

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 038010

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.06.22

(21) Номер заявки
202000016

(22) Дата подачи заявки
2020.01.20

(51) Int. Cl. C07K 7/06 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

(54) СТАБИЛЬНЫЕ ЯНТАРНОКИСЛЫЕ СОЛИ ГЕКСАПЕПТИДА

(43) 2021.06.18

(96) 2020000005 (RU) 2020.01.20

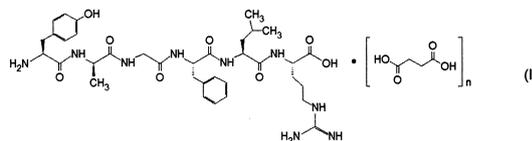
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ООО "ПРОМОМЕД РУС" (RU)

(72) Изобретатель:
Виноградов Валентин Антонович,
Белый Петр Александрович (RU)

(74) Представитель:
Томашевская Н.А. (RU)

(56) RU-C1-2672888
RU-C2-2413528
RU-C2-2198641

(57) Изобретение относится к области фармакологии и медицины, в частности к новым стабильным янтарнокислым солям гексапептида общей формулы (I)



где n=0,5 или 1, для приготовления фармацевтических композиций, пригодных для лечения, в частности, синдрома сухого глаза.

B1

038010

038010

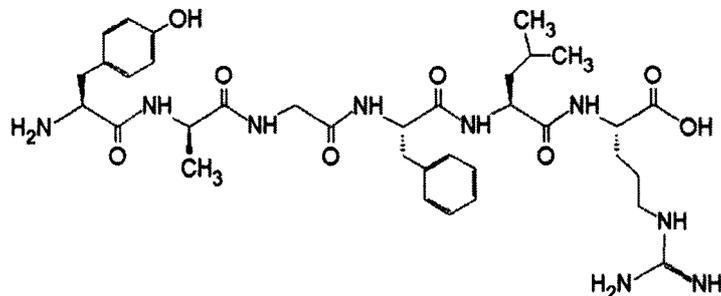
B1

Область изобретения

Изобретение относится к области фармакологии и медицины, в частности к стабильным янтарно-кислым солям гексапептида Н-Тур-D-Ала-Гли-Фе-Лей-Арг-ОН для использования в качестве фармацевтической субстанции в составе лекарственных средств.

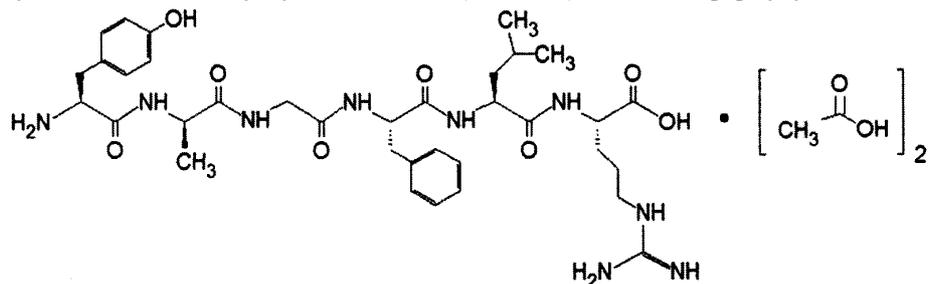
Сведения о предшествующем уровне техники

Известен синтетический гексапептид, имеющий химическую формулу



что соответствует аминокислотной последовательности Н-Тур-D-Ала-Гли-Фе-Лей-Арг-ОН, или в однобуквенном обозначении YdAGFLR. Синтетический гексапептид является модификацией природного пентапептида лей-энкефалина Н-Тур-Гли-Гли-Фе-Лей-ОН и обладает активностью агониста дельта-опиоидных рецепторов. Из-за наличия остатка аргинина в составе молекулы гексапептид является сильным основанием (изоэлектрическая точка рН 9,6), поэтому его использование в качестве фармацевтической субстанции в интервале физиологических рН 5,5-7,7 требует предварительного получения соли с подходящей нетоксичной кислотой.

Единственной известной фармацевтической субстанцией на основе указанного гексапептида является соль с двумя эквивалентами уксусной кислоты (диацетат), имеющая формулу



и используемая для производства лекарственных средств под международным непатентованным названием (МНН) "тирозил-D-аланил-фенилаланил-лейцил-аргинина диацетат" или сокращенным торговым названием "даларгин". Указанная субстанция (обозначенная здесь и далее как "диацетат гексапептида" или даларгин) входит в состав коммерчески доступных средств лечения язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, панкреатита и панкреонекроза. Применение диацетата гексапептида (даларгина) в составе лекарственных средств раскрыто в следующих патентах РФ (№№): 2032422, 2241488, 2198641, 2104717, 2306146, 2261721, 2432922, 2644285, 2405582, 2381034, 2323019, 2294746, 2254890, 2614105, 2488391, 2188675, 2594430, 2341282, 2396963, 2413528, 2270025, 2351334, 2343885, 2405534, 2363455, 2515550, 2180598, 2635083, 2436588, 2473325, 2144831, 2646569, 2200026, 2146530, 2155608, 2185176, 2139725, 2228762, 2185849, 2496493, 2366417, 2017488, 2167671, 2521199, 2045949, 2164153, 2181564, 2284192, 2290203, 2286793, 2366432, 2299065, 2429002, 2196603, 2142814, 2285522, 2203693, 2230549, 2180591, 2142736, 2113856, 2217139, 2266752, 2261722, 2362580, 2223741, 222814869, 2217186, 2266130, 2326661, 2299742, 2218896, 2416398, 2318503, 2430753, 2299438, 2258529, 2099077, 2122415, 2261713, 2006039, 2366416.

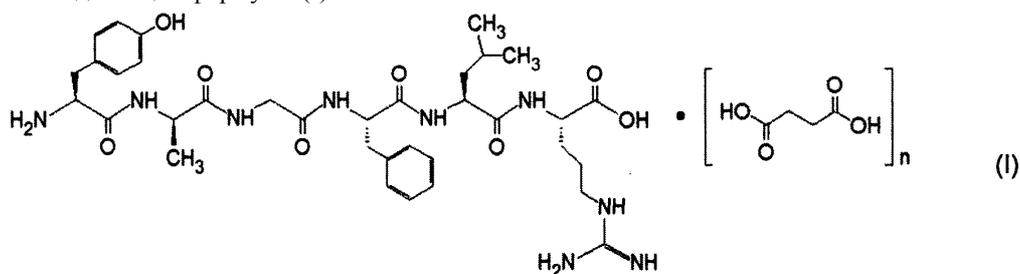
Основным недостатком диацетата гексапептида является его нестабильность, обусловленная наличием в его составе двух остатков уксусной кислоты. Только один из двух эквивалентов уксусной кислоты участвует в образовании соли гексапептида и образует прочную ионную связь с гексапептидом, тогда как второй остаток уксусной кислоты образует неустойчивый сольват и легко выделяется при незначительном повышении температуры и хранения. Поэтому диацетат гексапептида часто имеет запах высвобождающейся уксусной кислоты, о чем указывается в инструкции к препаратам даларгина. Диацетат гексапептида нестабильен в водном растворе. Приготовление раствора для инъекций сопровождается гидролизом диацетата гексапептида и высвобождением уксусной кислоты, вызывающей раздражение и болезненность в месте введения препарата, о чем как о побочном действии также указывают инструкции к препаратам даларгина. Нестабильность диацетата гексапептида затрудняет получение и хранение субстанции с заявленным соотношением гексапептида к уксусной кислоте, поэтому производители указывают широкий интервал допустимого содержания уксусной кислоты (от 7 до 14%) в препарате, несмотря на заявленное точное молярное соотношение 2:1, что означает, что содержание действующего вещества

(гексапептида) в составе субстанции варьируется в широких пределах от 86 до 93%. Это является существенным недостатком субстанции даларгина, так как неточность состава прямо влияет на точность дозирования лекарственного средства. Таким образом, существует необходимость в создании стабильной фармацевтической субстанции указанного гексапептида с воспроизводимым содержанием гексапептида в субстанции.

Сущность изобретения

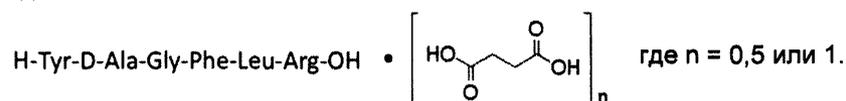
Задачей настоящего изобретения является создание стабильной фармацевтической субстанции гексапептида Н-Тир-D-Ала-Гли-Фе-Леу-Арг-ОН с фиксированным воспроизводимым содержанием гексапептида в субстанции.

Эта задача решается использованием в качестве фармацевтической субстанции янтарнокислых солей гексапептида общей формулы (I)

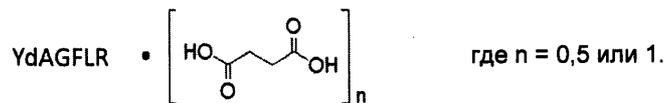


где $n=0,5$ или 1 .

Соединение формулы (I) может быть также записано с использованием трехбуквенных обозначений аминокислот в виде

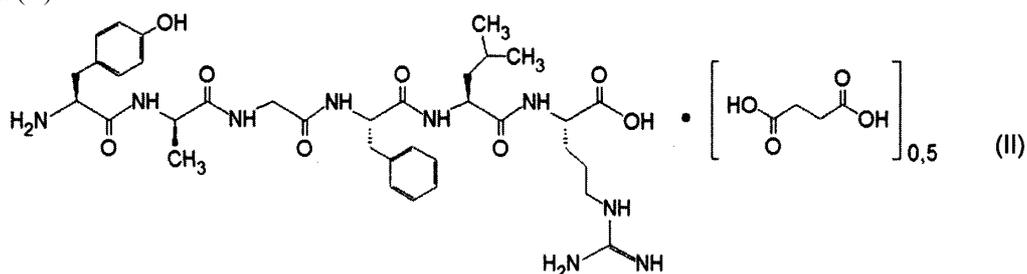


Соединение формулы (I) может быть также записано с использованием однобуквенных обозначений аминокислот в виде

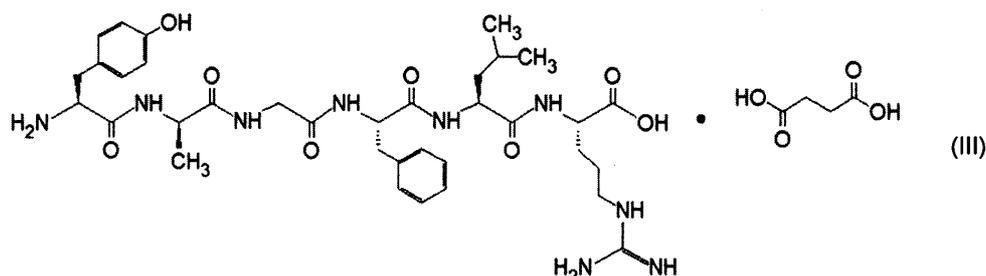


Янтарная кислота представляет собой нетоксичную фармацевтически приемлемую двухосновную кислоту, CAS No. 110-15-6, химическая формула $\text{HOOCCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, способную образовывать устойчивые индивидуальные янтарнокислые соли гексапептида YdAGFLR при молярных соотношениях гексапептида к янтарной кислоте 1:1 и 1:0,5.

В одном из воплощений настоящего изобретения соединение формулы (I) представляет собой соль, образованную основанием гексапептида и янтарной кислотой в молярном соотношении 1:0,5 ($n=0,5$), формула (II):



В другом воплощении настоящего изобретения соединение формулы (I) представляет собой соль, образованную основанием гексапептида и янтарной кислотой в молярном соотношении 1:1 ($n=1$), формула (III):



При осуществлении настоящего изобретения янтарнокислая соль пептидного соединения формулы

(II) может быть получена путем смешения янтарной кислоты с основанием гексапептида или его солями (трифторацетат или диацетат) в молярном соотношении 2:1 с последующей очисткой полученного соединения.

При осуществлении настоящего изобретения янтарнокислая соль пептидного соединения формулы (III) может быть получена путем смешения соединения формулы (II) с янтарной кислотой в молярном соотношении 1:1 с последующей очисткой полученного соединения.

При осуществлении настоящего изобретения соединение (II) может быть использовано при приготовлении фармацевтической субстанции, содержащей соединение (II) и янтарную кислоту в молярном соотношении от 1:0,01 до 1:1. При осуществлении настоящего изобретения, соединения (II) и (III) могут быть использованы в виде смеси в молярном соотношении от 0,05:0,95 до 0,95:0,05.

При осуществлении настоящего изобретения соединение общей формулы (I) используется в составе фармацевтических композиций (лекарственных средств) в качестве активной фармацевтической субстанции. Фармацевтическая композиция настоящего изобретения включает соединение общей формулы (I) и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В одном из воплощений настоящего изобретения фармацевтическая композиция включает соединение формулы (II). В другом из воплощений фармацевтическая композиция включает соединение формулы (III).

Фармацевтические композиции настоящего изобретения приготавливаются способами, хорошо известными из уровня техники, и в соответствии с признанными фармацевтическими процедурами, например, описанными в Фармацевтическом научном справочнике Ремингтона, 17-е издание, под ред. Альфонсо Р. Дженнаро, Мак Паблишинг Компании, Истон, Пенсильвания, 18-е издание (Remington's Pharmaceutical Sciences, seventeenth edition, ed. Alfonso R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, Pa., Eighteenth edition, 1990).

Фармацевтические композиции настоящего изобретения содержат от 0,01 до 10 мг соединения общей формулы (I) в единичной дозированной лекарственной форме. В одном из воплощений настоящего изобретения единичная дозированная лекарственная форма представляет собой одну ампулу лиофилизата соединения общей формулы (I) для приготовления раствора. Указанный раствор может быть использован для внутривенного, внутримышечного, подкожного введения, а также парентерального и наружного введения. В другом из воплощений единичная дозированная лекарственная форма представляет собой одну ампулу раствора соединения общей формулы (I) для внутривенного, внутримышечного и подкожного введения.

Термин "фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество" обозначает вещества неорганического или органического происхождения, используемые в процессе производства, изготовления лекарственных препаратов для придания им необходимых физико-химических свойств. Перечень вспомогательных веществ указан в национальных фармакопеях (РФ, Eur.Ph., Br.Ph., USP, JP) и справочниках (Physician's Desk Reference, Vidal, Rote Liste, Fiedler Encyclopedia of Excipients, Japanese Pharmaceutical Excipients, Handbook of Pharmaceutical Excipients, Inactive Ingredients Guide's of the FDA). Неэсклюзивные примеры таких вспомогательных веществ включают желатин, арабийскую камедь, лактозу, микрокристаллическую целлюлозу, крахмал, натрия крахмал гликолят, кальция гидрофосфат, магния стеарат, тальк, коллоидный диоксид кремния и подобные материалы, стабилизаторы, смачивающие соединения, эмульгаторы, ароматизаторы, буферные компоненты, связующие соединения, дезагреганты, лубриканты, скользящие соединения, антиадгезивные соединения, пропелленты, антимикробные агенты и антиоксиданты. Вода для инъекций и вода очищенная являются предпочтительными фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами настоящего изобретения. В интервале терапевтически эффективных концентраций соединения общей формулы (I) водные растворы являются гипотоническими, поэтому вспомогательное вещество нормализующее или повышающее тоничность раствора является важным вспомогательным компонентом в составе фармацевтических композиций настоящего изобретения. Неэсклюзивными примерами веществ модифицирующих тоничность растворов являются натрия хлорид, магния хлорид, маннитол, декстроза и их смеси. Содержание вспомогательного вещества в фармацевтической композиции настоящего изобретения может составлять от 0,100 до 99,999%.

В одном из воплощений настоящего изобретения фармацевтическая композиция представляет собой стабильный водный раствор для инъекций, содержащий соединение формулы (II) и хлорид натрия при следующих соотношениях, мас. %:

Соединение формулы (II)	0,01 – 1,00 %
Натрия хлорид	0,9 %
Вода для инъекций	до 100 %

В другом воплощении настоящего изобретения фармацевтическая композиция представляет собой стабильный водный раствор для инъекций, содержащий соединение формулы (III) и хлорид натрия при следующих соотношениях, мас. %:

Соединение формулы (III)	0,01 – 1,00 %
Натрия хлорид	0,9 %
Вода для инъекций	до 100 %

Указанные композиции могут быть приготовлены в промышленных условиях или непосредственно перед введением пациенту, нуждающемуся в этом, путем растворения лиофилизата соединения (II) или (III) в физиологическом растворе. Дополнительно композиции могут содержать вспомогательные вещества, поддерживающие pH композиции в интервале от 5,0 до 8,0. Примеры таких веществ включают без ограничения янтарную кислоту и другие органические нетоксичные кислоты, а также органические и неорганические основания.

Техническим результатом настоящего изобретения является высокая стабильность фармацевтической субстанции в виде янтарнокислой соли, в сравнении с диацетатом, проявляющаяся как повышение срока годности фармацевтической субстанции и приготовленного на его основе лекарственного средства при использовании изобретения.

Следующие примеры демонстрируют изобретение. Примеры иллюстрируют изобретение и не предназначены для ограничения объема изобретения тем или иным образом.

Пример 1.

Характеристики соединений (II) и (III) в сравнении с диацетатом гексапептида (даларгином) представлены в табл. 1.

Таблица 1

Характеристика	Формула	Доля гексапептида, %	Брутто-формула	Мол. масса, г/моль
Даларгин	$C_{35}H_{57}N_9O_8 \times 2H_3CCOON$	85,8	$C_{39}H_{59}N_9O_{12}$	845,9
Соединение (II)	$C_{35}H_{57}N_9O_8 \times (HOCC_2H_4COON)_{0,5}$	92,5	$C_{37}H_{54}N_9O_{10}$	784,9
Соединение (III)	$C_{35}H_{57}N_9O_8 \times HOCC_2H_4COON$	86,0	$C_{39}H_{57}N_9O_{12}$	843,9

Табл. 1 показывает, что соединения настоящего изобретения отличаются по химической структуре, молекулярной массе и содержанию гексапептида в составе соединений по сравнению с веществом сравнения даларгином. Соединение (II) содержит 92,5% активного гексапептида, тогда как диацетат гексапептида только 85,8% (меньше на 6,5%).

Фиг. 1 демонстрирует четкие различия в характеристиках спектров 1H ЯМР (А) диацетата гексапептида (даларгина) и (Б) соединения (II). Спектр 1H ЯМР соединения (II) в $DMSO-d_6$ содержит сигнал $-CH_2CH_2-$ группы янтарной кислоты (синглет, химический сдвиг 2.30 ppm, $-CH_2CH_2-$), тогда как диацетат гексапептида содержит сигнал CH_3 -группы уксусной кислоты (синглет, химический сдвиг 1,87 ppm, CH_3 -).

Таким образом, соединения настоящего изобретения отличаются по химической структуре и свойствам от вещества сравнения даларгина.

Пример 2.

Способ получения соединения (II).

К 0,730 кг Boc2-Тур-d-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg-ОН добавляют 3,400 кг охлажденной трифторуксусной кислоты и перемешивают до полного растворения осадка и получения раствора трифторацетата Н-Тур-d-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg-ОН. Отгоняют растворитель при постепенном повышении температуры бани от 20 до 40°C и остаточном давлении от 25 до 30 мБар. К полученным после упаривания маслообразным осадкам приливают диэтиловый эфир и выдерживают при перемешивании до выпадения однородного осадка, фильтруют, осадок промывают диэтиловым эфиром и сушат. Выход в пересчете на исходный Boc2-Тур-d-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg-ОН составляет 98%. Далее 0,650 кг трифторацетата Н-Тур-d-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg-ОН смешивают с 1% водным раствором ацетонитрила до полного растворения осадка и наносят на хроматографическую колонку (LPS-500, 70 мкм) ХК-23, промывают 20 л 3% раствора сукцината аммония и собирают элюент. Фракцию элюента, содержащую янтарнокислую соль Н-Тур-d-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg-ОН, соединение (II) упаривают при температуре бани от 40-45°C и давлении от 20 до 30 мБар. К маслообразному остатку добавляют 2,50 л воды очищенной и перемешивают до полного растворения, фильтруют, фильтрат собирают, замораживают и сушат в установке для лиофильной сушки ЛС-33 при температуре конденсатора -82°C и остаточном давлении не выше 215 мТорр. Выход соединения (II) 78%.

ЯМР 1H ($DMSO-d_6$, δ -шкала ppm): 0.85 (дд, 6H), 1.11 (д, 3H), 1.35-1.70 (уш.с, 7H), 2.30 (с, 2H), 2.55 (м, 1H), 2.82 (м, 2H), 2.97 (м, 2H), 3.07 (м, 2H), 3.5 (м, 1H), 3.65 (м, 1H), 3.88 (м, 1H), 4.20 (м, 2H), 4.54 (м, 1H), 6.65 (д, 2H), 6.97 (д, 2H), 7.24 (м, 5H), 7.37 (м, 5H), 8.0-8.5 (уш.с, 4H), 8.92 (уш.с, 1H). Элементный анализ для $C_{37}H_{54}N_9O_{10}$ (784,9): вычислено % С 56,62; Н 6,93; N 16,06; найдено % С 56,71; Н 7,01; N 16,01.

Пример 3.

Способ получения соединения (III).

10,0 г соединения (II) растворяют в воде очищенной, добавляют 1,50 г янтарной кислоты и перемешивают до полного растворения. Раствор замораживают и сушат в установке для лиофильной сушки ЛС-33 при температуре конденсора -82°C и остаточном давлении не выше 215 мТорр. Выход соединения (III) 98%. Элементный анализ для $\text{C}_{39}\text{H}_{57}\text{N}_9\text{O}_{12}$ (843,9): вычислено % С 55,50; Н 6,81; N 14,94; найдено % С 55,42; Н 6,78; N 14,99.

Пример 4.

Сравнительные исследования стабильности соединений.

Образцы соединений (II) и (III), а также вещество сравнения даларгин (диацетат гексапептида), в количестве 50 мг каждое, нагревали в вакууме при 100°C в течение 24 ч. Относительную потерю остатка кислоты (янтарной или уксусной) в составе указанных образцов после нагрева оценивали методом ^1H ЯМР (растворитель D_2O). Фиг. 2 показывает изменение соотношения сигнала остатка уксусной (CH_3 -группа, 3H, синглет, химический сдвиг δ -шкала 1,90 ppm) или янтарной кислоты ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, 4H, синглет, химический сдвиг δ -шкала 2,50 ppm) к референсному сигналу остатка аминокислоты лейцина (2CH_3 -, 6H, дублет, химический сдвиг 0,9 ppm) после нагрева в течение 24 ч. Результаты представлены в табл. 2 как потери остатков кислоты (уксусной или янтарной соответственно) в образцах после нагрева в процентах к исходному содержанию соответствующих остатков до нагрева.

Таблица 2

Вещество	Потери остатка кислоты после нагрева, %
Даларгин	-67
Соединение (II)	-3
Соединение (III)	-4

Табл. 2 показывает, что нагрев даларгина в течение 24 ч привел к потере 67% остатков уксусной кислоты, что соответствует превращению диацетата гексапептида с заявленным соотношением гексапептида к уксусной кислоте 1:2 в соединение с новым соотношением 1:1,34, что указывает на потерю подлинности фармацевтической субстанции. Нагрев соединений (II) и (III) в этих же условиях привел только к незначительной потере остатков янтарной кислоты, соответственно 3 и 4%, что не повлияло на подлинность фармацевтических субстанций. Таким образом, янтарнокислые соли гексапептида общей формулы (I) обеспечивают высокую стабильность фармацевтических субстанций гексапептида, намного превышающую стабильность вещества сравнения даларгина.

Пример 5.

Табл. 3 демонстрирует фармацевтическую композицию настоящего изобретения.

Таблица 3

Компонент композиции	Содержание, мас. %
Соединение (II)	0,01-1,00
Натрия хлорид	0,9
Вода для инъекций	до 100

При приготовлении композиции лиофилизат соединения (II) растворяют в физиологическом растворе в соотношениях, указанных в табл. 3, и полученный раствор разливают во флаконы или ампулы в атмосфере азота.

Пример 6.

Табл. 4 демонстрирует фармацевтическую композицию настоящего изобретения.

Таблица 4

Компонент композиции	Содержание, мас. %
Соединение (III)	0,01-1,00
Натрия хлорид	0,9
Вода для инъекций	до 100

При приготовлении композиции лиофилизат соединения (III) растворяют в физиологическом растворе и полученный раствор разливают в ампулы.

Пример 7.

Исследования стабильности фармацевтических композиций.

Образцы фармацевтических композиций (табл. 5) были подвергнуты испытаниям стабильности при 40°C и 75% относительной влажности в течение 6 месяцев. Стабильность оценивалась как постоянство состава композиции в интервале 95-105% от исходного.

Таблица 5

Композиция №№	Содержание ингредиентов, мас. %			
	Соединение (II)	Соединение (III)	NaCl	Вода
1	0,01	-	0,9	до 100
2	0,10	-	0,9	до 100
3	1,00	-	0,9	до 100
4	-	0,01	0,9	до 100
5	-	0,10	0,9	до 100
6	-	1,00	0,9	до 100

Испытания показали, что композиции №№1-6 были стабильны в условиях испытаний, и содержание гексапептида и остатка янтарной кислоты в указанных композициях не изменилось по данным анализа.

Пример 8.

Исследование эффективности соединений настоящего изобретения.

Эффективность соединений (II) и (III) была изучена на модели синдрома сухого глаза, как описано в Xiong C et al. A rabbit dry eye model induced by topical medication of a preservative benzalkonium chloride. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008, 49(5): 1850-6. В этой модели закапывание 0,1% раствора бензалкония хлорида (БХ) в один глаз кролика дважды в день вызывает синдром сухого глаза, сопровождающийся достоверным снижением производства слезы в тесте Шриммера. Оценка эффективности соединений настоящего изобретения производилась в тесте Шриммера по смачиванию фильтровальной бумаги Ватман 41, заложенной под нижнее веко на 5 мин. Белые кролики были распределены на группы (n=8) и получали дважды в день (8:00 и 14:00 ч) в течение 7 дней в правый глаз физ. раствор; 0,1% р-р БХ (контроль); р-р 0,1% БХ+0,1% соединение (II); р-р 0,1% БХ+0,1% соединение (III); р-р 0,1% БХ+фармацевтическую композицию содержащую 0,1% соединения (II); или р-р 0,1% БХ+фармацевтическую композицию содержащую 0,1% соединения (III). Тест Шриммера был произведен на 8-й день. Результаты теста представлены в табл. 6 как среднее \pm средняя ошибка длины увлажненной дорожки в мм. Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

Таблица 6

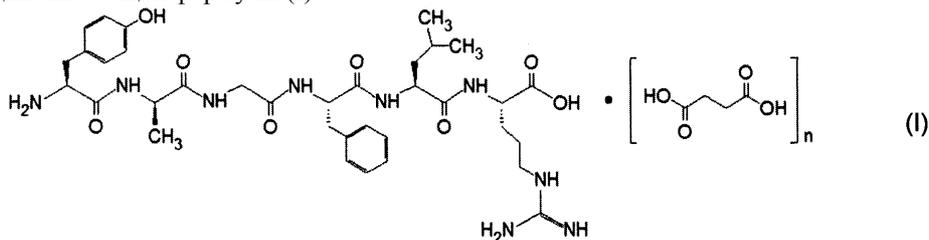
Группа	Тест Шриммера, мм
Физ. р-р	9,1 \pm 0,7
0,1% р-р БХ (контроль)	4,8 \pm 0,5 [#]
0,1% БХ + 0,1% соединение (II)	8,5 \pm 0,5 [*]
0,1% БХ + 0,1% соединение (III)	7,5 \pm 0,6 [*]
0,1% БХ + 0,1% соединение (II) + 0,9% NaCl	8,1 \pm 0,7 [*]
0,1% БХ + 0,1% соединение (III) + 0,9% NaCl	7,8 \pm 0,8 [*]

*достоверное отличие от контроля (p<0,05); #достоверное отличие от физ. р-ра (p<0,05)

Результаты теста Шриммера показывают, что введение 0,1% БХ вызывает сниженную продукцию слезной жидкости (синдром сухого глаза). Капельное введение растворов соединений (II) и (III), а также фармацевтических композиций на их основе достоверно улучшало секрецию слезной жидкости, нарушенную введением БХ. Таким образом, соединения (II) и (III) индивидуально и в составе фармацевтических композиций были эффективны для лечения синдрома сухого глаза при введении в форме раствора.

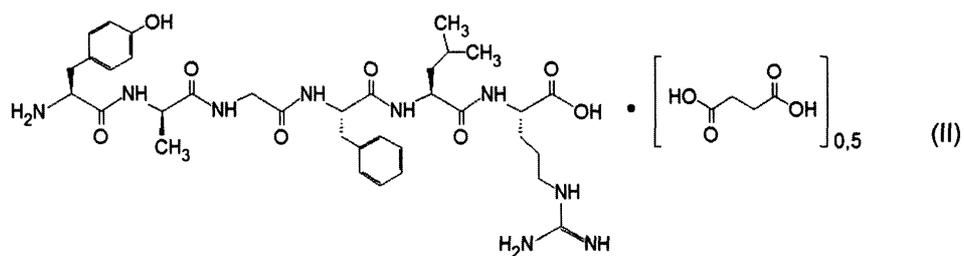
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение общей формулы (I)

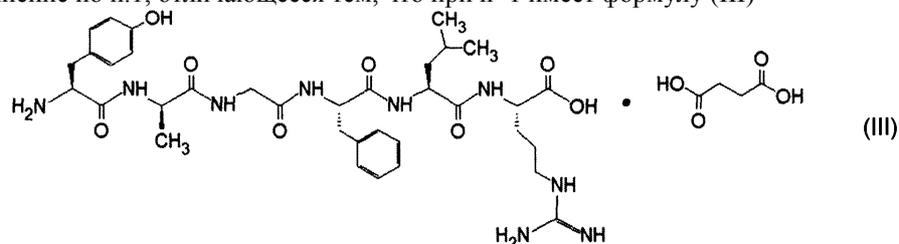


где n=0,5 или 1.

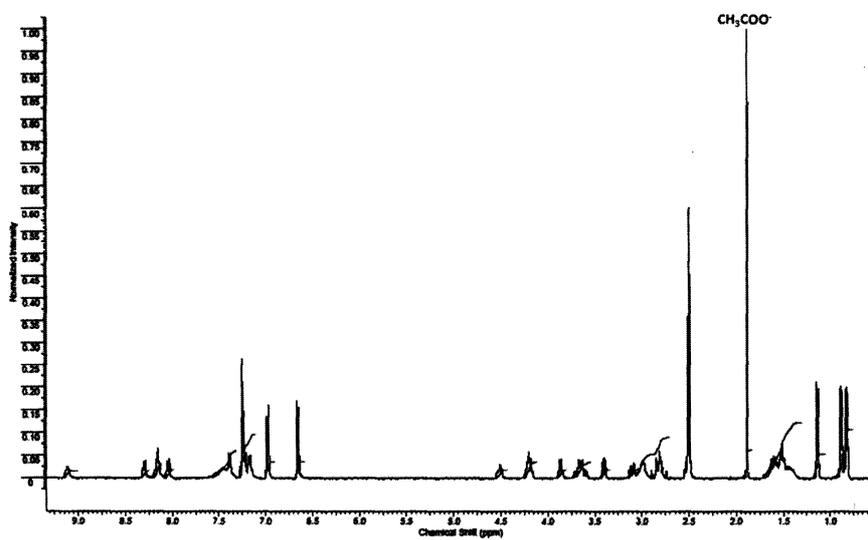
2. Соединение по п.1, отличающееся тем, что при n=0,5 имеет формулу (II)



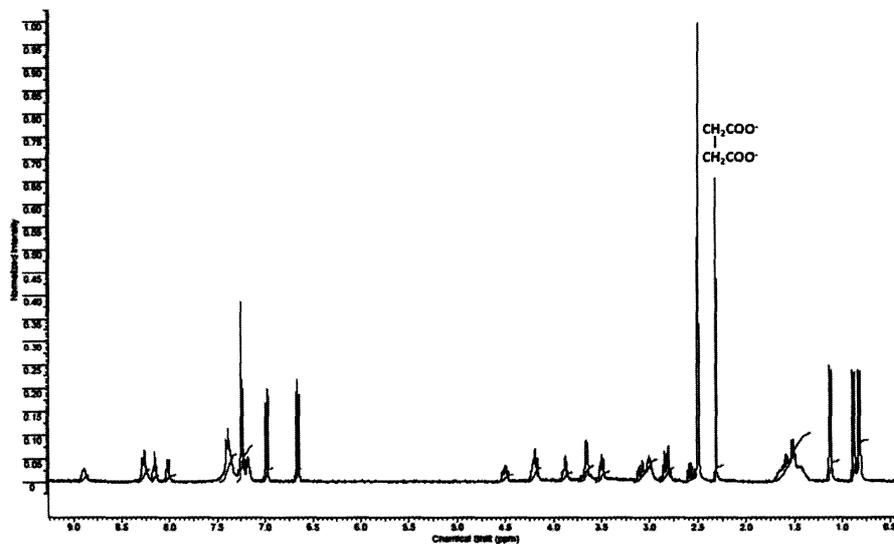
3. Соединение по п.1, отличающееся тем, что при $n=1$ имеет формулу (III)



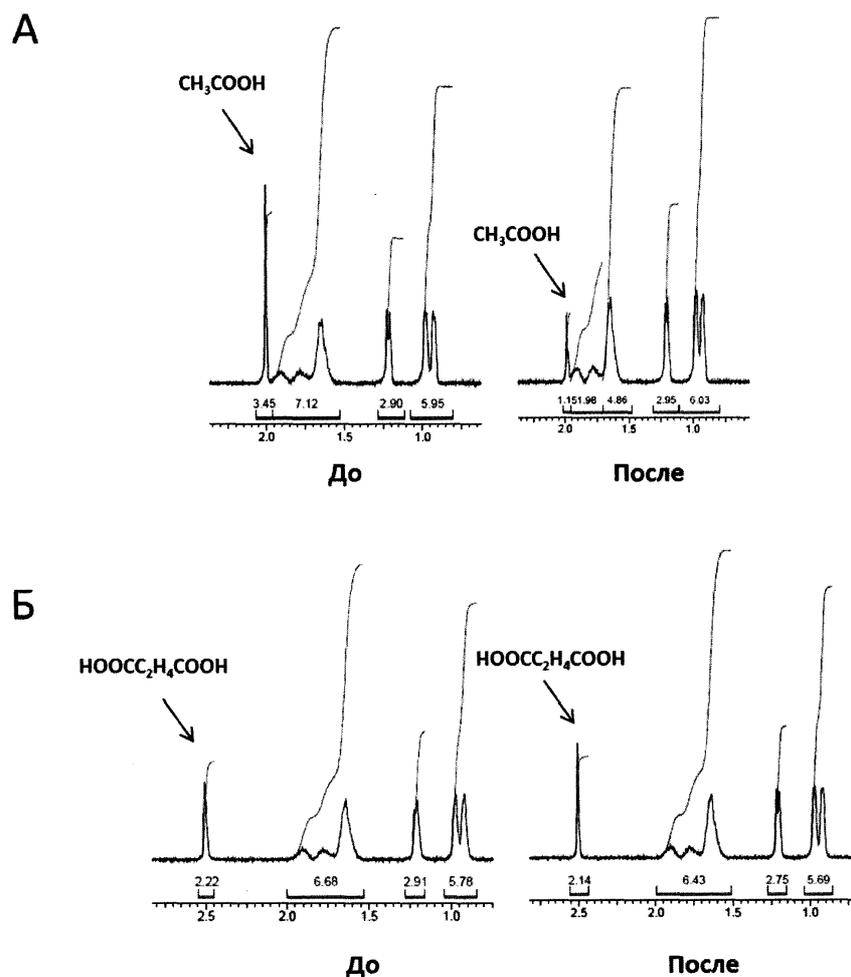
А



Б



Фиг. 1



Фиг. 2

