



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106456705 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(21)申请号 201580032022.9

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

(22)申请日 2015.06.03

代理人 刘蕾

(30)优先权数据

62/012,523 2014.06.16 US

(51)Int.Cl.

A61K 38/09(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.12.14

A61K 9/02(2006.01)

A61K 47/12(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/033951 2015.06.03

A61K 47/44(2017.01)

A61P 15/08(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/195333 EN 2015.12.23

(71)申请人 硕腾服务有限责任公司

地址 美国新泽西州

(72)发明人 K.L.芬斯特拉 L.罗 S.C.苏切塔

N.A.威克斯 K.P.科尔巴萨

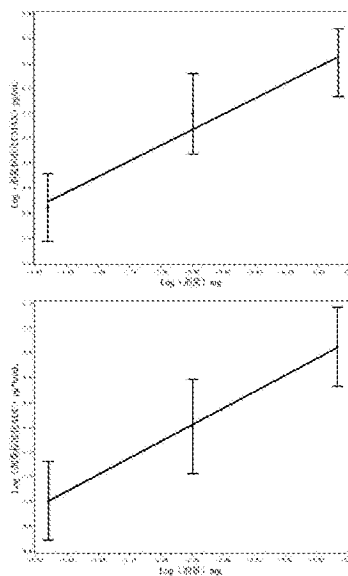
权利要求书2页 说明书13页 附图4页

(54)发明名称

包含GnRH的阴道内调配物

(57)摘要

本发明提供一种阴道内调配物,其包含呈所述调配物的10w/w%到20w/w%的量的羧酸;熔融温度在30°C与38°C之间的油性基质;GnRH或其类似物,其呈与10 μg与600 μg之间的GnRH量等效的量。还提供一种使用所述调配物在反刍动物中诱导排卵的方法。



1. 一种阴道内调配物,其包含:
 - a) 10%-20% (w/w) 羧酸;
 - b) Tm在约30°C与38°C之间的油性基质;以及
 - c) GnRH或GnRH类似物,其呈与10 μ g与600 μ g之间的GnRH量等效的量。
2. 根据权利要求1所述的阴道内调配物,其中所述GnRH或GnRH类似物以与140 μ g与550 μ g之间的GnRH量等效的量存在。
3. 根据权利要求1所述的阴道内调配物,其中所述GnRH或GnRH类似物以与140 μ g与500 μ g之间的GnRH量等效的量存在。
4. 根据权利要求1所述的阴道内调配物,其中所述GnRH或GnRH类似物以与140 μ g与300 μ g之间的GnRH量等效的量存在。
5. 根据权利要求1所述的阴道内调配物,其中所述GnRH或GnRH类似物以与140 μ g与200 μ g之间的GnRH量等效的量存在。
6. 根据权利要求1所述的阴道内调配物,其中所述GnRH或GnRH类似物以与200 μ g与500 μ g之间的GnRH量等效的量存在。
7. 根据权利要求1所述的阴道内调配物,其中所述GnRH或GnRH类似物以与200 μ g与400 μ g之间的GnRH量等效的量存在。
8. 根据权利要求1所述的阴道内调配物,其中所述GnRH或GnRH类似物以与200 μ g与300 μ g之间的GnRH量等效的量存在。
9. 根据权利要求1所述的阴道内调配物,其中所述GnRH或GnRH类似物以与280 μ g与550 μ g之间的GnRH量等效的量存在。
10. 根据权利要求1所述的阴道内调配物,其中所述GnRH或GnRH类似物以与280 μ g与500 μ g之间的GnRH量等效的量存在。
11. 根据权利要求1所述的阴道内调配物,其中当向雌性反刍动物肌肉内投与所述GnRH或其类似物时,其以所述GnRH或其类似物的ED70的140%与250%之间的量存在。
12. 根据权利要求11所述的阴道内调配物,其中所述雌性反刍动物为牛、绵羊或山羊。
13. 根据权利要求12所述的阴道内调配物,其中所述雌性反刍动物为牛。
14. 根据权利要求1到13中任一权利要求所述的阴道内调配物,其中当阴道内投与时,所述GnRH或其类似物以ED70或更高的剂量存在。
15. 根据权利要求1到14中任一权利要求所述的阴道内调配物,其中所述羧酸选自自由以下组成的群组:柠檬酸、丁二酸、酒石酸、乙醇酸、抗坏血酸、乳酸、天冬氨酸、乙二胺四乙酸二钾或其组合。
16. 根据权利要求15所述的阴道内调配物,其中所述羧酸为柠檬酸。
17. 根据权利要求1到16中任一权利要求所述的阴道内调配物,其中所述羧酸以所述调配物的12w/w%-15w/w%的量存在。
18. 根据权利要求1到17中任一权利要求所述的阴道内调配物,其中所述油性基质的OHV低于30。
19. 根据权利要求1到18中任一权利要求所述的阴道内调配物,其中所述油性调配物的OHV在1与20之间。
20. 根据权利要求1到19中任一权利要求所述的阴道内调配物,其中所述油性调配物的

OHV在5与15之间。

21. 一种在雌性反刍动物中诱导排卵的方法,所述方法包含向所述雌性反刍动物投与根据权利要求1到10和14到20中任一权利要求所述的阴道内调配物。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述反刍动物为牛。

23. 一种制造根据权利要求1到20中任一权利要求所述的阴道内调配物的方法,所述方法包含:

a) 使所述GnRH或GnRH类似物与所述羧酸掺合;

b) 研磨所述GnRH或GnRH类似物和所述羧酸;

c) 将所述经研磨GnRH或GnRH类似物和所述经研磨羧酸分散于所述油性基质中。

24. 一种根据权利要求23所述的方法制造的阴道内调配物。

包含GnRH的阴道内调配物

技术领域

[0001] 本发明涉及反刍动物中的排卵调节领域。

背景技术

[0002] 奶牛的运作需要针对理想效能及经济产量的高效育种方案。牛奶产量取决于处于开始妊娠、分娩及哺乳期的运作中的母牛。分娩之后，母牛可以产奶持续超过两百天。然而，分娩后约150天之后，牛奶产量通常会快速下降。缩短分娩-泌乳周期中的产犊与后续妊娠之间的时间段会由此增加作为母牛对乳制品运作的价值的牛奶产量。另外，在第一次产犊之后三十六个月，母牛的乳制品价值通常会快速下降。就饲料、开销及其它成本而言，增加此时间期间母牛的妊娠次数会使动物的投资回报达到最大。

[0003] 高牛奶产量和高繁殖力的目标可能难以同时实现。高牛奶产量会导致动情持续时间缩短、无动情体征的排卵以及与繁殖力直接相关的无排卵病状，使得基本生殖管理工具、动情检测继之以人工授精(AI)更加难以进行有效地实施。生殖管理的效率可以通过使用调节和控制动情周期和排卵的激素来增加。奶牛中的动情周期可以通过例如促性腺激素释放激素(GnRH)、黄体激素(LH)、前列腺素F_{2a}、雌激素、孕酮以及这些激素中的某些的合成类似物来操控。

[0004] **OVSYNCH®**处理方案为调节母牛动情周期的三次注射方案。在母牛的育种周期的任意阶段将GnRH注射于母牛中。GnRH刺激LH，所述LH刺激旧卵泡排卵和新卵泡生长。在注射GnRH之后七天进行使用前列腺素的第二次注射，实现任意活性黄体的变性(其将预防母牛排卵)。两天后，投与第二次GnRH注射，使得卵从通过第一次GnRH注射刺激的卵泡得到释放，即，排卵。授精的理想时间为第三次注射之后16小时，而奶牛的繁殖力会保持24小时。**OVSYNCH®**处理方案使得排卵在同时经处理的奶牛中得到同步。然而，在相对精确的排程下，**OVSYNCH®**处理方案需要对每只母牛进行四次处理，会增加处理成本并且使得大数目的动物的处理困难或不可行。由于GnRH成本相对较高且阴道内所投与的GnRH的生物可用性相对较低，使得难以进行调节**OVSYNCH®**处理方案的工作。

发明内容

[0005] 本发明涉及反刍动物中的排卵调节领域。

[0006] 在某些实施例中提供阴道内调配物，其包括呈10w/w%到20w/w%的量的羧酸；熔融温度在30℃与38℃之间的油性基质以及GnRH或其类似物，其呈与约10μg与600μg之间的GnRH等效的量。

[0007] 在某些实施例中，GnRH或其类似物以与140μg与550μg之间的GnRH量等效的量；或以与140μg与500μg之间的GnRH量等效的量；或以与140μg与300μg之间的GnRH量等效的量；或以与140μg与250μg之间的GnRH量等效的量；或以与140μg与200μg之间的GnRH量等效的量；或以与200μg与500μg之间的GnRH量等效的量；或以与200μg与400μg之间的GnRH量等效的量；或以与200μg与300μg之间的GnRH量等效的量；或以与280μg与550μg之间的GnRH量等

效的量;或以与280 μ g与500 μ g之间的GnRH量等效的量;或以与280 μ g与400 μ g之间的GnRH量等效的量存在。

[0008] 在某些实施例中,当向雌性反刍动物肌肉内投与GnRH或其类似物时,其以GnRH或其类似物的ED70的140%与250%之间的量存在。

[0009] 在某些实施例中,羧酸为柠檬酸、丁二酸、酒石酸、乙醇酸、抗坏血酸、乳酸、天冬氨酸、乙二胺四乙酸二钾或其组合。油性基质的OHV可以低于30,优选地,低于20、更优选地,低于15,例如,在5与15之间。

[0010] 在某些实施例中,雌性反刍动物为牛类动物、山羊类动物或绵羊类动物。

[0011] 在某些方面中提供一种根据上述实施例中的任一项通过使GnRH或其类似物与羧酸掺合;研磨GnRH或其类似物和羧酸;并且将所研磨的GnRH或其类似物和所研磨的羧酸分散于油性基质中来制造调配物的方法。

[0012] 在另一方面中提供一种根据先前实施例中的任一项通过阴道内投与调配物来在动情间期的反刍动物中诱导排卵的方法。在某些方面中,阴道内调配物提供为多组分调配物的一部分,其还包含前列腺素F2 α 和有效剂量的前列腺素以及另一有效剂量的GnRH或其类似物。在某些方面中,多组分调配物处于阴道内装置中,所述装置被配置成在释放前列腺素F2 α 之前释放另一有效剂量的GnRH或其类似物6到10天,例如,7天、8天或9天。阴道内装置还可以被配置成在释放前列腺素F2 α 之后释放如本文所述的调配物约两天。在某些方面中,另一有效剂量的GnRH或其类似物可与上文所述的阴道内调配物相同。

附图说明

[0013] 图1a和1b展示用乙酸高那瑞林(gonadorelin acetate)阴道内处理的动物的AUC的最小平方平均值(+/-标准误差)。

[0014] 图2a和2b展示用盐酸高那瑞林阴道内处理的动物的AUC的最小平方平均值(+/-标准误差)。

具体实施方式

[0015] 定义

[0016] 为了更好地理解本发明,提供以下非限制性定义:

[0017] 术语“GnRH”是指反刍动物中所自然存在的GnRH形式。GnRH的实例包括(但不限于)牛GnRH、山羊GnRH、绵羊GnRH和其盐。GnRH为氨基酸序列为SEQ ID NO:1的十肽(pyro-EHWSYGLRPG-NH₂)。通常使用GnRH的乙酸盐、乙酸水合物及/或盐酸盐。

[0018] 如应用于GnRH或GnRH类似物的术语“ED70”是指GnRH或GnRH类似物的剂量,如可适用,当在动情周期的动情间期阶段中向反刍动物投与时,其在70%的牛类反刍动物中引起排卵。

[0019] 术语与一定GnRH量“等效的GnRH类似物的量”是指GnRH量与类似物效力的比。举例来说,效力比GnRH强50倍的2ng GnRH类似物等效于100ng GnRH。

[0020] 调配物

[0021] 本文中公开的调配物适用于向反刍动物,例如,牛类物种和绵羊类物种阴道内投与GnRH。诸位发明人已出人意料地并且意外地发现,本文中公开的调配物提供接近(例

如,70%-75%) 在肌肉内投与后获得的生物可用性的GnRH或GnRH类似物的生物可用性。使用本文中所公开的调配物获得的GnRH高效阴道内递送提供增加的阴道内递送GnRH或GnRH类似物的经济性。另外,本文中所公开的调配物考虑到针对反刍动物中的动情周期同步和排卵诱导的“单触式”方案,亦即仅需要单次投与激素的方案的设计。

[0022] 提供增加的GnRH或GnRH类似物的生物可用性的调配物包括GnRH或GnRH类似物以及羧酸和油性基质。GnRH或GnRH类似物通常以与10 μ g与600 μ g之间的GnRH量等效的量存在。在某些实施例中,本发明的调配物含有GnRH或其类似物,GnRH或其类似物的量范围与140 μ g-600 μ g的GnRH量等效。在某些情况下,阴道内调配物中的GnRH或GnRH类似物的有效量可基于肌肉内投与时已知的有效GnRH量,针对投与阴道内调配物和肌肉内投与之后所获得的相应GnRH生物可用性进行调整。在牛类动物的情况下,举例来说,某些GnRH产品建议每只经肌肉内投与的动物100 μ g-200 μ g GnRH。对于提供的生物可用性为肌肉内投与GnRH后获得的生物可用性的75%的阴道内GnRH调配物而言,调配物将包括约133 μ g-266 μ g GnRH的等效物。此类调配物可由此提供每只经阴道内投与的动物例如140 μ g。

[0023] 当向一组动物阴道内投与时,调配物中所存在的GnRH或GnRH类似物的量优选产生同步排卵。因此,在不受理论束缚的情况下,当向雌性反刍动物肌肉内投与时,阴道内调配物可包括呈GnRH或GnRH类似物的ED70的140%与300%之间的量的GnRH或GnRH类似物。举例来说,当向雌性反刍动物肌肉内投与时,GnRH或其GnRH类似物可以与GnRH或GnRH类似物的ED70的140%-275%、140%-250%、140%-200%、180%-250%或200%-220%的GnRH量等效的量存在。

[0024] GnRH或GnRH类似物可以与140 μ g与550 μ g之间的GnRH量等效的量;或以与140 μ g与500 μ g之间的GnRH量等效的量;或以与140 μ g与300 μ g之间的GnRH量等效的量;或以与140 μ g与250 μ g之间的GnRH量等效的量;或以与140 μ g与200 μ g之间的GnRH量等效的量;或以与200 μ g与500 μ g之间的GnRH量等效的量;或以与200 μ g与400 μ g之间的GnRH量等效的量;或以与200 μ g与300 μ g之间的GnRH量等效的量;或以与280 μ g与550 μ g之间的GnRH量等效的量;或以与280 μ g与500 μ g之间的GnRH量等效的量;或以与280 μ g与400 μ g之间的GnRH量等效的量存在。

[0025] 阴道内GnRH调配物可包括GnRH和/或一种或多种GnRH盐和/或一种或多种GnRH类似物。GnRH盐包括例如(但不限于)GnRH盐酸盐、GnRH乙酸盐及GnRH乙酸四水合物。GnRH类似物包括例如(但不限于),亮丙立德(leuprolide;pyrGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NHEt;SEQ ID NO:2)、布舍瑞林(buserelin;pyrGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Tbu)-Leu-Arg-Pro-NHEt;SEQ ID NO:3)、德舍瑞林(deslorelin;pyrGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-NHEt;SEQ ID NO:4)和夫替瑞林(fertirelin;pyrGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-NHEt;SEQ ID NO:5)以及这些类似物的盐和/或水合物。优选的GnRH类似物为布舍瑞林。优选的布舍瑞林的剂量为等于GnRH量的10%的量。

[0026] GnRH类似物在本领域中为众所周知的。GnRH类似物的排卵诱导活性已很好地记载于可公开获得的来源,诸如Pubmed数据库中。此外,已研发出确定GnRH类似物的排卵诱导活性的适合模型。GnRH类似物的其它实例以及其排卵诱导活性公开在杜塔等人,《生物化学与生物物理研究通讯(Biochem Biophys Res. Commun.)》1978 1(2):382-390;Fujino等人,《生物化学与生物物理研究通讯(Biochem Biophys Res. Commun.)》1974 57(4):1248-1256;Dutta等人,《医药化学杂志(J Med. Chem.)》1978 21(10):1018-1024;Fujino等人,

《生物化学与生物物理研究通讯 (Biochem Biophys Res. Commun.)》1972 49 (3) :863-869 中。因此,仅需要常规实验来确定相关GnRH类似物的排卵诱导活性。

[0027] 多种油性基质适用于本文所述的GnRH阴道内调配物。通常,油性基质含有单酸甘油酯、二酸甘油酯以及三酸甘油酯的混合物。单酸甘油酯、二酸甘油酯以及三酸甘油酯的相对量以及脂肪酸尾部的长度会影响OHV值(游离羟基含量)。换句话说,OHV值提供关于油性基质中的单酸甘油酯、二酸甘油酯以及三酸甘油酯的相对量的某些信息。在某些实施例中,油性基质的OHV值低于30。因此,在不同实施例中,OHV值低于25、低于20、低于15、低于10或低于5。在一些实施例中,油性基质的OHV值在约5与约15之间。

[0028] 油性基质的实例为WITEPSOL®系列栓剂。WITEPSOL®H15栓剂的OHV值在5与15之间。H系列为羟值高达15的硬脂。其大部分由三酸甘油酯以及比例为最多15%的二酸甘油酯以及不超过1%的单酸甘油酯组成。其特征为熔融温度与固化温度之间的极小差距,仅具有后硬化现象的小倾向(最大值为1.5°C)。

[0029] WITEPSOL®W系列产品为羟值(OHV)为20-50的硬脂。其由三酸甘油酯(65%-80%)、二酸甘油酯(10%-35%)以及单酸甘油酯(1%-5%)的混合物组成。由于其组成,这些WITEPSOL级在熔点与固化点之间具有较大差距,其对骤冷较不敏感(更有弹性)、固化较为缓慢且可以容易用自动机且用小规模设备进行处理。偏甘油酯内含物还会减缓固体沉降并且促进可较不容易吸收的活性化合物的吸收。

[0030] 在某些方面中,油性基质的OHV值低于30。因此,OHV值可低于25、低于20、低于15、低于10或低于5。在一些方面中,油性基质的OHV值在约5与约15之间。

[0031] 油性基质的熔融温度还可以低于反刍动物的体温。油性基质的熔融温度还可以在例如30°C与40°C之间,例如30.5°C-32.5°C、32.5°C-34.5°C、34.5°C-36.5°C、36.5°C-38.5°C以及38.5°C-40°C范围内。

[0032] 不同羧酸适用于本文所述的GnRH阴道内调配物。例示性羧酸包括(但不限于)柠檬酸、丁二酸、酒石酸、乙醇酸、抗坏血酸、乳酸、天冬氨酸、乙二胺四乙酸二钾或其组合。通常, GnRH阴道内调配物含有约8w/w%-20w/w%羧酸(例如,9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%)。

[0033] GnRH阴道内调配物可通过将GnRH或GnRH类似物的固体形式和羧酸的固体形式分散于油性基质中来制备。可在分散于油性基质中之前对GnRH或GnRH类似物和/或羧酸进行处理(例如,研磨)以缩小粒度。

[0034] 可通过(但不限于)向一只或多只牛投与GnRH或其GnRH类似物(称为“GnRH-1”)、在其后5-9天内向牛投与前列腺素F_{2a},并且随后在投与前列腺素之后约30-72小时向牛投与第二剂量的GnRH或GnRH类似物(称为“GnRH-2”)来进行使牛中的排卵同步的方案。在不受理论束缚的情况下,投与GnRH-1会在大部分所处理的动物中诱导使卵泡波出现和卵泡生长模式标准化的优势卵泡排卵或黄体化。投与GnRH-2(诱导优势卵泡排卵)。所述GnRH阴道内调配物适用于GnRH-1和/或GnRH-2投与中的任一种或两种。

[0035] 本文所述的GnRH阴道内调配物可以用作多组分组合物的一部分。此类多组分可包含同步组分、前列腺素组分以及排卵诱导组分。本文所述的GnRH阴道内调配物由此适用作同步组分、排卵诱导组分或同步组分和排卵诱导组分这两者。按医师需要,多组分组合物可装载在被配置成用于递送治疗的阴道内装置中。阴道内递送装置可首先配置成例如同步组

分、前列腺素组分(递送同步组分之后6-10天)以及排卵诱导组分(递送前列腺素组分之后30-72小时)。

[0036] 在某些方面中,GnRH阴道内调配物用作多组分组合物的同步组分和排卵诱导组分。在同步组分之后约7天递送前列腺素组分,并且在前列腺素组分之后30-72小时递送排卵诱导组分。

[0037] 可适宜从被配置成用于定时递送不同组分的装置中投与多组分组合物。此类装置可含有例如一个或多个储槽和可编程处理单元。各个储槽可含有同步组分、排卵诱导组分以及前列腺素组分。在预定时间处,可编程处理单元实现在反刍动物的阴道中从装置的储槽释放适合组分。可编程处理单元通过储槽壁的破裂和挤压(例如,通过电力、机械力或渗透力)实现储槽的内含物到达装置以外的此类释放。

[0038] 所有这些公开案在本文中以全文引用的方式并入,其程度如同每一篇个别公开案具体并且单独说明为以引用方式并入。

[0039] 尽管本文中已参考特定实施例描述本发明,但应理解,这些实施例仅仅说明本发明的原理和应用。因此,应理解,在不脱离如由以下权利要求所界定的本发明的精神和范畴的情况下,可对说明性实施例作出诸多修改并且可设计出其它配置。

[0040] 在非限制性实例中进一步解释本发明。

[0041] 实例

[0042] 实例1:阴道内乙酸高那瑞林的生物可用性

[0043] 材料和方法

[0044] 动物和处理

[0045] 动物为成年哺乳期荷斯坦牛(holstein cattle)。其处于第一和第三产次之间,最少为分娩后50天并且并未妊娠。这些动物分组圈养在具有砂垫层的现代散养式畜舍乳品厂中且其每天产奶两次。在研究开始之前,根据具有单向处理结构的随机化完全区组设计,将动物分配到四个处理组中的一组:根据500kg-834kg的体重范围对其进行分组。处理组1(T01) (“阳性对照”) (n=4) 通过肌肉内(IM) 投药接受220 μ g乙酸高那瑞林(200 μ g当量 (“eq”) 高那瑞林)的PBS溶液;处理组2(T02) 阴道内(IVg) 接受呈粉末形式的与40mg柠檬酸混合的4406 μ g乙酸高那瑞林(4000 μ g-eq高那瑞林);处理组3(T03) 阴道内接受压缩成丸粒的4406 μ g乙酸高那瑞林以及40mg柠檬酸;处理组4(T04) 阴道内接受分散于蜡质基质(WITEPSOL® H-15) 中的4406 μ g乙酸高那瑞林以及40mg柠檬酸。在经过IACUC批准的Zoetis动物使用方案下投与全部处理。

[0046] 调配物

[0047] 处理组1由溶解于25mL磷酸盐缓冲生理盐水中的1.37mg乙酸高那瑞林组成。所得55 μ g/mL溶液与50 μ g/mL高那瑞林等效。通过0.22 μ m过滤器对这一溶液进行灭菌。投与4mL这一溶液来实现200 μ g高那瑞林的总剂量。处理组2由与400mg柠檬酸混合的4406 μ g乙酸高那瑞林组成,并且随后研磨以实现较小、较为均一的粒度。以与4000 μ g高那瑞林等效的松散粉末形式投与这一混合物。处理组3由与320mg柠檬酸、960mg乳糖、960mg微晶、160mg交联聚维酮以及6mg硬脂酸镁混合的4406 μ g乙酸高那瑞林组成。随后研磨此混合物以实现较小、较为均一的粒度,并且将305mg混合物压缩成丸粒形式以制成每个剂量。每个丸粒含有与4000 μ g高那瑞林等效的4406 μ g乙酸高那瑞林。处理组4由通过使4406 μ g乙酸高那瑞林与40mg柠檬

酸混合而产生的栓剂组成。研磨混合物以实现较小、较为均一的粒度，且随后将其分配到2mL塑料管中的在60℃下熔融的260mg WITEPSOL® H15中。对此悬浮液进行涡旋以确保均质性。随后对其冷却以形成含有4000µg高那瑞林的剂量当量的固体栓剂。

[0048] 实验设计

[0049] 在研究开始之前对动物进行检查以确保其在临床上健康的，不存在残疾并且具有正常生殖道。筛选牛奶以确保体细胞计数低于750,000个细胞/毫升并且乳腺区域不存在乳腺炎。采集体重以使动物随机化到处理组。喂以用于泌乳的代表行业的基础常规掺合饲料口粮并且将饮食说明记录在研究数据中。随意提供水。本研究开始之前并未对动情加以同步。在同一天投与全部处理。以IM推注形式将处理组1投与到每只动物的肩膀区域中。用改良的马类动物子宫内吸量管以推注形式将处理组2投与到阴道中。用改良的山羊口服投丸器以推注形式将处理组3和4投与到阴道中。在给药前和给药后0.33、0.75、1、1.5、2、4、7、12以及24小时采集血液样品。从这些样品中分离血浆并且加以处理以用于GnRH分析。

[0050] 血浆GnRH

[0051] 将血液采集到含有0.6mL 3mM杆菌肽充当蛋白酶抑制剂的预冷却的K2EDTA试管中之后，通过倒置试管至少5次对样品加以混合。随后把样品置放在冰上且在15分钟采集内在4℃下离心。随后把0.6mL血浆添加到2.0mL甲醇中且涡旋样品60秒。如先前所述，在-20℃下冷冻样品且运送到Endolytics有限责任公司以用于通过RIA加以分析(Nett, T.M., A.M. Akbar, W.R. White, M.T. Hedlund以及G.D. Niswender. 1973. 《血清中的促性腺激素释放激素(GnRH)的放射免疫分析(Radioimmunoassay for gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in serum.)》《临床内分泌学与新陈代谢杂志(J. Clin. Endocrinol. Metab.)》36: 880-885)。

[0052] 结果

[0053] 组平均血浆高那瑞林浓度

[0054] 如表1中所展示，接受4400µg IVg剂量(T02、T03、T04; 20×IM剂量)的动物达到的组平均血浆高那瑞林浓度比接受0.22mg IM剂量(T01)的动物高。在接受IVg剂量(T02、T03、T04)的处理组中，T04经历最高平均血浆浓度。给药后T02和T04IVg投药的平均高那瑞林浓度分别比IM T01投药高12小时和7小时。从给药后大约45分钟直到给药后7小时，T03IVg投药的平均高那瑞林浓度高于T01的平均高那瑞林浓度。T04中的血浆高那瑞林浓度最高，随后为T02，随后分别为T03和T01(对于全部处理，n=4)。处理组2、T03以及T04接受的剂量比投与到T01的剂量高20×。截至投与剂量后24小时，全部处理的血浆高那瑞林水平平均低于定量限值。

[0055] 表1.

[0056]

组平均血浆高那瑞林浓度										
处理	高那瑞林 (pg/mL)									
	0 h	0.333 h	0.75 h	1 h	1.5 h	2 h	4 h	7 h	12 h	24 h
T01 220 µg IM	19	124	83	49	22	16	0.80	0	0	0
T02 4400 µg IVg	BLQ	1050	694	627	413	263	200	66	26	0
T03 4400 µg IVG	BLQ	17	86	333	440	293	112	16	0	0
T04 4400 µg IVG	BLQ	1510	1260	836	453	192	33.4	1.48	0	0

[0057] T01: 220µg乙酸高那瑞林的PBS溶液 (200µg-eq高那瑞林)

[0058] T02: 4400µg乙酸高那瑞林+40mg柠檬酸(粉末) (4000µg-eq高那瑞林)

[0059] T03: 4400µg乙酸高那瑞林+40mg柠檬酸(丸粒) (4000µg-eq高那瑞林)

[0060] T04: 4400µg乙酸高那瑞林+40mg柠檬酸的蜡质溶液(栓剂) (4000µg-eq高那瑞林)

[0061] BLQ-低于定量限值

[0062] 组平均药物动力学参数

[0063] 如表2中所表明,如归因于20×较高剂量所期望,接受4400µg IVg剂量(T02、T03、T04)的动物达到的平均C_{max}和平均AUC(暴露量)比接受220µg IM剂量(T01)的动物高。

[0064] 最高平均C_{max}通过T04 (IVg) 达到,其比T01IM剂量的C_{max}高大约15×且呈现IM剂量(剂量标准化之后)的75%的相对C_{max}。T02和T03的平均C_{max}值分别比T01高大约9×和5×。作为组平均C_{max}与IM C_{max}的比的C_{max}分别在T04中为最大的,随后为T02、T03,且随后为T01(对于全部处理,n=4)。生物可用性(F)和作为组平均AUC与IM AUC的比的AUC分别在T02中为最大的,随后为T04、T03,且随后为T01。处理组2、T03以及T04接受的剂量比投与到T01的剂量高20×。

[0065] T02、T03以及T04的IVg生物可用性(相对于IM剂量)分别为92%、42%以及72%。IVg生物可用性在T02中为最大的,但在确定高那瑞林或其类似物的生物活性时,C_{max}和T_{max}可能为更加切合的。

[0066] T01的IM投药产生比IVg处理组中的任一组的T_{max}要早的T_{max} (20min)。在IVg投药中,T04在大约26分钟时展现最早T_{max},而T02和T03在大约37和90分钟时达到其相应T_{max}。

[0067] 表2

[0068]

高那瑞林的平均血浆 PK											
处理		C _{max} (pg/mL)		C _{max} / C _{max} , im	T _{max} (h)		AUC (pg*h/mL)		AUC/ AUC _{im}	F	
组	剂量	平均	S.D.		平均	S.D.	平均	S.D.		平均	S.D.

[0069]

	(μg)	值			值		值			值	
T01	220 IM	124	34	-	0.33	0.00	129	20	-	-	-
T02	4400 IVg	1070	746	8.6	0.62	0.59	2380	754	19.2	0.92	0.29
T03	4400 IVg	568	463	4.6	1.50	0.41	1090	691	8.8	0.42	0.27
T04	44004 IVg	1850	1150	14.9	0.44	0.21	1850	1130	14.9	0.72	0.44

[0070] T01: 220μg乙酸高那瑞林的PBS溶液 (200μg-eq高那瑞林)

[0071] T02: 4400μg乙酸高那瑞林+40mg柠檬酸(粉末) (4000μg-eq高那瑞林)

[0072] T03: 4400μg乙酸高那瑞林+40mg柠檬酸(丸粒) (4000μg-eq高那瑞林)

[0073] T04: 4400μg乙酸高那瑞林+40mg柠檬酸的蜡质溶液(栓剂) (4000μg-eq高那瑞林) F = 相对于IM剂量的IVg生物可用性

[0074] 实例2: 阴道内投与乙酸高那瑞林的剂量线性

[0075] 材料和方法

[0076] 动物和处理

[0077] 动物为成年哺乳期荷斯坦牛。其处于第一和第三产次之间,最少为分娩后50天并且并未妊娠。这些动物分组圈养在具有砂垫层的现代散养式畜舍乳品厂中且其每天产奶两次。在研究开始之前,根据具有单向处理结构的随机化完全区组设计,将动物分配到四个处理组中的一组:根据518kg-782kg的体重范围对其进行分组。处理组1(“阳性对照”)(n=4)通过肌肉内(IM)投药接受220μg乙酸高那瑞林(200μg-eq高那瑞林)的PBS溶液;处理组2阴道内接受分散于蜡质基质(WITEPSOL®H-15)中的220μg乙酸高那瑞林(200μg-eq高那瑞林)以及40mg柠檬酸;处理组3阴道内接受分散于蜡质基质(WITEPSOL®H-15)中的440μg乙酸高那瑞林(400μg-eq高那瑞林)以及40mg柠檬酸;处理组4阴道内接受分散于蜡质基质(WITEPSOL®H-15)中的880μg乙酸高那瑞林(800μg-eq高那瑞林)以及40mg柠檬酸。在经过IACUC批准的Zoetis动物使用方案下投与全部处理。

[0078] 调配物

[0079] 处理组1由溶解于25mL磷酸盐缓冲生理盐水中的1.37mg乙酸高那瑞林组成。所得55μg/mL溶液与50μg/mL高那瑞林等效。通过0.22μm过滤器对这一溶液进行灭菌。投与4mL这一溶液来实现200μg高那瑞林的总剂量。处理组2到4由通过使220μg、440μg或880μg乙酸高那瑞林分别与40毫克柠檬酸混合而产生的栓剂组成。研磨混合物以实现较小、较为均一的粒度,且随后将其分配到2mL塑料管中的在60℃下熔融的260mg Witepsol H15中。对此悬浮液进行涡旋以确保均质性。随后对其冷却以形成分别含有200μg、400μg或800μg高那瑞林的

剂量当量的固体栓剂。

[0080] 实验设计

[0081] 在研究开始之前对动物进行检查以确保其是健康的,不存在残疾并且具有正常生殖道。筛选牛奶以确保体细胞计数低于750,000个细胞/毫升并且乳腺区域不存在乳腺炎。采集体重以使动物随机化到处理组。喂以用于泌乳的代表行业的基础常规掺合饲料口粮并且将饮食说明记录在研究数据中。随意提供水。本研究开始之前并未对动情加以同步。在同一天投与全部处理。以IM推注形式将处理组1投与到每只动物的肩膀区域中。用改良的山羊口服投丸器以推注形式将处理组2、3和4投与到阴道中。在给药之前和给药后0.167、0.33、0.75、1、1.5、2、4、7小时采集血液样品。分离血浆并且加以处理以用于GnRH分析。

[0082] 血浆GnRH

[0083] 将血液采集到含有0.6mL 3mM杆菌肽充当蛋白酶抑制剂的预冷却的K2EDTA试管中之后,通过倒置试管至少5次对样品加以混合。随后把样品置放在冰上且在15分钟采集内在4℃下离心。随后把0.6mL血浆添加到2.0mL甲醇中且涡旋样品60秒。如先前所述,在-20℃下冷冻样品且运送到Endolytics有限责任公司以用于通过RIA加以分析(Nett, T.M., A.M.Akbar, W.R.White, M.T.Hedlund以及G.D.Niswender.1973.《血清中的促性腺激素释放激素(GnRH)的放射免疫分析》.《临床内分泌学与新陈代谢杂志》36:880-885)。

[0084] 结果

[0085] 逆转换组平均血浆高那瑞林浓度

[0086] 如表3中所表明,接受440μg和880μg IVg剂量(分别为T03和T04)的动物达到的最高组平均血浆高那瑞林浓度比接受220μg IM剂量(T01)的动物高。除通过T01投药达到的最高血浆浓度外,通过IVg处理(T02、T03以及T04)展现的最高血浆浓度随后也达到(分别为0.75h与0.333h)。尽管T01和T02中的动物已接受乙酸高那瑞林的当量剂量,但针对IVg投药途径(T02)的血浆浓度水平从未达到和IM投药(T01)之后所展现的血浆水平一样。T04中的血浆高那瑞林浓度最高,随后为T03,随后分别为T01和T02(对于全部处理,n=4)。截至剂量后4小时,全部处理的血浆高那瑞林水平平均低于定量限值。

[0087] 表3.

[0088]

逆转换平均血浆高那瑞林浓度									
处理	高那瑞林 (pg/mL)								
	0 h	0.167 h	0.333 h	0.75 h	1 h	1.5 h	2 h	4 h	7 h
T01 220 µg IM	BLQ	63	105.4	57.3	47.5	27.6	13.5	BLQ	BLQ
T02 220 µg IVg	BLQ	8.2	26.8	45.0	27.6	16.7	7.7	BLQ	BLQ
T03 440 µg IVG	BLQ	19.7	65.6	114.8	51.5	34.8	12.6	BLQ	BLQ
T04 880 µg IVG	BLQ	25.1	92.7	166.0	99.1	64.9	31.3	BLQ	BLQ

[0089] T01: 220µg乙酸高那瑞林的PBS溶液 (200µg-eq高那瑞林)

[0090] T02: 220µg乙酸高那瑞林+40mg柠檬酸的蜡质溶液 (栓剂) (200µg-eq高那瑞林)

[0091] T03: 440µg乙酸高那瑞林+40mg柠檬酸的蜡质溶液 (栓剂) (400µg-eq高那瑞林)

[0092] T04: 880µg乙酸高那瑞林+40mg柠檬酸的蜡质溶液 (栓剂) (800µg-eq高那瑞林)

[0093] BLQ-低于定量限值 (<1.9pg/mL)

[0094] 组平均药物动力学参数

[0095] 如表4中所表明,接受440µg和880µg IVg剂量 (T03、T04) 的动物达到的平均C_{max}和AUC水平比接受220µg IM (T01) 或IVg (T02) 剂量的动物高。在接受IVg投药的那些动物中,最高平均C_{max}和AUC通过T04达到,其中C_{max}比T01IM投药的C_{max}高大约1.8倍并且AUC高大约2.3倍。处理组3伴随有与T01的平均C_{max}和AUC大致相等的平均C_{max}和AUC。与220µg IM剂量 (T01) 等效的IVg投药 (T02) 产生分别呈IM剂量的大约43%和49%的C_{max}和AUC。正如期望,在投药后大约20分钟时,高那瑞林的IM投药 (T01) 产生比任意其它处理组的T_{max}要早的T_{max}。在IVg投药中,T04在大约36分钟时展现第二最早T_{max},而T02,且随后T03在大约45分钟时达到其相应T_{max}。

[0096] 表4

[0097]

高那瑞林的最小平方平均血浆 PK							
处理		C _{max} (pg/mL)		T _{max} (h)		AUC (pg*h/mL)	
		最小平方平均值		最小平方平均值		最小平方平均值	
组	剂量 (µg)	平均值	S.E.	平均值	S.E.	平均值	S.E.
T01	220 µg IM	105	35.8	0.330	0.0757	112	44.4
T02	220 µg IVg	45	15.2	0.750	0.0757	55	21.8
T03	440 µg IVg	115	46.4	0.750	0.0874	116	55.6
T04	880 µg IVg	191	65.0	0.605	0.0757	260	102.9

[0098] T01:220 μ g乙酸高那瑞林的PBS溶液(200 μ g-eq高那瑞林)

[0099] T02:220 μ g乙酸高那瑞林+40mg柠檬酸的蜡质溶液(栓剂)(200 μ g-eq高那瑞林)

[0100] T03:440 μ g乙酸高那瑞林+40mg柠檬酸的蜡质溶液(栓剂)(400 μ g-eq高那瑞林)

[0101] T04:880 μ g乙酸高那瑞林+40mg柠檬酸的蜡质溶液(栓剂)(800 μ g-eq高那瑞林)

[0102] 剂量比例性

[0103] 如通过图1A和1B所表明,当阴道内投与时,乙酸高那瑞林以及柠檬酸和Witepsol H15的调配物将提供与剂量成比例的C_{max}和AUC。此比例性允许对为实现与IM投与乙酸高那瑞林之后所观察到的高那瑞林血浆浓度相类似的血浆浓度所需的IVg剂量进行估算。失拟测试产生呈0.6912(C_{max})和0.9686(AUC)的p值,其在0.1水平下均为不显著的。

[0104] 实例3.阴道内投与盐酸高那瑞林的剂量线性

[0105] 材料和方法

[0106] 动物和处理

[0107] 动物为成年哺乳期荷斯坦牛。其处于第一和第三产次之间,最少为分娩后50天并且并未妊娠。这些动物分组圈养在具有砂垫层的现代散养式畜舍乳品厂中且其每天产奶两次。在研究开始之前,根据具有单向处理结构的随机化完全区组设计,将动物分配到四个处理组中的一组:其根据539kg-781kg的体重范围进行分组。处理组1(T01) (“阳性对照”) (n=4) 通过肌肉内(IM)投药接受212.3 μ g盐酸高那瑞林(200 μ g-eq高那瑞林)的PBS溶液;处理组2(T02)阴道内接受分散于蜡质基质(WITEPSOL®H-15)中的212.3 μ g盐酸高那瑞林(200 μ g-eq高那瑞林)以及40mg柠檬酸;处理组3(T03)阴道内接受分散于蜡质基质(WITEPSOL®H-15)中的424.6 μ g盐酸高那瑞林(400 μ g-eq高那瑞林)以及40mg柠檬酸;处理组4(T04)阴道内接受分散于蜡质基质(WITEPSOL®H-15)中的849.2 μ g盐酸高那瑞林(800 μ g-eq高那瑞林)以及40mg柠檬酸。在经过IACUC批准的Zoetis动物使用方案下进行全部处理。

[0108] 调配物

[0109] T01由溶解于25mL磷酸盐缓冲生理盐水中的1.37mg盐酸高那瑞林组成。所得53.1 μ g/mL溶液与50 μ g/mL高那瑞林等效。通过0.22 μ m过滤器对这一溶液进行灭菌。投与4mL这一溶液来实现200 μ g高那瑞林的总剂量。T02、T03以及T04由通过使212.3 μ g、424.6 μ g或849.2 μ g盐酸高那瑞林分别与40mg柠檬酸混合而产生的栓剂组成。研磨混合物以实现较小、较为均一的粒度,且随后将其分配到2mL塑料管中的在60°C下熔融的260mg Witepsol H15中。对此悬浮液进行涡旋以确保均质性。随后对其冷却以形成分别含有200 μ g、400 μ g或800 μ g高那瑞林的剂量当量的固体栓剂。

[0110] 实验设计

[0111] 在研究开始之前对动物进行检查以确保其是健康的,不存在残疾并且具有正常生殖道。筛选牛奶以确保体细胞计数低于750,000个细胞/毫升并且乳腺区域不存在乳腺炎。采集体重以使动物随机化到处理组。喂以用于泌乳的代表行业的基础常规掺合饲料口粮并且将饮食说明记录在研究数据中。随意提供水。本研究开始之前并未对动情加以同步。在同一天投与全部处理。以IM推注形式将T01投与到每只动物的肩膀区域中。用改良的山羊口服投丸器以推注形式将T02、T03以及T04投与到阴道中。在给药之前和给药后0.167、0.33、0.75、1、1.5、2、4、7小时采集血液样品。分离血浆并且加以处理以用于GnRH分析。

[0112] 血浆GnRH

[0113] 将血液采集到含有0.6mL 3mM杆菌肽充当蛋白酶抑制剂的预冷却的K2EDTA试管中之后,通过倒置试管至少5次对样品加以混合。随后把样品置放在冰上且在15分钟采集内在4℃下离心。随后把0.6mL血浆添加到2.0mL甲醇中且涡旋样品60秒。如先前所述,在-20℃下冷冻样品且运送到Endolytics有限责任公司以用于通过RIA加以分析(Nett, T.M., A.M.Akbar, W.R.White, M.T.Hedlund以及G.D.Niswender.1973.《血清中的促性腺激素释放激素(GnRH)的放射免疫分析》.《临床内分泌学与新陈代谢杂志》36:880-885)。

[0114] 结果

[0115] 逆转换组平均血浆高那瑞林浓度

[0116] 如表5中所表明,接受849.2μg IVg剂量(T04)的动物达到最高组平均血浆高那瑞林浓度,其为接受212.3μg IM剂量(T01)的动物的组平均血浆高那瑞林浓度的大约79%。通过T02和T03展现的最高血浆浓度分别为T01的大约20%和46%。尽管T01和T02中的动物已接受盐酸高那瑞林的当量剂量,但其中经IVg投与剂量(T02)的那些动物的浓度从未达到其中经IM投与剂量(T01)的那些动物的浓度。除通过IM投药途径(T01)接受盐酸高那瑞林的那些动物外,接受盐酸高那瑞林的IVg剂量(T02、T03以及T04)的全部处理随后也展现最高血浆高那瑞林浓度。截至剂量后4小时,全部处理的血浆高那瑞林水平均低于定量限值。

[0117] 表5

[0118]

逆转换平均血浆高那瑞林浓度									
处理	高那瑞林 (pg/mL)								
	0 h	0.167 h	0.333 h	0.75 h	1 h	1.5 h	2 h	4 h	7 h
T01 212.3 μg IM	BLQ	141.2	113.7	67.0	34.7	12.8	3.8	BLQ	BLQ
T02 212.3 μg IVg	BLQ	12.7	28.1	25.	15.8	8.0	4.0	BLQ	BLQ
T03 424.6 μg IVg	BLQ	17.5	28.3	64.4	35.5	25.4	10.8	BLQ	BLQ
T04 849.2 μg IVg	BLQ	19.2	52.2	112.2	75.9	54.3	23.0	BLQ	BLQ

[0119] T01:212.3μg盐酸高那瑞林的PBS溶液(200μg-eq高那瑞林)

[0120] T02:212.3μg盐酸高那瑞林+40mg柠檬酸的蜡质溶液(栓剂)(200μg-eq高那瑞林)

[0121] T03:424.6μg盐酸高那瑞林+40mg柠檬酸的蜡质溶液(栓剂)(400μg-eq高那瑞林)

[0122] T04:849.2μg盐酸高那瑞林+40mg柠檬酸的蜡质溶液(栓剂)(800μg-eq高那瑞林)

[0123] BLQ-低于定量限值(<1.9pg/mL)

[0124] 组平均药物动力学参数

[0125] 如表6中所表明,接受849.2μg IVg剂量(T04)的动物达到的平均AUC水平比接受212.3μg IM(T01)或IVg(T02)剂量的动物高。在接受IVg投药的那些动物中,最高平均C_{max}和AUC通过T04达到,其中C_{max}为T01IM投药的C_{max}的大约85%并且AUC高大约1.5倍。T03伴有呈T01的平均C_{max}和AUC大约一半的平均C_{max}和AUC。与212.3μg IM剂量(T01)等效的

IVg投药 (T02) 产生分别为IM剂量的大约21%和32%的C_{max}和AUC。正如期望,在投药后大约13分钟时,高那瑞林的IM投药 (T01) 产生比任意其他处理组的T_{max}要早的T_{max}。在IVg投药中,T02在大约32分钟时展现第二最早T_{max},而T03和T04在大约39分钟时达到其相应T_{max}。

[0126] 表6

[0127]

高那瑞林的最小平方平均血浆 PK							
处理		C _{max} (pg/mL) 最小平方平均值		T _{max} (h) 最小平方平均值		AUC (pg*h/mL) 最小平方平均值	
组	剂量 (μg)	平均值	S.E.	平均值	S.E.	平均值	S.E.
T01	212.3 μg IM	144	68.5	0.210	0.0979	106	56.1
T02	212.3 μg IVg	30	14.5	0.540	0.0979	34	18.2
T03	424.6 μg IVg	71	33.5	0.645	0.0979	77	40.8
T04	849.2 μg IVg	123	58.3	0.645	0.0979	157	83.3

[0128] T01: 212.3μg盐酸高那瑞林的PBS溶液 (200μg-eq高那瑞林)

[0129] T02: 212.3μg盐酸高那瑞林+40mg柠檬酸的蜡质溶液 (栓剂) (200μg-eq高那瑞林)

[0130] T03: 424.6μg盐酸高那瑞林+40mg柠檬酸的蜡质溶液 (栓剂) (400μg-eq高那瑞林)

[0131] T04: 849.2μg盐酸高那瑞林+40mg柠檬酸的蜡质溶液 (栓剂) (800μg-eq高那瑞林)

[0132] 剂量比例性

[0133] 如通过图2a和2b所表明,当阴道内投与时,盐酸高那瑞林以及柠檬酸和Witepsol H15的调配物将提供与剂量成比例的C_{max}和AUC。此比例性允许对为实现与IM投与盐酸高那瑞林之后所观察到的高那瑞林血浆浓度相类似的血浆浓度所需的IVg剂量进行估算。失拟测试产生呈0.8379 (C_{max}) 和0.9616 (AUC) 的p值,其在0.1水平下均为不显著的。

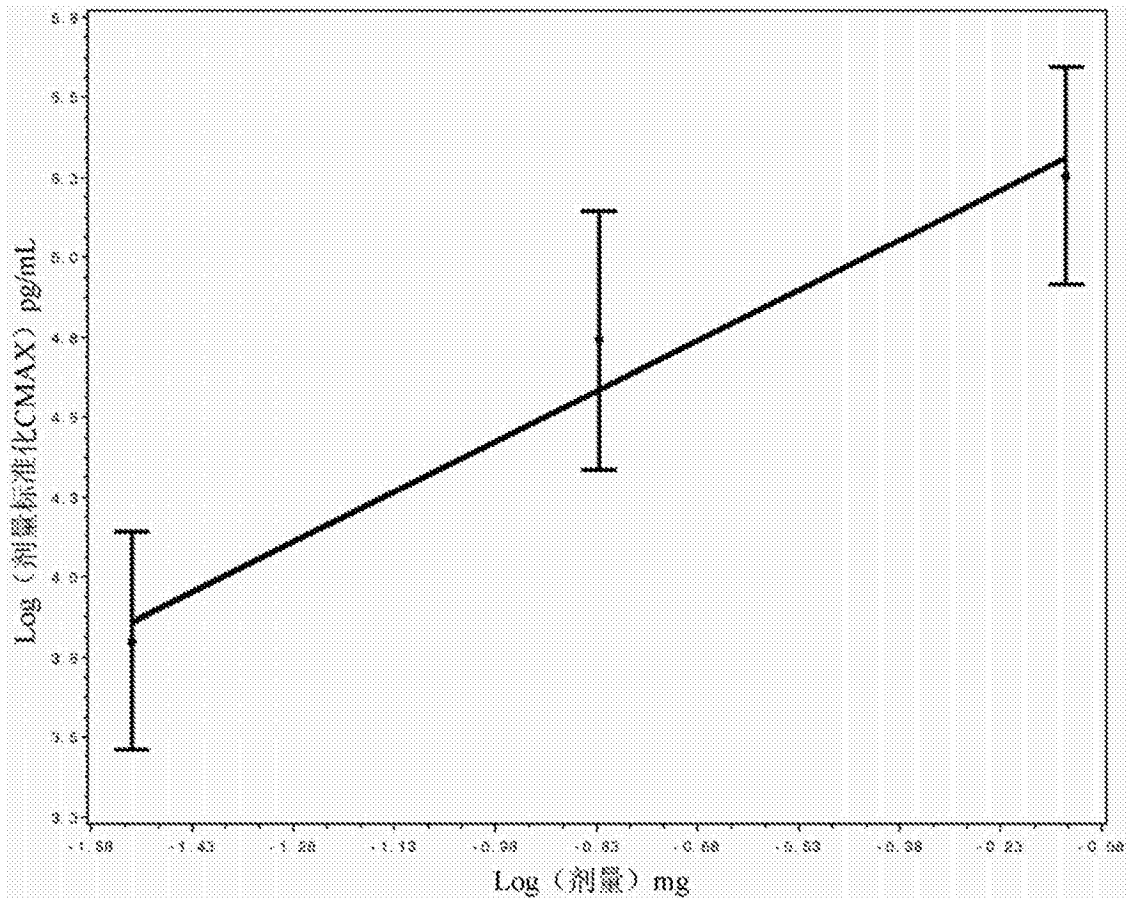


图1A

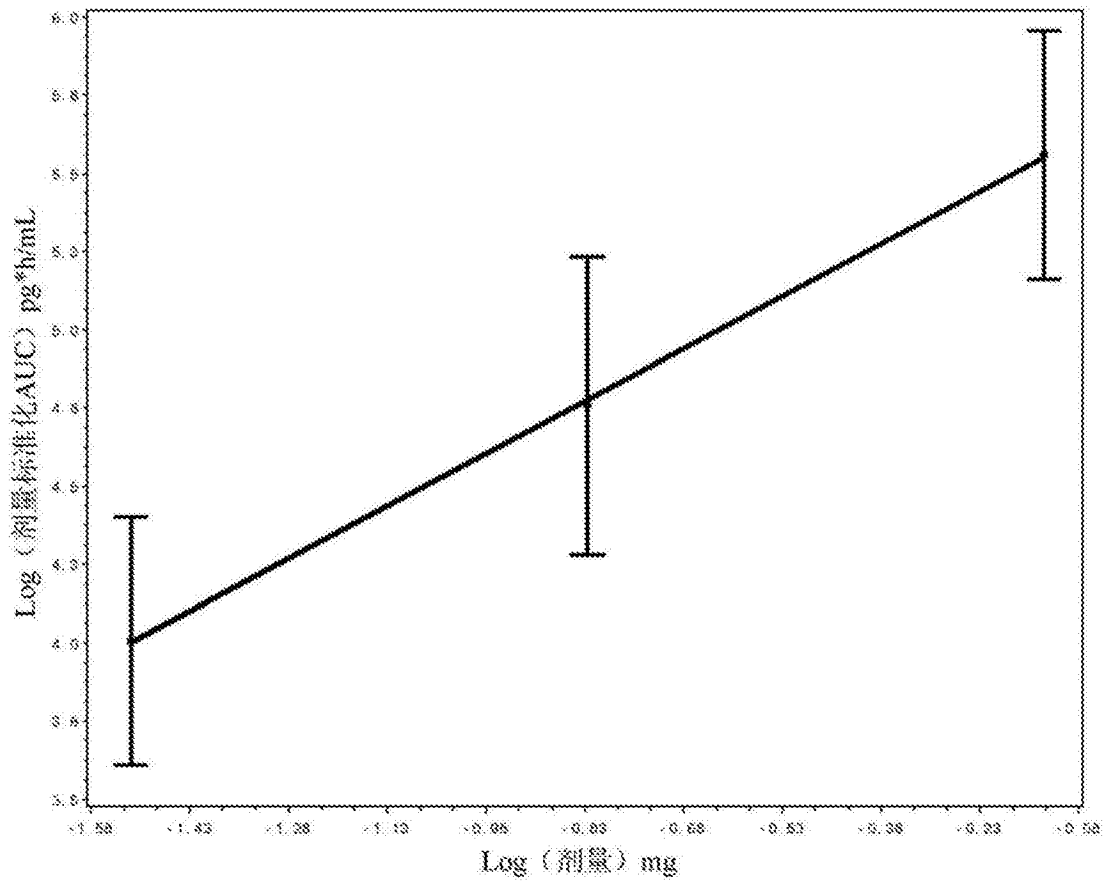


图1B

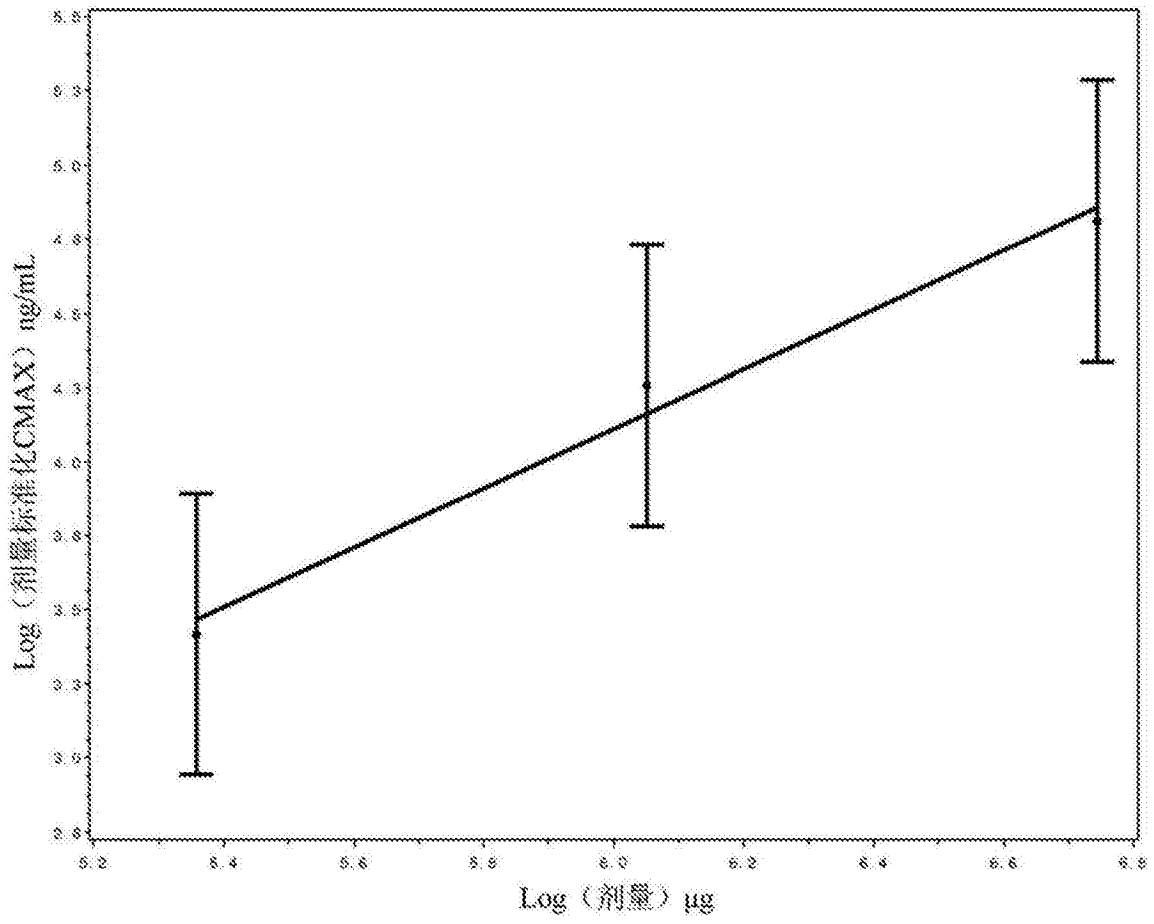


图2A

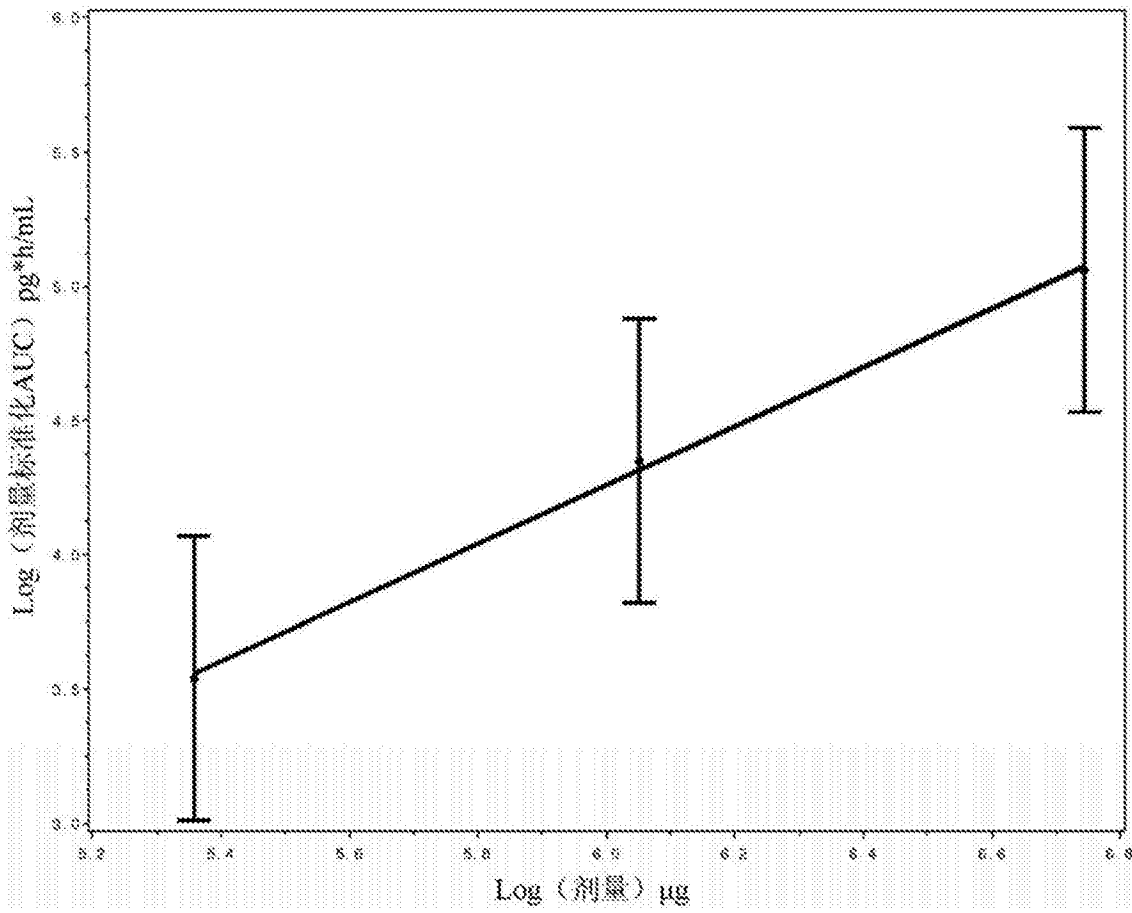


图2B