

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038363**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.08.16

(21) Номер заявки
201592019

(22) Дата подачи заявки
2014.04.18

(51) Int. Cl. **A61K 38/19** (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

(54) **ВОДНЫЙ АЭРОЗОЛЬ ДЛЯ ИНГАЛЯЦИИ, НЕ СОДЕРЖАЩИЙ ДОБАВОК И/ИЛИ СТАБИЛИЗАТОРОВ, СОДЕРЖАЩИЙ ЦИКЛИЧЕСКИЙ ПЕПТИД ФОРМУЛЫ X1-QQRETPEGAEAKPWY-X2**

(31) **13164829.7**

(32) **2013.04.23**

(33) **EP**

(43) **2016.03.31**

(86) **PCT/EP2014/058010**

(87) **WO 2014/173842 2014.10.30**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АПЕПТИКО ФОРШУНГ УНД
ЭНТВИКЛУНГ ГМБХ (АТ)**

(72) Изобретатель:
**Фишер Бернхард (АТ), Лукас Рудольф
(US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

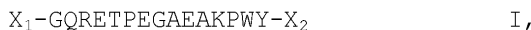
(56) **WO-A1-2006013183
WO-A1-2010099556
WO-A1-2011085423**

PARASTOO HAZEMI ET AL.: "Essential structural features of TNF-alpha lectin-like domain derived peptides for activation of amiloride-sensitive sodium current in A549 cells", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 53, no. 22, 27 October 2010 (2010-10-27), pages 8021-8029, XP002638326, DOI: 10.1021/JM100767P cited in the application abstract; table 2

VADASZ I. ET AL.: "The lectin-like domain of tumor necrosis factor-[alpha] improves alveolar fluid balance in injured isolated rabbit lungs", CRITICAL CARE MEDICINE 200805 US, vol. 36, no. 5, May 2008 (2008-05), pages 1543-1550, XP009172075, ISSN: 0090-3493 abstract

ELIA NADIA ET AL.: "Functional identification of the alveolar edema reabsorption activity of murine tumor necrosis factor-alpha", AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE, AMERICAN LUNG ASSOCIATION, NEW YORK, NY, US, vol. 168, no. 9, 1 November 2003 (2003-11-01), pages 1043-1050, XP002455314, ISSN: 1073-449X, DOI: 10.1164/RCCM.200206-6180C abstract; figures 2-6

(57) Изобретение относится к водному аэрозолю для ингаляции, не содержащему добавок и/или стабилизаторов, полученному из лиофилизата циклического пептида формулы I



где X₁ представляет собой от 1 до 4 N-концевые природные или синтетические аминокислоты; X₂ представляет собой природную аминокислоту, где доля капель диаметром ≤5 мкм в аэрозоле составляет по меньшей мере 50%, а также к способу получения водного аэрозоля и экстракорпоральному способу улучшения функции легких.

B1**038363****038363****B1**

Настоящее изобретение относится к фармацевтически приемлемому лиофилизату, предназначенному для введения некоторых пептидов в легкое млекопитающего, например человека.

Действие лекарственных средств весьма существенно зависит от того, как эти активные вещества попадают в тело или в орган, подлежащий лечению.

Обычным способом введения лекарственного средства является парентеральное введение. В данном случае лекарственное средство вводят через кожу, например, непосредственно в кровяное русло или в мышцу, или непосредственно под кожу.

Другие традиционно применяемые формы введения лекарственных средств представляет собой оральное введение в желудочно-кишечный тракт. Активные вещества, содержащиеся в лекарственных средствах, высвобождаются в желудочно-кишечный тракт и затем посредством резорбции попадают в тело, кровь и органы.

Лекарственные средства могут вводиться также через кожу и слизистую оболочку.

В качестве альтернативы инъекции предложены способы оральной ингаляции лекарственных средств. При этом лекарственные средства поступают в полость ротоглотки как в виде порошка, так и в форме капель, которые затем с вдыхаемым воздухом получают возможность попадать в пространство легких. Оттуда эти лекарственные средства через ткань легких выделяются в кровь и, таким образом, системно подаются в тело.

Однако оральная ингаляция лекарственных средств по-прежнему представляет собой существенную техническую проблему. В частности, высокомолекулярные активные вещества, такие как, например, протеины, посредством оральной ингаляции можно вводить только в очень ограниченном количестве. Протеины в качестве активных веществ повреждаются и инактивируются вследствие процесса распыления в виде порошка или капель тумана физическим путем посредством нагрева и давления. Протеиновые активные вещества, предусмотренные для ингаляции, являются очень нестабильными как во время их хранения, так и перед оральной ингаляцией и во время нее. Кроме того, количество таких пептидных активных веществ вследствие физиологических процессов разложения может уменьшаться уже в воздушном пространстве легкого.

Для противодействия этому явлению были разработаны самые разные фармацевтические композиции таких препаратов для ингаляции протеинов. Так, например, такие композиции для ингаляции протеинов могут содержать соли, такие как соли кальция или натрия, стабилизаторы и поверхностно-активные вещества, специфические буферные смеси, липидные добавки и другие вещества для достижения требуемых свойств растворов, для обеспечения стабильности, для защиты активности протеина. Другие добавки, применяемые во время получения протеиновых лекарственных средств, представляют собой, например, альбумин, осмотическое реагенты, антиоксиданты, химические вещества для предотвращения агрегации и преципитации, липосомы, желатин, альгинаты, сахар и т.п.

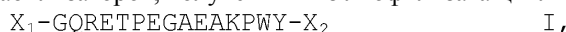
Полученные таким образом и фармацевтически подготовленные пептидные и протеиновые активные вещества для ингаляции затем предусмотренным порядком или самопроизвольно попадают через ткань легких в кровь и могут быть обнаружены там.

В целом, в настоящее время имеется только два разрешенных на международном уровне и основанных на протеине/пептиде лекарственных средства для ингаляции, а именно Pulmozyme® (дезоксирибонуклеаза) и Exubera® (инсулин). Для сохранения активности и стабильности препараты содержат, например, соли (хлорид натрия, хлорид кальция или цитрат натрия, маннит, глицерин, гидроксид натрия).

Традиционный технический путь получения протеиновых/пептидных композиций для медицинского применения представляет собой лиофилизацию для удаления воды (см., например, J. Pharm. Sci. 2009 Sep; 98(9): 2886-908). При этом в случае этих процессов предшествующего уровня техники прибавляют добавки, такие как, например, дисахариды, для сохранения стабильности и активности пептидов (Allison SD et al., Arch. Biochem. Biophys. 1999 May 15; 365(2): 289-98). Кроме того, прибавление к пептидам и протеинам полиэтиленгликоля (PEG) оказалось приемлемым для того, чтобы обеспечивать активность и стабильность после обезвоживания при лиофилизации (Roberts et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 2002 Jun 17; 54(4): 459-76 2002, Morris et al., Antimicrob. Agents Chemother. 2012 Jun; 56(6): 3298-308. doi: 10.1128/AAC.06335-11), а также для того, чтобы предотвращать деградацию вследствие протеолитических процессов (Lee et al., Regul. Pept. 2009 Jan 8; 152(1-3): 101-7; Baginski et al., Pharm. Res. 2012 Jun; 29(6): 1425-34) или чтобы влиять на молекулярную массу благоприятным образом (Veronese & Pasut, Drug Discov. Today. 2005 Nov 1; 10(21): 1451-8; Patton & Byron, Nat. Rev. Drug Discov. 2007 Jan; 6(1): 67-74).

Для некоторых пептидов, которые оказывают положительное влияние на функцию легких, неожиданно была найдена форма применения без добавок, которая проявила себя в качестве чрезвычайно приемлемой.

В одном из аспектов настоящего изобретения предлагается водный аэрозоль для ингаляции, не содержащий добавок и/или стабилизаторов, полученный из лиофилизата циклического пептида формулы I



где

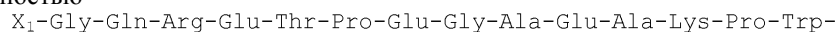
X_1 представляет собой от 1 до 4 N-концевые природные или синтетические аминокислоты;

X_2 представляет собой природную аминокислоту, где доля капель диаметром ≤ 5 мкм в аэрозоле составляет по меньшей мере 50%.

Лиофилизат, предлагаемый по настоящему изобретению, в данном случае обозначается также как "лиофилизат по настоящему (соответственно согласно настоящему) изобретению". Пептид в лиофилизате согласно настоящему изобретению в данном случае обозначается также как "пептид по настоящему (соответственно согласно настоящему) изобретению".

В лиофилизате по настоящему изобретению может содержаться один или несколько циклических пептидов формулы I, причем предпочтительно содержится только один пептид формулы I.

Циклическое соединение формулы I представляет собой циклизованное соединение с аминокислотной последовательностью



Tyr- X_2

I,

где X_1 и X_2 имеют определенные ранее значения.

Новое соединение формулы I представляет собой также объект настоящего изобретения.

Цикл в соединении формулы I может быть образован благодаря связи между двумя соответствующими заместителями в двух аминокислотных остатках соединения формулы I, например благодаря амидной связи или дисульфидному мостику, причем цикл предпочтительно содержит в качестве членов цикла по меньшей мере от 15 и более предпочтительно по меньшей мере от 17 до 19 или 20, например от 17 до 19, аминокислотных остатков, содержащихся в соединении формулы I.

Образование цикла предпочтительно осуществляют благодаря связи между соответствующим заместителем в аминокислоте в группировке X_1 , предпочтительно в аминокислоте в положении 1 в группировке X_1 , с соответствующим заместителем в группировке X_2 .

Природные аминокислоты, которые могут применяться в аминокислотной последовательности формулы I по настоящему изобретению, известны и представляют собой, например: G (Gly), A (Ala), V (Val), L (Leu), I (Ile), M (Met), P (Pro), F (Phe), W (Trp), S (Ser), T (Thr), N (Asn), Q (Gln), C (Cys), U (Sec), Y (Tyr), D (Asp), E (Glu), H (His), K (Lys), R (Arg).

Синтетические аминокислоты, которые могут применяться в аминокислотной последовательности формулы I по настоящему изобретению, представляют собой:

(i) аминокислоты, которые имеют принципиальную химическую структуру природных аминокислот, но отличаются от альфа-аминокислот;

(ii) природные аминокислоты в D-форме, отличающиеся от аминокислот в природной L-форме, то есть природные аминокислоты, в которых алкильная группа у атома C в положении 2 находится не в L-конфигурации, а в D-конфигурации;

(iii) синтетические аминокислоты, например, отличающиеся от аминокислот (i) и (ii), определенных ранее, и содержащие от 2 до 12, например от 2 до 6, атомов углерода, по меньшей мере одну аминогруппу, например одну или две, и по меньшей мере одну карбоксигруппу, например одну или две, при необходимости помимо заместителей, которые также имеются в природных аминокислотах, например OH, -CONH₂, -NH-C(=NH₂)NH₂, SH, (C₁₋₄) алкил-S-, фенил, гетероцикл, например содержащий 5 или 6 членов цикла и по меньшей мере один гетероатом, например один или два, выбранный из N, O, S, предпочтительно N, при необходимости сконденсированный с другим циклом, таким как фенил, например, представляющий собой пролилин, индолил, имидазолил.

Синтетические аминокислоты формулы I по настоящему изобретению представляют собой орнитин, 4-аминомасляную кислоту, β-аланин.

В одном из других аспектов циклическое соединение формулы I по настоящему изобретению представляет собой:

соединение с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1

цикло (CGQRETPEGAEAKPWYC) ,

где между обоими концевыми цистеиновыми остатками образован дисульфидный мостик;

соединение с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2

цикло (KSPGQRETPEGAEAKPWYE) ,

где амидная связь образована между аминогруппой, которая связана с ε-атомом углерода боковой цепи N-концевого остатка лизина, и карбоксильной группой боковой цепи, которая связана с γ-атомом углерода C-концевого остатка глутаминовой кислоты;

соединение с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3

цикло (KGQRETPEGAEAKPWYG) ,

где амидная связь образована между аминогруппой, которая связана с ε-атомом углерода боковой цепи N-концевого остатка лизина, и карбоксильной группой C-концевого остатка глицина;

соединение с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4

цикло (орнитин-GQRETPEGAEAKPWYG) ,

где амидная связь образована между аминогруппой, которая связана с δ-атомом углерода боковой

цепи N-концевого остатка орнитина, и карбоксильной группой C-концевого остатка глицина;
соединение с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5

цикло (4-аминомасляная кислота-GQRETPEGAEAKPWYD) ,

где амидная связь образована между аминогруппой N-концевого остатка 4-аминомасляной кислоты и карбоксильной группой боковой цепи, которая связана с β -атомом углерода C-концевого остатка аспарагиновой кислоты;

и

соединение с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6

цикло (β -аланин-GQRETPEGAEAKPWYE) ,

где амидная связь образована между аминогруппой N-концевого остатка аланина (остатка 3-аминопропионовой кислоты) и карбоксильной группой боковой цепи, которая связана с γ -атомом углерода C-концевого остатка глутаминовой кислоты.

В соединениях формулы I, таких как соединения с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, аминокислоты соединены соответственно нормальной структуре пептидов, за исключением связи, которая ведет к образованию цикла.

Циклическое соединение формулы I в данном случае обозначается также как "циклическое соединение (циклические соединения) по настоящему (соответственно согласно настоящему) изобретению" и представляет собой циклическое соединение формулы I в любой форме, например в свободной форме и в виде соли. В биологической среде соединение формулы I обычно находится в виде соли.

В одном из других аспектов соединение формулы I в лиофилизате по настоящему изобретению находится в виде соли.

Такие соли предпочтительно представляют собой фармацевтически приемлемые соли, хотя фармацевтически неприемлемые соли входят в число таких солей, например, при использовании их с целями получения/выделения/очистки.

В биологической среде соль циклического соединения формулы I обычно представляет собой гидроклорид.

Циклическое соединение формулы I по настоящему изобретению в свободной форме может быть превращено в циклическое соединение формулы I в виде соли и наоборот.

Циклическое соединение формулы I по настоящему изобретению может находиться в форме изомеров и в смеси изомеров, например оптических изомеров. Циклическое соединение формулы I может, например, содержать асимметрические атомы углерода и поэтому может находиться в форме энантиомеров, диастереоизомеров и их смесей, например рацематов. Циклическое соединение формулы I может находиться в (R)-, (S)- или (R,S)-конфигурации и предпочтительно в (R)- или (S)-конфигурации относительно отдельных заместителей у асимметрических атомов углерода. Смеси изомеров могут быть разделены соответствующим образом, например согласно, например аналогично традиционным способам, для получения чистых изомеров. Настоящее изобретение относится к циклическому соединению формулы I по настоящему изобретению в любой изомерной форме и в любой форме смесей изомеров. В случае природных аминокислот конфигурация заместителей обычно соответствует природным аминокислотам.

Циклическое соединение формулы I по настоящему изобретению может быть получено соответствующим образом, например согласно, например аналогично традиционным способам или согласно описанию настоящей заявки, например твердофазным пептидным синтезом при необходимости согласно стратегии защиты флуоренилметоксикарбонил/трет-бутилом на 2-хлортритилхлоридной смоле с применением приемлемого связывающего агента, такого как диизопропилкарбодимид и/или N-гидроксibenзотриазол, и приемлемого растворителя, например N,N-диметилформамида. Защищенные аминокислоты могут быть последовательно присоединены к пептидной цепи, причем начинают с C-концевой аминокислоты. Снятие защиты с групп, защищенных флуоренилметоксикарбонильной группой, может быть осуществлено посредством основания, например пиперидина, такого как 20%-й раствор пиперидина в приемлемом растворителе, таком как N,N-диметилформамид. Отщепление готового при необходимости еще (частично) защищенного пептида от носителя (смолы) может быть осуществлено соответствующим образом, например посредством кислоты, такой как уксусная кислота, в приемлемом растворителе, например в галогенированном углеводороде, таком как CH_2Cl_2 , например в смеси уксусной кислоты и CH_2Cl_2 с соотношением 1:1.

В случае пептидов, содержащих цистеин, после отщепления от носителя (смолы) может быть осуществлено снятие защиты, при необходимости, например, сильной кислотой, такой как трифторуксусная кислота (ТФУ), например смесью "95% ТФУ/5% H_2O ". Циклизация для получения дисульфидной связи может быть осуществлена за счет окисления концевых цистеиновых остатков, например, обработкой неочищенного линейного пептида воздухом, например, при pH 8,5 в течение 90 ч. Очистка полученного неочищенного пептида может быть осуществлена, например, посредством хроматографии, например способом Reverse Phase Medium Pressure Liquid Chromatography (RP-MPLC, обращенно-фазовая жидкостная хроматография среднего давления) в приемлемой колонке, такой как колонка с силикагелем RP-

C18, причем в предпочтительном случае может быть применена градиентная подача элюента, такого как смесь "ацетонитрил-вода" с градиентом от 5 до 40%. Противоион трифторуксусной кислоты может быть замещен, например, ацетат-ионом, например, в колонке, такой как колонка с леватитом MP64 (в ацетатной форме). После последней промывки водой очищенный пептид может быть лиофилизирован в виде ацетатной соли и получен в форме слегка окрашенного соединения, например в виде белого порошка.

В случае пептидов, не содержащих цистеин, стадия циклизации может быть выполнена соответствующим образом, например, еще с частично защищенным линейным пептидом после отщепления от носителя (смола). После селективной циклизации пептида, не содержащего цистеин, при необходимости может быть осуществлена защита боковой цепи в ТФУ. Очистка может быть осуществлена, например, способом хроматографии, например препаративной RP-MPLC. В пептиде, полученном таким образом, ион трифторуксусной кислоты может быть замещен ацетат-ионом, например, соответственно описанному ранее. Лيوфилизация ацетатной формы пептида, полученного таким образом, может быть осуществлена также, например, аналогично пептидам, содержащим цистеин.

Молекулярная масса полученных пептидов может быть определена масс-спектрометрией с ионизацией электрораспылением или способом MALDI-TOF-MS. Чистота может быть определена, например, способом аналитической High Performance Liquid Chromatography (HPLC, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)).

Циклические соединения формулы I по настоящему изобретению представляют собой соединения с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6. Такие соединения известны, например, из "Hazemi P., Tzotzos, S., Fischer B., Andavan, G.S.B., Fischer H., Pietschmann H., Lucas, R. und Lemmens-Gruber, R. Essential structural features of TNF- α lectin-like domain derived peptides for activation of amiloride-sensitive sodium current in A549 cells. J. Med. Chem. 2010 November 25, 53(22): 8021-8029" в качестве соединений, активирующих "амилоридчувствительный эпителиальный натриевый канал (ENaC)" и таким образом являющихся полезными для лечения заболеваний легких. Благодаря активации амилоридчувствительного натрий-ионного канала (ENaC) происходит транспортировка ионов натрия через ткань легких. При этом возникает осмотический градиент, который ведет к пассивной транспортировке воды. Если эту модель перенести на легкое, то активация амилоридчувствительного натрий-ионного канала может быть применена, например, для уменьшения скопления воды в легком, например в случае отека легкого.

При этом в ходе разработки настоящего изобретения было выявлено, что активная или пассивная транспортировка циклических пептидов формулы I по настоящему изобретению, где X_1 и X_2 имеют определенные ранее значения, например с аминокислотной последовательностью от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6, через ткань легких в кровь является нежелательной и не должна происходить, так как для физиологической эффективности циклических пептидов с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 существенно благоприятной является ситуация, когда они посредством оральной ингаляции попадают в воздушное пространство легкого, осаждаются на поверхности ткани легкого и там могут активировать апикально ориентированный амилоридчувствительный натрий-ионный канал.

Неожиданно оказалось возможным показать (пример 10), что после ингаляции аэрозоля, полученного из лиофилизата согласно настоящему изобретению путем прибавления воды, пептид по настоящему изобретению не обнаруживается в крови.

Ингаляционные препараты разрабатывались и обычно разрабатываются для того, чтобы они после ингаляции переходили через ткань легких в кровяное русло, чтобы таким образом можно было избежать парентеральных инъекций. Целью полученных до настоящего времени ингаляционных лекарственных средств является именно системное действие. При распространении активного вещества в крови его молекулы попадают во все ткани и органы. При этом существенным недостатком системного применения является большой спектр проявлений токсичности и побочных действий на органы и ткани тела, которые не связаны с болезнью, подлежащей лечению.

В отличие от этого при применении водного аэрозоля, полученного из лиофилизата по настоящему изобретению, пептиды попадают в граничный слой между воздухом и легочным эпителием, где они активируют натрий-ионный канал. Таким образом, пептиды по настоящему изобретению действуют на эпителиальную ткань легкого "локально", а не системно. Проход пептидов через ткань легких не является желательным и не происходит.

В отличие от пептидных композиций, известных из литературы, благодаря водному аэрозолю, который был получен из лиофилизата по настоящему изобретению и не содержит добавок, удалось предотвратить диффузию ингалированного пептида через легкое в кровь. Благодаря этому достигается крайне положительное действие в отношении предотвращения возможному влиянию системно-токсических свойств пептида как на другие органы, так и на легкие. Таким образом, могут быть исключены обычные системные побочные действия, что означает большую медицинскую эффективность. Кроме того, благодаря локальному введению на внутреннюю поверхность легких при отсутствии диффузии в кровь требуется заметно меньшее количество активного вещества по сравнению с системным применением.

Далее неожиданно было выявлено, что в случае лиофилизата по настоящему изобретению, который содержит циклические пептиды формулы I и предпочтительно циклические пептиды с аминокислотными

последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 без добавок, практически может быть устранена химическая или биологическая нестабильность на срок более нескольких месяцев и лет. Собственно было выявлено, что химическая структура и биологическая активность циклических пептидов формулы I по настоящему изобретению, таких как пептиды с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6, неожиданно не ухудшается даже без добавления общепринятых добавок и/или стабилизаторов.

При применении циклических пептидов формулы I по настоящему изобретению, предпочтительно с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6, для ингаляции было выявлено, что циклические пептиды структурированы так, что они даже в растворенном виде, то есть в водном растворе, даже без добавок являются стабильными в течение более длительного времени, например, в резервуаре прибора для распыления (распылителя). Кроме того, оказалось, что циклические пептиды формулы I по настоящему изобретению, предпочтительно с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 согласно настоящему изобретению могут быть подготовлены так, что при их превращении в приемлемую для ингаляции форму циклические протеины от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 не повреждаются и, таким образом, неожиданно сохраняют полную активность даже без добавления общепринятых добавок и/или стабилизаторов.

Для получения раствора, например, по меньшей мере одного из пептидов формулы I по настоящему изобретению, предпочтительно одного пептида с аминокислотной последовательностью от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 в форме, которая является приемлемой в качестве аэрозоля для распыления, эти пептиды могут быть растворены в воде, а полученный раствор, например, без других добавок, таких как, например, общепринятые добавки и/или стабилизаторы, лиофилизирован с получением при этом порошка. Перед лиофилизацией раствор при необходимости может быть профильтрован для удаления муты.

В одном из других аспектов настоящее изобретение относится к применению лиофилизата по настоящему изобретению для получения аэрозоля, который является приемлемым для распыления, предпочтительно аэрозоля без добавок и/или стабилизаторов.

Применение лиофилизата по настоящему изобретению в данном случае обозначается также как "применение по (согласно) настоящему изобретению".

Было найдено, что пептиды формулы I, предпочтительно пептиды с аминокислотной последовательностью от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6, в лиофилизованной таким образом форме были стабильными по меньшей мере в течение 24 месяцев в охлаждаемом месте и по меньшей мере в течение 6 месяцев при комнатной температуре даже без добавления общепринятых добавок и/или стабилизаторов.

Льофилизат по настоящему изобретению может быть растворен в воде для применения для получения аэрозоля, например, с добавками или без добавок, например без добавок, например, для прямого получения аэрозоля или для хранения раствора, например, в резервуаре.

В одном из других аспектов настоящее изобретение относится к применению лиофилизата, в случае которого пептид формулы I, где X_1 и X_2 имеют определенные ранее значения, находится в водном растворе предпочтительно без добавок и/или стабилизаторов.

Неожиданно в качестве полезного эффекта было выявлено, что растворенные таким образом циклические пептиды формулы I, где X_1 и X_2 имеют определенные ранее значения, предпочтительно с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6, по меньшей мере в течение 7 дней были стабильными в растворе, что означает, что биологическая эффективность циклических протеинов благодаря переводу в приемлемое для ингаляции состояние не уменьшается даже без добавления общепринятых добавок и/или стабилизаторов.

При применении циклических пептидов по настоящему изобретению, предпочтительно с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6, было выявлено, что раствор циклических пептидов структурирован так, что он может быть превращен в аэрозоль, например, посредством распылителя, благодаря чему распыляются циклические пептиды. При этом оказалось, что частицы аэрозоля получают с диаметром, меньшим или равным 5 мкм.

Далее было выявлено, что аэрозоль, который преобладающим образом содержит капли диаметром ≤ 5 мкм, является предпочтительно приемлемым для применения, так как благодаря этому аэрозоль попадает даже в воздушное пространство легкого. Нижняя граница размера капель определяется только возможностью реализации размера капель.

В одном из других аспектов настоящее изобретение относится к применению лиофилизата для получения аэрозоля, в котором размеры частиц характеризуются диаметром ≤ 5 мкм.

В одном из других аспектов настоящее изобретение относится к применению лиофилизата по настоящему изобретению, отличающемуся тем, что аэрозоль, полученный из лиофилизата, применяют в форме ингаляции для улучшения/нормализации функции легких.

В одном из других аспектов настоящее изобретение относится к применению аэрозоля, полученного из лиофилизата по настоящему изобретению, предпочтительно аэрозоля без добавок, для улучшения функции легких, например для лечения отеков легких, и в одном из других аспектов к способу для улучшения функции легких, например для лечения отеков легких, отличающемуся тем, что пациенту

вводят аэрозоль без добавок согласно настоящему изобретению в форме ингаляции, и в одном из других аспектов к лиофилизату по настоящему изобретению для применения для улучшения/нормализации функции легких или для ингаляции для улучшения/нормализации функции легких.

Эффективная доза зависит от различных факторов, например от химической природы и фармакокинетики циклического соединения формулы I, от конкретного пациента, например от его массы тела, возраста и индивидуального состояния пациента, от природы и тяжести заболевания. В общем случае для успешного лечения наиболее крупных млекопитающих, таких как, например, человек, можно исходить из того, что (суточная) доза (приблизительно) от 0,1 до приблизительно (около) 200 мг/кг массы тела, например от 1 до 100 мг/кг массы тела, введенная, например, в виде нескольких частичных доз, например числом до 4, дает положительные результаты. Дети обычно получают половину дозы взрослого.

Кроме того, в исследованиях было показано, что благодаря обработке донорского легкого *ex vivo*, а именно перед трансплантацией пациенту, циклическим пептидом формулы I, где X_1 и X_2 имеют определенные ранее значения, предпочтительно с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6, неожиданным образом функция легких может быть улучшена/нормализована. При этом оказалось, что благодаря этому чрезвычайное улучшение может достигаться тогда, когда легкое, подлежащее трансплантации, обрабатывают перед трансплантацией аэрозолем из лиофилизата по настоящему изобретению предпочтительно без добавок.

В одном из других аспектов настоящее изобретение относится к экстракорпоральному способу для улучшения/нормализации функции легких, отличающемуся тем, что донорское легкое *ex vivo* обрызгивают водным аэрозолем предпочтительно без добавок и/или стабилизаторов, полученным из лиофилизата по настоящему изобретению.

Обработка легкого может быть осуществлена также (еще раз) после осуществленной трансплантации реципиенту.

При этом были получены результаты, показанные на фиг. 1. Концентрация циклического пептида формулы I по настоящему изобретению в аэрозоле составляла при этом от 5 до приблизительно 150 нМ.

Описание фигур

На фиг. 1 показана активность циклических пептидов с аминокислотной последовательностью от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 в зависимости от концентрации. По оси x отложены значения концентрации в нМ (в логарифмическом масштабе) циклических пептидов от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6, по оси y отложены значения натрий-ионного тока в %.

На фиг. 2 показаны результаты ингаляционного применения циклического пептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 во время перфузии легких вне тела (экстракорпорально, *ex vivo*), которая моделирует трансплантацию легких.

На фиг. 2A по оси x отложены моменты от T1 до T4, в которые осуществляли измерения после ингаляционного применения пептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 (один раз в час). По оси y отложены значения изменения объема легких (Compliance), при этом на фиг. 2B по оси x отложены также моменты от T1 до T4, а по оси y отложены значения ΔpO_2 , представляющего собой разность артериовенозного показателя pO_2 . В качестве контроля впрыскивали воду (WFI). Показаны результаты 8 экспериментов на группу.

На фиг. 3 показан цикл лиофилизации пептидов с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 7, представленный как зависимость температуры камеры (сплошная линия) и температуры продукта (пунктирная линия) в °C (ось y) от времени в минутах (ось x).

На фиг. 4 показана схематическая структура опыта по конденсации аэрозоля в охлаждаемой ловушке, где цифрами обозначены:

- 1 - полистироловый сосуд, наполненный льдом и солью;
- 2 - трубка с растворенным пептидом (контрольное вещество);
- 3 - распылитель;
- 4 - камера-сборник;
- 5 - контрольный модуль.

На фиг. 5 показано усредненное распределение размеров частиц аэрозоля циклического пептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, генерированного 2 разными распылителями (тип A и тип B). Измерение осуществляли способом лазерной дифракции (расход: 15 л/мин). Интервал ошибок=SD. Линии показывают соответствующую долю частиц диаметром ≤ 5 мкм в аэрозоле. По оси x отложены значения размеров капель в мкм, по оси y отложены значения суммарного количества в %.

На фиг. 6 показано распределение аэрозоля циклического пептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 в симуляторе дыхания в разных местах:

- 1 - фильтр на стороне вдоха;
- 2 - фильтр на стороне выдоха;
- 3 - соединительная часть фильтра;
- 4 - Y-образная часть распылителя (включая односторонний клапан);
- 5 - остаток в распылителе;

причем были использованы 2 распылителя типа А и типа В.

Пример 1. Пептидный синтез.

Пептиды получали, осуществляя следующие стадии: последовательное присоединение аминокислот; селективное отщепление от твердой фазы; очистка и лиофилизация; селективная циклизация; отщепление защитных групп; очистка и лиофилизация; аналитическое исследование.

Все циклические пептиды по настоящему изобретению, представляющие собой пептиды с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6, а также пептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7 получали с использованием защитных групп "флуоренилметоксикарбонил (Fmoc)/трет-бутил" твердофазным синтезом на носителе (2-хлортритилхлоридная смола) в полностью автоматизированном режиме. Диизопропилкарбодиимид и N-гидроксibenзотриазол использовали в качестве связывающего агента. Все реакции присоединения проводили в N,N-диметилформамиде в качестве растворителя. С этой целью защищенные аминокислоты последовательно присоединяли к соответствующей С-концевой аминокислоте, которую использовали в качестве начального звена. Снятие защиты в виде флуоренилметоксикарбонильной группы осуществляли 20%-м раствором пиперидина в N,N-диметилформамиде. Отщепление готовых частично защищенных пептидов от носителя (смолы) осуществляли в смеси уксусной кислоты и дихлорметана с соотношением 1:1.

В случае пептидов, содержащих цистеин, осуществляли защиту боковой цепи после отщепления от носителя (смолы) в 95%-м растворе трифторуксусной кислоты, после чего осуществляли циклизацию окислением концевых цистеиновых остатков посредством подвода воздуха к неочищенному линейному пептиду при значении pH в щелочной области (8,5) в течение 90 ч. Неочищенный циклический пептид очищали в колонке с силикагелем RP-C18 способом обращенно-фазовой жидкостной хроматографии среднего давления (RP-MPLC) смесью "ацетронитрил/вода" с градиентом от 5 до 40%. В заключение трифторацетат-ион замещали в колонке с леватитом MP64 (в ацетатной форме) ацетат-ионом. После промывки водой очищенную ацетатную соль лиофилизовали и получали в виде белого или слегка окрашенного порошка.

В случае пептидов, не содержащих цистеин, стадию циклизации проводили с частично защищенным линейным пептидом после отщепления от носителя (смолы). После селективной циклизации пептида, не содержащего цистеин, осуществляли защиту боковой цепи трифторуксусной кислотой с последующим осуществлением хроматографирования способом препаративной RP-MPLC, замещения трифторацетат-иона ацетат-ионом и лиофилизации ацетатной формы так же, как и в случае пептидов, содержащих цистеин.

Затем циклические протеины от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 были проанализированы способом обращенной ВЭЖХ для определения чистоты и массы.

Чистота циклического протеина SEQ ID NO: 1 составила 96,3%, m/z (ESI) 1924,2 ($M^+ + 1$).

Чистота циклического протеина SEQ ID NO: 2 составила 96,3%, m/z (ESI) 1924,2 ($M^+ + 1$).

Чистота циклического протеина SEQ ID NO: 3 составила 98,8%, m/z (ESI) 1888,2 ($M^+ + 1$).

Чистота циклического протеина SEQ ID NO: 4 составила 97,4%, m/z (ESI) 1873,4 ($M^+ + 1$).

Чистота циклического протеина SEQ ID NO: 5 составила 99%, m/z (MALDI-TOF) 1901,6 ($M^+ + 1$).

Чистота циклического протеина SEQ ID NO: 6 составила 99%, m/z (MALDI-TOF) 1902,7 ($M^+ + 1$).

Чистота циклического протеина SEQ ID NO: 7 составила 95%, m/z (MALDI-TOF) 1778,02 ($M^+ + 1$).

Соединение с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7

цикло (CGQREAPAGAAKPWYC) ,

где дисульфидный мостик образован между обоими концевыми цистеиновыми остатками, оказалось биологически неактивным и было использовано в целях сравнения.

Пример 2. Электрофизиологические исследования амилоридчувствительного натрий-ионного канала (ENaC).

Макроскопические натрий-ионные токи определяли на человеческих клетках легочного эпителия A549 в конфигурации "whole cell" (целая клетка) посредством техники "patch clamp" (фиксация фрагмента) (Hamill et al., Pflugers Arch. 1981, 391(2): 85-100, 1981). Для определения токов в конфигурации "whole cell" использовали следующие омывающие и электродные растворы:

омывающий раствор: 135 mM метансульфоната натрия, 10 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 5,5 mM глюкозы и 10 mM HEPES, pH 7,4;

электродный раствор: 120 mM метансульфоната калия, 15 mM KCl, 6 mM NaCl, 1 mM Mg₂ATФ, 2 mM Na₃ATФ, 10 mM HEPES и 0,5 mM ЭГТА (pH 7,2).

Покровные стекла с культивированными на них клетками переносили в 1 мл вмещающего экспериментального раствора, фиксировали на предметном столике микроскопа (Axiovert 100, 400-кратное увеличение) и осуществляли супердиффундирование в клетки описанного ранее омывающего раствора. Затем на приемлемой клетке (прилипшей к покровному стеклу) определяли ток. С этой целью микроэлектрод, заполненный раствором электролита (стеклянные капилляры с определенным полированным оплавлением отверстием на конце острия диаметром приблизительно 1-3 мкм (соответствует сопротивлению острия электрода 3-5 МОм)), позиционировали на клетке и всасывали мембрану, так чтобы между мембраной и электродом образовывался "гигаомный контакт" для минимизации тока утечки. В случае

конфигурации "whole cell" мембрана под острием электрода прорывалась, чтобы можно было измерить ток, протекающий через все ионные каналы клетки. При получении "гигаомного контакта" благодаря предварительному усилителю CV-4 Headstage, Axon Instruments и усилителю Axopatch 1D, Axon Instr. к мембране прикладывали определенный исходный потенциал и измеряли ток, который при этом протекал через ионные каналы.

Процедура управления импульсами состояла из гиперполяризации мембраны клетки до -100 мВ в течение 5 с и осуществления после этого последующей пошаговой деполяризации с шагом 20 до +100 мВ.

Эту процедуру осуществляли перед прибавлением циклических пептидов (контроль) и после их прибавления. Полученные таким образом токи записывали и посредством программы PCLAMP 6.0 анализировали. С этой целью значения токов, полученных в присутствии амилорида, вычитали из значений ранее записанных токов, таким образом получая возможность определять амилоридчувствительный натриевый ток, протекающий через эпителиальные натриевые каналы.

Результаты измерений обобщены в табл. 1, в которой приведены значения активности циклических пептидов от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 7 в отношении клеточного амилоридчувствительного натрий-ионного тока. Активность отдельных пептидов указана как EC₅₀ (в нМ). EC₅₀ представляет собой эффективную концентрацию, при которой фиксируют 50%-е значение от максимальной активности (т.е. от максимального повышения силы тока I).

Таблица 1

Циклический пептид	EC ₅₀ (нМ)
SEQ ID NO: 1	54
SEQ ID NO: 2	56
SEQ ID NO: 3	38
SEQ ID NO: 4	45
SEQ ID NO: 5	24
SEQ ID NO: 6	19
SEQ ID NO: 7	Активность отсутствует

Активность циклических пептидов от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 в зависимости от концентрации показана на фиг. 1. Максимальная активность принята за 100%.

Результаты исследований, представленные в табл. 1 и на фиг. 1, показывают, что циклические пептиды с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 являются биологически активными, тогда как циклический пептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, которая имеет структурно соответствующую идентичность, является неактивным.

Пример 3. Получение лиофилизата.

Разработку стабильной при хранении формы циклических пептидов формулы I осуществляли в промышленном масштабе. С этой целью циклические пептиды от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6, а также циклический пептид SEQ ID NO: 7 растворяли с концентрацией от 0,1 до 100 мг/мл в чистой воде и для удаления веществ, вызывающих помутнение, примесей и возможных веществ, обуславливающих нестерильность, фильтровали через фильтр с размером пор 0,2 мкм. После фильтрования циклический пептид, растворенный в чистой воде, порционировали в стеклянные или пластиковые ампулы и сублимационной сушкой (лиофилизацией) переводили в форму стабильного порошка.

При этом использовали параметры лиофилизации, описанные в табл. 2, и цикл лиофилизации, описанный на фиг. 3.

Таблица 2

Стадия	Процесс	Температура камеры, °C	Выдержка, мин	Изменение температуры (°C) во время выдержки	Давление, мТорр
1	Загрузка	5	60	5,0	н.о.
2	Замораживание	-45	150	0,5	н.о.
3	Первичная сушка	-15	940	0,3	250
4	Вторичная сушка	20	630	0,5	75
5	Завершение	Закрывание флаконов в атмосфере азота с 95%-й чистотой			

В результате лиофилизации были получены циклические пептиды с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 в виде белого порошка.

Пример 4. Исследование стабильности лиофилизата по примеру 2 после хранения при комнатной

температуре и в холодильнике.

Исследование стабильности лиофилизата циклических пептидов с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 осуществляли в промышленном масштабе. С этой целью лиофилизат хранили в течение до 24 месяцев при температуре от 2 до 8°C и в течение до 6 месяцев при температуре 25°C и относительной влажности 60%. Стабильность исследовали в разные моменты в течение этих сроков. В частности, исследовали внешний вид, содержание, а также чистоту циклических пептидов. С этой целью использовали принятые в лабораторной практике аналитические способы, такие как, например, визуальная проверка и обращенная ВЭЖХ.

Кроме того, после хранения в течение 24 месяцев при 2-8°C определяли биологическую активность способом "patch clamp". При этом макроскопические токи клеток A549 определяли в конфигурации "whole cell" техники "patch clamp" соответственно описанию в разделе "Электрофизиологические исследования амилоридчувствительного натрий-ионного канала (ENaC)".

В табл. 3 обобщены результаты исследования стабильности соответствующих лиофилизатов циклических пептидов с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 в момент T=0 и через 6 месяцев (T=6 М) или через 24 месяца (T=24 М). Внешний вид не изменялся в течение всего срока. Содержание циклических пептидов, а также чистота характеризовались лишь незначительными колебаниями.

Таблица 3

Аналитический параметр	Температура хранения 2-8°C		Температура хранения 25°C при относительной влажности 60%	
	T=0	T=24 М	T=0	T=6 М
Внешний вид				
SEQ ID NO: 1	белый порошок		белый порошок	
SEQ ID NO: 2	белый порошок		белый порошок	
SEQ ID NO: 3	белый порошок		белый порошок	
SEQ ID NO: 4	белый порошок		белый порошок	
SEQ ID NO: 5	белый порошок		белый порошок	
SEQ ID NO: 6	белый порошок		белый порошок	
Количество/содержание				
SEQ ID NO: 1	100%	99%	100%	99%
SEQ ID NO: 2	100%	99%	100%	99%
SEQ ID NO: 3	100%	99%	100%	99%
SEQ ID NO: 4	100%	99%	100%	99%
SEQ ID NO: 5	100%	99%	100%	99%
SEQ ID NO: 6	100%	99%	100%	99%
Чистота				
SEQ ID NO: 1	96%	96%	96%	95%
SEQ ID NO: 2	96%	96%	96%	95%
SEQ ID NO: 3	98%	98%	98%	97%
SEQ ID NO: 4	97%	97%	97%	96%
SEQ ID NO: 5	99%	99%	99%	98%
SEQ ID NO: 6	99%	99%	99%	98%

Лиофилизат во всех случаях циклических пептидов с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 согласно результатам оставался стабильным в течение до 24 месяцев при температуре от 2 до 8°C и в течение до 6 месяцев при температуре 25°C и относительной влажности 60%.

Определение биологической активности способом "patch clamp" показало, что лиофилизат с любым из циклических пептидов с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 все еще оставался полностью активным через 24 месяца хранения при температуре от 2 до 8°C.

Пример 5. Получение водного раствора циклических пептидов с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 перед ингаляцией.

Для композиций для применения циклических протеинов с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 стабильные белые порошки, полученные при лиофилизации согласно примеру 2, в каждом случае растворяли в заданном объеме чистой воды с концентрацией от 0,1 до 100 мг на мл. Полученные растворы циклических протеинов от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 затем переносили в резервуар распылителя. При растворении циклических протеинов от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 в воде образовывались прозрачные растворы.

Пример 6. Исследование стабильности циклических пептидов с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 в растворенной композиции перед ингаляцией.

Из практических соображений водный раствор циклического пептида с одной из аминокислотных последовательностей от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 не всегда может быть применен для ингаляции непосредственно после его изготовления. Поэтому в порядке примера исследовали стабильность водного раствора. С этой целью готовый к применению раствор хранили в принятом в лабораторной практике шприце при температуре от 2 до 8°C в течение 7 дней или в резервуаре распылителя при 25°C в течение 24 ч. В частности, исследовали внешний вид, содержание циклического пептида SEQ ID NO: 1, а также его чистоту. Используемые с этой целью способы представляли собой принятые в лабораторной практике аналитические способы, такие как, например, визуальная проверка, а также анализ способом обращенной ВЭЖХ.

Результаты исследования стабильности водного раствора циклического пептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 обобщены в табл. 4. Внешний вид не изменялся в течение всего срока. Содержание циклического пептида, а также чистота характеризовались лишь незначительными колебаниями.

Таблица 4

Параметр	Лабораторный шприц при температуре от 2 до 8°C		Резервуар распылителя при температуре 25°C	
	T=0	T=7 дней	T=0	T=24 часа
Внешний вид	прозрачный раствор		прозрачный раствор	
Количество/содержание	25 мг/мл		25 мг/мл	
Чистота	96,3%	96,2%	96,6%	96,5%

Водный раствор циклического пептида с аминокислотной последовательностью от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 для ингаляции согласно результатам оставался стабильным в принятом в лабораторной практике шприце при температуре от 2 до 8°C в течение 7 дней или в резервуаре распылителя при температуре 25°C по меньшей мере в течение 24 ч.

Пример 7. Исследование стабильности циклических пептидов с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 в растворенной композиции во время превращения в аэрозоль.

Так как протеины и пептиды иногда могут быть очень нестабильными, то было исследовано, остаются ли стабильными циклические пептиды с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 в растворенной композиции во время превращения в аэрозоль. С этой целью циклические пептиды соответственно описанию примера 4 растворяли в воде. После заполнения резервуара распылителя водный раствор циклических пептидов превращали в аэрозоль. С этой целью использовали распылитель "сетчатого типа" (небулайзер). Аэрозоль, выходящий из распылителя, затем улавливали в охлаждаемой ловушке, соответственно представленной на фиг. 4. Биологическую активность собранного аэрозоля определяли способом "patch clamp". При этом макроскопические токи клеток A549 определяли в конфигурации "whole cell" техники "patch clamp" соответственно описанию в разделе "Электрофизиологические исследования амилоридчувствительного натрий-ионного канала (ENaC)".

Химическую стабильность сконденсированного аэрозоля определяли способом обращенной ВЭЖХ/МС.

В порядке примера удалось показать, что циклический пептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 в растворенной композиции сохраняет свою биологическую, а также химическую стабильность во время превращения в аэрозоль.

Пример 8. Физико-химическая характеристика аэрозоля циклических пептидов с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6.

Посредством распылителя, который превращает водные растворы в аэрозоль, водные растворы циклических пептидов с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 также могут быть превращены в аэрозоль. Такие аэрозоли могут быть охарактеризованы в отношении среднего размера капель, а также распределения по величине капель аэрозоля. С этой целью используют 2 традиционных способа, которые описаны также в фармакопее (Pharmacopoeia). В одном из аналитических способов применяют каскадный импактор в его современном исполнении "Next Generation Impaktor" (импактор следующего поколения). При этом аэрозоль пропускают через ряд сетчатых пластин, причем диаметр отверстий на каждой пластине уменьшается, а число отверстий возрастает. В случае другого аналитического способа при измерении по лазерной дифракции размеры капель определяют посредством лазера. 2 важных параметра, которые определяют в случае этих измерений, представляют собой, с одной стороны, медиану диаметров всех капель, а с другой стороны, количество капель, диаметр которых ≤ 5 мкм. В литературе этот диаметр описан в качестве границы, менее которой вдыхаемые частицы аэрозоля фактически попадают в легкие.

Широко известно, что на практике генерированный аэрозоль только частично становится доступ-

ным для пациента. Таким образом, для определения количества аэрозоля, который становится доступным для пациента, осуществляли испытания с симулятором дыхания. Для исследования размеров частиц и осуществления моделирования дыхания в порядке примера использовали аэрозоль из водного раствора циклического пептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1. Для получения аэрозоля применяли распылители разных типов. Распылители А и В представляли собой так называемые "распылители сетчатого типа".

Доля капель диаметром ≤ 5 мкм в аэрозоле составляла в случае всех распылителей по меньшей мере 50%, см. табл. 5 и фиг. 5, где приведены и показаны свойства аэрозоля циклического пептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, генерированного с 3 разными распылителями.

Таблица 5

Распылитель	Медиана диаметров частиц	Количество частиц с ≤ 5 мкм
Тип А	4,7 мкм	50%
Тип В	3,3 мкм	70%
Тип С	3,7 мкм	65%

Таким образом, можно было установить, что преобладающая доля получаемого благодаря распылителю аэрозоля водного раствора циклического пептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 доступна для ингаляции, как показано на фиг. 6, на которой проиллюстрировано количественное определение циклического протеина на "фильтре со стороны вдоха". Количество аэрозоля, которое не доступно для ингаляции, является заметно меньшим (фиг. 6).

Пример 9. Определение циклических пептидов с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 в крови после парентерального введения.

В порядке примера определение циклических пептидов с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 осуществляли после парентерального введения в кровь собаке и крысе. С этой целью в порядке примера водный раствор циклического протеина с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 в виде болюса (25 мг/кг массы тела) внутривенно вводили экспериментальным животным. Непосредственно после завершения внутривенного введения кровь отбирали и определяли концентрацию циклического протеина с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 принятым в лабораторной практике способом обращенной ВЭЖХ/МС. Результаты представлены в табл. 6, в которой приведена плазматическая концентрация циклического протеина с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 после внутривенного введения.

Таблица 6

	Крыса	Собака
Плазматическая концентрация (мкг/мл)	28	42

Пример 10. Определение циклических пептидов с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 в ткани легких после ингаляции в виде аэрозоля.

Определение циклического пептида с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 может быть осуществлено в ткани легких крысы. С этой целью в порядке примера из водного раствора циклического протеина с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 посредством распылителя получали аэрозоль. Аэрозоль давали вдыхать экспериментальному животному (72 мг/кг массы тела). После завершения ингаляции аэрозоля исследовали как ткань легких, так и кровь экспериментального животного. Концентрацию циклического пептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 определяли способом обращенной ВЭЖХ/МС.

В порядке примера после ингаляции циклического пептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 с дозой 72 мг/кг массы тела удалось определить в ткани легких концентрацию 1,2 мкг/г ткани легких. В отличие от этого циклический пептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 не удалось обнаружить в крови до предела обнаружения, равного 0,1 г/мл.

Пример 11. Действие пептида с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 7 на дегликозилированные поверхности клеток.

В экспериментах с цельными клетками клетки A549 инкубировали с ферментом "PNG-аза F" (пептид-N⁴-(N-ацетил-β-D-глюкозаминил)аспарагинамидаза F), 100 единиц в течение от 1 до 5 мин, непосредственно перед измерениями "patch clamp" и покровные стекла с культивированными клетками промывали внешним раствором перед их переносом в камеру с 1 мл омывающего раствора.

После контрольных записей к омывающему раствору прибавляли 240 нМ пептидов с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 7. Общий клеточный ток записывали при $E_h = -100$ мВ как на клетках без какой-либо предварительной обработки в контролируемых условиях и после прибавления одного из пептидов с аминокислотной последовательностью от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 7, так и с предварительной обработкой PNG-азой F. Результаты экспериментов с дегликозилированием с использованием методики "patch clamp" в варианте с цельными клетками приведены в табл. 7, в которой показано действие дегликозилирования клеток A549 на активацию натрий-ионного тока пепти-

дами с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 7. Токи цельных клеток записывали при $E_h = -100$ мВ. Концентрация пептидов с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 7 в омывающем растворе составляла 240 нМ.

Таблица 7

Контроль/пептид	С предварительной обработкой PNG-азой F	Без предварительной обработки PNG-азой F
Контроль	25,4 пА (n=16)	
SEQ ID NO: 1	19,6 пА (n=3)	1073,3±15,1 пА (n=10)
SEQ ID NO: 2	21,3 пА (n=3)	
SEQ ID NO: 3	20,6 пА (n=3)	
SEQ ID NO: 4	22,5 пА (n=3)	
SEQ ID NO: 5	22,4 пА (n=3)	
SEQ ID NO: 6	19,9 пА (n=3)	
SEQ ID NO: 7	Активность отсутствует	Активность отсутствует

Клетки с добавлением PNG-азы F (обработка) перед осуществлением испытания "patch clamp" снижали способность пептидов с аминокислотными последовательностями от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 повышать натриевый ток. В контрольных условиях без прибавления пептида в омывающий раствор и при исходном потенциале -100 мВ натрий-ионный ток составил 25,4 пА как в необработанных клетках, так и в клетках, которые были предварительно обработаны PNG-азой F. В необработанных клетках прибавление пептидов с аминокислотной последовательностью от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 (конечная концентрация 240 нМ) к омывающему раствору при исходном потенциале -100 мВ вызывало заметный натрий-ионный ток величиной больше 1000 пА. Пептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, напротив, не проявил активности.

Пример 12. Эксперименты по трансплантации легких у свиньи.

Свиней с мертвым головным мозгом укладывали в положение на спине и проводили продольную стернотомию. Вскрывали перикард и обе плевральные полости. Нижнюю и верхнюю полые вены закрывали. Подводящий катетер вводили в легочную артерию через кисетный шов в выходной тракт правого желудочка. Закрытие притока обеспечивали соединением нижней и верхней полых вен, а закрытие оттока обеспечивали наложением скобки на аорту. Затем легкие защищали профилактической промывкой холодным изотоническим консервирующим раствором (подаваемым из расчета 50 мл на кг массы тела свиньи и содержащим ионы калия, ионы натрия, ионы магния, ионы кальция, хлорид-ионы, декстран, глюкозу, буферизирующие ионы) через подводящий катетер. Разрез левого ушка сердца обеспечивал отток. В течение этого промежутка времени легкие вентилировали 50%-м кислородом, а в обе плевральные полости и в пневмомедиастинум вносили ледяную кашку.

Техника эксплантации в целом представляла собой удаление сердца и пищевода согласно следующим стадиям:

- а) рассечение мягких тканевых мостиков к полостям грудной клетки на обеих сторонах трахеи;
- б) пересечение обеих легочных связок (очень глубокое трудное действие), затем VCI (нижней поллой вены), нижней грудной нисходящей аорты, а также пищевода;
- с) тупое отделение остальных медиастинальных связок;
- д) полное раздувание донорского легкого перед закрытием трахеи скобкой.

После эксплантации легкие завертывали в марлю, укладывали в пузырь со льдом, заполненный низкомолекулярным калийдекстрановым внеклеточным раствором, и хранили при 4°C в течение от 18 до 24 ч.

Для кондиционирования легких ex vivo использовали технику EVLP (экстраваскулярная перфузия легких). В технике EVLP донорские легкие включают в контур циркуляции, состоящий из насоса, вентилятора и фильтров. В технике EVLP температура может быть повышена до 37°C. В EVLP для доставки к легким кислорода применяют вентилятор. Для пропускания через легкие внеклеточного раствора, содержащего человеческий альбумин и питательные вещества, применяют насос. Во время осуществления EVLP функция легких, как правило, может быть оценена по соответствующим ключевым индикаторам.

Для экспериментов по трансплантации экспериментальных свиных легких контур циркуляции EVLP заполняли в качестве праймера 2,0 л раствора человеческого альбумина. Этот внеклеточный раствор имел оптимальное коллоидное осмотическое давление. После продувки контура циркуляции праймер циркулировал при 20°C до его связывания легкими. К перфузату прибавляли гепарин, цефуроксим, метилпреднизолон.

Подготовку донорского легкого свиньи начинали с пришивания воронкообразной трубки из силиката с контролирующим давлением катетером, встроенным в левую предсердную воздушную манжету (LA), для того, чтобы LA в открытом состоянии закрепить шплинтом и поддерживать закрытым контур

перфузионной циркуляции. Эту трубку надежно анастомозировали на воздушной манжете LA с применением нити из монофиламента 5-0 для обеспечения надежного и эффективного оттока дренажа. Канюлю подобного типа, применяемую для перфорации легочной артерии (РА), подготавливали должным образом, так чтобы сравнять по размеру с РА. Ретроградную возвратную промывку проводили с применением 500 мл внеклеточного раствора, стабилизированного буферной системой. Перед включением донорских легких в контур циркуляции EVLP трахею открывали и проводили прямое отсасывание из бронхов для очистки дыхательных путей. Эндотрахеальную трубку (внутренним диаметром 8 мм) вводили в трахею и укрепляли охватывающей лентой. Затем легкие включали в контур циркуляции EVLP. Сначала соединяли канюлю LA с контуром циркуляции и начинали осуществлять медленный ретроградный проток для продувки канюли РА. По завершении полной продувки канюлю РА соединяли с контуром циркуляции и начинали антероградную подачу с расходом 150 мл/мин перфузата при комнатной температуре. Затем в следующие 30 мин температуру перфузата ступенчато повышали до 37°C. Как только температура достигала значения 32-34°C, начинали механическую вентиляцию донорских легких свиньи, причем скорость вентиляции и скорость потока перфузата ступенчато повышали.

Поток газа при EVLP транспортирует кислород к легким и переносит диоксид углерода к подводимому перфузату (86% N₂, 6% O₂, 8% CO₂), при этом через газообменную мембрану начинали (начало при расходе газа 0,5 л/мин с контролем на основе pCO₂ подводимого перфузата) подавать подводимый перфузат (под давлением) с pCO₂ в интервале 35-45 мм рт. ст. В момент, когда легкое было полностью расширено, вводили разовую дозу AP301 (1 мг/кг в 5 мл воды), применяя простую стандартную систему распыления жидкости в донорское легкое свиньи, вентилировали и пропускали через ячейку системы EVLP.

Во время осуществления экспериментов с EVLP поддерживали заданное постоянное кровоснабжение. Ежечасно определяли и записывали следующие функциональные параметры:

расход в легочной артерии (PAF): л/мин;

(среднее) давление в легочной артерии (PAP): мм рт. ст.;

давление в левом предсердии (LAP): мм рт. ст.;

сопротивление легочных сосудов (PVR=[PAP-LAP]×80/PAF): дин/с/см⁻⁵;

среднее значение, пиковое значение и значение на плато давления в дыхательных путях (mAwP, peakAwP, platAwP): см вод. ст.;

динамическое изменение объема легких (Compliance): мл/см вод. ст.;

газовый анализ подаваемого (РА) и отводимого (PV) перфузата: pO₂, pCO₂ и pH.

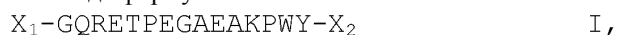
Результаты.

В данном исследовании оценено действие пептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 на функцию легких в экстракорпоральной системе, моделирующей трансплантацию легких. Результаты исследования показали, что при применении через вдыхание было улучшено как динамическое изменение объема легких, так и разность ΔpO₂ артериовенозного показателя pO₂ в легких, которые были обработаны пептидом с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, как показано на фиг. 2А и 2В.

Применение пептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7 не показало улучшающего действия на легкие.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Водный аэрозоль для ингаляции, не содержащий добавок и/или стабилизаторов, полученный из лиофилизата циклического пептида формулы I



где

X₁ представляет собой от 1 до 4 N-концевые природные или синтетические аминокислоты;

X₂ представляет собой природную аминокислоту, где доля капель диаметром ≤5 мкм в аэрозоле составляет по меньшей мере 50%.

2. Водный аэрозоль по п.1, в котором X₁ представляет собой C (Cys), KSP (Lys-Ser-Pro), K (Lys), орнитин, 4-аминомасляную кислоту или β-аланин.

3. Водный аэрозоль по п.1 или 2, в котором X₂ представляет собой C (Cys), D (Asp), G (Gly) или E (Glu).

4. Водный аэрозоль по п.1 или 2, в котором циклический пептид выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1



где между обоими концевыми цистеиновыми остатками образован дисульфидный мостик;

SEQ ID NO: 2



где амидная связь образована между аминогруппой, которая связана с ε-атомом углерода боковой цепи N-концевого остатка лизина, и карбоксильной группой боковой цепи, которая связана с γ-атомом

углерода С-концевого остатка глутаминовой кислоты;

SEQ ID NO: 3

цикло (KGQRETPEGAEAKPWYG) ,

где амидная связь образована между аминогруппой, которая связана с ϵ -атомом углерода боковой цепи N-концевого остатка лизина, и карбоксильной группой С-концевого остатка глицина;

SEQ ID NO: 4

цикло (орнитин-GQRETPEGAEAKPWYG) ,

где амидная связь образована между аминогруппой, которая связана с δ -атомом углерода боковой цепи N-концевого остатка орнитина, и карбоксильной группой С-концевого остатка глицина;

SEQ ID NO: 5

цикло (4-аминомасляная кислота-GQRETPEGAEAKPWYD) ,

где амидная связь образована между аминогруппой N-концевого остатка 4-аминомасляной кислоты и карбоксильной группой боковой цепи, которая связана с β -атомом углерода С-концевого остатка аспарагиновой кислоты;

SEQ ID NO: 6

цикло (β -аланин-GQRETPEGAEAKPWYE) ,

где амидная связь образована между аминогруппой N-концевого остатка аланина (остатка 3-аминопропионовой кислоты) и карбоксильной группой боковой цепи, которая связана с γ -атомом углерода С-концевого остатка глутаминовой кислоты.

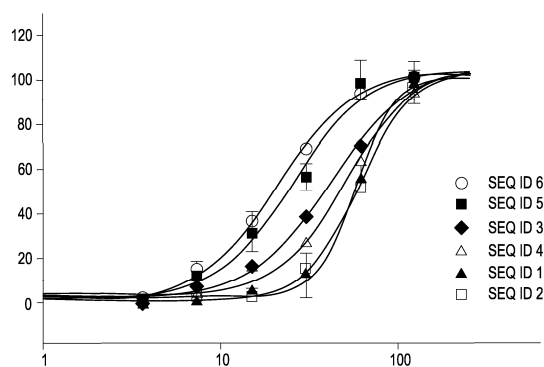
5. Водный аэрозоль по п.1 или 2, в котором циклический пептид находится в виде соли.

6. Водный аэрозоль по п.1 или 2 для улучшения функции легких.

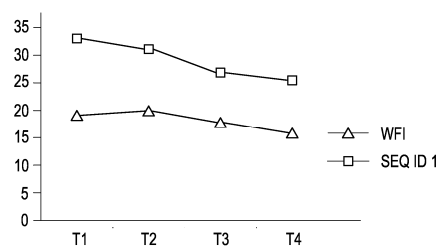
7. Водный аэрозоль по п.1 или 2 для лечения отека легких.

8. Способ получения водного аэрозоля по п.1 или 2, согласно которому лиофилизат циклического пептида формулы I растворяют в воде.

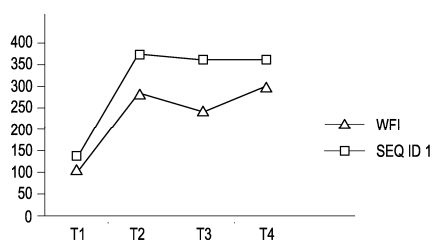
9. Экстракорпоральный способ улучшения функции легких, отличающийся тем, что донорское легкое обрызгивают ex vivo водным аэрозолем по любому из пп.1 или 2.



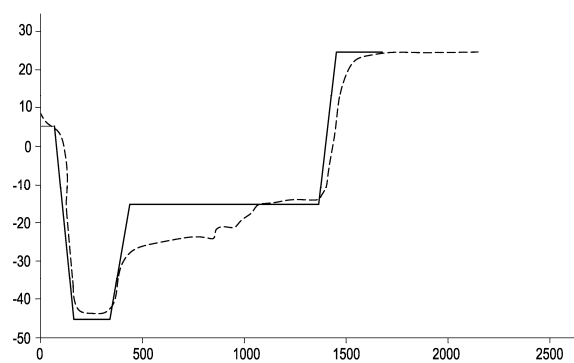
Фиг. 1



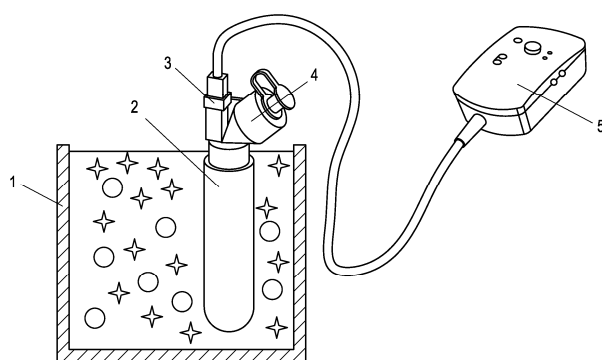
Фиг. 2А



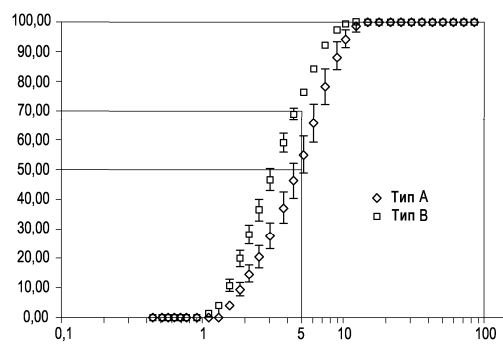
Фиг. 2В



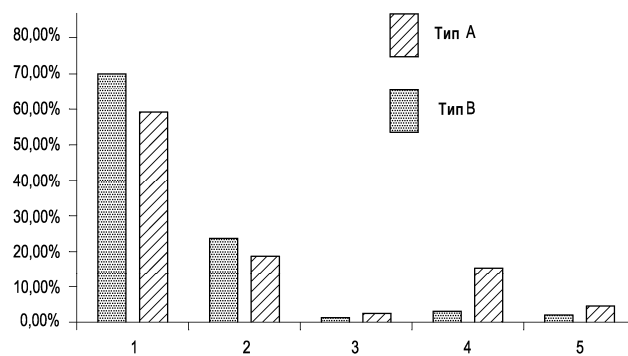
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2