priebehu 2 až 6 mesiacov, sa môže dosiahnuť s použitím homopolyméru kyseliny polymliečnej alebo kopolyesterov majúcich molárne zloženie:

35 % kyseliny glykovej (alebo glykolidu)/65 % kyseliny mliečnej (alebo laktidu) až 0 % kyseliny glykovej (alebo glykolidu)/100 % kyseliny mliečnej (alebo laktidu), ktoré sú rozpustné v benzéne, majú vnútornú viskozitu 1% roztoku (hmotn./obj.) v chloroforme pri teplote 25 °C od 0,08 do 0,8 dl/g a majú úzku až širokú polydisperzitu.

Kontinuálne uvoľňovanie z formulácií podľa vynálezu v priebehu veľmi dlhšej časovej periódy, t. j. časovej periódy do dvoch rokov, sa môže dosiahnuť s použitím homopolyméru kyseliny polymliečnej alebo kopolyesterov majúcich molárne zloženie:

25 % kyseliny glykolovej (alebo glykolidu)/75 % kyseliny mliečnej (alebo laktidu) až 0 % kyseliny glykolovej (alebo glykolidu)/100 % kyseliny mliečnej (alebo laktidu), ktoré sú rozpustné v benzéne, majú vnútornú viskozitu 1% (hmotn./obj.) roztoku v chloroforme pri teplote 25 °C od 0,02 do 4,0 dl/g a normálnu až vysokú polydisperzitu.

Časové alebo pulzné uvoľňovanie (s indukčnou periódou pred vlastným uvoľňovaním) alebo diskontinuálne uvoľňovanie (najprv uplynie prvotná fáza uvoľňovania, ktorá je nasledovaná periódou, v priebehu ktorej nedochádza k uvoľňovaniu účinnej látky alebo dochádza len k neúčinnému uvoľňovaniu účinnej látky, potom nasleduje sekundárna fáza uvoľňovania) v priebehu relatívne krátkej časovej periódy, t. j. v priebehu až 2 mesiacov, sa môže dosiahnuť použitím formulácie podľa vynálezu, ktorá obsahuje v benzéne nerozpustné polyméry, ktoré majú úzku až najpravdepodobnejšiu distribúciu molekulovej hmotnosti a vnútornú viskozitu 1 % (hmotn./obj.) roztoku v chloroforme pri teplote 25 °C od 0,3 do 4,0 dl/g.

Ešte ďalším znakom vynálezu, ktorý je nový a ktorý odlišuje vynález od všetkých ostatných skôr opísaných systémov s regulovaným uvoľňovaním účinnej látky založených na polyesteroch alebo kopolyesteroch, a ktorý ďalej reguluje rýchlosť uvoľňovania, je miera inkorporácie peptidu vo forme polyesterovej soli (prípadne v prítomnosti voľnej účinnej látky a/alebo voľného polyméru). Tento ďalší regulačný znak sa celkom odlišuje od parametrov, ktoré majú za následok zvýšenú rýchlosť uvoľňovania vo väčšine konvenčných systémov s regulovaným uvoľňovaním účinnej látky na báze polyesterov, ktoré sú smerované na uvoľňovanie vysoko lipofilných účinných látok majúcich relatívne nízku rozpustnosť vo vode, akými sú steroidy. V týchto prípadoch sa dá pri rastúcej miere inkorporácie účinnej látky všeobecne pozorovať rastúcu rýchlosť uvoľňovania a to dokonca vtedy, keď redukovaná absorpcia vody takéhoto systému v dôsledku rastúceho fázového objemu lipofilnej účinnej látky. V skutočnosti sú takéto zvýšené rýchlosti uvoľňovania účinných látok, akými sú steroidy, závislé od účinnej látky, ktorá si zachováva svoju termodynamickú identitu a od jednoduché Fickianovej difúznej kinetiky (pozri Barker a Lonsdale, už sa citovalo). To znamená, že v prípade účinných látok, akými sú steroidy, sa s rastúcim obsahom účinnej látky a za predpokladu, že lipofilná účinná látka je do určitej miery rozpustná v lipofilnom polyméru, vzrastá i rýchlosť samotnej Fickianovej difúzie.

K celkom odlišnej situácii však dochádza pri produktoch podľa vynálezu. Teraz sa zistilo, že hlavným mechanizmom degradácie polyesterov a kopolyesterov je hydrolyza esterových skupín a rýchlosť, ktorou táto hydrolyza prebieha, je závislá od absorpcie vody (pozri Pitt a Thongwei Gu, *J. Controlled Release*, 4, 283-292 (1987); Hutchinson and Furr, *tamtiež* 13,279-294 (1990)). Peptidy sú hydrofilné a ich tvorba solí s polyesterami prebieha z vzniku fázy obsahujúcej soľ tvorenú polyesterom a účinnou látkou, ktorá má vyššiu absorpciu vody ako samotný polyester. To znamená, že polyesterový reťazec v tejto soli môže degradovať rýchlejšie ako samotný voľný polyester, ktorý má obdobné zloženie, obdobnú molekulovú hmotnosť a obdobnú polydisperzitu. Uvoľňovanie peptidu je silne závislé od degradácie a uvoľňovanie účinnej látky je teda čiastočne riadené tak mierou inkorporácie soli tvorenej polyesterom a peptidovou účinnou látkou v kompozícii, ako množstvom peptidu v uvedenej soli. Pre polyester alebo kopolyester majúce rovnaké zloženie a rovnakú štruktúru má vzrast jedného z týchto dvoch parametrov za následok zvýšenú rýchlosť uvoľňovania účinnej látky, čo mô-

že zasa za určitých okolností skrátiť časovú periódu, v priebehu ktorej sa účinná látka uvoľňuje. Miera inkorporácie peptidovej účinnej látky buď v soli tvorenej polyesterom a účinnou látkou alebo v kombinácii tvorenej soľou polyester-účinná látka a voľným peptidom je výhodne od 0,1 % do 75 % hmotnosti vo formulácii obsahujúcej polyester a účinnú látku.

Obsah peptidovej účinnej látky v kompozícii podľa vynálezu a jeho variácia s molekulovou hmotnosťou a polydisperzitou polyesteru sú diskutované v ďalšej časti opisu. Pre kontinuálne uvoľňovanie peptidu v priebehu veľmi dlhých časových periód, t. j. v priebehu až 2 rokov, sú výhodné nízke miery inkorporácie účinnej látky od 1,0 do 20 % hmotnosti a to s použitím polyesterov, ktoré majú výhodne hmotnostnú strednú molekulovú hmotnosť 20 000 Da alebo vyššiu a polydisperzitu vyššiu ako 2,2 a výhodne vyššiu ako 3,5. Tieto parametre pre veľmi dlhý čas uvoľňovania účinnej látky tiež závisia čiastočne od ostatných parametrov formulácie s obsahom účinnej látky, akými sú zloženia komonomérov, štruktúra, rozpustnosť/nerozpustnosť v benzéne, geometria a rozmery dávkovacej formy. Polyester s hmotnostnou strednou molekulovou hmotnosťou asi 20000 má vnútornú viskozitu asi 0,2 a to v závislosti od jeho štruktúry, zloženia a polydisperzity.

Pre kontinuálne uvoľňovanie účinnej látky v priebehu relatívne dlhej časovej periódy, t. j. v priebehu až 6 mesiacov, sa výhodná miera inkorporácie peptidovej účinnej látky pohybuje od asi 0,5 do 35 % hmotnosti a to s použitím polyesterov alebo kopolyesterov, ktoré majú hmotnostnú strednú molekulovú hmotnosť výhodne rovnajúca sa 10000 alebo ešte vyššiu a polydisperzitu vyššiu ako 1,8 a výhodne vyššiu ako 2,2 v závislosti od všetkých ostatných parametrov, akými sú zloženie, štruktúra, rozpustnosť/nerozpustnosť v benzéne, geometria a rozmery dávkovacích foriem.

Pre kontinuálne uvoľňovanie účinnej látky v priebehu relatívne krátkych časových periód, t. j. v priebehu až dvoch mesiacov, sa výhodná miera inkorporácie peptidovej účinnej látky pohybuje od asi 0,1 do 75 % hmotnosti a to s použitím polyesterov, ktoré majú výhodne hmotnostnú strednú molekulovú hmotnosť rovnajúcu sa 2000 Da alebo ešte vyššiu a polydisperzitu vyššiu ako 1,2 v závislosti od všetkých ostatných parametrov, akými sú zloženie, štruktúra, rozpustnosť/nerozpustnosť v benzéne, geometria a rozmery dávkovacích foriem.

Ďalším parametrom, ktorý ďalej reguluje uvoľňovanie peptidovej účinnej látky z formulácii podľa vynálezu a ktorý je neprítomný pri systémoch s regulovaným uvoľňovaním účinnej látky, patriacich do doterajšieho stavu techniky a založených na homo- a kopolyméroch kyseliny mliečnej a kyseliny glykolovej, je funkčnosť peptidu, pokiaľ ide o počet zásaditých skupín, akými sú arginínové a lyzínové zvyšky, v molekule peptidovej účinnej látky a funkčnosť polyesteru alebo kopolyesteru, pokiaľ ide o stredný počet karboxylových skupín obsiahnutých v priemernom polymernom alebo kopolymernom reťazci. Všeobecne pre kontinuálne uvoľňovanie peptidovej účinnej látky platí, že čím vyššia je miera takejto polyfunkčnej interakcie v polyelektrolytickom komplexe peptid-polyester, tým vyššia musí byť polydisperzita. Na rozdiel od toho sú pre diskontinuálne alebo pulzné uvoľňovanie účinnej látky žiaduce polydisperzity nižšie ako 2,2.

Jedným z relatívne zriedkavých prípadov vzájomnej zlučiteľnosti alebo rozpustnosti dvoch polymérnych typov s odlišnými chemickými štruktúrami sú zmesi polyesterov založených na homo- alebo kopolyméroch kyseliny mliečnej a kyseliny glykolovej s nízkomolekulárnymi polyoxyetylénmi a najmä s nízkomolekulárnymi polyetylénglykol-

mi. Táto zlučiteľnosť sa zhodnotila v soliach tvorených polyesterom a peptidovou účinnou látkou a v jej kompozíciách podľa vynálezu novým a neočakávaným spôsobom. Je známe, že niektoré farmakologicky účinné peptidy sa môžu "pegylovať", t. j. konjugovať s polyetylén glykolom alebo alkoxy polyetylén glykolom takým spôsobom, že si peptid zachová svoju farmakologickú účinnosť. Prítomnosť konjugovaného polyoxyetylénového reťazca v molekule pegylovaného peptidu spôsobuje, že pegylovaný peptid je kompatibilný s polyesterom alebo kopolyesterom.

Za predpokladu, že zostávajúce lyzinové alebo arginínové zvyšky v pegylovanom peptide sa vyskytujú vo forme solí slabých kyselín, táto zlučiteľnosť uľahčuje prípravu soli tvorenej polyesterom a peptidovou účinnou látkou a predstavuje ďalší regulačný prvok uvoľňovania účinnej látky. Užitočné sú taktiež farmakologicky účinné konjugáty peptidov s ostatnými vo vode rozpustnými polymérmi, akými sú polysacharidy, syntetické polypeptidy a polyvinylpyrolidón, ale tieto konjugáty sú menej výhodné, lebo žiadny z týchto vo vode rozpustných polymérov nie je rozpustný v polyesteru alebo kopolyestere alebo nie je s týmito polyesterami zlučiteľný.

Tento vynález sa dá výhodne použiť v súvislosti s farmakologicky účinnými látkami, ktoré obsahujú zásadité funkčné skupiny. Ale môže sa tiež použiť v prípade peptidov, ktoré sú farmakologicky účinné a ktoré sú buď neutrálne alebo majú tendenciu existovať vo veľkej miere ako polyanióny (polypeptidy majúce prebytok karboxylových skupín).

V prvom z týchto prípadov (farmakologicky účinný neutrálny polypeptid, ktorý neobsahuje ani kyslé ani zásadité zvyšky) sa použije soľ syntetického polypeptidu, ktorá obsahuje zásadité funkčné skupiny a ktorá je farmakologicky neúčinná, a polyester. Takáto soľ farmakologicky neúčinného syntetického polypeptidu a polyesteru alebo kopolyesteru je taktiež obojaká a pôsobí teda ako dispergačné činidlo pri solubilizácii alebo koloidnom dispergovaní farmakologicky účinného, ale neutrálneho peptidu v organickej fáze.

V druhom z uvedených prípadov (keď farmakologicky účinný polypeptid obsahuje zvyškové karboxylové funkčné skupiny) sa použije soľ syntetického polypeptidu majúceho aspoň dve zásadité skupiny v syntetickom polypeptidovom reťazci, pričom tento polypeptid je farmakologicky neúčinný, a polyester alebo kopolyester. V tomto druhom prípade je v soli syntetického polypeptidu a polyesteru koncentrácia zásaditých funkčných skupín v soli vyššej ako koncentrácia karboxylových skupín v kyslom, farmakologicky účinnom peptide. Tento prebytok zásaditých funkčných skupín môže mať potom za následok ďalšiu tvorbu soli s karboxylovými skupinami kyslého farmakologicky účinného peptidu. Rezultujúce komplexné soli sa potom môžu rozpúšťať alebo dispergovať v organickom rozpúšťadle alebo v organickej fáze, ktoré, prípadne ktorá je normálne celým nerozpúšťadlom pre použitý peptid, ale ktoré, prípadne ktorá je rozpúšťadlom pre polyester alebo kopolyester, a to spôsobom opísaným pre ostatné polyester-peptidové soli.

Pretože soli peptidov, ktoré obsahujú zásadité funkčné skupiny s polyesterami alebo kopolyesterami, obsahujúcimi karboxylové funkčné skupiny sú obojaké, môžu sa ich povrchovo aktívne vlastnosti využiť na uľahčenie dispergovania iných hydrofilných účinných látok alebo vodných suspenzií takýchto účinných látok v organickom rozpúšťadle alebo organickej fáze, obsahujúcom, prípadne obsahujúcej polyester-peptidovú soľ. Použitie takýchto dvojakých solí peptidov s polyesterami alebo kopolyesterami vo funkcii dis-

pergačných alebo solubilizačných činidiel predstavuje ďalší znak vynálezu.

V nasledujúcej časti opisu bude vynález bližšie objasnený pomocou konkrétnych príkladov jeho uskutočnenia, pričom tieto príklady majú len ilustračný charakter a nijako neobmedzujú rozsah vynálezu, ktorý je jednoznačne definovaný formuláciou patentových nárokov.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Meranie viskozít a ich vzťah k rôznym stredným molekulovým hmotnostiam sa diskutujú v práci Sorensen a Campbell, "Preparative Methods of Polymer Chemistry", 2. vyd., 1968, Interscience Division of John Wiley, str. 43-50. V ďalej opísaných príkladoch sa použil Ubbelohdeov viskozimeter, majúci čas prietoku pre samotný chloroform asi 100 sekúnd. Ako rozpúšťadlo sa použil chloroform, pretože chloroform rozpúšťa v udanom rozmedzí zloženia tak vo vode rozpustné, ako i vo vode nerozpustné polyméry.

Molekulové hmotnosti a distribúcia molekulových hmotností polyesterov opísaných v tejto prihláške a majúcich molekulovú hmotnosť vyššiu ako asi 20 000 Da, sa stanovili dimenzne-exklúznou chromatografiou vzhľadom na polystyrénový štandard s použitím 3 x 30 cm zmesových B-kolón (PL Gel, 10 μ m, Polymer Laboratoires, Church Stretton, Shropshire, GB), zapojených do série a vybavených 10 μ m zaisťovacou kolónou. Ako rozpúšťadlo sa použil tetrahydrofurán s nominálnym prietokom pri teplote 25 °C 1 ml za minútu. Molekulárne hmotnostné charakteristiky sa vypočítali s použitím GPC-sofwaru Data Analysis Package Perkin-Elmer 7700 Professional Computer.

Na meranie molekulovej hmotnosti nižšej ako asi 20 000 Da nepredstavuje uvedená dimenzne-exklúzna chromatografia výhodnú metódu na stanovenie molekulovej hmotnosti a namiesto nej sa môže použiť nevodná potenciometrická titrácia na účely získania buď molekulovej hmotnosti alebo ekvivalentnej hmotnosti polyesteru priamym meraním obsahu karboxylovej kyseliny v polyesteru alebo kopolyestere. Nevodné potenciometrické titrácie sa všeobecne uskutočňujú s použitím známej hmotnosti polyesteru alebo kopolyesteru rozpusteného v acetóne obsahujúcom 10 % objemu vody. Titrácia sa uskutočňuje s použitím zriedených roztokov hydroxidu sodného a s použitím zariadenia dodaného firmou Radiometer (Kodaň, Dánsko). Toto zariadenie pozostáva z titratora (TTT 80) a autobytrey (ABU 80), pHmetra a elektródy Russel CMAWK. Priebeh titrácie sa vynáša na zariadení Servograpg (REC 80), pričom molekulová hmotnosť polyméru sa rovná

$$\frac{W \times 1000 \times f}{v \times n}$$

kde

w znamená hmotnosť použitého polyméru,

f znamená stredný počet karboxylových skupín v polymernom reťazci,

v znamená objem použitého roztoku hydroxidu sodného a

n normalitu použitého roztoku hydroxidu sodného.

Príklad 1

Goserelin-acetát (100,6 mg, toto množstvo je ekvivalentné asi 86 mg peptidu vo forme voľnej zásady) a D,L-laktid/glykolidový kopolymér (300,3 mg, 50/50 mol. %), obsahujúci jednu koncovú karboxylovú kyselinu na každý

polymérny reťazec a majúci hmotnostnú strednú molekulovú hmotnosť 4300 Da a vnútornú viskozitu 1 % (hmotn./obj.) roztoku v chloroforme pri teplote 25 °C 0,08 dl/g, pričom tento kopolymér je rozpustný v benzéne, sa rozpustí v ľadovej kyseline octovej bez anhydridu (3 ml). Takto získaný roztok účinnej látky a polymér v kyseline octovej sa potom po kvapkách pridá ku kvapalnému dusíku a zmrazené kvapky sa lyofilizujú vo vákuu počas 24 hodín. Lyofilizovaný produkt sa potom dosuší vo vákuu pri teplote 50 °C počas 24 hodín za vzniku zmesi tvorenej polyesterom a účinnou látkou, ktorá nominálne obsahuje asi 25 % hmotnosti goserelínacetátu (toto množstvo je ekvivalentné asi 22,3 % hmotnosti peptidu vo forme voľnej zásady).

Vysušená zmes polyesteru a účinnej látky (400 mg) sa pridá k dichlórmetánu a objem sa doplní na 4 ml. Najskôr sa získa zakalená kolooidná zmes, pričom v priebehu jednej hodiny sa táto zmes postupne vyčirí za vzniku číreho roztoku. Tento roztok sa odleje do tvaru fólie, ktorá sa nechá vyschnúť pri teplote okolia počas asi 6 hodín a potom ešte počas 20 hodín pri teplote 50 °C a v hlbokom vákuu. Získa sa číra transparentná fólia obsahujúca soľ tvorenú polyesterom a účinnou látkou.

i) Takto získaná číra transparentná fólia (100 mg) sa roztaví a tlakovo tvaruje pri teplote 80 °C za vzniku transparentnej fólie s hrúbkou asi 0,02 cm. Po ponorení do vody 37 °C teplej, počas 24 hodín v rastie hmotnosť hydratovanej fólie tvorenej účinnou látkou a polymérom na 225 mg. Na rozdiel od toho vzrastie hmotnosť rovnako spracovaného samotného polyesteru (100 mg) len na 126 mg a fólia obsahujúca čistú zmes goserelín-acetátu (25 mg) a polyméru (75 mg) (pripravená pridaním účinnej látky k roztoku polyméru v dichlórmetáne, odstránením rozpúšťadla a lisovaním získaného materiálu za vzniku fólie, ktorá má hrúbku asi 0,02 cm) má hmotnosť po 24 hodinovom ponorení do vody 37 °C teplej len 137 mg. Z tohto experimentu je zrejme, že kompozícia obsahujúca soľ tvorenú polyesterom a účinnou látkou je výrazne hydrofilnejšia a má vyššiu absorpciu vody ako samotný polyester a ako čistá zmes účinnej látky a polyesteru.

V rámci uvedenej čistej zmesi účinnej látky a polyméru v dichlórmetáne nemá účinná látka náznak rozpúšťania dokonca ani po 1 mesiaci a keď sa vysuší a vylisuje, poskytuje táto zmes opakovanú fóliu. Ale v ďalšom experimente sa uvedeným spôsobom získaná číra transparentná fólia (100 mg) rozpustí v dichlórmetáne (1 ml) za vzniku číreho transparentného roztoku polyesteru a drogy. K tomuto roztoku sa pridá kyselina trifluóroctová (50 µl) a získaná zmes sa intenzívne mieša. V podstate bezprostredne tu dochádza k vyzrážaniu goserelínu vo forme trifluóracetátvej soli.

Tieto dva experimenty ukazujú, že číra transparentná fólia, obsahujúca soľ tvorenú polyesterom a účinnou látkou a získaná uvedeným spôsobom, sa môže spracovať na tvarovaný systém s regulovaným uvoľňovaním účinnej látky s použitím konvenčného spracovania polymérnej taveniny. Okrem toho tento produkt fakticky neobsahuje kyselinu octovú ani acetátový anión a účinná látka musí takto existovať vo forme polyesterovej soli. K tvorbe soli tvorenej polyesterom a účinnou látkou dochádza preto, že koncové skupiny kyseliny mliečnej alebo kyseliny glykolyovej na kopolyméri sú silnejšie kyseliny ako kyselina octová a slabšia kyselina je vytlačená polymérom. Polymérna karboxylová kyselina v soli tvorenej polyesterom a účinnou látkou a rozpustná v dichlórmetáne môže byť zase vytlačená omnoho silnejšou karboxylovou kyselinou, akou je kyselina trifluóroctová. V prípade, že k tomu dôjde, vznikne

trifluóracetátová soľ peptidu, ktorá sa vyzráža, pretože nie je rozpustná v dichlórmetáne.

ii) Číra transparentná fólia získaná uvedeným spôsobom (50 mg) a obsahujúca soľ tvorenú polyesterom a účinnou látkou sa tvaruje do tvaru fólie majúca hrúbku 0,02 cm. Tento film sa potom inkubuje v tlmivej soľanke (obsahujúcej 0,02 % azidu sodného) pri pH 7,4 a teplote 37 °C, pričom sa tlmivý roztok periodicky analyzuje ultrafialovým žiarením na účely stanovenia uvoľneného množstva goserelínu. Tento tvarovaný produkt uvoľňoval plynule goserelín v priebehu asi 2 týždňov a v priebehu tretieho týždňa fakticky prišlo k jeho úplnej degradácii a k vymiznutiu z inkubačného prostredia.

Tento experiment demonštruje použiteľnosť polymérov s veľmi nízkou molekulovou hmotnosťou a nerozpustných v benzéne na uvoľňovanie účinnej látky v priebehu veľmi krátkeho časového intervalu.

Obdobne tvarované formulácie sa môžu pripraviť nahradením goserelín-acetátu buď prirodzene sa vyskytujúcimi hormónmi, ktoré uvoľňujú gonadotropín, alebo ďalšími vysoko potentnými syntetickými analógmi (agonistické alebo antagonistické) hormónu uvoľňujúceho gonadotropín, akými sú pryporelín, leuprorelín, buserelín a nafarelín, výhodne vo forme acetátových solí alebo solí s ďalšími slabými kyselinami, alebo ľubovoľným ďalším hormónom, ktorý reguluje sekréciu intaktného gonadotropínu alebo oboch gonadotropínových podjednotiek.

Príklad 2

Číry transparentný fóliový produkt získaný v uvedenom príklade 1 (100 mg) a D,L-laktid/glykolidový kopolymér (molárne zastúpenie 50/50, 1,05 g), ktorý má hmotnostnú strednú molekulovú hmotnosť 121000 Da a vnútornú viskozitu 1 % (hmotn./obj.) roztoku v chloroforme pri teplote 25 °C 0,84 dl/g a ktorý je nerozpustný v benzéne, sa rozpustí v dichlórmetáne (100 ml). Získaný roztok sa intenzívne mieša pri rýchlosti miešadla 1000 otáčok za minútu a v priebehu jednej hodiny sa pomaly pridá silikónový olej (50 ml) na účely vyzrážania tak soli tvorenej polyesterom a účinnou látkou, ako i voľného polyesteru. Po jednej hodine sa čiastočne vyzráža zmes soli tvorenej polyesterom a účinnou látkou, voľného polyesteru, silikónového oleja a dichlórmetánu pridá k intenzívne miešanému hexánu (2 litre) na účely vytvrdenia mikročastic soli tvorenej polyesterom a účinnou látkou a voľného polyesteru. Táto zmes sa mieša počas dvoch hodín, následne sa nechá usadiť a hexánová vrstva sa odleje. Mikročastice (obsahujúce asi 1,95 % hmotnosti goserelínu vo forme voľnej zásady) sa trikrát premyjú čerstvým hexánom (500 ml) a nakoniec sa izolujú filtráciou a vysušia pri teplote 35 °C v hlbokom vákuu v priebehu 24 hodín. Stredná veľkosť približne sférických mikročastic, ktoré obsahujú roztok soli tvorenej polyesterom a účinnou látkou, sa rovná asi 30 µm.

Časť tohto produktu (250 mg) sa inkubuje vo fosfátovej tlmivej soľanke (obsahujúcej 0,02 % azidu sodného) pri pH 7,4 a teplote 37 °C, pričom sa tlmivý roztok periodicky analyzuje ultrafialovým žiarením na účely stanovenia množstva uvoľneného goserelínu. Uvedené mikročastice uvoľňujú účinnú látku počas asi piatich týždňov, pričom počas siedmeho týždňa celkom vymizne z inkubačného prostredia.

Polymérna kompozícia použitá pri tomto experimente je tvorená zmesou dvoch kopolymérov rovnakého laktido-glykolidového zloženia, ktoré však majú značne odlišné molekulové hmotnosti a ktoré vo forme uvedenej zmesi sú nerozpustné v benzéne a majú hmotnostnú strednú molekulovú hmotnosť 108 000 Da, polydisperezitu 5,1 a vnútornú

viskozitu 1 % (hmotn./obj.) roztoku v chloroforme pri teplote 25 °C rovnajúcu sa 0,72 dl/g.

Tieto experimenty ilustrujú použiteľnosť v benzéne nerozpustných polyesterov, ktoré majú molekulovú hmotnosť a vysokú polydisperzitu, na uvoľňovanie goserelínu v priebehu relatívne krátkej časovej periódy 5 až 7 týždňov.

Obdobné mikroparticulárne formulácie sa môžu pripraviť nahradením goserelín-acetátu buď prirodzene sa vyskytujúcimi analógmi hormónov uvoľňujúcich gonadotropín alebo ďalšími vysoko potentnými syntetickými analógmi (agonistické alebo antagonistické) hormónu, ktorý uvoľňuje gonadotropín, akými sú tryptorelín, leuprorelín, buserelín alebo nafarelín, výhodne vo forme acetátových solí alebo solí s ďalšími slabými kyselinami, alebo ľubovoľným ďalším polypeptidovým hormónom, ktorý reguluje alebo moduluje sekréciu intaktných gonadotropínov alebo oboch individuálnych gonadotropínových podjednotiek.

Príklad 3

Goserelín-acetát (101 mg, toto množstvo je ekvivalentné asi 86 mg goserelínu vo forme voľnej zásady) a kyselina poly-D,L-mliečna (100 mol. %, 299,7 mg), ktorá je rozpustná v benzéne a má hmotnostnú strednú molekulovú hmotnosť rovnajúcu sa asi 5400 Da, vnútornú viskozitu 1 % (hmotn./obj.) roztoku v chloroforme pri teplote 25 °C rovnajúcu sa 0,08 dl/g a polydisperzitu rovnajúcu sa 1,8, sa rozpustí v ľadovej kyseline octovej (4 ml) bez anhydridu.

Získaný roztok goserelínu a polyesteru v kyseline octovej sa po kvapkách pridá ku kvapalnému dusíku, následne sa zmrazené kvapky izolujú a lyofilizujú vo vákuu počas 24 hodín a potom sa dosušia pri teplote 55 °C počas 24 hodín.

i) Získaný vysušený produkt sa pridá k dichlórmetánu (4 ml) za vzniku najprv zakalenej zmesi, ktorej zákal sa rýchlo rozpustí za vzniku číreho roztoku, ktorý sa prefiltruje cez 0,2 µm nylonový sterilizujúci filter.

Tento experiment ukazuje, že roztoky polyesterovej soli goserelínu sa môžu sterilizačne prefiltrovať a to na rozdiel od zmesí alebo disperzií čistých solí účinnej látky v organickom roztoku polyesteru.

ii) K číremu dichlórmetánovému roztoku (1 ml), získanému v uvedenom stupni i) sa za intenzívneho miešania pridá kyselina trifluóroctová (50 µl). Dochádza k bezprostrednému vyvráždaniu goserelínu vo forme jeho trifluóracetátovej soli, čo ukazuje, že goserelín je prítomný v dichlórmetánovom roztoku vo forme soli s polyesterom ukončeným karboxylovou skupinou.

Obdobné sterilné roztokové formulácie sa môžu pripraviť nahradením goserelín-acetátu buď prirodzene sa vyskytujúcimi hormónmi, ktoré uvoľňujú gonadotropín alebo ďalšími vysoko potentnými syntetickými analógmi (agonistické alebo antagonistické) hormónu, ktorý uvoľňuje gonadotropín, akými sú tryptorelín, leuprorelín, buserelín alebo nafarelín, výhodne vo forme acetátových solí alebo solí s ďalšími slabými kyselinami, alebo ľubovoľným ďalším polypeptidovým hormónom, ktorý reguluje alebo moduluje sekréciu intaktných gonadotropínov alebo oboch individuálnych gonadotropínových podjednotiek.

Príklad 4

Dichlórmetánový roztok goserelín-polyesteru získaný v príklade 3 (2 ml) sa zriedi väčším množstvom dichlórmetánu a doplní na 10 ml. Tento roztok sa nastrekuje do intenzívne miešaného hexánu (1 liter) za vzniku mikročastíc, ktoré majú po izolácii a vysušení vo vákuu pri teplote 45 °C počas 24 hodín veľkosť asi 2 µm, až asi 30 µm a priemernú veľkosť častíc rovnajúcu sa asi 10 µm. Obsah

goserelínu v týchto mikročasticiach je ekvivalentný obsahu voľnej zásady asi 22 %.

Tieto mikročastice sa inkubujú vo fosfátovej tlmivej soľanke pri pH 7,4 a teplote 37 °C, pričom supernatant sa periodicky analyzuje ultrafialovým svetlom na obsah goserelínu. Goserelín sa uvoľňoval kontinuálne, pričom toto uvoľňovanie sa v podstate ukončilo asi v 8. týždni, zatiaľ čo v 11. týždni mikročastice celkom degradovali a vymizli z inkubačného prostredia. Tento experiment ukazuje použiteľnosť v benzéne rozpustených polyesterov s veľmi nízkou molekulovou hmotnosťou na zaistenie uvoľňovania účinnej látky v priebehu asi dvoch mesiacov.

Ak sa pri uvedených experimentoch goserelín-acetát nahradí trifluóracetátovou soľou, potom sa nezíska číry roztok, ale namiesto toho obsahuje polyesterový roztok v dichlórmetáne v podstate disperziu goserelín-trifluóracetátu. Táto zmes neprechádza cez 0,2 µm filter a v dôsledku toho sa nemôže ani sterilizačne filtrovať, pričom táto disperzia goserelín-trifluóracetátu v polyesterovom roztoku neposkytuje pri nastriekaní do miešaného hexánu mikročastice, ale zrazenú vločkovitú hmotu.

Goserelín-polyesterová soľ má teda vlastnosti, ktoré ju robia omnoho ľahšie formulovateľnou do tvaru mikročastíc, ako je to v prípade zmesi čistej jednoduchej soli v roztoku polyméru s veľmi nízkou molekulovou hmotnosťou.

Obdobné mikročastice sa môžu pripraviť nahradením goserelín-acetátu buď prirodzene sa vyskytujúcimi hormónmi, ktoré uvoľňujú gonadotropín alebo inými vysoko potentnými syntetickými analógmi (agonistické alebo antagonistické) hormónu, ktorý uvoľňuje gonadotropín, akými sú tryptorelín, leuprorelín, buserelín alebo nafarelín, výhodne vo forme acetátových solí alebo solí s ďalšími slabými kyselinami, alebo ľubovoľným peptidovým hormónom, ktorý reguluje alebo moduluje sekréciu intaktných gonadotropínov alebo oboch individuálnych gonadotropínových podjednotiek.

Príklad 5

Goserelín-acetát (304 mg, toto množstvo je ekvivalentné asi 248 mg goserelínu vo forme voľnej zásady) a kyselina poly-D,L-mliečna (102 mg, 100 mol.%), ktorá má hmotnostnú strednú molekulovú hmotnosť asi 5400, vnútornú viskozitu 1 % (hmotn./obj.) roztoku v chloroforme pri teplote 25 °C rovnajúcu sa 0,08 dl/g a polydisperzitu 1,8, sa rozpustí v ľadovej kyseline octovej (2 ml) bez anhydridu. Roztok goserelínu a polyester v kyseline octovej sa potom po kvapkách pridá ku kvapalnému dusíku a získané zmrazené kvapky sa izolujú, lyofilizujú v hlbokom vákuu počas 24 hodín a potom vysušia vo vákuu pri teplote 55 °C počas 24 hodín.

Získaný produkt sa pridá k dichlórmetánu (2 ml) za vzniku zakalenej koloidnej zmesi, ktorá sa v priebehu času celkom nevyčistí. Táto zmes v dichlórmetáne je v podstate tvorená disperziou goserelín-acetátu v goserelín-polyesterovej soli.

Táto disperzia goserelín-acetátu v metylénchloridovom roztoku polyester-goserelínovej soli sa formuluje do mikroparticulárnej formy, obsahujúcej goserelín v množstve, ktoré je ekvivalentné asi 72 % hmotnosti voľnej zásady, pričom voľný goserelín-acetát je tu dispergovaný v kontinuálnej fáze goserelín-polyesterovej soli a uvedené prevodenie do particulárnej formy sa uskutoční sušením rozprašovaním, nástrekom do zmrazovacieho média, jednoduchým zrazením alebo fázovou separačnou konzerváciou.

Obdobné mikročasticové formulácie sa môžu pripraviť nahradením goserelín-acetátu buď prirodzene sa vyskytujúcimi hormónami, ktoré uvoľňujú gonadotropín, alebo ostat-

nými vysoko potentnými syntetickými analógmi (agonistické alebo antagonistické) hormónov, ktoré uvoľňujú gonadotropín, akými sú tryptorelín, leuprorelín, buserelín alebo nafarelín, výhodne vo forme acetátových solí alebo solí s ďalšími slabými kyselinami, alebo ľubovoľným ďalším polypeptidovým hormónom, ktorý reguluje alebo moduluje sekréciu intaktných gonadotropínov alebo oboch jeho individuálnych podjednotiek.

Príklad 6

Kopolyester kyseliny D,L-mliečnej a kyseliny glykovej, ktorý molárne obsahuje 78 % kyseliny D,L-mliečnej a 22 % kyseliny glykovej, sa pripraví kopolykondenzáciou oboch hydroxy-kyselín. Po prečistení získaného kopolyméru pridaním roztoku kopolyesteru v acetóne k metanolu na účely vyzrážania kopolyesteru, po separácii a vysušení vyzrážaného materiálu má kopolyester hmotnostnú strednú molekulovú hmotnosť asi 11000 Da, číselnú strednú molekulovú hmotnosť (ktorá je stanovená nevodnou potenciomrickou titráciou, pričom sa stanovilo, že každý kopolyesterový reťazec obsahuje len jednu karboxylovú kyselinu) 6100 Da a teda polydisperzitu rovnajúcu sa 1,6 a vnútornú viskozitu 1 % (hmotn./obj.) roztoku v chloroforme pri teplote 25 °C rovnajúcu sa 0,15 dl/g.

Goserelín-acetát (228,9 mg, toto množstvo je ekvivalentné asi 200 mg goserelínu vo forme voľnej zásady) a opísaný kopolyester (1,8 g) sa rozpustí v ľadovej kyseline octovej (10 ml) bez anhydridu. Takto získaný goserelín-polyesterový roztok sa po kvapkách pridá ku kvapalnému dusíku a zmrazené kvapky sa izolujú, lyofilizujú počas 24 hodín a nakoniec vysušia pri teplote 50 °C vo vákuu v priebehu 24 hodín.

Vysušená goserelín-polyesterová zmes sa pridá k dichlórmetánu (10 ml) za vzniku najprv zakalenej koloidnej zmesi, ktorá však po 24 hodinách prejde na číry roztok, ktorý sa môže filtrovať cez 0,2 µm nylonový sterilizujúci filter.

Ak sa k malej alikvotnej časti tohto číreho roztoku pridá kyselina trifluóroctová, dochádza k bezprostrednému vyzrážaniu goserelínu vo forme jeho trifluóracetátovej soli, čo ukazuje na to, že v čírom transparentnom dichlórmetánovom roztoku je goserelín v goserelín-polyesterovej zmesi prevažne alebo celkom prítomný vo forme polyesterovej soli.

Dichlórmetánový roztok goserelín-polyesterovej soli sa odparí do sucha a získaný pevný podiel sa suší pri teplote okolia počas 6 hodín a potom pri teplote 55 °C počas 20 hodín vo vákuu za vzniku čirej odliatej fólie obsahujúcej goserelín-polyesterovú soľ.

Vysušená goserelín-polyesterová zmes, pripravená uvedeným spôsobom (1 g), sa rozpustí v 8 ml dichlórmetánu. Získaný roztok sa zavedie do 250 ml viachrdlej banky s guľatým dnom, následne sa roztokom prebubláva prúd dusíka na účely odstránenia celého vzduchu a vytvorí sa atmosféra bez oxidu uhličitého. Do banky sa zavedie voda (90 ml), ktorá sa predbežne odplynila na účely odstránenia všetkého oxidu uhličitého a potom skladovala pod atmosférou dusíka bez oxidu uhličitého a zmes sa intenzívne mieša pri rýchlosti otáčania miešadla asi 500 otáčiek za minútu pod atmosférou, ktorá je v podstate bez oxidu uhličitého. Dichlórmetánový roztok goserelín-polyesterovej soli rýchlo disperguje za vzniku stabilnej disperzie typu (dichlórmetánový roztok soli účinnej látky a polyméru) vo vode. Zatiaľ čo sa disperzia ďalej mieša pri rýchlosti otáčania miešadla 200 otáčok za minútu, vystavuje sa postupne vákuu, pričom podstatné množstvo dichlórmetánu sa takto odparí vo vákuu za vzniku disperzie goserelín-polyesterovej soli vo vo-

de. Lyofilizáciou tejto disperzie sa získajú mikročastice, v ktorých je goserelín prítomný vo forme goserelín-polyesterovej soli, ktorá má strednú veľkosť častíc rovnajúcu sa asi 20 µm a z ktorých sa uvoľňuje goserelín v priebehu asi 6 týždňov v prípade, že sa tieto mikročastice inkubujú v soľanke tlmenej fosfátom na pH 7,4 pri teplote 37 °C a supernatant sa periodicky analyzuje ultrafialovým svetlom na stanovenie uvoľneného goserelínu.

Obdobné mikročastice sa môžu pripraviť inkorporáciou do činidiel vo vodnej fáze, o ktorých je známe, že zlepšujú stabilitu polypeptidov, ich príkladom je manitol. I keď je výhodné uskutočňovať uvedený spôsob v atmosfére, ktorá je bez oxidu uhličitého, je však možné uskutočňovať uvedený spôsob pri dosiahnutí uspokojivých výsledkov v prítomnosti stôp oxidu uhličitého a to v závislosti od molekulovej hmotnosti polyesteru a od obsahu účinnej látky.

Obdobné formulácie na báze sterilného roztoku, odliatej fólie a mikročastíc sa môžu pripraviť nahradením goserelínacetátu buď prírodnými analógmi hormónov, ktoré uvoľňujú gonadotropín, alebo ostatnými vysoko potentnými syntetickými analógmi (agonistické alebo antagonistické), akými sú tryptorelín, leuprorelín, buserelín alebo nafarelín, výhodne vo forme acetátových solí alebo solí s ďalšími slabými kyselinami, alebo ľubovoľným ďalším polypeptidovým hormónom, ktorý môže regulovať alebo modulovať sekréciu intaktných gonadotropínov alebo oboch ich podjednotiek.

Príklad 7

Opakuje sa príklad podľa príkladu 5 za vzniku čirej transparentnej fólie a táto fólia (1 g) sa rozpustí v dichlórmetáne (4 ml). Získaný roztok sa zohreje na teplotu asi 35 °C, následne sa k dichlórmetánovému roztoku goserelín-polyesterovej soli pridá vodný roztok purifikovanej želatíny (15 mg) vo vode (100 µl) s teplotou asi 40 °C a získaná zmes sa intenzívne mieša pri teplote asi 35 °C za vzniku extrémne jemnej disperzie vodného želatínového roztoku v dichlórmetánovom roztoku goserelín-polyesterovej soli. Po ochladení na teplotu okolia si zmes zachováva koloidný charakter suspenzie.

Tento experiment demonštruje, že goserelín-polyesterová soľ má povrchovo aktívne vlastnosti a že sa môže použiť na získanie stabilných disperzií v olejovej fáze, akou je dichlórmetán, vodných roztokov alebo iných vo vode rozpustných činidiel, akými sú želatína, polysacharidy a ďalšie hydrofilné polyméry, alebo opačne.

Opakuje sa postup podľa príkladu 6 s použitím opísanej disperzie vodnej želatíny v dichlórmetánovom roztoku goserelín-polyesterovej soli za vzniku mikrokapsulového produktu, ktorý obsahuje tak želatínu, ako i goserelín-polyesterovú soľ.

Vo vodnej polymérnej fáze sa môžu inkorporovať i ďalšie nízkomolekulárne zlúčeniny. Najmä je niekedy užitočné použiť zlúčeniny ako manitol, o ktorých je známe, že zvyšujú stabilitu peptidov. Alternatívne sa môžu tieto stabilizačné činidlá inkorporovať v oboch vodných fázach komplexnej disperzie typu voda-v-oleji-vo-vode, obsahujúcej vodnú želatínu dispergovanú v dichlórmetánovom roztoku goserelín-polyesterovej soli, pričom získaná disperzia typu voda-v-oleji je zasa dispergovaná vo vode.

Obdobné suspenzné a mikroparticulárne formulácie sa môžu pripraviť nahradením goserelín-acetátu inými vysoko potentnými analógmi (agonistické alebo antagonistické) hormónu, ktorý uvoľňuje gonadotropín, akými sú tryptorelín, leuprorelín, buserelín alebo nafarelín, výhodne vo forme acetátových solí alebo solí s ostatnými slabými kyselinami, alebo ľubovoľným ďalším polypeptidovým hormó-

nom, ktorý môže regulovať alebo modulovať sekréciu intaktných gonadotropínov alebo oboch ich podjednotiek.

Príklad 8

Goserelín-acetát (771 mg, toto množstvo je ekvivalentné asi 670 mg goserelínu vo forme voľnej zásady), kopolymér kyseliny D,L-mliečnej a kyseliny glykolovej (D,L-laktido-glykolidový kopolymér, 1,8 g, molárne 95/5), ktorý má hmotnostnú strednú molekulovú hmotnosť asi 3600 Da a vnútornú viskozitu 1 % (hmotn./obj.) chloroformového roztoku pri teplote 25 °C rovnajúcu sa 0,08 dl/g, a D,L-laktido-glykolidónový kopolymér, ktorý má hmotnostnú strednú molekulovú hmotnosť asi 15 000 Da a vnútornú viskozitu 1 % (hmotn./obj.) chloroformového roztoku pri teplote 25 °C rovnajúcu sa 0,17 dl/g (4,2 g) sa rozpustí v ľadovej kyseline octovej (70 ml) bez anhydridu. Kombinované polyméry majú hmotnostnú strednú molekulovú hmotnosť asi 12 300 Da a polydisperzitu asi 2,6. Získaný goserelín-polyesterový roztok sa po kvapkách pridá do kvapalného dusíka a zmrazené kvapky sa izolujú a lyofilizujú v hlbokom vákuu počas asi 18 hod. Produkt tvorený zmesou účinnej látky a polyméru sa nakoniec suší v hlbokom vákuu pri teplote 55 °C počas 24 hodín.

Vysušená zmes účinnej látky a polyméru (6 g) sa pridá k dichlórmetánu (60 ml) za vzniku zakalenej koloidnej zmesi, ktorá sa v priebehu jednej hodiny postupne vyčistí za vzniku čirého roztoku goserelín-polyesterovej soli v dichlórmetáne.

Tento roztok sa potom vysuší rozprašením s použitím Buchiho rozprašovacej sušiarne, pričom vstupná teplota je 60 °C a výstupná teplota je 35 °C, získajú sa približne sférické mikročastice, ktoré majú priemer od asi 1 do asi 10 µm.

V týchto mikročasticiach je účinná látka prítomná v podstate celkom ako goserelín-polyesterová soľ v prípade, že obsah kyseliny octovej vyjadrený ako voľná kyselina alebo ako anión je nižší alebo rovnajúci sa 0,06 % a to na rozdiel od prípadu, ak by bolo žiaduce, aby goserelín bol prítomný vo forme acetátovej soli a ak by uvedený obsah bol 0,6 až 0,7 %.

Tieto mikročastice po spracovaní lisovaním pri teplote 80 °C poskytnú čiru, transparentnú a krehkú fóliu.

Tento experiment demonštruje užitočnosť peptidových solí s nízkomolekulárnymi polyesterami rozpustnými v benzéne, ktoré majú prípadne vysokú polydisperzitu.

Obdobné roztokové, mikroparticulárne a tvárnené formulácie sa môžu pripraviť nahradením goserelín-acetátu buď prirodzene sa vyskytujúcimi hormónmi, ktoré uvoľňujú gonadotropín, alebo ďalšími vysoko potentnými syntetickými analógmi (antagonistami alebo agonistami) hormónu uvoľňujúceho gonadotropín, akými sú tryptorelín, leuprorelín, buserelín alebo nafarelín, výhodne vo forme acetátových solí alebo solí s ďalšími slabými kyselinami, alebo ľubovoľným ďalším polypeptidovým hormónom, ktorý reguluje sekréciu intaktných gonadotropínov alebo oboch ich podjednotiek.

Príklad 9

Goserelín-acetát a ďalšie vysoko potentné syntetické agonizujúce činidlá hormónu, ktorý uvoľňuje gonadotropín sú selektívne chemické kastráčne činidlá, ktoré sa používajú pri liečení hormonálnych dependentných rakovín, medzi ktoré patria rakovina prostaty u mužov a premenopauzálna rakovina prsní u žien. Tieto účinné látky sa tiež užívajú na liečenie nemalígnych gynekologických stavov u žien, pričom mechanizmus ich pôsobenia spočíva v konečnom potlačení sekrécie gonadotropínov hlienom, čo zase vedie k

potláčaniu pohlavných hormónov, akými sú estrogén u žien a testosterón u mužov.

Kontinuálne pravidelné uvoľňovanie takýchto účinných látok sa môže takto výhodne vyhodnotiť pri normálnych dospelých samičkách potkanov, ktoré majú normálne cykly sekrécie estrogénu. Pri týchto zvieratách má takýto cyklus dĺžku asi 4 dni a existencia pozitívnej sekrécie estrogénu sa môže detekovať prítomnosťou len zrohovateľých buniek v pošvovom výtere, vykonanom v deň oestru. Ak je zvierka chemicky kastrovaná účinnou látkou, akou je goserelín, potom k oestru nedochádza, čo zase vedie k absencii uvedených zrohovateľých buniek v pošvovom výtere. Pri pokusných zvieratách došlo k prolongovanej perióde potláčania sekrécie pohlavného hormónu, indukovanej chemickou kastráciou, pričom toto potláčanie produkcie pohlavného hormónu sa udržiavalo tak dlho, pokiaľ dochádzalo k uvoľňovaniu účinného množstva účinnej látky.

i) Mikročastice získané v príklade 8 (450 mg) sa dispergujú vo vode, ktorá obsahuje 2 % (hmotn./obj.) natriumkarboxymetylcelulózy a 0,2 % (hmotn./obj.) produktu Polysorbate 80 a objem disperzie sa doplní vodou na 3 ml. 0,2 ml (toto množstvo je ekvivalentné asi 3 mg goserelínu vo forme voľnej zásady) sa subkutánne injikuje 10 normálnym dospelým samičkám potkanov, ktoré majú pravidelný cyklus sekrécie pohlavného hormónu, pričom účinok účinnej látky na uvedený cyklus sa vyhodnocuje mikroskopickým skúmaním pošvových výterov. Pokusné zvieratá vstúpili do kontinuálnej fázy dioestru, t. j. chemickej kastrácie, trvajúcej 95 ± 3 dni.

Tento experiment ukazuje, že vodná suspenzná formulácia goserelín-polyesterovej soli na báze nízkomolekulárneho polyesteru rozpustného v benzéne poskytuje relatívne dlhú periódu regulovaného uvoľňovania počas asi troch mesiacoch peptidovej účinnej látky, ktorá má metabolický polčas len asi 4 až 6 dní.

ii) Mikročastice získané v príklade 8 (450 mg) sa dispergujú v etyloleáte a objem disperzie sa doplní na 3 ml. 0,2 ml tejto formulácie sa subkutánne injekciou podá šiestim samičkám potkanov, ktoré majú pravidelný cyklus sekrécie pohlavného hormónu. Pokusné zvieratá vstúpili do kontinuálnej fázy dioestru trvajúcej 81 ± 3 dni.

Tento experiment ukazuje, že roztoková formulácia goserelín-polyesterovej soli v organickom injekčnom nosiči, ktorý nerozpúšťa samotný polyester, poskytuje relatívne dlhú periódu regulovaného uvoľňovania peptidovej účinnej látky.

Príklad 10

Leuprorelín-acetát (50,3 mg) a kopolyester obsahujúci 78 mol. % kyseliny D,L-mliečnej a 22 mol. % kyseliny glykolovej (453,2 mg) a opísaný v uvedenom príklade 6 sa rozpustí v ľadovej kyseline octovej (5 ml) bez anhydridu. Získaný roztok sa po kvapkách pridá ku kvapalnému dusíku a zmrazené kvapky sa lyofilizujú v hlbokom vákuu počas 22 hodín, následne sa sušia v hlbokom vákuu pri teplote 55 °C počas 24 hodín.

Získaný produkt (500 mg) sa rozpustí v redestilovanom acetóne (10 ml) v 100 ml banke s guľatým dnom za vzniku najprv zakalenej koloidnej zmesi, ktorá sa postupne vyčistí za vzniku transparentného roztoku. Acetón sa odparí vo vákuu a získaná číra fólia sa suší v hlbokom vákuu pri teplote 55 °C počas 4 hodín. Táto fólia leuprorelín-polyesterovej soli sa opäť rozpustí v acetóne (10 ml) a získaný roztok sa odplyní a prepláchnie dusikom.

Čerstvo destilovaná voda (200 ml) sa intenzívne mieša pod atmosférou dusíka, následne sa do takto miešanej vody nastrieka uvedený acetónový roztok leuprorelín-polyeste-

rovej soli. Keď sa na povrch vody nastrieka celý acetónový roztok, v miešaní sa pokračuje ešte počas jednej hodiny, následne sa zmes nechá usadiť. Mikročastice leuprorelín-polyesterovej soli sa usadia na dne banky a vodný supernatant sa odleje. Izolované mikročastice sa opätovne resuspendujú v ďalšom podieli (asi 200 ml) vody bez oxidu uhličitého a získaná suspenzia sa mieša pod atmosférou dusíka počas jednej hodiny. Mikročastice sa oddelia najskôr dekantáciou vodnej vrstvy po usadení mikročastíc a potom prefiltrovaním zvyšku na účely oddelenia mikročastíc od prebytku vody. Tieto mikročastice sa potom sušia vo vákuu pri teplote 30 °C počas 24 hodín za vzniku produktu, ktorý má strednú veľkosť častíc asi 15 µm.

Táto mikroparticulárna formulácia leuprorelín-polyesterovej soli sa inkubuje v soľanke tmenej fosfátom na pH 7,4 pri teplote 37 °C, pričom sa supernatant periodicky analyzuje ultrafialovým svetlom na účely stanovenia uvoľneného leuprorelínu. Tento leuprorelín sa kontinuálne uvoľňoval počas asi 5 týždňov, pričom v priebehu tejto časovej periódy prišlo k úplnému odbúrianiu formulácie.

Obdobné mikroparticulárne formulácie sa môžu pripraviť nahradením leuprorelínu buď prirodzene sa vyskytujúcimi hormónmi, ktoré uvoľňujú gonadotropín, alebo inými vysoko potentnými syntetickými analógmi (agonistickými alebo antagonistickými) hormónu, uvoľňujúceho gonadotropín, akými sú tryptorelín, leuprorelín, buserelín alebo nafarelín, výhodne vo forme acetátových solí alebo ďalších solí so slabými kyselinami, alebo ľubovoľným iným polypeptidovým hormónom, ktorý reguluje sekréciu intaktných gonadotropínov alebo oboch gonadotropínových podjednotiek.

Príklad 11

i) Goserelín-acetát (2,28 g, toto množstvo je ekvivalentné asi 2,00 g goserelínu vo forme voľnej zásady) sa rozpustí v ľadovej kyseline octovej (60 ml) bez anhydridu. Zmes dvoch kopolymérov kyseliny D,L-mliečnej a kyseliny glykovej (molárne 95/5) (12,6 g kopolyméru s hmotnostnou strednou molekulovou hmotnosťou 15,846, polydisperzitou 1,38 a 5,4 g kopolyméru s hmotnostnou strednou molekulovou hmotnosťou 3,896 a polydisperzitou 1,78) poskytujúcou prebytok kopolymérnych koncových karboxylových skupín vzhľadom na zásaditú účinnú látku, sa rozpustí za miešania v ľadovej kyseline octovej (150 ml) za vzniku číreho roztoku. Roztok účinnej látky sa pridá k roztoku kopolyméru a zmes sa intenzívne premieša. Táto zmes sa potom po kvapkách pridá ku kvapalnému dusíku a zmrazené častice vo forme malých perličiek sa potom lyofilizujú počas dvoch dní v Edwardsovej hlbokovákuovej lyofilizačnej aparatúre. Takto vysušený materiál sa potom dosuší vo vákuu pri teplote 50 až 55 °C vo vákuovej sušiarňi počas 24 hodín.

Takto vysušený produkt sa potom pridá (100 mg) k dichlórmetánu (1 ml), pričom v priebehu 2 hodín dôjde k jeho rozpusteniu za vzniku číreho roztoku. V tomto prípade je ukázané, že tvorbou polyester-goserelínovej soli sa dosiahne tak dobrá rozpustnosť účinnej látky, že sa táto môže rozpúšťať v nepolárnom rozpúšťadle.

ii) Goserelín-acetát (2,28 g, toto množstvo je ekvivalentné asi 2,00 g goserelínu vo forme voľnej zásady) sa rozpustí v ľadovej kyseline octovej (60 ml) bez anhydridu. Zmes dvoch 100 mol. % polymérov kyseliny D,L-mliečnej (12,6 g polyméru s hmotnostnou molekulovou hmotnosťou 15,178, polydisperzitou 1,27 a 5,5 g polyméru s hmotnostnou molekulovou hmotnosťou 4,204, polydisperzitou 1,84), poskytujúca prebytok polymérnych koncových karboxylových skupín vzhľadom na zásaditú účinnú látku, sa za miešania rozpustí v ľadovej kyseline octovej (150 ml) bez anhydridu za vzniku číreho roztoku. Roztok účinnej látky sa pridá k roztoku kopolyméru a zmes sa dôkladne premieša. Táto zmes sa potom po kvapkách pridá do kvapalného dusíka, pričom sa získajú zmrazené malé perličky, ktoré sa lyofilizujú počas dvoch dní s použitím Edwardsovej vysokovákuovej lyofilizačnej aparatúry a takto vysušený materiál sa potom dosuší vo vákuu pri teplote 50 až 55 °C vo vákuovej sušiarňi v priebehu 24 hodín.

šania rozpustí v ľadovej kyseline octovej (150 ml) bez anhydridu za vzniku číreho roztoku. K tomuto roztoku polyméru sa pridá roztok účinnej látky a zmes sa dôkladne premieša, následne sa po kvapkách pridá ku kvapalnému dusíku a získané zmrazené perličky sa potom lyofilizujú počas dvoch dní s použitím Edwardsovej hlbokovákuovej lyofilizačnej aparatúry, následne sa takto vysušený materiál dosuší vo vákuovej sušiarňi pri teplote 50 až 55 °C počas 24 hodín.

Takto vysušený produkt (100 mg) sa potom pridá k dichlórmetánu (1 ml), pričom sa celý pevný produkt celkom rozpustí v priebehu dvoch hodín za vzniku číreho roztoku. V tomto prípade sa demonštrovalo, že tvorba polyester-goserelínovej soli robí účinnú látku do tej miery rozpustnú, že táto látka sa môže rozpúšťať v nepolárnom rozpúšťadle.

iii) Goserelín-acetát (2,28 g, toto množstvo je ekvivalentné asi 2,00 g goserelínu vo forme voľnej zásady) sa rozpustí v ľadovej kyseline octovej (60 ml) bez anhydridu. Zmes kopolyméru kyseliny D,L-mliečnej a kyseliny polyglykovej (80/20 mol. %, 12,6 g kopolyméru s hmotnostnou strednou molekulovou hmotnosťou 160,510 a polydisperzitou 2,27) a kopolyméru kyseliny D,L-mliečnej a kyseliny glykovej (95/5 mol. %, 5,4 g kopolyméru s hmotnostnou strednou molekulovou hmotnosťou 3,896 a polydisperzitou 1,78), poskytujúca prebytok kopolymérnych koncových karboxylových skupín vzhľadom na zásaditú účinnú látku, sa rozpustí za miešania v ľadovej kyseline octovej (150 ml) bez anhydridu za vzniku číreho roztoku. Roztok účinnej látky sa pridá k roztoku kopolyméru a zmes sa dôkladne premieša. Táto zmes sa potom po kvapkách pridá ku kvapalnému dusíku a získané zmrazené malé perličky sa potom lyofilizujú v Edwardsovej vákuovej lyofilizačnej aparatúre vo vákuu pri teplote 50 až 55 °C (vo vákuovej sušiarňi) počas 24 hodín.

Tento vysušený produkt (100 mg) sa pridá k dichlórmetánu (1 ml), pričom sa celý pevný podiel celkom rozpustí v priebehu dvoch hodín za vzniku číreho roztoku. Týmto príkladom sa demonštruje skutočnosť, že tvorba polyester-goserelínovej soli robí účinnú látku tak dobre rozpustnou, že sa môže rozpúšťať v nepolárnom rozpúšťadle.

iv) Goserelín-acetát (2,17 g, toto množstvo je ekvivalentné asi 190 g goserelínu vo forme voľnej zásady) sa rozpustí v kyseline octovej (ľadovej) bez anhydridu (60 ml). Zmes dvoch kopolymérov kyseliny D,L-mliečnej a kyseliny polyglykovej (67/33 mol. %) (12,0 g kopolymérov s hmotnostnou strednou molekulovou hmotnosťou 35 833, polydisperzitou 1,83 a 5,15 g kopolyméru s hmotnostnou strednou molekulovou hmotnosťou 4116 a polydisperzitou 1,86), poskytujúca prebytok polymérnych koncových karboxylových skupín vzhľadom na zásaditú látku, sa rozpustí za miešania v ľadovej kyseline octovej (150 ml) bez anhydridu za vzniku číreho roztoku. Roztok účinnej látky sa pridá k roztoku kopolyméru a zmes sa dôkladne premieša. Táto zmes sa potom po kvapkách pridá do kvapalného dusíka, pričom sa získajú zmrazené malé perličky, ktoré sa lyofilizujú počas dvoch dní s použitím Edwardsovej vysokovákuovej lyofilizačnej aparatúry a takto vysušený materiál sa potom dosuší vo vákuu pri teplote 50 až 55 °C vo vákuovej sušiarňi v priebehu 24 hodín.

Tento vysušený produkt (100 mg) sa pridá k dichlórmetánu (1 ml), pričom sa celý pevný podiel celkom rozpustí v priebehu 10 minút za vzniku číreho roztoku. Týmto príkladom je demonštrovaná skutočnosť, že tvorba polyester-goserelínovej soli robí účinnú látku tak dobre rozpust-

tnou, že táto účinná látka sa môže rozpúšťať v nepolárnom rozpúšťadle.

Porovnávací príklad

Goserelín-acetát (2,28 g, toto množstvo je ekvivalentné asi 2,00 g goserelínu vo forme voľnej zásady) sa rozpustí v kyseline octovej (60 ml) bez anhydridu. Kopolymér kyseliny D,L-mliečnej a kyseliny polyglykolovej (50/50 mol. %, 18,0 g polyméru s hmotnostnou strednou molekulovou hmotnosťou 22 307 a polydisperzitou 2,07), poskytujúci približne stechiometrický ekvivalent kopolymérnych koncových karboxylových skupín vzhľadom na zásaditú účinnú látku, sa za miešania rozpustí v ľadovej kyseline octovej (150 ml) bez anhydridu za vzniku číreho roztoku. Roztok účinnej látky sa pridá k roztoku polyméru a zmes sa dôkladne premieša. Táto zmes sa potom po kvapkách pridá do kvapalného dusíka za vzniku malých zmrazených perličiek, ktoré sa potom lyofilizujú počas dvoch dní s použitím Edwardsovej vysokovákuovej lyofilizačnej aparatury a takto vysušený materiál sa potom dosuší vo vákuovej sušiarňi pri teplote 50 až 55 °C počas 24 hodín.

Tento vysušený produkt (100 mg) sa pridá k dichlórmetánu (1 ml), pričom ani po 4 hodinách sa celý pevný podiel nerozpustí a k úplnému rozpusteniu dôjde až po 4 dňoch a to za vzniku číreho roztoku. Týmto príkladom je demonštrovaná skutočnosť, že tvorbou polyester-goserelínovej soli sa tak dobrá rozpustnosť účinnej látky, aby sa táto látka mohla rozpúšťať v nepolárnom rozpúšťadle, dosiahne omnoho ľahšie v prípade, keď sú kopolymérne koncové karboxylové skupiny prítomné v prebytku vzhľadom na zásaditú účinnú látku.

Vysušené produkty i) až iv) sa rozpustia v dichlórmetáne a získané roztoky sa vysušia rozprašovaním v Buchiho laboratórnej rozprašovacej sušiarňi (Buch 190) v súlade s údajmi uvedenými v nasledujúcej tabuľke:

Produkt	Pomer produktu k rozpúšťadlu (%)	Vstupná teplota (°C)	Výstupná teplota (°C)
i)	10	48	32
ii)	10	58	38
iii)	2	58	44
iv)	10	55	35

Sušenie rozprašovacích produktov i) až iv) poskytne malé častice s priemerom približne 1 až 10 µm, pričom tieto rozmery sa zistili elektrónovým skanovacím mikroskopom.

Finálne častice sa analyzujú plynovým chromatografom s medznou detekciou približne rovnajúcou sa 0,03 % na účely stanovenia obsahu kyseliny octovej. S použitím tohto detekčného vybavenia sa v týchto formuláciách nestanovila žiadna kyselina octová, čo demonštruje, že účinná látka je prítomná ako polyesterová soľ a nie ako acetátová soľ, lebo pri existencii acetátovej soli by bolo nutné očakávať obsah kyseliny octovej približne rovnajúci sa 0,5 %.

Častice získané sušením rozprašovaním (50 mg) i) až iv) sa rozpustia v dichlórmetáne (0,5 ml) za vzniku číreho roztoku. Ku každému sa pridá kvapka kyseliny trifluórotovej, čo má vo všetkých prípadoch za následok tvorbu bielej zrazeniny. Vzorky sa odstredia na účely izolácie zrazenín, ktoré sa potom premyjú dichlórmetánom. Analýza uskutočnená tlakovou kvapalinovou chromatografiou (HPLC) ukazuje, že vyzrážanou látkou je goserelín. Tieto príklady ukazujú, že účinná látka je vytesnená z jej soli s polyesterom v roztoku v nepolárnom rozpúšťadle pridaním silnej kyseliny a že je to spôsobené tým, že rozpustnosť účinnej látky v nepolárnom rozpúšťadle sa vráti k očakávanej rozpustnosti soli peptidovej účinnej látky s kyselinou (táto soľ je nerozpustná).

Príklad 12

Častice získané sušením rozprašovaním i) až iv) v príklade 11 sa dispergujú (18 % hmotn./obj.) vo vhodnom nosiči pre injekcie (2 % natriumkarboxymetylcelulózy, Fluka, stredná viskozita, 0,2 % produktu polysorbát 80, Fluka).

Častice získané sušením rozprašovaním v príklade 11, dispergované v uvedenom injekčnom nosiči, sa injikujú deťom samičkám potkanov Wistar. Z chvostov piatich potkanov sa 7., 14. a 29. deň odoberú krvné vzorky a tieto krvné vzorky sa analyzujú na účely stanovenia obsahu goserelínu s použitím radiačne-imunitného stanovenia uskutočneného na báze známej špecifickej reakcie s účinnou látkou a preukázanej absencie krížovej reaktivity za vzniku metabolitov.

Výsledky týchto experimentov ukazujú, že táto formulácia poskytuje merateľné hladiny goserelínu v krvi počas aspoň 4 týždňov.

Príklad 13

Produkt ii) získaný sušením rozprašovaním v príklade 11 sa disperguje v nasledujúcich vodných nosičoch pre injekcie:

- natriumkarboxymetylcelulóza (produkt so strednou viskozitou, Fluka) 1,0 % a polysorbát 80 (Tween) 0,75 %,
- metylcelulóza (15 mPa.s, Fluka) 0,75 % a polysorbát 80 (Tween) 0,75 %.

Uvedené formulácie dobre dispergované v týchto nosičoch sú vhodné pre parenterálne podania.

Príklad 14

Produkt ii) získaný sušením rozprašovaním v príklade 11 (400 mg) sa rozpustí v dichlórmetáne (4 ml). Takto získaný roztok sa s použitím injekčnej striekačky pridá k 0,25 % roztoku polyvinylalkoholu vo vode (Aldrich, zo 75 % hydrolyzovaný produkt, molekulová hmotnosť 2000), ktorý sa mieša pri rýchlosti otáčania miešadla 2500 otáčok za minútu. Po dvoch minútach miešania sa rýchlosť zníži na 800 otáčok za minútu a v miešaní sa pokračuje ešte počas 30 minút. Potom sa miešanie preruší a vytvorené častice sa nechajú usadiť. Polyvinylalkoholový roztok sa dekantuje a častice sa dvakrát premyjú ľadovo chladnou vodou a izolujú sa odstredením. Častice sa nakoniec vysušia lyofilizáciou a finálnym produktom je jemný partikulárny produkt obsahujúci goserelín.

Príklad 15

Produkt iv) získaný sušením rozprašovaním v príklade 11 sa pri teplote 82 °C vytlačí za vzniku valcového extrudátu, ktorý má priemer približne jeden milimeter. Tento extrudát sa nareže na úseky majúce hmotnosť asi 36 mg a ktoré obsahujú približne 3,6 mg goserelínu. Tento extrudát celkom prepúšťa svetlo a nemá teda bielu farbu, ktorá je typická pre jednoduché zmesi účinnej látky a polyméru, pripravené bez tvárnenia, ktoré sa použilo pri tvárnení soli peptidu s polyesterom. Toto biele zafarbenie má napríklad komerčne dostupný depotný Zoladex (Zoladex je ochranná známka). Činosť získaného extrudátu indikuje, že peptidový goserelín je zlúčiteľný s polyesterovou fázou a že vzhľadom na ňu netvorí separátnu fázu, v ktorej by dochádzalo k rozptylu svetla a teda k vzniku bieleho zafarbenia. K tejto zlúčiteľnosti môže dôjsť len v prípade, ak je peptid v rovnakej fáze ako polymér, t. j. keď je prítomný vo forme soli s polyesterom.

Každá takáto 3,6 mg depotná forma sa implantovala pod anestéziou 21 potkanom Wistar. Po uplynutí určitých časových úsekov sa vždy tri potkany zabilí a uvedené depotné formy sa opäť vyoperovali. Takto získané depotné

formy sa rozpustili v ľadovej kyseline octovej v odmernej banke a polymér sa vyzrážal pridaním prebytku vody. Polymér sa potom odfiltroval (cez filter Millex 0,5 µm) a filtráty sa analyzovali tlakovou kvapalinovou chromatografiou (HPLC) na účely stanovenia obsahu účinnej látky. Vypočítala sa profil uvoľňovania účinnej látky v depótnej forme, ktorá sa neimplantovala a ktorá sa analyzovala rovnakým spôsobom. Uvedené depótne formy soli účinnej látky s polyesterom poskytujú pravidelné goserelíny in vivo počas aspoň 4 týždňov.

Príklad 16

i) Laktid/glykolidový kopolymér (95/5) s jednou koncovou karboxylovou skupinou (8,87 g, molekulová hmotnosť $M_w = 5750$, molekulová hmotnosť stanovená titráciou koncovkej skupiny = 2516 g/mol, polydisperzita = 1,5, vnútorná viskozita 1 % (hmotn./obj.) roztoku v chloroforme = 0,10 dl/g) sa rozpustí v dichlórmetáne (50 ml) za miešania. K takto získanému roztoku sa pridá 1,13 g goserelín-acetátu za vzniku kalnej suspenzie. Za miešania sa pridá metanol (5 ml), pričom po 30 minútach sa zmes celkom vyčerí. Rozpúšťadlo sa potom odstráni v rotačnom odparovači za vzniku jasného produktu. Tento produkt sa opätovne rozpustí v dichlórmetáne (50 ml) a rozpúšťadlo sa opätovne odstráni v rotačnom odparovači. Toto opätovné rozpustenie a odparenie rozpúšťadla sa opakuje ešte dvakrát za vzniku veľmi viskózne tekutiny, ktorá sa vysuší v hlbokom vákuu za vzniku bielej peny. Táto pena sa rozotrie a vysuší vo vákuu v priebehu 24 hodín pri teplote okolia, pričom sa ako finálny produkt získa jemný amorfný pevný produkt.

ii) Postup opísaný v odseku i) sa opakuje s použitím laktido/glykolidového kopolyméru (75/25) s jednou koncovou karboxylovou kyselinou (8,87 g, $M_w = 10\,900$, polydisperzita = 1,85, molekulová hmotnosť stanovená titráciou koncovkej skupiny = 3210 g/mol, vnútorná viskozita 1% (hmotn./obj.) v chloroforme = 0,14 dl/g), pričom sa získa jemný amorfný pevný produkt.

Formulácia 1

Goserelín-laktido/glykolidový polymér z odseku i) (1 g) sa pridá k benzylbenzoátu (99 %, od firmy Janssen, 2 ml) a zmes sa zohrieva s použitím ručne držaného fúkača horúceho vzduchu až do okamihu, keď sa zmes za miešania rozpustí. 110 µl takto získanej roztokovej formulácie obsahuje 3,6 mg goserelínu.

Formulácia 2

Táto formulácia je rovnaká ako formulácia 1 s výnimkou, ktorá spočíva v tom, že sa ako rozpúšťadlo použije zmes (1,7 ml) 67 % benzylbenzoátu (99 % od firmy Janssen) a 33 % benzylalkoholu (99 %, bezvodý, od firmy Aldrich). 100 µl tejto roztokovej formulácie obsahuje 3,6 mg goserelínu.

Formulácia 3

Táto formulácia je rovnaká ako formulácia 1 s výnimkou, ktorá spočíva v tom, že sa ako rozpúšťadlo použije benzylalkohol (1,7 ml, bezvodý, 99 % od firmy Aldrich). 100 µl tejto roztokovej formulácie obsahuje 3,6 mg goserelínu.

Formulácia 4

Táto formulácia je rovnaká ako formulácia 1 s výnimkou, ktorá spočíva v tom, že sa použije goserelín-laktido/glykolido-polymérna soľ z uvedeného odseku ii) (1 g) a 3 ml benzylbenzoátu. 150 µl tejto roztokovej formulácie obsahuje 3,6 mg goserelínu.

Formulácia 5

Táto formulácia je rovnaká ako formulácia 4 s výnimkou, ktorá spočíva v tom, že sa použije rozpúšťadlová zmes z formulácie 2.

Formulácia 6

Táto formulácia je rovnaká ako formulácia 4 s výnimkou, ktorá spočíva v tom, že sa použije rozpúšťadlo z formulácie 3. 100 µl tejto roztokovej formulácie obsahuje 3,6 mg goserelínu.

Biologické vyhodnotenie

Uvoľňovanie goserelínu z uvedených formulácií 1 až 6 in vivo sa vyhodnotí skúmaním denných pošvových výterov samičiek potkanov, ktorým sa podali uvedené formulácie. Normálny cyklus oestru (oestrus, dioestrus, metoestrus, prooestrus) sa môže sledovať podľa množstva rôznych bunkových typov (leukocyty, epiteliálne bunky a zrohovatelé bunky) v pošvovom výtere samíc. V prípade, že je uvoľňovanie účinnej látky z formulácií plynulé, potom dôjde k prerušeniu normálneho cyklu oestru a samičky potkanov zostanú v dioestre tak dlho, pokiaľ pokračuje uvoľňovanie goserelínu.

Formulácie 1 až 6 sa podali skupinám ($n = 6$) samičiek potkanov s pravidelným cyklom oestru v dávke 3,6 mg goserelínu na každého potkana. Pre subkutánne dávkovanie uvedených formulácií sa použila injekčná striekačka s ihlou kalibru 20. Ako kontrolná skupina 5 pokusných zvierat sa použila skupina 5 myší, ktorým sa účinná látka nepodala. Samičkám potkanov sa denne odoberali pošvové výtery a tieto sa skúmali na účely určenia štádia oestru pokusných zvierat, pričom získané výsledky sú uvedené v nasledujúcej tabuľke:

Číslo formulácie	Priemerný čas trvania dioestru (dni) (\pm štandardná odchýlka)
1	100 \pm 2,7
2	120 \pm 6,3
3	69 \pm 5,9
4	59 \pm 1,2
5	61 \pm 2,1
6	53 \pm 3,7

Z týchto výsledkov je zrejmé, že všetkých šesť formulácií poskytuje časovú periódu uvoľňovania goserelínu dlhšiu ako 6 týždňov, pričom formulácia 1 a formulácia 2 uvoľňuje goserelín počas troch mesiacov alebo ešte dlhšie. Z týchto výsledkov je ďalej jasné, že formulácie goserelín-polyesterovej soli môžu existovať vo forme roztokov, ktoré sa môžu ľahšie podať parenterálne s použitím injekčných ihiel úzkych kalibrov a že takéto formulácie sú vhodné na liečenie hormónovo dependentných nádorov u ľudí.

Príklad 17

Formulácia 1

Táto formulácia je rovnaká ako formulácia z príkladu 16.

Formulácia 2

Opakuje sa postup opísaný v príklade 16 i) s použitím polyaktidového homopolyméru s jednou koncovou karboxylovou skupinou ($M_w = 5092$, polydisperzita = 1,44, molekulová hmotnosť stanovená titráciou koncovkej skupiny = 2270 g/mol a goserelín-acetátu (0,46 g). Obsah kyseliny octovej v tomto amorfnom pevnom produkte sa stanoví plynovou chromatografiou a je 0,14 %.

Táto goserelín-laktido polymérna soľ (1 g) sa pridá k benzylbenzoátu (99%, od firmy Janssen, 2 ml) a zmes sa

zohrieva ručne držaným fúkačom horúceho vzduchu za miešania až do okamihu, keď sa celý pevný podiel rozpustí. 110 µl tejto roztokovej formulácie obsahuje 3,6 mg goserelínu.

Formulácia 3

Laktido/glykolidový kopolymér (95/5) s jedinou koncovou karboxylovou skupinou (7,86 g, Mw = 5750, polydispersita = 1,50, molekulová hmotnosť stanovená titráciou koncovej skupiny = 2516 g/mol) a goserelín-acetát (0,98 g) sa rozpustí v ľadovej kyseline octovej (100 ml). Získaný roztok sa po kvapkách zavedie do kvapalného dusíka, následne sa získané zmrazené kvapky lyofilizujú počas dvoch dní. Rezultujúci pevný podiel sa potom dosuší v priebehu 24 hodín pri teplote 40 °C.

Plynovou chromatografiou sa stanoví obsah kyseliny octovej v produkte získanom po lyofilizácii, pričom tento obsah je 0,17 %.

Táto goserelín-laktido/glykolidová kopolymérna zmes (1 g) sa pridá k benzylbenzoátu (2 ml, 99 % od firmy Janssen) a získaná zmes sa zohrieva ručne držaným fúkačom horúceho vzduchu za miešania až do okamihu, keď dôjde k rozpusteniu pevného podielu. 110 µl tejto roztokovej formulácie obsahuje 3,6 mg goserelínu.

Je zrejme, že formulácia goserelínu vo forme polyesterovej soli činí rozpustnosť účinnej látky natoľko dobrú, že táto látka sa môže rozpúšťať v lipofilných rozpúšťadlách, akým je benzylbenzoát, v ktorom je samotný goserelín-acetát nerozpustný.

Biologické vyhodnotenie

Formulácie 1 až 3 sa podávajú skupinám (n = 10) samičiek potkanov s pravidelným cyklom oestru v dávke 3,6 mg goserelínu každému potkanovi, ako je to opísané v príklade 16. Po podaní formulácií sa zistilo, že pokusné zvieratá vstúpili do periódy kontinuálneho dioestru, čo indikuje plynulé uvoľňovanie goserelínu. V nasledujúcej tabuľke je uvedený stredný čas trvania dioestru pre každú skupinu potkanov. Z výsledkov uvedených v tejto tabuľke je zrejme, že všetky tri formulácie poskytujú periódy uvoľňovania goserelínu dlhšie ako štrnásť týždňov.

Číslo formulácie	Stredný čas trvania dioestru (dni) (± štandardná odchýlka)
1	104 (± 5,4)
2	99 (± 3,9)
3	101 (± 2,8)

Z týchto príkladov je ďalej zrejme, že formulácia goserelín-polyesterovej soli môže byť vo forme roztokov, ktoré sa môžu ľahko podať parenterálne s použitím injekčnej ihly úzkeho kalibru a že tieto formulácie sú vhodné na liečenie hormónovo dependentných nádorov u ľudí.

Príklad 18

Formulácia 1

Laktido/glykolidový kopolymér (95/5) s jedinou koncovou karboxylovou skupinou (4,5 g, Mw = 6806, polydispersita = 1,55, molekulová hmotnosť stanovená titráciou koncovej skupiny = 3027 g/mol, vnútorná viskozita 1 % (hmotn./obj.) roztoku v chloroforme = 0,108 dl/g) sa rozpustí v ľadovej kyseline octovej (50 ml). K tomuto roztoku sa pridá goserelín-acetát (0,56 g, toto množstvo je ekvivalentné 0,5 g goserelínu) a získaná zmes sa mieša počas 10 minút za vzniku číreho bezfarebného roztoku. Tento roztok sa po kvapkách pridá ku kvapalnému dusíku a zís-

kané zmrazené kvapky sa lyofilizujú počas dvoch dní. Získaný pevný produkt sa potom dosuší pri teplote 40 °C v priebehu 24 hodín. Obsah sa stanoví plynovou chromatografiou, pričom tento obsah je 0,3 %.

Táto goserelín-laktido/glykolido-kopolymérna zmes (1,0 g) sa pridá k benzylbenzoátu (2,0 ml) (2,0 ml, 99 % od firmy Janssen) a rozpustí sa za miešania a zohrievania. Získaný roztok obsahuje 3,67 mg goserelínu v 110 µl, pričom obsah goserelínu vo finálnom produkte je 10,0 % hmotnosti.

Formulácia 2

Opakuje sa postup pre uvedenú formuláciu 1 s použitím laktido/glykolidového kopolyméru (95/5) s jedinou koncovou karboxylovou skupinou (4,0 g, Mw = 6011, polydispersita = 1,56, molekulová hmotnosť stanovená titráciou koncovej skupiny = 2700 g/mol, vnútorná viskozita 1 % (hmotn./obj.) roztoku v chloroforme = 0,099 dl/g) a 1,12 g goserelín-acetátu (toto množstvo je ekvivalentné 1,0 g goserelínu). Plynovou chromatografiou sa stanoví obsah kyseliny octovej vo vysušenom pevnom podiele získanom po lyofilizácii, pričom tento obsah je 0,83 % a obsah goserelínu vo finálnom produkte je 19,46 % hmotnosti.

Táto goserelín-laktido/glykolido-kopolymérna zmes (0,54 g) sa pridá k benzylbenzoátu (2,46 ml, 99 % od firmy Janssen) a pevný podiel sa rozpustí zohrievaním a miešaním. Finálny roztok obsahuje 3,50 mg goserelínu v 110 µl.

Formulácia 3

Opakuje sa postup, ktorý je opísaný pre formuláciu 2, s použitím 2,1 g laktido/glykolidového kopolyméru a 1,0 g goserelín-acetátu (toto množstvo je ekvivalentné 0,9 g goserelínu). Plynovou chromatografiou sa stanoví obsah kyseliny octovej v produkte vysušenom lyofilizáciou, pričom tento obsah je 1,14 % a obsah goserelínu vo finálnom produkte je 28,91 % hmotnosti.

Táto goserelín-laktido/glykolido-kopolymérna zmes (0,36 g) sa pridá k benzylbenzoátu (2,64 ml, 99 % od firmy Janssen) a pevný podiel sa rozpustí zohrievaním a miešaním. Finálny roztok obsahuje 3,47 mg goserelínu v 110 µl.

Formulácia 4

Opakuje sa postup, ktorý je opísaný pre formuláciu 1, s použitím laktido/glykolidového kopolyméru (95/5) s jedinou koncovou karboxylovou skupinou (8,66 g, Mw = 5604, polydispersita = 1,71, molekulová hmotnosť stanovená titráciou koncovej skupiny = 1960 g/mol, vnútorná viskozita 1 % (hmotn./obj.) roztoku chloroformu = 0,094 dl/g) a 1,08 g goserelín-acetátu (toto množstvo je ekvivalentné 0,96 g goserelínu). Plynovou chromatografiou sa stanoví obsah kyseliny octovej v pevnom produkte vysušenom lyofilizáciou, pričom tento obsah je 0,08 % a obsah goserelínu vo finálnom produkte je 9,90 % hmotnosti.

Táto goserelín-laktido/glykolido-kopolymérna zmes (1,0 g) sa pridá k benzylbenzoátu (2,0 ml, 99 % od firmy Janssen) a rozpustí sa zohrievaním a miešaním. Finálny roztok obsahuje 3,47 mg goserelínu v 110 µl.

Biologické vyhodnotenie

Formulácie 1 až 4 sa podávajú skupinám (n = 9 alebo 10) samičiek potkanov s pravidelným cyklom oestru v dávke 3,6 mg každému pokusnému zvieraťu, ako je to opísané v príklade 16. Po podaní tejto dávky sa zistilo, že samičky potkanov vstúpili do periódy kontinuálneho dioestru, čo svedčí o plynulom uvoľňovaní goserelínu. Stredný čas trvania periódy dioestru pre každú skupinu potkanov je uvedený v nasledujúcej tabuľke. Z výsledkov uvedených v

tejto tabuľke je zrejme, že všetky tri formulácie poskytujú periódy uvoľňovania goserelínu asi 3 mesiace alebo ešte dlhšie.

Formulácia č.	Stredný čas trvania účinku (dni) (\pm štandardná odchýlka)
1	114 \pm 1,8
2	94 \pm 4,6
3	97 \pm 5,3
4	84 \pm 4,3

Z týchto príkladov je ďalej zrejme, že formulácie obsahujúce soľ tvorenú účinnou látkou a polyesterom môžu mať formu roztokov, ktoré sa môžu ľahko podávať parenterálne s použitím injekčnej ihly úzkeho kalibru a že takéto formulácie sú vhodné na liečenie hormónovo dependentných nádorov u ľudí.

Príklad 19

Goserelín-polyesterová soľ ii) z príkladu 16 (3,75 g) sa rozpustí v dichlórmetáne (50 ml), ktorý sa predbežne prefiltruje cez 0,45 μ m filter. Získaný roztok sa prefiltruje cez 0,5 μ m teflonovú filtračnú membránu (Whatman WTP) do banky, ktorá sa sterilizovala s použitím autoklávu. Rozpúšťadlo sa odstráni v rotačnom odparovači za vzniku viskózne fázy, následne sa vzduch do rotačného odparovača pripúšťa cez 0,5 μ m filter. Získaná viskózna kvapalina sa vysuší zahrievaním vo vákuu za vzniku bielej peny, ktorá sa odváži do ampuliek so zúženým hrdlom, prechovávaných v autokláve s laminárnym prúdením, následne sa do ampuliek pridajú čerstvo destilované rozpúšťadlá za vzniku roztokových formulácií goserelín-polyesterovej soli, ktoré sú v podstate bez podielu suspendovaných častíc.

Formulácia 1

1 g pevného podielu sa pridá k benzylbenzoátu (destilovaný, teplota varu 106 °C/30 Pa, 3 ml) a získaná zmes sa zahrieva generátorom horúceho vzduchu až do okamihu, keď sa rozpustí pevný podiel. 245 μ l tejto roztokovej formulácie obsahuje 3,6 mg goserelínu.

Formulácia 2

1 g pevného podielu sa pridá k benzylalkoholu (destilovanému, teplota varu 44 °C/30 Pa) a pevný podiel sa rozpustí zahrievaním prostredníctvom generátora horúceho vzduchu. 100 μ l tejto roztokovej formulácie obsahuje 3,6 mg goserelínu.

Biologické vyhodnotenie

Dvom skupinám po desiatich samičkách potkanov sa podali subkutánne formulácie 1 a 2 s použitím injekčnej ihly s kalibrom 20. Po uplynutí určitých časových úsekov (1 týždeň (n=4), 4 týždne (n=3) a 6 týždňov (n=3)) sa pokusným zvieratám odoberali terminálne krvné vzorky. Tieto krvné vzorky sa analyzovali s použitím radiačno-imunologického stanovenia na účely stanovenia obsahu goserelínu. Pri oboch formuláciách sa zistili merateľné obsahy goserelínu v krvi, čo ukazuje na skutočnosť, že roztokové formulácie poskytujú pravidelné uvoľňovanie účinnej látky počas niekoľkých týždňov. Zistilo sa, že profil uvoľňovania formulácie 1 má maximum asi po štyroch týždňoch, zatiaľ čo k maximu profilu uvoľňovania formulácie 2 dochádza v prvom týždni, následne sa zistilo, že obsah goserelínu v krvi postupne klesá s časom. Profil uvoľňovania formulácie 1 je považovaný za priaznivejší ako profil uvoľňovania formulácie 2, lebo s použitím benzylbenzoátu ako rozpúšťadla vo formulácii 1 sa dosiahne konštantnejšia hladina goserelínu v krvi s časom.

Z týchto príkladov je ďalej zjavné, že formulácia obsahujúca soľ tvorenú účinnou látkou a polyesterom, môže byť vo forme roztokov, ktoré sa môžu ľahko aplikovať parenterálne s použitím injekčnej ihly s úzkym kalibrom a že takéto formulácie sú vhodné na liečenie hormónovo dependentných nádorov u ľudí.

Príklad 20

Laktido/glykolidový kopolymér (95/5) s jedinou koncovou karboxylovou skupinou (9,0 g, Mw = 6011, polydisperzita = 1,56, molekulová hmotnosť stanovená titráciou koncovej skupiny = 2700 g/mol, vnútorná viskozita 1% (hmotn./obj.) roztoku v chloroforme = 0,099 dl/g) sa rozpustí v dichlórmetáne (100 ml).

K získanému roztoku sa pridá goserelín-acetát (1,124 g, toto množstvo je ekvivalentné 1 g goserelínu) za miešania, následne sa pridá metanol (10 ml). Získaná kalná suspenzia sa mieša pri teplote okolia počas asi jednej hodiny až do okamihu, keď sa získa číry roztok. Rozpúšťadlo sa odstráni s použitím rotačného odparovača za vzniku čirej viskózne kvapaliny. Táto kvapalina sa potom opätovne rozpustí v dichlórmetáne a ako skôr opäť vysuší. Tento stupeň sa opakuje dvakrát a získaná viskózna kvapalina sa nakoniec vysuší vo vákuu za tvorby bielej peny, ktorá sa ďalej suší vo vákuu cez noc. Pena sa rozdrví na jemný prášok, ktorý sa suší vo vákuu pri teplote okolia počas jedného dňa. K tomuto prášku sa potom pridá benzylbenzoát (20 ml, 99 % od firmy Janssen) a získaná zmes sa za miešania mierne zahrieva za vzniku roztoku.

Biologické vyhodnotenie

Táto roztoková formulácia goserelínu sa s použitím injekčnej ihly s kalibrom 20 subkutánne podá každej zo 45 samičiek potkanov (220 μ l, toto množstvo je ekvivalentné 7,3 mg goserelínu). Pokusné zvieratá sa rozdelili do skupín po piatich a pokusným zvieratám sa odobrali vzorky krvi 1. a 4. deň a 1, 3, 5, 7, 9, 11 a 13 týždňov po podaní. Okrem toho sa pokusným zvieratám odobrali vzorky krvi z chvostovej žily (skupinám s piatimi pokusnými zvieratami) 2, 4, 6, 8, 10 a 12 týždňov po podaní formulácie goserelínu. Tieto vzorky sa analyzovali radiačno-imunologickým stanovením na účely zistenia obsahu goserelínu a získané výsledky ukazujú, že sa s použitím kvapalnej formulácie goserelín-polyesterovej soli získajú merateľné obsahy účinnej látky v krvi ešte asi 11 týždňov po podaní formulácie účinnej látky a že uvedené formulácie poskytujú pravidelné uvoľňovanie goserelínu in vivo.

Z týchto príkladov je ďalej zjavné, že formulácia obsahujúca soľ účinnej látky a polyesteru môžu byť vo forme roztokov, ktoré sa môžu ľahko podávať parenterálne s použitím injekčnej ihly s úzkym kalibrom a že takéto formulácie sú vhodné na liečenie hormónovo dependentných nádorov u človeka.

Príklad 21

Peptid známy ako látka P vo forme jeho acetátvej soli (od firmy Sigma, 2 mg) sa pridá k dichlórmetánu (3 ml) a zmes sa dôkladne premieša. Uvedený peptid nemá žiadnu známku toho, že sa rozpúšťa v uvedenom rozpúšťadle a vytvára v tomto rozpúšťadle kalnú suspenziu.

Laktido/glykolidový kopolymér (70/30) s jedinou koncovou karboxylovou skupinou (225 mg, Mw = 9755, polydisperzita = 1,52, molekulová hmotnosť stanovená titráciou koncovej skupiny = 1800) sa pridá k dichlórmetánu (25 ml). Zmes sa mieša počas 15 minút za vzniku čireho bezfarebného roztoku. K tomuto roztoku sa pridá roztok látky P (25 mg) a metanolu (0,5 ml). Rezultujúca kalná

suspenszia sa mieša počas jednej hodiny a po uplynutí tohto času sa získa celkom číry roztok. Rozpúšťadlo sa odstráni v rotačnom odparovači a získaný číry sklovitý pevný produkt sa opätovne rozpustí v dichlórmetáne (5 ml) a roztok sa opätovne odparí. To sa opakuje dvakrát. Finálny pevný podiel sa opätovne rozpustí v dichlórmetáne (3 ml) a získaný roztok sa pomaly nakvapká na PTFE-ovrstvenú tkaninu, umožňujúcu odparenie rozpúšťadla a vytvorenie tenkej fólie číreho bezfarebného sklovitého pevného produktu (obsah peptidu = 9,1 % hmotnosti).

Táto fólia (96,8 mg) sa uloží do malej liekovky, následne sa do liekovky pridá fosfátom tlmená soľanka (2 ml, pH 7,4) (tlmivý roztok sa prebežne prefiltruje cez 0,2 µm filter a obsahuje 0,02 % azidu sodného vo funkcii konzervačného činidla). Liekovka sa potom uloží do inkubátora pri teplote 37 °C a tlmivý roztok sa periodicky odstraňuje a znovu dodáva. Tlmivý roztok, ktorý sa odstráni, sa analyzuje s použitím UV-spektrofotometra (Hewlett Packard 8452A) pri 210 nm proti štandardným roztokom látky P na účely stanovenia uvoľňovania látky P. Výsledky ukazujú, že látka P sa môže rozpúšťať v dichlórmetáne v prípade, že má formu soli kopolyméru kyseliny mliečnej a kyseliny glykolyvej ukončeného karboxylovou skupinou a že sa môže s použitím tohto rozpúšťadla spracovávať na tenký film, ktorý poskytuje kontinuálne uvoľňovanie peptidu počas časovej periódy asi 4 týždňov.

Príklad 22

Vodný roztok leuprolid-acetátu (inak známy ako leuporelín-acetát) (300 µl roztoku s koncentráciou 330 mg/ml) sa za intenzívnych strihových podmienok k 20 ml 10 % (hmotn./hmotn.) roztoku kyseliny polyhydroxystarovej, ktorá má číselnú strednú molekulovú hmotnosť asi 2000, v produkte Miglyol 812 (triglyceridy nasýtených mastných kyselín so stredným reťazcom vrátane kyseliny linolenovej, Dynamit Nobel, GB) za vzniku, čiastočne na rozmedzí olejovej a vodnej fázy, leuprolid-polárnej soli, ktorá stabilizuje vytvorenú koloidnú suspenziu typu voda-v-oleji. Voda sa potom odstraňuje pri teplote 50 °C, za miešania a v hlbokom vákuu až do okamihu, keď zmes už nepení a neublá, pričom sa získa olejovitá kompozícia, ktorá je veľmi jemne zakalená a ktorá je vhodná pre perorálne podania.

Príklad 23

Lys⁸-vasopressín-acetátová soľ sa pridá (2 mg, od firmy Sigma) k dichlórmetánu a získaná zmes sa mieša. Peptid nemá žiadnu známku toho, že sa rozpúšťa v uvedenom rozpúšťadle a zostáva vo forme kalného suspendovaného podielu.

Laktido-glykolidový kopolymér (70/30) s jedinou koncovou karboxylovou skupinou (225 mg, Mw = 9755, polydispersita = 1,52, molekulárna hmotnosť stanovená titráciou koncovej skupiny = 1800) sa pridá k dichlórmetánu (5 ml). Táto zmes sa mieša počas 15 minút za vzniku číreho bezfarebného roztoku. K tomuto roztoku sa pridá Lys⁸-vasopressín (25 mg, od firmy Sigma) a metanol (0,5 ml). Získaná kalná suspenzia sa mieša počas jednej hodiny a v priebehu tohto času sa vytvorí celkom číry roztok. Rozpúšťadlo sa odstráni v rotačnom odparovači a získaný číry sklovitý pevný produkt sa opätovne rozpustí v dichlórmetáne (5 ml) a znovu odparí. To sa opakuje dvakrát. Finálny pevný produkt sa rozpustí v dichlórmetáne (3 ml) a roztok sa pomaly nakvapká na PTFE-ovrstvenú tkaninu, umožňujúcu odparenie rozpúšťadla a vytvorenie tenkého filmu číreho bezfarebného sklovitého pevného produktu (obsah Lys⁸-vasopressínu je 10 % hmotnosti).

Tento film (97,31 mg) sa uloží do malej liekovky, do ktorej sa pridá fosfátom tlmená soľanka (2 ml, pH 7,4) tlmivý roztok sa prebežne prefiltruje cez 0,2 µm filter a obsahuje 0,02 % azidu sodného vo funkcii konzervačného činidla). Liekovka sa uloží do inkubátora pri teplote 37 °C a tlmivý roztok sa periodicky odstraňuje a dodáva. Odoberaný tlmivý roztok sa analyzuje v UV-spektrofotometre (Hewlett Packard 8452A) pri 210 nm proti štandardným roztokom Lys⁸-vasopressínu na účely stanovenia množstva uvoľňovaného Lys⁸-vasopressínu. Výsledky tohto testu sú uvedené v nasledujúcej tabuľke. Experiment ukazuje, že Lys⁸-vasopressín sa môže rozpúšťať v prípade, že je vo forme soli laktido-glykolidového kopolyméru ukončeného karboxylovou skupinou a že získaná zmes poskytuje kontinuálne uvoľňovanie peptidu počas časovej periódy aspoň štyroch týždňov.

Uvoľňovanie Lys⁸-vasopressínu in vitro

Čas (dni)	Uvoľnené množstvo Lys ⁸ -vasopressínu z filmu (%)
1	4,11
4	5,45
7	5,55
14	5,75
21	26,82
28	47,27

Príklad 24

Dve formulácie Zeneca ZD6003 (Met¹, Arg¹¹, Ser^{17,27,60,65}/ľudský G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) modifikovaný polyetylén glykolom 5000 spôsobom opísaným v referenčnom príklade 4 alebo 7 európskej patentovej prihlášky 0 473 268) v laktido-glykolidovom kopolyméri sa pripraví nasledujúcim spôsobom.

i) Dichlórmetán (4 ml) sa pridá k lyofilizovanému prípravku ZD6003 (39,72 mg). Takto sa vytvorí opaková disperzia účinnej látky v rozpúšťadle. Pridá sa laktido-glykolidový kopolymér (75/25) s jedinou koncovou karboxylovou skupinou (363,6 mg, Mw = 9963, polydispersita = 2,19, molekulová hmotnosť stanovená titráciou koncovej skupiny = 2815 a vznikne číry roztok.

Tento roztok sa pridá k roztoku (400 ml) metylcelulózy (0,25 % (hmotn./obj.) Methocel, 15 mPa.s od firmy Fluka) vo vode za strihového namáhania (mixér Heidolph RZR 50, 2150 otáčok za minútu). Po 3 minútovom miešaní touto rýchlosťou otáčania mixéra sa rýchlosť miešania zníži na 800 otáčok za minútu. Získané častice sa potom nechajú usadiť (gravitačne) počas 30 minút, zatiaľ čo sa zmes chladí ľadom. Supernatant sa odleje a častice sa premyjú resuspendovaním v ľadovo chladnej destilovanej vode (50 ml) a odstredením pri 1000 otáčkach za minútu. To sa opakuje štyrikrát a častice sa nakoniec lyofilizujú.

Častice pripravené týmto spôsobom majú dobrú kvalitu, pričom sú sférické a majú strednú veľkosť častíc 32 µm, čo sa stanovilo obrazovou analýzou pod optickým mikroskopom. Obsah účinnej látky v týchto časticách sa stanovil extrakciou a následnou podtlakovou kvapalinovou chromatografiou, pričom je 9,45 %, čo znamená 96 % účinnosť inkorporácie účinnej látky použitej k vytvoreniu mikročastíc.

ii) Dichlórmetán (4 ml) sa pridá k lyofilizovanému prípravku ZD6003 (44,18 mg). Takto sa získa opaková disperzia účinnej látky v rozpúšťadle. Pridá sa laktido-glykolidový kopolymér (75/25, 364,1 mg, Mw = 16800 (stanovené dimenzne exkluznou chromatografiou, polydispersita = 2,2, od firmy Boehringer Ingelheim). Spravil sa pokus na stanovenie molekulovej hmotnosti polyméru titráciou koncovej skupiny, ale to nebolo možné vzhľadom na veľmi nízku koncentráciu titrovateľných zvyškov, čo znamená, že polymér nemá koncovú karboxylovú skupinu. Zmes roztokov účinnej látky a polyméru sa nevyčierila po pridaní polyméru

a zostala kalnou disperziou, čo ukazuje, ako sa aj očakávalo, že v prípade neprítomnosti koncových karboxylových skupín v polymére sa nemôže vytvoriť peptid-polyesterová soľ.

Táto zmes sa pridá k roztoku (400 ml) metylcelulózy (0,25 % (hmotn./obj.) Methocel, 15 mPa.s od firmy Fluka) vo vode za strihového namáhania (mixér Heindolph RZR50, 2150 otáčok za minútu). Po 30 minútovom miešaní pri tejto rýchlosti sa rýchlosť zníži na 800 otáčok za minútu. Rezultujúce častice sa potom nechajú gravitačne usadiť počas 30 minút, zatiaľ čo sa zmes chladí na ľade. Supernatant sa odleje a častice sa premyjú resuspendovaním v destilovanej vode (50 ml) a odstredením pri 1000 otáčkach za minútu. To sa opakuje štyrikrát, následne sa častice nakoniec lyofilizujú.

Častice pripravené týmto spôsobom majú podradnú kvalitu v porovnaní s časticami, ktoré sa získali v uvedenom odseku i), pričom niektoré majú nepravidelný tvar a ich stredná veľkosť je 40 μm , čo sa stanovilo obrazovou analýzou pod optickým mikroskopom. Obsah účinnej látky v týchto časticách sa stanovil extrakciou a potom tlakovou kvapalinovou chromatografiou, pričom je 2,05 %, čo znamená 19 % účinnosť inkorporácie účinnej látky použitej na vytvorenie mikročastíc.

Uvedený príklad ukazuje, že ZD6003 sa môže rozpúšťať v dichlórmetáne v prípade prítomnosti polyméru s jedinou karboxylovou skupinou a to napriek tomu, že samotný dichlórmetán účinnú látku nerozpúšťa. Okrem toho takýto roztok sa môže použiť na vytvorenie mikročastíc účinnej látky s polyméru s veľmi vysokou mierou inkorporácie účinnej látky. Na rozdiel od toho uvedený príklad tiež ukazuje, že ZD6003 sa nemôže rozpúšťať v dichlórmetáne v prítomnosti polyméru v prípade, keď polymér nemá koncovú karboxylovú skupinu. V tomto prípade sa vytvorí len kalná disperzia. Navyše takáto kalná disperzia produktu ZD6003 v roztoku polyméru bez koncovkej karboxylovej skupiny má za následok nízku mieru inkorporácie účinnej látky pri spracovaní mikročastíc do formy.

Príklad 25

i) Goserelín-acetát (22,47 mg, toto množstvo je ekvivalentné 19,99 mg goserelínu) sa pridá k benzylbenzoátu (2,21 g, 99 % od firmy Janssen). Táto zmes sa zavedie do inkubátora pri teplote 40 °C a kontinuálne sa mieša počas 9 dní s použitím magnetického miešadla. Po 2 a 9 dňoch sa odoberejú alikvotné podiely, ktoré sa odstredia počas 15 minút pri 1300 otáčkach za minútu, pričom sa získa peleta nerozpustenej účinnej látky. Alikvotné časti supernatantu sa presne odvážia (okolo 100 mg) do 50 ml odmerných baniek. Do každej banky sa pridá ľadová kyselina octová (2 ml), následne sa objem doplní vodným 0,5 % (obj./obj.) roztokom kyseliny trifluóroctovej. Časť tohto roztoku sa uloží do odstredivkovej kyvety a takto sa odstredí počas 15 minút pri 13000 otáčkach za minútu na účely oddelenia suspendovaného podielu. Supernatant sa potom analyzuje s cieľom stanoviť obsah goserelínu s použitím tlakovej kvapalinovej chromatografie. V žiadnej vzorke nebol detekovaný goserelín. Detekčná medza pri tomto chromatografickom stanovení je 0,2 $\mu\text{g/ml}$ goserelínu, pričom kvantifikačná medza je 0,5 $\mu\text{g/ml}$ goserelínu. Z uvedeného sa môže stanoviť rovnovážna rozpustnosť (pri teplote 40 °C) goserelínu v benzylbenzoáte, ktorá je 0,2 $\mu\text{g/mg}$.

ii) Laktido-glykolidový kopolymér (95/5) s jedinou koncovou karboxylovou skupinou (291,9 mg, $M_w = 6742$, polydisperzita = 1,61, molekulová hmotnosť stanovená titračiou koncovej skupiny = 2565 g/mol, vnútorná viskozita 1 % (hmotn./obj.) roztoku v chloroforme = 0,103 dl/g) sa pridá

k benzylbenzoátu (3,38 g, 99 %, od firmy Janssen) za vzniku roztoku. K tomuto roztoku sa pridá goserelín-acetát (22,52 mg, toto množstvo je ekvivalentné 20,03 mg goserelínu). Táto zmes sa inkubuje a jej vzorky sa spracujú postupom opísaným v uvedenom odseku i). V benzylbenzoáte sa nedetekoval po dvoch dňoch žiadny goserelín, ale deviaty deň sa detekovala hladina približne 0,2 μg goserelínu na miligram benzylbenzoátu. Detekčná medza pre goserelín pri tomto stanovení s použitím tlakovej kvapalinovej chromatografie (HPLC) je rovnaká ako je uvedená v predchádzajúcom odseku i). Z tohto sa dá určiť, že rovnovážna rozpustnosť (pri teplote 40 °C) goserelínu v benzylbenzoáte v prípade, že je prítomný vo forme čirej zmesi s laktido-glykolidovým kopolymérom, sa môže stanoviť ako hodnota pohybujúca sa od 0,2 do 0,5 $\mu\text{g/mg}$.

iii) Laktido-glykolidový kopolymér (95/5) s jedinou koncovou karboxylovou skupinou (9,0 g, $M_w = 6011$, polydisperzita = 1,56, molekulová hmotnosť stanovená titračiou koncovej skupiny = 2700 g/mol, vnútorná viskozita 1 % (hmotn./obj.) roztoku v chloroforme = 0,099 dl/g) sa rozpustí v dichlórmetáne (100 ml).

K získanému roztoku sa pridá goserelín-acetát (1,124 g, toto množstvo je ekvivalentné 1 g goserelínu) za miešania, následne sa pridá metanol (10 ml). Získaná kalná suspenzia sa potom mieša pri teplote okolia počas asi jednej hodiny až do okamihu, keď sa získa číry roztok. Rozpúšťadlo sa odstráni s použitím rotačného odparovača za vzniku čirej viskózne kvapaliny. Táto kvapalina sa potom opätovne rozpustí v dichlórmetáne a vysuší ako v predchádzajúcom prípade. Tento krok sa opakuje potom dvakrát a nakoniec sa získaná viskózna kvapalina vysuší vo vákuu za vzniku bielej peny, ktorá sa dosuší vo vákuu cez noc. Táto pena sa rozdrví na jemný prášok, ktorý sa suší vo vákuu pri teplote okolia počas jedného dňa. Tento prášok sa pridá k benzylbenzoátu (20 ml, 99 %, od firmy Janssen) a získaná zmes sa mierne zohrieva za miešania za vzniku roztoku.

Tento roztok sa intenzívne premieša a 1 ml vzorka tohto roztoku sa uloží do odstredivkovej kyvety a odstredí sa pri 14000 otáčkach za minútu počas 30 minút. Opatrne sa odoberejú alikvotná časť supernatantu, ktorý sa odváži do 50 ml odmernej banky. Vzorka sa analyzuje na obsah goserelínu postupom opísaným v odseku i). Stanovil sa obsah goserelínu v tomto roztoku 24,6 $\mu\text{g/mg}$ benzylbenzoátu.

Tento príklad ukazuje, že benzylbenzoát je veľmi zlým rozpúšťadlom pre goserelín-acetát. Okrem toho pridanie laktido-glykolidového polyméru za vzniku čirej zmesi s goserelín-acetátom v benzylbenzoáte nevedie k výraznému zvýšeniu rovnovážnej rozpustnosti goserelín-acetátu v benzylbenzoáte. Ale goserelín-polyesterová soľ sa môže rozpúšťať v benzylbenzoáte za vzniku roztoku obsahujúceho goserelín v koncentrácii omnoho vyššej, ako je rovnovážna rozpustnosť voľného goserelínu v tomto rozpúšťadle.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Kompozícia obsahujúca soli peptidov s polyesterami s koncovou karboxylovou skupinou, **v y z n a ě u j ú c a s a t ý m**, že obsahuje soľ tvorenú kationom, odvodeným od peptidu obsahujúceho aspoň jednu zásaditú skupinu, a aniónom, odvodeným od polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou, alebo že je tvorená touto soľou, pričom táto kompozícia má formu roztoku alebo disperzie uvedenej soli v rozpúšťadle, ktoré je rozpúšťadlom pre voľný polyester, ale nie je rozpúšťadlom pre voľný peptid, a veľkosť častíc soli v uvedenej disperzii je menšia ako 5 μm

a výhodne menšia ako 0,2 µm, alebo má formu mikročastíc alebo implantátu pre injekciu alebo podkožnú implantáciu.

2. Kompozícia podľa nároku 1, **v y z n a ě u j ú c a s a t ý m**, že peptid je farmakologicky účinný a je zvolený z množiny zahŕňajúcej oxytocín, vazopresín, adrenokortikotropný hormón (ACTH), epidermálny rastový faktor (EGF), prolaktín, luteinizujúci hormón, folikul-stimulujúci hormón, luliberín alebo hormón uvoľňujúci luteinizujúci hormón (LHRH), inzulín, somatostatín, glukagón, interferón, gastrín, tetragastrín, pentagastrín, urogastrón, sekretín, calcitonín, enkefalín, endorfíny, kytorfín, taftsín, tymopietín, tymozín, tymostimulín, týmusový humorálny faktor, sérový týmusový faktor, faktor nádorovej nekrozy, faktory stimulujúce kolónie, motilín, bombezín, dinorfín, neurotensín, ceruleín, bradykinín, urokinázu, kallikreín, analógy a antagonistov látky P, angiotenzín II, nervový rastový faktor, krvný koagulačný faktor VII a IX, lyzozým-chlorid, renín, bradykinín, tyrocidín, gramizidíny, rastové hormóny, hormón stimulujúci melanocyty, hormón uvoľňujúci hormón štítnej žľazy, hormón stimulujúci štítnu žľazu, paratyroidný hormón, pankreozymín, cholecystokinín, ľudský placentálny laktogén, ľudský choriónný gonadotropín, peptid stimulujúci syntézu proteínu, gastrický inhibičný peptid, vazoaktívny intestinálny peptid, rastový faktor odvodený z krvných doštičiek, faktor uvoľňujúci rastový hormón, kostný morfogénny proteín a syntetické analógy a modifikácie a farmakologicky účinné fragmenty týchto látok.

3. Kompozícia podľa nároku 1, **v y z n a ě u j ú c a s a t ý m**, že peptid je farmakologicky neúčinný a je zvolený z množiny zahŕňajúcej polyarginín, polylyzín a kopolymér arginínu a lyzínu, kopolyméry neutrálnych aminokyselín v D-, L- alebo DL-forme s arginínom a/alebo lyzínom vo forme D alebo L alebo v racemickej forme a peptidy alebo kopolypeptidy, v ktorých sú peptidové reťazce celkom alebo čiastočne ukončené na N-konci zásaditou skupinou a základný reťazec tvoria neutrálne aminokyselinové zvyšky.

4. Kompozícia podľa nároku 1, **v y z n a ě u j ú c a s a t ý m**, že polyester je zvolený z množiny zahŕňajúcej polyestery odvodené od hydroxykyselín a polyestery odvodené z polykondenzácie diolov a/alebo polyolov s karboxylovými kyselinami a/alebo polykarboxylovými kyselinami a polyestery odvodené z polykondenzácie mechanizmom otvorenia kruhu dimérov kyselín.

5. Spôsob prípravy kompozície vo forme roztoku alebo disperzie soli podľa nároku 1, **v y z n a ě u j ú c i s a t ý m**, že sa

- peptid obsahujúci aspoň jednu zásaditú aminokyselinu vo forme voľnej zásady alebo vo forme soli so slabou kyselinou a polyester ukončený karboxylovou kyselinou rozpustí v neutrálnom polárnom rozpúšťadle, v ktorom sú obe uvedené zložky rozpustné, následne sa odstráni celé rozpúšťadlo alebo jeho podstatná časť a zostávajúci koncentrovaný roztok sa pridá k rozpúšťadlu, ktoré nie je rozpúšťadlom peptid-polyesterovej soli, alebo sa
- peptid obsahujúci aspoň jednu zásaditú aminokyselinu vo forme voľnej zásady alebo vo forme soli so slabou kyselinou a polyester ukončený karboxylovou skupinou sa rozpustí v rozpúšťadle, v ktorom sú obe uvedené zložky rozpustné, a ktoré sa môže odstrániť lyofilizáciou, následne sa získaný roztok veľmi rýchlo zmrazí, získaná zmrazená zmes sa lyofilizuje a získaná zmes sa disperguje v rozpúšťadle polyesterovej zložky, následne sa zmes nechá rozpustiť po vytvorení peptid-polyesterovej soli, alebo sa
- uvedie do reakcie peptid obsahujúci aspoň jednu zásaditú aminokyselinu vo forme soli so silnou kyselinou a polyes-

ter, ktorý je celkom alebo čiastočne vo forme soli karboxylovej kyseliny s vhodným alkalickým kovom alebo kovom alkalických zemín.

6. Kompozícia podľa nároku 1, obsahujúca farmakologicky účinný peptid a polyester, majúci prolongované uvoľňovanie peptidovej účinnej látky, **v y z n a ě u j ú c a s a t ý m**, že má formu mikročastíc s priemerom 0,2 až 500 µm, suspendovaných vo farmaceuticky prijateľnom injekčnom nosiči.

7. Kompozícia podľa nároku 6, **v y z n a ě u j ú c a s a t ý m**, že injekčným nosičom je vodný alebo organický nosič, ktorý nie je rozpúšťadlom použitých látok, alebo je týmto nosičom hydrofilný organický injekčný nosič v prípade vysoko lipofilných polyesterov.

8. Kompozícia podľa nároku 1, obsahujúca farmakologicky účinný peptid a polyester, majúci prolongované uvoľňovanie peptidovej účinnej látky, **v y z n a ě u j ú c a s a t ý m**, že má formu farmaceuticky prijateľného roztoku obsahujúceho

- definovanú peptidovú účinnú látku obsahujúcu aspoň jednu zásaditú aminokyselinu a majúcu molekulovú hmotnosť aspoň 300 Da, ktorá je vo forme soli s polyesterom, pričom táto soľ obsahuje kation zásaditého peptidu a anión polyesteru ukončeného karboxylovou skupinou,
- rozpúšťadlo, ktoré je rozpúšťadlom voľného polyesteru, ale ktoré nie je rozpúšťadlom voľného peptidu,
- prebytok polyesteru.

9. Kompozícia podľa nároku 8, **v y z n a ě u j ú c a s a t ý m**, že zásaditou peptidovou účinnou látkou je syntetický analóg hormónu uvoľňujúci luteinizujúci hormón zvolený z množiny zahŕňajúcej buserelín (/D-Ser(Bu)⁶, des-Gly-NH₂¹⁰/-LHRH(1-9)-NH₂Et), deslore-lín (/D-Trp⁶, des-Gly-NH₂¹⁰/-LHRH(1-9)NH₂Et), fertirelín (/des-Gly-NH₂¹⁰/-LHRH(1-9)NH₂Et), goserelín (/D-Ser-(Bu)⁶, Azgly¹⁰/-LHRH), histrelín (/D-His(Bzl)⁶, des-Gly-NH₂¹⁰/-LHRH(1-9)NH₂Et), leuporelín (/D-Leu⁶, des-Gly-NH₂¹⁰/-LHRH(1-9)-NH₂Et), lutrelín (/D-Trp⁶, MeLeu⁷, des-Gly-NH₂¹⁰/-LHRH(1-9)NH₂Et), nafarelin (/D-Nal⁹/-LHRH), tryptorelín (/D-Trp⁹/-LHRH) a ich farmakologicky účinné soli.

10. Kompozícia podľa nároku 8, **v y z n a ě u j ú c a s a t ý m**, že rozpúšťadlo je zvolené z množiny zahŕňajúcej benzylbenzoát, benzylalkohol, etylaktát, glyceryltriacetát, estery kyseliny citrónovej a polyetylénglykoly, alkoxypolyetylénglykoly a polyetylénglykolacetáty s nízkou molekulovou hmotnosťou (nižšou ako 100).

11. Kompozícia podľa nároku 8, **v y z n a ě u j ú c a s a t ý m**, že pomer soli zásaditej peptidovej účinnej látky a polyesteru k voľnému polyesteru sa rovná 1 : 0 až 0,1 : 10.

12. Kompozícia podľa nároku 8, **v y z n a ě u j ú c a s a t ý m**, že pomer celkového pevného podielu k rozpúšťadlu sa rovná 2 až 40 % (hmotn./obj.).

13. Spôsob prípravy farmaceutickej kompozície podľa nároku 8, **v y z n a ě u j ú c i s a t ý m**, že sa

- dokonale premiešaná zmes peptidovej účinnej látky a polyesteru rozpustí vo farmaceuticky prijateľnom rozpúšťadle alebo sa
- roztok peptidovej účinnej látky v alkanole obsahujúcom 1 až 6 atómov uhlíka pomaly pridá k roztoku polyesteru v rozpúšťadle vhodnom pre injekciu, následne sa v prípade, že rozpúšťadlo prítomné vo východiskovom peptidovom roztoku nie je farmaceuticky prijateľné pre injekciu, toto rozpúšťadlo odstráni.

Koniec dokumentu