

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034820**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.03.25

(21) Номер заявки
201791560

(22) Дата подачи заявки
2016.02.16

(51) Int. Cl. *A61K 9/14* (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)

(54) **ПОРОШКОВЫЙ СОСТАВ ДЛЯ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГИПОГЛИКЕМИИ**

(31) **62/117,031**

(32) **2015.02.17**

(33) **US**

(43) **2018.02.28**

(86) **PCT/US2016/018003**

(87) **WO 2016/133863 2016.08.25**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
**Мантрипрагада Санкарам Б., Пиш
Клод А., ван Бетцбрюгге Джо Ян
Филип (US)**

(74) Представитель:
**Лыу Т.Н., Угрюмов В.М., Гизатуллина
Е.М., Глухарёва А.О., Дементьев
В.Н., Карпенко О.Ю., Клюкин В.А.,
Строкова О.В., Христофоров А.А.
(RU)**

(56) WO-A1-9216196
US-A1-2006074025
US-A1-2011237510

(57) Изобретение относится к порошковой композиции для лечения гипогликемии, содержащей или состоящей из глюкагона (SEQ ID NO: 1), додецилфосфохолина и β -циклодекстрина, где отношение глюкагона к додецилфосфохолину и β -циклодекстрину составляет 1:1:8 по массе. В настоящем изобретении также предложен интраназальный аппликатор для указанной порошковой композиции, а также способ ее получения и способ лечения гипогликемии, предусматривающий ее применение.

B1**034820****034820****B1**

Область техники

Настоящая заявка относится к порошковому составу, содержащему глюкагон или аналог глюкагона, для интраназального введения, подходящему для лечения гипогликемии и, в частности, для лечения тяжелой гипогликемии. Настоящая заявка дополнительно относится к способу получения указанного порошкового состава и к устройствам и способам применения порошкового состава.

Уровень техники

В большинстве стран Западного мира распространение диабета достигло эпидемических значений, что является серьезной и растущей проблемой для систем здравоохранения во многих странах с развивающейся экономикой. Во всем мире примерно 285 миллионов человек имеют диабет, и по ожиданиям это количество к 2030 году достигнет 438 миллионов (IDF Diabetes Atlas, 2009).

Осложнения при диабете, как правило, связаны с хроническим повышением уровня глюкозы в крови (гипергликемия), которое приводит к заболеваниям сердца, почек и глаз, ампутации и неврологическим расстройствам. К сожалению, использование лекарственных средств, предназначенных для лечения гипергликемии, связанной с диабетом, сопровождается выраженными и серьезными осложнениями. Одним из наиболее распространенных осложнений способов лечения, применяемых для снижения уровня сахара в крови, является гипогликемия (низкий уровень сахара в крови), которую наиболее часто наблюдают у пациентов, которым проводят лечение инсулином (т.е. у всех субъектов с диабетом 1 типа и примерно у 30% пациентов с диабетом 2 типа), но также и у пациентов с диабетом 2 типа, которым проводят лечение с применением сульфонилмочевины. Действительно, если бы не такое ограничение как гипогликемия, люди, страдающие от диабета, вероятно, могли бы иметь нормальный уровень глюкозы в крови, и, таким образом, можно было бы избежать осложнений, связанных с гипергликемией (Cryer, 2002).

В зависимости от тяжести приступа гипогликемия вызывает широкий спектр физических проблем от слабости, головокружения, потливости, озноба и голода до более серьезных симптомов, включая размытое зрение, изменение поведения, судороги, кому и даже смерть. Помимо физических эффектов гипогликемии, отмечают значительные психологические эффекты, включая раздражительность, страх возникновения нового приступа, высокий уровень тревоги и низкий общий уровень счастья, которые нежелательным образом влияют на контролирование уровня глюкозы и качество жизни (Deary, 2008).

Тяжелую гипогликемию у субъектов, находящихся в сознании, следует лечить путем приема внутрь углевода, предпочтительно в виде таблеток глюкозы или их эквивалентов. В случае тяжелой гипогликемии у индивидуума в бессознательном состоянии, находящегося вне стационара, рекомендуемым способом лечения является введение 1 мг глюкагона путем внутримышечной (в.м.) или подкожной (п.к.) инъекции. В случае тяжелой гипогликемии у индивидуума в бессознательном состоянии, если имеется возможность оказания профессиональной медицинской помощи и доступно внутривенное введение, то рекомендуется вводить внутривенно декстрозу. Во всех случаях после обращения вспять гипогликемии пациенту следует давать перорально углеводы для полного восстановления и предотвращения повторных случаев гипогликемии.

Глюкагон, который является высокоэффективным способом лечения тяжелой гипогликемии, как в домашних условиях, так и в стационаре, в настоящее время доступен только в виде порошка, который необходимо смешивать с разбавителем непосредственно перед введением путем инъекции. Несмотря на то, что указанная процедура должна быть относительно легкой для людей, страдающих от диабета, которые делают себе инъекции инсулина, они не могут проводить лечение самостоятельно, так как по определению тяжелая гипогликемия представляет собой приступ гипогликемии, при котором пациенту требуется помощь третьего лица (Cryer, 2009). Для любого человека, который не является медицинским специалистом, в случае чрезвычайной ситуации, при которой пациент, страдающий от диабета, впадает в гипогликемическую кому или испытывает конвульсии, связанные с гипогликемией, перерастворение и инъекция доступного в настоящее время инъекционного глюкагона являются сложными и пугающими процедурами, в которых они могут допустить ошибки.

Действительно, исследователи из Австралии опубликовали исследование, в котором родители детей или подростков, страдающих от диабета, использовали один из доступных в настоящее время наборов глюкагона (GlucoGen Hypokit, Novo Nordisk) в условиях, имитирующих экстренную ситуацию (Harris et al., 2001). Каждого родителя просили представить ситуацию, при которой их ребенок потерял сознание в 3 ч ночи. Затем им давали неоткрытый набор первой помощи с глюкагоном и просили ввести лекарственное средство в упакованный кусок мяса, имитирующий бедро. Небольшая группа из 11 специалистов по диабету (пять эндокринологов и шесть инструкторов по борьбе с диабетом) выступала в качестве сурrogатного контроля.

Среди 136 родителей, которые принимали участие в исследовании, 106 были родителями подростков, у которых средняя продолжительность диабета составляла 4,7 года, и 30 были родителями более юных детей, у которых средняя продолжительность диабета составляла 2,4 года. Более 90% исследуемых родителей ранее проходили инструктаж по использованию глюкагона. 69% родителей отмечали трудности при работе с существующим набором первой помощи с глюкагоном. Трудности включали проблемы с открытием упаковки, удалением футляра иглы, смешиванием ингредиентов и изгибанием игл. В среднем родителям требовалось 2 мин 30 с на полное выполнение процедуры (диапазон от 30 с до >12 мин).

Кроме того, 6% вообще не смогли ввести инъекцию, и 4% участников вводили инъекцию воздуха или только разбавителя. В противоположность этому профессионалы, изучающие диабет, проводили процедуру за 1 мин 17 с (диапазон 1-1,75 мин). Количество ошибок, наблюдаемых для указанной выборки родителей, было очень неожиданным особенно с учетом того, что это была контролируемая во времени симуляция, а не фактическая экстренная ситуация.

Сложности, связанные с использованием набора первой помощи с глюкагоном, подтверждаются в недавнем отчете, выпущенном Канадским институтом безопасной медицинской практики (ISMP) (ISMP Canada Safety Bulletin, 2010). В отчете ISMP за сентябрь 2010 г. отмечаются три отдельных случая, в которых вводили только разбавитель, а порошок с глюкагоном не перерастворяли в разбавителе перед введением. Это приводило к полностью неэффективной доставке назначенной дозы глюкагона индивидуумам, находящимся в тяжелом гипогликемическом кризисе, и, согласно отчету, к нанесению дополнительного вреда пациенту в одном из указанных случаев.

Для того, чтобы узнать мнение о доступных в настоящее время наборах первой помощи с глюкагоном, был проведен телефонный опрос 102 пациентов с диабетом 1 типа (Yanai, 1997). Большинство пациентов (67%) отметили, что они бы предпочли интраназальное введение глюкагона, если бы оно было доступно, и 82% из указанных пациентов предположили, что члены их семей, учителя и коллеги предпочли бы проводить экстренную терапию при помощи интраназального способа. Аналогично, специалисты неотложной помощи, которых, как правило, в первую очередь вызывают для лечения пациента, страдающего от приступа тяжелой гипогликемии, отмечают значительные трудности, связанные с введением путем инъекции. Как и при любом использовании острых предметов, существует очень высокий риск случайного заражения крови и повреждения от укола и связанного с этим возможного возникновения инфекционных заболеваний, опасных для жизни (Leiss J., 2006). В рамках данного контекста некоторые специалисты неотложной помощи стараются предложить неинвазивные способы введения, включая интраназальный, для улучшения ухода за пациентом в экстренных ситуациях, увеличения безопасности для пациента и лица, осуществляющего помощь, и увеличения при этом количества лиц, которые смогут эффективно оказывать помощь в экстренной ситуации (Cugtan, 2007).

Указанные факторы очевидно указывают на то, что существующий подход к введению глюкагона в экстренных ситуациях сопровождается недостатками, и существует реальная необходимость в альтернативных подходах для доставки глюкагона для лечения тяжелой гипогликемии.

Были предложены различные подходы для доставки глюкагона путем интраназального введения, но они не смогли обеспечить одобренный альтернативный вариант инъецируемому глюкагону. В целом, указанные подходы можно разделить на две группы, в одной используют введение жидкого состава и в другой используют различные типы сухих составов.

В рамках группы жидких составов все композиции, которые использовали в Pontiroli (1983), Pontiroli (1985), Freychet (1988), Pontiroli (1989), Pontiroli (1993) и Pacchioni (1995), представляли собой составы, которые необходимо распылять в нос. В более позднем исследовании (Sibley et al., 2013) отмечается успешное применение глюкагона, предназначенного для инъекции, путем интраназального распыления переработанного раствора глюкагона у пациента в домашних условиях.

Так как глюкагон является нестабильным в жидком состоянии, то жидкие композиции, применяемые в указанных исследованиях, было необходимо перерастворять непосредственно перед использованием, и, таким образом, они не были лучшим вариантом для использования в экстренных случаях для лечения тяжелой гипогликемии. Кроме того, во многих из указанных исследований пациентам требовалось сделать глубокий вдох сразу после введения дозы указанных композиций. Так как пациенты с тяжелой гипогликемией часто находятся без сознания или даже в коме, то их невозможно просить сделать глубокий вдох. Таким образом, указанные композиции не являются лучшим вариантом для интраназальной доставки при лечении тяжелой гипогликемии, и при их использовании не решаются проблемы, связанные с инъецируемыми составами, включая использование игл субъектами, не являющимися медицинскими специалистами, и необходимость подготовки препарата перед использованием.

Что касается второй группы, то в патенте США № 5059587 описаны порошки для интраназального введения физиологически активных пептидов, включая глюкагон. Указанные порошки включают водорастворимую органическую кислоту в качестве ускорителя всасывания.

В публикации Jorgensen et al. (1991) описан "порошковый состав глюкагона для интраназальной доставки". Согласно описанию указанный состав содержит глюкагон, дидецилфосфатидилхолин (DDPC) и α -циклодекстрин (α -CD), и сообщается, что он обеспечивает зависящий от дозы ответ в виде увеличения уровня глюкозы в плазме и уровня глюкагона в плазме. В указанной работе не описаны количества компонентов в составе и способ получения состава.

Было выявлено, что состав Jorgensen (1991) или HypoGon® Nasal (NovoNordisk) использовали в нескольких последующих исследованиях, и в одном из указанных отчетов утверждается, что состав имеет композицию глюкагон:DDPC: α -CD в отношении 5:10:85 по массе. В указанных исследованиях сообщается, что интраназальное введение порошкового состава Jorgensen, 1991, взрослым увеличивает концентрацию глюкозы в плазме у взрослых людей с гипогликемией. В указанных исследованиях уровень глю-

козы повышался после введения и достигал плато примерно через 30 мин после введения дозы. В противоположность этому лечение с применением инъектируемого глюкагона в указанных исследованиях обеспечивало уровень глюкозы, который продолжал повышаться по меньшей мере до 90 мин с момента введения (Hvidberg, 1994; Rosenfalck, 1992). Сообщается, что интраназальное введение порошкового состава Jorgensen (1991) детям с гипогликемией повышает концентрацию глюкозы в плазме сразу после введения, и максимальный уровень достигается через 25-30 мин после введения дозы, после чего уровень глюкозы снижается. В противоположность этому лечение детей с применением инъектируемого глюкагона обеспечивало повышение уровня глюкозы в плазме в течение по меньшей мере 45 мин (Stenninger, 1993).

В публикации Sakr (1996) приведено сравнение распыляемых и порошковых составов, содержащих глюкагон и диметил- β -циклодекстрин (DMPCD). Состав для интраназального распыления получали путем растворения коммерческого глюкагона в "растворителе от производителя", содержащем 2 или 5% (мас./об.) DMPCD. Порошки получали путем лиофилизации растворов для распыления.

Teshima с соавторами (2002) обнаружили, что максимальное увеличение концентрации глюкозы в плазме составляло 1,56 ммоль/л (28,08 мг/дл) у здоровых добровольцев после интраназального введения порошка, содержащего глюкагон и микрокристаллическую целлюлозу в отношении 1:69. Указанные авторы также сообщили, что порошковая форма является стабильной при 5 и 25°C в течение по меньшей мере 84 дней. В случае введения интраназального продукта пациентам с гипогликемией, вызванной инсулином, увеличение только на 1,5 ммоль/л может быть недостаточным для возвращения нормального уровня глюкозы в крови пациента. Кроме того, количество порошка (т.е. 70 мг для состава с отношением 1:69) является значительным и может быть избыточным для использования в доступных устройствах.

Matilainen с соавторами (2008, 2009) исследовали стабильность в твердом состоянии и растворение порошков глюкагон/ γ -CD и глюкагон/лактоза при повышенной температуре и/или влажности в течение до 39 недель, при этом стабильность в твердом состоянии порошка глюкагон/ γ -CD была выше. Порошок не использовали для интраназального введения.

Endo с соавторами (2005) сообщали об использовании эритрита в качестве вспомогательного вещества и носителя глюкагона в ингаляторе сухих порошков для внутрилегочного введения. Порошок получали путем смешения измельченных частиц глюкагона и вспомогательных веществ с более крупными частицами носителя. Для обеспечения осаждения в альвеолах и последующего системного всасывания ингалируемый препарат глюкагона в виде сухого порошка (DPI) измельчали до достижения среднего массового диаметра от 1 до 6 мкм, определяемого при помощи анализа лазерной дифракции.

Опоие с соавторами (2009) сообщали, что добавление лимонной кислоты в ингалятор глюкагона для сухих порошков для внутрилегочной ингаляции улучшало характеристики растворения и не ухудшало стабильность в твердом состоянии. Внутритрахеальное введение глюкагона, содержащего лимонную кислоту, с использованием ингалятора для сухих порошков (50 мкг/кг крысам) обеспечивало гипергликемический эффект у крыс, в 2,9 раза более выраженный по сравнению с ингалируемым глюкагоном, не содержащим лимонную кислоту.

В описаниях Endo (2005) и Опоие (2009) сообщается о внутрилегочной доставке глюкагона. Так как пациенты с тяжелой гипогликемией могут находиться без сознания или ощущать сильную потерю ориентации, то можно ожидать, что они не смогут сделать глубокий вдох для обеспечения внутрилегочной доставки. Таким образом, внутрилегочная доставка глюкагона не подходит для лечения тяжелой гипогликемии.

Несмотря на описанные попытки в настоящее время пациентам не доступны продукты, в которых применяют интраназальный порошок для доставки глюкагона для лечения тяжелой гипогликемии.

Задачей настоящего изобретения является предложение указанного порошкового состава для интраназального введения.

Краткое описание изобретения

Согласно первому аспекту настоящего изобретения предложен порошковый состав глюкагона или аналога глюкагона. Указанная порошковая композиция содержит глюкагон или аналог глюкагона, циклодекстрин и фосфолипидное поверхностно-активное вещество и получена таким образом, что по меньшей мере часть порошка присутствует в фазе, характеризующейся мезопиком XRPD при определении путем рентгеновской порошковой дифракции. В дополнительных конкретных вариантах реализации порошковая композиция содержит:

- (a) от 5 до 15 мас.% глюкагона или аналога глюкагона;
- (b) от 5 до 51 мас.% фосфолипидного поверхностно-активного вещества;
- (c) от 44 до 90 мас.% циклодекстрина и
- (d) необязательно до 10 мас.% низкомолекулярной органической кислоты или ее фармацевтически приемлемой водорастворимой соли или сложного эфира.

Согласно второму аспекту изобретения предложен интраназальный аппликатор для порошкового состава. Аппликатор содержит резервуар для порошкового состава, где порошковый состав согласно настоящему изобретению содержится внутри резервуара.

Согласно третьему аспекту изобретения предложен способ получения порошкового состава согласно настоящему изобретению. Указанный способ включает стадии:

- (а) получения первой смеси глюкогона и поверхностно-активного вещества в водном носителе, где поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации, равной критической концентрации мицеллообразования или превышающей ее;
- (b) добавления β -циклодекстрина к указанной первой смеси с получением второй смеси;
- (с) сушки второй смеси с получением твердого состава; и
- (d) обработки указанного твердого состава с получением однородного порошка, где меньшей мере часть указанного порошка находится в фазе, характеризующейся мезопиком XRPD. В конкретных вариантах реализации сушку второй смеси можно проводить путем ее лиофилизации или сушки распылением.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - изменение концентрации глюкозы в плазме в ммоль/л со временем после интраназального введения собакам 1 мг дозы глюкогона в виде порошкового состава с массовым отношением глюкогон:DPC: β -CD, составляющим 10:10:80.

Фиг. 2 - изменение концентрации глюкозы в плазме в ммоль/л со временем после интраназального введения собакам 1 мг дозы глюкогона в виде порошкового состава с массовым отношением глюкогон:DDPC: β -CD, составляющим 10:10:80.

Фиг. 3 - изменение концентрации глюкозы в плазме в ммоль/л со временем после интраназального введения собакам 1 мг дозы глюкогона в виде порошкового состава с массовым отношением глюкогон:LLPC: β -CD, составляющим 10:10:80.

Фиг. 4 - изменение концентрации глюкозы в плазме в ммоль/л со временем после интраназального введения собакам 750 мкг дозы глюкогона в виде порошкового состава с массовым отношением глюкогон:D8PC: β -CD, составляющим 10:10:80.

Фиг. 5 - изменение концентрации глюкозы в плазме в ммоль/л со временем после интраназального введения в одну ноздрию собак 750 мкг дозы глюкогона в виде порошкового состава с массовым отношением глюкогон:DLPG: α -CD, составляющим 5:25:70.

Фиг. 6 - дифрактограммы рентгеновской порошковой дифракции порошковых составов глюкогон:DPC: β -CD и глюкогон-DDPC: β -CD с массовым отношением 10:10:80.

Фиг. 7 - средняя концентрация глюкозы в плазме у взрослых с диабетом 1 типа и гипогликемией, вызванной инсулином, которым вводили глюкогон интраназально и путем инъекции.

Фиг. 8A - средняя концентрация глюкогона в плазме у детей возрастом 12-17 лет с диабетом 1 типа, которым вводили глюкогон интраназально и путем инъекции. Верхняя линия соответствует внутримышечному введению, нижняя линия соответствует интраназальному введению.

Фиг. 8B - средняя концентрация глюкозы в плазме у детей возрастом 12-17 лет с диабетом 1 типа, которым вводили глюкогон интраназально и путем инъекции. Верхняя линия соответствует внутримышечному введению, нижняя линия соответствует интраназальному введению.

Фиг. 9A - средняя концентрация глюкогона в плазме у взрослых людей с заложенностью носа (верхняя линия) и без нее (нижняя линия) и у взрослых с заложенностью носа, которым предварительно проводили лечение с использованием средства от заложенности носа (средняя линия).

Фиг. 9B - средняя концентрация глюкозы в плазме у взрослых людей с заложенностью носа (верхняя линия) и без нее (нижняя линия) и у взрослых с заложенностью носа, которым предварительно проводили лечение с использованием средства от заложенности носа (средняя линия).

Фиг. 10 - типовое устройство доставки порошковых составов для интраназального введения (устройство Aptar).

Подробное описание изобретения

Некоторые желательные атрибуты порошкового состава для интраназальной доставки, обладающего коммерческим потенциалом, перечислены ниже.

Возможность доставки однородной дозы с использованием устройства для интраназального введения.

Отсутствие значительной фракции мелких частиц для исключения случайного введения в легкие.

Достаточное содержание лекарственного средства для обеспечения общей дозы лекарственного средства, требуемой для достижения терапевтического действия при введении одной дозы в одну ноздрию.

Достаточное содержание лекарственного средства для доставки общей дозы, составляющей несколько десятков миллиграммов или соответствующей максимальному количеству, допустимому для устройства для доставки.

Достаточное содержание лекарственного средства и характеристики всасывания для обеспечения эффективности даже при заложенности носа, которая может быть связана с аллергией или простудой.

Стабильность при хранении в условиях окружающей среды в течение продолжительного периода времени, предпочтительно по меньшей мере 18 месяцев.

Хороший профиль безопасности и переносимости.

В предпринимавшихся ранее попытках разработки порошкового состава для интраназального введения один или несколько из желательных атрибутов состава не достигались.

Композиции, описанные в настоящем изобретении, разработаны таким образом, чтобы удовлетворять некоторым и предпочтительно всем из указанных желательных атрибутов, где композиции содержат три необходимых компонента: глюкагон или аналог глюкагона, циклодекстрин и фосфолипидное поверхностно-активное вещество.

Глюкагон и аналоги глюкагона.

При использовании в описании и формуле изобретения термин "глюкагон" относится к полипептиду, имеющему последовательность

His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-

Val-Gln-Trp-Leu- Met-Asn-Thr (SEQ ID NO: 1).

Глюкагон можно синтезировать химическими методами, получать при помощи технологии рекомбинантной ДНК или экстрагировать из природных источников. Термин "аналог глюкагона" относится к вариантам указанной последовательности, которые сохраняют способность стимуляции повышения уровня глюкозы в крови *in vivo*, но могут обеспечивать другие преимущества при фармацевтическом применении, такие как повышенная активность, повышенная растворимость или повышенная стабильность.

Примеры аналогов глюкагона, в которых одна аминокислота из природной последовательности заменена на аланин, а также аналоги, содержащие несколько замещений, описаны в Chabenne et al. (2014), содержание которой включено в настоящую заявку посредством ссылки. Типовым аналогом, в котором три аминокислоты модифицированы для обеспечения аналога глюкагона с улучшенной биологической активностью, является [Lys^{17,18}, Glu²¹]-глюкагон. Компания Zealand Pharma описала множество аналогов глюкагона, например, в опубликованных заявках на патент США №№ 20140080757, 2014001733, 20130316941, 20130157935, 20130157929, 20120178670, 20110293586, 20110286982, 20110286981 и 20100204105, содержание которых включено в настоящую заявку посредством ссылок. Сообщается, что указанные аналоги имеют повышенную активность связывания с рецептором GLP по сравнению с рецептором глюкагона, но при этом сохраняют активность глюкагона. Zealand Pharma также проводила клинические испытания аналога глюкагона для лечения гипогликемии, обозначенного как ZP4207. В опубликованной заявке на патент США № 20130053310, содержание которой включено в настоящую заявку посредством ссылки, описаны другие аналоги глюкагона, подходящие для лечения гипогликемии.

Фосфолипидные поверхностно-активные вещества.

Фосфолипиды представляют собой компоненты, распространенные в разнообразных биологических мембранах, которые являются частями клеток и тканей в организме человека, включая слизистую носа. Наиболее распространенными фосфолипидными поверхностно-активными веществами в клетке являются фосфатидилхолины и фосфохолины (PC), при этом фосфатидилглицерины (PG) также являются значимыми компонентами биологических мембран.

PC и PG можно применять в составах согласно настоящему изобретению.

Также можно применять лизофосфолипиды, полученные из диацил-PC или PG путем удаления одной из ацильных групп. Предпочтительные фосфолипиды растворяются в воде или подкисленной воде, при этом при необходимости для увеличения растворимости фосфолипида можно применять фармацевтически приемлемый соразтворитель, такой как этанол, диметилсульфоксид или N-метилпирролидон.

Согласно настоящему изобретению типовыми фосфолипидными поверхностно-активными веществами, которые можно применять в порошковом составе, являются додецилфосфохолин (DPC), 1,2-дидецил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DDPC или "дидецилфосфатидилхолин"), 1-дидецилоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (LLPC или "лизолауроилфосфатидилхолин"), 1,2-диооктаноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (D8PC или "диооктаноилфосфатидилхолин") и 1,2-дилауроил-sn-глицеро-3-фосфо(1'-рац-глицерин) (DLPG или "дилауроилфосфатидилглицерин").

Предпочтительными фосфолипидными поверхностно-активными веществами являются агенты, которые образуют мицеллы, но не двойные слои, в концентрации, в которой их используют для получения порошкового состава. Указанные агенты включают DPC, DDPC, LLPC и D8PC, но не DLPG.

В общем случае образование мицелл, но не двойных слоев, может быть предсказано после изучения структуры фосфолипидных поверхностно-активных веществ, которые состоят из двух или трех частей: фосфорсодержащей холиновой или глицериновой концевой группы, необязательного глицеринового остова и одной или двух ацильных цепей. Длина ацильной цепи и количество ацильных цепей в молекуле важны для определения возможного образования мицеллы или двойного слоя фосфолипидом. Если содержится только одна ацильная цепь, как в случае DPC и LLPC, которые содержат 12 атомов углерода в одной ацильной цепи, то более вероятным является образованием мицелл, но не двойных слоев при условии, что длина ацильной цепи составляет менее 14 атомов. Диацилфосфолипиды содержат две ацильные цепи в молекуле. Если длина каждой цепи составляет менее 12 атомов, то они имеют тенденцию к образованию мицелл. DLPG, DDPC и D8PC представляют собой диацилфосфолипиды. DLPG содержит

по 12 атомов углерода в ацильной цепи и образует двойные слои. DDPC содержит по 10 атомов углерода в ацильной цепи. Он образует двойные слои или мицеллы в зависимости от концентрации (Marsh, 1990). D8PC содержит по 8 атомов углерода в ацильной цепи и образует, главным образом, мицеллы.

В конкретных вариантах реализации изобретения состав содержит один тип фосфолипидного поверхностно-активного вещества. В других вариантах реализации компонент фосфолипидного поверхностно-активного вещества в составе можно получать из смесей фосфолипидных поверхностно-активных веществ, включая, например, комбинацию любых двух, трех или четырех поверхностно-активных веществ, указанных выше.

Циклодекстрины.

Циклодекстрины как класс состоят из 5 или более звеньев α -D-глюкопиранозидов, связанных 1 - >4, как в случае амилозы (крахмал). При использовании в настоящей заявке, тем не менее, термин "циклодекстрины" относится к более распространенным и типовым циклодекстринам, содержащим шесть, семь или восемь остатков глюкозы в кольце с образованием конусной формы, а именно к

α (альфа)-циклодекстрину: молекула, содержащая 6 колец сахаров,

β (бета)-циклодекстрину: молекула, содержащая 7 колец сахаров,

γ (гамма)-циклодекстрину: молекула, содержащая 8 колец сахаров.

Компания Novo Nordisk использовала α -CD в порошковом составе (HypoGon® Nasal) в клинических испытаниях (Stenniger and Aman, 1993; Rosenfalck, 1992). Сообщалось, что растворимость α -CD в воде составляла примерно 5 мас. %.

Два других циклодекстрина, один из которых имеет более низкую растворимость в воде по сравнению с α -CD (β -CD, 1,85 мас. %), и другой имеет более высокую растворимость в воде по сравнению с α -CD (HP- β -CD), подходят для применения в композициях согласно настоящему изобретению так же, как и γ (гамма)-циклодекстрин, который свободно растворяется в воде.

Циклодекстрины в композициях согласно настоящему изобретению выступают в качестве наполнителя и также прикрепляются к поверхности слизистой носа и способствуют всасыванию глюкагона. При доставке в ноздрию основной ингредиент (от 90 до 70 мас. %), а именно циклодекстрин, способствует прикреплению порошка к поверхности слизистой. Чем ниже растворимость циклодекстрина, тем дольше порошок может сохранять физическую мукоадгезивность. На основании характеристик растворимости циклодекстринов можно ожидать, что мукоадгезивность будет снижаться в следующем порядке β -CD > α -CD > HP- β -CD. По указанной причине наиболее предпочтительным наполнителем является β -CD.

Циклодекстрины согласно настоящему изобретению можно применять по отдельности или в виде смесей двух или более циклодекстринов.

Порошковый состав.

Порошковый состав согласно настоящему изобретению содержит три ингредиента, глюкагон или аналог глюкагона, фосфолипидное поверхностно-активное вещество и циклодекстрин, в количествах, которые являются эффективными для обеспечения терапевтического количества глюкагона или аналога глюкагона в таком количестве порошка, которое можно вводить в виде одной дозы в одну ноздрию. В конкретных вариантах реализации порошковый состав содержит:

(a) от 5 до 15 мас. % глюкагона или аналога глюкагона;

(b) от 5 до 51 мас. % фосфолипидного поверхностно-активного вещества;

(c) от 44 до 90 мас. % циклодекстрина и

(d) необязательно до 10 мас. % низкомолекулярной органической кислоты или ее фармацевтически приемлемой водорастворимой соли или сложного эфира.

Как будет показано ниже в примерах, порошковые составы данного типа обладают превосходными свойствами при применении для интраназального введения глюкагона, хотя продукт Jorgensen 1991/Rosenfalck 1992/HypoGon® Nasal, который имел схожий состав ингредиентов, не обеспечивал сравнимые результаты, и после начальных испытаний на субъектах-людях от его использования решили отказаться.

На основании различных описаний, приведенных в данной области техники, полагают, что продукт Jorgensen 1991/Rosenfalck 1992/HypoGon® Nasal содержал глюкагон, DDPC и альфа-CD в массовом отношении 5:10:85. Информация о способе объединения указанных ингредиентов отсутствует. Таким образом, прямое сравнение указанного состава с составом согласно настоящему изобретению не представляется возможным. Тем не менее, доступные данные для каждого состава иллюстрируют, что фактически составы являются различными. Важно отметить, что состав, описанный в Jorgensen 1991/Rosenfalck 1992, вводили в виде разделенных доз, где по половине дозы вводили в каждую ноздрию. Несмотря на то, что указанную операцию можно относительно легко провести в условиях клинического исследования, при практическом использовании указанный способ значительно усложняет неотложное непрофессиональное лечение приступа тяжелой гипогликемии, так как для этого требуется введение двух доз средства для скорой помощи. Также сообщается о приступах чихания у 50% пациентов, которым проводили лечение, что значительно выше по сравнению с уровнем (менее 2%), наблюдаемым для состава, описанного в настоящем изобретении.

Сообщалось, что интраназальное введение порошкового состава Jorgensen 1991 обеспечивает повышение концентрации глюкозы в плазме у взрослых с гипогликемией. У здоровых взрослых с гипогликемией, вызванной инсулином, уровень глюкозы повышался после введения и достигал плато примерно через 45 мин после введения дозы. В противоположность этому лечение с применением инъектируемого глюкагона в указанном исследовании обеспечивало повышение уровня глюкозы от момента введения по меньшей мере до 90 мин (Hvidberg, 1994). В другом исследовании, которое проводили у взрослых с диабетом 1 типа и гипогликемией, вызванной инсулином, уровень глюкозы повышался после введения и достигал плато примерно через 30 мин после интраназального введения дозы, для сравнения для инъектируемого глюкагона указанный период составлял по меньшей мере 90 мин (Rosenfalck, 1992).

В противоположность профилю уровня глюкозы для состава Jorgensen 1991/Rosenfalck 1992 данные, полученные для порошкового состава, описанного в настоящем изобретении, показывают, что концентрация глюкозы в плазме продолжает повышаться в течение по меньшей мере 90 мин после введения дозы (фиг. 7, нижняя линия). Как показано, этот результат сравним с тем, что получали при внутримышечном введении глюкагона в течение такого же периода времени (фиг. 7, верхняя линия).

Сообщалось, что интраназальное введение порошкового состава Jorgensen 1991/Rosenfalck 1992 детям с диабетом 1 типа и индуцированной гипогликемией приводило к повышению концентрации глюкозы в плазме вскоре после введения дозы, максимальный уровень достигался через 25-30 мин после введения дозы, после чего уровень глюкозы снижался, для сравнения после п.к. инъекции уровень глюкозы в плазме продолжал повышаться в течение по меньшей мере 45 мин (Stenninger, 1993). Максимальные значения уровня глюкагона после лечения наблюдали примерно через 10 мин после интраназального введения (Rosenfalck 1992; Stenninger 1993). В отличие от профиля уровня глюкозы, наблюдаемого для состава Jorgensen 1991/Rosenfalck 1992, данные, полученные у детей (12- <17 лет) при введении порошкового состава, описанного в настоящем изобретении, указывают на повышение концентрации глюкозы в плазме в течение по меньшей мере 60 мин после введения дозы (фиг. 8В). Кроме того, максимальная концентрация глюкагона в плазме достигалась не раньше чем через примерно 20 мин после введения дозы (фиг. 8А).

Так как приступы тяжелой гипогликемии не поддаются прогнозированию и могут возникать у лиц, принимающих инсулин, имеющих заложенность носа, то было проведено исследование для оценки РК и PD предложенного порошкового состава в указанной ситуации. Согласно описанию эксперимента 11, и как показано на фиг. 9А и 9В, заложенность носа не влияла отрицательно на фармакокинетику и фармакодинамику после лечения с применением интраназального порошка согласно настоящему изобретению. Этот факт подтверждает возможность применения настоящего изобретения для лечения приступов тяжелой гипогликемии у людей, которые могут страдать от заложенности носа. У людей без заложенности носа время достижения максимального уровня глюкагона в плазме составляло примерно 20 мин после введения дозы. Какие-либо сообщения или данные о возможности применения состава Jorgensen 1991/Rosenfalck 1992 для лечения лиц с заложенностью носа, которую можно наблюдать у людей, страдающих от простуды или сезонного аллергического ринита, отсутствуют.

Заявитель полагает, что указанные различия результатов определяются структурными различиями между предложенным порошковым составом и порошком Jorgensen 1991/Rosenfalck 1992. Как будет обсуждаться далее, совместное растворение фосфолипидного и циклодекстринового компонента и последующая сушка и получение порошка обеспечивают образование некоторой структуры, которая имеет характеристический пик XRPD, который отсутствует в спектрах каждого отдельного из указанных материалов. Указанный пик сохраняется при добавлении глюкагона в композицию. Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, полагают, что глюкагон или аналог глюкагона образует ассоциаты с мицеллярным фосфолипидом в растворе, и после сушки некоторая степень ассоциации сохраняется при том, что разрушение структуры, образованной фосфолипидом и циклодекстрином, не происходит, и указанная ассоциация более эффективно обеспечивает глюкагон для интраназального всасывания. Таким образом, предложенный порошковый состав представляет собой не просто смесь трех компонентов, но, напротив, содержит уникальную физическую структуру, которая поддается обнаружению при помощи способов рентгеновской порошковой дифракции.

Полученные сведения о структуре состава согласно настоящему изобретению согласуются с известной информацией о взаимодействии глюкагона с фосфолипидными поверхностно-активными веществами. Глюкагон образует сложные структуры с мольным отношением фосфолипид:глюкагон примерно 55:1 (Epand & Sturtevant, 1982). Также было показано, что глюкагон может связывать до 50 молекул фосфолипидов, и 20 из них связаны очень плотно (Epand & Sturtevant, 1981). Boesch с соавторами (1980) и Brown с соавторами (1981) сообщали, что конформация глюкагона, связанного с различными мицеллярными липидами, включая DPC, практически не зависит от типа липида. Конформация описана как четко определенная и в значительной степени вытянутая. Сообщалось, что комплекс DPC:глюкагон имеет стехиометрию 40:1. Указанные авторы также предположили, что конформация глюкагона, связанного с мицеллами, очень похожа на конформацию глюкагона, связанного с двойными слоями липидов.

Мольное отношение фосфолипид (DPC, DDPC, LLPC, D8PC или DLPG):глюкагон при массовом отношении 10:10, а в некоторых предпочтительных составах согласно настоящему изобретению от 6:1 до

10:1, позволяет предположить, что фосфолипиды с большой долей вероятности очень плотно связаны с глюкагоном в порошковых составах для интраназального введения.

В исследованиях рентгеновской порошковой дифракции порошкового состава согласно настоящему изобретению явным образом показано наличие пиков, вероятно связанных с мицеллярной или мезофазной структурой, присутствующей в составе. Указанные пики характеризуются небольшими углами дифракции ($6,6^\circ 2\theta$ для DPC и $7,3^\circ 2\theta$ для DDPG) (фиг. 6). Указанные одинаковые пики присутствуют в образцах, в которых не содержится глюкагон, и в настоящей заявке их называют "мезопики XRPD". Указанный мезопик XRPD является характеристическим для порошковых составов согласно настоящему изобретению.

На фиг. 6 приведено наложение рентгеновских порошковых дифрактограмм для композиций глюкагон-DPC- β -циклодекстрина (File 474320) и глюкагон-DDPG- β -циклодекстрина (File 407476). Дифрактограммы содержат пики при больших значениях углов, что соответствует наличию кристаллического циклодекстрина (например, пик 61 примерно при $18-20^\circ 2\theta$), что является вполне ожидаемым, так как циклодекстрин присутствует в значительном избытке по сравнению с фосфолипидом и глюкагоном. Кроме того, каждая дифрактограмма содержит пик при низком угле дифракции при $6,6$ и $7,3^\circ 2\theta$ соответственно. Указанные пики также присутствуют в образцах, не содержащих глюкагон, которые получали путем растворения фосфолипида в концентрации мицеллообразования, добавления циклодекстрина и последующей сушки полученного раствора. При использовании в настоящей заявке утверждение "по меньшей мере часть порошка присутствует в фазе, характеризующейся мезопиком XRPD при определении путем рентгеновской порошковой дифракции" обозначает, что пики при низких углах поддаются обнаружению на дифрактограмме рентгеновской порошковой дифракции, и они явным образом отличаются от шумов при измерении. В предпочтительных вариантах реализации размер мезопика XRPD (определенный по высоте пика) составляет примерно 30% от высоты пика примерно при $18-20^\circ 2\theta$ (как в случае дифрактограммы File 407476 на фиг. 6) или более и может быть примерно равен высоте указанного пика (как в случае дифрактограммы File 474320 на фиг. 6).

Образование фазы, характеризующейся мезопиком XRPD, наблюдали в образцах, содержащих или не содержащих глюкагон, полученных с использованием различных составов и способов сушки. Было замечено, что некоторые изменения формы и положения мезопика XRPD могут происходить в зависимости от условий сушки. Например, в одном из экспериментов наблюдали, что лиофилизация повышенных количеств образца, которая приводит к образованию более толстого замороженного слоя и увеличению времени сушки, обеспечивает появление двух расширенных и перекрывающихся мезопиков XRPD.

Дополнительное преимущество настоящего изобретения заключается в том, что его можно применять для неотложного лечения даже в экстремальных условиях окружающей среды, в частности на холоде. Состав согласно настоящему изобретению можно применять напрямую, даже при отрицательной температуре, и в исследованиях было показано, что порошок, который хранят при -20°C , можно применять непосредственно при приемлемом уровне доставки и захвата глюкагона. В противоположность этому наборы первой помощи, содержащие жидкий носитель для перерастворения глюкагона перед применением, необходимо выдерживать при температуре выше температуры замерзания носителя. Аналогично растворы глюкагона также необходимо выдерживать при температуре выше температуры замерзания раствора, которая может быть повышенной, если для увеличения стабильности раствора применяют растворитель, такой как ДМСО.

Способ получения композиций согласно настоящему изобретению.

Дополнительный аспект настоящего изобретения представляет собой способ получения порошкового состава, имеющего активность глюкагона, содержащего глюкагон или аналог глюкагона, циклодекстрина и фосфолипидное поверхностно-активное вещество, где по меньшей мере часть порошка находится в фазе, характеризующейся мезопиком XRPD, при определении путем рентгеновской порошковой дифракции. Способ включает стадии:

a) получения первой смеси глюкагона и поверхностно-активного вещества в водном носителе, где поверхностно-активное вещество содержится в концентрации, равной критической концентрации мицеллообразования или превышающей ее;

b) добавления β -циклодекстрина к указанной первой смеси с получением второй смеси;

c) сушки второй смеси с получением твердого состава; и

d) обработки указанного твердого состава с получением однородного порошка, где по меньшей мере часть указанного однородного порошка находится в фазе, характеризующейся мезопиком XRPD.

Стадию a), получение первой смеси, можно проводить путем добавления глюкагона или аналога глюкагона в растворитель, например в воду, и последующего добавления поверхностно-активного вещества. В качестве альтернативы сначала можно растворять поверхностно-активное вещество, а затем добавлять глюкагон или аналог глюкагона. Два компонента смеси также можно растворять по отдельности и затем объединять с получением первой смеси.

Растворитель предпочтительно подкисляют до pH 4 или менее для увеличения растворимости глюкагона. Подкисление можно проводить при помощи минеральной кислоты, такой как HCl, фосфорная

кислота или серная кислота, или органической кислоты, такой как уксусная кислота, лимонная кислота и гликолевая кислота, или с использованием комбинации минеральной кислоты и органической кислоты. В предпочтительных составах кислота представляет собой уксусную кислоту.

Количество растворителя, применяемого для получения первой смеси, является достаточным для растворения глюкогона и фосфолипидного поверхностно-активного вещества в первой смеси. Можно применять избыток растворителя, хотя большой избыток приводит к увеличению продолжительности и затрат энергии на стадии сушки и поэтому не является предпочтительным.

Циклодекстрин можно добавлять в первую смесь в виде твердого вещества или в растворителе, таком как вода, с получением второй смеси. Смешение можно проводить при помощи способов, включая статическое и динамическое смешение. Динамическое смешение можно осуществлять с применением лезвия, погруженного в жидкость, присоединенного к приводу и вращаемого двигателем. Статическое смешение можно осуществлять путем пропускания потока жидкости по извилистому маршруту внутри статического смесителя.

Наличие поверхности раздела воздух-вода в условиях высокоскоростного смешения может приводить к пенообразованию. Высокоскоростное смешение, в свою очередь, также может приводить к деаэрации белка вследствие сдвигового напряжения. Для минимизации пенообразования и предпочтительно его устранения предпочтительными являются условия низкоскоростного смешения. В случае динамического смешения скорость определяют в оборотах в минуту (об/мин) смесителя. Предпочтительные значения составляют от 100 до 1000 об/мин. В случае статического смешения условия с низким сдвиговым усилием обеспечивают путем подбора насоса, который делает возможным образование неламинарного потока.

Вторую смесь сушат для удаления растворителя (например, воды) и получения твердого продукта. Сушку можно проводить путем лиофилизации, сушки распылением, полочной сушки или при помощи других способов. Макроскопические физические характеристики продукта могут быть различными в зависимости от способа сушки и могут соответствовать хлопьевидному твердому веществу в случае лиофилизации или высушенному твердому осадку. Независимо от способа, применяемого для сушки, удаление избытка воды из состава в значительной степени влияет на характеристики и стабильность порошка.

Порошки с избыточным содержанием влаги могут слипаться и образовывать комки, что приводит к получению порошка, которым трудно заполнять устройство для введения. Важно отметить, что содержание остаточной воды напрямую влияет на стабильность. В случае глюкогона хорошо известно, что вода нежелательным образом влияет на стабильность и физические характеристики. В частности, в присутствии избытка воды глюкогон образует амилоидные волокна, которые отрицательно влияют на стабильность и профиль токсичности глюкогона (Pederson 2010). Вследствие указанной тенденции к образованию амилоидных волокон доступные в настоящее время продукты глюкогона поставляют в виде порошка, который необходимо растворять в воде непосредственно перед применением. Вода также может отрицательно влиять на стабильность глюкогона вследствие возможного гидролиза, окисления и деаминирования. В связи с этим для составов согласно настоящему изобретению были получены данные, в которых было показано содержание остаточной влаги более 5% в массе порошка обеспечивает пониженную стабильность по сравнению с порошком, в котором содержание остаточной воды составляет менее 5%. Подходящие порошки для интраназального введения, таким образом, как правило, имеют содержание остаточной воды менее 5%.

Подходящие порошки для интраназального введения, как правило, имеют такое распределение частиц по размерам, при котором размер большинства частиц составляет более чем примерно 10 мкм и менее чем примерно 1000 мкм. Предпочтительно распределение частиц по размерам является таким, что D10 находится в диапазоне 3-75 мкм, D50 находится в диапазоне от 15 до 450 мкм, D90 находится в диапазоне 80-1000 мкм, и ширина диапазона составляет от 1,5 до 15.

Для порошков, подходящих для интраназального введения, требуются физические характеристики, которые обеспечивали бы достаточную текучесть, которая позволяет наполнять ими устройство для введения в нос. Текучесть определяется различными параметрами, включая размер частиц, форму, плотность, текстуру поверхности, площадь поверхности, плотность, когезию, адгезию, эластичность, пористость, гигроскопичность и истираемость.

Порошки, имеющие соответствующий размер частиц и характеристики текучести, можно получать путем обработки порошка в массе для удаления слишком мелких или крупных частиц. Способы обработки порошка в массе для удаления слишком мелких или крупных частиц могут включать измельчение порошка в массе для разрушения более крупных частиц и просеивание для выделения частиц с желаемым диапазоном размеров. Можно проводить различные способы просеивания, включая вибрационное просеивание, горизонтальное просеивание, наклонное просеивание, ультразвуковое просеивание и просеивание с использованием круглой струи воздуха. Можно использовать отдельные сита с фиксированным номинальным размером ячеек, или можно обрабатывать массу порошка, пропуская ее через последовательность сит с постепенно уменьшающимся размером ячеек для достижения желаемого распределения частиц по размерам. Сита могут представлять собой сита из плетеной проволоки с номинальным

размером ячеек в диапазоне 25-1000 мкм.

Профиль распыления и форма струи при введении порошка с применением устройства для интраназального введения порошка являются важными характеристиками, которые определяют площадь поверхности внутри носовой полости, на которой осаждается интраназальный порошок. Подходящие характеристики распыления согласно настоящему изобретению включают минимальный диаметр (D_{min}) 5-25 мм, максимальный диаметр (D_{max}) от 10 до 60 мм и коэффициент овальности от 0,5 до 6. Специфические профили распыления, наблюдаемые для составов согласно настоящему изобретению, приведены в следующей таблице:

Профиль распыления					
D_{min} (мм)		D_{max} (мм)		Коэффициент овальности	
(min/max)	(средний)	(min/max)	(средний)	(min/max)	(средний)
10,7-21,9	13,9	14,5-42,9	23,6	1,1-3,6	1,7

Подходящие характеристики формы струи согласно настоящему изобретению включают угол распыления в диапазоне от 20 до 75° и ширину струи в диапазоне от 10 до 50 мм. В следующей таблице приведена информация о геометрии струи для нескольких партий порошка согласно настоящему изобретению:

Геометрия струи			
Угол распыления (°)		Ширина струи (мм)	
(min/max)	(средний)	(min/max)	(средняя)
28,31-65,2	44,8	15,2-38,4	25,0

Введение композиций согласно настоящему изобретению и аппликаторы для композиций согласно настоящему изобретению.

Несмотря на то, что в способе согласно настоящему изобретению можно использовать любые методики введения порошка в нос пользователя, порошковую композицию согласно настоящему изобретению эффективно обеспечивают в специально разработанном интраназальном аппликаторе, который сохраняет порошок в чистом, сухом и готовом к применению состоянии перед использованием и затем обеспечивает доставку порошка в слизистую носа пользователя. Указанные аппликаторы известны в данной области техники, в общем случае содержат резервуар для порошкового состава и порошковый состав, содержащийся внутри резервуара, и механизм для удаления порошкового резервуара через распыляющий блок, вставляемый в ноздрю.

Аппликатор выбирают таким образом, чтобы он мог обеспечивать достаточное количество порошкового состава за одну операцию инсuffляции/введения для достижения терапевтической дозы. Для порошков с пониженным содержанием глюкагона или аналога глюкагона в составе требуются более крупные резервуары и емкость доставки, тогда как для составов с более высоким процентным содержанием можно применять более мелкие резервуары и емкость доставки.

Конкретные подходящие устройства для доставки описаны в патентах США №№ 6398074 и 6938798, содержание которых включено в настоящую заявку посредством ссылок. Фиг. 10 взята из патента '074 для иллюстрации подходящего устройства. На фиг. 10 резервуар 810 содержит одну дозу состава согласно настоящему изобретению. Резервуар 810 содержит блок подвода воздуха 811 и блок вывода продукта 815. Устройство для удерживания продукта 812 и/или 813 расположено в блоке подвода воздуха 811 для сохранения продукта в резервуаре 810 перед удалением продукта. Блок вывода продукта 815 заблокирован предпочтительно герметично при помощи блокирующего шарика 816, который удаляется из блокирующего положения потоком воздуха при распылении продукта.

Пользователь при активации устройства давит на плунжер 825 таким образом, чтобы поршень 821 сжимал воздух, содержащийся в камере 822 для воздушной струи 820. Так как сетка 812 проницаема для воздуха, то сжатие воздуха в камере 822 передается в резервуар 810 и затем на блокирующий шарик 816, который блокирует блок вывода продукта 815. Размеры блокирующего шарика 816 и его расположение в блоке вывода продукта из резервуара 815 подобраны таким образом, чтобы шарик 816 удалялся из блокирующего положения при создании минимального предварительно определенного давления в резервуаре 810 под действием указанной воздушной струи 820. Таким образом, при достижении указанного минимального давления шарик внезапно сдвигается по каналу для вывода 840 устройства, и поток воздуха, создаваемый воздушной струей 820 выдавливает всю дозу, содержащуюся в резервуаре 810. Предварительное сжатие, создаваемое указанным блокирующим шариком 816, делает возможной ситуацию, когда при удалении шарика из блокирующего положения, энергия, накапливаемая в руке пользователя, является достаточной, чтобы поршень 821, образующий единый блок с плунжером 825, проталкивался внутри камеры 822 и создавал тем самым мощный поток воздуха, то есть поток воздуха, подходящий для мелкого распыления дозы продукта и, что важно, для недопущения образования каких-либо агломератов продукта в случае, если продукт представляет собой порошок.

Другим примером устройства-аппликатора, подходящего для применения в комбинации с порошковой композицией согласно настоящему изобретению, является устройство, описанное в опубликован-

ной заявке на патент США № 20110045088, содержание которой включено в настоящую заявку посредством ссылки. Также можно применять устройство, показанное в патенте США № 7722566, в частности такое, как показано на фиг. 1 и 7 указанного патента, так как при применении порошка согласно настоящему изобретению введение в обе ноздри не требуется.

Дополнительные примеры устройств-аппликаторов для интраназального введения порошковой композиции известны из WO 2014004400 и патента США № 5702362, содержание которых включено в настоящую заявку посредством ссылок.

Экспериментальная часть

Пример 1.

Глюкагон, DPC и α -CD, β -CD или HP- β -CD растворяли в 0,01н. или 0,1н. растворе HCl. Также получали составы с использованием 1 М уксусной кислоты или 0,5 М уксусной кислоты. Массовое отношение глюкагон:DPC:циклодекстрин находилось в диапазоне от 5:10:75 до 10:20:70. В двух отдельных экспериментах в качестве добавки вводили цитрат натрия или лимонную кислоту. Лиофилизированный порошок помещали в устройство для доставки в ноздрю. Порошок доставляли интраназально биглям в дозе 500, 750 или 1000 мкг. Порошок вводили 3 или 6 собакам в группе. Измеряли концентрацию глюкозы в плазме при помощи глюкометра. Концентрации глюкозы в плазме перед введением (0 мин) и через 5, 10, 20, 30, 40 и 60 мин после интраназального введения показаны в табл. 1. В табл. 1 "отношение" относится к отношению глюкагон:DPC:циклодекстрин или к отношению глюкагон:DPC:циклодекстрин:добавка.

Таблица 1
Средняя концентрация глюкозы в плазме (ммоль/л) у биглей
после интраназального введения композиций глюкагон:DPC:CD

Отношение	CD	Доза в ноздри (мкг)	Ноздри	К-та	Добавка	Концентрация глюкозы в плазме (ммоль/л)							
						0 мин	5 мин	10 мин	20 мин	30 мин	40 мин	60 мин	
5:25:70	α -CD	500	1	0,1н. HCl	Нет	3,7	3,4	6,1	6,3	3,6	2,4	3,4	
5:25:70	α -CD	750	1	0,1н. HCl	Нет	3,7	3,7	4,4	4,7	6,9	5,0	3,8	
5:25:70	α -CD	1000	1	0,1н. HCl	Нет	3,7	3,9	4,8	7,9	5,8	3,5	3,2	
5:25:70	α -CD	500	2	0,1н. HCl	Нет	3,3	3,3	3,7	4,1	4,0	3,2	3,5	
5:40:55	α -CD	500	1	0,1н. HCl	Нет	3,7	3,6	3,8	3,8	3,5	4,2	4,2	
5:40:55	α -CD	1000	1	0,1н. HCl	Нет	3,6	3,6	4,3	6,7	5,1	3,8	3,2	
5:25:70	α -CD	750	1	0,1н. HCl	Нет	3,7	3,5	4,2	4,3	4,3	4,1	4,0	
10:30:60	HP- β - CD	750	1	0,1н. HCl	Нет	3,7	4,2	5,2	5,4	5,0	4,4	3,9	
10:30:60	HP- β - CD	750	1	0,1н. HCl	Нет	3,4	4,2	5,2	5,1	4,9	4,0	3,7	
10:70:10:10	α -CD	750	1	0,1н. HCl	Лимон. к-та	3,6	5,2	6,0	6,2	5,9	4,5	3,3	
10:70:10:10	α -CD	750	1	0,1н. HCl	Цитрат натрия	3,7	5,4	6,6	6,3	5,5	4,4	3,9	
10:10:80	α -CD	750	1	0,1н. HCl	Нет	3,8	5,6	7,3	9,0	8,0	6,0	3,1	
10:10:80	α -CD	750	1	0,1н. HCl	Нет	4,0	4,1	5,1	5,6	6,1	6,1	5,7	
5:10:85	α -CD	750	1	0,1н. HCl	Нет	3,9	3,8	4,4	4,2	4,1	4,0	4,0	
10:10:80	β -CD	750	1	0,1н. HCl	Нет	3,8	4,7	7,0	7,7	8,1	6,7	5,2	
10:10:80	α -CD	600	1	0,01 н. HCl	Нет	4,0	4,3	5,7	5,6	5,5	4,6	4,0	
10:10:80	β -CD	750	1	0,01 н. HCl	Нет	4,5	5,1	6,6	7,2	6,8	5,5	4,8	
10:10:80	β -CD	600	1	0,01 н. HCl	Нет	4,0	4,3	5,4	4,9	4,9	3,6	3,7	
10:10:80	β -CD	1000	1	0,01 н. HCl	Нет	4,4	7,4	8,7	8,8	8,1	5,9	4,6	
10:10:80	β -CD	750	1	0,01 н. HCl	Нет	4,4	5,4	6,8	6,1	5,1	4,0	4,0	
10:10:80	β -CD	500	1	0,01 н. HCl	Нет	4,4	5,4	7,3	6,6	6,1	4,9	4,3	
10:10:80	β -CD	500	1	1М укс. к- та	Нет	4,40	5,08	6,00	5,80	5,17	4,65	4,53	
10:10:80	β -CD	1000	1	1М укс. к- та	Нет	3,80	5,08	8,22	9,74	10,0	7,96	6,44	
10:10:80	β -CD	2000	1	1М укс. к- та	Нет	4,23	6,50	10,2	12,3	12,7	11,2	8,85	

Для всех композиций (полученных с использованием различных концентраций кислоты, различных

кислот, различными отношениями трех ингредиентов, в присутствии лимонной кислоты или цитрата натрия, в различных дозах, доставляемых в одну ноздрию или две ноздри) наблюдали увеличение уровня глюкозы в плазме в интервале от 10 до 30 мин, затем снижение через 40 мин и дополнительное снижение через 60 мин. Например, результаты для композиции 10:10:80 с β -CD и 0,01н. HCl при введении 1000 мкг дозы в одну ноздрию показаны на фиг. 1.

Пример 2.

Глюкагон, DDPG и α -CD, β -CD или гидроксипропил- β -CD растворяли в 0,01н. или 0,1н. растворе HCl. Массовое отношение глюкагон:DDPG:циклодекстрин находилось в диапазоне от 5:10:75 до 10:20:70. В одном исследовании также добавляли цитрат натрия. Порошок помещали в устройство для доставки в ноздрию. Порошок доставляли интраназально биглям в дозе 500, 750 или 1000 мкг. Порошок вводили 3 или 6 собакам в группе. Концентрацию глюкозы в плазме измеряли при помощи глюкометра. Результаты показаны в следующей таблице. Концентрация глюкозы в плазме перед введением (0 мин) и через 5, 10, 20, 30, 40 и 60 мин после интраназального введения показаны в табл. 2. В табл. 2 "отношение" относится к отношению глюкагон:DDPG:циклодекстрин или к отношению глюкагон:DDPG:циклодекстрин:добавка.

Таблица 2

Средняя концентрация глюкозы в плазме (ммоль/л) у биглей
после интраназального введения композиций глюкагон:DDPG:CD

Отношение	CD	Доза в ноздрию (мкг)	Ноздрии	К-та	Добавка	Концентрация глюкозы в плазме (ммоль/л)							
						0 мин	5 мин	10 мин	20 мин	30 мин	40 мин	60 мин	
5:10:85	α -CD	500	1	0,1н. HCl	None	5:10:85, α -CD, 500 мкг, 1 ноздрия	3,8	3,7	4,6	6,0	6,3	4,3	3,4
5:10:85	α -CD	750	1	0,1н. HCl	None	5:10:85, α -CD, 750 мкг, 1 ноздрия	3,6	3,8	7,8	7,6	8,3	4,7	3,3
5:10:85	α -CD	1000	1	0,1н. HCl	None	5:10:85, α -CD, 1000 мкг, 1 ноздрия	3,8	4,0	4,7	7,4	7,1	4,3	3,8
5:10:85	α -CD	500	2	0,1н. HCl	None	5:10:85, α -CD, 500 мкг в ноздрию, 2 ноздрии	3,4	3,1	3,4	5,3	5,0	3,2	3,2
5:51:44	α -CD	500	1	0,1н. HCl	None	5:51:44, α -CD, 500 мкг, 1 ноздрия	3,3	3,2	4,0	4,6	4,3	3,6	3,9
5:51:44	α -CD	500	2	0,1н. HCl	None	5:51:44, α -CD, 500 мкг в ноздрию, 2 ноздрии	3,4	2,8	4,0	4,8	3,8	3,6	3,7
5:10:85	α -CD	750	1	0,1н. HCl	None	5:10:85, α -CD, 750 мкг, 1 ноздрия	3,7	5,1	6,4	7,5	7,9	7,3	6,3
10:41:49	HP- β -CD	750	1	0,1н. HCl	None	10:41:49, HP- β -CD, 750 мкг, 1 ноздрия	3,7	3,5	4,1	4,0	4,0	3,8	3,9
10:41:49	HP- β -CD	750	1	0,1н. HCl	None	10:41:49, HP- β -CD, 750 мкг, 1 ноздрия	3,7	4,6	5,6	5,5	4,9	4,1	3,7
10:25:55:10	α -CD	750	1	0,1н. HCl	Sodium Citrate	10:25:55:10, α -CD, цитрат натрия, 750 мкг, 1 ноздрия	3,6	4,8	6,3	6,3	5,5	4,6	4,0
10:20:70	α -CD	750	1	0,1н. HCl	None	10:20:70, α -CD, 750 мкг, 1 ноздрия	3,5	3,9	4,4	4,3	4,4	4,0	3,9
10:10:80	α -CD	750	1	0,1н. HCl	None	10:10:80, α -CD, 750 мкг, 1 ноздрия	3,5	5,3	6,7	7,8	6,7	5,3	3,7
	CD			HCl		750 мкг, 1 ноздрия							
10:10:80	α -CD	750	1	0,1н. HCl	None	10:10:80, α -CD, 750 мкг, 1 ноздрия	3,8	4,9	5,5	6,9	5,6	4,4	4,0
5:10:85	α -CD	750	1	0,1н. HCl	None	5:10:85, α -CD, 750 мкг, 1 ноздрия	4,0	4,3	5,2	5,6	5,6	5,6	5,2
10:10:80	β -CD	750	1	0,1н. HCl	None	10:10:80, β -CD, 750 мкг, 1 ноздрия	3,6	4,7	6,8	6,5	6,1	4,6	4,0
10:10:80	β -CD	700	1	0,1н. HCl	None	10:10:80, β -CD, 700 мкг, 1 ноздрия	4,0	5,5	7,1	6,9	7,0	5,2	4,3
10:10:80	α -CD	750	1	0,01 н. HCl	None	10:10:80, α -CD, 750 мкг, 1 ноздрия, 0,01н. HCl	4,3	4,7	6,0	6,4	6,5	5,1	4,5
10:10:80	β -CD	1000	1	0,01 н. HCl	None	10:10:80, β -CD, 1000 мкг, 1 ноздрия, 0,01н. HCl	4,2	6,4	8,7	8,5	7,5	4,6	3,6
10:10:80	β -CD	750	1	0,01 н. HCl	None	10:10:80, β -CD, 750 мкг, 1 ноздрия, 0,01н. HCl	4,5	6,1	6,4	6,4	5,8	4,4	3,9
10:10:80	β -CD	500	1	0,01 н. HCl	None	10:10:80, β -CD, 500 мкг, 1 ноздрия, 0,01н. HCl	4,4	5,8	6,8	5,4	4,6	4,0	4,1

Для всех композиций (полученных с использованием различных концентраций кислоты, различных циклодекстринов, различных отношений компонентов, в различных дозах, доставляемых в одну ноздрию или две ноздри) наблюдали увеличение концентрации глюкозы в плазме в интервале от 10 до 30 мин, затем снижение через 40 мин и дополнительное снижение через 60 мин. Например, результаты для композиции 10:10:80 с β -CD, которую вводили в 1000 мкг дозе, доставляемой в одну ноздрию, показаны на фиг. 2.

Пример 3.

Глюкагон, LLPC и β -CD растворяли в 0,01н. или 0,1н. растворе HCl. Массовое отношение глюкагон:LLPC: β -CD составляло 10:10:80. Порошок помещали в устройство для доставки в одну ноздрю. Порошок доставляли интраназально биглям в дозе 750 или 1000 мкг. Порошок вводили 6 собакам в группе. Концентрацию глюкозы в плазме измеряли с использованием тест-полоски для определения глюкозы. Концентрации глюкозы в плазме перед введением (0 мин) и через 5, 10, 20, 30, 40 и 60 мин после интраназального введения показаны в табл. 3.

Таблица 3

Средняя концентрация глюкозы в плазме (ммоль/л) у биглей после интраназального введения композиций глюкагон:LLPC:CD

Доза в мкг	Кислота	Концентрация глюкозы в плазме (ммоль/л)						
		0 мин	5 мин	10 мин	20 мин	30 мин	40 мин	60 мин
750	0,1н. HCl	3,8	4,8	6,6	6,9	6,1	4,4	4,0
750	0,1н. HCl	4,2	4,5	5,8	5,7	5,7	5,2	4,6
1000	0,01н. HCl	4,5	6,6	7,6	7,3	7,4	5,4	4,2

Для всех композиций (в различных дозах, доставляемых в одну ноздрю) наблюдали увеличение концентрации глюкозы в плазме в интервале от 10 до 20 мин, затем снижение через 30 или 40 мин и дополнительное снижение через 40 или 60 мин. Например, результаты для композиции 10:10:80 с β -CD, которую вводили в 1000 мкг дозе в одну ноздрю, показаны на фиг. 3.

Пример 4.

Глюкагон, D8PC и β -CD растворяли в 0,01н. или 0,1н. растворе HCl. Массовое отношение глюкагон:D8PC: β -CD составляло 10:10:80. Порошок помещали в устройство для доставки в ноздрю. Порошок доставляли интраназально биглям. Порошок вводили 6 собакам в группе. Концентрацию глюкозы в плазме измеряли при помощи тест-полоски для определения глюкозы. Концентрации глюкозы в плазме перед введением (0 мин) и через 5, 10, 20, 30, 40 и 60 мин после введения показаны в табл. 4.

Таблица 4

Средняя концентрация глюкозы в плазме (ммоль/л) у биглей после интраназального введения композиций глюкагон:D8PC:CD

Кислота	Концентрация глюкозы в плазме (ммоль/л)						
	0 мин	5 мин	10 мин	20 мин	30 мин	40 мин	60 мин
0,1н. HCl	4,0	5,4	7,4	7,7	7,4	6,0	4,8
0,01н. HCl	3,5	4,0	4,8	4,5	4,3	4,0	3,9
0,01н. HCl	4,1	4,7	6,3	5,7	5,0	3,9	3,9
0,01н. HCl	3,7	4,3	5,4	5,4	5,3	4,7	4,4

Для всех композиций (полученных с использованием различных концентраций кислоты, доставляемых в одну ноздрю) наблюдали увеличение концентрации глюкозы в плазме в интервале от 10 до 20 мин, затем снижение через 30 или 40 мин и дополнительное снижение через 40 или 60 мин. Например, результаты для композиции 10:10:80 с β -CD, которую вводили в 750 мкг дозе в одну ноздрю, показаны на фиг. 4.

Пример 5.

Глюкагон, DLPG и α -CD растворяли в 0,1н. растворе HCl. Массовое отношение глюкагон:DLPG: α -CD составляло 5:25:70 или 5:54:41. В отдельном эксперименте глюкагон, DLPG и β -CD растворяли в 0,1н. растворе HCl при массовом отношении 10:10:80. Полученные растворы лиофилизировали с получением порошка. Порошок помещали в устройство для доставки в ноздрю. Порошок доставляли в одну ноздрю или две ноздри биглям. Порошок вводили 3 или 6 собакам. Концентрацию глюкозы в плазме измеряли при помощи тест-полоски для определения глюкозы. Результаты показаны в следующей таблице. Массовое отношение глюкагон:DLPG: α -CD (или β -CD), доза глюкагона на ноздрю и проведение доставки порошка в одну или обе ноздри указаны в таблице. Концентрации глюкозы в плазме перед введением (0 мин) и через 5, 10, 20, 30, 40 и 60 мин после интраназального введения показаны в табл. 5.

Таблица 5

Средняя концентрация глюкозы в плазме (ммоль/л) у биглей после интраназального введения композиций глюкагон:DLPG:CD

Отн.	CD	Доза в ноздрию в мкг	Ноздри	Концентрация глюкозы в плазме (ммоль/л)						
				0 мин	5 мин	10 мин	20 мин	30 мин	40 мин	60 мин
5:25:70	α -CD	500	1	3,9	3,9	4,1	4,0	4,6	4,4	4,1
5:25:70	α -CD	750	1	3,8	3,5	5,3	6,6	7,2	4,6	3,6
5:25:70	α -CD	1000	1	3,4	4,0	4,4	5,7	4,4	3,7	4,3
5:25:70	α -CD	500	2	3,8	3,1	3,1	3,2	4,3	4,1	4,0
5:54:41	α -CD	500	1	3,4	3,0	3,2	4,2	3,2	4,3	4,0
10:10:80	β -CD	750	1	4,2	4,7	6,1	6,0	5,5	4,6	4,0

Для всех композиций (полученных с использованием различных циклодекстринов, различных от-

ношений компонентов, в различных дозах, доставляемых в одну ноздрию или две ноздри) наблюдали увеличение концентрации глюкозы в плазме в интервале от 10 до 30 мин, затем снижение через 40 мин и дополнительное снижение через 60 мин. Например, результаты для композиции 5:25:70 с α -CD, которую вводили в 750 мкг дозе в одну ноздрию, для которой отмечали наивысшую концентрацию глюкозы в плазме, показаны на фиг. 5.

Пример 6.

Для определения структуры композиций глюкагон-DPC- β -циклодекстрин и глюкагон-DDPC- β -циклодекстрин использовали рентгеновскую порошковую дифракцию. Указанные композиции имели пики при небольших углах ($6,6^\circ 2\theta$ в случае DPC и $7,3^\circ 2\theta$ в случае DDPC), что соответствует мезофазе (фиг. 6). Указанные пики отсутствуют для глюкагона, так как он представляет собой аморфный порошок. Они также отсутствуют для β -циклодекстрина, который имеет характеристическую кристаллическую форму. Кроме того, они отсутствуют и для поверхностно-активного вещества, DPC. Указанные пики присутствуют для смесей DDPC (или DPC) и β -циклодекстрина в отсутствие глюкагона. Композиции согласно настоящему изобретению характеризуются мезофазой, которая обнаруживается при указанных низких углах дифракции.

Пример 7.

Профиль взвешенного по объему распределения, который использовали для вычисления D_{10} , D_{50} и D_{90} , приведен в табл. 6.

Таблица 6

Диаметр 10% частиц (D_{10}), 50% частиц (D_{50}) и 90% частиц (D_{90})

Пов.-акт. в-во	Кислота	D_{10} (мкм)	D_{50} (мкм)	D_{90} (мкм)
DDPC	0,1н. HCl	6,063	11,77	21,86
DPC	0,1н. HCl	6,63	66,51	426
DPC, ультразвук	0,1н. HCl	3,6	10,68	21,77
D8PC	0,1н. HCl	7,926	17,97	35,34
LLPC	0,1н. HCl	8,031	15,31	28,89
DPC	1М уксусная к-та	6,867	92,480	537,471

Анализ размера частиц показывает, что небольшая часть частиц в шести различных порошковых составах имеет эффективный диаметр в диапазоне от 3,6 до 8,031 мкм. Результаты D_{10} показывают, что более 90% частиц порошка, доставляемого в ноздрию, не доступны для ингаляции.

Пример 8.

Порошковый состав получали при помощи способов, описанных в разделе "Способ получения". Композицию с отношением 10:10:80 глюкагон:DPC- β -циклодекстрин получали с использованием 1М уксусной кислоты. В 10 мг порошка содержался 1 мг глюкагона. 10 мг порошкового состава помещали в каждое из десяти устройств. Собирали порошок, доставляемый при активации устройства. Масса порошка, доставляемого из десяти устройств, показана в табл. 7 в столбце "доставляемая доза" (мг). Однородность доставляемой дозы (%) для десяти устройств, которая также показана в табл. 7, вычисляли путем умножения на 100 отношения количества глюкагона в каждом из десяти доставляемых порошков к количеству глюкагона в 10 мг порошка перед тем, как его помещали в каждое из десяти устройств.

Таблица 7

Доставляемая доза и однородность доставляемой дозы

Номер устройства	Однородность доставляемой дозы (%)	Доставляемая доза, мг
1	97,5	9,3
2	97,0	9,2
3	98,9	9,7
4	102,7	9,8
5	100,3	9,7
6	92,3	9,0
7	100,2	9,6
8	96,9	9,2
9	94,8	9,2
10	96,8	9,2

Пример 9.

Проводили многоцентровое рандомизированное двухфакторное перекрестное исследование III фазы, для которого отбирали пациентов с диабетом 1 типа (T1D, $n=75$), для оценки эффективности и безопасности одной дозы глюкагона, вводимого интраназально (порошок, являющийся объектом настоящего изобретения), по сравнению с глюкагоном, вводимым путем в.м. инъекции, при гипогликемии, индуцированной инсулином. Первичной конечной точкой настоящего исследования являлась доля пациентов, у которых уровень глюкозы в крови повышался до ≥ 70 мг/дл в течение 30 мин после лечения с применением глюкагона или у которых повышение уровня глюкозы в крови составляло 20 мг/мл в течение 30 после лечения с применением глюкагона. Согласно протоколу для понижения уровня глюкозы в крови до гипогликемического диапазона (целевое минимальное значение < 50 мг/дл) использовали инсулин.

Статистический анализ гликемического ответа на лечение с применением интраназального порошка

показал, что интраназальный порошок не уступал по характеристикам инъекционному глюкагону в отношении лечения гипогликемии, индуцированной инсулином. На кривой зависимости ответа глюкозы, приведенной на фиг. 7, показано, что уровень глюкозы существенно увеличивался в группах, которым проводили лечение при помощи интраназального способа и инъекции, и уровень глюкозы увеличивался до нормального диапазона у большинства субъектов в обеих группах в течение примерно 15 мин после введения дозы.

Пример 10. AMG103.

AMG103 представляло собой исследование детей с диабетом 1 типа возрастом 4 - <17 лет. Индуцирование тяжелой гипогликемии у указанной популяции не допускается педиатрическими ЭСО, но инсулин использовали при необходимости для нормализации уровня глюкозы в крови до целевого значения <80 мг/дл (4,4 ммоль/л) перед введением глюкагона.

Дети посещали центр исследования дважды. Во время первого посещения 12 детей возрастом от 12 до <17 лет случайным образом распределяли по группам, где вводили глюкагон путем в.м. инъекции (уровень дозирования согласно указаниям производителя) или порошковый состав глюкагона, который является объектом настоящего изобретения (10:10:80 по массе). Во время второго посещения субъектам проводили альтернативный способ лечения. Для детей возрастом от 4 до <8 лет и от 8 до <12 лет группы включали по 18 детей. В рамках каждой из указанных возрастных групп детей случайным образом распределяли в отношении 2:1 и вводили две дозы интраназального глюкагона или одну в.м. инъекцию глюкагона. Детей, которым вводили и.н. глюкагон, случайным образом распределяли и вводили 2 или 3 мг во время первого посещения и альтернативную дозировку во время второго посещения. Проводили заслепление участников исследования и сотрудников центра исследования относительно уровня дозировки.

Результаты для детей возрастом 12 - <17 лет предложены в качестве примера наблюдаемого действия у детей, которым вводили интраназальный порошок глюкагона. На фиг. 8А приведена кривая РК глюкагона, при этом на фиг. 8В приведен профиль уровня глюкозы. Данные, полученные в настоящем исследовании, указывают на то, что интраназальный порошок глюкагона обеспечивал ответ глюкозы, который не отличался от ответа, наблюдаемого после инъекции глюкагона.

Пример 11. Влияние заложенности носа.

Проводили исследование порошка согласно настоящему изобретению, содержащего глюкагон:ДПС и бета-циклодекстрины в отношении 10:10:80 по массе, на субъектах с простудой, которым одновременно вводили или не вводили средство от заложенности носа, для изучения безопасности и РК/PD 3 мг дозы и.н. глюкагона у субъектов-мужчин и женщин. Исследование проводили по схеме одноцентрового открытого параллельного исследования одной дозы с повторяющимися измерениями. Всем 36 субъектам вводили одну 3 мг дозу глюкагона при помощи интраназального способа утром натощак через 10 ч после приема пищи. Исследование когорты 1 (18 субъектов) согласно схеме включало два периода. Во время периода 1 у субъектов наблюдали заложенность носа и/или выделения из носа, связанные с простудой, и во время периода 2 субъекты восстанавливались от простуды и не имели симптомов в течение по меньшей мере 2 дней. В когорте 2 (субъекты от № 019 до 036) субъектов исследовали только во время периода 1. После появления заложенности носа и/или выделений из носа, связанных с простудой, указанным субъектам проводили предварительное лечение с использованием средства от заложенности носа перед введением одной и.н. дозы глюкагона.

Измерение максимального потока воздуха, вдыхаемого через нос, являлось объективной мерой заложенности носа и подтверждало заложенность носа, связанную с простудой, а также предполагаемое терапевтическое действие оксиметазолина.

Исследуемое лекарственное средство хорошо переносилось, во время исследования не отмечали серьезные нежелательные явления или смерть.

Ответы глюкагона и глюкозы после введения порошка приведены на фиг. 9А и 9В. Концентрация глюкагона в плазме (фиг. 9А), по существу, повышалась относительно исходного уровня, где средняя максимальная концентрация (C_{max}) составляла 1198,4, 868,0 и 801,5 пг/мл для условий "AMG504-1+простуда", "простуда+средство от заложенности носа" и "Нет симптомов простуды" соответственно. Среднее время достижения максимальной концентрации (t_{max}) составляло 20 мин после введения дозы для всех групп, которым проводили лечение. Оценочное значение AUC_{0-t} для условия "AMG504-1+простуда" превышало значения для двух других групп, которым проводили лечение (1198,4 по сравнению с 1038,0 и 797,5).

Уровень глюкозы в крови (фиг. 9В) во всех трех группах начинал повышаться к 5 минуте после введения дозы, это указывало на то, что заложенность носа при сопутствующем введении средства от заложенности носа или без него не оказывало влияние на начало гликемического ответа. Таким образом, профили глюкозы после введения интраназального глюкагона были сравнимыми независимо от наличия простуды или введения средства от заложенности носа субъектам с простудой.

Результаты настоящего исследования указывают на то, что заложенность носа, связанная с простудой, при сопутствующем введении средства от заложенности носа или без него, не влияла значительно на РК или PD порошка, вводимого интраназально. Этот факт очень важен, так как люди с диабетом, ко-

которые принимают инсулин, подвержены риску тяжелой гипогликемии в любой момент времени, включая периоды, когда они страдают от аллергии или простуды. Таким образом, интраназальный глюкагон, предназначенный для лечения тяжелой гипогликемии, также может сохранять эффективность при заложенности носа.

Пример 12.

Проводили оценку биосовместимости, безопасности и переносимости композиций согласно настоящему изобретению в серии исследований, которые проводили на крысах, собаках и кроликах. Проводили оценку субхронической и острой токсичности. В табл. 8 показаны результаты указанных исследований. В исследованиях было показано, что композиции согласно настоящему изобретению хорошо переносятся и не имеют нежелательных эффектов.

Таблица 8

Исследования субхронической и острой токсичности крыс, собак и кроликов

Тип исследования	Вид	Исследуемое изделие и дозировка	Ключевые факты
28-дневная субхроническая токсикология	Собака	Солевой раствор, порошок плацебо, AMG504-1 в дозе 2 и 4 мг/собака/день в течение 28 дней	Отличное от временного (т.е., < 30 секунд) шмыгание и слюноотделение непосредственно после введения дозы, нежелательные клинические признаки отсутствуют. Нежелательная общая картина после вскрытия или эффекты на МТ, употребление пищи, показатели клинической химии, гематологии, ЭКГ или массу органов, связанные с лечением, отсутствуют. Минимальная или умеренная полностью обратимая атрофия/дегенерация обонятельного эпителия. Отсутствие факторов, связанных с исследуемым изделием, на микроскопическом уровне при гистологическом исследовании всех тканей.
28-дневная субхроническая токсикология	Крыса	Солевой раствор, жидкое плацебо, ингредиенты AMG504-1 в растворе, доза 0,1 и 0,2 мг/крыса/день в течение 28 дней	Отсутствие нежелательных клинических признаков или общей нежелательной картины после вскрытия. Отсутствие эффектов на МТ, потребление пищи, показатели клинической химии, гематологии, ЭКГ или массу органов, связанных с лечением. Минимальная(-ое) или умеренная(-ое) полностью обратимая(-ое) эрозия/образование язв в обонятельном эпителии в группе, которой вводили высокую дозу. Отсутствие факторов, связанных с исследуемым изделием, на микроскопическом уровне при гистологическом исследовании всех тканей.
Острая токсикология	Крыса	Воздушный контроль плацебо, AMG504-1, доза 0,5 мг внутритрахеально	Отсутствие нежелательных клинических, макроскопических или микроскопических факторов
Острая токсикология	Кролик	30 мг лекарственного продукта, введение непосредственно в глаз	Хорошо переносится при минимальном раздражении глаза, ограничивающимся небольшим покраснением и отеком, локализованным в конъюнктиве и пальпебральной мембране.

Справочные материалы (содержание всех из которых включено в настоящую заявку посредством ссылок).

- C. Boesch, L.R. Brown, and K. Wuethrich. Physicochemical characterization of glucagon-containing lipid micelles. *Biochim. Biophys. Acta* 603: 298-312, 1980.
- L.R. Brown, C. Boesch and K. Wuthrich. Location and orientation relative to the micelle surface for glucagon in mixed micelles with dodecylphosphocholine: EPR and NMR studies. *Biochim. Biophys. Acta* 642: 296, 1981
- S. Carstens and M. Sprehn. Prehospital treatment of severe hypoglycaemia: A comparison of intramuscular glucagon and intravenous glucose. *Prehospital and Disaster Medicine* 13: 44-50, 1998
- Chabenne et al., *MOLECULAR METABOLISM* 3 (2014) 293–300.
- P.E. Cryer. Hypoglycaemia: The limiting factor in the glycaemic management of type I and type II diabetes. *Diabetologia* 45: 937-948, 2002.
- P.E. Cryer. Hypoglycemia in diabetes. American Diabetes Association. 2009.
- R. Curran. A milestone change in practice. A call for widespread application of intranasal medication delivery in the prehospital environment. www.emsworld.com. 2007
- I.J. Deary. Symptoms of hypoglycaemia and effects on mental performance and emotions. In: *Hypoglycaemia in Clinical Diabetes*. Второе издание. Ред. B.M. Frier and M. Fisher. 2007.
- H. Dodziuk. Cyclodextrins and their complexes. Wiley-VCH Verlag, Berlin, 2006.
- K. Endo, S. Amikawa, A. Matsumoto, N. Sahashi and S. Onoue. Erythritol-based dry powder of glucagon for pulmonary administration. *Int. J. Pharm.* 290: 63-71, 2005.
- R. M. Epand and J.M. Sturtevant. A calorimetric study of peptide-phospholipid interactions: The glucagon-dimyristoylphosphatidylcholine complex. *Biochemistry* 20: 4603-4606, 1981.
- R.M. Epand and J.M. Sturtevant. Studies on the interaction of glucagon with phospholipids. *Biophys. J.* 37: 163-164, 1982.
- J. Filipovic-Grcic and A. Hafner. Nasal powder drug delivery. Chapter 5.7, p. 651-681, в: *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes*, Ред. S.C. Gad, Wiley-Interscience, New York, 2008, pp. 1384.
- L. Freychet, N. Desplanque, P. Zirinis, S.W. Rizkalla, A. Basdevant, G. Tchobroutsky and G. Slama. Effect of intranasal glucagon on blood glucose levels in healthy subjects and hypoglycaemic patients with insulin-dependent diabetes. *The Lancet*. pp. 1364-1366, June 18, 1988
- Glucagon for injection (rDNA origin). Вкладыш в упаковке. Eli Lilly & Co. 2005.
- G. Harris, A. Diment, M. Sulway and M. Wilkinson. Glucagon administration – underevaluated and undertaught. *Practical Diabetes Int.* 18: 22-25, 2001.
- M.A. Howell and H.R. Guly. A comparison of glucagon and glucose in prehospital hypoglycaemia. *J. Accid. Emerg. Med.* 14: 30-32 (1997).
- A. Hvidberg, R. Djurup and J. Hilsted. Glucose recovery after intranasal glucagon during hypoglycaemia in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 46: 15-17, 1994.
- IDF Diabetes Atlas, International Diabetes Foundation, Четвертое издание, 2009.
- ISMP Canada Safety Bulletin. Administration of product-specific diluent without medication. Institute for Safe Medication Practices Canada. 10(7): 1-3, 2010.
- K.K. Jain. Drug Delivery Systems. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 437. pp. 8-9, Humana Press, Totowa, NJ, 2008.
- S. Jorgensen, A.R. Sorensen, L.L. Kimer and N. Mygind. A powdery formulation of glucagon for nasal delivery- a phase I study. *Diabetes* 40 [Suppl A]:2190, 1991
- N.C. Kaarsholm. Stabilized aqueous glucagon solutions comprising detergents. Номера патентных документов WO9947160, EP19990906095, 1999.
- N.C. Kaarsholm. Stabilized aqueous peptide solutions. Патент США №6384016, 1999a.
- D. Lichtenberg. Liposomes as a model for solubilization and reconstitution of membranes. Chapter 13. pp. 199-218. B: *Handbook of nonmedical applications of liposomes. Models for biological phenomena*. Vol II, ред. Y. Barelholz and D.D. Lasic, CRC Press, Boca Raton FL. pp. 379, 1996
- Marsh, D. Handbook of lipid bilayers. CRC Press, Boca Raton, FL, 387pp., 1990.

L. Matilainen, K.L. Larsen, R. Wimmer, P. Keski-Rahkonen, S. Auriola, T. Jarvinen and P. Jarho. The effect of cyclodextrins on chemical and physical stability of glucagon and characterization of glucagon/gamma-CD inclusion complexes. *J. Pharm. Sci.* 97: 2720-2729, 2008.

L. Matilainen, S. L. Maunu, J. Pajander, S. Auriola, I. Laaskelainen, K.L. Larsen, T. Jarvinen and P. Jarho. The stability and dissolution properties of solid glucagon/gamma-cyclodextrin powder. *Eur. J. Pharm. Sci.* 36: 412-420, 2009.

S. Onoue, K. Yamamoto, Y. Kawabata, M. Hirose, T. Mizumoto and S. Yamada. Novel dry powder inhaler formulation of glucagon with addition of citric acid for enhanced pulmonary delivery. *Int. J. Pharm.* 382: 144-150, 2009.

R.P. Oomen and H. Kaplan. Binding of glucagon to lipid bilayers. *Biochem. Cell Biol.* 68: 284-291, 1990.

J.E. Sondergaard Pederson. The nature of amyloid-like glucagon fibrils. *J. Diab. Science Tech.* 4: 1357-1367, 2010.

A.E. Pontiroli, M. Alberetto and G. Pozza. *British Medical Journal.* 287: 462-463, 1983.

A.E. Pontiroli, M. Alberetto, A. Calderara, E. Pajetta and G. Pozza. Nasal administration of glucagon and human calcitonin to healthy subjects: a comparison of powders and spray solutions and of different enhancing agents. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 37: 427-430, 1989.

A.M. Rosenfalck, I. Bendtsen, S. Jorgensen and C. Binder. Nasal glucagon in the treatment of hypoglycaemia in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 17: 43-50, 1992.

F.M. Sakr. Nasal administration of glucagon combined with dimethyl- β -cyclodextrin: comparison of pharmacokinetics and pharmacodynamics of spray and powder formulations. *Int. J. Pharmaceutics* 132: 189-194, 1996.

Sibley et al. *Prehosp. Emer. Care.* Vol. 17: 98-102, 2013.

E. Stenninger and J. Aman. Intranasal glucagon treatment relieves hypoglycaemia in children with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia.* 36: 931-935, 1993.

D. Teshima, A. Yamauchi, K. Makino, Y. Kataoka, Y. Arita, H. Nawata and R. Oishi. Nasal glucagon delivery using microcrystalline cellulose in healthy volunteers. *Int. J. Pharm.* 233: 61-66, 2002.

D. P. Tieleman, D. van der Spoel and H.J.C. Berendsen. Molecular dynamics simulations of dodecyl phosphocholine micelles at three different aggregate sizes: micellar structure and lipid chain relaxation. *J. Phys. Chem. B* 104:6380-6388, 2000

O. Yanai, D. Pilpel, I. Harman, E. Elitzur-Leiberman and M. Philip. IDDM patients' opinions on the use of Glucagon Emergency Kit in severe episodes of hypoglycaemia. *Practical Diabetes Int.* 14: 40-42, 1997.

Последовательности.

(SEQ ID NO: 1)

His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu- Met-Asn-Thr

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Порошковая композиция для лечения гипогликемии, содержащая глюкагон (SEQ ID NO: 1), додецилфосфохолин и β -циклодекстрин, где отношение глюкагона к додецилфосфохолину и β -циклодекстрину составляет 1:1:8 по массе.

2. Порошковая композиция по п.1, дополнительно содержащая цитрат натрия или лимонную кислоту.

3. Порошковая композиция по п.2, где количество цитрата натрия или лимонной кислоты составляет до 10 мас.% включительно от общей массы композиции.

4. Порошковая композиция по п.1, где содержание воды в композиции составляет менее 5 мас.% от общей массы композиции.

5. Порошковая композиция для лечения гипогликемии, состоящая из глюкагона (SEQ ID NO: 1), додецилфосфохолина и β -циклодекстрина, где отношение глюкагона к додецилфосфохолину и β -циклодекстрину составляет 1:1:8 по массе.

6. Интраназальный аппликатор для порошковой композиции, содержащий резервуар для порошковой композиции и порошковую композицию, содержащуюся внутри указанного резервуара, где порошковая композиция представляет собой композицию по п.1.

7. Способ получения порошковой композиции по п.1, включающий стадии:

а) получения первого раствора глюкогона (SEQ ID NO. 1) и додецилфосфохолина в водном носителе, где додецилфосфохолин присутствует в концентрации, равной критической концентрации мицеллообразования или превышающей ее;

б) добавления β -циклодекстрина к указанной первой смеси с получением второй смеси;

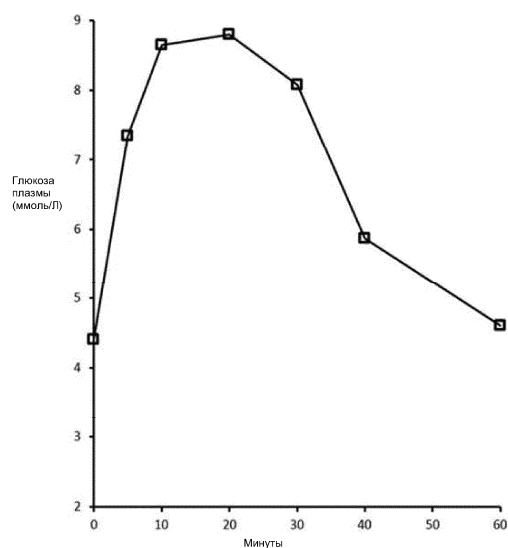
с) сушки второй смеси с получением твердого состава и

д) обработки указанного твердого состава с получением однородного порошка.

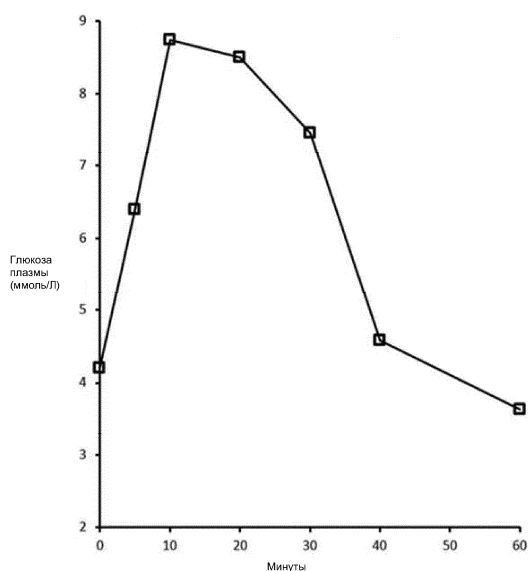
8. Способ по п.7, где сушку второй смеси проводят путем ее лиофилизации или сушки распылением.

9. Способ лечения гипогликемии у индивидуума, страдающего от гипогликемии, включающий введение индивидууму композиции по п.1, где композицию вводят в терапевтически эффективном количестве в виде порошка в слизистую носа индивидуума.

10. Способ по п.9, где указанную порошковую композицию вводят только в одну ноздрю индивидуума.

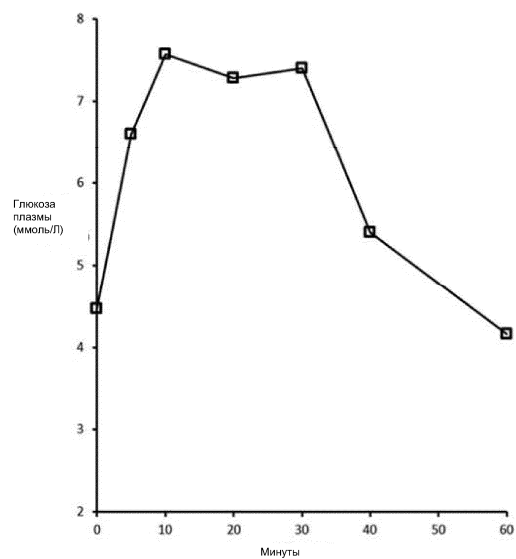


Фиг. 1

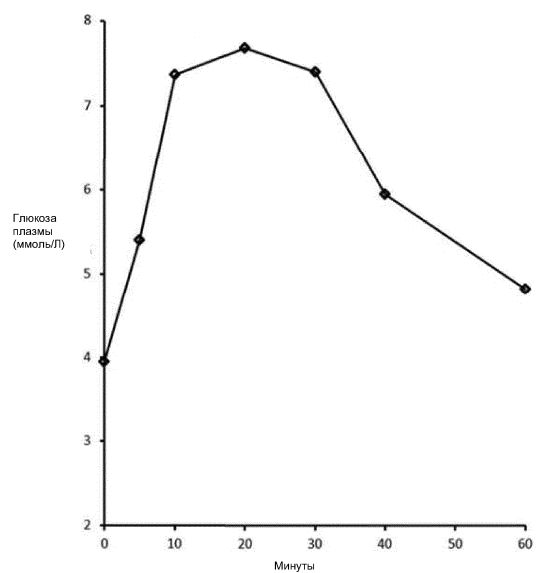


Фиг. 2

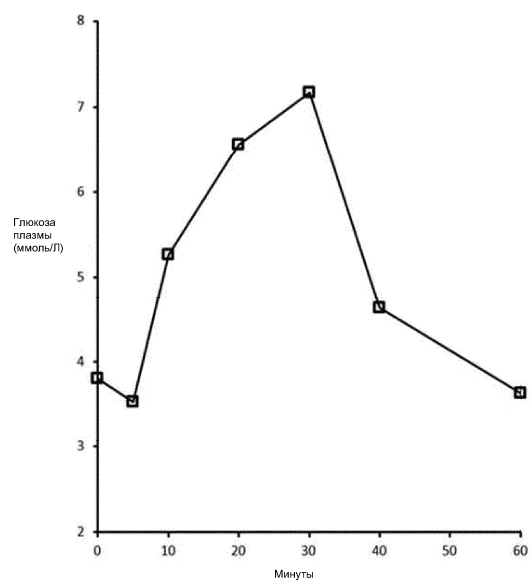
034820



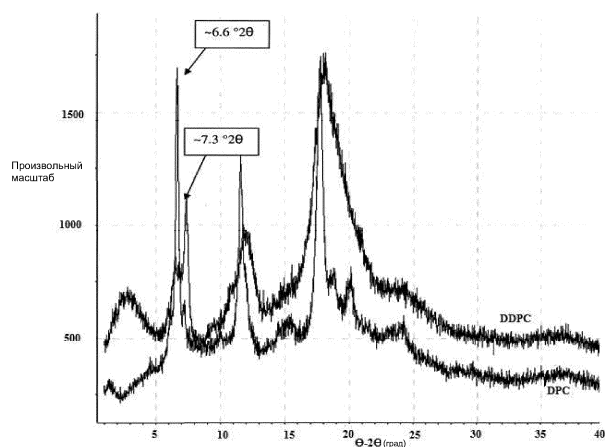
Фиг. 3



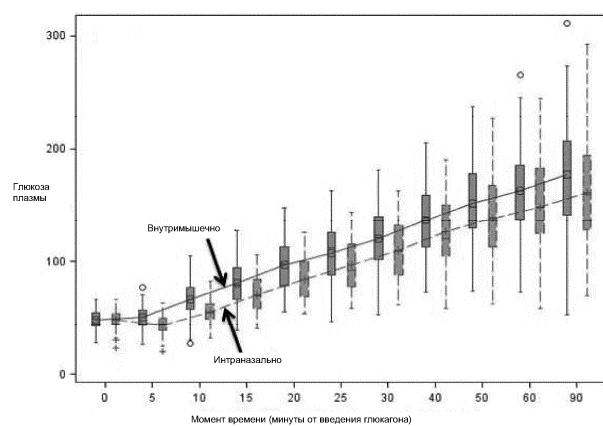
Фиг. 4



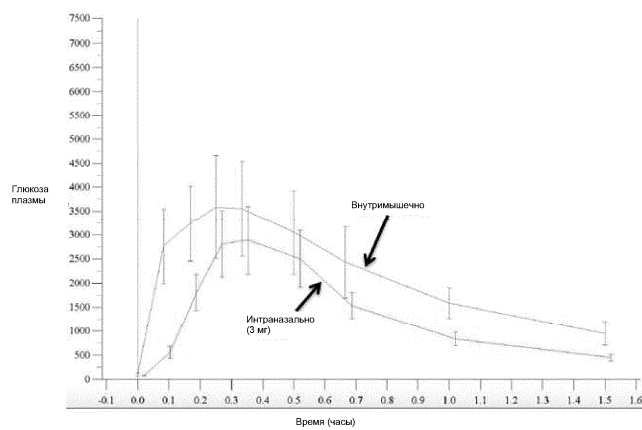
Фиг. 5



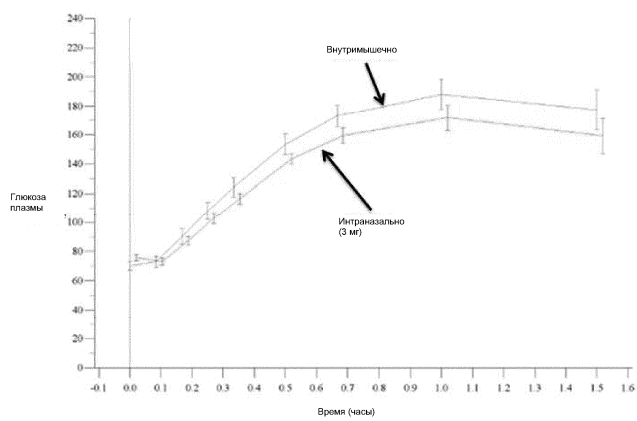
Фиг. 6



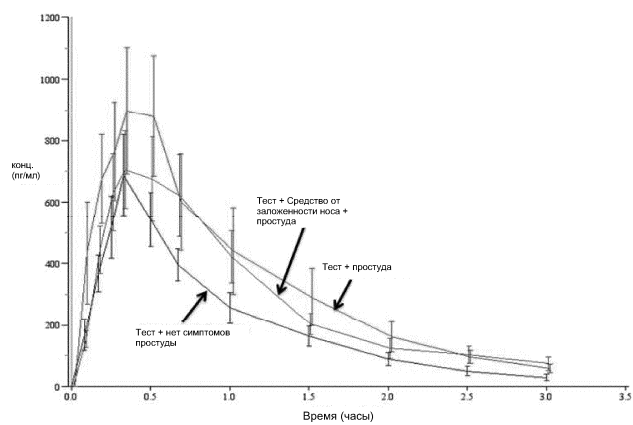
Фиг. 7



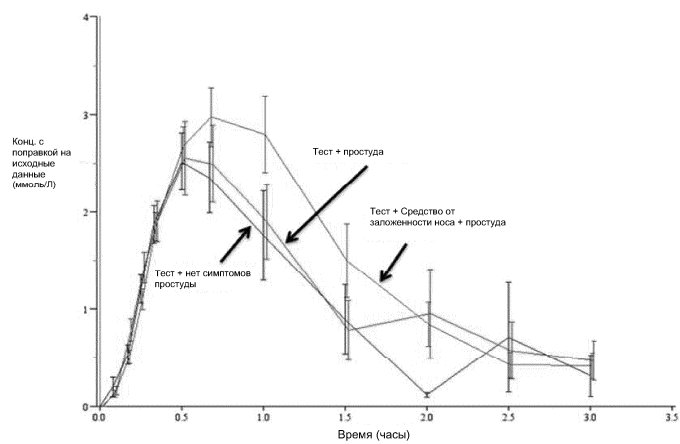
Фиг. 8А



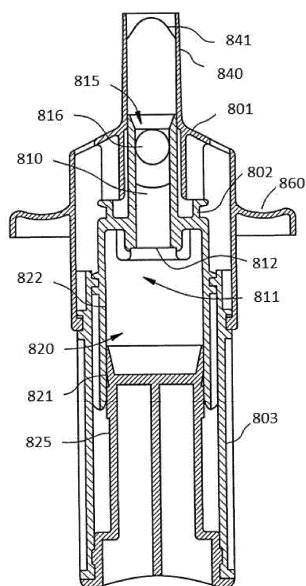
Фиг. 8В



Фиг. 9А



Фиг. 9В



Фиг. 10

