



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 146 128** <sup>(13)</sup> **C1**  
(51) МПК<sup>7</sup> **A 61 K 9/16, 38/16**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 95118395/14, 05.01.1994  
(24) Дата начала действия патента: 05.01.1994  
(30) Приоритет: 06.01.1993 IE 930005  
(46) Дата публикации: 10.03.2000  
(56) Ссылки: EP 0467389 A2, 22.01.92. US 4767628 A, 09.07.92. RU 94016158 A1, 27.09.95.  
(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 06.08.1995  
(86) Заявка РСТ:  
US 94/00148 (05.01.1994)  
(87) Публикация РСТ:  
WO 94/15587 (21.07.1994)  
(98) Адрес для переписки:  
129010, Москва, ул.Б.Спасская, 25, стр.3,  
"Городисский и Партнеры"

(71) Заявитель:  
Кинертон Лимитед (IE)  
(72) Изобретатель: Шалаби В.Шалаби (US),  
Стивен А.Джэксон (US), Жак-Пьер Моро (US)  
(73) Патентообладатель:  
Кинертон Лимитед (IE)

(54) ИОННЫЙ КОНЬЮГАТ С ДЛИТЕЛЬНЫМ ПЕРИОДОМ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ПЕПТИДА, СПОСОБ СИНТЕЗИРОВАНИЯ ИОННОГО КОНЬЮГАТА, СПОСОБ СИНТЕЗИРОВАНИЯ МИКРОЧАСТИЦ

(57) Реферат:  
Изобретение относится к медицине. Описан ионный конъюгат замедленного высвобождения, который включает сложный полиэфир, содержащий свободную СООН-группу, сопряженный с биоактивным полипептидом, содержащим по крайней мере один эффективный ионогенный амин, причем по крайней мере 50 вес.% полипептида, присутствующего в конъюгате, ионно сопряжено со сложным полиэфиром.

Предложены способ синтеза ионного конъюгата путем ионного сопряжения, а также способ синтеза микрочастиц растворением ионного конъюгата по п. 1 в апротонном водосмешивающем органическом растворителе. Конъюгат обеспечивает регулируемое монофазное выделение биологически активной полипептидной молекулы в организме. 3 с. и 26 з.п. ф-лы, 6 табл., 3 ил.

RU 2 146 128 C1

RU 2 146 128 C1



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 146 128** <sup>(13)</sup> **C1**  
 (51) Int. Cl.<sup>7</sup> **A 61 K 9/16, 38/16**

RUSSIAN AGENCY  
 FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 95118395/14, 05.01.1994  
 (24) Effective date for property rights: 05.01.1994  
 (30) Priority: 06.01.1993 IE 930005  
 (46) Date of publication: 10.03.2000  
 (85) Commencement of national phase: 06.08.1995  
 (86) PCT application:  
 US 94/00148 (05.01.1994)  
 (87) PCT publication:  
 WO 94/15587 (21.07.1994)  
 (98) Mail address:  
 129010, Moskva, ul.B.Spaskaja, 25, str.3,  
 "Gorodisskij i Partnery"

(71) Applicant:  
 Kinerton Limited (IE)  
 (72) Inventor: Shalabi V.Shalabi (US),  
 Stiven A.Dzhehkson (US), Zhak-P'er Moro (US)  
 (73) Proprietor:  
 Kinerton Limited (IE)

(54) IONIC CONJUGATE EXHIBITING PROLONGED PERIOD OF PEPTIDE RELEASE, METHOD OF SYNTHESIS OF IONIC CONJUGATE, METHOD OF SYNTHESIS OF MICROPARTICLES

(57) Abstract:  
 FIELD: medicine, peptides. SUBSTANCE: invention describes the conjugate of delayed release that involves complex polyester containing free COOH-group coupled with bioactive polypeptide containing at least one effective ionogenic amine being at least 50 weight % of polypeptide in the conjugate composition are coupled with complex polyester. Invention proposes the method of

synthesis of ionic conjugate by ionic coupling and the method of synthesis of microparticles by dissolving ionic conjugate by p. 1 of the invention claim in aprotic water-soluble organic solvent. Conjugate provides the controlled monophasic release of biologically active polypeptide molecule in the body. EFFECT: improved properties, enhanced effectiveness of conjugate. 29 cl, 6 tbl, 3 dwg, 11 ex

RU 2 146 128 C1

RU 2 146 128 C1

Изобретение относится к биоактивным полипептидам с длительным периодом высвобождения действующего вещества.

Разработано, испытано и используется на практике большое количество так называемых систем доставки лекарства, регулирующих выделение (высвобождение) *in vivo* фармацевтических композиций. Например, сложные полиэфиры, такие как поли (DL-молочная кислота), поли(гликолевая кислота), поли(капролактон) и другие различные сополимеры, использовались для высвобождения биологически активных молекул, таких как прогестерон (progesteron); они изготавливались в форме микрокапсул, пленок или стержней (Pitt CG, TA and Schindler A. 1980). После имплантации композиции полимер/терапевтический агент, например, подкожно или внутримышечно терапевтический агент выделяется в течение определенного периода времени. Такие биосовместимые биоразлагаемые полимерные системы предназначаются для того, чтобы дать возможность заключенному в ней терапевтическому агенту диффундировать через полимерную матрицу. После высвобождения терапевтического агента полимер разлагается *in vivo* без хирургического удаления имплантата. Несмотря на то, что факторы, способствующие разложению полимера, не достаточно хорошо изучены, полагают, что такое разложение для сложных полиэзфиров может регулироваться доступностью эфирных мостиков для неферментного автокаталитического гидролиза полимерных компонентов.

Несколько публикаций ЕРО и патентов США посвящены разработке полимерных матриц и их роли в регулировании скорости и продолжительности высвобождения терапевтических агентов *in vivo*.

Например, Deluca (ЕРО Publication 0467389 A2/Univ of Kentucky) описывает физическое взаимодействие между гидрофобным биоразлагаемым полимером и белком или полипептидом. Полученная композиция представляла собой смесь терапевтического агента и гидрофобного полимера, который продлевал его диффузионное высвобождение из матрицы после введения субъекту.

Hutchinson (патент США N 4767628/ICI) регулировал высвобождение терапевтического агента посредством однородной дисперсии в полимерном устройстве. Заявлено, что эта композиция обеспечивает регулированное непрерывное высвобождение при совмещении двух способов: первый - диффузионно-зависимое истечение лекарства с поверхности композиции и второй - высвобождение через водные каналы, образованные в результате разложения полимера.

Краткое описание изобретения

В целом изобретение представляет фармацевтическую композицию замедленного высвобождения (выделения), образованную сложным полиэзфиром, содержащим одну или более свободных групп-СООН, ионно сопряженных с биологически активным полипептидом, образованным по меньшей мере одним эффективным ионогенным амином, в которой по меньшей мере 50% веса полипептида,

присутствующего в композиции, ионно сопряжено со сложным полиэзфиром.

В предпочтительных воплощениях сложный полиэфир модифицирован с целью повышения отношения количества концевых карбоксильных групп к количеству концевых гидроксильных групп от более чем единицы до приближения к бесконечности, т. е. все гидроксильные группы могут быть замещены на карбоксильные. Примерами подходящих эфиров являются эфиры, полученные из таких соединений, как L-молочная кислота, D-молочная кислота, DL-молочная кислота, капролактон, п-диоксанон,  $\epsilon$ -капроновая кислота, замещенный и незамещенный триметиленкарбонат, 1,5-диоксепан-2-он, 1,4-диоксепан-2-он, гликолид, гликолевая кислота, L-лактид, DL-лактид, мезо-лактид, алкиленоксалат, циклоалкиленоксалат, алкиленсукцинат, ( $\beta$ -гидроксипутират), и оптически активные изомеры, рацематы и сополимеры вышеуказанных веществ. Другие гетероцепные полимеры, относящиеся к традиционным сложным полиэзфиром, также могут использоваться (например, полиортоэфиры, полиортокарбонаты и полиацетали).

Предпочтительно сложный полиэфир получают поликарбоксильным реакцией с яблочной или лимонной кислотой.

В предпочтительных воплощениях сложный полиэфир представляет собой "частично кислотнo-закрытый" полимер, часть гидроксильных групп которого закрыта кислотными группами посредством взаимодействия с глутаровым ангидридом. В других предпочтительных воплощениях сложный полиэфир представляет собой "полностью кислотнo-закрытый полимер", в котором все гидроксильные группы закрыты кислотными группами с помощью реакции с глутаровым ангидридом. Предпочтительно, сложный полиэфир имеет среднюю степень полимеризации от 10 до 300, более предпочтительно - от 20 до 50.

Ионно-молекулярные конъюгаты изобретения предпочтительно изготавливают из поликарбонатов кислотнo-закрытых сложных полиэзфиров, конъюгированных с одноосновными и полиосновными биоактивными полипептидами, имеющими по меньшей мере одну эффективную ионогенную аминную группу. Альтернативно, любой сложный полиэфир может использоваться для образования ионно-молекулярного конъюгата данного изобретения при условии, что он предварительно обработан подходящим основанием, например гидроксидом натрия. Кроме того, может использоваться любая кислотнo-стабильный пептид, например пептид, выделяющий гормон роста (GHRP), лютеинизирующий гормон - выделяющий гормон (LHRH), соматостатин, бобмезин, гастринвыделяющий пептид (GRP), кальцитонин, брадикинин, галанин, меланоцитстимулирующий гормон (MSH), фактор, выделяющий гормон роста (GRF), амилин, тахикинины, секретин, паразитовидный гормон (PTH), инкафелин, индотелин, кальцитонин - генвыделяющий пептид (CGRP), нейромедины, белок, связанный с гормоном щитовидной железы (PTHrP), глюкагон, нейротензин, адренокортикотропный гормон (ACTH), пептид YY (PYY), глюкагонвыделяющий пептид

(GLP), вазоактивный кишечный пептид (VIP), гипофизарный аденилат-циклаза активирующий пептид (PACAP), мотилин, субстанция P, нейропептид P, нейропептид Y (NPY), TSH и их аналоги и фрагменты. Такие ионно-молекулярные конъюгаты обладают способностью выделять их биоактивные компоненты *in vivo* предопределенной скоростью, которая зависит от химической структуры, молекулярных весов и рКа обоих компонентов конъюгата. Механизм выделения лекарства вызывает трансформацию нерастворимой конъюгатной формы в водорастворимые компоненты, частью посредством гидролиза гидрофобного сложного полиэфира. Таким образом, выделение биоактивного полипептида возрастает независимо

(а) с уменьшением разницы рКа между биоактивным полипептидом и сложным полиэфиром,

(b) с химической реакционной способностью полиэфирной цепи, которая отражается карбонильной нуклеофильностью,

(с) с уменьшением плотности сложного полиэфира, которая связана с температурой стеклования и минимизированной кристаллизационной способностью,

(d) с повышением гидрофильной способности матриц.

В предпочтительных воплощениях полипептид составляет от 1 до 50 весовых процентов от общего веса ионно-молекулярного конъюгата и предпочтительно более чем 82%, более предпочтительно 95% и наиболее предпочтительно 99%, причем присутствующий в композиции полипептид является конъюгированным со сложным эфиром; компонент сложного полиэфира ионно-молекулярного конъюгата имеет вязкость приблизительно от 0,05 до 0,7 децилитр на грамм в хлороформе; и сложный полиэфир имеет средний молекулярный вес приблизительно 1200-40000.

Полимерные ионно-молекулярные конъюгаты данного изобретения легко могут быть внесены в микросферы или микрочастицы для инъекций или пленки или стержни для имплантации без необходимости использовать процесс, приводящий к получению многофазных эмульсий или неводных двухфазных систем. Предпочтительно, микрочастицы изготавливают (а) растворением композиции в апротонном органическом растворителе, обладающем способностью смешиваться с водой; (b) смешением органического растворителя с водой и (с) выделением микрочастиц из воды. В предпочтительных воплощениях органический растворитель выбирают из группы, включающей ацетон, ацетонитрил, тетрагидрофуран, диметилформамид и диметоксиэтиленгликоль.

В предпочтительных воплощениях ионно-молекулярный конъюгат сложного полиэфира с полипептидом обладает способностью выделять *in vivo* терапевтически эффективную дозу биоактивного полипептида в течение периода, равного по меньшей мере 20 дням, более предпочтительно - в течение периода до 95 дней, но не менее чем 7 дней. В других предпочтительных воплощениях выделение

терапевтического ионно-молекулярного конъюгата является, по существу, монофазным.

Композиции данного изобретения с длительным выделением действующего вещества предпочтительно изготавливают (а) обеспечением наличия сложного полиэфира, обладающего свободными COOH-группами, и биоактивного полипептида, имеющего по меньшей мере один эффективный ионогенный амин; и (b) ионным конъюгированием сложного полиэфира с пептидом для образования ионно-молекулярного конъюгата, в котором по меньшей мере 85% веса полипептида, присутствующего в композиции, является ионно конъюгированным со сложным полиэфиром. Сложный полиэфир может быть полиэфиром, который имеет достаточное число свободных COOH-групп прежде всего или, если вначале имеется недостаточное количество таких групп для получения необходимого грузочного уровня, сложный полиэфир может подвергаться (1) реакции, например, с яблочной или лимонной кислотой посредством реакции этерификации или функционального внутреннего обмена или (2) реакции образования кислотных закрывающих групп с, например, глутаровым ангидридом или (3) сложный полиэфир может быть обработан основанием, например гидроксидом натрия, для открытия кислотных групп. Наконец, ионно-молекулярный конъюгат сложного полиэфира с полипептидом может быть превращен в пленки или стержни для имплантации или микросферы или микрочастицы для инъекций, способные выделять *in vivo* полипептид.

Предпочтительно, сложный полиэфир синтезируют каталитической или автокаталитической прямой конденсацией одной или более оксикислоты, например гликолевой кислоты и молочной кислоты, в присутствии поликарбоневой оксикислоты предопределенной концентрации, например яблочной или лимонной кислоты. Сложные полиэфиры, полученные таким образом, обладают кислотно-закрытыми гидроксильными концевыми группами, которые предпочтительно являются частично или полностью кислотно-закрытыми.

Сложные полиэфиры могут также быть синтезированы каталитической полимеризацией лактонов с ациклизацией (раскрытием цикла) или полимеризацией циклических мономеров, таких как капролактон, п-диоксанон, триметиленкарбонат, 1,5-диоксепан-2-он или 1,4-диоксепан-2-он, в присутствии инициатора цепи, например поликарбоневой оксикислоты.

Другой способ синтеза включает реакцию оксикислоты с циклическим димером с последующей конденсацией системы с открытой цепью в присутствии поликарбоневой кислоты.

Еще один способ синтеза включает реакцию органической поликарбоневой кислоты с предварительно полученным сложным полиэфиром.

В ранее указанных предпочтительных воплощениях кислотно-закрытый сложный полиэфир имеет отношение числа карбоксильных к числу гидроксильных концевых групп, равное более чем единице и приближающееся к бесконечности (т.е.

удаление всех гидроксильных групп), со средней степенью полимеризации от 10 до 300, в особенно предпочтительных воплощениях от 20 до 50.

Альтернативно, сложный полиэфир превращают в способный к образованию ионно-молекулярного конъюгата с биоактивным полипептидом обработкой основанием, например гидроксидом натрия.

Предпочтительно ионно-молекулярный конъюгат сложного полиэфира с полипептидом синтезируют прямым взаимодействием сложного полиэфира, например, в свободной форме с полипептидом, например, в свободной форме в подходящей жидкой среде. В других предпочтительных воплощениях подходящие растворители для образования конъюгата должны быть смесью апротонного растворителя (например, ацетон, тетрагидрофуран (ТГФ) или этиленгликольдиметилат) и подходящего растворителя для пептида (например, вода) в таких пропорциях, чтобы эти две системы смешивались. Предпочтительно полипептид является солью монокарбоновой кислоты, имеющей рКа, большую или равную 3,5. Предпочтительно полипептид имеет по меньшей мере одну эффективную ионогенную аминную группу.

В предпочтительных воплощениях полипептид составляет от 1 до 50% веса и предпочтительно от 19 до 20 процентов веса ионно-молекулярного конъюгата сложного эфира и полипептида. В предпочтительных воплощениях доступные карбоксильные группы сложного полиэфира частично нейтрализованы ионом щелочного металла или органическими основаниями. В других предпочтительных воплощениях щелочная обработка обеспечивает диссоциацию цепи сложного полиэфира и образование связывающих сайтов с меньшим молекулярным весом.

Термин "полипептид" в данном описании означает белок, пептид, олигопептид или синтетический олигопептид.

Термин "поликарбоновая", использованный в данном описании, относится к соединениям, обладающим более чем одной карбоксильной группой, например к яблочной или лимонной кислоте.

Термин "средняя степень полимеризации" в данном описании используется для обозначения числа повторений мономерного фрагмента.

Термин "эффективный ионогенный амин", использованный в данном описании, относится к полипептиду, который содержит по меньшей мере одну аминную группу, способную образовывать при благоприятных условиях ион.

Термин "кислотно-закрытый" относится в данном описании к соединениям, имеющим на конце кислотную группу.

Термин "частично кислотно-закрытый" в данном описании относится к соединениям, в которых от 1 до 99 процентов их гидроксильных концевых групп закрыты кислотными группами.

Термин "полностью кислотно-закрытый" в данном описании относится к обозначенным соединениям, в которых более чем 99,9% их гидроксильных групп закрыты кислотными группами.

Термин "оксикислота" в данном описании относится к любому соединению, содержащему гидроксильную и карбоксильную группы.

Термин "монокарбоновая оксикислота" в данном описании относится к органической кислоте с одной карбоксильной группой и одной или более гидроксильными группами.

Термин "органический азеотропообразователь" относится к органическим жидкостям, которые перегоняются вместе с водой.

"Биоактивной" в данном описании называют молекулу, которая проявляет или вызывает биологическое действие.

"Ациклизация" в данном описании - это реакция, приводящая к раскрытию цикла.

Термин "поликонденсация" относится к образованию сложного полиэфира конденсацией двух или более молекул.

Данное изобретение предлагает новую фармацевтическую композицию, которая химически связывает биосовместимый биоразлагаемый сложный полиэфир с олигопептидами, полипептидами, пептидами или белками в гомогенную структуру ионного типа. Химическим связыванием полиэфиров различных молекулярных весов с терапевтическими агентами химические характеристики композиции могут быть точно сохранены для обеспечения регулируемого монофазного выделения биологически активной полипептидной молекулы *in vivo*. Кроме того, композиции данного изобретения легко оптимизируются с получением функциональных свойств для большей нагрузки терапевтически активного полипептида.

Другие характерные черты и преимущества изобретения будут понятны из следующего подробного описания предпочтительных воплощений и из формулы изобретения.

Краткое описание чертежей.

На фиг. 1 изображены изомеры поликарбоновой кислотно-закрытого лактид/гликолид (яблочного типа) сополимера.

На фиг. 2 изображен молекулярный конъюгат и показано химическое взаимодействие между лактид/гликолид (яблочного типа) сополимером и соматулином (Somatuline BIM-23014).

На фиг. 3 изображен график, показывающий высвобождение пептида, выраженное в процентах, из ионно-молекулярных конъюгатов в фосфатно-солевой буфер при температуре 37 °C в течение 28 дней.

Описание предпочтительных воплощений  
Синтез.

Биоразлагаемые или абсорбируемые сложные полиэфиры данного изобретения получают специально для достижения требуемой химической реакционной способности, обеспечивающей контролируемую способность цепи к гидролизу, и максимальной связывающей способности в отношении олигопептидов, полипептидов и белков, обладающих положительным зарядом при физиологической pH, посредством точного выбора составных мономеров, сомономеров или входящих фрагментов для образования цепочек с определенными структурами и

молекулярными весами (см., например, фиг. 2).

Для получения композиций данного изобретения используют трехстадийный синтез в пределах возможностей, которыми располагает специалист. Стадии включают: (1) синтез поликарбонатовых кислотно-закрытых сложных полиэфиров; (2) синтез ионного конъюгата сложный полиэфир-полипептид посредством ионного взаимодействия поликарбонатового сложного полиэфира или сложного эфира, обработанного основанием, и биологически активных полипептидов; и (3) конверсию ионных конъюгатов в имплантаты, стержни, микросферы или микрокапсулы, способные выделять терапевтический агент в течение по меньшей мере 7 дней.

1) Синтез поликарбонатовых кислотно-закрытых сложных полиэфиров

Цепочки поликарбонатовых кислотно-закрытых сложных полиэфиров синтезируют несколькими способами, например прямой конденсацией 2-оксикислоты и поликарбонатовой органической кислоты, ступенчатой полимеризацией продуктов реакции ациклизации, полимеризацией лактона или смеси лактонов, протекающей с раскрытием цикла, или функциональным обменом поликарбонатовой органической кислоты с предварительно полученными сложными полиэфирами с большими молекулярными весами (см. фиг. 1). Ниже приведены описания синтеза поликарбонатовых кислотно-закрытых сложных полиэфиров этими перечисленными способами.

Прямую конденсацию 2-оксикислот в оптически активной и/или не активной форме и predetermined количества поликарбонатовой органической кислоты в присутствии или в отсутствии неорганического или металлоорганического катализатора, например конденсацию гликолевой кислоты, DL-молочной кислоты и DL-яблочной кислоты, обычно осуществляют посредством нагревания монокарбонатовой оксикислоты или смеси двух или более монокарбонатовых оксикислот в присутствии фракции поликарбонатовой оксикислоты в стеклянном реакторе, обеспечивающем непрерывную подачу сухого азота и перемешивание реакционной массы (в таблице I обозначен как Полиэфир типа IA). Как правило, поликонденсацию проводят при температуре 150 - 170 °C в течение периода времени продолжительностью от 4 до 72 часов. Перемешивание реакционной смеси может осуществляться при помощи магнитной мешалки или посредством барботирования газообразного азота через массу сложного полиэфира. Полимеризацию продолжают до достижения необходимого среднего молекулярного веса, который определяется по вязкости раствора и/или кислотному числу, которое определяется титрованием концевых групп. Анализ сложных полиэфиров способом титрования концевых групп выполняют следующим образом. Образцы сложных полиэфиров (300 мг - 500 мг) точно взвешивают и растворяют в минимальном количестве (10 - 30 мл) ацетона. После растворения растворы разбавляют бензиловым спиртом, доводя объем каждого раствора до 100 мл (бензиловый спирт - Mallinckrodt, Analytical Reag), и титруют

до слабого покраснения (фенолфталеин), которое считают конечной точкой титрования, используя раствор гидроксида натрия в бензиловом спирте (стандартизованный HCl образцом). Объем раствора основания, использованный для образца  $V_{об}$ , сравнивают с объемом основания, использованного для контрольного раствора  $V_{эт}$ , получая кислотное число сложного полиэфира:

$$\text{Кислотное число} = \frac{\text{Вес образца (мг)}}{\frac{\Delta V_{об}^{(мл)}}{\text{основания}} - \Delta V_{эт}^{(мл)}} \times \text{ХН}$$

При оценке полимеризации сложный полиэфир выделяют и экстрагируют водой или разбавленным водным раствором гидроксида натрия из подходящего органического раствора для удаления водорастворимых или солюбилизированных цепей с небольшими молекулярными весами.

Анализ сложных полиэфиров методом GPC выполняют следующим образом. Средние молекулярные веса (МВ) сложных полиэфиров определяют методом GPC с использованием насоса марки Waters Model 6000 и УФ-D детектора модели Dynamax (rainin). Опыты выполняют в тетрагидрофуране (Burdick Jackson, УФ-марки) с использованием геля дивинилбензола марки Jordin Gel DVB 1000 А, колонки размером 50 см x 10 см (Jordin Associates) при скорости подачи 1,2 мл/мин и температуре 25 °C.

Регистрацию пиков выполняют при 220 нм или 1,0 AUFS. Колонку калибруют, используя полистироновые эталоны (Polysciences Inc.) с МВ = 4000, 9200 и 25000.

Разновидностью процесса прямой конденсации является применение органического азеотропообразователя и катионообменной смолы в качестве катализатора конденсации (продукты этого процесса в таблице обозначены как Полиэфиры типа IB). В данном процессе необходимыми являются стадии фильтрации и выпаривания для удаления катализатора и азеотропообразователя соответственно. Типичные примеры сложных полиэфиров, полученные с помощью этих способов, а также соответствующие данные анализа приведены в таблице I.

Ступенчатая полимеризация продуктов реакции ациклизации, при которой оксикислота реагирует с циклическими димерами, и последующая конденсация образующихся систем с открытой цепочкой в присутствии predetermined количеств поликарбонатовой кислоты и в присутствии или в отсутствие подходящего катализатора конденсации, например гликолевой кислоты, L-лактида и DL-яблочной кислоты, по существу, аналогична процессу конденсации, описанному выше, за исключением того, что в ней используется смесь монокарбонатовой оксикислоты, циклического димера вторичной оксикислоты и поликарбонатовая оксикислота. Примеры полиэфиров, полученных с помощью этого способа, и соответствующие данные анализа представлены в таблице II. В том случае, когда циклический димер является предварительно обработанным водой, систему обрабатывают как при простой ступенчатой полимеризации.

Полимеризация лактона или смеси лактонов, протекающая с раскрытием цикла в присутствии поликарбоневой оксикислоты предопределенной концентрации в качестве инициатора роста макромолекулы и каталитического количества

металлоорганического катализатора, например смеси L-лактида, гликолида и DL-яблочной кислоты, в присутствии октоата двухвалентного олова, осуществляется при использовании сухих циклических мономеров или смеси циклических мономеров и следового количества октоата двухвалентного олова в виде 0,33 М-ного раствора в толуоле, которые в сухой бескислородной атмосфере переносятся в стеклянный реактор, снабженный магнитной или механической мешалкой. Реакцию полимеризации проводят в атмосфере азота с использованием подходящей последовательности нагрева до достижения требуемого молекулярного веса, который определяется по вязкости раствора. В конце процесса полимеризации температуру понижают и непрореагировавшие мономеры отгоняют под вакуумом. Массу сложных полиэфиров затем охлаждают и водорастворимые фракции с низкими молекулярными весами удаляют из реакционной массы посредством низкотемпературной экстракции из подходящего органического растворителя. Раствор сушат затем и растворитель отгоняют. После этого по характеристической вязкости определяют молекулярный вес, а при помощи титрования концевых групп вычисляют кислотное число. Примеры сложных полиэфиров, полученных данным способом, и соответствующие результаты анализа приведены в таблице III.

Функциональный обмен поликарбоневой или полиосновной органической оксикислоты с предварительно полученными сложными полиэфирами больших молекулярных весов с соотношением  $\text{COOH}/\text{OH}$  от единицы до нуля предпочтительно в присутствии металлоорганического катализатора, например реакция в расплаве 85/15 лактид/гликолид сополимера с молекулярным весом более 5000 и соотношением  $\text{COOH}/\text{OH} \leq 1$  и DL-яблочной кислотой в присутствии октановокислого олова для получения низкомолекулярных сложных полиэфиров с соотношением  $\text{COOH}/\text{OH}$ , меньшим или равным единице, проводят при нагревании высокомолекулярного сложного полиэфира с предопределенным количеством поликарбоневой кислоты или поликарбоневой оксикислоты в присутствии следов металлоорганического катализатора, такого как октановокислого олова. Реагенты нагревают до температуры более 150°C под атмосферой сухого азота при интенсивном перемешивании до завершения функционального обмена, который контролируется измерением уменьшения непрореагировавшей поликарбоневой кислоты. Результат реакции определяют посредством контроля молекулярного веса (определяется по вязкости раствора с использованием капиллярной вискозиметрии при 28°C) полученного сложного полиэфира с меньшим молекулярным весом и наличием непрореагировавшей поликарбоневой кислоты. Это осуществляют посредством

водной экстракции образца сложного полиэфира и анализом экстракта методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЖХ). Содержание остаточного мономера, димера и поликарбоневой кислоты определяют методом ВЖХ с использованием насоса марки Waters Model 6000 и УФ-D детектора модели Dynamax (Rainin) (205 нм, 1,0 AUFS). Проток осуществляют при использовании 0,025 н. буферного раствора  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , pH 3,5 (скорость подачи 1,0 мл/мин), используя колонку размером 25 см x 4,6 мм с наполнителем Nucleosil C18, 5 мм.

Искомый сложный полиэфир выделяют и очищают от примесей аналогично способу, описанному для ациклической полимеризации. Пример сложного полиэфира, полученного этим способом, и соответствующие данные анализа представлены в таблице IV.

В данном изобретении для синтеза сложных полиэфиров используются следующие мономеры: L-молочная кислота, DL-молочная кислота,  $\epsilon$ -капролактон, п-диоксанон,  $\epsilon$ -капроновая кислота, триметиленкарбонат, 1,5-диоксепан-2-он, 1,4-диоксепан-2-он, гликолид и мезолактид. Примеры инициаторов роста макромолекулы и/или модификаторов цепей включают яблочную кислоту и лимонную кислоту.

2) Синтез ионного конъюгата сложного полиэфира и полипептида ионным взаимодействием поликарбоневых кислотно-закрытых сложных полиэфиров и биологических активных полипептидов.

Поликарбоневые кислотно-закрытые биоразлагаемые сложные полиэфиры используют для получения ионно-молекулярных конъюгатов с моно- или поликарбоневыми олигопептидами, пептидами или белками с доступными эффективными ионогенными аминными группами (см. фиг. 2). Кроме того, любой сложный полиэфир способен образовывать ионно-молекулярный конъюгат с полипептидом при условии, что он обрабатывается основанием, например, 0,1 н. гидроксидом натрия. Такая обработка открывает кислотные группы для многочисленных участков ионного взаимодействия с катионным полипептидом.

Таким образом, эти конъюгаты получают прямым молекулярным взаимодействием компонентов в подходящем растворителе с или без предварительной обработки сложного полиэфира неорганическим основанием для получения максимальной скорости связывания с основным лекарственным средством. Как отмечалось выше, ионное взаимодействие компонентов ионных конъюгатов повышается в пределах разницы в значениях их  $pK_a$ .

Сложный полиэфир растворяют в подходящем апротонном растворителе с получением концентрации от 2% до 20% вес/объем. Такие растворители должны растворять полиэфиры, а также должны быть частично смешиваемы с водой. Подходящими растворителями для этих целей являются тетрагидрофуран, ацетон и диметилловый эфир этиленгликоля. Для получения максимальной связывающей способности сложного полиэфира к этим растворителям добавляют водный раствор основания, такого

как гидроксид натрия, калия, аммония или карбонат натрия, калия. В целом, количество добавляемого основания соответствует количеству кислоты, представленному подсчитанным анионным уровнем основного пептида, используемого в данном синтезе.

После недолгого перемешивания смеси в сложный эфир-основание добавляют водный раствор пептида или соли пептида при уровне дозирования пептида к сложному полиэфиру в пределах от 2% до 50% вес./вес. (пептид/полиэфир). Эту смесь перемешивают в течение периода до трех часов, а затем растворитель отгоняют и продукт сушат под вакуумом. Полученный продукт может быть далее использован для изготовления дозированной композиции. Образующаяся фармацевтическая композиция, как полагают, должна быть изготовлена целиком из ионно-молекулярных конъюгатов и, по существу, свободна от микроскопических и макроскопических сфер активного лекарственного средства, диспергированных в биоразлагаемой матрице. Примеры полученных ионно-молекулярных конъюгатов и соответствующие данные анализа представлены в таблице V.

3) Конверсия ионных конъюгатов в имплантаты, стержни, микросферы или микрочастицы, способные высвобождать терапевтический агент в течение по меньшей мере 20 дней в монофазный профиль.

Ионные конъюгатные соли данного изобретения могут быть превращены в: (A) стерильные микросферы для инъекций с или без от 0,1 до 10% твердого многоатомного спирта в качестве вспомогательной добавки, содержащие полипептид в количестве от 1 до 50% веса, который они могут выделять соответственно в, по существу, монофазный профиль и поддерживать фармацевтическую активность в течение периода продолжительностью от одной до 12 недель; (B) стерильные имплантируемые пленки, изготовленные литьем, прессованием или экструзией, с или без фармацевтически неактивной вспомогательной добавки, способные обеспечивать профиль высвобождения, аналогичный описанному в (A).

Опыт высвобождения *in vitro*.

Образцы высушенного и размолотого материала ионного конъюгата весом 50 мг каждый помещают в сцинтилляционные емкости диаметром 25 мм. Аликвоты объемом 5 мл модифицированного фосфатно-солевого буфера (фосфатно-солевой буфер: 2,78 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,654 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 5,9 г  $\text{NaCl}$ , 0,5 г  $\text{NaN}_3$ , 1 литр деионизированной воды; pH 7,27) добавляют в каждую емкость, емкости помещают на вибратор марки Lab-Line Orbit Environ-Shaker и вращают со скоростью 120 об/мин при температуре 37°C. Емкости периодически достают из вибратора, декантируют раствор и наполняют емкости фосфатно-солевым буфером. Количество высвобожденного пептида определяют, подвергая декантированный раствор анализу методом ВЖХ.

Экстракция пептида из ионных конъюгатов.

Образец ионно-молекулярного конъюгата весом 50 мг смешивают с 20 мл метилхлорида. Смесь экстрагируют последовательно 50 мл, 20 мл и 20 мл 2 н.

укусной кислоты. Экстракты уксусной кислоты соединяют и анализируют на содержание пептида методом ВЖХ. Анализ на содержание пептида методом ВЖХ проводят следующим образом. Анализ ВЖХ выполняют при использовании насоса марки Waters Model M-45 и детектора EM Sciens с длиной волны 220 нм и 1,0 AUFS. Пептиды выделяют при использовании Lichrospher (EM-разделение) C18, 100  $\mu\text{m}$ , 5 нм, колонки

25 см x 4,6 мм и в качестве элюента буферного раствора 30% ацетонитрил/0,1% ТФУК.

В таблице VI представлены данные опыта *in vitro*, показывающие количество пептида, выделенного в течение периода продолжительностью 28 дней для следующих ионно-молекулярных конъюгатов: 49:49:2 L-молочный/гликолевый/яблочный D-триптофан<sup>6</sup> [LHPH] (пример 8), 49:49:2 L-молочный/гликолевый/яблочный соматостатин - опухольингибирующий аналог (пример 9) и 73,5:24,5:2 поли-L-лактид/гликолевый/яблочный D-триптофан<sup>6</sup> (пример 10). На фиг. 3 показана графическая интерпретация этих данных.

Определение количества пептидов в ионных конъюгатах.

Ионно-связанные пептиды в конъюгатах количественно определяют растворением 10 мг образцов в 5,7 мл смеси ацетона и 0,1 М водной трифторуксусной кислоты в соотношении 9:1. Раствор подвергают вибрации при температуре 25°C в течение 15-24 часов, а затем фильтруют через тефлоновые фильтрующие патроны размером 0,5 мкм. Фильтраты подвергают анализу на содержание пептидов методом ВЖХ. Анализ пептидов методом ВЖХ проводят при использовании Millipore Wisp Autosampler модели 717, насоса модели 510 и УФ-детектора 486 при длине волны 220 нм. Пептиды пропускают через Lichrospher (EM-разделение) 25 см x 4,6 мм C18, колонку 5 мкм, 100 ангстрем, со скоростью истечения 1,0 мл в минуту при использовании в качестве элюентной системы буфера 35% ацетонитрила в 0,14% перхлората натрия. Количество пептидов определяется сравнением площади соответствующего пика в анализируемом образце с площадью введенного пептидного эталона.

Применение

Любые кислото-несущие ионные конъюгаты сложных полиэфиров и полипептидов, описанные в данном изобретении, могут быть введены реципиенту сами по себе или в сочетании с фармацевтически приемлемым компонентом. Несмотря на то, что они могут быть доступны для введения подкожно, внутримышечно, парентерально, назально, терапевтический препарат вводят в соответствии с тем заболеванием, которое подлежит лечению. Концентрация композиции в препаратах изобретения будет изменяться в зависимости от ряда факторов, включая дозу, которая должна быть введена, и способ введения.

Мы полагаем, что специалист данной области может, используя предыдущее описание без дополнительных уточнений, наиболее полно применить его. Таким образом, приведенные ниже описания



воплощений следует рассматривать только как иллюстрирующие, а не ограничивающие область данного изобретения.

Пример 1. Способ прямой конденсации. Синтез 50/50 поли (D,L-молочный-со-гликолевый) эфира с катализатором Amberlyst 15.

D, L-молочную кислоту (85%-ный раствор в воде; 13,7 г, 0,13 моля) смешивают с гликолевой кислотой (10 г, 0,13 моля) в круглодонной колбе, снабженной магнитной мешалкой, ловушкой Дина-Старка и конденсатором, охлаждаемым водой. К смеси добавляют толуол (100 мл) и шарики катализатора Amberlyst 15 и полученную массу кипятят в течение 72 часов под атмосферой азота, отгоняя воду из смеси. Смесь охлаждают, толуол декантируют от отвердевшей массы, продукт растворяют в метиленхлориде (250 мл). Раствор метиленхлорида обрабатывают активированным углем (Darco, 500 мг), фильтруют и сушат под вакуумом на роторном испарителе. Сложный полиэфир затем сушат под высоким вакуумом (1 мм рт.ст.) при температуре 40°C, в результате чего получают белый порошок ( $\eta_{\text{хар}}$  в хлороформе = 0,3, кислотное число 2439,  $T_c = 12^\circ\text{C}$ ).

Пример 2. Способ прямой конденсации. Синтез 49/49/2

поли(L-молочный-со-гликолевый/лимонный) эфира с катализатором Amberlyst 15.

Используя установку, аналогичную описанной выше, L-молочную кислоту (88%-ный водный раствор; 25,6 г, 0,25 моля) смешивают с гликолевой кислотой (19,2 г, 0,25 моля), моногидратом лимонной кислоты (2,33 г, 0,011 моля), шариками катализатора Amberlyst 15 (500 мг) и толуолом (150 мл) в круглодонной колбе. Смесь нагревают при перемешивании до температуры кипения и кипятят в течение 51 часа, удаляя воду при помощи ловушки Дина-Старка. Толуол декантируют от полутвердого продукта. Сложный полиэфир растворяют в ацетоне (300 мл), фильтруют и сушат на роторном испарителе. Твердый сложный полиэфир затем снова растворяют в метиленхлориде и дважды промывают водой (2 x 150 мл) для удаления растворимых олигомеров. Органический раствор упаривают на роторном испарителе, остаток тщательно сушат под вакуумом, в результате получают продукт в виде белого порошка (см. таблицу I, сложный полиэфир типа IB, полимер 4) ( $\eta_x$  в хлороформе = 0,11, кислотное число 842,  $T_c = 15^\circ\text{C}$ ).

Пример 3. Способ ступенчатой полимеризации. Синтез 73,5/24,5/2 поли(L-лактид-со-гликолевый/яблочный) эфира при использовании в качестве катализатора яблочной кислоты.

Используя цилиндрическую ампулу объемом 150 мл, снабженную устройством для ввода азота, L-лактид (20 г, 0,139 моля) смешивают с гликолевой кислотой (7,1 г, 0,093 моля) и d,l-яблочной кислотой (1,0 г, 0,0075 моля). Смесь перемешивают, барботируя азот через входное устройство для нагнетания газа (100 мл/мин), и нагревают от температуры 25°C до 155°C в течение 100 минут. Реакционную массу выдерживают при температуре 155°C в

течение 70 часов, в процессе чего воду из полимеризационного процесса удаляют через охлажденную ловушку на линии выхода. По истечении 70 часов реакционную массу охлаждают до 100°C и выливают в охлажденный стальной приемник для затвердевания. Твердый полиэфир затем растворяют в метиленхлориде, дважды промывают водой для удаления растворимых олигомеров (2 x 150 мл). Органический раствор упаривают на роторном испарителе и продукт тщательно сушат под вакуумом, в результате чего получают вещество в виде порошка белого цвета (см. таблицу II, сложный полиэфир типа II, полимер 2) ( $\eta_{\text{хар}}$  в хлороформе = 0,13, кислотное число 1800,  $T_c = 27^\circ\text{C}$ ).

Пример 4. Способ полимеризации с раскрытием цикла. Синтез 75/25 поли(L-лактид-со-гликолид)эфира, инициированный яблочной кислотой.

L-лактид (12,0 г, 0,0833 моля), гликолид (3,21 г, 0,0277 моля), яблочную кислоту (0,3042 г, 0,00227 моля) и катализатор - октановокислородное олово (0,33 М в толуоле, 67 мкл, 0,022 моля) помещают в атмосфере азота в стеклянную ампулу, снабженную магнитной мешалкой. Систему продувают азотом и в течение некоторого времени создают в ней вакуум, а затем запаивают. Затем реагенты подвергают плавлению при температуре 140°C, полученный расплав нагревают и выдерживают при температуре 180°C, 190°C, 180°C и 150°C в течение 1, 4,5, 12 и 2-х часов соответственно. После охлаждения до комнатной температуры полиэфир снова нагревают до 110°C под вакуумом менее 1 мм рт.ст. и выдерживают в этих условиях в течение приблизительно одного часа для удаления мономера, снова охлаждают до комнатной температуры, гасят жидким азотом, выделяют и сушат под вакуумом ( $\eta_{\text{хар}}$  в хлороформе = 0,20, кислотное число 2560,  $T_c = 39^\circ\text{C}$ ).

Пример 5. Способ полимеризации с раскрытием цикла. Синтез сложного 50/50 поли(L,D-лактид-со-гликолид) эфира, инициированный лимонной кислотой.

D, L-лактид (10,0 г, 0,0694 моля) смешивают с гликолидом (8,06 г, 0,0694 моля), лимонной кислотой (1,07 г, 0,0555 моля) и октановокислым оловом (0,33 М-ный раствор в толуоле, 84 мкл, 0,0278 ммоль) под атмосферой азота в стеклянной ампуле, снабженной магнитной мешалкой и запаянной под вакуумом. Реагенты подвергают плавлению и выдерживают при температуре 180°C, 185°C, 195°C и 120°C в течение 1, 2, 7 и 9 часов соответственно. Сложный полиэфир охлаждают до комнатной температуры, гасят жидким азотом, продукт выделяют и сушат ( $\eta_{\text{хар}}$  в хлороформе = 0,26, кислотное число 970,  $T_c = 23^\circ\text{C}$ ).

Пример 6. Способ полимеризации с раскрытием цикла. Синтез сложного 50/50 поли(L-лактид-со-гликолид) эфира, инициированный 1,6-гександиолом.

Используя описанную выше систему, D, L-лактид (10,0 г, 0,0694 моля), гликолид (8,06 г, 0,0694 моля), 1,6-гександиол (0,656 г, 0,00666 моля) и октановокислородное олово (0,33 М-ный раствор в толуоле, 85 мкл, 0,0278 ммоль) помещают под атмосферой

сухого азота в стеклянную ампулу, которую после этого запаивают под вакуумом. Реагенты выдерживали при температуре 150 °С, 185 °С, 150 °С и 120 °С в течение 0,5, 4, 1,5 и 3 часов соответственно. Сложный полиэфир выделяют и сушат (см. таблица III, полиэфир типа III, полимер 5) ( $\eta_{\text{хар}}$  в хлороформе = 0,39, кислотное число 10138,  $T_c = 30^\circ\text{C}$ ).

Пример 7. Способ функционального обмена. Синтез сложного 50/50 поли(D, L-лактид-со-гликолид) эфира, содержащего карбоксильную группу.

50/50 поли(D, L-лактид-со-гликолид) эфир (Boehringer A001, 8 г), лимонную кислоту (0,8 г, 4,16 ммоль) и октановокислородное олово (2 капли) помещают в стеклянную ампулу под атмосферой сухого азота и запаивают. Смесь нагревают до 150 °С и выдерживают при этой температуре 4 часа, охлаждают до комнатной температуры, гасят жидким азотом, выделяют и сушат конечный продукт (см. таблицу IV, сложный полиэфир типа IV, полимер 1) ( $\eta_{\text{хар}}$  в хлороформе = 0,26, кислотное число 670,  $T_c = 23^\circ\text{C}$ ).

Пример 8. Синтез ионно-молекулярного конъюгата сложного 49:49:2 (L-молочный/гликолевый/яблочный) эфира (см. таблицу I, полимер 4) и гонадотропинвыделяющего гормона D-Trp<sup>6</sup> [LHRH].

500 мг сложного 49: 49: 2 L-молочный/гликолевый/яблочный полиэфира (синтезирован прямой конденсацией; МВ = 9500; кислотное число 1420) растворяют в 10 мл ацетона (Mallinckrodt Anal. Reagent). К полученной смеси добавляют раствор гидроксида натрия (0,1 н., 1,14 мл) и смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 15 минут. Раствор 100 мг гонадотропин-выделяющего гормона D-Trp<sup>6</sup> [LHRH] (BIM-21003 Пептид I, основное содержание 87%, содержание ацетата 7%) в 1,0 мл воды добавляют в реакционную смесь и перемешивают полученную массу при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем отгоняют растворитель сначала на роторном испарителе под вакуумом при температуре менее 40 °С, а затем в десикаторе при комнатной температуре в течение 1 часа под вакуумом 1 мм рт.ст. Высушенное твердое вещество растирают в порошок и смешивают со 100 мл деионизированной воды, после чего выделяют фильтрацией. Водный фильтрат анализируют методом ВЖХ, обнаруживая содержание растворимого пептида менее 1 мг. Твердый материал сушат несколько дней под вакуумом с получением 540 мг белого порошка. Порошок используют в опыте *in vitro* (см. таблицу VI, пример 8).

Пример 9. Синтез ионно-молекулярного конъюгата сложного 49:49:2 L-молочный/гликолевый/яблочный полиэфира (см. таблицу I, полимер 4) и соматостатин/опухолемингибирующего аналога.

100 мг сложного 49: 49: 2 L-молочный/гликолевый/яблочный полиэфира (синтезирован прямой конденсацией; МВ = 9500; кислотное число 1420) растворяют в 2 мл ацетона (Mallinckrodt Analytic Reagent). К полученной смеси добавляют раствор гидроксида натрия (0,1 н., 0,32 мл) и смесь

перемешивают при комнатной температуре в течение 15 минут. Раствор 20 мг соматостатин/опухолемингибирующего аналога (BIM-23014 Пептид II, основное содержание 83%, содержание ацетата 9,8%) в 1,2 мл воды добавляют к полученной смеси и всю массу перемешивают в течение 1 часа при комнатной температуре. Растворители затем отгоняют сначала на роторном испарителе при температуре менее 40 °С, а затем в десикаторе в течение 1 часа при комнатной температуре под вакуумом 1 мм рт. ст. Высушенное твердое вещество растирают в порошок и смешивают с 20 мл деионизированной воды, после чего выделяют фильтрацией. Водный фильтрат анализируют методом ВЖХ, обнаруживая содержание растворимого пептида менее 0,05 мг. Твердый материал сушат несколько дней под вакуумом, в результате получают 106 мг белого порошка. Порошок растирают и используют в опыте высвобождения *in vitro* (см. таблицу VI, пример 9).

Пример 10. Синтез ионного конъюгата сложного 73,5:24,5:2 поли (L-лактид/гликолевый/яблочный) эфира (см. таблицу II, полимер 2) и гонадотропинвыделяющего гормона.

80 мг сложного 73,5: 24,5: 2 поли(L-лактид-гликолевый/яблочный) эфира (синтезирован ступенчатой полимеризацией ацилированных продуктов; кислотное число 1800) растворяют в ацетоне (16 мл). К полученной смеси добавляют раствор гидроксида натрия (0,1 н., 2,8 мл) и смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 20 минут. Раствор гонадотропинвыделяющего гормона 200 мг D-Trp<sup>6</sup> [LHRH] (BIM-21003; основное содержание 87%, содержание ацетата 7%) в 2 мл воды добавляют к образовавшейся смеси и всю массу перемешивают в течение 90 минут. Растворители удаляют и образовавшееся твердое вещество растирают и смешивают с деионизированной водой, как в примере 8, которая показывает содержание водорастворимого пептида менее чем 1%. Выделенное твердое вещество сушат 4 дня под вакуумом, после чего получают 839 мг белого порошка. Порошок измельчают и используют в опыте высвобождения *in vitro* (см. таблицу VI, пример 10).

Пример 11. Получение ионного конъюгата пептид-полимер в виде микрочастицы 1,50 L-лактид/гликолид/d,l-яблочный сложного полиэфира (65:33:2).

Конъюгаты синтезируют полимеризацией с раскрытием цикла, как в примере 4 (МВ = 4700, полидисперсность 1,3, как определено гель-проникающей хроматографией на колонке 50 x 1 см со смешанным наполнителем Jordi Gel, элюент ТГФ, детектор рассеивающего света  $dn/de = 0,05$ , кислотное число 1475 определено титрованием,  $T_c = 42^\circ\text{C}$ ), растворяют в 40 мл ацетона. Кислотные группы нейтрализуют 2,0 г BIM-23014 (содержание пептида 83,7%, содержание ацетата 11,5) в 20 мл воды, который добавляется медленно при перемешивании к раствору полимера. Дополнительные 40 мл ацетона добавляют небольшими порциями в процессе добавления пептида для предотвращения образования осадка. Прозрачный бесцветный раствор перемешивают 1 час, а затем

упаривают досуха под вакуумом. Образовавшийся белый порошок снова растворяют в смеси 20 мл ацетона и 2 мл Milli - Q воды с образованием прозрачного раствора. Раствор этот вводится через 0,2 мкм тефлоновый фильтр в емкость, содержащую 500 мл Milli - Q воды с температурой 4°C при быстром перемешивании. Фаза полимер/пептидного комплекса выделяется немедленно в небольшие частицы в результате контакта с водой. После перемешивания в течение 30 минут при температуре 4°C остаточный ацетон удаляют под вакуумом, а твердые частицы выделяют центрифугированием, снова суспендируют в 100 мл Milli - Q воды и снова центрифугируют. Выделенное твердое вещество сушат леофильной сушкой с получением 1530 мг белого свободного текучего порошка. Размер частиц порошка составляет от 2 до 100 мкм, T<sub>c</sub> ионного конъюгата равна 53°C. Общий остаток пептида, не связанного во всех водных супернатантах, как найдено методом ВЖХ, составляет 63 мг. Общее начальное содержание пептида, как определено элементарным анализом содержания азота, составляет 19,9% веса. Количество экстрагируемого из конъюгата пептида составляет 16,9% веса, что определено методом экстракции ацетон/0,1 М трифторуксусная кислота. Таким образом, полученный конъюгат сохраняет на 84,8% ионный экстрагируемый характер.

Квалифицированный специалист исходя из вышеприведенного описания легко сможет оценить характерные особенности данного изобретения и, не выделяя из области данного изобретения, может выполнить различные изменения и модификации изобретения для адаптивирования к различным условиям. Следовательно, другие воплощения также лежат в области данного изобретения.

#### Формула изобретения:

1. Ионный конъюгат с длительным периодом высвобождения пептида, содержащий сложный полиэфир, содержащий одну или более свободных COOH-групп, ионно сопряженный с биологически активным полипептидом, содержащим по меньшей мере один эффективный ионогенный амин, причем по меньшей мере 50 вес.% полипептида, присутствующего в композиции, ионно сопряжены со сложным полиэфиром.

2. Ионный конъюгат по п.1, где в сложном полиэфире отношение количества карбоксильных групп к количеству гидроксильных групп больше единицы.

3. Ионный конъюгат по п.1, где полиэфир образован компонентом, выбранным из группы, включающей L-молочную кислоту, D-молочную кислоту, DL-молочную кислоту, E-капролактон, п-диоксанон, E-капроновую кислоту, алкиленоксалат, циклоалкиленоксалат, алкиленсукцинат, β-гидроксипутират, замещенный или незамещенный триметиленкарбонат, 1,5-диоксепан-2-он, 1,4-диоксепан-2-он, гликолид, гликолевую кислоту, L-лактид, D-лактид, DL-лактид, мезо-лактид и их оптически активные изомеры, рацематы и сополимеры.

4. Ионный конъюгат по п.1, где сложный

полиэфир является частично кислотнo-закрытым глутаровым ангидридом.

5. Ионный конъюгат по п.1, где сложный полиэфир является полностью кислотнo-закрытым глутаровым ангидридом.

6. Ионный конъюгат по п.1, где сложный полиэфир имеет степень полимеризации в пределах от 10 до 300.

7. Ионный конъюгат по п.1, где сложный полиэфир имеет вязкость от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,7 дал на 1 г в хлороформе и средний молекулярный вес приблизительно 1200 - 40000.

8. Ионный конъюгат по п.1, где биоактивный полипептид составляет от 1 до 50% от общего веса указанного ионно-молекулярного конъюгата.

9. Ионный конъюгат по п.1, где более 85% полипептида, присутствующего в композиции, ионно сопряжено со сложным полиэфиром.

10. Ионный конъюгат по п.1, где полипептид выбирают из группы, включающей лютеинизирующий гормон выделяющий гормон (LHRH), соматостатин, бобмезин/гастринвыделяющий пептид (GRP), кальцитонин, брадикинин, галанин, мелано-цитстимулирующий гормон (MSH), фактор, выделяющий гормон роста (GPF), амилин, тахикинины, секретин, паразитовидный гормон (PTH), кальцитонингенвыделяющий пептид (CGRP), нейромедины, белок, связанный с гормоном щитовидной железы (PTHrP), глюкагон, нейротензин, адренкортикотропный гормон (ACTH), гормон роста - выделяющий пептид (GHRP), глюкагонвыделяющий пептид (GLP), вазоактивный кишечный пептид (VIP), гипофизарный

аденилат-циклаза-активирующий пептид (PACAP), енкафелин, пептид УУ (PUU), мотилин, субстанция P, нейропептид Н (NPY), TSH и их аналоги и фрагменты.

11. Ионный конъюгат по п.1, который способен высвободить *in vivo* терапевтически эффективную дозу полипептида в течение периода продолжительностью по меньшей мере 7 дней.

12. Способ синтеза ионного конъюгата, отличающийся тем, что (а) получают сложный полиэфир и биоактивный полипептид, имеющий по меньшей мере один эффективный ионогенный амин, и (б) проводят ионное сопряжение сложного полиэфира к полипептиду с образованием ионно-молекулярного конъюгата, в котором полипептид ионно сопряжен со сложным полиэфиром.

13. Способ по п.12, отличающийся тем, что по меньшей мере 50 вес.% полипептида, присутствующего в композиции, ионно сопряжено со сложным полиэфиром.

14. Способ по п.13, отличающийся тем, что сложные полиэфиры имеют кислотнo-закрытые гидроксильные концевые группы.

15. Способ по п.14, отличающийся тем, что гидроксильные концевые группы частично кислотнo-закрыты глутаровым ангидридом.

16. Способ по п.14, отличающийся тем, что концевые гидроксильные группы полностью кислотнo-закрыты глутаровым ангидридом.

17. Способ по п.13, отличающийся тем, что сложные полиэфиры синтезируют с использованием в качестве инициаторов

образования макромолекулы поликарбоновые оксикислоты.

18. Способ по п.13, отличающийся тем, что гидроксильные концевые группы сложных полиэфиров кислотно-закрыты.

19. Способ по п.18, отличающийся тем, что гидроксильные концевые группы частично кислотно-закрыты глутаровым ангидридом.

20. Способ по п.18, отличающийся тем, что гидроксильные концевые группы полностью кислотно-закрыты глутаровым ангидридом.

21. Способ по п. 13, отличающийся тем, что синтез сложного полиэфира приводит к средней степени полимеризации в пределах от 10 до 300.

22. Способ по п.21, отличающийся тем, что в сложном полиэфире отношение количества карбоксильных групп к количеству концевых гидроксильных групп больше единицы.

23. Способ по п.13, отличающийся тем, что синтезирование ионно-молекулярного конъюгата сложного полиэфира и полипептида включает: (а) растворение сложного полиэфира в тетрагидрофуране, ацетоне или диметиловом эфире этиленгликоля с последующим добавлением основания и (б) добавление водного раствора полипептида или соли полипептида при

загружающем уровне полипептид/сложный полиэфир от 2 до 50% вес./вес. (полипептид/сложный полиэфир).

24. Способ по п.23, отличающийся тем, что полипептид является солью кислоты, имеющей рКа больше или равно 3,5.

25. Способ по п.23, отличающийся тем, что полипептид составляет от 1 до 50% общего веса ионного конъюгата.

26. Способ по п. 23, отличающийся тем, что более чем 85% полипептида, присутствующего в композиции, ионно сопряжено со сложным полиэфиром.

27. Способ по п.23, отличающийся тем, что реакция приводит к образованию ионной связи между реагентами.

28. Способ синтезирования микрочастиц, отличающийся тем, что включает (а) растворение ионного конъюгата по п.1 в апротонном водосмешивающемся органическом растворителе; (б) смешение органического растворителя с водой и (с) выделение микрочастиц из воды.

29. Способ по п.28, отличающийся тем, что органический растворитель выбирают из группы, включающей ацетон, ацетонитрил, тетрагидрофуран, диметилформамид и диметоксиэтиленгликоль.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Таблица I

Полиэффиры, полученные способом прямой конденсации

Сложные полиэффиры типа IA						
№ полимера	Загрузка	Условия полимеризации	кислотное число	$\eta_{\text{хар}}$	Tс, °C	
I. L -Молочная кислота 88%	35,7 г (0,349M)	100°C/0,7ч	563	0,24	II	
	Гликолевая кислота	4,65 г (0,612M)	165°C/17,5ч			
	Лимонная кислота	1,75 г (0,0091M)				
2. L -Молочная кислота 88%	25,6 г (0,25M)	165°C/22ч	820	0,14	27	
	Гликолевая кислота	18,2 г (0,25M)				
	Яблочная кислота	1,5 г (0,011M)				
Сложные полиэффиры типа IB						
3. L -Молочная кислота 88%	25,6 г (0,25M)	132°C/53ч	842	0,11	15	
	Гликолевая кислота	19,2 г (0,25M)				
	Лимонная кислота	2,13 г (0,011M)	Используют сепаратор Дина-Старка. Декантируют, фильтруют в ацетон. Сушат, промывают водой. Сушат под вакуумом.			
	<i>Amberlyst</i> Шариковый катализатор № 15	0,5 г				
Толуол	150 мл					

RU 2146128 C1

RU 2146128 C1

I	2	3	4	5	6
4. L-Молочная кислота 88%	25,6 г (0,25M)	132°C/68 ч	1421	0,20	28
Гликолевая кислота	19,2 г (0,25M)				
Яблочная кислота <i>Amberlyst</i>	1,5 г(0,01M)	Используют сепаратор Дина-Старка. Декантируют, фильтруют, сушат. Промывают водой и сушат под вакуумом.			
Толуол	100 мл				

\* Определяется на дифференциальном сканирующем калориметре (TA 2100 DSC) при использовании 2-10 мг образца и скорости нагревания 10°C/мин в атмосфере азота.

RU 2146128 C1

RU 2146128 C1

Таблица II

Ступенчатая полимеризация продуктов реакции  
ациклизации

Сложные полиэфиры типа II						
№ полимера	Загрузка	Условия полимеризации	Кислотное число	$\eta_{хар}$	$T_c, ^\circ C$	*
I. / -Молочный мономер	10,0 г (0,07M)	160°C/29 ч	1200	0,21	20	
Гликолевая кислота	10,7 г (0,14M)	Яблочная кислота				
	0,79 г (0,006M)					
2. / -Молочный мономер	20,0 г (0,139M)	25°-155°C 1,5 часа	1800	0,13	27	
Гликолевая кислота	7,1 г (0,093M)	155°C/70 ч				
Яблочная кислота	1,01 г (0,0075M)	Растворяют в дихлор- метане, промывают водой и сушат под вакуумом.				

\* Определяется на дифференциальном сканирующем калориметре (ТА 2100 DSC) при использовании 2-10 мг образца и скорости нагрева 10°C/мин в атмосфере азота.

Таблица III

Сложные полиэфиры, полученные полимеризацией  
с раскрытием цикла

Сложные полиэфиры типа III						
№ полимера	Загрузка	Условия полимеризации	Кислотное число	$\eta_{хар}$	$T_c, ^\circ C$	*
I. Гликолид	3,22 г (0,028M)	120°C/0,5 ч	2150	0,79 <sup>***</sup>	38	
Л -лактид	10,7 г (0,14M)	150°C/6,0 ч				

Продолжение таблицы III.

I	2	3	4	5	6
Яблочная кислота	0,79 г (0,0061M)	120°C/11 ч			
2.Гликолид	2,84 г (0,0245M)	120°C/0,5 ч	1206	0,08	26
D, L -Лактид	20,84 г (0,139M)	180°C/2,5 ч			
Яблочная кислота	0,876 г (0,00541M)	130°C/15 ч			
3.Гликолид	2,84 г (0,0245M)	155°C/1 час	937	0,10	27
D, L -Лактид	20,0 г (0,139M)	195°C/2,5 ч			
Лимонная кислота	1,256 г (0,00654M)	190°C/2,5 ч 160°C/13 ч			
4.Гликолид	8,06 г (0,0694M)	180°C/1 час	970	0,26	23
D, L -Лактид	10,0 г (0,0694M)	185°C/2 часа			
Яблочная кислота	0,744 г (0,00555M)	195°C/7 ч 120°C/9 ч			
5.Гликолид	8,06 г (0,0694M)	150°C/0,5 ч	10138	0,39	30
D, L -Лактид	10,0 г (0,0694M)	185°C/4 ч			
1,6-гексан-диол	0,656 г (0,00555M)	150°C/1,5 ч 120°C/3 ч			
* Определяется на дифференциальном сканирующем калориметре (ТА 2100 DSC) при использовании 2-10 мг образца при скорости нагрева 10°C/мин в атмосфере азота.					
** В гексафторизопропанолe.					

RU 2146128 C1

RU 2146128 C1



Таблица IV

Сложные полиэфиры, полученные способом функционального обмена

Полиэфиры типа IV					
№ полимера	Загрузка	Условия полимеризации	Кислотное число	$\eta_{\text{хар}}$	$T_c, ^\circ\text{C}$ <sup>*</sup>
I. <i>Boehringer</i> A001	5 г (50/50 лактид/гликолид)	150°C/5 ч	670	0,26	25
Лимонная <sup>**</sup> кислота	0,8 г (0,00417M)				

\* Определяется на дифференциальном сканирующем калориметре (ТА 2100 DSC) при использовании 2-10 мг образца и скорости нагрева 10°C/мин в атмосфере азота.

\*\* Каталитическое количество октановокислого олова (2 капли 0,33 M-ного раствора, приблизительно 0,03 нмоль).

Таблица V

Ионно-молекулярные пептид-связывающие конъюгаты I)

Использованный полимер	Пептид <sup>2)</sup>	Нагрузка, %	Удерживание <sup>3)</sup> %
I. 50/50 <i>dl</i> -лактид/гликолид (коммерческий) кислотное число = 22000 $\eta_{\text{хар}} = 0,53$	I	10	47
	I	20	25
	II	20	73
	III	20	48,5
2. Поли L-лактид (коммерческий) MB (средн.) = 2000 кислотное число = 850	I	10	62
	II	20	40

	I	2	3	4
3. Поли L-лактид (коммерческий) МВ (средн.) = 50000 кислотное число = 21000	I		10	54
4. 48/48/4 Поли D,L-лактид/гли- коolid/I,6-гександиол (способ III) кислотное число = 10138 $\eta_{хар} = 0,39$	I		20	43
5. 49/49/2 Поли L-лактид/гли- колид/яблочная кислота (тип IV) кислотное число = 1400 $\eta_{хар} = 0,20$	I		10	100
	I		20	99
	I		30	95,5
	I		40	96,0
	I		50	99,8
	II		20	99,8
	III		20	77,5
6. 83,3/14,7/2 Поли L-лактид/ гликолид/лимонная кислота (тип IA) кислотное число = 563 $\eta_{хар} = 0,24$	I		20	96
7. 49/49/2 Поли D,L-лактид/гли- колид/яблочная кислота (тип II) кислотное число = 1200 = 0,21	I		20	96
	III		20	73,9
8. 48/48/4 Поли D,L-лактид/гли- колид/лимонная кислота (тип III) кислотное число = 589 $\eta_{хар} = 0,22$	I		10	90

RU 2146128 C1

RU 2146128 C1

1) Во всех случаях конъюгаты получают способом, описанным в тексте, используя в качестве растворителя ацетон и в качестве основания гидроксид натрия. Все пептиды представляли собой солевые формы - соли уксусной кислоты.

2) Пептиды: I BIM-21003  $D$ -Trp<sup>6</sup>-LHRH (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-  
 $D$ -Trp-Leu-Arg-Pro-Gly NH<sub>2</sub>) pKa = 10,1

II BIM-23014 (H<sub>2</sub>N-β-D-Nal-Cys-Tyr-Trp-Lys-  
 Val-Cys-Thr NH<sub>2</sub>) pKa = 9,8

III BIM-26226 (H<sub>2</sub>N-D-Fs-Phe-Gln-Trp-Ala-His-  
 Leu -OCH<sub>3</sub>) pKa = 8,0

3) % удержания: Измеряется посредством промывания высушенного ионного конъюгата сложного полиэфира с пептидом водой и определением количества растворимого пептида в жидкости, которой промывали конъюгат, методом ВЖХ.

$$\% \text{ удержания} = 100\% \cdot \frac{\text{вес загруз. пептида} - \text{вес раств. пептида}}{\text{вес загруженного пептида}}$$

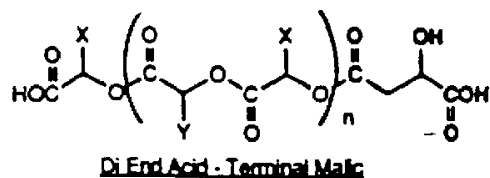
Таблица VI

Данные опыта

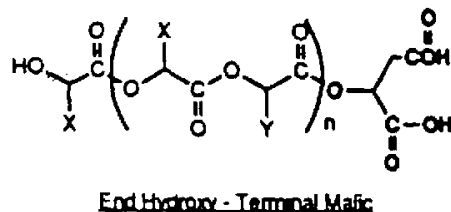
День опыта	Количество высвобожденного пептида в % от общего количества пептида		
	Пример 8	Пример 9	Пример 10
I	5,5%	12,5%	11%
7	26,9%	21,3%	53%
14	55,2%	47,3%	55%
17	84,4%	72,2%	60%
21	98,6%	82,5%	66%
24	100%	98,2%	75%
28	-	99,6%	-

1. Линейные цепочки

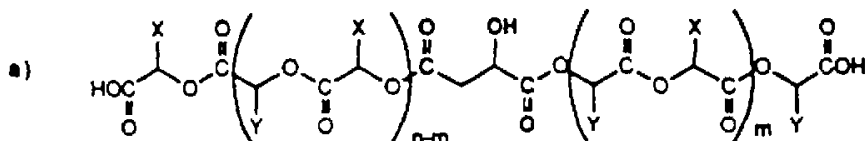
A) цепочка с двумя концевыми кислотными группами - концевая группа яблочной кислоты



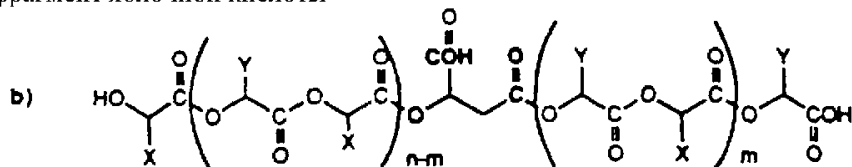
B) цепочка с концевой гидроксильной группой и концевым фрагментом яблочной кислоты



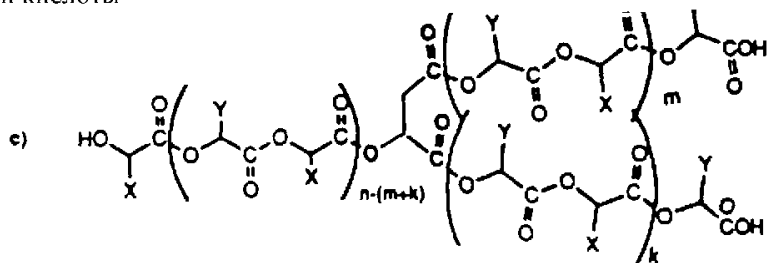
2. Разветвление цепочки



цепочка с двумя концевыми кислотными группами - внутренний фрагмент яблочной кислоты



цепочка с концевой гидроксильной группой и внутренним фрагментом яблочной кислоты



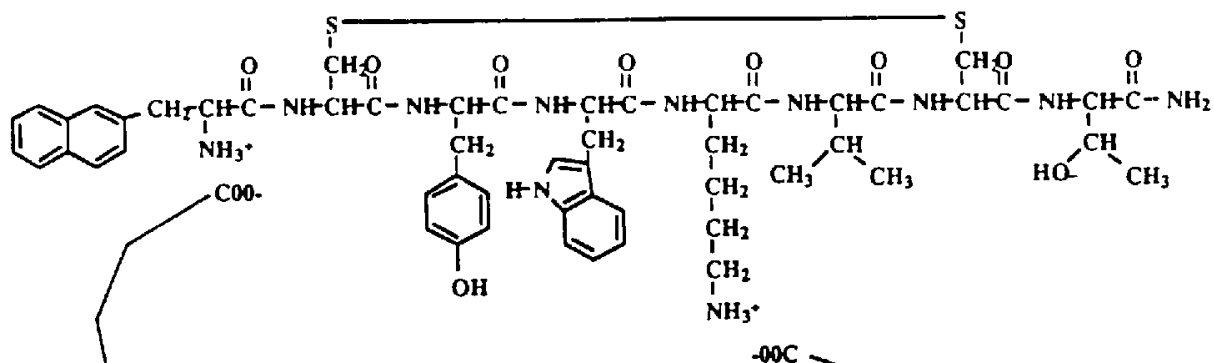
полностью разветвленная с внутренним фрагментом яблочной кислоты

Y = CH<sub>3</sub> для молочной ; H - для гликолевой ; X = H для гликолевой ,

CH<sub>3</sub> для молочной . Распределение суммы X + Y зависит от формулы и полимеризации

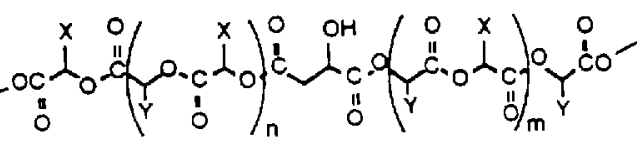
Фиг. 1

пример ионного конъюгата



цепочка с двумя концевыми кислотными группами  
и внутренним фрагментом яблочной кислоты

С ВКМ-23014

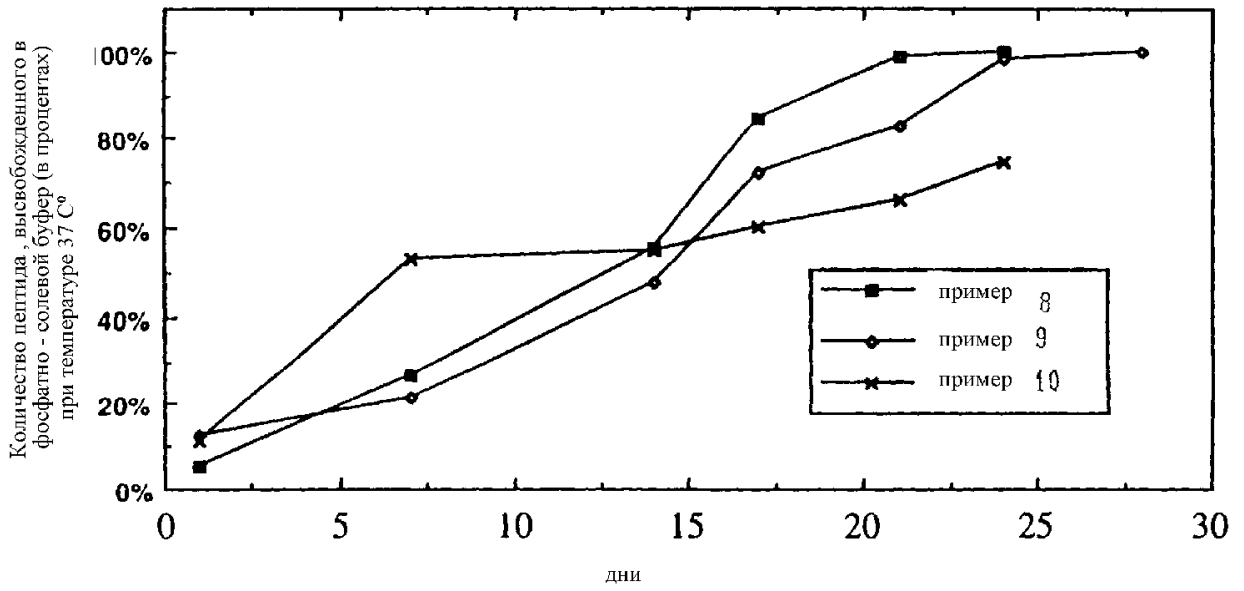


Фиг.2

RU 2146128 C1

RU 2146128 C1

Высвобождение пептида IN VITRO



RU 2146128 C1

RU 2146128 C1