

# PATENTOVÝ SPIS

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

- (21) Číslo přihlášky: 1999-2066  
(22) Přihlášeno: 11.12.1997  
(30) Právo přednosti: 11.12.1996 US 08/762747  
(40) Zveřejněno: 17.11.1999  
(Věstník č. 11/1999)  
(47) Uděleno: 02.10.2009  
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: 11.11.2009  
(Věstník č. 45/2009)  
(86) PCT číslo: PCT/US1997/022881  
(87) PCT číslo zveřejnění: WO 1998/025642

(11) Číslo dokumentu:

## 301 119

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)  
A61K 47/48 (2006.01)  
A61K 38/09 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A61P 15/08 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 94/15587; CZ 288879; EP 467389; EP 328090; CZ PV 1997-3916.

(73) Majitel patentu:

PRAECIS PHARMACEUTICALS INCORPORATED,  
Cambridge, MA, US

(72) Původce:

Gefter Malcolm L., Lincoln, MA, US  
Barker Nicholas, Southborough, MA, US  
Musso Gary, Hopkinton, MA, US  
Molineaux Christopher J., Brookline, MA, US

(74) Zástupce:

Ing. Ivana Jirotková, Nad Štolou 12, Praha 7, 17000

(54) Název vynálezu:

**Farmaceutické přípravky s vodонераzpustným  
komplexem pro trvalé uvolňování léčiv**

(57) Anotace:

Farmaceutická kompozice obsahující ve vodě nerozpustný pevný iontový komplex farmaceuticky aktivního peptidu (například peptidu, polypeptidu, proteinu, peptidomimetika a podobně) a makromolekulárního nosiče, kde před komplexací s farmaceuticky aktivním peptidem je molekula nosiče ve vodě rozpustná a obsah peptidu v uvedeném komplexu je alespoň 57 hmotnostních procent. Formulace umožňují použití vysokých koncentrací peptidové sloučeniny v malém objemu a zavedení farmaceuticky aktivní peptidové sloučeniny po prodloužené době, například jeden měsíc po aplikaci komplexu. Ve formě prášku tvoří komplexy stabilní vodné suspenze a disperze, vhodné pro aplikaci injekcí. V preferovaném provedení je peptidickou sloučeninou v komplexu analog LHRH, přednostně antagonistu LHRH, a makromolekulárním nosičem je aniontový polymer, přednostně karboxymethylcelulóza. Kompozice je použitelná pro výrobu léčiva pro léčbu hormonálně závislého zhoubného bujení, benigní hypertrofie prostaty, předčasné puberty, endometriózy a děložních fibroidů, neplodnosti a fertility.

CZ 301119 B6

## Farmaceutické přípravky s vodонераzpustným komplexem pro trvalé uvolňování léčiv

### Oblast techniky

5

Vynález se týká komplexu tvořeného kombinací peptidové sloučeniny a makromolekuly nosiče, který umožňuje nepřerušované zavádění aktivní látky *in vivo*, a metod, které se používají při léčbě zhoubného bujení prostaty.

10

### Dosavadní stav techniky

Řada onemocnění a klinických stavů se léčí aplikací farmaceuticky aktivního peptidu. Jedním takovým příkladem je zhoubné bujení prostaty, což je zhoubné bujení závislé na pohlavních hormonech a může se léčit aplikací analogu hormonu uvolňujícího luteinizační hormon (LHRH), který způsobuje poruchu produkce luteinizačního hormonu (LH), jenž reguluje syntézu mužských hormonů. Ke snižování produkce LH se používají zvláště peptidické analogy LHRH, které působí jako superagonisté receptoru hormonu uvolňujícího luteinizační hormon, jako je leuprolid a goserelin.

20

V mnoha případech terapeutická účinnost farmaceuticky aktivního peptidu závisí na jeho stále přítomnosti *in vivo* během dlouhého časového úseku. Aby se dosáhlo kontinuálního zavádění peptidu *in vivo* a předešlo se opakovaným aplikacím, je žádoucí formulace s nepřerušovaným uvolňováním nebo nepřerušovaným zaváděním. Jeden způsob nepřerušovaného zavádění je mikrokapsulizace, kdy aktivní látka je uzavřena v polymerní membráně za vzniku mikročástic. Například superagonisté LHRH, jako jsou leuprolid nebo goserelin, jsou v typickém případě uzavřeny v mikročásticích, které obsahují polylaktidový/polyglykolidový kopolymer za vzniku formulací vhodných pro depotní injekci, která poskytuje trvalé dodávání superagonisty po dobu několika týdnů až měsíců (viz například patent US 4 675 189, US 4 677 191, US 5 480 656 a US 4 728 721).

25

Existuje potřeba dalších formulací pro trvalou dlouhodobou aplikaci farmaceuticky aktivních peptidů *in vivo*.

35

### Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je farmaceutická kompozice obsahující ve vodě nerozpustný pevný iontový komplex farmaceuticky aktivního peptidu (například peptidu, polypeptidu, proteinu, peptidomimetika a podobně) a makromolekulárního nosiče, jejíž podstata spočívá v tom, že před komplexací s farmaceuticky aktivním peptidem je molekula nosiče ve vodě rozpustná a obsah peptidu v uvedeném komplexu je alespoň 57 % hmotnostních. Složení kompozice umožňuje při aplikaci komplexu trvalé dodávání farmaceuticky účinné peptidické sloučeniny *in vivo*. Komplex podle vynálezu tak může umožňovat dlouhodobé kontinuální dodávání farmaceuticky aktivní peptidové sloučeniny subjektu, například po dobu jednoho měsíce. Spojení peptidické sloučeniny a nosné makromolekuly do pevného stabilního komplexu navíc umožňuje vnášet do formulace vysoké koncentrace peptidické sloučeniny.

40

45

Komplex podle vynálezu vzniká spojením peptidické sloučeniny a makromolekuly nosiče za podmínek takových, že se tvoří v podstatě ve vodě nerozpustný komplex, například se míchá vodný roztok peptidické sloučeniny s vodným roztokem makromolekulárního nosiče do vysrážení komplexu. Komplex může být ve formě pevné látky (například ve formě pasty, granulí, prášku nebo lyofilizátu) nebo může být prášková forma komplexu dostatečně rozmělněna, až vznikají stabilní kapalné suspenze nebo polo-pevné disperze.

50

55

V preferovaném provedení vynálezu peptidová sloučenina ve vodě nerozpustného komplexu je analog LHRH, přednostně antagonist LHRH, a makromolekulárním nosičem je aniontový polymer, přednostně. Komplex podle vynálezu je možné před aplikací *in vivo* sterilizovat způsobem, jako je gama záření nebo ozáření elektronovými paprsky.

Předmětem vynálezu je dále použití uvedené farmaceutické kompozice při výrobě léčiva pro léčbu hormonálně závislého zhoubného bujení, benigní hypertrofie prostaty, předčasné puberty, endometriózy a děložních fibroidů, neplodnosti a fertility. V preferovaném provedení vynálezu se kompozice použije pro výrobu léčiva pro léčbu zhoubného bujení prostaty.

Vynález zahrnuje i další použití takových kompozic. Farmaceutické kompozice podle vynálezu jsou výhodné, protože jsou schopny dlouhodobě zavádět farmaceuticky aktivní peptidovou sloučeninu buď systémově, nebo lokálně (například několik týdnů, jeden měsíc nebo několik měsíců) a dále jsou schopny vnést do komplexu vysoké koncentrace peptidové sloučeniny.

Aby se lépe porozumělo vynálezu, je nutné definovat pojmy:

Termín „peptidová sloučenina“ označuje sloučeniny, které tvoří nebo alespoň jejich část tvoří aminokyselinové zbytky spojené amidovými vazbami (to znamená peptidové vazby). Termín „peptidová sloučenina“ označuje peptidy, polypeptid a proteiny. V typickém případě peptid obsahuje méně než přibližně 100 aminokyselin, s výhodou méně než přibližně 50 aminokyselin a preferuje se méně než 25 aminokyselinových zbytků. Termín „peptidová sloučenina“ dále zahrnuje analogy peptidů, jejich deriváty a peptidomimetické látky, které napodobují chemickou strukturu peptidu, který tvoří přirozeně se vyskytující aminokyseliny. Příklady peptidových analogů zahrnují peptidy, které obsahují jednu nebo více nepřirozených aminokyselin. Příklady peptidových derivátů zahrnují peptidy, kde je derivatizován postranní aminokyselinový řetězec, peptidová kostra nebo amino- nebo karboxy-terminální konec (například peptidové sloučeniny s methylovanými amidovými vazbami). Příklady peptidomimetických látek zahrnují peptidové sloučeniny, ve kterých peptidová kostra je substituována jednou nebo více molekulami benzo-diazepinu (popisuje se například v publikaci James, G.L. et al (1993) Science 260: 1937-1942), „inverzní“ peptidy, kde všechny L-aminokyseliny jsou substituovány odpovídajícími D-aminokyselinami, „retroinverzní“ peptidy (popisuje se v publikaci patent US 4 522 752, Sisto), kde sekvence aminokyselin je obrácená („retro“) a všechny L-aminokyseliny jsou nahrazeny D-aminokyselinami („inverzní“), jiné izostery, jako například látky s mimetickou peptidovou kóstrou (to je amidovou vazbou), zahrnující modifikace amidového dusíku, alfa-uhlíku, amidové karbonylové skupiny, kompletní nahrazení amidové vazby, prodloužení, delecí nebo zesílení kostry. Je známo několik modifikací peptidové kostry, mezi něž patří  $\psi[\text{CH}_2\text{S}]$ ,  $\psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ ,  $\psi[\text{CSNH}_2]$ ,  $\psi[\text{NHCO}]$ ,  $\psi[\text{COCH}_2]$  a  $\psi[(\text{E}) \text{ nebo } (\text{Z}) \text{CH}=\text{CH}]$ . Ve zde použitém názvosloví  $\psi$  označuje nepřítomnost amidové vazby. Struktura, která nahrazuje amidovou skupinu, se specifikuje v závorce. Další možné modifikace zahrnují N-alkyl- (nebo aryl-) substituce ( $\psi[\text{CONR}]$ ), zesílení kostry za vzniku laktamů nebo jiných cyklických struktur a další deriváty, zahrnující C-terminální hydroxymethyl-deriváty, O-modifikované deriváty a N-terminálně modifikované deriváty zahrnující substituované amidy, jako jsou alkylamidy a hydrazidy.

Termín „farmaceuticky aktivní peptidová sloučenina“ označuje peptidovou sloučeninu, která vykazuje farmaceutickou aktivitu, buď ve své současné formě, nebo po zpracování *in vivo* (tj. farmaceuticky aktivní peptidové sloučeniny zahrnují peptidové sloučeniny s konstitutivní farmakologickou aktivitou a peptidové sloučeniny ve formě prekurzoru, která, aby vykazovala farmakologickou aktivitu, musí být metabolizována nebo nějakým způsobem *in vivo* zpracována).

Termíny „multivalentní kationtová peptidová sloučenina“ a „multivalentní aniontová peptidová sloučenina“ zde označují peptidové sloučeniny obsahující mnohonásobný pozitivní resp. negativní náboj. Termín „bivalentní kationtová“ nebo „bivalentní aniontová“ peptidová sloučenina zde označuje peptidovou sloučeninu obsahující dva pozitivní resp. negativní náboje. Termín

„trivalentní kationtová“ nebo „trivalentní aniontová“ peptidová sloučenina zde označuje peptidovou sloučeninu obsahující tři pozitivní resp. negativní náboje.

5 Termín „analog LHRH“ zde zahrnuje peptidové sloučeniny, které napodobují strukturu hormonu uvolňujícího luteinizační hormon. Analogem LHRH může být agonista LHRH nebo antagonist LHRH.

10 Termín „agonista LHRH“ zde označuje sloučeninu, která stimuluje receptor hormonu uvolňujícího luteinizační hormon (LHRH-R) tak, že stimuluje uvolnění luteinizačního hormonu. Termín „antagonista LHRH“ označuje sloučeninu, která inhibuje LHRH-R tak, že inhibuje uvolnění luteinizačního hormonu. Příklady agonistů LHRH zahrnují leuprolid (obchodní název Lupron®; Abbott/TAP), goserelin (obchodní název Zoladex®; Zeneca), buserelin (Hoechst), triptorelin (také znám jako Decapeptyl, D-Trp-6-LHRH a Debiopharm®; Ipsen/Beaufour), nafarelin (obchodní jméno Synarel®; Syntex), lutrelin (Wyeth), cysterolin (Hoechst), gonadorelin (Ayerst) a histrelin (Ortho).

15 Termín „antagonista LHRH“ zde znamená sloučeninu, která inhibuje receptor hormonu uvolňujícího luteinizační hormon tak, že se inhibuje uvolnění luteinizačního hormonu. Příklady antagonistů LHRH zahrnují Antid, Cetrotorelix, sloučeniny popsané v publikacích: patent US 5 470 947 (Folkers et al.), PCT přihláška WO 89/01944 (Folkers et al.), patent US 5 413 990 (Haviv), patent US 5 300 492 (Haviv), patent US 5 371 070 (Koerber et al.), patent US 5 296 468 (Hoeger et al.), Patent US 5 171 835 (Janaky et al.), Patent US 5 003 011 (Coy et al.), Patent US 4 431 635 (Coy), Patent US 4 992 421 (De et al.), patent US 4 851 385 (Roeske), patent US 4 801 577 (Nestor, Jr. Et al.) a patent US 4 689 396 (Roeske et al.) a sloučeniny popsané v přihlášce patentu US 08/480,494 s názvem „LHRH Antagonist Peptides“ a v její odpovídající přihlášce PCT (přihláška PCT PCT/US96/09852) se stejným názvem „LHRH Antagonist Peptides“. Zvláště preferovaný antagonist LHRH zahrnuje strukturu: Ac-D-Nal<sup>1</sup>, 4-Cl-D-Phe<sup>2</sup>, D-Pal<sup>3</sup>, N-Me-Tyr<sup>5</sup>, D-Asn<sup>6</sup>, Lys(iPr)<sup>8</sup>, D-Ala<sup>10</sup>-LHRH, zde se označuje jako PPI-149.

20 Termín „makromolekula nosiče“ znamená makromolekulu, která v komplexu s peptidovou sloučeninou udělá ve vodě nerozpustný komplex. Před vytvořením komplexu s peptidovou sloučeninou je makromolekula nosiče v typickém případě ve vodě rozpustná. Upřednostňuje se, aby makromolekula měla molekulovou hmotnost alespoň 5 000, upřednostňuje se molekulová hmotnost 10 000. Termín „aniontová makromolekula nosiče“ zahrnuje negativně nabitě molekuly s vysokou molekulovou hmotností, jako jsou aniontové polymery. Termín „kationtová makromolekula nosiče“ zahrnuje pozitivně nabitě molekuly s vysokou molekulovou hmotností, jako jsou kationtové polymery.

30 Termín „ve vodě nerozpustný komplex“ znamená fyzikálně a chemicky stabilní komplex, který se tvoří vhodným kombinováním peptidové sloučeniny a makromolekuly nosiče zde popsaným způsobem. Tento komplex se v typickém případě vyskytuje ve formě sraženiny, která vzniká kombinováním vodních přípravků peptidové sloučeniny a makromolekuly nosiče. Mechanismus tvoření preferovaných ve vodě nerozpustných komplexů podle vynálezu podle předpokladu zahrnuje (to znamená je zprostředkován alespoň zčásti) iontové interakce v situacích, kde se vyskytuje kationtová peptidová sloučenina a aniontová molekula nosiče nebo naopak. Navíc nebo v jiném případě tvorba ve vodě nerozpustného komplexu podle vynálezu může zahrnovat (to znamená může být jimi alespoň zčásti zprostředkována) hydrofobní interakce. Dále může tvoření ve vodě nerozpustného komplexu podle vynálezu zahrnovat (to znamená může být jimi alespoň zčásti zprostředkováno) kovalentní interakce. Popis komplexu jako „ve vodě nerozpustného“ má ukazovat, že komplex se v podstatě nebo snadno nerozpouští ve vodě, jak vyplývá z jeho srážení z vodného roztoku. Je však třeba jej chápat tak, že „ve vodě nerozpustný“ komplex podle vynálezu může vykazovat omezenou rozpustnost (to znamená částečnou rozpustnost) ve vodě buď *in vitro*, nebo ve vodném fyziologickém prostředí *in vivo*.

Termín „trvalé dodávání“ znamená kontinuální zavádění farmaceutického činidla *in vivo* během doby následující po aplikaci, přednostně alespoň několik dní, týden nebo několik týdnů. Trvalé dodávání činidla se může demonstrovat například kontinuálním terapeutickým účinkem činidla v čase (například pro analog LHRH je možno jeho dodávání demonstrovat kontinuálním potlačení syntézy testosteronu v určitém časovém úseku). V jiném případě nepřerušované zavádění činidla se může demonstrovat detekcí přítomnosti činidla *in vivo* v určitém časovém úseku.

Termín „subjekt“ zde savce, s výhodou zahrnuje primáty, teplokrevné a nejvíce se živočichy, preferují přednostně lidé.

Termín „aplikace subjektu“ zde znamená vydání, dodání nebo aplikaci přípravku (například farmaceutické formulace) subjektu libovolným způsobem, který je vhodný pro zavedení kompozice do požadované oblasti subjektu, což zahrnuje zavedení buď parenterální, nebo orální cestou, intramuskulární injekcí, podkožní/intradermální injekcí, intravenózní injekcí, aplikací do tváře, transdermálním zavedením a aplikací do rekta, střev, vagíny, nosem nebo respiračním traktem.

Termín „stav léčitelný analogem LHRH“ zde zahrnuje onemocnění, poruchy a jiné stavy, při kterých aplikace agonisty LHRH nebo antagonisty LHRH má požadovaný účinek, například terapeuticky příznivý účinek. Příklady stavů, které jsou léčitelné analogem LHRH, zahrnují zhoubné bujení závislé na hormonech (zahrnuje zhoubné bujení prostaty, prsu, vaječnicků, dělohy a testikulární zhoubné bujení), benigní hypertrofii prostaty, předčasnou pubertu, endometriózu, fibroidy dělohy, neplodnost (myslí se oplodnění *in vitro*) a plodnost (to znamená použití jako antikoncepce).

Jedno provedení vynálezu popisuje farmaceutickou kompozici obsahující ve vodě nerozpustný komplex farmaceuticky aktivní peptidové sloučeniny a makromolekuly nosiče. V preferovaném provedení vynálezu tvorba ve vodě nerozpustného komplexu je zprostředkována alespoň z části iontovými interakcemi mezi farmaceuticky aktivní peptidovou sloučeninou a makromolekulou nosiče. V těchto provedeních vynálezu je farmaceuticky aktivní peptidová látka kation a makromolekula nosiče je anion nebo farmaceuticky aktivní peptidová sloučenina je anion 3 makromolekula nosiče je kation. V jiném provedení podle vynálezu tvorba ve vodě nerozpustného komplexu je zprostředkována alespoň z části hydrofobními interakcemi mezi farmaceuticky aktivní peptidovou sloučeninou a makromolekulou nosiče. V preferovaném provedení podle vynálezu v komplexu používaná peptidová sloučenina je multivalentní kationtová peptidová sloučenina, jako je bivalentní nebo trivalentní kationtová peptidová sloučenina a makromolekula nosiče je aniontová makromolekula.

Po aplikaci kompozice subjektu farmaceutické kompozice podle vynálezu umožňují nepřerušované zavádění peptidové sloučeniny subjektu *in vivo*, kde trvání nepřerušovaného zavádění může kolísat v závislosti na koncentraci peptidové sloučeniny a makromolekuly nosiče, která se používá pro přípravu komplexu. V jednom provedení vynálezu například jediná dávka ve vodě nerozpustného komplexu poskytuje nepřerušované zavedení peptidové sloučeniny subjektu alespoň po dobu jednoho týdne po té, co se subjektu aplikuje farmaceutická kompozice. V jiném provedení vynálezu jedna dávka ve vodě nerozpustného komplexu poskytuje nepřerušované zavádění peptidové sloučeniny subjektu po dobu alespoň dvou týdnů poté, co se subjektu aplikuje farmaceutická kompozice. V dalším provedení vynálezu jedna dávka ve vodě nerozpustného komplexu poskytuje nepřerušované zavádění peptidové sloučeniny subjektu po dobu alespoň tří týdnů poté, co se subjektu aplikuje farmaceutická kompozice. V dalším provedení vynálezu jedna dávka ve vodě nerozpustného komplexu poskytuje nepřerušované zavádění peptidové sloučeniny subjektu po dobu alespoň čtyř týdnů poté, co se subjektu aplikuje farmaceutická kompozice. Vynález také popisuje formulace, které poskytují nepřerušované zavádění delšího nebo kratšího trvání, jako jsou formulace, které jsou kontinuálně zavádějí po dobu 1 dne, 1 až 7 dní, jednoho měsíce, dvou měsíců, tří měsíců a podobně. Kontinuální zavádění peptidové sloučeniny po dobu několika měsíců se může uskutečnit například opakováním měsíční dávky, kdy každá z nich poskytuje

nepřerušované zavádění peptidové sloučeniny přibližně po dobu jednoho měsíce (popisuje například v příkladu 14).

V komplexu se může použít libovolná velikost peptidové sloučeniny pokud peptidová sloučenina má schopnost tvořit ve vodě nerozpustný nekovalentní komplex s makromolekulou nosiče, když se tyto dvě látky zkombinují. V jistém preferovaném provedení vynálezu je však peptidovou sloučeninou peptid, který obsahuje přibližně 5 až 20 aminokyselin, přibližně 8 až 15 aminokyselin nebo přibližně 8 až 12 aminokyselin. Řada farmaceuticky aktivních peptidů se může použít ve formulacích, jejichž příklady například jsou, ale neomezují se na analogy LHRH (popisuje se dále v textu), analogy bradykininu, parathyroidní hormon, adenokortikotropní hormon (ACTH), kalcitonin a analogy vazopresinu (například 1-deamino-8-D-argininvazopresin (DDAVP)).

Ačkoli při tvorbě ve vodě nerozpustných komplexů podle vynálezu je možné použít řadu makromolekul nosičů, preferovanými makromolekulami jsou polymery. Upřednostňují se ve vodě rozpustné polymery. V preferovaném provedení vynálezu makromolekulou nosiče je aniontový polymer, jako je aniontový derivát polyalkoholu nebo jeho fragment nebo sůl (například sole sodíku). Aniontové části, kterými se mohou derivatizovat polyalkoholy, zahrnují například karboxylát, fosforečnan nebo síran. Zvláště preferovaným aniontovým polymerem je aniontový derivát polysacharidu nebo jeho fragment nebo jeho sůl (například sole sodíku). Makromolekulární nosič může obsahovat jediný druh molekuly (například jediný druh polymeru) nebo dva či více různých druhů molekuly (například směs dvou typů polymerů). Příklady specifických aniontových polymerů zahrnují karboxymethylcelulózu, algin, alginát, aniontové acetátové polymery, aniontové akrylové polymery, xanthamovou gumu, glykolát sodný a jejich deriváty, fragmenty a farmaceuticky přijatelné sole, stejně jako aniontové deriváty karagenanu, aniontové deriváty kyseliny polygalakturonové a sulfátované a sulfonátované deriváty polystyrenu. Preferovaným aniontovým polymerem je sodná sůl karboxymethylcelulózy. Příklady kationtových polymerů zahrnují poly-L-lyzín a jiné polymery bazických aminokyselin.

Ve zvláště preferovaném provedení vynálezu je peptidovou sloučeninou ve vodě rozpustného komplexu analog LHRH, například agonista LHRH nebo přednostně antagonistu LHRH. Takové analogy LHRH v typickém případě obsahují 10 aminokyselin. Preferovaní antagonisté LHRH zahrnují antagonisty LHRH, kteří obsahují peptidovou sloučeninu, kde zbytek peptidové sloučeniny odpovídající aminokyselině v poloze 6 přirozeného savčího LHRH obsahuje strukturu D-asparaginu (D-Asn). Termín „struktura D-asparaginu“ zahrnuje D-Asn a jeho analogy, deriváty a mimetické látky, které vykazují funkční aktivitu D-Asn. Další preferovaní antagonisté LHRH zahrnují antagonisty LHRH, které obsahují peptidovou sloučeninu obsahující strukturu A-B-C-D-E-F-G-H-I-J, kde

- A je pyro-Glu, Ac-D-Nal, Ac-D-Qal, Ac-Sar nebo Ac-D-Pal,
- B je His nebo 4-Cl-D-Phe,
- C je Trp, D-Pal, D-Nal, L-Nal, D-Pal(N-O) nebo D-Trp,
- D je Ser,
- E je N-Me-Ala, Tyr, N-Me-Tyr, Ser, Lys(iPr), 4-Cl-Phe, His, Asn, Met, Ala, Arg nebo Ile,
- F je D-Asn, D-Gln nebo D-Thr,
- G je Leu nebo Trp,
- H je Lys (iPr), Gln, Met nebo Arg,
- I je Pro a
- J je Gly-NH<sub>2</sub> nebo D-Ala-NH<sub>2</sub>,

nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl.

Termín „malá polární část“ znamená část, která vykazuje malý sterický objem a je relativně polární. Polarita se měří jako hydrofilita P měřítkem. Jako reference pro měření hydrofility sloučeniny se používá rozdělovací koeficient P mezi 1-oktanolem a vodou. Hydrofilita se může vyjádřit jako logP (logaritmus rozdělovacího koeficientu (popisuje se v publikaci Hansch et al., Nature 194: 178 (1962); Fujita et al., J. Am. Chem. Soc. 86: 5 175 (1964))). Sestavily se tabulky hydrofility řady molekul a substitučních konstant lipofility (hydrofobity) (označené jako  $\pi$ ) řady funkčních skupin (Hansch and Leo, „Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology“ Wiley, New York, New York, (1979)). Za použití uvedených tabulek je možné předpovědět hydrofilitu případných hydrofilních částí. Měřená hodnota logP (oktanol/voda) naftalenu je například 3,45. Substituční konstanta p pro hydroxylovou skupinu je -0,67. Proto předpovězená logP v případě  $\beta$ -naftolu je  $3,54 + (-0,67) = 2,78$ . Tato hodnota souhlasí s naměřenou hodnotou logP v případě  $\beta$ -naftolu, která je 2,84. Termín „malá polární část“ znamená části, jejichž hodnoty logP se pohybují -1 a 2 a sterický objem je menší než sterický objem Trp.

V jistých provedeních vynálezu obsahuje L malou polární skupinu (část) s podmínkou, že symbolem F není D-Cit, D-Hci nebo nižší alkyl-derivát D-Cit nebo D-Hci. Upřednostňuje se, aby symbol F se vybral ze skupiny zahrnující D-Asn, D-Gln a Thr. Více se upřednostňuje, aby symbol F byl D-Asn. Symbol E je s výhodou tyrozin (Tyr) nebo N-methyl-tyrozin (N-Me-Tyr). Ve zvláště preferovaném provedení vynálezu antagonisty LHRH vykazuje následující strukturu: Ac-D-Nal<sup>1</sup>, 4-Cl-D-Phe<sup>2</sup>, D-Pal<sup>3</sup>, N-Me-Tyr<sup>5</sup>, D-Asn<sup>6</sup>, Lys(iPr)<sup>8</sup>, D-Ala<sup>10</sup>-LHRH (zde se označuje jako PPI-149). Zvláště preferovaný komplex podle vynálezu obsahuje PPI-149 a karboxymethylcelulózu.

Mimo ve vodě rozpustného komplexu farmaceutické formulace podle vynálezu mohou obsahovat další farmaceuticky přijatelné nosiče a/nebo excipienty. Termín „farmaceuticky přijatelný nosič“ zahrnuje libovolné činidlo vybrané ze skupiny zahrnující rozpouštědla, disperzní médium, potahovací činidla, antibakteriální nebo antifungicidní činidla a činidla oddalující absorpci a podobně, kde všechna uvedená činidla jsou fyziologicky kompatibilní. Upřednostňuje se, aby nosič byl vhodný pro intravenózní, intramuskulární, podkožní nebo parenterální aplikaci zahrnující farmaceuticky (například injekcí). Excipienty zahrnují farmaceuticky přijatelné stabilizátory a dezinfekční činidla.

Kromě farmaceutických formulací analogů LHRH v komplexu s makromolekulárním nosičem zahrnuje vynález dále balené formulace s obsahem těchto komplexů a injekční stříkačky obsahující takové komplexy. Vynález například zahrnuje balení pro léčbu stavu subjektu, který je možno léčit analogem LHRH, obsahující ve vodě nerozpustný komplex analogu LHRH (přednostně PPI-449) a makromolekulární nosič (přednostně karboxymethylcelulózu), balené spolu s návodem k použití ve vodě nerozpustného komplexu pro léčbu subjektu, trpícího stavem léčitelným pomocí analogu LHRH. V jiném provedení zahrnuje vynález injekční stříkačku, mající dutinu, v níž je obsažen ve vodě nerozpustný komplex analogu LHRH (přednostně PPI-149) a makromolekulárního nosiče (přednostně karboxymethylcelulózy).

Komplex podle vynálezu se připravuje kombinováním peptidové sloučeniny a makromolekulárního nosiče za podmínek, kdy se tvoří ve vodě nerozpustný komplex peptidové sloučeniny a makromolekulárního nosiče. Vynález se dále týká způsobů přípravy farmaceutických formulací. V jednom provedení vynálezu uvedený způsob zahrnuje:

- přípravu peptidové sloučeniny a makromolekulárního nosiče,
- kombinování peptidové sloučeniny a makromolekulárního nosiče za takových podmínek, že se tvoří ve vodě nerozpustný komplex peptidové sloučeniny a makromolekulárního nosiče a
- přípravu farmaceutické formulace obsahující ve vodě nerozpustný komplex.

Roztok peptidové sloučeniny a roztok makromolekulárního nosiče se například mísí, dokud se z roztoku nevysráží ve vodě nerozpustný komplex peptidové sloučeniny a makromolekulárního

5 nosiče. V jistých provedeních jsou roztoky peptidové sloučeniny a makromolekulárního nosiče  
 vodné roztoky. V jiném případě, jestliže peptidová sloučenina nebo makromolekulární nosič  
 (nebo obě látky) nejsou před vzájemným kombinováním v podstatě ve vodě rozpustné, pak je  
 možno peptidovou sloučeninu a/nebo makromolekulární nosič před kombinováním obou složek  
 10 komplexu rozpustit v rozpouštědle mísitelném s vodou, jako je alkohol (například etanol).  
 V jiném provedení způsobu přípravy ve vodě nerozpustného komplexu se kombinuje roztok  
 peptidové sloučeniny a roztok makromolekulárního nosiče, zahřívají se, dokud se z roztoku  
 nevysráží ve vodě nerozpustný komplex peptidové sloučeniny a makromolekulárního nosiče.  
 Množství peptidové sloučeniny a makromolekulárního nosiče nezbytné pro dosažení ve vodě  
 15 nerozpustného komplexu může kolísat v závislosti na určité použité peptidové sloučenině  
 a makromolekulárním nosiči, na použitém rozpouštědle(ch) a/nebo použitém způsobu dosažení  
 komplexu. V typickém případě je však peptidová sloučenina vůči makromolekulárnímu nosiči  
 v nadbytku (na molárním základě). Peptidová sloučenina je často v nadbytku i na základě poměru  
 20 hmotnost/hmotnost, jak se popisuje v příkladech dále v textu. V jistých provedeních vynálezu se  
 kombinuje makromolekulární nosič, s výhodou sodná sůl karboxymethylcelulózy, a peptidová  
 sloučenina, přednostně PPI-149, v poměru 0,2:1 (hmotnost/hmotnost) makromolekulárního  
 nosiče : peptidové sloučenině. V různých jiných provedeních vynálezu může být poměr makro-  
 molekulárního nosiče k peptidové sloučenině (hmotnost/hmotnost) například 0,5:1, 0,4:1, 0,3:1,  
 0,25:1, 0,15:1 nebo 0,1:1. Neomezující příklady podmínek a postupů přípravy ve vodě neroz-  
 25 pustného komplexu podle vynálezu jsou uvedeny dále jako příklady 1 až 5 a 8 až 9.

Jakmile se vysráží z roztoku komplex peptidová sloučenina/makromolekulární nosič, je možno  
 sraženinu od roztoku oddělit známým způsobem, jako je filtrace (například přes nylonovou mem-  
 30 bránu s póry o velikosti 0,45  $\mu\text{m}$ ), centrifugace a podobně. Získaná pasta se pak může sušit  
 (například ve vakuu nebo v sušárně při teplotě 70  $^{\circ}\text{C}$ ) a pevné části se mohou drtit nebo pulveriz-  
 ovat na prášek známým způsobem (například kládíkové nebo klínové mlýny nebo drcením  
 v misce s tloučkem). Po mletí a pulverizaci se prášek může prosít skrz síto (upřednostňuje se síto  
 s oky o velikosti 90 mikronů), aby se získalo jednotné rozdělení partikulí. Získaná pasta se může  
 35 zmrazit a lyofilizací usušit. Komplex v práškové formě se může dispergovat v roztoku nosiče za  
 vzniku kapalně suspenze nebo semi-pevné disperze vhodné pro aplikaci injekcí. V různých pro-  
 vedeních vynálezu farmaceutická kompozice podle vynálezu je suchá pevná, kapalná nebo semi-  
 pevná disperze. Příklady kapalných nosičů vhodných pro použití v kapalně suspenzi zahrnují  
 fyziologické roztoky, roztoky glycerinu a roztoky lecitinu.

40 V jiném provedení vynálezu farmaceutická kompozice podle vynálezu je sterilní formulace. Po  
 vytvoření ve vodě nerozpustného komplexu se například komplex sterilizuje, v optimálním přípa-  
 dě gama zářením nebo elektronovými paprsky. Shora popsáný způsob přípravy farmaceutické  
 formulace podle vynálezu může dále zahrnovat sterilizaci ve vodě nerozpustného komplexu  
 gama zářením nebo ozářením elektronovými paprsky. Formulace se s výhodou sterilizuje gama  
 45 zářením za použití dávky nejméně 15 kGy. V jiných provedeních vynálezu se formulace sterili-  
 zuje gama zářením za použití dávky alespoň 19 kGy nebo alespoň 24 kGy. Jak se popisuje  
 v příkladu 11, formulace podle vynálezu zůstává po ozáření gama paprsky přijatelně stabilní.

50 V jiném případě se za účelem přípravy sterilní farmaceutické formulace ve vodě nerozpustný  
 komplex může izolovat za použití běžných metod ve sterilních podmínkách (například se používá  
 sterilní výchozí materiál a způsob produkce probíhá asepticky). V jiném provedení vynálezu se  
 ve vodě nerozpustný komplex tvoří za použití aseptického postupu.

Způsoby tvoření ve vodě nerozpustného komplexu podle vynálezu se popisuje dále  
 55 v příkladech 1 až 5 a 8 až 9. Vynález dále popisuje farmaceutické formulace, které zahrnují  
 prášek, kapalně suspenze, semi-pevné disperze, suché pevné látky (například lyofilizované pevné  
 látky) a jejich sterilizované formy (sterilizují se například gama zářením) a formulace, které se  
 připravují způsobem podle vynálezu.



Vynález dále popisuje způsoby použití farmaceutických formulací podle vynálezu za účelem léčit subjekt, který trpí stavem léčitelným farmaceuticky aktivní peptidovou sloučeninou, přičemž uvedená formulace zahrnuje ve vodě nerozpustný komplex. V preferovaném provedení podle vynálezu se popisuje způsob léčby stavu subjektu, který je možno léčit analogem LHRH, zahrnující aplikaci subjektu farmaceutické formulace obsahující ve vodě nerozpustný komplex analogu LHRH a makromolekulárního nosiče.

Farmaceutická formulace se může aplikovat subjektu libovolnou cestou vhodnou k dosažení terapeutického výsledku(ů), avšak preferuje se aplikace parenterální cestou, zvláště pak intramuskulární injekcí (i.m.) a podkožní/intradermální (s.c./i.d.) injekcí. V jiném případě se formulace může aplikovat subjektu orálně. Jiná vhodná parenterální cesta zahrnuje intravenózní injekci, aplikace tváří, transdermální zavedení a aplikace do rekta, vagíny, intranasální cestou a respiračním traktem. Je nutné poznamenat, že pokud se formulace umožňující nepřerušované dodávání po dobu týdnů nebo měsíců cestou i.m. nebo s.c./i.d. podává alternativní cestou, pak nemusí vykazovat nepřerušované dodávání činidla po ekvivalentní dobu v důsledku vymizení činidla jinými fyziologickými mechanismy (tj. dávková forma) může z místa dodání vymizet, takže prodloužený terapeutický účinek není pozorován po tak dlouhou dobu, po jakou se pozoruje u i.m. nebo s.c./i.d. injekce.

Farmaceutická formulace obsahuje terapeuticky účinné množství analogu LHRH. Termín „terapeuticky účinné množství“ znamená množství účinné v dávkách a po dobu, které jsou nezbytné pro dosažení požadovaného výsledku. Terapeuticky účinné množství analogu LHRH může kolísat v závislosti na faktorech, jako je stadium onemocnění, věk a hmotnost jednotlivce a schopnost analogu LHRH (samotného nebo v kombinaci s jedním nebo více léky) vyvolat požadovanou odezvu u jednotlivce. Dávkový režim se může upravit tak, aby poskytoval optimální léčebnou odezvu. Terapeuticky účinné množství je takové množství, kdy libovolný toxický a škodlivý účinek antagonisty je převážen terapeuticky výhodným účinkem. Rozmezí terapeuticky účinného množství analogu LHRH je 0,01 až 10 mg/kg. Preferovaná dávka analogu LHRH PPI-149 pro nepřerušovanou redukci množství testosteronu v plazmě po dobu 28 dní je přibližně 0,1 až 10 mg/kg, upřednostňuje se rozmezí 0,3 až 1,2 mg/kg (je-li vyjádřen jako volný peptid). Podává se v kapalné suspenzi o objemu přibližně 1 ml nebo méně. Je nutné poznamenat, že hodnoty dávky mohou kolísat podle vážnosti stavu. Musí být dále známo, že specifický režim dávek se musí nastavit podle individuálních potřeb a profesionálního úsudku osoby, která provádí nebo dohlíží na aplikaci kompozic, a že zde uvedené rozmezí dávky jsou pouze příklady, které neomezují rozsah a praktické použití nárokové kompozice.

Léčivo připravené z kompozice podle vynálezu se může aplikovat při léčbě různých stavů, onemocnění a poruch, při kterých aplikace analogu LHRH má požadovaný klinický účinek. Příklady onemocnění a poruch zahrnují zhoubné bujení závislé na produkci hormonů, jako je například zhoubné bujení prostaty, prsu, vaječníků, dělohy a testikulární zhoubné bujení, benigní hypertrofie prostaty, předčasná puberta, endometrióza, fibroidy dělohy. Vynález popisuje způsoby léčby těchto onemocnění a poruch aplikací farmaceutické formulace podle vynálezu. Navíc analog LHRH se může použít za účelem změny plodnosti. Kompozice podle vynálezu se mohou také použít při oplodnění *in vitro* nebo pro účely antikoncepce.

Ve zvláště preferovaném provedení vynálezu se kompozice používá při léčbě zhoubného bujení prostaty. Analogem LHRH užívaným v tomto případě je antagonist LHRH, s výhodou PPI-149, a uvedený způsob léčby umožňuje nepřerušované dodávání analogu LHRH *in vivo* po dobu alespoň čtyř týdnů po aplikaci do svalu nebo pod kůži. Analog LHRH, přednostně PPI-149, formulovaný podle vynálezu, se může použít při inhibici růstu buněk zhoubného bujení prostaty u subjektu, který vykazuje zhoubné bujení prostaty, podáváním analogu LHRH. Antagonista LHRH, přednostně PPI-149, formulovaný podle vynálezu, může být navíc použit i při inhibici výkyvu testosteronu, který doprovází použití agonisty LHRH tím, že se před zahájením terapie agonistou LHRH subjektu trpícímu zhoubným bujením prostaty předem aplikuje antagonist LHRH, přednostně PPI-149. Způsoby inhibice výkyvu testosteronu indukovaného agonis-

5 tou LHRH a jiné metody léčby zhoubného bujení prostaty, při kterých se použije antago-  
nista LHRH, se popisují v přihlášce patentu US 08/573,109 s názvem „Methods for Treating  
Prostate Using LHRH Antagonists“, podané 15. prosince 1995 a v částečné pokračovací přihlášce  
08/755,593, která má stejný název „Methods for Treating Prostate Using LHRH Antagonists“,  
podané 25. listopadu 1996, jejichž obsahy obou přihlášek jsou začleněny do přihlášky  
PCT WO 97/22357.

10 Konkrétní způsoby tvorby komplexu farmaceuticky aktivní peptidové sloučeniny s makro-  
molekulárním nosičem se popisují dále v textu v příkladech 1 až 5 a 8 až 9. Dále se popisují  
výsledky testů, které ukazují, že komplex obsahující antagonistu LHRH může umožnit  
nepřerušované uvolňování farmaceuticky aktivního peptidu *in vivo* (příklad 6) a inhibovat výkyv  
testosteronu indukovaný agonistou LHRH (příklad 7). Následující příklady, které ilustrují  
15 vynález, by se neměly považovat za limitující.

#### 15 Přehled obrázků na výkresech

20 Na obrázku č. 1 jsou grafy znázorňující množství testosteronu v plazmě (jednotky ng/ml; prázdné  
čtverce) a množství PPI-149 v plazmě krys (jednotky ng/ml; plné čtverce) (vyneseno na levou  
stranu grafu) nebo v plazmě psa (vyneseno na pravou stranu grafu) v době, která následuje po  
intramuskulární injekci komplexu PPI-149 a karboxymethylcelulózy.

25 Na obrázku č. 2 je graf znázorňující množství testosteronu v plazmě (jednotky ng/ml; prázdné  
čtverce) a množství PPI-149 (ng/ml; plné čtverce) v plazmě krys v době, která následuje po  
intramuskulární injekci komplexu antagonisty LHRH PPI-149 a karboxymethylcelulózy v den 0  
a po injekci agonisty LHRH Lupron<sup>TM</sup> 30-tý den. Vynesená data naznačují potlačení zvýšení  
množství testosteronu indukovaného Lupronem<sup>TM</sup> aplikací PPI-149.

30 Na obrázcích 3A až 3C je uvedena série grafů znázorňující množství testosteronu v plazmě  
(v jednotkách ng/ml) u samců krys Sprague-Dawley v době následující po intramuskulární  
injekci PPI-149-CMC (obr. 3A), PPI-258-CMC (obr. 3B) nebo Cetrorelixu<sup>TM</sup>-CMC (obr. 3C).

35 Na obrázku 4 je graf znázorňující množství testosteronu v plazmě (v jednotkách ng/ml; prázdné  
čtverce) a množství PPI-149 v plazmě (v jednotkách ng/ml; plné čtverce) u psů v době následu-  
jící po podkožní injekci PPI-149-CMC při uvedených dávkách v 28-mi denních intervalech.  
Vynesená data naznačují prodlouženou supresi množství testosteronu v plazmě.

40 Obrázek č. 5 je graf znázorňující množství testosteronu (ng/ml; prázdné čtverce) a množství  
PPI-149 v plazmě (ng/ml; plné čtverce) u psů v době následující po intramuskulární injekci  
komplexu PPI-149-CMC při uvedených dávkách ve 28-mi denních intervalech. Vynesená data  
naznačují prodlouženou supresi množství testosteronu v plazmě.

#### 45 Příklady provedení vynálezu

##### Příklad 1:

50 Rozpuštěním 6,25 mg/ml PPI-149 ve vodě se připravilo 100 ml roztoku antagonisty LHRH  
PPI-149. Připravil se stejný vzorek (minimálně 100 ml) sodné soli karboxymethylcelulózy  
(CMC) USP (s nízkou viskozitou, Hercules Chemical Co.) v koncentraci 0,125 % (hmotnost/-  
objem) a míchal se do rozpuštění. Smíchala se ekvivalentní část roztoků PPI-149 a CMC (vzniká  
poměr CMC:peptidu 0,2:1 (hmotnost/hmotnost)) a získal se pevný materiál. Pevný materiál se  
míchal přes noc a pak se izoloval filtrací přes nylonovou membránu s velikostí pórů 0,45  $\mu$ m.  
55 Analýza filtrátu pomocí HPLC ukazuje, že alespoň 95 % sloučeniny PPI-149 se přetvořilo na

pevný komplex. Získaná bílá pasta se dvakrát promyla vodou a přenesla se do zkumavky a sušila se ve vakuu. Po sušení po dobu 72 hodin se získalo 633 mg bílého prášku. Pevný materiál se pak rozmělnil v misce s tloučkem na prášek. Elementární analýza ukazuje v komplexu 57 % peptidu.

5

## Příklad 2:

25 mg PPI-149 se rozpustilo v 1 ml vody. Přidal se 1 ml roztoku 0,5 % karboxymethylcelulózy. Po promíchání směs vytvořila hedvábně bílou pevnou látku. Směs se zahřála pod zpětným chladičem po dobu 5 minut a vytvořily se vločky bílé sraženiny. Tento materiál se izoloval centrifugací/dekantací. Pevný materiál se resuspendoval ve vodě a izoloval se opakovanou centrifugací. Analýza filtrátu pomocí HPLC ukazuje, že alespoň 90 % PPI-149 přešlo do pevného komplexu. Bílá sraženina se sušila ve vakuu a pevný materiál se rozmělnil v misce tloučkem. Elementární analýza ukazuje, že komplex obsahuje 77 % peptidu.

15

## Příklad 3:

50 mg PPI-149 se rozpustilo ve 2 ml 5% manitolu a směs se míchala s 0,5 % karboxymethylcelulózou o objemu 2 ml (s nízkou viskozitou, USP, Spectrum Quality Chemicals). Směs se míchala a ihned se tvořila bílá sraženina. Suspenze se zmrazila a lyofilizovala se do vysušení za vzniku komplexu schopného nepřerušovaně zavádět PPI-149.

20

## Příklad 4:

25 mg PPI-149 se rozpustilo v 1 ml vody. Do roztoku se přidal 1 ml 0,5 % alginátu sodného, USP (Spectrum). Při smíchání se ihned tvoří bílá sraženina. Tento materiál se izoloval centrifugací a dekantací. Pevný materiál se resuspendoval ve vodě a izoloval se opakovanou centrifugací. Bílá sraženina se sušila ve vakuu. Uskutečnila se elementární analýza, aby se zjistilo, že sraženina obsahuje 66 % peptidu.

30

## Příklad 5:

25 mg PPI-149 se rozpustilo v 1 ml vody. Pro úpravu hodnoty pH na 11,0 se použil amoniak. K roztoku se přidal 1 ml 0,5% kyseliny alginové, USP (Spektrum). Při míchání se ihned tvoří bílá sraženina. Tento materiál se izoloval centrifugací a dekantací. Pevný materiál se resuspendoval ve vodě a izoloval se opakovanou centrifugací. Bílá sraženina se sušila ve vakuu. Proběhla elementární analýza a zjistilo se, že sraženina obsahuje 79 % peptidu.

35

40

## Příklad 6:

Ve vodě nerozpustný komplex antagonisty LHRH PPI-149 a karboxymethylcelulózy se připravil podle předcházejících příkladů. Připravila se suspenze komplexu PPI-149-CMC a jedna dávka se aplikovala injekcí do svalu krysám a psům. Dávka určená krysám je 50 µg/kg/den x 60 dní a dávka určená psům je 40 µg/kg/den x 28 dní. V různém čase se stanovilo množství testosteronu v plazmě (jednotky jsou ng/ml) jako měření aktivity antagonisty LHRH u zvířat. Výsledky vynesené do grafu na obrázku č. 1 ukazují, že intramuskulární injekce komplexu PPI-149-CMC vede k nepřerušovanému potlačení množství testosteronu v plazmě alespoň po dobu 42 dní u krys a alespoň po dobu 28 dní u psů (na obrázku č. 1 se k označení použily prázdné čtverce). Což ukazuje na nepřerušované zavádění antagonisty LHRH. U zvířat se také zaznamenávalo množství PPI-149 v plazmě (v jednotkách ng/ml) (na obrázku č. 1 se použily k označení plné čtverce). Počáteční přidání PPI-149 bylo zřejmé přibližně po dobu prvních osmi dní, pak PPI-149 nebyl

50

55

v plazmě v podstatě detekován. Navzdory detekovatelnosti PPI-149 v plazmě po přibližně 8 dnech, výsledky množství testosteronu v plazmě ukazují, že PPI-149 je stále v průběhu experimentu terapeuticky aktivní *in vivo*.

5

## Příklad 7:

Ve vodě nerozpustný komplex antagonisty LHRH PPI-149 a karboxymethylcelulózy se připravil podle předcházejících příkladů. Připravila se suspenze komplexu PPI-149/CMC a jedna dávka se  
10 injekcí aplikovala intramuskulárně krysám v den 0. 30-tý den se agonista LHRH Lupron™ (leuprolid) aplikoval injekcí krysám. V různém čase se stanovilo v plazmě zvířat množství testosteronu (jednotky ng/ml, na obrázku č. 2 se k označení použily prázdné čtverce) jako měření aktivity antagonisty LHRH. U zvířat se také monitorovalo množství PPI-149 (ng/ml) v plazmě (na obrázku č. 2 se k označení použily plné čtverce). Výsledky vynesené do grafu na obrázku č. 2  
15 ukazují, že předchozí léčba komplexem PPI-149/CMC rychle redukuje testosteron v plazmě na úroveň kastrovaných zvířat a blokuje uvolnění testosteronu indukované agonistou LHRH. Navzdory neschopnosti detekce PPI-149 v plazmě po uplynutí přibližně 8 dní výsledky získané při stanovení množství testosteronu ukazují, že PPI-149 je stále během experimentu terapeuticky aktivní *in vivo*.

20

## Příklad 8:

V tomto případě se připravil nerozpustný komplex mezi analogem LHRH PPI-258 a karboxymethylcelulózou (CMC). PPI-258 má strukturu acetyl-D-naftylalanyl-D-4-Cl-fenylalanyl-D-pyridylalanyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-asparaginy-L-leucyl-L-Neisopropyl-lysyl-L-propyl-D-alanyl-amid. Pro přípravu komplexu PPI-258/CMC se přidalo 174,8 mg (148,6 mg čisté hmotnosti) PPI-258 do 29,72 ml vody a materiál se míchal až se peptid suspendoval a rozpustil.  
25 Do uvedeného míchaného roztoku se přidalo 1,85 ml 2% roztoku sodné soli karboxymethylcelulózy (Hercules). Ihned se pozorovala tvorba sraženiny. Při zahřívání pod zpětným chladičem se suspenze stala průhlednou a pak se objevila bílá sraženina. Po 5 minutách zahřívání pod zpětným chladičem se reakční ochladila a pevné části se izolovaly centrifugací. Pevné části se promyly vodou a sušily se přes noc ve vakuu. Sušený materiál se rozmělnil na prášek v misce tloučkem a prosil se sítím z nerezové oceli s velikostí ok 90 µm. Prosetý prášek (o velikosti částic 90 µm) se shromáždil a provedla se jeho charakterizace. Celkový výtěžek je 198,4 mg suchého pevného materiálu, po kroku mletí vzniká 110,8 mg prášku. Komplex obsahuje 80 % peptidu PPI-258, 18,8 % CMC a 6,6 % vody.  
30  
35

## 40 Příklad 9:

V tomto příkladu se vytvořil komplex mezi analogem LHRH Cetorelix™ (také je znám jako SB-75) a karboxymethylcelulózou (CMC). Cetorelix™ má strukturu: acetyl-D-naftylalanyl-D-4-Cl-fenylalanyl-D-pyridylalanyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-citrulyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-D-alanyl-amid. Aby se připravil zásobní roztok komplexu Cetorelixu/CMC, přidalo se  
45 102,8 mg (87 mg čisté hmotnosti) Cetorelix™ do 17,4 ml vody a materiál se míchal, až se peptid suspendoval a rozpustil. K tomuto míchanému roztoku se přidalo 1,1 ml 2 % roztoku sodné soli karboxymethylcelulózy (Hercules). Ihned se pozorovaly chuchvalce bílé sraženiny. Suspenze se zahřála pod zpětným chladičem po dobu 5 minut a ochladila se za vzniku pevné bílé sraženiny.  
50 Pevná sraženina se izolovala centrifugací, promyla se vodou a sušila se přes noc ve vakuu. Suchý prášek se rozmělnil v misce tloučkem a přesil se nerezovým sítím o velikosti ok 90 µm. Prášek se sebral a provedla se jeho charakterizace. Celkový výtěžek byl 95 mg suchého pevného materiálu, po kroku mletí vzniká 60 mg prášku. Komplex obsahuje 75 % peptidu Cetorelix™, 20,7 % CMC a 6,5 % vody.

55

## Příklad 10:

V tomto příkladu se testovalo nepřerušované uvolňování in vivo tří různých analogů LHRH PPI-149, PPI-258 a Cetrorelix<sup>TM</sup>, které se připravily jako depotní CMC formulace způsobem popsaným ve třech předchozích příkladech. Testovala se tři různá formulační vehikula, a to fyziologický roztok, glycerin (15 % glycerin/4 % dextróza) a lecitin. K pokusům se použily krysy Sprague-Dawley (25 samců, rozmezí hmotnosti je 300 až 325 gramů) a účinnost analogu LHRH se stanovila v závislosti na redukci množství testosteronu v plazmě.

10 Dávky a způsoby aplikace byly následující:

Skupina	Sloučenina	Dávka (mg/kg)	Dávka (μg/kg/den)	Dávka (mg/krysa)	Nástroj	Způsob aplikace
A	PPI-149	9	300	2,7	Fyziologický roztok	IM
B	PPI-149	9	300	2,7	Glycerin	IM
C	PPI-149	9	300	2,7	Glycerin	SC
D	PPI-149	9	300	2,7	Lecitin	IM
E	PPI-258	9	300	2,7	Fyziologický roztok	IM
F	Cetrorelix <sup>TM</sup>	9	300	2,7	Fyziologický roztok	IM

15 Skutečná dávka peptidu je 300 μg/kg/den po dobu 30 dní, která se podala v množství 2,7 mg na jednu krysu jako jediná intramuskulární (IM) nebo podkožní (SC) injekce o objemu 200 μl. Celkový objem nutný pro aplikaci injekcí 5-ti krysám ve skupině byl 1,3 ml při koncentraci 13,5 mg/ml aktivního peptidu 13,5 mg/ml. Objem injekce byl konstantní a hmotnost prášku se stanovila vzhledem k celkovému obsahu peptidu následujícím způsobem:

skupina	Požadovaný objem (ml)	Požadovaná hmotnost prášku (mg)	Hmotnost užívaného prášku (mg)	Užívaný objem (ml)
A	1,3	22,5	29,5	1,7 ml fyziol. roztoku
B, C	2,6	45	71,1	4,1 ml glycerinu/dextrozy
D	1,3	22,5	35,2	2,03 ml 0,5 % lecitin/manitol
E	1,3	22,5	31	1,79 ml fyziol. roztoku
F	1,3	22,5	20,9	1,21 ml fyziol. roztoku

20

Jedna intramuskulární nebo podkožní injekce testovaného vzorku o objemu 200 μl se aplikovala do oblasti horního boku zadní nohy nebo pod kůži mezi lopatky při anestezii v den 0.

Aby se mohlo stanovit množství testosteronu v plazmě, odebralo se v den 1 po aplikaci dávky z retro-orbitální dutiny přibližně 0,4 ml krve a dále se odběr opakoval v den 3, 7, 14, 21, 28 a 35. Krev se zpracovala na plazmu a zmrazila se na suchém ledu, aby se stanovilo množství testosteronu v plazmě za použití standardních metod.

Výsledky uvedené na obrázcích 3A až 3C ukazují, že množství testosteronu v plazmě u samců krys Sprague-Dawley se redukovalo a udržovalo se na velmi nízké hodnotě po dobu alespoň 28 dní a přibližně 50 dní trvala odezva na nepřerušované uvolňování analogů LHRH PPI-149, PPI-258 a Centrorelix<sup>TM</sup>, které se připravily jako CMC depotní formulace (zobrazeno na obrázcích 3A, 3B a 3C). Tyto výsledky indikují, že všechny tři formulace jsou účinné při redukcí množství testosteronu *in vivo* a při udržení redukováného množství testosteronu v plazmě během určitého časového období.

15

#### Příklad 11:

Formulace PPI-149-CMC se vystavily gama záření z důvodů sterilizace. Pak následuje hodnocení fyzikálních a chemických vlastností ozářených formulací. Data uvedená dále v textu ukazují, že gama záření je vhodný způsob sterilizace komplexu PPI-149-CMC.

20

#### Stabilita peptidu.

Přibližně 40 mg každého ze dvou komplexů PPI-149-CMC se odděleně ukládaly do skleněných zkumavek typu 1, neprodyšně se uzavřely gumou a hliníkovým těsněním. Zkumavky se pak ozářily různými nominálními dávkami gama záření. U dvou zkumavek se testovala čistota peptidu (vyjádřeno v %) při každém stupni ozáření gama paprsky pro každou ze dvou šarží. Výsledky ukazují, že při dávkách gama záření až do hodnoty 24 kGy včetně vykazuje PPI-149 konzistentně méně než 2 % snížení čistoty peptidu (stanovilo se pomocí profilu nečistot HPLC). Byl provedena druhá studie využívající vyšší dávky gama záření na další laboratorní šarži PPI-149-CMC. Komplex PPI-149-CMC vykazuje po ozáření vysokou dávkou gama paprsků pozoruhodně dobrou chemickou stabilitu.

25

30

Byla provedena následná preformulační studie za účelem porovnání degradačního profilu získaného po ozáření komplexu PPI-149-CMC gama paprsky a profilu, který se získal při autoklávování injekčního roztoku PPI-149 (1 mg/ml). Připravily se dva vzorky: a) komplex PPI-149-CMC se vystavil gama záření v dávce 19 kGy, b) roztok PPI-149 (1 mg/ml) se autoklávoval (121 °C po dobu 20 minut). Chromatogramy HPLC obou vzorků ukazují, že degradační profily se jeví být kvalitativně podobné (dáno podobnými relativními retenčními časy hlavních píků).

35

40

#### Stabilita v náročných podmínkách při skladování po ozáření paprsky gama

Na zkumavkách po gama-ozáření byly rovněž provedeny preformulační studie při skladování za náročných podmínek. Zatavené zkumavky ze dvou laboratorních šarží PPI-149-CMC byly vystaveny záření gama 19 kGy a skladovány až jeden měsíc při 25, 37 a 50 °C. Údaje o chemické stabilitě těchto preformulací ukazují, že gama-ozáření v dávce 19 kGy s následným skladováním za náročných podmínek nevede k významné nestabilitě ani za velmi náročných podmínek (například 1 týden při 50 °C). Data ukazují, že při dávkách gama záření do 19 kGy včetně PPI-149-CMC při skladování až po dobu 28 dní při nebo pod 50 °C konzistentně vykazoval méně než 2% snížení čistoty peptidu (stanoveno profilem nečistot pomocí HPLC). I přes zjevný rozdíl počátečního obsahu vlhkosti mezi oběma studovanými šaržemi nebyl zjištěn významný rozdíl čistoty peptidu ani u počátečních preformulačních vzorků, ani u vzorků skladovaných až jeden měsíc.

50

55

## Analýza velikosti částic komplexu PPI-149-CMC

Za použití difrakce laserového záření se vyvinula metoda stanovení velikosti částic, která je vhodná pro studium velikosti částic komplexu PPI-149-CMC. Pro ilustraci využitelnosti metody se uvádí pre-formulační experiment, který se uskutečnil za účelem zkoumání účinku gama záření na velikost částic komplexu PPI-149-CMC. Tento experiment se koncipoval na základě vědomostí o tom, že amorfní pevné materiály mohou mít během skladování sklon ke shlukování částic. Dva vzorky komplexu PPI-149-CMC se uložily do skleněných zkumavek typu I, uzavřely se zátkou z šedého butylkaučuku a neprodyšně se uzavřely hliníkovým těsněním. Hodnocení velikosti částic se provedlo před a po ozáření gama paprsky v dávce 15,5 kGy. Hodnocení částic se provedlo metodou rozptylu laserového záření (za použití Malvern Mastersizer STM vybaveného reverzními Fourierovými čočkami). 20 mg vzorku se za silného míchání vneslo do přibližně 0,5 ml deionizované vody za vzniku disperze, která pak byla sonifikována v lázni s teplotou okolí po dobu 5 minut. Po provedení výpočtu pozadí proběhl experiment kvalifikace metody. Disperze vzorku se po kapkách přidávala do kontinuálně se plnícího rezervoáru (nominální objem přibližně 60 ml), až se získalo přibližně 20 % zakalení. Rotační rychlost mixéru se držela během experimentu na 2700 ot. /min (plus hodnota pozadí). Při této rychlosti nevznikaly bubliny vlivem vírů, ale byla udržována adekvátně stabilní disperze. Provedlo se 8 měření a analýza získaných dat ukázala standardní odchylku <0,03 % jako extrémní bod kteréhokoli naměřeného údaje. V případě, že disperze vzorku byla v rezervoáru po dobu 15 minut a pak podrobena novému experimentu, nedošlo k podstatným změnám, což ukazuje, že částice se během experimentu nerozpustily.

Za použití výše uvedených experimentálních parametrů byly analyzovány vzorky. Uskutečnilo se 8 měření a stanovil se průměrný průměr částic. Byly zaznamenány dvě různé distribuce velikostí částic, které obě měly na horním konci ostrou hranu, což ukazuje na absenci agregace částic. Jedna šarže PPI-149-CMC měla před ozářením gama paprsky zjevně menší průměrnou hodnotu průměru než vzorek po ozáření. Zdá se, jako by tato preformulační studie ukazovala, že ke konsolidaci částic dochází během sterilizace.

## Příklad 12:

V tomto příkladu se které proběhly popisuje za účelem řada pre-formulačních zjištění účinku gama experimentů, záření a zatížení teploty/vlhkosti na pevnou formu komplexu PPI-149-CMC.

## Prášková rentgenová difrakce

Na začátku experimentu se dva vzorky komplexu PPI-149-CMC v množství 60 mg vnesly do skleněných zkumavek typu I (s horním prostorem vyplněným vzduchem), uzavřely se zátkou z šedého butylkaučuku a neprodyšně se uzavřely hliníkovým těsněním. Jeden ze vzorků se pak vystavil gama záření v dávce 19,0 kGy. U těchto vzorků se pak studovala prášková rentgenová difrakce. Difraktogramy se porovnály před a po expozici gama záření v dávce 19,0 kGy.

V následující studii se 60 mg vzorku komplexu PPI-149-CMC (po ozáření gama paprsky) umístilo do skleněné zkumavky typu I a inkubovalo se v inkubátoru s předem ekvilibrovanou konstantní vlhkostí při teplotě 50 °C a 75% vlhkosti po dobu 5 dní. Ihned po vyjmutí s inkubátoru se vzorek ve zkumavce uzavřel zátkou z šedého butylkaučuku a neprodyšně se uzavřel hliníkovým těsněním. Difraktogram X-paprsků uvedeného vzorku vystaveného zatížení se porovnal s jiným vzorkem stejné řady, který se nacházel v uzavřené zkumavce při teplotě místnosti. Vzorky se analyzovaly za použití automatizovaného práškového difraktometru Siemens D500 vybaveného grafitovým monochromátorem a rentgenovým zdrojem Cu ( $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ ) pracujícím při 50 kV, 40 mA. Rozmezí měření dvou-theta bylo 4 až 40° za použití postupného skenovacího okna s krokem 0,05°/1,2 vteřiny. Šířka šterbin paprsků se nastavila (1)1°, (2)1°, (3)1°, (4)0,15°.

Kalibrace dvou-theta se provedla za použití slídového standardu NBS (SRM 675). Vzorky se analyzovaly za použití nulového pozadí.

Data ukazují, že komplex PPI-149-CMC před ozářením gama nevykazuje zjevnou krystalickou nebo pseudo-krystalickou strukturu. Poskytuje totiž práškový rentgenogram, který je charakteristický pro amorfní látky (široká pata mezi 2 až 20°, žádné významné píky v difraktogramu). Vzorek PPI-149-CMC po ozáření poskytl velmi podobný rentgenogram jako neozářený vzorek, což ukazuje, že zpracování gama zářením (v dávce až do 19,0 kGy včetně) zjevně neindukuje polymorfní přechod látky v pevném stavu. Podobně vzorek PPI-149-CMC vystavený namáhání za podmínek teploty/vlhkosti vytvořil velmi podobný rentgenogram jako neozářený i ozářený vzorek, což silně naznačuje, že PPI-149-CMC není příliš náchylný k polymorfnímu přechodu v pevném stavu.

#### Hygroskopičnost

Provedly se pre-formulační studie komplexu PPI-149-CMC (po ozáření) za účelem stanovení rovnováhy pohlcené vlhkosti (měří se jako přírůstek hmotnosti) při konstantní teplotě (25 °C) za různých podmínek relativní vlhkosti. Analýza rovnovážné vlhkosti (% vody) jako funkce relativní vlhkosti (% RH) ukázala, že obsah vlhkosti postupně roste až do dosažení přibližně 80 % relativní vlhkosti. Při vysoké relativní vlhkosti (95% RH) byl komplex PPI-149-CMC schopen podstatně sorbovat vlhkost. Při relativní vlhkosti rovné nebo nižší 80 % RH se ochranná opatření proti vlhkosti nepovažují za nutná; některé kroky výroby tak mohou probíhat za podmínek vlhkosti okolí (pokud se zamezí extrémům vlhkosti).

#### Příklad 13:

V tomto příkladu se popisuje studie rozpouštění komplexu PPI-149-CMC. Experimenty se uskutečnily za použití podmínek ponoření i bez ponoření. Komplex PPI-149-CMC vykazuje hodnotu přibližné rozpustnosti 100 µg/ml (měřeno a vyjádřeno jako volný peptid) při teplotě 25 °C v 0,1M fyziologickém roztoku pufrovaném fosforečnanem, jehož hodnota pH je 7,3. Při podmínkách ponoření (které se definují jako < 10 % rozpustnosti v systému za nasycení při dané teplotě), se i bez míchání komplex PPI-149-CMC rychle rozpustil (měří se a vyjadřuje se jako volný peptid). V podobném experimentu se stanovila rovnovážná rozpustnost komplexu PPI-149-CMC (měřeno a vyjádřeno se jako volný peptid) při teplotě 25 °C v 0,1M fyziologickém roztoku pufrovaném fosforečnanem, jehož hodnota pH je 7,3, s použitím tří vzorků: samotný PPI-149-CMC, PPI-149-CMC v přítomnosti dalších 10 % (hmotnostní procenta) PPI-149 (vyjádřeno jako volný peptid, ale zaváděno jako PPI-149 s asociovaným acetátem) a PPI-149-CMC v přítomnosti dalších 50 % hmotnostních sodné soli karboxymethylcelulózy. Všechny tři vzorky poskytly nápadně podobnou rovnovážnou rozpustnost peptidu. Protože se vybraný systém pufru přibližuje fyziologickým podmínkám, přítomnost další volné zdá se nepravděpodobné, že by peptidu karboxymethylcelulózy nebo v komplexu PPI-149-CMC ovlivňovala rozpustnost.

#### Příklad 14:

Na psech se charakterizovala farmakokinetika, farmakodynamika a bezpečnost aplikace opakované dávky komplexu PPI-149-CMC podkožní (SC) a intramuskulární injekcí (IM).

V první studii, prováděné po dobu tří měsíců, bylo hodnoceno 40 samců psů beagle přičemž se měsíčně aplikovala IM nebo SC injekce komplexu PPI-149-CMC v koncentraci 1,2 mg/kg (den 1), 0,3 nebo 0,6 mg/kg (den 29) a 1,2 mg/kg (den 57) v různých rekonstitučních vehikulech. Do studie se zahrnulo 8 skupin psů:



Skupina	N	Rekonstituční vehikulum <sup>a,b</sup>			Dávka <sup>c</sup>			Způsob aplikace
		Den 1	Den 29	Den 57	Den 1	Den 29	Den 57	
A <sup>d</sup>	5	Fyz. r.	Glycerin	Lecitin	0	0	0	IM
B	5	Glycerin	Glycerin	Lecitin	1,2	0,3	1,2	IM
C	5	Glycerin	Glycerin	Lecitin	1,2	0,6	1,2	IM
D	5	PEG	Glycerin	Lecitin	1,2	0,3	1,2	IM
E	5	PEG	Glycerin	Lecitin	1,2	0,3	1,2	SC
F <sup>d</sup>	5	Lecitin	Glycerin	Lecitin	1,2	0,6	1,2	IM
G <sup>d</sup>	5	Lecitin	Glycerin	Lecitin	1,2	0,6	1,2	SC
H	5	glycerin	glycerin	Lecitin	1,2	0,3	1,2	SC

- a. rekonstituční vehikulum se používá při rekonstituci PPI-149-CMC jako suspenze částic. Obsah je následující:
- 5 1. Glycerin (15% glycerinu/5% dextrózy)
  2. PEG (4 % polyethylenglykol-3350/4% mannitol)
  3. Lecitin (0,5 % lecitin/5% mannitol)
- b. Poznámka: rekonstrukční vehikulum používané při klinických studiích je 0,9% chlorid sodný USP
- 10 c. Všechny dávky se vyjadřují jako obsah peptidu (PPI-149).
- d. V den 85 byla usmrcena tři zvířata za účelem anatomické a mikroskopické histologie.

15 Tato studie byla navržena tak, že účinnost komplexu PPI-149-CMC při počáteční dávce v různých vehikulech byla hodnocena během prvního měsíce léčby. Během druhého měsíce studie psi dostávali nižší dávku komplexu PPI-149-CMC za účelem stanovení účinné „udržovací“ dávky. Třetí měsíc byl navržen pro hodnocení charakteristik dlouhodobé bezpečnosti a účinnosti komplexu PPI-149-CMC.

20 IM nebo SC dávky komplexu PPI-149-CMC formulovaného v jednom z rekonstitučních vehikul nebo IM dávky kontrolní látky se aplikovaly v každém dnu podání dávky do horní části boku pravé zadní nohy (IM) nebo do mezilopatkové oblasti (SC). Materiál se natáhl do stříkačky pro aplikaci tuberkulinu o objemu 1 ml s jehlou 23 g s krátkým úkosem. Místo aplikace injekce se bezprostředně před aplikací dávky potřelo alkoholem. Injektovaný objem závisel na konkrétní dávce peptidu na hmotnost těla v kilogramech. Je nutné poznamenat, že všechny dávky se  
25 vztahují na aplikovaný peptid PPI-149.

Každé zvíře se během celé studie prohlíželo nejméně dvakrát denně a zjišťovaly se zjevné známky toxického nebo farmakologického účinku a změny obecného chování a vzhledu. Všechna abnormální klinická pozorování se zaznamenávala.

30 Krev se odebrala před aplikací první dávky a dále v různých časech po aplikaci dávky, provedl se celkový krevní obraz (CBC), chemická analýza séra a dvakrát týdně se stanovila radioimunitní koncentrace PPI-149 a testosteronu.

35 Po třech měsících studie se usmrtilo devět zvířat a za účelem provedení hrubé patologické a histopatologické analýzy se izolovala jejich tkáň. Za účelem usmrcení se vybrala zvířata z kontrolní skupiny ošetřené pouze vehikulem, jedno ze skupiny po IM injekcí a jedno ze skupiny po aplikaci SC injekcí. Vybrané tkáně pocházely z místa aplikace (SC nebo IM injekce),

nadledvin, aorty, kosti, kostní dřeň, mozku, bránice, nadvarlete, jícnu, očí s očním nervem, srdce, ledvin, tlustého střeva (caecum, colon), jater s žlučníkem, plic s průduškami, lymfatických uzlin, pankreatu, podvěsku mozkového, prostatické žlázy s močovou trubicí, slinných žláz, sciatického nervu, kosterních svalů, kůže, tenkého střeva (duodenum, jejunu, ileum), páteře, sleziny, žaludku, varlete, thymu, štítné žlázy s příštítným tělískem, jazyka, trachei, močového měchýře a hrubých lézí.

Během studie se nezjistily žádné odchylky od základních hodnot při hematologickém a chemickém vyšetření krve kontrolních nebo ošetřených zvířat. Hrubé hodnocení a histologické hodnocení usmrcených zvířat po tříměsíčním experimentu neukazuje žádné rozdíly mezi psy, kterým se aplikoval komplex PPI-149-CMC, a kontrolními zvířaty, kterým se aplikovalo pouze vehikulum, s výjimkou změn tkáně varlete a prostaty, což se při aplikaci uvedeného antagonisty LHRH očekávalo.

Pokud jde o farmakokinetiku komplexu PPI-149-CMC, všichni psi, kteří dostali dávku 1,2 mg/kg komplexu PPI-149-CMC resuspendovaného v různých rekonstitučních vehikulech a aplikovaného IM nebo SC injekcí, vykazovali podobné farmakokinetické profily PPI-149 v plazmě, přičemž píku se dosahuje v prvních dvou dnech a pak během následujícího měsíce obsah peptidu pomalu exponenciálně klesá. Komplex PPI-149-CMC vykazoval podobnou distribuci PPI-149 v plazmě, byl-li suspendován v libovolném ze tří rekonstitučních vehikul užívaných v této studii.

Pokud jde o endokrinní účinnost PPI-149-CMC, 24 hodin po začátku aplikace dávek komplexu PPI-149-CMC se u všech psů pozorovalo množství testosteronu na úrovni kastrovaných zvířat (<0,6 ng/ml) a hodnoty během prvního měsíce obecně přetrvávaly v rozmezí, které odpovídá kastrovaným jedincům, bez ohledu na způsob aplikace nebo volbu rekonstitučního vehikula. 26 z 35 psů (75 %) mělo hladinu testosteronu odpovídající kastrátům ve vzorku získaném těsně před aplikací druhé dávky PPI-149-CMC v den 29. Tyto výsledky ukazují, že počáteční dávka 1,2 mg/kg u psů úspěšně vyvolává rychlou dlouhotrvající supresi (déle jak 28 dní) testosteronu v plazmě. Ve druhém měsíci, kdy se zkoumala účinnost „udržovací“ dávky (dávka nižší než počáteční dávka), výsledky ukazují, že aplikace 0,3 nebo 0,6 mg/kg komplexu PPI-149-CMC udržuje množství testosteronu na úrovni kastrovaných jedinců více než 20 dní u 30 z 35 psů. Na konci druhého měsíce experimentu (den 57) 21 psů z 35 (60 %) mělo množství testosteronu na úrovni kastrovaných zvířat, zatímco 14 psů mělo testosteron v normálním rozmezí (vyšší než 0,6 ng/ml). Na začátku třetího měsíce byla aplikována dávka 1,2 mg/kg. Koncentrace PPI-149 v plazmě přetrvávala po následujících 28 dní, zatímco množství testosteronu v plazmě opět odpovídalo úrovni kastrovaných jedinců. Na konci třetího měsíce (den 85) množství testosteronu v plazmě odpovídá kastrovaným jedincům u 30 z 35 psů, kterým se aplikoval komplex PPI-149-CMC.

Shrnutí: 35 psům se aplikovalo 1,2 mg/kg komplexu PPI-149-CMC v den 1, 0,3 nebo 0,6 mg/kg komplexu PPI-149-CMC v den 29 a 1,2 mg/kg komplexu PPI-149-CMC v den 57. Dávky se aplikovaly IM nebo SC injekcemi, které obsahují komplex s různými rekonstitučními vehikuly. Z uvedených 35 psů 19 zvířat (54 %) vykazuje množství testosteronu v plazmě, které zůstává v rozmezí kastrátů po celý průběh terapie. Aplikace komplexu PPI-149-CMC ve 28 denních intervalech tedy umožnila úplnou supresi testosteronu v plazmě, která je rychlá (všechna zvířata dosáhla množství testosteronu odpovídající kastrovaným jedincům během 24 hodin) a dlouhodobá (udržuje se po dobu aplikace).

Podobná studie, jako se popisuje výše, se uskutečnila po dobu šesti měsíců na psech. Účelem studie bylo dále zhodnotit dlouhodobou účinnost a bezpečnost komplexu PPI-149-CMC. Zvířatům se aplikovala dávka 1,2 mg/kg komplexu PPI-149-CMC buď IM, nebo SC injekcí a pět následujících dávek (v koncentraci buď 0,3, 0,6, nebo 1,2 mg/kg) ve 28 denních intervalech. Množství testosteronu a PPI-149 v plazmě se stanovilo radioimunotestem v pravidelných časových intervalech. Výsledky jsou uvedeny na obrázku č. 4 (v případě aplikace SC injekcí) a na obrázku č. 5 (v případě injekcí IM). Výsledky ilustrují množství testosteronu (prázdné čtverce) a

PPI-149 (plné čtverce). V grafech jsou uvedeny konkrétní dávky použité při každé aplikaci komplexu PPI-149-CMC. Výsledky ilustrované na obrázcích č. 4 a 5 dále ukazují, že aplikace komplexu PPI-149CMC v 28 denních intervalech vede k celkové supresi množství testosteronu v plazmě, která je rychlá a dlouhodobá, přičemž redukované množství testosteronu v plazmě trvá až 6 měsíců.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Farmaceutická kompozice obsahující ve vodě nerozpustný pevný iontový komplex farmaceuticky aktivního peptidu a makromolekulárního nosiče, **vyznačující se tím**, že před komplexací s farmaceuticky aktivním peptidem je molekula nosiče ve vodě rozpustná a obsah peptidu v uvedeném komplexu je alespoň 57 % hmotnostních.

2. Farmaceutická kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že obsah peptidu v uvedeném komplexu je 57 až 79 % hmotnostních.

3. Farmaceutická kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že je v podstatě tvořena ve vodě nerozpustným pevným iontovým komplexem.

4. Farmaceutická kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že nosič a farmaceuticky aktivní peptid, použité při tvorbě komplexu, jsou kombinovány v hmotnostním poměru nosič:polypeptid 0,5:1 až 0,1:1 a uvedený komplex není mikrokapsle.

5. Farmaceutická kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že uvedený komplex je schopen zůstat stabilní po sterilizaci  $\gamma$ -zářením.

6. Farmaceutická kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že uvedený farmaceuticky aktivní peptid je analog LHRH.

7. Farmaceutická kompozice podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že analog LHRH je antagonist LHRH.

8. Farmaceutická kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že uvedený farmaceuticky aktivní peptid je vybrán ze skupiny zahrnující analogy bradykininu, parathyroidní hormon, adrenokortikotropní hormon, kalcitonin a analogy vazopresinu.

9. Farmaceutická kompozice podle libovolného z nároků 1, 2, 3, 4 nebo 5, **vyznačující se tím**, že uvedený farmaceuticky aktivní peptid je kation a makromolekulární nosič je anion.

10. Farmaceutická kompozice podle libovolného z nároků 1, 2, 3, 4 nebo 5, **vyznačující se tím**, že komplex zabezpečuje nepřerušované dodávání farmaceuticky aktivního peptidu subjektu alespoň po dobu jednoho týdne po aplikaci farmaceutické kompozice subjektu.

11. Farmaceutická kompozice podle libovolného z nároků 1, 2, 3, 4 nebo 5, **vyznačující se tím**, že komplex zabezpečuje nepřerušované dodávání farmaceuticky aktivního peptidu subjektu alespoň po dobu dvou týdnů po aplikaci farmaceutické kompozice subjektu.

12. Farmaceutická kompozice podle libovolného z nároků 1, 2, 3, 4 nebo 5, **vyznačující se tím**, že komplex zabezpečuje nepřerušované dodávání farmaceuticky aktivního peptidu subjektu alespoň po dobu tří týdnů po aplikaci farmaceutické kompozice subjektu.

13. Farmaceutická kompozice podle libovolného z nároků 1, 2, 3, 4 nebo 5, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že komplex zabezpečuje nepřerušované dodávání farmaceuticky aktivního peptidu subjektu alespoň po dobu čtyř týdnů po aplikaci farmaceutické kompozice subjektu.
- 5 14. Farmaceutická kompozice podle libovolného z nároků 1, 2, 3, 4 nebo 5, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že farmaceuticky aktivní peptid je multivalentní kationtový nebo aniontový peptid.
15. Farmaceutická kompozice podle libovolného z nároků 1, 2, 3, 4 nebo 5, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že peptid obsahuje 5 až 20 aminokyselin.
- 10 16. Farmaceutická kompozice podle libovolného z nároků 1, 2, 3, 4 nebo 5, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že peptid obsahuje 8 až 15 aminokyselin.
- 15 17. Farmaceutická kompozice podle libovolného z nároků 1, 2, 3, 4 nebo 5, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že peptid obsahuje 8 až 12 aminokyselin.
18. Farmaceutická kompozice podle libovolného z nároků 1, 2, 3, 4 nebo 5, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že makromolekulární nosič je aniontový polymer.
- 20 19. Farmaceutická kompozice podle libovolného z nároků 1, 2, 3, 4 nebo 5, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že makromolekulární nosič je aniontový derivát polyalkoholu nebo jeho fragment.
20. Farmaceutická kompozice podle libovolného z nároků 1, 2, 3, 4 nebo 5, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že makromolekulární derivát polysacharidu nebo jeho nosič je aniontový fragment.
- 25 21. Farmaceutická kompozice podle libovolného z nároků 1, 2, 3, 4 nebo 5, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že makromolekulární nosič je karboxymethylcelulóza nebo její fragment nebo derivát.
- 30 22. Farmaceutická kompozice podle libovolného z nároků 1, 2, 3, 4 nebo 5, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že makromolekulární nosič je vybrán ze skupiny zahrnující algin, alginát, aniontové acetátové polymery, aniontové akrylové polymery, xanthamové gummy, aniontové deriváty karanenu, aniontové deriváty polygalakturonové kyseliny, sodnou sůl glykolátu škrobu a jejich fragmenty, deriváty a farmaceuticky přijatelné sole.
- 35 23. Farmaceutická kompozice podle libovolného z nároků 1, 2, 3, 4 nebo 5, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že je lyofilizovanou pevnou látkou.
- 40 24. Farmaceutická kompozice podle libovolného z nároků 1, 2, 3, 4 nebo 5, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že uvedený pevný iontový komplex je suspendován jako kapalná suspenze nebo dispergován jako polo-pevná disperze.
- 45 25. Farmaceutická kompozice podle nároku 6, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že analog LHRH je antagonist LHRH zahrnující peptidovou sloučeninu, kde zbytek peptidové sloučeniny odpovídající aminokyselině v poloze 6 přirozeného savčího LHRH obsahuje strukturu D-asparaginu.
26. Farmaceutická kompozice podle nároku 6, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že analog LHRH je antagonist LHRH zahrnující peptidovou sloučeninu, která zahrnuje strukturu A-B-C-D-E-F-G-H-I-J, kde
- 50 A je pyro-Glu, Ac-D-Nal, Ac-D-Qal, Ac-Sar nebo Ac-D-Pal,  
 B je His nebo 4-Cl-D-Phe,  
 C je Trp, D-Pal, D-Nal, L-Nal, D-Pal(N-O) nebo D-Trp,  
 D je Ser,  
 E je N-Me-Ala, Tyr, N-Me-Tyr, Ser, Lys(iPr), 4-Cl-Phe, His, Asn, Met, Ala, Arg nebo Ile,

- F je D-Asn, D-Gln nebo D-Thr,  
 G je Leu nebo Trp,  
 H je Lys (iPr), Gln, Met nebo Arg,  
 I je Pro a  
 5 J je Gly-NH<sub>2</sub> nebo D-Ala-NH<sub>2</sub>,

nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl.

10 27. Farmaceutická kompozice podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že analog LHRH je antagonist LHRH, který má následující strukturu: Ac-D,-Nal-4-Cl-D-Phe-D-Pal-Ser-N-Me-Tyr-D-Asn-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala.

15 28. Balená formulace pro léčbu hormonálně závislého zhoubného bujení, benigní hypertrofie prostaty, předčasné puberty, endometriózy a děložních fibroidů, neplodnosti a fertility u subjektu, **vyznačující se tím**, že zahrnuje farmaceutickou kompozici podle nároku 1.

20 29. Balená formulace podle nároku 28, **vyznačující se tím**, že farmaceuticky aktivním peptidem je antagonist LHRH mající následující strukturu: Ac-D-Nal-4-Cl-D-Phe-D-Pal-Ser-N-Me-Tyr-D-Asn-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala a makromolekulární nosič je karboxymethylcelulóza.

30 30. Injekční stříkačka s dutinou, **vyznačující se tím**, že zahrnuje kapalnou suspenzi farmaceutické kompozice podle nároku 1.

25 31. Injekční stříkačka podle nároku 30, **vyznačující se tím**, že farmaceuticky aktivním peptidem je analog LHRH mající strukturu Ac-D-Nal-4-Cl-D-Phe-D-Pal-Ser-N-Me-Tyr-D-Asn-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala a makromolekulární nosič je karboxymethylcelulóza.

30 32. Použití farmaceutické kompozice podle nároku 1 při výrobě léčiva pro léčbu hormonálně závislého zhoubného bujení, benigní hypertrofie prostaty, předčasné puberty, endometriózy a děložních fibroidů, neplodnosti a fertility.

35 33. Použití podle nároku 32, kde komplex umožňuje nepřerušované dodávání antagonisty LHRH subjektu po dobu alespoň jednoho týdne po aplikaci farmaceutické kompozice subjektu.

34. Použití podle nároku 32, kde komplex umožňuje nepřerušované dodávání antagonisty LHRH subjektu po dobu alespoň dvou týdnů po aplikaci farmaceutické kompozice subjektu.

40 35. Použití podle nároku 32, kde komplex umožňuje nepřerušované dodávání antagonisty LHRH subjektu po dobu alespoň tří týdnů po aplikaci farmaceutické kompozice subjektu.

36. Použití podle nároku 32, kde komplex umožňuje nepřerušované dodávání antagonisty LHRH subjektu po dobu alespoň čtyř týdnů po aplikaci farmaceutické kompozice subjektu.

45 37. Použití podle nároku 32, kde farmaceuticky aktivním peptidem je antagonist LHRH mající následující strukturu Ac-D-Nal-4-Cl-D-Phe-D-Pal-Ser-N-Me-Tyr-D-Asn-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala.

50 38. Použití podle nároku 32, kde makromolekulární nosič je aniontový polymer.

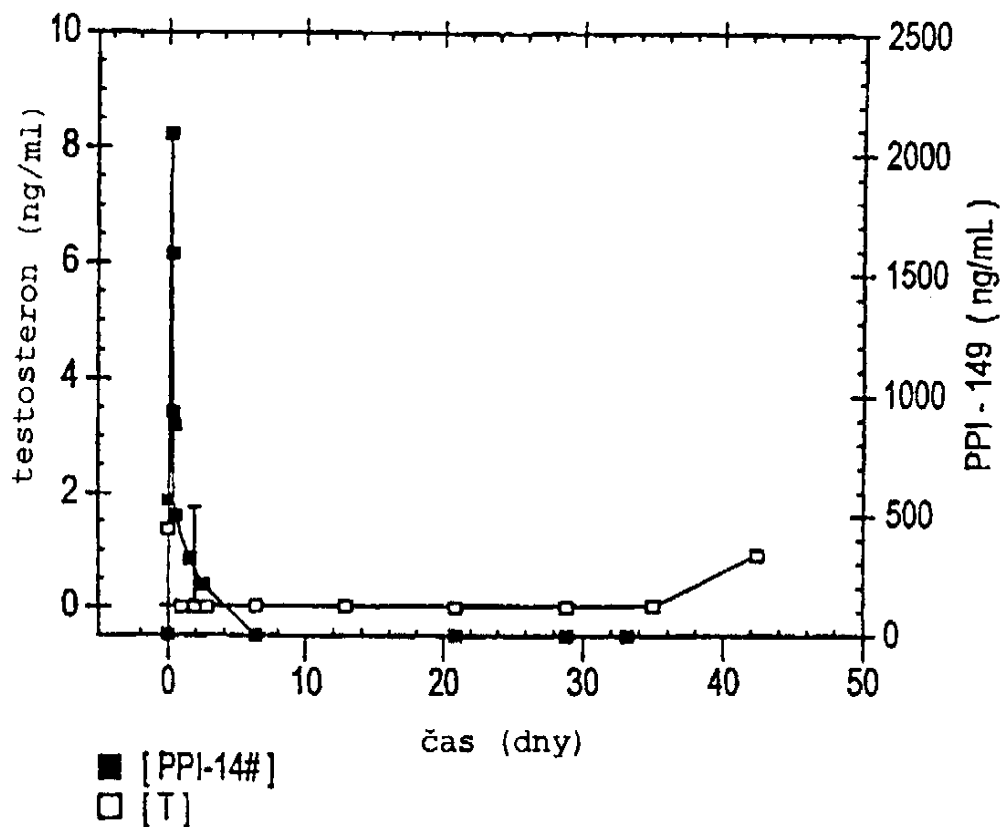
39. Použití podle nároku 32, kde makromolekulární nosič je aniontový derivát polyalkoholu nebo jeho fragment.

40. Použití podle nároku 32, kde makromolekulární nosič je aniontový derivát polysacharidu nebo jeho fragment.
- 5 41. Použití podle nároku 32, kde makromolekulární nosič je karboxymethylcelulóza nebo její fragment nebo derivát.
- 10 42. Použití podle nároku 32, kde makromolekulární nosič je vybrán ze skupiny zahrnující algin, alginát, aniontové acetátové polymery, aniontové akrylové polymery, xanthamové gummy, aniontové deriváty karagenanu, aniontové deriváty polygalakturonové kyseliny, sodnou sůl glykolátu škrobu a jejich fragmenty, deriváty a farmaceuticky přijatelné soli.
- 15 43. Použití podle nároku 32, kde farmaceutická kompozice se aplikuje subjektu parenterální cestou.
44. Použití podle nároku 32, kde farmaceutická kompozice se aplikuje subjektu orálně.
45. Použití podle nároku 32, kde farmaceutická kompozice se aplikuje subjektu intramuskulární injekcí nebo podkožní/intradermální injekcí.
- 20 46. Použití podle nároku 32, kde hormonálně závislé zhoubné bujení je zhoubné bujení prostaty.

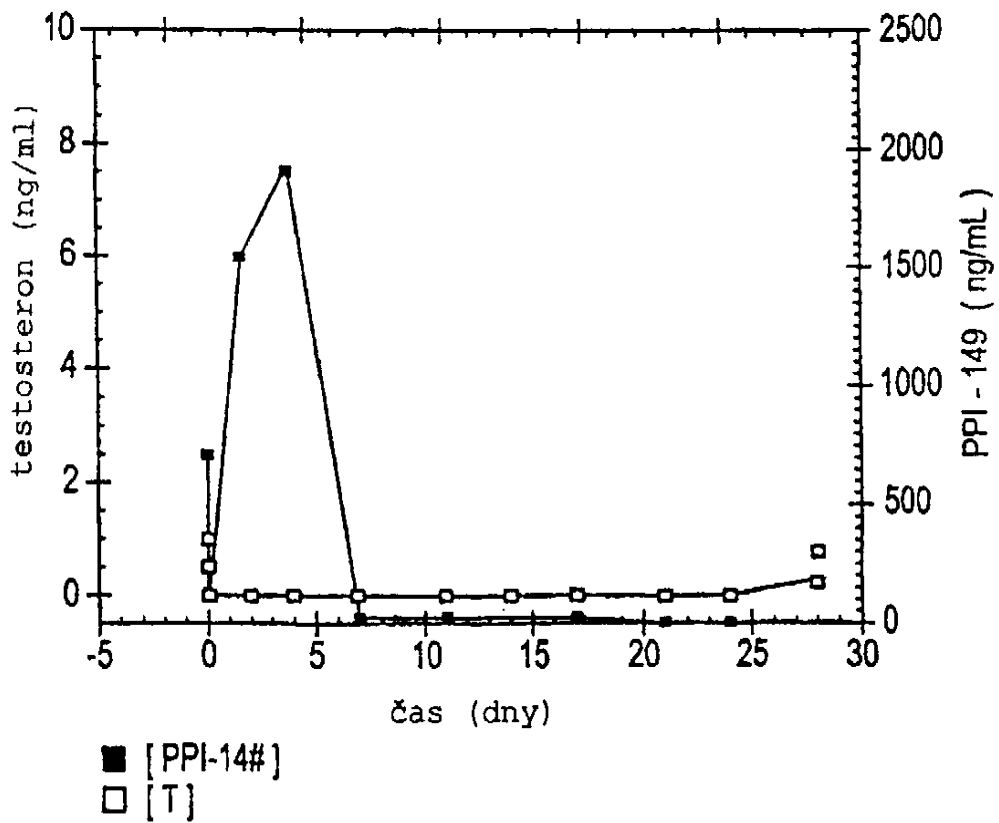
25

5 výkresů

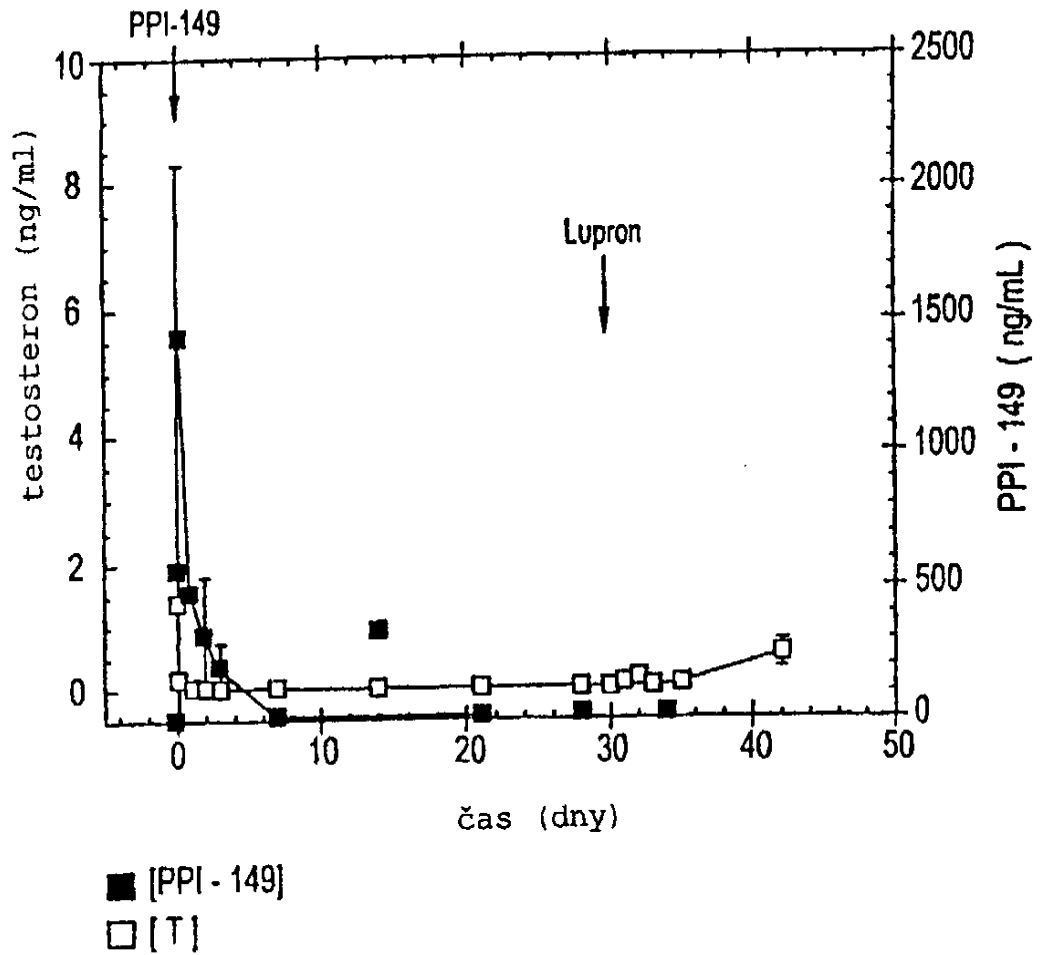
Obrázek č. 1A



Obrázek č. 1B

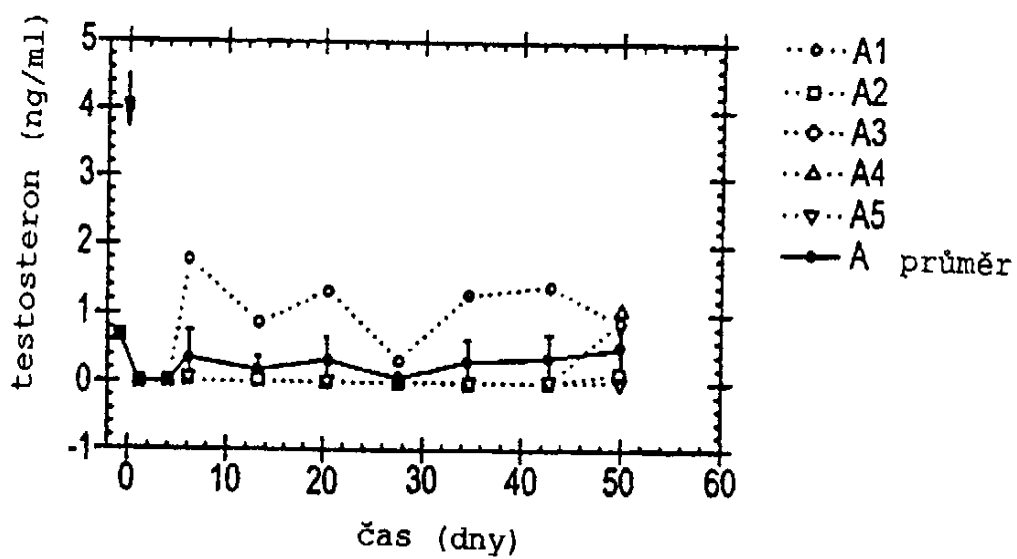


Obrázek č. 2

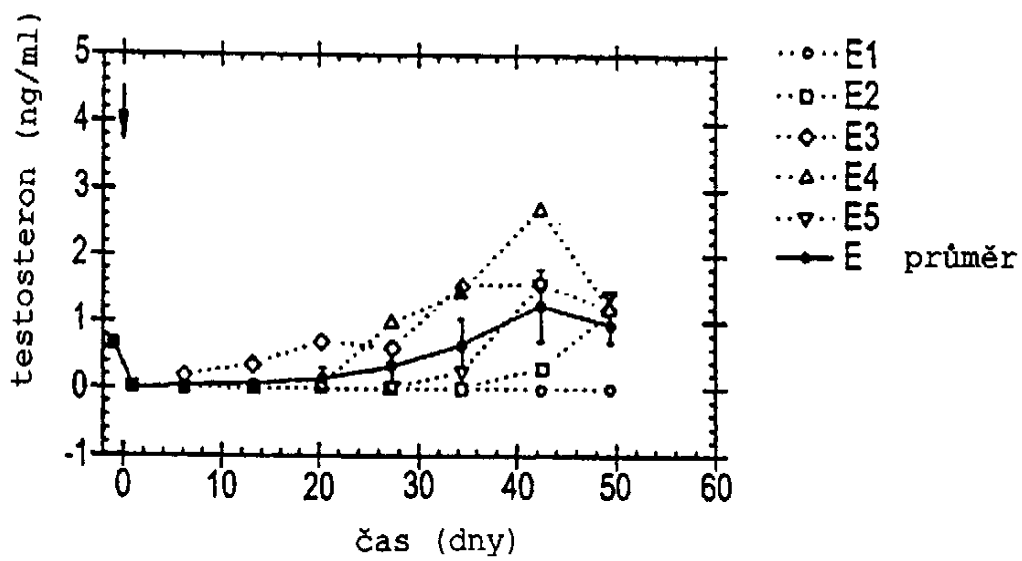




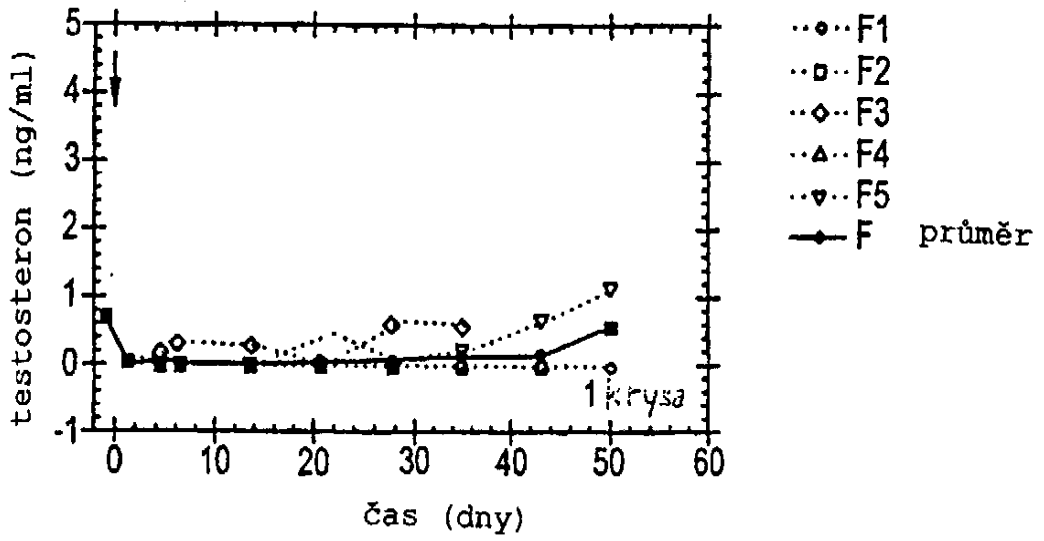
Obrázek č. 3A



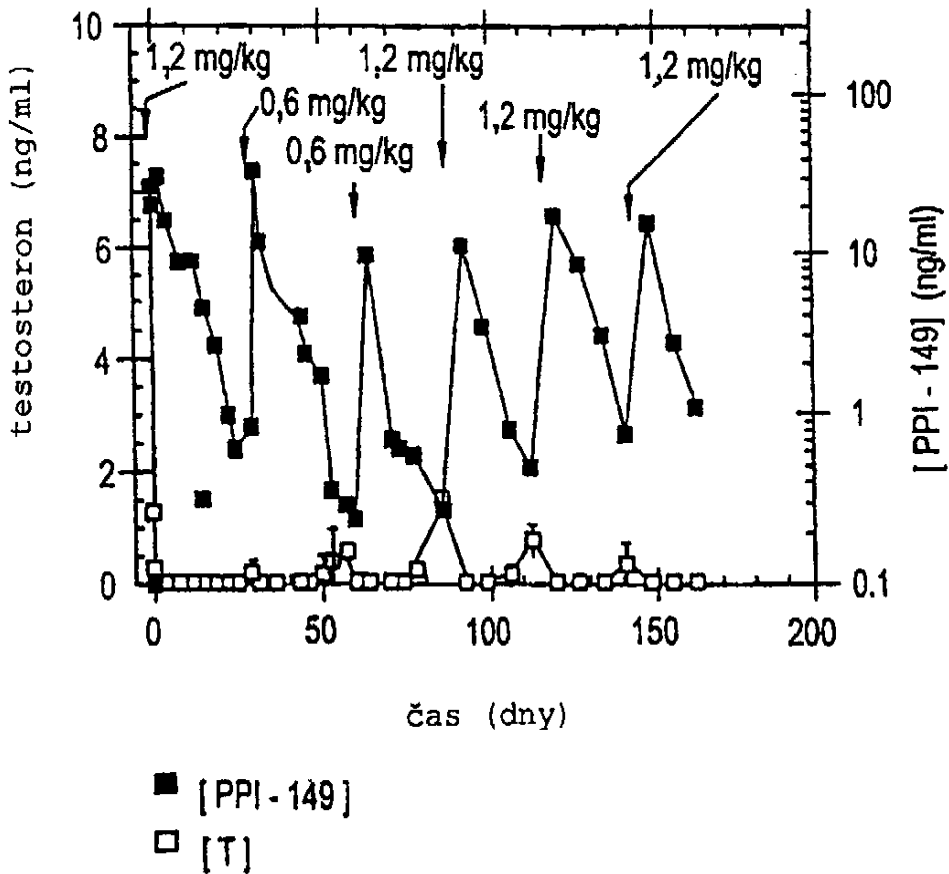
Obrázek č. 3B



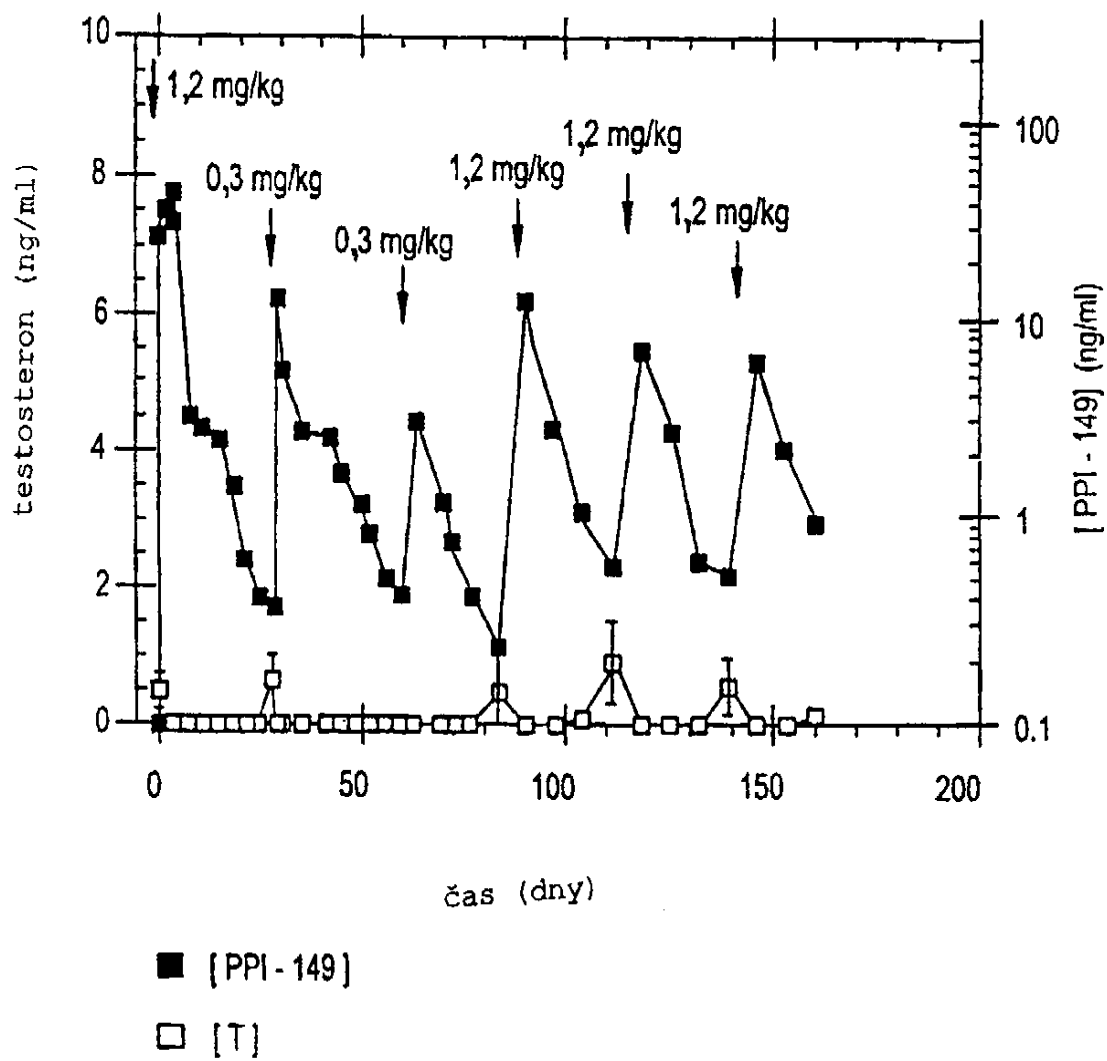
Obrázek č. 3C



Obrázek č. 4



Obrázek č. 5



čas (dny)

■ [PPI-149]

□ [T]

Konec dokumentu