

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040577**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.06.28

(21) Номер заявки
201500486

(22) Дата подачи заявки
2015.06.01

(51) Int. Cl. *A61K 38/55* (2006.01)
A61K 47/10 (2017.01)
A61K 9/12 (2006.01)
A61K 9/72 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

**(54) КОМБИНИРОВАННЫЙ АЭРОЗОЛЬНЫЙ СОСТАВ НА ОСНОВЕ ИНГИБИТОРОВ
ПРОТЕАЗ И ЕГО ПОЛУЧЕНИЕ**

(43) 2016.12.30

(96) 2015000046 (RU) 2015.06.01

(71)(72)(73) Заявитель, изобретатель и
патентовладелец:

ЖИРНОВ ОЛЕГ ПЕТРОВИЧ (RU)

(56) WO-A2-2013066214

ZHIRNOV O.P. High protection of animals
lethally infected with influenza virus by aprotinin-
rimantadine combination. Journal of Medical
Virology. 1987, Vol. 21, Issue 2, pp. 161-167,
doi:10.1002/jmv.1890210208, реферат

RU-C1-2425691

RU-C1-2054180

(57) Изобретение относится к медицине и описывает лекарственную композицию белковых или полипептидных соединений из группы ингибиторов протеолитических ферментов или их комбинаций с противовирусными, антибактериальными или противовоспалительными веществами для создания аэрозоля с помощью водонерастворимого озонсберегающего пропеллента в аэрозольных устройствах, снабженных дозирующим клапаном. Созданный аэрозольный состав может применяться при лечении заболеваний, сопровождающихся нарушением протеолитического баланса, таких как респираторные инфекции, включая грипп, кератоконъюнктивиты вирусной и бактериальной этиологии, герпетические поражения слизистых оболочек и кожи, хроническая обструктивная бронхопневмония, астма, заживление ран и др.

040577

B1

040577

B1

Изобретение относится к медицине и посвящено созданию фармацевтических аэрозолей с активными веществами белковой природы с выталкивающими пропеллентными системами для лечения заболеваний у людей.

Известна трех-компонентная выталкивающая система "Модулит", состоящая из водонерастворимого пропеллента, глицерола и этанола [Ganderton et al. 2002]. Основными медицинскими пропеллентами нового поколения из группы озон-сберегающих (свободных от хлорсодержащих флюорокарбонов; CFC-free -chlorofluorocarbons free) служат 134А (1,1,1,2-тетрафторэтан) и 227 (1,1,1,2,3,3,3-гептафторпропан). Однако для медицинского применения системы Модулит в аэрозольной композиции не установлено, каким образом и в каком соотношении нужно соединить перечисленные компоненты и/либо каким образом получить замещение водной фазы, чтобы сохранить активное вещество полипептидной природы и создать однородную смесь при наличии водной фазы, в которой растворен белковый ингибитор протеаз. Не известно, каким образом предотвратить денатурацию белковой или полипептидной молекулы ингибитора протеаз на разделе фаз под воздействием пропеллента и этанола. Не известно, каким образом устранить токсический эффект раздражения слизистых оболочек органов этанолом, входящим в состав выталкивающей системы.

Молекулы белков плохо растворимы в указанных флюорокарбонных смесях и быстро денатурируют, теряя нативную структуру и активность при смешивании с указанными поверхностно-активными веществами. Для достижения технического результата, заключающегося в создании нетоксичных аэрозолей с физиологически активными белковыми и полипептидными молекулами предложено уникальное соотношение указанных компонентов и активного вещества и специфический порядок их приготовления и смешивания, позволяющий: (1) сохранить сорастворимость компонентов, (2) сохранить аэрозоль-генерирующие свойства многокомпонентной композиции, (3) сохранить биологические свойства активного белкового вещества и (4) снизить токсические и воспалительные эффекты генерируемого аэрозоля на органы человека и животных.

Известен способ лечения гриппа и других респираторных инфекций аэрозолем ингибиторов протеаз, преимущественно апротинина, приготовленным из водного раствора или его сухого вещества [патент РФ 2054851]. Апротинин, ингибитор широкого спектра протеаз, который является природным низкомолекулярным полипептидом, состоящим из 58 аминокислот (мол. масса 6 кД) [Trautschold et al. 1983]. Однако в этом патенте не описано, каким образом можно приготовить аэрозольный состав, содержащий в качестве активного ингредиента белковый или полипептидный ингибитор протеаз, а в качестве выталкивающей силы водонерастворимый озонсберегающий пропеллент, чтобы состав однородно смешивался, не денатурировал и не инактивировал белковую и полипептидную молекулу ингибитора.

Известен патент РФ № 2425691 "Аэрозольный препарат на основе апротинина для лечения вирусных инфекций". Первое, патент не может рассматриваться в качестве прототипа, так как содержит недостоверные и несоответствующие действительности (сфальсифицированные) данные о его медицинской применимости. Второе, в этом патенте соотношения ингредиентов таковы, что его использование ограничено из-за высокого денатурирующего потенциала на высокомолекулярные белки и полипептиды и выраженное воспалительное и токсическое действие на клеточные структуры. Эти задачи решены в настоящем изобретении, которое описывает уникальную композицию и процедуру поэтапного приготовления и смешивания для получения аэрозольного состава, позволяющего повысить сорастворимость компонентов, снизить денатурирующий эффект аэрозольного состава на активное вещество, применить для антипротеазных белков и полипептидов и уменьшить токсичность для клеток и тканей. Для сохранения активного вещества и повышения однородности (сорастворимости) аэрозольного состава в изобретении использован новый принцип частичного или полного замещения водной фазы поверхностно-активными веществами.

Известны дозирующие аэрозольные устройства, состоящие из контейнера с покрытием, устойчивым к озонсберегающим пропеллентам, и дозирующим приспособлением (головкой), выпускающим определенное количество аэрозоля за одно нажатие клапана. Например, устройства такого типа производят фирмы Bepack, Ovar 3M Pharmaceuticals и др. Фармацевтический аэрозольный состав высвобождается из устройства путем его распыления через выходное отверстие под действием выталкивающей силы пропеллента. Задачей изобретения являлось создание универсальной аэрозольной композиции, содержащей активное вещество полипептидной природы из группы ингибиторов протеаз и их комбинаций и выталкивающую систему с пропеллентом, включая водонерастворимые озонсберегающие пропелленты, пригодную для использования в различных дозирующих аэрозольных устройствах, обладающую низким денатурирующим потенциалом, лишенную токсичности и раздражающего действия на клеточные структуры органов и тканей.

Грипп и другие респираторные инфекции вирусной и бактериальной природы приносят огромный вред здоровью человека. Для лечения гриппа и ОРВИ известен аэрозоль порошка занамивира, ингибитора нейраминидазы, для ингаляций у гриппозных больных [Moscona 2005]. Аэрозольный занамивир ингибирует размножение вируса в респираторном тракте посредством ингибирования его нейраминидазы, но не действует на патогенез самой болезни. Хорошо известно, что в патогенезе респираторных инфекций, включая гриппозную инфекцию, развивается нарушение протеолитического баланса в респираторном

тракте [Kido et al. 2007]. Для коррекции этого нарушения предлагается применение новой аэрозольной композиции ингибиторов протеаз белковой и полипептидной природы, состоящей из аминокислот и их дериватов, с использованием озонсберегающих пропеллентов посредством прямого воздействия на очаг инфекции в респираторном тракте аэрозольной формой ингибиторов протеаз. Воздействие аэрозоля ингибитора протеаз объединяет три действия. Во-первых, блокируется размножение вируса за счет ингибирования протеазной активации вирусных белков. Во-вторых, подавляется патогенез заболевания за счет снижения уровня вредных протеаз непосредственно в очаге и в инфицированном организме. В-третьих, за счет повышения количеств глицерола и снижения спирта усиливаются адгезивные свойства и снижается токсическое воздействие активного вещества на респираторный тракт. В результате, в отличие от сухого аэрозоля зanamивира влажный аэрозоль ингибиторов протеаз оказывает бинарное антивирусное и патогенетическое лечебное действие. Для усиления лечебного эффекта ингибиторов протеаз впервые предлагается их комбинированное использование в аэрозольном составе в смеси с веществами, обладающими антивирусным, противомикробным и/или противовоспалительным действием, такими как рибавирин, римантадин и его производные, реленза, интерферон, ацетилсалициловая кислота, фавипиравир, их аналоги и др.

Предлагаемый аэрозольный состав разработан на основе водонерастворимых озонсберегающих пропеллентов, преимущественно 134А (1,1,1,2-тетрафторэтана) и 227 (1,1,1,2,3,3,3-гептафторпропан), не содержащих хлора и поэтому оказывающих сниженное окислительное действие на полипептидные молекулы. Разработанный состав пригоден для использования в аэрозольных устройствах ручного типа, генерирующих влажный нетоксичный аэрозоль активного протеазного ингибитора белковой и полипептидной структуры. Такое аэрозольное устройство позволяет: (1) оптимизировать индивидуальное (каждым больным) применение фармацевтического белкового аэрозоля, (2) снижать кросс-контаминацию инфекции среди людей и (3) минимизировать токсическое воздействие аэрозоля на слизистые мембраны органов и тканей. Разработанный фармацевтический аэрозольный состав ингибиторов протеаз пригоден для широкого медицинского применения, поскольку нарушение протеолитического баланса, требующее коррекции ингибиторами протеаз, развивается при многих заболеваниях человека и животных. В частности, антипротеазный аэрозольный состав найдет применение при таких заболеваниях, как респираторные инфекции, кератоконъюнктивиты вирусной и бактериальной этиологии, герпетические поражения слизистых оболочек и кожи, хроническая обструктивная бронхопневмония, астма, муковисцидоз, заживление ран и других.

Примеры реализации изобретения

Пример 1. Получение аэрозольного состава из водного раствора ингибиторов, их комбинаций и озонсберегающего пропеллента.

В качестве примера аэрозольного состава приведен состав N1. Для его получения проводят последовательное один за другим смешивание индивидуальных компонентов в следующей последовательности и соотношениях: 0,07 мл водного раствора (или раствора с добавлением этанола, глицерола, диметилсульфоксида и др.), содержащего 2,2 мг белка (или 15000 Калликреин Ингибирующих Единиц (КИЕ)) белка апротинина, в него вносят 2,5 мл 96% водного раствора глицерола и перемешивают; далее в полученную смесь вносят 1,3 мл 96% этанола и к полученной смеси добавляют 0,01 мл ментолового масла и на заключительном этапе при постоянном помешивании добавляют 13,0 мл пропеллента 134А под давлением в герметичной емкости или при пониженной температуре. В качестве дополнительного примера приведен аэрозольный состав N2, который получен смешиванием компонентов в отличающихся пропорциях согласно прописи в табл. 1. В качестве примера комбинаций ингибиторов протеаз приведен состав, приготовленный на основе апротинина и рибавирина - вещества с широким спектром противовирусного действия и ацетилсалициловой кислоты (АСК) - вещества, обладающего противовоспалительным действием. Соотношения ингредиентов в аэрозольном составе показаны в табл. 1.

Таблица 1. Соотношение компонентов в аэрозольном составе, полученном на основе апротинина, АСК и рибавирина с водонерастворимым пропеллентом 134А

Компоненты	Состав №1	Состав №2	Долевое содержание компонентов в составе
Активное вещество: (суммарное количество 0,001-50 мг/мл состава)			
Апротинин, концентрированный водный раствор, содержащий 20% глицерола и 7,5% этанола	0,07 мл (содержит 15000 КИЕ ¹⁾ или 2,2 мг белка апротинина)	0,07 мл (содержит 15000 КИЕ или 2,2 мг белка апротинина)	Суммарная водная фаза < 10 об. %
Вытесняющая система:			
Пропеллент 134А (1,1,1,2-тетрафторэтан) CH ₂ FCF ₃	13,0 мл	13,9 мл	50,0 - 99,7 об. %
Глицерол (96 % водный раствор)	2,5 мл	2,1 мл	0,01 - 40 об. %
Этанол (96 % водный раствор)	1,35 мл	0,84 мл	0,01 - 7,99 об. %
Вспомогательные добавки:			
Ментоловое масло	0,01 мл	0,015 мл	0,001-0,9 об. %
Компоненты	Состав №3	Состав №4	Долевое содержание компонентов в составе
Активное вещество: (суммарное количество 0,001-50 мг/мл состава)			
Апротинин, концентрированный водный раствор.	0,07 мл (содержит 15000 КИЕ ¹⁾ или 2,2 мг белка апротинина)	0,07 мл (содержит 15000 КИЕ или 2,2 мг белка апротинина)	Суммарная водная фаза < 10 об. %
Вытесняющая система:			
Пропеллент 134А (1,1,1,2-тетрафторэтан) CH ₂ FCF ₃	13,0 мл	13,9 мл	50,0 - 99,7 об. %
Глицерол (96 % водный раствор)	2,5 мл	2,1 мл	0,01 - 40 об. %
Этанол (96 % водный раствор)	1,35 мл	0,84 мл	0,01 - 7,99 об. %
Вспомогательные добавки:			
Ментоловое масло	0,01 мл	0,015 мл	0,001-0,9 об. %
Активное вещество: (суммарное количество 0,001-50 мг/мл состава)			
Апротинин, концентрированный водный раствор	0,08 мл (содержит 2,3 мг белка; 15700 КИЕ апротинина, 5 мг АСК ²⁾ , 30% глицерола, 30% ДМСО ³⁾ , 25% этанола, 15% воды)	0,07 мл (содержит 2,2 мг белка; 15000 КИЕ апротинина, 5 мг рибавирина, 20% глицерола, 20% ДМСО, 60% воды)	Суммарная водная фаза < 10 об. %
Вытесняющая система:			
Пропеллент 134А (1,1,1,2-тетрафторэтан) CH ₂ FCF ₃	14,2 мл	14,2 мл	50,0 - 99,7 об. %
Глицерол (96 % водный раствор)	2,5 мл	2,5 мл	0,01 - 40 об. %
Этанол (96 % водный раствор)	1,43 мл	1,45 мл	0,01 - 7,99 об. %
Вспомогательные добавки:			
Ментоловое масло	0,01 мл	0,015 мл	0,001-0,9 об. %

1) Калликреин ингибирующая единица (КИЕ).

2) Ацетил салициловая кислота (АСК).

3) Диметилсульфоксид (ДМСО).

Полученный аэрозольный состав разливают либо под давлением, либо при пониженной температуре в баллоны, снабженные выпускным отверстием с диаметром от 0,1 до 0,5 мм и клапаном. Заполненные баллоны хранят при температуре 18-20 град. Цельсия (С) в течение 0,5, 2 или 5 лет. Диапазон необходимой лечебной концентрации ингибитора протеаз в аэрозольном составе установлен экспериментальным путем на основании курсовой дозы аэрозольных ингаляций апротинина в клинических испытаниях, выполненных на пациентах с различными формами гриппа и ОРВИ.

Пример 2. Полипептидные ингибиторы протеаз медицинского назначения и их комбинации

Пример иллюстрирует список различных ингибиторов протеаз полипептидной природы, которые растворяют в водно-глицериноспиртовой фазе предлагаемого аэрозольного состава, приготовленной согласно изобретения, для использования в качестве активного компонента в фармацевтическом аэрозольном составе. Указанные ингибиторы протеаз могут применяться для коррекции патологических процессов и различных форм воспаления.

Таблица 2. Список полипептидных ингибиторов протеаз медицинского назначения

Название ингибитора	номер доступа SWISS-PROT
Апротинин	P00974
Альфа-протеазный ингибитор	P01009
Альфа 1 - антихимотрипсин	P01011
Цистатин А	P01040
Цистатин С	P01034
Тиостатин	P01042
Кальпаstatин	P20810
Альфа 2- макроглобулин	P01023
Альфа 1-микроглобулин	P02760
Ингибитор фактора 1 тканевого пути	P10646
Ингибитор фактора 2 тканевого пути	P48307
Серозный ингибитор протеаз	P00995
Елафин	P19957
Леупептин	ацетил-Leu-Leu-Arg-альдегид
Ингибитор апоптоза BIRC 5	O15392
Ингибитор апоптоза XIAP	P98170
Ингибитор каспаз c-FLIP	O15519
Тканевой ингибитор металлопротеаз (1-4)	XO1683
Серпин А1 (альфа 1- антитрипсин)	P01009
Серпин А3 (инги-химотрипсин)	P01011
Серпин F2 (альфа 2-антиплазмин)	P08697
Серпин G1 (C1 ингибитор)	P05155
Лейкоцитарный секреторный ингибитор	P03973
Протеазный ингибитор Bowman-BIRK	X68704
Ангиотензин-3	P01019
Протеазный ингибитор SPINK-1	NM003122

Перечисленные антипротеазные ингибиторы используют в аэрозольном составе в комбинации с фармацевтическими веществами, имеющими другой механизм противовирусного и лечебного патогенетического действия. В группу дополнительных фармацевтически активных веществ, включены преимущественно римантадин, рибавирин, фавипиравир, занамивир, интерферон, ацетилсалициловая кислота, антибиотики и др.

Пример 3. Отсутствие физической денатурации аэрозольного состава

Чтобы оценить смешиваемость ингредиентов в полученных образцах аэрозольного состава, исследовали оптические свойства, т.е. прозрачность раствора. С этой целью аэрозольный состав выпускали из баллона путем открытия клапана и выпуска аэрозоля в пробирки объемом 15 мл. Сразу после выпуска порцию собранного раствора переносили в кювету для измерения (объемом 0,5 мл) и определяли оптическую плотность раствора в потоке видимого света на спектрофотометре Ultraspec-2 (Pharmacia, Швеция). Оптическую плотность (прозрачность) аэрозольного раствора сравнивают с оптической плотностью дистиллированной воды, которую принимают за нулевое значение. Тестируют три порции аэрозольного состава: из полного баллона (выпуски номер 10-40), выпуски 120-150 (наполовину заполненный баллон); выпуски 190-240 (последняя фракция баллона), которые смешивают. Устройство содержит около 25 мл аэрозольного состава, что позволяет сделать около 250 выпусков объемом 85 мкл каждый. Результаты оптической плотности аэрозольного состава трех фракций приведены в табл. 3.

Таблица 3. Оптическая плотность ранних и поздних фракций аэрозольного состава

Фракции аэрозольного состава	Срок хранения		
	0	0,5 года	2 года
Ранняя	0,0 ± 0,03	0,0 ± 0,03	0,0 ± 0,06
Средняя	0,0 ± 0,05	0,0 ± 0,04	0,0 ± 0,03
Поздняя	0,0 ± 0,04	0,0 ± 0,02	0,0 ± 0,06

Аэрозольный раствор, генерированный из ранних и поздних фракций баллона, имеет полную прозрачность подобно дистиллированной воде. Этот результат указывает на хорошую совместимость компонентов и отсутствие преципитации компонентов и взвешенных частиц в аэрозольном составе и в генерируемом аэрозоле.

Пример 4. Биофизическая стабильность ингибитора протеаз в аэрозольном составе

Биофизические свойства протеазного ингибитора тестируют методом фракционирования белков в полиакриламидном геле в электрическом поле, так называемым электрофорезом полипептидов в полиакриламидном геле (ПАГЭ). Тестированию подвергаются образцы аэрозольного состава, хранившиеся 0,5

и 5 лет при температуре 18-22°C. Для проведения тестирования получают порции аэрозольного состава, как описано в разделе 3.

Из собранных порций аэрозольного состава отбирают равные аликвоты (15 мкл), которые смешивают с 5 мкл диссоциирующего раствора, содержащего 5% додецилсульфата натрия (ДСН) и 200 мкМ дитиотрептола (ДТТ), нагревают в течение 10 мин при 70°C и наносят на гель. Фокусирующий и разделительный гели полимеризуют с помощью системы катализаторов - персульфат аммония (0,05%) и тетраметилэтилен диамина (ТЕМЕД; 0,2%) в буферной системе по методу Laemmli (1970). Электрофорез проводят при 70V на пластину ПАГ шириной 8 см в течение 2 ч. После окончания электрофореза полипептиды в геле окрашивают Кумаси Голубым R-350 (0,1%), который растворяли в смеси вода:этанол:уксусная кислота в соотношении по объему 5:5:1 в течение 2 ч при комнатной температуре. Не связавшуюся краску отмывают из геля в смеси вода:этанол:уксусная кислота с соотношением 88:5:7 соответственно. Для сравнения в качестве стандартного образца апротинина используют коммерческий препарат очищенного апротинина, выделенного из легких крупного рогатого скота (фирма Sigma, США).

На фиг. 1 показаны результаты анализа образцов аэрозольного состава № 1 и № 5, полученных после хранения в течение 0,5 и 5 лет при комнатной температуре (18-22°C). Первое, апротинин из аэрозольного состава имел типичный профиль электрофоретической подвижности для полипептида с молекулярной массой около 6 кД и полностью соответствовал по электрофоретическим характеристикам стандартного апротинина. Второе, в образцах аэрозоля апротинина не обнаружено высокомолекулярных белковых агрегатов в высокомолекулярной зоне (ВМЗ), соответствующей мол. массе 150-250 кДа (показана на фиг. 1 в рамке на вершине разделительного геля). В зоне агрегатов не выявлялось заметных количеств белка в образцах, 5 лет. Таким образом, протеазный ингибитор в монокомпонентном и комплексном аэрозольном составе сохраняет свои исходные структурные свойства и не формирует агрегаты в процессе хранения и при его последующем распылении.

После электрофореза проводят количественную оценку белков в геле методом сканирования геля. Для этого гель окрашивают Кумаси голубым и сканируют в видимом свете при помощи сканера ScanJet 6300. Оценка интенсивности белковых пятен на сканограмме определяют с помощью программы, позволяющей регистрировать оптическую плотность (ОП) участков. Используя полученные величины ОП, рассчитывают отношения площадей участков сканируемой зоны для апротинина и примесных белков в высокомолекулярной зоне, соответствующей молекулярным массам от 150 до 250 кДа. Интенсивность основного пика апротинина (молекулярная масса около 6500 Да) принимают за 100%.

$$N = \frac{A}{B} \times 100$$

где А - оптическая интенсивность высокомолекулярной зоны (ВМЗ);

В - оптическая интенсивность пятна апротинина;

N - процент высокомолекулярных примесей.

Количество белка в высокомолекулярной зоне не превышает 3%.

Пример 5. Иммунологическая стабильность ингибитора протеаз в аэрозольном составе

Иммунологические свойства протеинового ингибитора протеаз в аэрозольном составе тестируют по его взаимодействию со специфическими антителами по методу "вестерн блот". Исследуют три образца: стандартный апротинин (фирма Sigma, США) и аэрозольный состав из баллона, хранившегося 0,5 и 5 года при температуре 20-22°C (фиг. 2). После электрофореза в ПАГе белки из геля переносят на нитроцеллюлозную протрановую мембрану с диаметром пор 0,45 мкм (фирма Schleier & Schull, Германия) и далее адсорбированный на мембране белок тестируют по взаимодействию со специфическими к апротинину антителами. Взаимодействие на мембране апротинина с антителами идентифицируют методом усиленной хемилюминесценции с помощью конъюгата пероксидазы со вторичным анти-видовым анти-телом. В качестве субстрата на пероксидазу используют коммерческий препарат фирмы Pierce (США) и его свечение регистрируют на рентгеновской пленке Kodak (США). Первое, апротинин стандарта и обоих исследованных образцов аэрозольного состава хорошо взаимодействует с антителами против апротинина, что указывает на его иммунологическую стабильность в аэрозольном составе. Второе, после 5-летнего хранения белкового ингибитора протеаз сохраняет способность реагировать со специфическими антиапротининовыми антителами. Этот результат показывает, что ингибитор протеаз сохраняет нативную иммунологическую структуру при хранении аэрозольного состава в течение 5 и более лет.

Пример 6. Сохранение антипротеазной активности ингибиторов протеаз в аэрозольном составе

Антипротеазную активность аэрозольного состава проверяют по его способности ингибировать гидролитическую функцию трипсина. Для этого устанавливают стандартное количество стандартного препарата трипсина (Sigma; США), которое расщепляет хромогенный субстрат L-ZAPA (Z-Arg-pNA; BACHEM, Швейцария) с образованием нитроанилида (NA) с интенсивностью желтого окрашивания около 0,8 единиц при длине волны 405 нм (ОП₄₀₅). Это количество соответствует 100 нг трипсина при общем объеме реакционной смеси 150 мкл. Далее это количество трипсина в объеме 50 мкл смешивают с серийными разведениями образцов аэрозольного состава (объем 50 мкл) и инкубируют 30 мин при температуре 20°C для связывания апротинина с трипсином и его ингибирования. После этого в смесь вносят

субстрат L-ZAPA (25 мкл раствора с концентрацией 1 мг/мл), инкубируют 15 мин при 20°C и гидролитическую реакцию останавливают добавлением 25 мкл 1М раствора соляной кислоты и измеряют ОП 405 для определения остаточной активности трипсина (фиг. 3). Для расчета молярного соотношения трипсина и ингибитора протеаз, при котором происходит 50% ингибирование трипсина, определяют концентрации белка трипсина и ингибитора в исходных растворах. Для определения концентрации ингибиторного белка используют стандартную методику Брэдфорда, в которой в качестве стандарта берут бычий сывороточный альбумин (Sigma, США) и Кумаси голубой G-250 (Sigma, США). Учитывая фактор разведения тестируемого аэрозольного состава, при котором отмечалось 50% снижение ОП₄₀₅ высвободившегося субстратного нитроанилида, рассчитывают молярное соотношение трипсин/апротинин.

Кривые титрования протеазного ингибитора в аэрозольном составе сразу после приготовления смеси и через 5 лет хранения приведены на фиг. 3. Как показывают исследования, 50% ингибирование трипсина наблюдается с исходным веществом апротининового ингибитора при молярном соотношении трипсин/ингибитор=1/1. При тестировании аэрозольного состава наблюдается сходная антитрипсиновая активность апротинина и 50% ингибирование (на фиг. 3 показано стрелкой) также регистрируется при молярном соотношении трипсин/апротинин=1/1. Таким образом, это тестирование показывает, что ингибитор протеаз остается стабильным в аэрозольном составе и устойчиво сохраняет антипротеазную активность на исходном уровне в процессе хранения в течение 5 лет.

Пример 7. Аэрозольная композиция ингибиторов протеаз с мультифазной смесью поверхностно-активных веществ (ПАВ)

Водный либо диметилсульфоксидный (ДМСО) раствор ингибиторов протеаз, содержащий полипептидный апротинин, леупептин (олигопептид: acetyl-Leu-Leu-Arg-aldehyde, цистатин (Sigma, США)), либо альфа 1-антитрипсин (серпин) (Boehringer, Германия) с концентрацией 1 и 2 мг сухого вещества на мл раствора, последовательно смешивают с водным раствором 99% раствора глицерола (FisherBiotech, США) и 96% этанола медицинской квалификации. Тестируют 4 диапазона соотношения ингредиентов, А-Г. После инкубации в течение 1 ч при 20°C определяют антипротеазную активность по ингибированию гидролитической активности трипсина (табл. 4). Гидролитическую активность трипсина (антипротеазная активность) определяют по способности расщеплять хромогенный субстрат L-zapa (фирма ВАС-НЕМ, Швейцария) по методике, описанной выше в примере 6. Положительной реакцией ингибирования считают результат, при котором в пробе с тестируемым образцом ингибитора определяют уменьшение оптического сигнала свободного нитроанилида на 20% и более по сравнению с контрольной пробой трипсина без ингибитора. Установлено, что смешивание белковых и полипептидных ингибиторов протеаз с трехфазной водно-глицеро-спиртовой смесью или четырехфазной (водно-глицеро-спирто-диметилсульфоксидной) смесью сохраняет их активность полностью или частично.

Таблица 4. Активность ингибиторов протеаз в смеси ПАВ

Ингредиенты	А		Б		В		Г	
	Объем (мл)	Соотношение (%)	Объем (мл)	Соотношение (%)	Объем (мл)	Соотношение (%)	Объем (мл)	Соотношение (%)
Водный раствор ингибитора протеаз (1 мг/мл)	0,35	10	0,35	10	0,1	2,9	-	-
Раствор ингибитора протеаз в ДМСО (2 мг/мл)	-	-	-	-	0,25	7,1	0,35	10
Глицерол (96%)	1,45	41,4	2,65	75,7	2,65	75,7	2,65	5,7
Этанол (95%)	1,7	48,6	0,5	14,3	0,5	0,5	0,5	0,5
Содержание ПАВ	90%		90%		97,1%		100%	
Ингибиторная (антипротеазная) активность *								
Апротинин	+		+		+		+	
Леупептин	+		+		+		+	
Серпин А1	+		+		+		+	
Цистатин	+		+		+		+	

*) Полученную смесь объединяли с пропеллентом А134 в соотношении 0,5 и 95,5% (состав 1) или 20 и 80% (состав 2) перемешивали при пониженной температуре и распыляли при комнатной температуре. Генерируемый аэрозоль конденсировали при комнатной температуре, как описано в разделе 3, и определяли антипротеазную активность. Содержание водной фазы в смесях А и Б составляет 0,075 и 3% по объему составов 1 и 2 соответственно.

Пример 8. Сохранение противовирусной активности ингибитора протеаз в аэрозольном составе

Антивирусные свойства аэрозольного состава тестировали по главному патогенетическому критерию расщепления вирусного белка НА0 и его ингибированию при размножении вируса гриппа человека А/Puerto Rico/34 (H1N1) и А/Aichi/2/68 (H3N2) в куриных эмбрионах. 9-дневные куриные эмбрионы заражали путем введения вируса в аллантоисную полость эмбриона в количестве около 1000 вирусных

частиц. Сразу после заражения в аллантоисную полость эмбриона дополнительно вводили исследуемый аэрозольный состав. После 24 ч инкубации эмбрионов при 37°C получали аллантоисную жидкость из куриных эмбрионов и исследовали количество накопившегося синтезируемого инфекционного вируса и белковый состав вируса.

Чтобы доказать фармацевтическое и антивирусное действие аэрозольного состава, исследовали белковый состав вируса, синтезируемого в куриных эмбрионах в присутствии аэрозольного состава. Образцы аллантоисной жидкости (АЖ) подвергали 2-этапному центрифугированию для очистки вирусных частиц. Для осаждения вируса образцы АЖ центрифугировали в ультрацентрифуге Spinko L7-50 (ротор SW 55.1) при 27000 об/мин в течение 2,5 ч в пробирке объемом 5,5 мл, на дно которой подслаивали 2 мл 18% раствора сахарозы, приготовленного на фосфатном буфере (ФБ: 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7,2; 2,7 mM KCl; 137 mM NaCl). Полипептиды вирусных осадков подвергали электрофорезу в ПАГе по методу Laemmli (1970), описанному выше в разделе 3, и анализировали техникой вестерн-блот (ВБ) с антителами к белку НА. С этой целью белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Protran; Schleier & Schull, Германия) в буфере для полусухого переноса белков (0,05 М Трис; 0,01 М глицин; pH 9,7; 0,01% ДСН; 17,5% этанол). После переноса мембрану насыщали в течение ночи в 3% растворе обезжиренного молока коров и далее инкубировали в течение 1 ч при температуре 20°C в ФБ, содержащем 0,5% БСА и антитела морской свинки против вирусного белка НА, и образованные на мембране иммунные комплексы идентифицировали с помощью пероксидазного конъюгата против иммуноглобулина свинки ("Pierce"; США) методом усиленной хемилюминесценции (ECL) с ECL-субстратом ("Pierce; США).

Известно, что полипептид НА0 входит в состав неинфекционных вирионов, тогда как НА1 делает вирионы инфекционными. Переход НА0→НА1 осуществляется трипсиновыми протеазами, на которые направлено действие активного вещества - ингибитора протеаз. Профиль полипептидов НА0 (мол. вес 75 kD) и НА1 (мол. вес 55 kD) в препаратах вируса показан на фиг. 4. апротинина. В эмбрионах, не обработанных аэрозольным составом, в составе вируса выявлялся в активный НА1 (около 95%), что указывало на образование инфекционного вируса в таких эмбрионах. Напротив, в вирусе из эмбрионов, обработанных аэрозольным составом, преобладал нерасщепленный НА0 (около 50%), что показало преимущественное накопление неинфекционного вируса в этих эмбрионах. Аэрозольный состав ингибитора протеаз сохраняет антивирусную функцию и после 5-летнего хранения блокирует активацию вируса гриппа посредством ингибирования расщепления НА0→НА1.

Для оценки влияния аэрозольного состава на размножение вируса сравнивали урожай инфекционного вируса в куриных эмбрионах, обработанных и не обработанных аэрозольным составом. Тестировали аэрозольный состав, хранившийся 5 месяцев и 5 лет при комнатной температуре (18-22°C) (табл. 5). Урожай вируса определяли по общепринятой методике титрования инфекционного вируса методом инфекционных фокусов в клеточной культуре МДСК. Каждый образец аэрозольного состава вводили в 3 эмбриона и исследовали урожай вируса независимо в каждом из эмбрионов. Результаты приведены в табл. 5. Как видно, оба образца аэрозольного состава из баллонов оказывали выраженное вирусингибирующее действие и снижали в 100 и более раз накопление инфекционного вируса. Эти результаты доказывают, что аэрозольный состав ингибитора протеаз обладает фармацевтической антивирусной активностью по подавлению размножения инфекционного вируса и эта активность состава сохраняется на высоком исходном уровне в течение по крайней мере 5 лет хранения.

Таблица 5. Ингибирование вируса гриппа аэрозольным составом

Инфекционный титр вируса (иф/мл)			
Номер эмбриона ^{*)}	Контроль	0,5 года	3 года
1.	$2,5 \times 10^7$	$1,1 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$
2.	$1,7 \times 10^7$	$1,3 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$
3.	$1,1 \times 10^7$	$0,5 \times 10^5$	$3,1 \times 10^4$
4.	$0,8 \times 10^8$	$4,2 \times 10^4$	$5,7 \times 10^4$
5.	$2,7 \times 10^7$	$1,9 \times 10^4$	$2,5 \times 10^5$
Среднее значение	$3,76 \pm 1,6 \times 10^7$	$0,7 \pm 1,45 \times 10^5$	$1,48 \pm 1,1 \times 10^5$

(*) 9-дневные куриные эмбрионы заражали вирусом гриппа введением в аллантоисную полость эмбриона около 1000 вирионов и дополнительно вводили 75 мкл аэрозольного состава (табл. 1), полученного через 0,5 и 5 лет после хранения при температуре 20°C. Берут по 5 эмбрионов на один образец состава. После 24 ч инкубации эмбрионов при 37°C отбирали аллантоисную жидкость (АЖ) из куриных эмбрионов и определяли количество синтезированного инфекционного вируса методом титрования инфекционных фокусов в культуре клеток МДСК. Количество вируса рассчитывают по количеству вирусных частиц на мл аллантоисной жидкости (средние значения $\pm \sigma$). Контрольные эмбрионы заражали вирусом

гриппа без введения аэрозольного состава.

Пример 9. Отсутствие токсичности аэрозольного состава

Токсичность аэрозольного состава проверяли на развивающихся куриных эмбрионах. Критерием оценки токсичности служили время вылупления эмбрионов из яйца и наличие геморрагических и анатомических аномалий у эмбрионов. Первое, установлено, что во всех группах эмбрионов, получавших и не получавших аэрозольный состав, все эмбрионы вылуплялись в положенный срок 21-22 дня инкубации при 37°C (фиг. 5). Второе, у вылупившихся цыплят во всех группах не выявлено каких-либо геморрагий и аномалий развития при наблюдении в течение 10 дней после вылупления. Эти данные показывают отсутствие токсичности у аэрозольного состава ингибитора протеаз, приготовленного согласно изобретения.

Пример 10. Профиль дисперсности аэрозольного облака при распылении аэрозольного состава

Исследуют пригодность аэрозольного состава для генерирования мелкодисперсного аэрозоля. Определение проводят микроскопически после выпуска аэрозоля на стекло. Аэрозольный баллон встряхивают и распыляют 1 дозу на чистую обезжиренную матрицу, расположенную перпендикулярно направлению распыления на расстоянии 7 см от выходного отверстия устройства. Определение величины влажных частиц осуществляют с помощью микроскопа при 450-кратном увеличении сразу после напыления аэрозоля на стекло. Диаметр частиц определяют на матрице, имеющей размеченную сетку. Подсчет проводят на 10 полях зрения (фиг. 6). Измерение проводят 3 раза из одного баллона на разных сроках выпуска аэрозоля, в испытании используют 3 баллона, рассчитывают распределение частиц по фракциям с определенным диапазоном по диаметру частиц в процентах от общего количества частиц на стекле в поле зрения. Аэрозольное облако, генерированное из аэрозольного состава ингибитора протеаз, имело преимущественный диапазон дисперсности от 0,5 до 240 мкм, пригодный для медицинского применения.

Литературные источники

1. Патент РФ 2054180 «Способ лечения вирусных респираторных инфекций, аэрозоль для его осуществления» приоритет 21 августа 1991 г.
2. Ganderton D, Lewis D, Davies R, Meakin B, Brambilla G, Church T. 2002. Modulite: a means of designing the aerosols generated by pressurized metered dose inhalers. *Respir Med.* 96 Suppl D:S3-8.
3. Moscona A. 2005. Oseltamivir resistance - disabling our influenza defenses. *N Engl J Med.* 353(25):2633-6.
4. Патент РФ 2425691 «Аэрозольный препарат на основе апротинина для лечения вирусных респираторных инфекций» приоритет 10 июня 2010 г.
5. Trautschold I., Werle E., Zickgraf-Rudel G. 1967. Trasylol. *Biochem. Pharmacol.* 16: 59-72.
6. Kido H, Okumura Y, Yamada H, Le TQ, Yano M. Proteases essential for human influenza virus entry into cells and their inhibitors as potential therapeutic agents. *Curr Pharm Des.* 2007;13(4):405-14. Review. PubMed PMID: 17311557.
7. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15; 227(5259):680-5. PubMed PMID: 5432063.

Перечень и описание фигур

Фиг. 1. Структурная стабильность ингибитора протеаз в аэрозольном составе.

Пробы стандартного апротининового ингибитора и образцов аэрозольного состава, хранившегося 0,5 и 4 года, подвергали электрофорезу в 15% ПАГе. После фракционирования гели окрашивали Кумаси голубым R350 и фотографировали в обычном свете. Маркерные белки смесь фирмы Fermentas (Латвия) (дорожка 1) показаны стрелками слева. Дорожки 4-11, аэрозольные составы 1,2,3,5, хранившиеся 0,5 и 4 года соответственно.

Дорожки 2,3 - стандартный апротинин, хранившийся 0.5 и 4 года соответственно. Зона высокомолекулярных агрегатов показана рамкой.

Фиг. 2. Иммунологическая стабильность ингибитора протеаз в аэрозольном составе

Образцы стандартного апротинина (пробы А) и аэрозольного состава (пробы В и С), хранившиеся 0,5 и 5 лет, подвергали электрофорезу в 15% ПАГе и анализировали техникой вестерн-блот (ВБ) с антителами к белку апротинина. Количество нанограмм (нг) белка, нанесенное на дорожку геля, указано под дорожками. Для регистрации белков, реагирующих с антителами к апротинину, использовали методику усиленной хемилюминесценции (ECL) с пероксидазным субстратом фирмы Pierce (США). Белковые

компоненты аprotинина (А) и маркерных стандартов показаны стрелками справа и слева соответственно. Фиг. 3. Антипротеазная активность аэрозольного состава.

Различные количества аэрозольного состава в объеме 50 мкл, полученного через 0,5 и 5 лет после хранения, смешивали с 50 мкл 0,15 М фосфатного буфера (ФБ), содержащего 100 нг трипсина, инкубировали в течение 30 мин при температуре 20°C и в смесь вносили 25 мкл субстрата L-зара (1 мг/мл), инкубировали 30 мин при 20°C и реакцию останавливали раствором гидрохлористой кислоты. Остаточную активность трипсина в пробе определяли по интенсивности расщепления субстрата по окраске (ОД) высвободившегося нитроанилида при 405 нм. По оси ординат отложены средние значения $ОД_{405}$ по трем независимым измерениям; по оси абсцисс показаны количества белка (нг) аprotинина в пробе: ◆ - стандартный аprotинин, хранение в течение ■ — 0,5 года, ● — 2 года, ▼ - 5 лет

Фиг. 4. Ингибирование протеолиза вирусного белка $HA0 \rightarrow HA1$ аэрозольным составом

9-дневные куриные эмбрионы заражают вирусом гриппа A/Aichi/68 (H3N2) и вводят 75 мкл аэрозольного состава, полученного через 0,5 (четные дорожки) и 3-летнего хранения (нечетные дорожки). После 24 ч инкубации эмбрионов при 37° тестируют белки HA0 и HA1 в вирусе из эмбрионов методом ПАГ и вестерн-блот (ВБ) с антителами к белку HA. Приведены пробы, полученные из 9 эмбрионов (номера сверху). Под фигурой указаны количественное соотношение HA0/HA1 в вирусе, суммарное содержание HA0+HA1 принято за 100%. Дорожка 1 - контрольный эмбрион без аэрозольного состава. Исследовали стандартный аprotинин (дор. 2, 3) и аэрозольные составы №1 (4, 5), №3 (6, 7) и №5 (8, 9).

Фиг. 5. Отсутствие токсичности у аэрозольного состава для развивающихся куриных эмбрионов.

Образцы аэрозольного состава согласно табл. №1 вводили ежедневно в аллантоисную полость 7-дневных куриных эмбрионов в объеме 0,25 мл в течение 7 дней. В каждую группу брали по 10 эмбрионов. Определяли срок вылупления эмбриона в исследуемых группах. Количество вылупившихся эмбрионов показано на оси ординат, номер аэрозольного состава показан на оси абсцисс. №5 - контрольные эмбрионы (без ингибитора). Серый столбик - 21-ый, черный столбик - 22-ой день инкубации.

Фиг. 6. Профиль дисперсности аэрозоля

По оси ординат показано содержание (%) фракции в аэрозольном облаке, состав №3. По оси ординат отложены диапазоны диаметра частиц в аэрозольном облаке: 1 - (0,5-10 мкм); 2 - (10-50 мкм); 3 - (50-100 мкм); 4 - (100-240 мкм); 5 - (> 250 мкм).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтический аэрозольный состав, позволяющий при распылении за счёт выталкивающей силы пропеллента генерировать фармацевтический аэрозоль, состоящий из смеси активных веществ с различной биологической активностью, в котором водосодержащий раствор активного вещества из группы ингибиторов протеаз полипептидной и олигопептидной природы в различных комбинациях между собой и с дополнительными активными веществами рибавирина, занамивира и ацетилсалициловой кислоты, взятыми в суммарном количестве активных веществ 0,001-50 мг на 1 мл водосодержащего раствора, составляющего по объёму не более 10% состава, получен поэтапным смешиванием с каждым последующим ингредиентом выталкивающей смеси, а именно - глицеролом, этанолом и пропеллентом, взятыми в долевом соотношении 0,01-40: 0,01-7,9: 50,0-99,7% соответственно.

2. Состав по п.1, отличающийся тем, что активное вещество, выбрано из группы ингибиторов протеаз полипептидной природы, преимущественно аprotинин, альфа 2-антиплазмин, альфа-1 антитрипсин, антитрипсин, серпин, лейкоцитарный секреторный ингибитор или их комбинации.

3. Состав по п.1, отличающийся тем, что активное вещество выбрано из группы антипротеазных олигопептидов, состоящих из двух и более аминокислотных остатков, их модифицированных производных или их комбинаций.

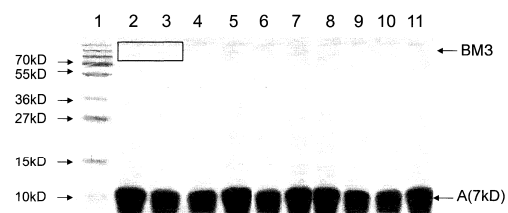
4. Состав комбинированного активного вещества по п.1, отличающийся тем, что он приготовлен на воде, содержащейся в количестве до 10% от объема состава.

5. Состав комбинированного активного вещества по п.1, отличающийся тем, что состав дополнительно содержит диметилсульфоксид из расчета суммарного содержания диметилсульфоксида, глицерола, этанола до 100% объема раствора активного вещества.

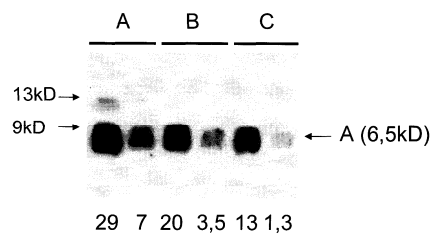
6. Состав по п.1, отличающийся тем, что содержит водонерастворимый озонсберегающий пропеллент, преимущественно A134 или 227.

7. Состав по п.1, содержащий одну или несколько добавок, из группы растительных масел, включающих ментоловое масло, масло мяты перечной, мяты душистой в количестве 0,001-0,9% от общего объема.

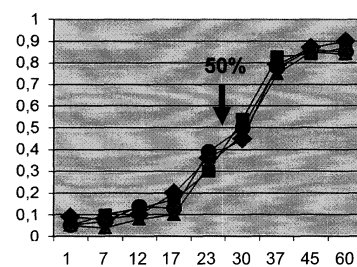
8. Состав по п.1, содержащий одну или несколько добавок, из группы поверхностно-активных веществ, включающих Твин-20, Твин-80, сран-20, сран-80, олеиновую кислоту, глицерин моноолеат, полиэтиленгликоль, в количестве 0,001-3,0% от общего объема.



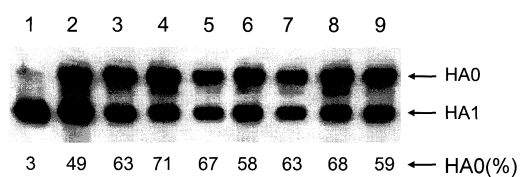
Фиг. 1



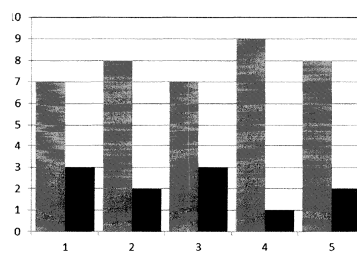
Фиг. 2



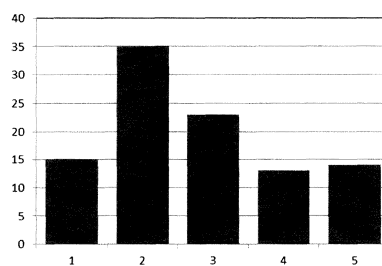
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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