

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041580**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.11.09

(21) Номер заявки
201891572

(22) Дата подачи заявки
2018.02.14

(51) Int. Cl. *A61K 31/18* (2006.01)
A61K 9/10 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
B82Y 40/00 (2011.01)
B82Y 5/00 (2011.01)

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ НАНОСУСПЕНЗИЯ ДЛЯ ТЕРАПИИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

(31) 2017122003

(32) 2017.06.22

(33) RU

(43) 2020.04.15

(86) PCT/RU2018/000086

(87) WO 2018/236249 2018.12.27

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"ВИРИОМ" (RU)**

(72) Изобретатель:
**Иващенко Андрей Александрович
(RU), Савчук Николай Филиппович,
Хват Александр Викторович (US)**

(74) Представитель:
Шмакова Е.А. (RU)

(56) US-A1-20100063154
Gosudarstvennaya Farmakopeya Rossyskoi
Federatsii, Izdatelstvo "Nauchny tsentr ekspertizy
sredstv meditsinskogo primeneniya", XII, Part 1,
2008, p.704; ss. 443-444, 449
UA-C2-26356

Viriom Reports Positive Findings in Phase
Iib Study of Elpida® as Compared to Efavirenz in
Combination with TDF/FTC at CROI 2017, NEWS
PROVIDED BY Viriom, Inc., 17.02.2017, Found
in <[https://www.prnewswire.com/news-releases/
viriom-reports-positive-findings-in-phase-iib-study-
of-elpida-as-compared-to-efavirenz-in-combination-
with-tdfftc-at-croi-2017-300409372.html](https://www.prnewswire.com/news-releases/viriom-reports-positive-findings-in-phase-iib-study-of-elpida-as-compared-to-efavirenz-in-combination-with-tdfftc-at-croi-2017-300409372.html)>

Nadezhda dlya VICH-patsientov, TASS
Informatsionnoe Agentstvo Rossy, Skolkovo:
Tekhnologii buduschego, 18.05.2016, Found in
<<http://tass.ru/skolkovo/3291012>>

(57) Данное изобретение относится к фармацевтической композиции (наносуспензии) для длительно действующего инъекционного (LAI - long-acting injectable) препарата для долгосрочно поддерживающей терапии ВИЧ/СПИД. Фармацевтическая наносуспензия в качестве инъекционного препарата для долгосрочно поддерживающей терапии ВИЧ-инфекции, включающая композицию, содержащую в качестве активного вещества соединение общей формулы 1 в кристаллической или поликристаллической форме 1, где R представляет собой C₂H₅CONa⁺, NH₂.

B1

041580

041580

B1

Область техники

Данное изобретение относится к фармацевтической композиции (наносуспензии) для длительно действующего инъекционного (LAI - long-acting injectable) препарата для долгосрочно поддерживающей терапии ВИЧ/СПИД.

Предшествующий уровень техники

Вирус иммунодефицита человека - ретровирус из рода лентивирусов, вызывающий медленно прогрессирующее заболевание - ВИЧ-инфекцию [Weiss R.A. How does HIV cause AIDS. Science 1993, 260(5112), 1273-1279. Douek D.C., Roederer M., Koup R.A. Emerging Concepts in the Immunopathogenesis of AID". Annu. Rev. Med. 2009, 60, 471-84]. Вирус иммунодефицита человека независимо открыли в 1983 году в двух лабораториях: в Институте Пастера во Франции под руководством Люка Монтанье и в Национальном институте рака в США под руководством Роберта Галло. Результаты исследований, в которых из тканей пациентов с симптомами СПИДа впервые удалось выделить новый ретровирус, были опубликованы 20 мая 1983 г. в журнале Science [Barré-Sinoussi F. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 1983, 220 (4599), 868-871. Gallo R. C. et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 1983, 220 (4599), 865-867.]. В 2008 г. Люк Монтанье и Франсуаза Барр-Синусси были удостоены Нобелевской премии в области физиологии или медицины "за открытие вируса иммунодефицита человека".

Вирус поражает клетки иммунной системы, имеющие на своей поверхности рецепторы CD4: Т-хелперы, моноциты, макрофаги, клетки Лангерганса, дендритные клетки, клетки микроглии. В результате работа иммунной системы угнетается и развивается синдром приобретённого иммунного дефицита (СПИД), организм больного теряет возможность защищаться от инфекций и опухолей, возникают вторичные оппортунистические заболевания, которые не характерны для людей с нормальным иммунным статусом. Без врачебного вмешательства ВИЧ вызывает смерть пациента в среднем через 9-11 лет после заражения (в зависимости от подтипа вируса) [https://ru.wikipedia.org/wiki/Вирус_иммунодефицита_человека].

Согласно глобальной статистике в 2015 г во всем мире: жили с ВИЧ 36,7 миллиона человек, 2,1 млн человек были инфицированы ВИЧ, 1,1 млн человек умерли от болезней, обусловленных СПИДом, 78 млн человек были инфицированы ВИЧ с момента начала эпидемии, из них 35 млн человек умерли от болезней, обусловленных СПИДом, с момента начала эпидемии.

По состоянию на декабрь 2015 г. 17 млн человек, живущих с ВИЧ, имели доступ к антиретровирусной терапии, в то время как в июне 2015 г. это число составляло 15,8 млн, а в 2010 г. - 7,5 млн человек.

В 2015 г. 46% всех взрослых, живущих с ВИЧ, имели доступ к лечению, в то время как в 2010 г. этот показатель составлял 23%.

С 2010 г. число новых случаев инфицирования ВИЧ снизилось на 6%. Во всем мире число людей, инфицированных ВИЧ в 2015 г., составило 2,1 млн человек, а в 2010 г. это число составляло 2,2 млн.

По сравнению с пиковым показателем в 2005 г. число смертей, связанных со СПИДом, снизилось на 45% и в 2015 г. число людей, умерших в связи со СПИДом, во всем мире составило 1,1 млн человек. Для сравнения в 2005 г. это число составляло 2 млн.

ВИЧ можно ослаблять с помощью комбинированной антиретровирусной терапии (АРТ), состоящей из трех или более антиретровирусных препаратов. АРТ не излечивает ВИЧ-инфекцию, но контролирует репликацию вируса в организме человека и содействует укреплению иммунной системы и восстановлению ее способностей бороться с инфекциями. При проведении АРТ продолжительность жизни пациента может быть продлена до 70-80 лет.

В 2016 году ВОЗ выпустила второе издание "Руководства в отношении начала антиретровирусной терапии и предэкспозиционной профилактики ВИЧ".

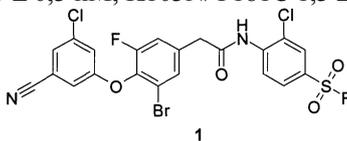
К середине 2016 года 18,2 миллиона человек с ВИЧ в мире получали АРТ, что означает 46% [43-50%] всех людей с ВИЧ получали АРТ.

С учетом новых рекомендаций ВОЗ в отношении лечения всех людей с ВИЧ и предложения антиретровирусных препаратов в качестве дополнительного варианта профилактики людям, подвергающимся "значительному" риску, число людей, отвечающих критериям антиретровирусной терапии, возрастает с 28 до 36,7 млн человек. Расширение доступа к лечению является одной из центральных задач, выдвинутых на 2020 г. с целью ликвидации эпидемии СПИДа к 2030 г. [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/ru/>].

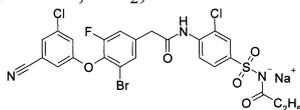
В настоящее время достигнуты значительные успехи в терапии ВИЧ/СПИД с помощью АРТ - эффективных и безопасных схем профилактики и лечения ВИЧ. Наиболее продвинутым препаратом, который в настоящий момент находится на регистрации в Минздраве России, является Эльсульфавирин (Elsulfavirine, Elpida®, VM1500) для АРТ ВИЧ/СПИД [(a) A. Kravchenko et al. Safety and antiviral effect of Elpida (VM-1500), a novel NNRTI (+Truvada) in treatment-naïve HIV1 infected patients at 24-48 weeks therapy. HIV Drug Therapy 2016, 23-26 October 2016, P024. Glasgo, UK. (b) R.L. Murphy et al. Elsulfavirine as Compared to Efavirenz in Combination with TDF/FTC: 48-week Study. CDRI 2017, Seattle, WA <http://www.prnewswire.com/news-releases/viriom-reports-positive-findings-in-phase-ii-study-of-elpida-as-compared-to-efavirenz-in-combination-with-tdf-ftc-at-croi-2017-300409372.html>], (c) Вириом объявил промежуточные результаты Фазы 3 клинических испытаний с Эльсульфавирином, которые были представлены

на крупной конференции по ВИЧ/СПИДу в Москве. <https://www.viriom.com/press-releases/2016/12/13/viriom-announces-interim-results-from-phase-3-clinical-trials-with-elpida-were-presented-at-largest-events-on-hiv-aids-in-moscow.>

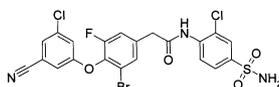
Элсульфавирин/Elpida/VM-1500 (1a) является пролекарством активного соединения VM-1500A (1b), которое является мощным ингибитором репликации ВИЧ-1 штамма HXB2 в клетках линии MT-4 и относится к классу ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors - NNRTI). Среднее значение IC_{50} , полученное для VM-1500A (1b) на штамме HXB2 дикого типа и для ингибирования репликации мутантных вирусов ВИЧ-1, содержащих мутации V106A, G190A, L100I/K103N и K103N/Y181C имеют значение для: HXB2 $1,3 \pm 0,4$ нМ, V106A $1,2 \pm 0,2$ нМ, G190A $0,6 \pm 0,6$ нМ, L100I/K103N $1,3 \pm 0,3$ нМ, K103N/Y181C $1,3 \pm 0,4$ нМ.



где R представляет собой $C_2H_5CONa^+$, NH_2 ;



1a (Elsulfavirine, Elpida, VM-1500, RO5011500)



1b (VM-1500A, RO4970335)

Несмотря на успехи, достигнутые в терапии ВИЧ/СПИД с помощью АРТ, актуальной остается разработка более эффективных и безопасных схем профилактики и лечения ВИЧ.

В частности, к настоящему моменту в мире не зарегистрировано длительно действующих (Long-Acting - LA) препаратов для долгосрочно поддерживающей терапии ВИЧ/СПИД.

Данное изобретение относится к фармацевтической композиции (наносуспензии) для длительно действующего инъекционного (LAI - long-acting injectable) препарата для долгосрочно поддерживающей терапии ВИЧ/СПИД.

Ниже приведены определения различных терминов, используемых для описания данного изобретения. Эти определения применимы к терминам, как они использованы в данном описании и формуле изобретения, если иным не ограничены в конкретных случаях либо по отдельности, либо как часть большей группы.

Термин "активный компонент" (лекарственное вещество) относится к физиологически активному веществу синтетического или иного (биотехнологического, растительного, животного, бактерицидного и так далее) происхождения, обладающему фармакологической активностью, которое является активным ингредиентом фармацевтической композиции.

Термин "кристаллическая форма" означает структуру вещества, характеризующуюся упаковкой образующих ее молекул в один из видов кристаллической решетки.

Термин "поликристаллическая форма" означает структуру вещества, имеющую поликристаллическое строение, т.е. состоящую из множества мелких монокристаллов, т.е. кристаллитов определенной кристаллической формы.

Термин "лекарственный препарат" означает вещество (или смесь веществ в виде фармацевтической композиции) в виде таблеток, капсул, инъекций, мазей и др. готовых форм, предназначенное для восстановления, исправления или изменения физиологических функций у человека и животных, а также для лечения и профилактики болезней, диагностики, анестезии, контрацепции, косметологии и прочего.

Термин "фармацевтическая композиция" обозначает композицию, включающую в себя соединение общей формулы 1 и, по крайней мере, один из компонентов, выбранных из группы, состоящей из фармацевтически приемлемых и фармакологически совместимых наполнителей, растворителей, разбавителей, носителей, вспомогательных, распределяющих и воспринимающих средств, средств доставки, таких как консерванты, стабилизаторы, наполнители, измельчители, увлажнители, эмульгаторы, суспендирующие агенты, загустители ли, подсластители, отдушки, ароматизаторы, антибактериальные агенты, фунгициды, лубриканты, регуляторы пролонгированной доставки, выбор и соотношение которых зависит от природы и способа назначения и дозировки. Примерами суспендирующих агентов являются этоксилированный изостеариловый спирт, полиоксиэтилен, сорбитол и сорбитовый эфир, микрокристаллическая целлюлоза, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант, а также смеси этих веществ. Защита от действия микроорганизмов может быть обеспечена с помощью разнообразных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, таких как парабены, хлорбутанол, сорбиновая кислота и подобные им соединения. Композиция может включать также изотонические агенты, например, сахара, хлористый на-

трий и им подобные. Пролонгированное действие композиции может быть обеспечено с помощью агентов, замедляющих абсорбцию активного начала, например, моностеарат алюминия и желатин. Примерами подходящих носителей, растворителей, разбавителей и средств доставки являются вода, этанол, полиспирты, а также их смеси, растительные масла (такие, как оливковое масло) и инъекционные органические сложные эфиры (такие, как этилолеат). Примерами наполнителей являются лактоза, молочный сахар, цитрат натрия, карбонат кальция, фосфат кальция и им подобные. Примерами измельчителей и распределяющих средств являются крахмал, альгиновая кислота и ее соли, силикаты. Примерами лубрикантов являются стеарат магния, лаурилсульфат натрия, тальк, а также полиэтиленгликоль с высоким молекулярным весом. Фармацевтическая композиция для перорального, сублингвального, трансдермального, внутримышечного, внутривенного, подкожного, местного или ректального введения активного начала, одного или в комбинации с другим активным началом, может быть введена животным и людям в стандартной форме введения, в виде смеси с традиционными фармацевтическими носителями. Пригодные стандартные формы введения включают пероральные формы, такие как таблетки, желатиновые капсулы, пилюли, порошки, гранулы, жевательные резинки и пероральные растворы или суспензии, сублингвальные и трансбуккальные формы введения, аэрозоли, имплантаты, местные, трансдермальные, подкожные, внутримышечные, внутривенные, интраназальные или интраглазные формы введения и ректальные формы введения.

Термин "инертный наполнитель", используемый в данном описании, относится к соединению, которое используют для получения фармацевтической композиции, и, как правило, безопасному, нетоксичному, ни биологически, ни иным образом нежелательному, и включает в себя вспомогательные вещества, которые являются приемлемыми для применения в ветеринарии, а также фармакологически приемлемыми для использования человеком. Соединения по данному изобретению могут быть введены отдельно, но обычно их будут вводить в смеси с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями, выбранными с учетом предполагаемого пути введения и стандартной фармацевтической практики.

Термин "терапевтически эффективное количество", используемый здесь, означает количество субстанции, пролекарства или лекарства, необходимое для уменьшения симптомов заболевания у субъекта. Доза субстанции, пролекарства или лекарства будет соответствовать индивидуальным требованиям в каждом конкретном случае. Эта доза может варьироваться в широких пределах в зависимости от многочисленных факторов, таких как тяжесть заболевания, подлежащего лечению, возраста и общего состояния здоровья пациента, других лекарственных средств, с помощью которых пациент проходит лечение, способа и формы введения и опыта лечащего врача. Для перорального введения суточная доза составляет приблизительно от 0,01 до 10 г, включая все значения между ними, в день в монотерапии и/или в комбинированной терапии. Предпочтительная суточная доза составляет примерно от 0,1 до 7 г в день. Как правило, лечение начинают с большой начальной "нагрузочной дозы", чтобы быстро уменьшить или устранить вирус, сопровождающей убывающую дозу до уровня, достаточного для предотвращения всплеска инфекции.

Термин "субъект" означает млекопитающее, предпочтительно субъектом является человек. Предполагается, что в способе лечения субъекта может быть любое из пролекарств общей формулы 1, его изотопно-обогащенные аналоги, его фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты, кристаллические и полиморфные формы, либо в сочетании их с другими соединениями и препаратами для комбинированной антиретровирусной терапии ВИЧ/СПИД.

Раскрытие изобретения

Неожиданно изобретатели обнаружили, что фармацевтическая наносуспензия, включающая в качестве активного вещества соединение общей формулы 1 в кристаллической или поликристаллической форме, эффективна в качестве инъекционного препарата для долгосрочно поддерживающей терапии ВИЧ-инфекции.

Предметом данного изобретения является наноконпозиция, включающая в качестве активного вещества соединение общей формулы 1 в кристаллической или поликристаллической форме в терапевтически эффективном количестве необязательно в комбинации с фармацевтически приемлемым наполнителем, добавкой или разбавителем для производства фармацевтической наносуспензии.

Более предпочтительной является лиофилизированная наноконпозиция, включающая в качестве активного вещества соединение формулы 1b в кристаллической или поликристаллической форме, в комбинации с сольбулизатором (например с полоксамером P338) и детергентом (например с маннитолом или сахарозой).

Более предпочтительной является лиофилизированная наноконпозиция с размером частиц от 200 до 900 нм.

Предметом данного изобретения является также фармацевтическая наносуспензия, включающая описанную выше наноконпозицию, фосфатно-буферный солевой раствор (PBS) и воду для инъекций для долгосрочно поддерживающей терапии субъектов инфицированных ВИЧ/СПИД.

Предметом данного изобретения является также способ получения лиофилизированной наноконпозиции, заключающийся во вращательном перетирании с помощью циркониевого песка в водном растворе

полоксамера соединения общей формулы 1 в кристаллической или поликристаллической форме, солубилизатора и детергента, последующем отделении циркониевого песка и лиофилизации полученной суспензии.

Предметом данного изобретения является также способ получения фармацевтической наносуспензии путем смешивания описанной выше лиофилизированной наноконпозиции и воды для инъекций.

Данное изобретение поясняется чертежами.

Фиг. 1 - график измерения размера частиц трех образцов после 24 ч перемалывания с сахарозой.

Фиг. 2 - график измерения размера частиц трех образцов после 24 ч перемалывания с маннитолом.

Фиг. 3 - график измерения размера частиц трех образцов после 24 ч перемалывания и 20 ч отстаивания (сахароза).

Фиг. 4 - график измерения размера частиц трех образцов после 24 ч перемалывания и 20 ч отстаивания (маннитол).

Фиг. 5 - график измерения распределения частиц трех образцов Лота № 740-1-101.1 (сахароза) после лиофилизации и ресуспендирования.

Фиг. 6 - график измерения распределения частиц трех образцов Лота № 740-1-101.2 (маннитол) после лиофилизации и ресуспендирования.

Фиг. 7 - фармакокинетические кривые VM-1500A в плазме крови собак при однократном SC и IM введении фармацевтических наносуспензий VM-1500-LAI и VM-1500A-LAI в дозе 10 мг/кг.

Лучший вариант осуществления изобретения

Настоящее изобретение далее будет описано в связи с определенными вариантами осуществления, которые не предназначены для ограничения его объема. Напротив, настоящее изобретение охватывает все альтернативы, модификации и эквиваленты, которые могут быть включены в объем формулы изобретения. Таким образом, следующие примеры, которые включают в себя конкретные варианты, иллюстрируют, но не ограничивают настоящее изобретение.

Пример 1. Способ получения лиофилизированной наноконпозиции.

В сосуд (Jar) загружают циркониевый песок (150 мл) (grinding media: 0.5 mm YTZ® Zirconia Grinding and Dispersion Media; Tosoh USA, Inc.) и раствор полоксамера P338 (10,0 г) и сахарозы или маннитола (11,6 г) в 400 мл фосфатного буферного раствора (PBS, pH = 7.4). 150 мл полученного раствора помещают в сосуд (Jar), прибавляют циркониевый песок (150 мл) (grinding media: 0.5 mm YTZ® Zirconia Grinding and Dispersion Media; Tosoh USA, Inc.) и соединение VM1500A (15,07 г). Сосуд (Jar) помещают на мельничный аппарат (U.S. Stoneware 700 Series jar mill) и устанавливают вращение 104 об/мин и перетирают в течение 24 ч. Окончание процесса контролируется анализами распределения частиц на приборе Malvern Zetasizer Nano ZS. По окончании процесса перемалывания вращение останавливают и оставляют на 16-20 ч при температуре 2-8°C для осаждения циркониевого песка. Суспензию фильтруют через стеклянный фильтр пористостью 5-15 микрон и анализируют на установление содержания (концентрации) соединения VM1500A (92-97% от номинальной). Получают наносуспензию, которую в стерильных условиях разливают по 2 мл в стеклянные стерильные флаконы емкостью 5 мл, замораживают и лиофилизируют. Получают лиофилизированную наноконпозицию, характеристики которой представлены в табл. 1 и 2 и на фиг. 1, 2, 3 и 4.

Таблица 1. Размеры частиц в наносуспензии после 24 ч перетирания (значения, усредненные по трем измерениям)

Образец	Объем образца, мкл	Размер частиц, нм	PDI*	Качество
Лот № 740-1-101.1 (сахароза)	30	442.3	0.428	хорошее
Лот № 740-1-101.1 (сахароза)	10	357.7	0.283	хорошее
Лот № 740-1-101.2 (маннитол)	30	395.6	0.31	хорошее
Лот № 740-1-101.2 (маннитол)	10	552.4	0.487	хорошее

*PDI - Здесь и далее - индекс дисперсности, характеризующий однородность частиц в смеси.

Таблица 2. Размеры частиц в наносуспензии после 24 ч перетирания и 20 ч отстаивания (значения усредненные по трем измерениям)

Образец	Объем образца, мкл	Размер частиц, нм	PDI	Качество
Лот № 740-1-101.1 (сахароза)	30	402.9	0.367	хорошее
Лот № 740-1-101.1 (сахароза)	10	362.1	0.268	хорошее
Лот № 740-1-101.2 (маннитол)	30	403.5	0.28	хорошее
Лот № 740-1-101.2 (маннитол)	10	381.3	0.286	хорошее

Пример 2. Способ получения фармацевтической наносуспензии

К полученной в примере 1 наносуспензии прибавляют предварительно приготовленный стерильный раствор PBS с pH = 6.8 из расчета 2.2 мл на флакон емкостью 5 мл. Получают фармацевтическую наносуспензию, готовую к использованию, характеристики которой представлены в табл. 3 и на фиг. 5 и 6.

Таблица 3. Распределения частиц в фармацевтической наносуспензии

Фармацевтическая наносуспензия		Лот № 740-1-101.1 (сахароза)	Лот № 740-1-101.2 (маннитол)
pH		7.44	7.29
Распределение частиц (10 мкл образец)	Размер частиц, нм	381.7	447.6
	PDI	0.255	0.248
Распределение частиц (30 мкл образец)	Размер частиц, нм	386.1	442.6
	PDI	0.252	0.252
ВЭЖХ-анализ (% от номинального количества)		93.5%	95.0%

Пример 3. Фармакокинетика фармацевтических наносуспензий VM1500LAI и VM1500A-LAI в собаках

Наносуспензии VM1500LAI и VM1500A-LAI, полученные в примере 2, вводили собакам породы Бигль однократно подкожно и внутримышечно в дозе 10 мг/кг и анализировали содержание VM1500 в плазме крови собак на протяжении 120-ти дней после инъекций. Определение концентрации исследуемых соединений проводили с помощью ВЭЖХ-МС/МС метода.

Для введения дозы приготовленные наносуспензии вводят собакам подкожно или внутримышечно в объеме 0.1 мл/кг в одно и то же место. Кровь собирали через 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 ч и 2, 3, 6, 8, 12, 15, 18, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85, 92, 107, 114 и 121 день после инъекции. Цельную кровь для получения плазмы собирали в пробирки, содержащие натрий-гепарин. Немедленно после взятия крови пробирку осторожно переворачивали 8 раз для лучшего перемешивания крови и натрий-гепарина, после чего инкубировали при комнатной температуре 15 мин. Затем плазму отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 3000 об/мин. После центрифугирования аликвоту плазмы крови объемом 1 мл аккуратно переносили в криопробирку при помощи автоматической пипетки, избегая касания носиком клеточной массы/разделительного геля. Из одной пробирки Vacuette образцы плазмы переносили в две криопробирки. Полученные образцы замораживали. До анализа образцы плазмы крови и ФЭК хранятся при температуре -80°C.

Для определения концентрации VM-1500 и VM-1500A использовали ВЭЖХ-МС/МС анализ. В качестве внутреннего стандарта (IS) использовали близкое по структуре соединение VM-6819. При сканировании в режиме полного ионного тока (MS1) определяли молекулярный ион исследуемых соединений и IS, основные ионы-продукты фиксировали в режиме MS2. Для количественного анализа была проведена оптимизация МС/МС метода в режиме MRM для достижения максимальной чувствительности. При анализе регистрировали как минимум два MRM-перехода для каждого аналита, при количественной обработке хроматограмм использовали один из них.

Хроматографические условия были подобраны при вводе раствора исследуемого соединения и IS в смеси MeCN:H₂O (1:1) в МС/МС детектор через ВЭЖХ систему для достижения оптимальных хроматографических параметров. Стандартные калибровочные образцы VM1500 и VM1500A в плазме крови готовили в диапазоне концентраций 1,0-2000,0 нг/мл. Помимо калибровочных стандартов готовили нулевую пробу k₀, k₀ с IS и по две серии контрольных образцов (QC) с низкой, средней и высокой концентрациями, которые служили показателем качества количественных расчетов. Из сток-растворов VM1500 (2,0 мг/мл) и VM1500A (2,0 мг/мл) в ДМСО готовили 10-кратные рабочие растворы в MeCN:H₂O (1:1). Растворы для калибровочных стандартов (k) и QC образцов готовились из отдельных аликвот сток-растворов VM1500 и VM1500A.

Экспериментальные образцы плазмы, используемые для приготовления стандартных образцов, были разморожены при комнатной температуре, перемешаны и центрифугированы в течение 5 мин при 14 000 об/мин. 90 мкл интактной плазмы переносили в пробирку на 1,5 мл, добавляли 10 мкл 10-кратного стандартного раствора смеси исследуемых веществ в смесь ацетонитрил:вода 1:1. К 90 мкл экспериментального образца добавляли 10 мкл чистой смеси ацетонитрил:вода 1:1. Пробы тщательно перемешивали на вортексе в течение 10 с. Добавляли 10 мкл IS (VM-6819 5 мг/мл в ацетонитрил:вода 1:1), перемешивали на вортексе в течение 10 с. К образцам добавляли 1 мл смеси этилацетат:гексан (60:40) и перемешивали на вортексе в течение 20 с, а затем на шейкере при 1000 об/мин в течение 5 мин. Затем образцы центрифугировали при 14 000 об/мин 10 мин.

0,8 мл органической фазы отбирали в пробирки на 1,5 мл и упаривали под током азота в эвапораторе при температуре 40°C. Сухие экстракты разводили в 150 мкл смеси ацетонитрил:вода (1:1), перемешивали на вортексе в течение 10 с и переносили в чистую плашку для ВЭЖХ/МС/МС анализа.

Концентрации VM1500 и VM1500A в пробах рассчитывали по калибровочной кривой, построенной по площадям хроматографических пиков стандартных образцов VM1500 и VM1500A в матрице (плазма крови или ФЭК), нормированных на площадь IS. Построение калибровочной кривой проводилось путем подбора простейшей модели, адекватно описывающей зависимость аналитического сигнала от концентрации, и используя подходящее нормирование. Основные фармакокинетические параметры рассчитывали внемоделным методом с помощью компьютерной программы WinNonlin Professional 6.3 (Pharsight

Corporation) на основании экспериментально полученных данных "концентрация - время" для каждого животного:

C_{max} - максимальная концентрация вещества в плазме крови;

T_{max} - время достижения максимальной концентрации в плазме крови;

AUC_{0-t} - площадь под фармакокинетической кривой от момента введения препарата до последней точки наблюдения с измеряемой концентрацией;

AUC_{0-inf} - площадь под фармакокинетической кривой от момента введения препарата до бесконечности;

$T_{1/2}$ - период полувыведения из плазмы крови;

k_{el} - константа скорости элиминации - параметр, характеризующий скорость выведения вещества из плазмы крови;

MRT - среднее время удержания препарата в организме от момента приема препарата.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью описательной статистики. Рассчитывали средние арифметические значения параметров (M), стандартное отклонение (SD), стандартную ошибку среднего (SE), коэффициент вариации (CV), медиану. Статистический анализ был выполнен с помощью программы WinNonlin Professional 6.3 (Pharsight Corporation).

В табл. 4 суммированы фармакокинетические параметры, характеризующие поведение VM-1500 и VM-1500A после введения собакам наносуспензий VM-1500-LAI и VM-1500A-LAI подкожно (SC) и внутримышечно IM.

Таблица 4. Фармакокинетические параметры VM-1500 и VM-1500A в плазме крови собак при SC и IM введении наносуспензий VM-1500-LAI и VM-1500A-LAI в дозе 10 мг/кг

Параметры	Ед. изм.	SC	IM	SC		IM	
		VM1500-LAI		VM1500-LAI	VM1500A-LAI	VM1500-LAI	VM1500A-LAI
		VM-1500		VM-1500A			
AUC_{inf}	ч*нг/мл	4 435.7	5 743.6	89 210.0	89 409	121 175.1	83 916
AUC_{last}	ч*нг/мл	3 989.9	5 596.7	88 830.4	78 492	120 975.5	79 518
C_{max}	нг/мл	111.4	1 158.7	558.7	104	1 225.0	153
$T_{1/2}$	ч	229	74.9	170	581	153	446
K_{el}	1/ч	0.003	0.009	0.004	0.001	0.005	0.002
MRT_{inf}	ч	180	38.6	205	957	90	657
MRT_{last}	ч	95	29.1	200	671	88	537
T_{max}	ч	1.7	1.0	64	216	32	64.0

При внутримышечной инъекции достигаются более высокие значения C_{max} как самого VM-1500, так и его метаболита VM-1500A, чем при подкожном введении. Однако при использовании формуляции VM-1500A-LAI эта разница не так существенна. При этом общая экспозиция VM-1500 и VM-1500A при внутримышечном введении в виде VM-1500-LAI выше, чем при подкожном, тогда как экспозиция VM-1500A не зависит от пути введения формуляции VM-1500A-LAI. Также при внутримышечном введении VM-1500A раньше достигает максимальной концентрации, чем при подкожном введении. Время полувыведения не зависит существенно от пути введения.

Средние концентрации (C) VM-1500A в плазме крови собак после однократного SC и IM введения собакам в виде наносуспензий VM1500-LAI и VM1500A-LAI приведены в табл. 5 и на фиг. 7.

Таблица 5. Концентрация VM-1500A в плазме крови собак при однократном SC и IM введении в виде депо-формуляций VM-1500-LAI и VM-1500A-LAI в дозе 10 мг/кг

Время		VM1500-LAI IM		VM1500-LAI SC		VM1500A-LAI IM		VM1500A-LAI SC	
ч	дни	Среднее, нг/мл	SD, нг/мл						
0	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
1	0.0	55.67	7.76	3.54	0.58	6.35	1.59	3.40	3.48
1	0.0	129.67	12.74	5.62	1.56	11.96	6.64	4.24	2.56
2	0.1	350.67	74.54	16.57	2.75	28.80	9.30	7.12	4.59
4	0.2	482.33	87.93	31.43	6.11	40.23	3.82	12.25	5.03
8	0.3	892.67	108.49	77.93	8.47	84.43	25.20	16.43	3.98
24	1.0	1166.67	151.85	314.67	35.64	124.50	11.46	49.80	13.17
48	2.0	1023.00	187.20	480.00	155.79	131.67	4.25	70.23	16.42
72	3.0	812.67	28.36	535.33	210.24	151.33	18.06	91.73	5.61
144	6.0	245.33	51.60	232.67	8.14	99.37	22.09	59.96	4.82
192	8.0	105.70	26.49	129.00	16.70	115.50	12.26	86.97	3.57
288	12.0	39.43	9.03	90.27	10.83	101.22	8.75	96.22	24.58
360	15.0	12.97	4.16	48.40	7.41	79.38	22.07	57.62	4.52
432	18.0	7.06	2.98	36.10	5.20	61.52	7.52	71.20	4.98
528	22.0	6.04	1.89	34.30	3.70	48.85	7.19	56.42	9.05
696	29.0	2.61	0.84	16.80	4.11	37.07	3.26	65.5	10.8
864	36.0	1.03	0.10	8.57	2.31	27.80	7.89	37.8	3.1
1032	43.0	0.89	0.18	4.83	1.98	32.37	5.09	34.5	12.5
1200	50.0	BLQ		1.47	0.70	13.30	1.31	18.4	3.9
1368	57.0	BLQ		BLQ		7.6	2.55	12.02	2.48
1536	64.0	BLQ		BLQ		12.27	3.52	12.40	1.60
1704	71.0	BLQ		BLQ		8.88	2.74	8.53	1.12
1872	78.0	BLQ		BLQ		6.03	1.84	11.24	3.41
2040	85.0	BLQ		BLQ		5.87	2.07	9.92	2.52

Таблица 5 (продолжение). Концентрация VM-1500A в плазме крови собак при однократном SC и IM введении в виде депо-формуляций VM-1500-LAI и VM-1500A-LAI в дозе 10 мг/кг

2208	92.0	BLQ		BLQ		6.81	1.46	12.79	3.01
2568	107	BLQ		BLQ		6.43	1.38	9.59	0.39
2736	114	BLQ		BLQ		9.68	1.33	5.72	1.12
2904	121	BLQ		BLQ		5.70	1.81	11.47	1.07

BLQ - ниже предела количественного определения

Как видно из табл. 5 и фиг. 7, при IM введении фармацевтической наносuspензии VM-1500-LAI в дозе 10 мг/кг собакам эффективная концентрация препарата VM1500A ($IC_{50} = 1,3$ нМ или 0,74 нг/мл) в плазме поддерживается в течение месяца (через 29 дней $C_{VM-1500A} = 2,61$ нг/мл), а при SC введении - в течение полутора месяцев (через 43 дня $C_{VM-1500A} = 4,83$ нг/мл).

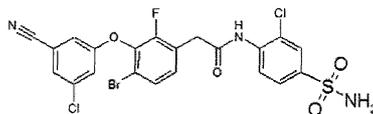
Еще более убедительный результат наблюдается при IM и SC введении наносuspензии VM-1500-LAI в дозе 10 мг/кг собакам. В этом случае эффективная концентрация VM1500A поддерживается в течение четырех месяцев (через 121 день $C_{VM-1500A} = 5,70$ нг/мл при IM введении и $C_{VM-1500A} = 11,47$ нг/мл при SC введении).

Промышленная применимость

Изобретение может быть использовано в медицине и ветеринарии.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция для инъекционной долгосрочной поддерживающей терапии ВИЧ-инфекции, включающей в качестве активного компонента 2-[4-бром-3-(3-хлор-5-цианофеноксид)-2-фторфенил]-N-(2-хлор-4-сульфамилфенил)ацетамид формулы 1b с частицами размером от 200 до 900 нм



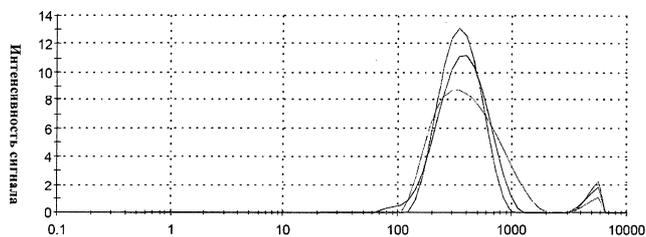
1b (VM1500A, RO4970335)

2. Композиция по п.1, включающая солюбилизатор - полоксамер P338 и детергент, выбранный из маннитола и/или сахарозы, фосфатно-буферный солевой раствор (PBS) и воду для инъекций.

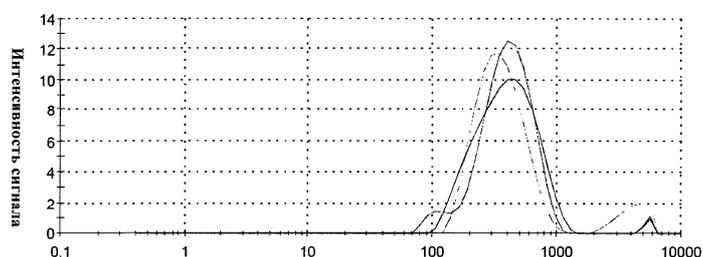
3. Способ получения композиции по п.1 или 2, включающий стадию перетирания с помощью циркониевого песка в водном растворе солюбилизатора-полоксамера, соединения формулы 1b, указанного в

п.1, фосфатно-буферного раствора и детергента, с последующим отделением циркониевого песка с получением суспензии, которую при необходимости подвергают лиофилизации, и последующую стадию смешивания полученной композиции с фосфатно-буферным солевым раствором (PBS) с pH = 6.8 и водой для инъекций.

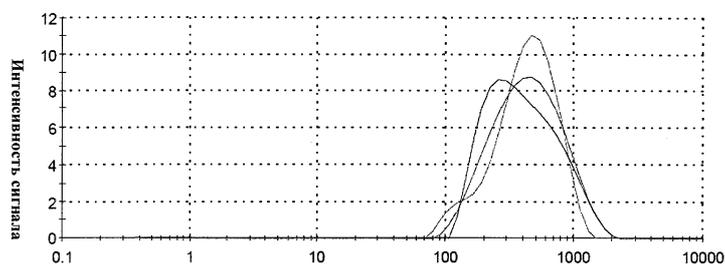
4. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.1 или 2 для внутримышечной или подкожной долгосрочной поддерживающей терапии ВИЧ-инфекции.



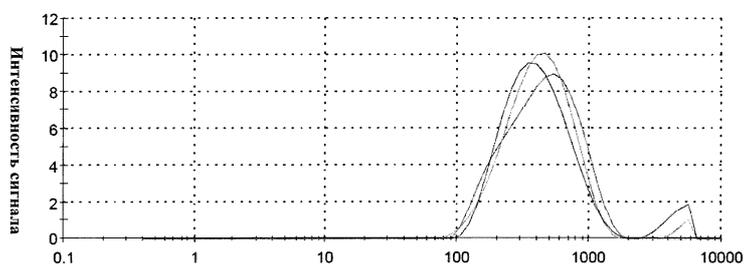
Размер частиц, нм
Фиг. 1



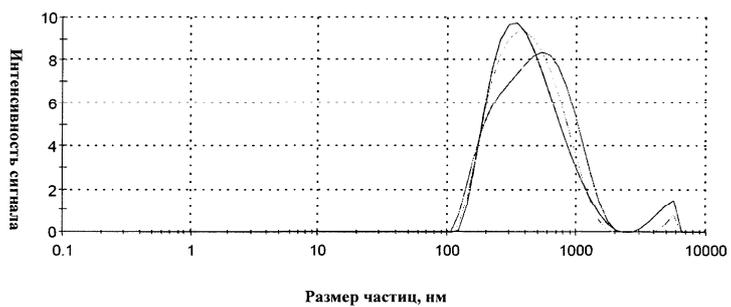
Размер частиц, нм
Фиг. 2



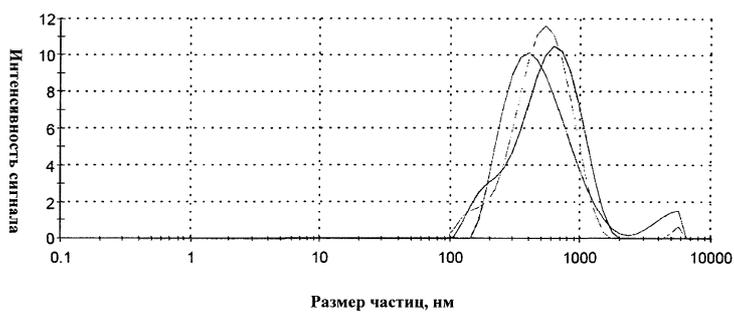
Размер частиц, нм
Фиг. 3



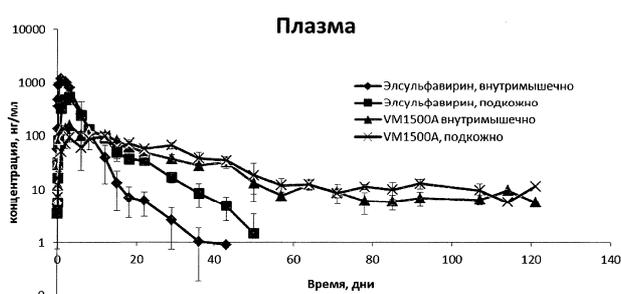
Размер частиц, нм
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7

