



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2 Patentgesetz

(19) DD (11) 256 605 A3

4(51) A 61 K 37/02
A 61 K 37/38
A 61 K 9/22
A 61 K 9/52
A 61 K 9/08

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21) WP A 61 K / 246 469 1

(22) 23.12.82

(45) 18.05.88

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD

(72) Fechner, Klaus, Dr. rer. nat.; Mehlig, Burkhard, Dr. sc. rer. nat.; Loth, Fritz, Dr. rer. nat.; Dautzenberg, Horst, Dr. rer. nat.; Bergfeld, Jost, Dr. med. vet.; Bienert, Michael, Dr. rer. nat.; Klauschenz, Erhard, Dr. rer. nat.; Wolf, Ingrid, Dr. rer. nat., DD

(54) Verfahren zur Herstellung von Peptidpräparaten mit verlängerter Wirkung

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Peptidderivaten mit verlängerter Wirkung. Die Aufgabe der Erfindung, mit Hilfe eines neuen Trägerstoffes für Peptidwirkstoffe, Präparate mit einer verlängerten Wirksamkeit zu erhalten, wurde dadurch gelöst, daß Polystyrensulfonsäure bzw. deren Salze mit den Peptidwirkstoffen zu pharmazeutischen Präparationen umgesetzt werden. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Human- bzw. Veterinärmedizin sowie die Landwirtschaft (Tierzucht).

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung von Peptid-Präparaten, die unter physiologischen Bedingungen das Peptid verzögert abgeben, **dadurch gekennzeichnet**, daß biologisch aktive Peptide, Polypeptide oder deren Derivate oder deren Salze mit Polystyrensulfonsäuren oder deren Salzen umgesetzt werden.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Salz der Polystyrensulfonsäuren das Natriumsalz eingesetzt wird.
3. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als biologisch aktives Peptid GnRH, GnRH-Analogue und GnRH-Sequenzen eingesetzt werden.
4. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als biologisch aktives Peptid Substanz P, Substanz P-Analogue und Substanz P-Sequenzen eingesetzt werden.
5. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß in von dem gewünschten Anteil nicht gebundenen Peptides abhängigen Konzentrationen
 - a) feste Peptidwirkstoffe mit wäßrigen Lösungen der Polystyrensulfonsäuren oder deren Salze,
 - b) wäßrige Peptidlösung mit wäßrigen Lösungen der Polystyrensulfonsäuren oder deren Salzen,
 - c) Polystyrensulfonsäuren oder deren Salze in fester Form mit festen Peptidwirkstoffen
oder
 - d) Polystyrensulfonsäuren oder deren Salze in fester Form mit wäßrigen Peptidlösungen umgesetzt werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Peptidpräparaten mit verlängerter Wirkung. Anwendungsgebiete sind die Human- oder die Veterinärmedizin sowie die Landwirtschaft (Tierzucht) entsprechend dem Wirkungsspektrum der biologisch aktiven Peptide, Polypeptide oder deren Derivate.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist bekannt, daß Peptide, die zu therapeutischen oder biologischen Zwecken exogen verabreicht werden, im Körper sehr schnell inaktiviert werden (Bennet, H. P. J. und C. McMartin, Pharmacological Reviews **30** [1979]; 247–292). Deshalb müssen Peptide oft oder ständig dem Organismus zugeführt werden, um eine langanhaltende Wirkung zu erzielen (Irsigler, K.; H. Kritz; G. Hagmüller; M. Franetzki; K. Prestele; H. Thurow und K. Geisen, Diabetes **30** [1981] 1072–1075. Klindt, J.; S. L. Davis und D. L. Ohlson, Endocrinol. **104** [1979] 45).

Bei den Anwendern physiologisch wirksamer Peptide besteht deshalb die Forderung nach Peptidpräparaten mit verlängerter Wirksamkeit. So ist z. B. vorgeschlagen worden, die Wirksamkeit der Peptide zu verlängern, indem die Peptide mit anorganischen Stoffen, wie schwerlöslichen Zinkverbindungen, beispielsweise Zinkhydroxid oder Zinkphosphat, oder mit Silikaten, beispielsweise Kalium/Aluminiumsilikaten, zu Komplexen umgesetzt werden (DD-AP 104430, DD-AP 48786, DD-AP 98915). Ein anderer Lösungsansatz besteht darin, Peptide mit organischen Stoffen, wie Gelatine und deren Derivate, Polyvinylpyrrolidon, Carboxymethylcellulose, Polyphlorethinphosphat, Phenolen oder alkalischen oder sauren Polyaminosäuren, beispielsweise Protamin oder Polyglutaminsäure, zu vermischen bzw. umzusetzen (DD-AP 109305, DD-WP 98610, DE-OS 21 07 282, DE-OS 24 22 310).

Weiterhin wurden pharmazeutische Peptidpräparate beschrieben, die die wirksame Dosis des Peptids in Form öliger Suspensionen oder öliger Gele enthalten, wobei der Präparation als Adsorptionsmittel bzw. als Gelbildner ein Fettsäure-Aluminiumsalz zugesetzt wird (US-PS 4256737).

Das Prinzip der vorgestellten Verfahren beruht auf einer verlangsamten Diffusion des Peptidwirkstoffs aus der beigegebenen Vehikelsubstanz (Wirkprinzip: Viskosität) bzw. auf einer verzögerten Abgabe des Peptides aus einem Komplex/Adsorbent zwischen Peptidwirkstoff und zugegebener Trägersubstanz (Wirkungsprinzip: Bindung/Adsorption).

In bezug auf die durch Komplexbildung/Adsorption des Peptids an einen Trägerstoff bewirkte verlängerte Abgabe des Peptids aus diesem System besteht ein nicht befriedigend gelöstes Problem darin, daß die den Retardeffekt verursachende Komplexbildung/Adsorption zwischen Peptid und Trägersubstanz im allgemeinen nur bei geringen Ionenstärken sehr groß ist. Bei einer Ionenstärke, die den physiologischen Bedingungen entspricht, ist die Bindung/Adsorption des Peptids an die Trägersubstanz dagegen meistens sehr gering und damit auch die Retardwirkung.

Die Versuche der Anmelder richteten sich daher auf die Bereitstellung von biologisch aktive Peptide, Polypeptide und deren Derivate bzw. Salze enthaltenden Präparaten, die auf Grund einer Komplexbildung auch bei einer „physiologischen Ionenstärke“ und damit auch unter physiologischen Bedingungen zwischen den Peptiden und einem geeigneten Trägerstoff eine verlängerte Peptidabgabe (Retardwirkung) zeigen und die der inaktivierenden Wirkung im Organismus längere Zeit widerstehen als das frei applizierte Peptid.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, der pharmazeutischen Industrie zu human- und veterinärmedizinischen Zwecken Peptidpräparate zugänglich zu machen, die sich durch eine verlängerte Wirksamkeit und eine gute physiologische Verträglichkeit auszeichnen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu entwickeln, das mit Hilfe eines neuen Trägerstoffes für Peptidwirkstoffe zu Präparaten mit einer verlängerten Wirksamkeit führt. Die Aufgabe wurde dadurch gelöst, daß biologisch aktive Peptide, Polypeptide oder deren Derivate bzw. Salze, beispielsweise GnRH, GnRH-Analoga, Substanz P, Substanz P-Sequenzen, Angiotensin oder Insulin, mit Polystyrensulfonsäure bzw. deren Salze behandelt werden. Unter den Polystyrensulfonsäuresalzen eignen sich die mit Alkali- oder Erdalkalimetallionen besonders gut. Das Natriumsalz der Polystyrensulfonsäure z. B. ist wasserlöslich und kann dadurch leicht in pharmazeutische Präparationen eingearbeitet werden. Polystyrensulfonsäure läßt sich leicht aus Polystyren durch Sulfonierung nach bekannten Verfahren herstellen, wobei das Molekulargewicht der Polystyrensulfonsäure durch den Einsatz von Polystyren mit dem entsprechenden Molekulargewicht variiert werden kann.

Die erfindungsgemäß hergestellten Komplexe sind neu. Sie zeichnen sich im allgemeinen dadurch aus, daß sie neben ionischen Wechselwirkungen noch andere zur Bindung beitragende Wechselwirkungen besitzen und auch bei „physiologischen Ionenstärken“ eine für eine Retardwirkung notwendige ausreichende Bindung des Peptids an das Polymer aufweisen. Die neuen Präparate können nicht nur parenteral appliziert werden, sondern sie können auch für orale, nasale, vaginale oder rectale Verabreichungen angewendet werden.

Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß bei Kenntnis des Bindungsgrades des Peptides (% Bindung) in Abhängigkeit von der Konzentration des Salzes der Polystyrensulfonsäure die Menge an freiem, nicht gebundenem Peptid durch Variation der Konzentration des Polymers in der Applikationsform verändert werden kann. Die Initialdosis des Peptids (% freies, nicht gebundenes Peptid) und die Menge des retardiert abzugebenen Peptids (% gebundenes Peptid) sind also in den neuen Präparaten variabel gestaltbar.

Die erfindungsgemäßen Komplexe werden hergestellt, indem Peptide und/oder Polypeptide und/oder deren Derivate bzw. Salze in der entsprechenden Menge der wäßrigen Lösung der Polystyrensulfonsäure oder ihrer Salze der entsprechenden Konzentration aufgelöst werden. Auch kann man die entsprechenden Mengen der wäßrigen Lösungen der Polystyrensulfonsäure bzw. ihrer Salze vereinen. Weiterhin besteht die Möglichkeit, die Polystyrensulfonsäure bzw. ihre Salze in fester Form zu der wäßrigen Lösung des Peptids zu geben und darin aufzulösen. Die Komponenten lassen sich auch im festen Zustand vermischen. Die erfindungsgemäßen Komplexe gelangen in den üblichen Applikationsformen zur Anwendung, wobei diese die erfindungsgemäßen Komplexe zusammen mit bekannten Hilfsmitteln enthalten können.

Die Präparate können beispielsweise als Injektionslösungen, Lyophilisate, Zäpfchen, Suppositorien und Kapseln zur Anwendung gelangen.

Die verlängerte Wirksamkeit der erfindungsgemäß hergestellten Peptidpräparate ist im Tierversuch erwiesen. GnRH-, GnRH-Analoga und GnRH-Sequenzen/Polystyrensulfonat-Präparate eignen sich zur Ovulationsinduktion an landwirtschaftlichen Nutztieren und damit zur Erzeugung der Brunstsynchronisation in der Tierzucht.

Substanz P-, Substanz P-Analoga und Substanz P-Sequenzen lassen sich in Nasentropfen bzw. Nasensprays zur Behandlung streßbedingter Schäden anwenden.

Die Erfindung soll anhand von Beispielen näher erläutert werden.

Beispiel 1

Man stellt eine steril filtrierte Lösung von GnRH her und vermischt diese unter keimfreien Bedingungen mit einer wäßrigen Lösung von Polystyrensulfonat-Natrium und Mannitol. Diese Lösung wird in Ampullen gefüllt und lyophilisiert.

Die erhaltenen Trockenampullen enthalten:

GnRH:	1 mg
Polystyrensulfonat-Natrium:	11,25 mg
Mannitol:	20 mg

Vor Gebrauch wird der Inhalt der Trockenampulle mit 5 ml einer in einer Ampulle befindlichen isotonischen Natriumchloridlösung versetzt und durch intensives Schütteln der Inhalt gelöst.

Das verwendete Polystyrensulfonat-Natrium wurde durch Sulfonierung von Polystyren mit einer mittleren relativen Molekülmasse von 200 000 und anschließende Neutralisation mit Natronlauge hergestellt und besitzt einen Substitutionsgrad von etwa 1.

Beispiel 2

Entsprechend DD-WP 141996 werden Ampullen mit Lyophilisaten von GnRH hergestellt, die pro Ampulle enthalten:

GnRH:	4,5 mg
Citronensäure:	2,0 mg
Mannitol:	20,0 mg

Vor Gebrauch werden die Ampullen mit 5 ml einer in einer Lösungsmittelampulle befindlichen wäßrigen 0,125%igen Lösung von Polystyrensulfonat-Natrium versetzt und der Inhalt durch Schütteln gelöst. Die gewünschte Injektionskonzentration an GnRH kann durch weiteres Verdünnen obiger Lösung mit einer wäßrigen 0,125%igen Lösung von Polystyrensulfonat-Natrium hergestellt werden.

Beispiel 3

Man stellt eine steril filtrierte wäßrige Lösung von Angiotensin und Sorbitol her, ampulliert und lyophilisiert. Die erhaltene Trockenampullen enthalten:

Angiotensin:	2,5 mg
Sorbitol:	25 mg

Vor Gebrauch werden die Ampullen mit 5 ml einer in einer Lösungsmittelampulle befindlichen 0,125%igen Lösung von Polystyrensulfonat-Natrium in isotonischer Natriumchloridlösung versetzt und der Inhalt durch Schütteln gelöst. Die gewünschte Injektionskonzentration an Angiotensin kann durch weiteres Verdünnen obiger Lösung mit einer 0,125%igen Lösung von Polystyrensulfonat-Natrium in isotonischer Natriumchloridlösung hergestellt werden.

Beispiel 4

Man stellt eine steril filtrierte wäßrige Lösung von D-Phe⁶, Des-Gly-NH₂¹⁰, Pro-ethylamid⁹-GnRH und Mannitol her, ampulliert und lyophilisiert.

Die erhaltenen Trockenampullen enthalten:

D-Phe⁶, Des-Gly-NH₂¹⁰, Pro-ethylamid⁹-GnRH: 100 µg.

Mannitol: 10 mg

Vor Gebrauch werden die Ampullen mit 5 ml einer in einer Lösungsmittelampulle befindlichen 0,125%igen Lösung von Polystyrensulfonat-Kalium in isotonischer Natriumchloridlösung versetzt und der Inhalt durch Schütteln gelöst.

Beispiel 5

Man stellt eine steril filtrierte wäßrige Lösung von D-Ser(Bu¹), Des-Gly-NH₂¹⁰, Pro-ethylamid⁹-GnRH und Sorbitol her, ampulliert und lyophilisiert.

Die erhaltenen Trockenampullen enthalten:

D-Ser(Bu¹), Des-Gly-NH₂¹⁰, Pro-ethylamid⁹-GnRH: 100 µg;

Sorbitol: 10 mg.

Vor Gebrauch werden die Ampullen mit 5 ml einer in einer Lösungsmittelampulle befindlichen 0,125%igen Lösung von Polystyrensulfonat-Natrium in isotonischer Natriumchloridlösung versetzt und der Inhalt durch Schütteln gelöst.

Beispiel 6

Man stellt ein flüssige Applikationsform von Substanz P her, wobei 100 ml enthalten:

Substanz P	80 mg
Phosphorsäure, 0,02 M	8,6 ml
Natronlauge, 0,01 M	26 ml
Hydroxylethylcellulose	2 g
Benzalkoniumchlorid	10 mg
Polystyrensulfonat-Natrium	125 mg
Wasser zu 100 ml	

Dabei wird die Peptidlösung ohne Polymerzusatz steril filtriert und die sterilisierten Zusatzstoffe anschließend zugegeben.