

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202200081** (13) **A2**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.30

(51) Int. Cl. **A61K 9/12** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.07.11

**(54) КОМБИНИРОВАННЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ АЭРОЗОЛЬНЫЙ СОСТАВ
ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕАЗ НА ВОДНОЙ ОСНОВЕ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **2021113625/04(028878)**

(71)(72) Заявитель и изобретатель:

(32) **2022.05.12**

ЖИРНОВ ОЛЕГ ПЕТРОВИЧ (RU)

(33) **RU**

(57) Изобретение относится к медицине и описывает комбинированную лекарственную композицию поливалентного действия на водной основе, содержащую активные вещества из группы ингибиторов протеолитических ферментов и дополнительно активные вещества из других фармакологических классов, выбранных из группы противовирусных и антимикробных веществ, противовоспалительных средств, гидролитических ферментов, вирусных препаратов и их компонентов, антител и фрагментов антител, для генерирования мелко дисперсного нетоксичного для реципиентного макроорганизма и безвредного для планетарной экологии аэрозоля, лишённого парникового эффекта. Созданный аэрозольный состав может найти применение при лечении и профилактике широкой группы заболеваний, сопровождающихся нарушением протеолитического баланса, таких как вирусные и бактериальные респираторные инфекции, включая грипп, ковид, кератоконъюнктивиты вирусной и бактериальной этиологии, герпетические поражения слизистых оболочек, инфекционное и онкологическое воспаление, кожи, кишечника, мозга, хронической обструктивной бронхопневмонии, астмы и др.

202200081

A2

A2

202200081

Коды классификации: A61 K009/08; A61 K009/12; A61 K009/38; A61 P031/04; A61 P031/12; A61 P031/14; A61 P031/16; A61 P031/22; A61 P037/08.

О.П.Жирнов

Комбинированный фармацевтический аэрозольный состав ингибиторов протеаз на водной основе и его применение

Описание изобретения

Настоящее изобретение относится к медицине. Изобретение раскрывает экологичный и нетоксичный комбинированный аэрозольный состав на водной основе, содержащий комбинации активных веществ, выбранных из различных фармакологических групп, для использования в беспропеллентных аэрозольных устройствах (небулайзерах) с целью генерирования мелкодисперсного фармакологического аэрозоля. Результирующий аэрозоль обладает поливалентным фармакологическим действием, для применения с терапевтической и/или профилактической целями посредством воздействия на патологический процесс в организме и на множественные патогенетические мишени патологических процессов, расстройств и повреждений, сопровождающихся, как правило, нарушенным протеазо-ингибиторного баланса.

Известны аэрозольные системы, в которых движущей выталкивающей силой служит фторкарбонный пропеллент 134А или 227, находящийся под давлением в устройстве с клапаном [Терехова, 2014]. Для таких пропеллентных устройств на основе ингибиторов протеаз разработаны фармацевтические аэрозольные составы, в которые входят три обязательных компонента пропеллентной системы, а именно: пропеллент, этанол и глицерин, на долю которых приходится 85% и более аэрозольного состава, так называемая система «Модулит» [Ganderton et al. 2002; Патенты РФ №2657523; №2711080]. Разработанные пропеллентные аэрозольные системы на основе ингибиторов протеаз имеют недостаток, так как могут быть приготовлены только определенным способом, чтобы добиться гомогенного смешивания с компонентами пропеллентной выталкивающей системы из-за слабой смешиваемости фторкарбонного пропеллента с водой [Пат. ент РФ №2657523, пат. ент ЕАПО 034991]. Пропеллентные системы (составы) не могут использоваться в аэрозольных устройствах, таких как эжекторные, ультразвуковые небулайзеры, портативные системы «мягкого облака» и мембранного типа Micro-Air «Омрон» (устройство «смэш»), которые могут работать только на растворах, не содержащих пропеллентов. Более того, пропеллентные аэрозольные системы обладают экологическим недостатком. Современные фторкарбонные пропелленты могут содержать токсичные для организма человека примеси и обладают нежелательным парниковым эффектом, хотя и менее выраженным, чем прежнее поколение хлор-содержащих пропеллентов [Rusch, 2018], и согласно дополнительной декларации к Монреальскому протоколу (г. Кигали, Руанда, 15 октября 2016 г.) подлежат ограниченному использованию в целях сохранения планетарной экологии. Для преодоления перечисленных недостатков в настоящем изобретении созданы беспропеллентные аэрозольные системы на водной основе с комбинацией активных веществ различных фармакологических классов, преимущественно белковой природы.

Не разработаны аэрозольные составы на основе водных растворов ингибиторов протеаз, которые скомбинированы с активными веществами иного фармакологического действия и воздействующими на различные этапы патологического процесса при заболеваниях, вызванных вирусами, бактериями, токсинами и другими патологическими агентами, а также, разнообразными патологическими формами расстройств, воспаления и нарушения метаболизма.

Не известно, будут ли комбинированные смеси разнородных фармацевтических веществ смешиваться с ингибиторами протеаз, сохранять свои биологические и фармакологические свойства без взаимной инактивации при смешивании и процессе распыления состава с его переходом в дисперсную аэрозольную фазу и при этом не подавлять и не денатурировать друг друга. В настоящем изобретении впервые созданы аэрозольные составы поливалентного фармакологического действия на водной основе ингибиторов протеаз и их комбинаций с включением в состав дополнительных фармакологических активных веществ из других классов, подавляющих воспаление, образование оксидных радикалов и патогенез заболевания, а также добавлением веществ, блокирующих размножение вирусов и бактерий, для использования разработанных поливалентных составов в аэрозольных устройствах непропеллентного типа на безвредной водной основе.

Технический результат разработанных аэрозольных составов обусловлен решением следующих задач. (1) Разработанные мультикомпонентные аэрозольные составы делают более безопасным и удобным процесс лечения, когда при одной процедуре пациент получает комбинированный курс нескольких лекарств неинвазивного типа поливалентного фармакологического действия. (2) Разработанный поливалентный аэрозольный состав повышает фармакологический эффект используемых активных веществ, так как оказывают биологическое действие на несколько мишеней в патогенезе заболевания при более низких концентрациях, чем при индивидуальном применении отдельного вещества (синергидное действие) и позволяет получить фармакологический эффект в тех случаях, когда при применении индивидуального лекарства такой эффект не возможен. (3) Использование комбинаций активных веществ в аэрозольном составе позволяет снизить лечебные дозы, что, в свою очередь, понижает риск возникновения токсичности от побочных нежелательных реакций их действия на организм. (4) Применение двух и более активных веществ, направленных на различные мишени патогенеза болезни и различные этапы размножения вирусов, бактерий и простейших патогенных организмов, снизит риск возникновения мутантных форм этиологического агента с повышенной вирулентностью для организма и будет предотвращать возникновение вторичных осложнений. (5) Комбинации активных веществ, относящихся к различным фармакологическим группам, в одном аэрозольном составе позволяют получить синергидный эффект в месте воздействия аэрозоля по предотвращению возникновения мутантных форм патогенов (вирусов, микробов), резистентных к используемым в аэрозольном составе лекарственным веществам. (6) Разработанные аэрозольные составы на водной (непропеллентной) основе дают новые возможности для их универсального медицинского использования против заболеваний с различной локализацией патологического процесса, включая кожные покровы, респираторный тракт, кишечник, органы зрения, органы слуха, мозг и т.п., когда пропеллентные аэрозольные составы применяться не могут из-за побочной токсичности

пропеллентов для слизистых оболочек организма. (7) Разработка аэрозольных составов на водной основе позволяет исключить побочную токсичность на организм человека, обусловленную высокой концентрацией вредных компонентов, таких как пропеллент и этанол, необходимых для работы выталкивающей системы, используемой в аэрозольных составах на основе фторкарбоновых пропеллентов. (8) Создание комбинированных аэрозольных составов на беспропеллентной водной основе устраняет общий экологически вредный для планеты парниковый эффект фторкарбоновых пропеллентов, что особенно важно на современном этапе развития общества. (9) На основе ингибиторов протеаз разработан состав, содержащий активный инфекционный вирус или его субвирусные компоненты (внутренний нуклеокапсид, наружная вирусная мембрана, белковые комплексы и др.), отличающийся повышенной стабильностью и фармакологической активностью вируса и его компонентов, что создаёт новую лекарственную форму комбинированного лекарства в зависимости от локализации очага при лечении опухолей с помощью ингибиторов протеаз и вирусов, так называемой онколитической виротерапии, а также для приготовления, стабилизации и применения белок содержащих вакцин при инфекционных болезнях различной этиологии и локализации.

Известны многочисленные аэрозольные системы (устройства), в которых движущей выталкивающей силой служит механическое (эжекторные) или ультразвуковое возбуждение состава и дополнительное мембранное распыление (типа "smash") в ряде устройств. К таким устройствам относятся стационарные небулайзеры эжекторного или ультразвукового типов, и ручные ингаляторы механического типа «респимат» или ручные ингаляторы мембранного типа Micro-Air «Омрон» [Терехова, 2013]. При открытии клапана и при запуске аэрозольного возбуждения происходит выталкивание аэрозольного состава и его распыление, так называемое генерирование аэрозоля. Для всех без исключения типов устройств применим разработанный аэрозольный состав на водной основе поливалентного патогенетического фармакологического действия. Более того, аэрозольный состав на основе ингибиторов протеаз в комбинации с противовирусными, противомикробными, противовоспалительными, ферментными веществами применим для обширного круга болезней, в которых имеет место нарушение протеазного и окислительного баланса в сочетании с вирусной и бактериальной инфекцией при таких заболеваниях, как грипп, коронавирусная инфекция (включая ковид-19), респираторно-синцитиальный бронхит, муковисцидоз, респираторная инфекция вирусами парагриппа, риновирусами, бокавирусами и многим другим вирусам, хроническая обструктивная болезнь легких, астма, герпетическая болезнь кожных покровов, глаз, мозга, кожные и глазные поражения при аденовирусной и бактериальной инфекции, воспаления, возникающего при полостных хирургических операциях, образование опухоли и её метастазов и т.д. Помимо прямого патогенетического и лечебного действия, ингибиторы протеаз будут оказывать стабилизирующее фармакологическое действие на активные фармацевтические вещества белковой природы, такие как противовирусные антитела, антитела против цитокинов, цельно вирионные и субъединичные вирусные и бактериальные вакцины и др., поскольку способны инактивировать протеазы, способные чрезмерно активировать патогенный вирус и разрушать белковые активные вещества как в аэрозольном составе, так и в реципиентном организме и особенно в местах первичного контакта аэрозольного состава (аэрозоля) с организмом.

В разработанном аэрозольном составе используются растворы, приготовленные на основе воды, как главного компонента аэрозольного состава. Водный раствор предлагается как преимущественный (базовый) тип раствора, приемлемый для большинства аэрозольных устройств непропеллентного типа. Вместе с тем в изобретении предлагается использование поверхностно активных соразтворителей и растворов с различным значением pH, которые, с одной стороны, позволяют повысить соразстворимость комбинаций активных веществ и при этом сохранить пригодность аэрозольного состава для большинства типов аэрозольных генераторов, будь то эжекторный, «смэш», ультразвуковой и т.д. генераторы аэрозолей (небулайзеры). С другой стороны, аэрозольные составы на водной основе имеют сниженную токсичность, что открывают новые возможности их широкого применения для воздействия аэрозолем на различные типы высокочувствительных клеток и тканей, таких как органы глаз, мозг, органы брюшной полости (при хирургических операциях) и т.д.

Вместе с тем, в изобретении для более эффективного и оптимизированного соразстворения и предотвращения агрегации и взаимной инактивации используемых активных (в том числе белковых) веществ, часть из которых может иметь повышенную гидрофобность и, следовательно, пониженную растворимость в водном растворе, а также для их стабилизации и предотвращения агрегации в аэрозольном составе, в аэрозольном облаке и очаге действия (органе, ткани, отдельных типах клеток и т.п.) и для оптимизации воздействия аэрозоля на целевой орган или ткань предлагается дополнительное включение в состав буферных солевых растворов соразтворителей и поверхностно-активных веществ из группы сурфактантов или органических растворителей, таких как твин-20, твин-80, спан- 20, спан-80, нонидет-Р40, тритон X-100, тритон X-101, бета-октилглюкозид, этанол, диметилсульфоксид, бензалкониум, этанол, глицерин и другие. Для повышения лечебных и органолептических свойств аэрозольный состав может содержать растительные экстракты, такие как, масло мяты, настой мелисы, настой термопсиса, экстракт душицы, лютеолин и др. Композиция может быть в виде раствора на водной основе, мелкодисперсной суспензии или коллоидного раствора, но преимущественно в виде раствора.

Решение поставленных целей достигается посредством комбинированного аэрозольного состава и следующих подходов его получения.

- Комбинированный фармацевтический аэрозольный состав поливалентного действия на основе ингибиторов протеаз для использования в устройствах с аэрозольным распылением непропеллентного типа, отличающийся тем, что содержит водный раствор ингибиторов протеаз или их комбинаций с концентрацией активных веществ в терапевтически эффективном количестве 0,001 мкг – 100 мг на мл состава в диапазоне pH 4,0 – 9,0, который дополнительно содержит одно и более активных веществ с иным механизмом фармакологического или патогенетического действия или их комбинации, выбранные из группы гидролитических ферментов трипсин, гиалуронидаза, хемаза, каспаза, противовирусных веществ, выбранных из группы ремантадин, осельтамивир, рибавирин, фавипиравир, противовирусные антитела, противомикробных веществ, выбранных из группы тобрамицин, колистин, гентамицин, тетрациклин, противовоспалительных веществ, выбранных из группы ацетилсалициловая кислота, интерферон, антитела против цитокинов, супероксиддисмутаза, вирусных средств или субвирусных компонентов, выбранных из

группы ортомиксо-, парамиксо-, пикорна-, ортопокс-, корона-, адено-, тогавирусов, и других вирусов в конечной концентрации 0,001 мкг – 100 мг на мл состава, предназначенный для генерирования аэрозоля с дисперсностью аэрозольных частиц 0,1 – 300 мкм для поливалентного фармакологического воздействия на организм.

- Состав по п.1 отличается тем, что содержит ингибиторы протеаз различной специфичности и механизма действия, преимущественно альфа 1-антитрипсин, апротинин, леупептин, камостад, фамотидин, эпсилон-аминокапроновую кислоту, тканевой ингибитор Куница, ингибитор ангиотензин-превращающего фермента, тканевой ингибитор металлопротеаз, или их производные.
- Состав по п.1 отличается тем, что водный раствор активного вещества содержит поверхностно активные соразтворители в терапевтически приемлемых количествах, преимущественно твин-20, твин-80, спан-20, спан-80, бета-октилглюкозид, диметилсульфоксид, глицерин, этанол, полиэтилен гликоль, бензалкониум, в концентрации 0,0001% и более.
- Состав по п.1 отличается тем, что содержит солевой буферный раствор с диапазоном рН 4,0 – 9,0, преимущественно хлорид натрия, одно- и двузамещенные натриевые-калиевые соли фосфорной, салициловой, уксусной кислоты, в терапевтически приемлемой концентрации 0,1 мкМ и более.
- Состав по п.1, отличающийся тем, что содержит добавки растительного происхождения и растительных экстрактов, преимущественно масло мяты, настой Melissa, настой термопсиса, экстракт душицы, лютеолин, дигидрокверцитин в терапевтически приемлемой концентрации 0, 0001% по объему и более.
- Аэрозоль по п.1, отличающийся тем, что используется в терапевтически эффективном количестве для воздействия на патологический очаг с нарушенным протеазо-ингибиторным балансом при лечении и профилактике расстройств и повреждений с преимущественной локализацией в респираторном тракте, кишечнике, коже, органах зрения, мозге.

Разработка стабилизированных аэрозольных составов комбинированного типа, содержащих активные вещества белковой природы, созданных методами генетической инженерии, представляет быстро развивающееся направление в современной медицинской аэрозольной биотехнологии, актуальность которого особенно возрастает в эпоху возникновения новых вирусных пандемий глобального масштаба и эпидемического роста онкологических заболеваний в мире. Настоящее изобретение аэрозольных составов поливалентного действия на водной основе представляет собой новый этап в развитии и усовершенствовании комбинированных аэрозольных систем медицинского назначения на основе ингибиторов протеаз и их фармацевтических композиций. Разработанный аэрозольный состав наиболее востребован для активных веществ белковой природы и их искусственных рекомбинантных аналогов, полученных с помощью генетической инженерии и современной биотехнологии, включая рекомбинантные антитела. В этом направлении настоящее изобретение превосходит фармацевтические аэрозольные составы на основе пропеллентов, так как имеют перед ними ряд преимуществ как медицинского применения и экологической планетарной безопасности,

так и биологической стабильности, новых возможностей биотехнологии и приготовления аэрозольных систем нового поколения.

Примеры реализации изобретения

Пример 1.

Полипептидные ингибиторы протеаз медицинского назначения и их комбинации. Пример иллюстрирует список различных ингибиторов протеаз полипептидной природы, а также антипротеазных олигопептидов, состоящих из двух и более аминокислотных остатков, их модифицированных производных или их комбинаций, а также ингибиторы протеаз небелковой природы, которые растворяют в водно-содержащих растворах предлагаемого фармацевтического аэрозольного состава, приготовленного согласно изобретению, для использования в качестве активного компонента в аэрозольных системах непропеллентного типа. Указанные ингибиторы протеаз могут применяться у людей и животных для коррекции патологических процессов и воспаления различной этиологии и патогенеза, ингибирования опухолей, усиления стабильности белковых и пептидных соединений в растворах и реципиентном организме.

Таблица 1.

Список полипептидных ингибиторов протеаз фармацевтического назначения для аэрозольных составов.

Название ингибитора	номер доступа SWISS-PROT
Альфа-протеазный ингибитор	P01009
Альфа 1 – антихимотрипсин	P01011
Ангиотензин-3	P01019
Апротинин	P00974
Антитромбин	P01008
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
Олигопептидный ингибитор Леупептин	ацетил-Leu-Leu-Arg-альдегид
Ингибитор апоптоза BIRC 5	O15392
Ингибитор апоптоза XIAP	P98170
Ингибитор каспаз с-FLIP	O15519
Тканевой ингибитор металлопротеаз (1-4)	XO1683
Серпин А1 (альфа 1- антитрипсин)	P01009
Серпин А3 (инти-химотрипсин)	P01011
Серпин F2 (альфа 2-антиплазмин)	P08697
Серпин G1 (C1 ингибитор)	P05155
Серпин P18 (PI ингибитор)	P50452

Лейкоцитарный секреторный ингибитор	P03973
Протеазный ингибитор Bowman-BIRK	X68704
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 (комбинированных) фармацевтически активных веществ включены преимущественно римантадин, рибавирин, фавипиравир, занамивир, триазавирин (группа триазидов), интерферон, ацетилсалициловая кислота, аллопуринол, фамотидин, тетрациклин, лютеолин, тобрамицин, колистин, гентамицин, антитела различной специфичности, вирусы, протеазы различной специфичности и др.

Пример 2.

Комбинированный аэрозольный состав апротинина (ингибитор протеаз) и рибавирина (антивирусное вещество).

Готовили серию растворов, содержащих различные концентрации апротинина и рибавирина, как указано в табл. 2. Для приготовления составов использовали буферный раствор, содержащий (3,3 mM Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄ pH 7,2; 0,9 mM KCl; 45 mM NaCl) (ФБ/3), в который добавляли последовательно белок апротинина и вещество рибавирина до соответствующих конечных концентраций.

Таблица 2.

Компоненты аэрозольных составов, приготовленных на основе апротинина и рибавирина.

Активные вещества	Аэрозольные составы						
	№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7
Апротинин (АТрЕ/мл) ^(*)	—	50	50	1500	1500	250	—
Рибавирин (мкг/мл)	20	20	150	20	150	—	—

(*) Апротинин характеризуется следующим соотношением: 1 мг вещества обладает активностью 5000 АТрЕ.

После приготовления состав вносили в капсулу объемом 4,0 мл для аэрозольного устройства мягкого облака («Респимат»). Далее проводили генерирование аэрозоля посредством 30 пусков. Образовавшееся аэрозольное облако собирали посредством его конденсирования в стеклянную пробирку объемом 10 мл. Сформировавшийся конденсат облака собирали посредством центрифугирования при 1500 об/мин в течении 3 мин. В результирующем конденсате определяли количественное содержание и фармакологические и биологические

активности апротинина и рибавирина по их способности ингибировать трипсиновую протеазу (для апротинина) и по способности тормозить размножение вируса гриппа в культуре клеток кишечника человека CaCo-2 (для апротинина и рибавирина). Полученные результаты показаны на Фиг. №1-№5.

Пример 3.

Комбинированный аэрозольный состав леупептина (ингибитор протеаз) и фавипиравира (антивирусное вещество).

Готовили серию растворов, содержащих различные концентрации леупептина и фавипиравира, как указано в табл. 3. Для приготовления составов использовали буферный раствор ФБ/3, в который добавляли последовательно белок леупептин (ингибитор протеаз) и вещество фавипиравира (антивирусное вещество) по прописи согласно таблице 3 до соответствующих конечных концентраций.

Таблица 3.

Компоненты аэрозольных составов, приготовленных на основе леупептина и фавипиравира.

Активные вещества	Аэрозольные составы						
	№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7
Леупептин (мкг/мл) ^(*)	—	5	5	40	40	40	—
Фавипиравир (мкг/мл)	200	40	120	40	120	—	—

(*) Апротинин характеризуется следующим соотношением: 1 мг сухого вещества обладает активностью ~5000 АТрЕ.

После смешивания компонентов аэрозольный состав вносили в капсулу объемом 4,0 мл для аэрозольного устройства мягкого облака («Респимат»). Далее проводили генерирование аэрозоля посредством 30 пусков. Образовавшееся аэрозольное облако собирали посредством его конденсирования в стеклянную пробирку объемом 10 мл. Сформировавшийся конденсат облака собирали посредством центрифугирования при 1500 об/мин в течении 3 мин. В результирующем конденсате определяли количественное содержание и фармакологические и биологические активности леупептина и фавипиравира по их способности ингибировать трипсиновую протеазу (для леупептина) и по способности тормозить размножение коронавируса (штамм KB92) в культуре клеток кишечника человека CaCo-2 (для леупептина и фавипиравира). Полученные результаты показаны на фиг. №6 и №7.

Исследование фармакологической активности аэрозоля леупептина и фавипиравира проводили в культуре клеток млекопитающих, инфицированных коронавирусом по его накоплению в культуральной жидкости в клеточной культуре кишечника человека в присутствии аэрозольного состава. Накопление вируса оценивали методом титрования по

гемагглютинирующей активности с мышинными эритроцитами, что характерно для вирусов семейства коронавирусов. формирующихся под действием патогенных коронавирусов животных и человека. Данные такого тестирования приведены на фиг. №7.

Пример 4.

Ингибирование размножения коронавируса аэрозольным составом, содержащим ингибиторы протеаз и противовирусные вещества и их комбинации.

Аэрозольные составы ингибиторов протеаз (апротинин и леупептин) в комбинации с противовирусными веществами, а именно: фавипиравиром, рибавирином готовили на фосфатном буферном растворе ФБ/3, содержащем 0,05% ДМСО. Далее производили распыление в устройстве мягкого облака Респимат, собирали и осаждали аэрозольный конденсат, который добавляли в клеточную питательную среду и вносили начальную дозу коронавируса (штамм KB92), равную 0,001 ФОЕ на клетку, и инкубировали при 36,5 град С в CO₂-атмосферном инкубаторе. Через 48-72 часов после инкубации исследовали фармакологическое действие аэрозольного состава по уровню накопления вируса в культуральной жидкости клеток.

Для тестирования фармакологической активности аэрозоля ингибиторов протеаз и их комбинаций с веществами иного механизма действия исследовали размножение коронавируса (штамм KB92) в культуре клеток млекопитающих. Уровень подавления вируса оценивали по снижению вирусного накопления в культуральной среде, используя для этого тест вирусной гемагглютинации эритроцитов мыши методом двух-кратных разведений. Результаты показаны на фиг. 8.

Пример 5

Фармакологическая активность комбинированного аэрозольного состава, содержащего ингибиторы протеаз, противовирусные вещества, растительное вещество.

Комбинированный аэрозольный состав, содержащий апротинин (ингибитор протеаз) 50 мкг/мл, лютеолин (растительный экстракт, ингибитор протеаз) 10 мкг/мл, рибавирин (противовирусное вещество) 25 мкг/мл, детергент твини-20 (10 мкг/мл), масло мяты 1 мкг/мл и глицерин 0,3%, готовили на буфере ФБ/3. Далее производили распыление в устройстве мягкого облака Респимат, собирали и осаждали аэрозольный конденсат. Фармакологическую активность полученного аэрозольного конденсата исследовали по подавлению размножения коронавируса в культуре клеток почки быка (линия MDBK), ингибированию активности трипсина.

Конденсат добавляли в клеточную питательную среду и вносили начальную дозу коронавируса (штамм KB92), равную 0,001 ФОЕ на клетку, и инкубировали при 36,5 град С в CO₂-атмосферном инкубаторе. Через 48-72 часов после инкубации исследовали фармакологическое действие аэрозольного состава по уровню накопления вируса в культуральной жидкости клеток. Уровень подавления вируса оценивали по снижению вирусного накопления в культуральной среде, используя для этого тест вирусной гемагглютинации эритроцитов мыши методом двух-кратных разведений.

Антипротеазную активность аэрозольного конденсата тестировали по ингибированию трипсина. Для этого стандартный раствор трипсина смешивали с аэрозольным конденсатом и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. После инкубации смеси конденсата с трипсином определяли остаточную активность трипсина методом гидролитического расщепления хромогенного субстрата L-ZAPA (Z-Arg-pNA), ведущего к образованию окрашенного соединения нитроанилида (NA), которое регистрируется при длине волны 405 нм (ОП/405). Для тестирования в исследуемую смесь вносят субстрат L-ZAPA (25 мкл раствора с концентрацией 1 мг/мл), инкубируют 15 мин при 20 град. С, гидролитическую реакцию останавливают добавлением 25 мкл 1М раствора соляной кислоты и измеряют величину ОП/405, которая показывает уровень остаточного активного (не ингибированного) трипсина. Результаты показаны в таблице 4.

Таблица 4

Фармакологическая активность комбинированного аэрозольного состава ингибитора протеаз, противовирусного вещества, растительного ингибитора

Пробы	Размножение вируса ⁽¹⁾	Гидролитическая активность ⁽²⁾
Контроль (конденсат без активных веществ)	+	+
Комбинированный состав	+/-	-

(1) Фармакологическое действие на вирус оценивали по ингибированию размножения коронавируса в культуре клеток млекопитающих. Размножение вируса определяли по титру вируса в культуральной жидкости методом агглютинации эритроцитов мыши. Обозначения: «+» - титр вируса 1/4000 и выше; «+/-» - титр вируса 1/32 и ниже (ингибирование более 10 раз).

(2) Фармакологическое действие аэрозольного состава по ингибированию гидролитической активности протеаз. Аэрозольный конденсат тестировали методом ингибирования гидролитического расщепления хромогенного субстрата L-ZAPA (Z-Arg-pNA) трипсином, которое регистрируется по нарастанию окрашивания инкубационной смеси в случае отсутствия активных ингибиторов протеаз в аэрозольном составе. Оценку окрашивания проводят при длине волны 405 нм (ОП/405). Обозначения: «+» - эффективное расщепление субстрата исходным раствором трипсина; «-» - отсутствие регистрируемой активности трипсина в инкубационной смеси.

Пример 6

Фармакологические свойства комбинированного аэрозольного состава, содержащего ингибитор протеаз, противовирусное вещество, сорастворитель

Комбинированный аэрозольный состав, содержащий камостад (ингибитор протеаз) 15 мкг/мл, осельтамивир (антивирусное вещество) 10 мкг/мл, детергент твини-20 (2 мкг/мл), масло мяты 0,5 мкг/мл и глицерин 0,3%, готовили на буфере ФБ/3. Далее производили распыление в эжекторном устройстве Бореаль, собирали и осаждали аэрозольный конденсат. Фармакологическую активность полученного аэрозольного конденсата исследовали по подавлению размножения вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в культуре клеток кишечника человека (линия Сасо-2) и ингибированию активности трипсина.

Конденсат добавляли в клеточную питательную среду и вносили начальную дозу вируса гриппа, равную 0,001 ФОЕ на клетку, и инкубировали при 36,5 град С в CO₂-атмосферном инкубаторе. Через 72 часа после инкубации оценивали фармакологическое действие аэрозольного состава по уровню накопления вируса в культуральной жидкости клеток. Уровень подавления вируса оценивали по снижению вирусного накопления в культуральной среде, используя для этого тест вирусной гемагглютинации эритроцитов человека группы 1(0) методом двух-кратных разведений.

Антипротеазную активность аэрозольного конденсата тестировали по ингибированию трипсина. Для этого стандартный раствор трипсина смешивали с аэрозольным конденсатом и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. После инкубации смеси конденсата с трипсином определяли остаточную активность трипсина методом гидролитического расщепления хромогенного субстрата L-ZAPA (Z-Arg-pNA), ведущего к образованию окрашенного соединения нитроанилида (NA), которое регистрировалось при длине волны 405 нм (ОП/405). Для тестирования в исследуемую смесь вносили субстрат L-ZAPA (25 мкл раствора с концентрацией 1 мг/мл), инкубировали 15 мин при 20 град. С, гидролитическую реакцию останавливали добавлением 25 мкл 1М раствора соляной кислоты и измеряли величину ОП/405, показывающую уровень остаточного активного (не ингибированного) трипсина. Результаты показаны в таблице 5.

Таблица 5

Фармакологическая активность комбинированного аэрозольного состава ингибитора протеаз, антивирусного вещества, сорастворителя

Пробы	Размножение вируса ⁽¹⁾	Гидролитическая активность ⁽²⁾
Контроль (конденсат без активных веществ)	++	+
Комбинированный состав	+/-	-
Камостад	+	-
Осельтамивир	+	+

(1) Фармакологическое действие на вирус оценивали по ингибированию размножения коронавируса в культуре клеток млекопитающих. Размножение вируса определяли по титру вируса в культуральной жидкости методом агглютинации эритроцитов мыши. Обозначения: «+» - титр вируса 1/4000 и выше; «+/-» - титр вируса 1/32 и ниже (ингибирование более 10 раз).

(2) Фармакологическое действие аэрозольного состава по ингибированию гидролитической активности протеаз. Аэрозольный конденсат тестировали методом ингибирования гидролитического расщепления хромогенного субстрата L-ZAPA (Z-Arg-pNA) трипсином, которое регистрируется по нарастанию окрашивания инкубационной смеси в случае отсутствия активных ингибиторов протеаз в аэрозольном составе. Оценку окрашивания проводят при длине волны 405 нм (ОП/405). Обозначения: «+» - эффективное расщепление субстрата исходным раствором трипсина; «-» - отсутствие регистрируемой активности трипсина в инкубационной смеси.

Пример 7.

Фармакологическая активность аэрозольного состава ингибитора протеаз и бактериального антибиотика.

Бактерии E.Coli (штамм HB110; XL1) культивировали в бульоне LB в течении 2 часов. Далее полученную культуру делили на 2 части. Одну часть смешивали с конденсатом аэрозольного состава в соотношении 3:1 и продолжали инкубацию при 33 град. С в течении 2 часов, после чего измеряли оптическую плотность суспензии, что отражало рост микробов. Полученные величины оценивали следующим образом: «+» - прирост ОП на 0,5 ЕД и более; «+/-» - средний уровень прироста плотности не более 0,2 ЕД; «-» - низкий уровень отсутствие прироста. Во второй части суспензии микроб осаждали при 6000 об/мин в течении 20 мин, микробный осадок суспендировали в ФБ/3 и микробы разрушали ультразвуком (Соникатор DVE/модель GS (Германия); 3 цикла по 15 сек каждый в ледяной бане). Бактериальные гомогенаты смешивали с равным объёмом аэрозольного конденсата и определяли гидролитическую активность смеси по расщеплению хромогенного субстрата L-ZAPA (Z-Arg-pNA), как описано в разделе 3. Результаты оценивали по следующей шкале:

«+» - сильная гидролитическая активность в контрольной пробе без конденсата 100%;

«+/-» - средняя активность не более 30%; «-» - слабая активность не более 10%. Полученные результаты представлены в табл. 6.

Таблица 6

Фармакологическая активность аэрозольного состава ингибитора протеаз и бактериального антибиотика.

Пробы *)	Рост микробов	Гидролитическая активность
Контроль (без конденсата)	+	+

Леупептин	+/-	-
Тетрациклин	-	+/-
ЛЕУ+ТЕТ	-	-
АПР+ТЕТ	-	-

(*) Аэрозольные составы готовили на ФБ/3 с концентрациями активных веществ: леупептин (ЛЕУ) (10 мкг/мл), тетрациклин (ТЕТ) 20 мкг/мл), апротинин (АПР) (30 мкг/мл).

Приведённые результаты показывают, что при распылении аэрозольного состава ингибитора протеаз и бактериального антибиотика сохраняется фармакологическая активность обоих активных компонентов аэрозольного состава и не происходит взаимной инактивации активных веществ в комбинированном аэрозольном составе. Результирующий аэрозоль имеет мультивалентное фармакологическое действие.

Пример 8.

Фармакологическая активность аэрозольного состава, содержащего ингибитор протеаз, бактериальный антибиотик и сорастворитель.

Кишечная палочка (E.Coli) штамм HB101, либо XL1 выращивали в бульоне LB (содержит 10 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г NaCl на 1 литр среды) в течение 2 часов при 33 град. С. Далее одну часть микробной суспензии смешивали с конденсатом аэрозольного состава в соотношении 3:1 и продолжали инкубацию при 33 град. С в течении 2 часов, после чего измеряли ОП суспензии, как показатель роста микробов. Вторую часть микробной суспензии осаждали при 6000 об/мин в течении 20 мин, микробный осадок суспендировали в ФП/3 и микробы разрушали ультразвуком (Соникатор DVE/модель GS (Германия); 3 цикла по 15 сек в ледяной бане). Бактериальные гомогенаты смешивали с равным объёмом аэрозольного конденсата и определяли протеазную активность смеси по расщеплению хромогенного субстрата - N-а-бензоил-DL-аргинин-4-нитроанилида (БАПНА), который при расщеплении приобретает окраску, которую регистрируют по интенсивности окрашивания при длине волны 405 нм. Результаты оценивали по следующей шкале: «+» - сильная протеазная активность в контрольной пробе без конденсата, 100%; «-» - слабая активность не более 20% по сравнению в контрольной пробой. Полученные результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7.

Фармакологическая активность аэрозольного состава, содержащего ингибитор протеаз, бактериальный антибиотик и сорастворители.

Пробы *)	Рост микробов	Протеазная активность
Контроль (без конденсата)	+	+

АПР+ГЕН+ЛЕУ	-	-
АПР+ГЕН+ЛЕУ (№1)	-	-
АПР+ГЕН+ЛЕУ (№2)	-	-
АПР+ГЕН+ЛЕУ (№3)	-	-

(*) Аэрозольные составы готовили на ФБ/3 с указанными концентрациями активных веществ: леупептин (ЛЕУ) (10 мкгр/мл), гентамицин (ГЕН) 15 мкгр/мл), апротинин (АПР) (30 мкгр/мл), с добавлением следующих сорастворителей: глицерин (до конечной концентрации 5%) (смесь №1), твин-20 (до конечной концентрации 0,1%) (смесь №2), диметилсульфоксид – ДМСО (до конечной концентрации 0,05%) (смесь №3).

Полученные результаты показывают совместимость различных по структуре и активности веществ друг с другом и сорастворителями, отсутствие взаимной инактивации при приготовлении аэрозольных составов и при их распылении, сохранение фармакологической активности активных веществ. Результирующий аэрозоль имеет мультивалентное фармакологическое действие.

Пример 9.

Фармакологическая активность аэрозольного состава, содержащего ингибитор протеаз, противовирусное вещество, бактериальный антибиотик и сорастворитель.

Готовили комбинированный аэрозольный состав по схеме, представленной в примере 12 с использованием следующих компонентов: апротинин (100 мкгр/мл), рибавирин (30 мкгр/мл), тетрациклин (20 мкгр/мл). Раствор готовили на буфере ФБ/3, содержащем 1%глицерина. Полученные составы распыляли в устройстве респимат, получали конденсаты и исследовали фармакологические свойства активных веществ. Результат представлены в таблице 8.

Таблица 8.

Фармакологическая активность аэрозольного состава, содержащего ингибитор протеаз, противовирусное вещество, бактериальный антибиотик и сорастворитель

Активное вещество в аэрозольном составе	Фармакологическая ингибиторная активность		
	Противовирусная ¹⁾	Антибактериальная ²⁾	Патогенетическая ³⁾
АПР	+	+/-	+
РИБ	++	—	+/-
ТЕТ	-	+	-
АПР+РИБ+ТЕТ	++	+	++

(1) Фармакологическое действие на вирус оценивали в тесте ингибирования образования инфекционных фокусов вируса, как описано в примере 3. Обозначения: «+» - ингибирование не более 50 раз; «++» - сильное ингибирование в 100 раз и более.

(2) Фармакологическое действие аэрозольного состава на микробы оценивали по ингибированию роста микроба в жидкой среде, как описано в примере 11. Обозначения:

«+» - полное ингибирование роста микроба в присутствии исследуемого аэрозольного конденсата; «+/-» - частичное ингибирование роста микроба до уровня оптической плотности около 0,3 и менее; «-» - отсутствие ингибирующего эффекта на рост микроба, который достигал уровня оптической плотности 1,0 и более.

(3) Защитное действие на клетки-мишени оценивали по снижению цитотоксического действия парамиксовируса Сендай на монослой клеток почки обезьяны (линия VERO), используя тест клеточного окрашивания трипановым голубым. Обозначения: «++» - выраженное защитное действие, более 50% клеток сохраняют жизнеспособность; «+» - умеренное снижение количества мертвых клеток в монослое до уровня 15-50%; «+/-» - слабое снижение количества мертвых клеток в монослое на уровне 15% и менее; «-» - отсутствие защитного эффекта и практически 100% гибель клеток.

Результаты, представленные в таблице 13, показывают сохранение полного комплекса фармакологических свойств комбинированного аэрозольного состава после его распыления и отсутствие инактивации активных веществ фармацевтической композиции аэрозоля.

Пример 10.

Стабилизация инфекционности вируса в комбинированном аэрозольном составе.

Готовили комбинированный аэрозольный состав, содержащий активный парамиксовирус болезни Ньюкасла (штамм LaSota), приготовленный на растворе ФБ/3, содержащем 5% глицерина. Состав инкубировали 48 часов при температуре 30 град С и помещали в аэрозольное устройство Респимат. Далее генерировали аэрозоль, получали аэрозольный конденсат, который тестировали на наличие инфекционного вируса. Инфекционность вируса определяли методом титрования инфекционных фокусов в культуре клеток почки собаки (клеточная линия МДСК) (таблица 9).

Таблица 9.

Стабилизация инфекционности вируса в аэрозольном составе, содержащем ингибитор протеаз

Аэрозольный состав *)	Инфекционность вируса **)		Стабильность (%)
	До распыления	После распыления	
Контрольный состав ВБН без ингибитора протеаз	5,0 x10 ⁶	3,1 x10 ⁴	0,62

Состав ВБН с аprotинином	$4,0 \times 10^6$	$6,7 \times 10^5$	16,8
Состав ВБН с леупептином	$5,1 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	30,0
Состав с ВБН с аprotинином и леупептином	$5,5 \times 10^6$	$4,7 \times 10^6$	85,4

(*) Аэрозольный состав готовили на буферном растворе ФБ/3, в который вносили вирус болезни Ньюкасла (ВБН) до титра около $3-6 \times 10^6$ инфекционных вирионов в мл аэрозольного состава, глицерин до конечной концентрации 5% и активное вещество ингибитора протеаз аprotинин (до концентрации 50 мкг/мл), леупептин (до концентрации 15 мкг/мл) либо оба ингибитора в комбинации. Полученные состав помещали в капсулу Респимат, делали 30 выпусков, собирали конденсат и инфекционность вируса определяли методом инфекционных фокусов в культуре клеток МДСК. Фокусы определяли методом иммунного окрашивания специфическими анти-НДВ антителами, как описано выше в примере 2.

(**) Для определения инфекционного титра вируса готовили 10-кратные разведения аэрозольного конденсата, которые вносили в культуру клеток и через 20 часов считали количество вирусных фокусов в клеточном монослое. Количество вируса рассчитывали по числу фокусов на мл объема аэрозольного состава.

Результаты проведенного тестирования указывают на то, что включение в аэрозольный состав ингибиторов протеаз широкого антипротеазного спектра действия (аprotинина и леупептина) тормозило инактивацию инфекционных вирусных частиц в аэрозольном составе.

Пример 11.

Фармакологическое действие комбинированного аэрозольного состава по предотвращению формирования вирусных мутантов.

Таблица 10.

Фармакологическое действие комбинированного аэрозольного состава ингибитора протеаз и противовирусного вещества против вируса гриппа А.

Действующее вещество в аэрозольном составе	Размножение вируса в присутствии аэрозольного конденсата (*)	
	Пассаж 3	Пассаж 6
Контроль (без активных веществ)	+	+

ОСТМ	+/-	+
АПР	+/-	+/-
ОСТМ+АПР	-	-

(*) Готовили комбинированный аэрозольный состав на основе раствора ФБ/3, содержащего апротинин, осельтамивир и ацетилсалициловую кислоту согласно следующего соотношения активных веществ: концентрация осельтамивира карбоксилата (ОСТМ) и апротинина (АПР) в аэрозольном составе составляло 2 мкМ и 40 мкг/мл, соответственно. Используемая низкая концентрация апротинина вызывала частичное торможение размножения вируса гриппа в культуре клеток легкого человека (Calu-3). Действие комбинированного аэрозольного состава проверяли в клеточной культуре инфицированной вирусом гриппа A/PR/8/34 (H1N1) со множественностью около 0,001 ФОЕ на клетку. В культуру клеток вносили 2 мл питательной среды с добавлением 70 мкл конденсированного аэрозольного состава, содержащего указанные активные вещества, и инкубировали при 37 град. С. Через 48 часов среду отбирали, смешивали 1 к 10 с новой порцией среды с аэрозольным составом и инкубировали на клеточной культуре 48 часов (пассаж №2). Таким образом, повторяли 6 последовательных пассажей в клеточной культуре Calu-3. После пассажа №3 и №6 клетки окрашивали на наличие вируса с помощью антител, конъюгированных с пероксидазой, красителем ТМБ. Результаты оценивали следующим образом: (-) – отсутствие инфицированных вирусом клеток (полное ингибирование вируса). (+/-) вирусом заражено не более 10% клеток во всем монослое (частичное ингибирование вируса). (+) - все 100% клеток заражены вирусом (появление резистентных штаммов вируса, отсутствие терапевтического эффекта).

Полученный результат показывает формирование нового синергидного эффекта двух активных веществ, который возникает при совместном применении в комбинированном (смешанном) аэрозольном составе и их действии в одном локальном очаге (органе, ткани, клетке организма и т.п.) и отсутствие данного эффекта при раздельном применении активных фармакологических веществ.

Пример 12.

Фармакологическое действие аэрозольного состава ингибитора протеаз и ацетилсалициловой кислоты (АСК).

Таблица 11.

Комбинированное действие активных веществ с различным механизмом действия в аэрозольном составе.

Наименование активного вещества	Эффективные концентрации препаратов в аэрозольном составе(*)	
	Индивидуальное применение	Комбинированное применение
Апротинин	50-150 мкг/мл	10-50 мкг/мл
АСК	20-35 мкМ	0,4- 5,5 мкМ

(*) Готовили комбинированный аэрозольный состав на основе раствора ФБ/3, содержащего апротинин, АСК с соотношением активных веществ, как указано в таблице. Далее полученные составы вносили в устройство мягкого облака, распыляли аэрозоль и готовили конденсат аэрозольного облака, как описано в примере 2. Фармакологическую активность состава исследовали по ингибированию размножения вируса гриппа А в куриных эмбрионах. 9-дневные куриные эмбрионы заражали вирусом гриппа человека A/Aichi/68 введением в аллантоисную полость эмбриона около 1000 вирионов и дополнительно вводили 100 мкл двух кратных разведений конденсированного аэрозольного состава, полученного по прописи в таблице 18. Брали по 5 эмбрионов на одно разведение состава. После 36 часов инкубации эмбрионов при 37 град С отбирали аллантоисную жидкость из куриных эмбрионов и определяли количество синтезированного инфекционного вируса методом инфекционных фокусов в культуре клеток МДСК по количеству вирусных частиц на мл аллантоисной жидкости. В качестве контроля брали эмбрионы, которые заражали вирусом гриппа без введения аэрозольного состава. Определяли концентрацию активных веществ в аэрозольном конденсате, при которой отмечалось 100-кратное снижение титра вируса по сравнению с контролем (эффективная концентрация препарата).

Приведенные примеры №17, №18 и №22 (далее) демонстрируют сохранение противовирусного действия активных веществ в комбинированном аэрозольном составе и синергидное усиление их терапевтического эффекта при совместном присутствии в аэрозольном составе и совместном действии в одной точке приложения (органе, ткани, пораженной клетки и т.п.). Синергидное действие комбинаций веществ выражается также в снижении эффективной лечебной дозы каждого активного вещества и предотвращении возникновения вирусных мутантных вариантов при применении комбинированного аэрозольного состава. Для достижения лечебного противовирусного эффекта требуются концентрации препаратов, которые более чем в 10 раз ниже концентраций при их индивидуальном применении. При применении комбинированного аэрозольного состава достигается снижение лечебной концентрации препаратов и понижение уровня и опасности развития их побочной токсичности.

Пример 13.

Аэрозольный состав вируса с ингибитором протеаз

Готовили аэрозольный состав, содержащий низко инфекционный вируса гриппа, содержащий нерасщеплённый гемагглютинин HA0 (м.м. 75 кДа), ингибитор протеаз (апротинин) или протеазу (трипсин) в концентрации 0,7, 250 и 10 мкг на мл, соответственно. Состав готовили на буфере ФБ/3, содержащем 0,3% глицерина и 0,001% ДМСО. Затем проводили распыление в аэрозольном устройстве Респимат, собирали конденсат аэрозольного облака и исследовали его фармакологическую активность в тесте ингибирования протеазы (трипсина) и в тесте инфицирования клеток млекопитающих вирусом. Результаты приведены на фиг. 9 и в таблице 12.

Таблица 12.

Фармакологическая активность комбинированного аэрозоля, содержащего вирус гриппа, ингибитор протеаз и протеазу.

Активные вещества аэрозольного состава	Фармакологическая активность(*)		
	Антипротеазная активность (%)	Инфекционная активность вируса (ФОЕ/мл)	Протеазная активность (%)
Контроль (исходный вирус)	5	$4,3 \times 10^4$	11
Вирус + апротинин	100	$6,0 \times 10^3$	0,02
Вирус + трипсин	0	$3,3 \times 10^7$	100

(*) Готовили комбинированный аэрозольный состав, содержащий вирус гриппа A/Aichi/2/68, выращенный в культуре клеток МДСК, апротинин и трипсин, как указано в таблице. Вирус гриппа подвергали очистке методом осаждения через 30% раствор глицерина, приготовленный на буфере ФБ, при центрифугировании в роторе SW55.1 ультрацентрифуги Spinko L-65 при 25000 об/мин в течение 2 часов при +4 град С. Полученные осадок очищенного вируса суспендировали в буфере ФБ/3 и использовали для приготовления аэрозольного состава. Далее полученные составы вносили в устройство мягкого облака, распыляли аэрозоль и готовили конденсат результирующего аэрозоля. Фармакологическую активность полученных аэрозольных составов исследовали тремя тестами: (1) по ингибированию протеазы; (2) по гидролизу хромогенного протеазного субстрата L-ZAPA (Z-Arg-pNA); (3) по инфекционности в культуре клеток легкого человека (линия клеток Calu-3), как описано в примере 2. Инфекционность вируса определяли методом инфекционных фокусов в культуре клеток Calu-3 с идентификацией вирусных фокусов методом иммунного окрашивания специфическими анти-Aichi антителами, как описано выше в примере 2. В таблице представлен инфекционный титр вируса в 1 мл аэрозольного конденсата.

Полученные результаты показывают совместимость компонентов аэрозольного состава, сохранение фармакологических свойств активных веществ состава и отсутствие взаимного ингибирования активных веществ, стабилизация инфекционности вируса в аэрозольном

составе ингибитором протеаз. Аэрозольные составы данного типа могут использоваться для приготовления вирусных вакцин и для местного применения при онколитической виротерапии живыми вирусами различных типов опухолей.

Пример 14.

Комбинированный аэрозольный состав на основе ингибитора протеаз и протеазы иной специфичности.

Готовили аэрозольный состав, содержащий ингибитор клеточных протеаз смерти (каспаз) и протеолитический фермент трипсин (сериновая протеаза) на основе буфера ФБ/3 с 0,1% глицерина. Концентрации активных веществ составляли 10 и 20 мкг на мл состава для ингибитора каспаз и трипсина, соответственно. Для генерации аэрозоля использовали устройство респимат, производили распыление и собирали конденсат исследуемого состава. Фармакологическую активность конденсата исследовали в тесте ингибирования каспазы 3 человека и трипсина по расщеплению соответствующих субстратов N-а-бензоил- DL-аргинин-4-нитроанилида (БАПНА) для трипсина и Ac-DEVD-pNA для каспазы 3. Реакцию расщепления субстратов соответствующими протеазами оценивали по изменению цвета раствора, которое сопровождается окрашиванием раствора измеряемое по интенсивности поглощения при длине волны 405 нм. Результат показан на Фиг. 10.

Пример 15.

Комбинированный аэрозольный состав, содержащий ингибитор протеаз, супероксиддисмутазу, сорастворитель.

Готовили аэрозольный состав, содержащий апротинин (ингибитор протеаз) и супероксиддисмутазу (СОД - фермент утилизации активных форм кислорода и оксидных радикалов) на основе буфера ФБ/3 с 0,03% глицерина. Концентрации активных веществ составляли 250 и 700 мкг на мл состава для ингибитора протеаз и СОД, соответственно. Для генерации аэрозоля использовали устройство мягкого облака Респимат, производили распыление и собирали конденсат исследуемого состава. Фармакологическую активность конденсата исследовали в тесте подавления цитопатогенного действия (ЦПД) вируса гриппа на клетки лёгкого человека (линия Calu-3) и в тесте ингибирования гидролитической активности трипсина по расщеплению хромогенного субстрата N-а-бензоил-DL-аргинин- 4-нитроанилида (БАПНА). Реакцию расщепления субстрата трипсином оценивали по изменению цвета раствора, которое сопровождается окрашиванием раствора измеряемое по интенсивности поглощения при длине волны 405 нм.

ЦПД исследовали колориметрическим тетразолиевым методом (МТТ тест) с использованием красителя 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромида, который переходит в пурпурный формазан под действием НАДФ-Н-зависимых клеточных оксидоредуктазных ферментов жизнеспособных клеток. Количество формазана, которое определяют фотометрически при 590 нм, отражает количество живых клеток.

Для определения активности ингибитора протеаз использовали тест ингибирования трипсина. Конденсат после аэрозольного распыления комбинированного состава конденсат

смешивали с трипсином в присутствии субстрата БАПНА, инкубировали 20 мин при 30 град С и определяли интенсивность окрашивания (ОП-оптическую плотность) раствора при 405 нм. Результаты показаны в таблице 13.

Таблица 13.

Фармакологическая активность комбинированного аэрозоля, генерированного из состава, содержащего апротинин и СОД

Активное вещество в аэрозольном составе	Фармакологическая ингибиторная активность	
	Цитопатогенное действие ¹⁾	Гидролитическая активность ²⁾
Контроль (состав без активных веществ)	+	+
АПР	+/-	-
СОД	+/-	+/-
АПР+СОД	-	-

1) ЦПД действие исследовали методом МТТ. Клетки инфицировали вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2), вносили среду с аэрозольным конденсатом и инкубировали 48 часов при 36 град. С. Затем клетки инкубировали с тетразолиевым красителем и определяли уровень образования формазана по стандартной МТТ методике по оптической плотности при 590 нм. Обозначения: «+» - значение оптической плотности в контрольной пробе, которое принимали за 100%; «+/-» - частичное ЦПД на уровне 5-40%; «-» - минимальный уровень ЦПД на уровне 5% и ниже.

2) Аэрозольные конденсаты смешивали с равным объемом стандартного трипсина и определяли гидролитическую активность смеси по расщеплению хромогенного субстрата L-ZAPA (Z-Arg-pNA), как описано в примере 2. Результаты оценивали по следующей шкале: «+» - контрольная гидролитическая активность в пробе трипсина без конденсата, которую принимали за 100%; «+/-» - средняя активность не более 30%; «-» - слабая активность не более 5%. Полученные результаты представлены в табл. 13. Полученные результаты показывают сохранение фармакологической активности как ингибитора протеазы, так и супероксиддисмутазы после аэрозольного распыления комбинированного аэрозольного состава.

Пример 16.

Комбинированный аэрозольный состав ингибитора протеаз и противовирусных антител.

Готовили аэрозольные составы, содержащие активные вещества апротинина, леупептина и антитела кролика против белка НА вируса гриппа человека штамм A/Aich/2/68 (H3N2) в

концентрации 40, 15 и 10 мкг/мл, соответственно, в отдельности или вместе. В качестве базового раствора использовали буфер ФБ/3 (pH 7,2), содержащий 0,07% глицерина. После распыления приготовленного состава в устройстве Респимат или Бореаль (модель 4000) получали конденсат аэрозольного состава. Далее брали вирус гриппа в дозе 100 ФОЕ, смешивали с равным объемом аэрозольного конденсата, вносили в культуру клеток почки собаки (линия МДСК) и инкубировали при 36 град С в CO₂ атмосфере. Через 10-15 часов клетки фиксировали и инфицированные клетки окрашивали мышиными антителами к вирусному белку NP с помощью метода "True Blue", как описано в примере 2. Результат показан на фиг. 11.

Пример 17.

Комбинированный аэрозольный состав интерферона и ингибитора протеаз.

Готовили аэрозольные составы, содержащие активные вещества апротинина и интерферона альфа-2в человека в концентрации 40 и 15 мкг/мл, соответственно, в отдельности или вместе. В качестве базового раствора использовали буфер ФБ/3 (pH 7,2), содержащий 0,1% глицерина. После распыления приготовленного состава в устройстве Респимат получали конденсат аэрозольного состава. Далее среду для клеток смешивали аэрозольным конденсатом в соотношении 3 к 1 и вносили в культуру клеток легкого человека (линия Calu-3) и инкубировали при 36 град С в CO₂ атмосфере в течение 2 часов. Затем в культуру вносили вирус гриппа человека A/PR/8/34 (H1N1) в дозе 100 ФОЕ на клеточный монослой в чашке диаметром 3 см и инкубировали при 36 град С в CO₂ атмосфере в течение 10 часов. Затем клетки фиксировали и инфицированные клетки окрашивали антителами кролика, полученными к вирусу, и окрашивали вторичными антителами с пероксидазой с помощью метода "True Blue", как описано в примере 2. Результат показан на фиг. 12.

Пример 18.

Профиль дисперсности аэрозольного облака при распылении комбинированного аэрозольного состава ингибитора протеаз и рибавирина, содержащего глицерин.

Исследовали пригодность аэрозольного состава для генерирования мелкодисперсного аэрозоля за счет выталкивающей силы в устройстве мягкого облака. Аэрозольный состав готовится согласно прописи состава №3, указанного в таблице 2 с добавлением глицерина в конечной концентрации 0,5%. Определение дисперсности проводили микроскопически после выпуска аэрозоля на стекло. Делают выпуск аэрозольного состава на чистую обезжиренную матрицу, расположенную перпендикулярно направлению распыления на расстоянии 5 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.13). Измерение проводят 3 раза из одного баллона на разных сроках выпуска аэрозоля и далее 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 0,1 до 300 мкм, пригодный для медицинского применения. Результат показан на Фиг.13.

Пример 19

Тестировали фармакологические свойства активных веществ при минимальных концентрациях в аэрозольном составе.

Нижний порог значений 0,001 мкг/мл прежде всего относится к низкомолекулярным активным веществам, тогда как для высокомолекулярных веществ потребуется более высокие концентрации для получения фармакологического эффекта. Для подтверждения данного диапазона минимальных концентраций представлен пример в таблице 14.

Таблица 14.

Фармакологическая активность аэрозольного состава, содержащего ингибитор протеаз, антивирусное вещество, производное соединения антител (Fab2 фрагмент).

Активное вещество в аэрозольном составе ²⁾	Фармакологическая активность		
	Противовирусная ³⁾	Антипротеазная ⁴⁾	Поглощение ОП/206 ⁵⁾
Панель А			
АПР	+	+	—
РИБ	+	—	+
Fab2 ¹⁾	+	—	—
АПР+РИБ+Fab2	+++	+	+
Панель Б			
1.ЛЕУ+РИБ+Fab2 ⁶⁾	++	+	+
2.ЛЕУ+РИБ+Fab2 ⁷⁾	+	+ / —	+

Панель А.

1) Препарат фрагмента (Fab2) антител против вируса гриппа А человека A/Aichi/2/68 (H3N2) получали с помощью обработки IgG фракции сыворотки крови кролика конъюгированным папаином (Pierce, США), последующим удалением отщеплённых фрагментов Fc антител с помощью сорбции на протеин А- сефарозе (Sigma, США) и устранением конъюгированного папаина центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 20 мин. Полученная надосадочная фракция (препарат антител Fab2) имела электрофоретическую чистоту 90% и более в расчёте на содержание Fab2 фрагмента с м.м. ~25 кД в геле и сохраняла противовирусную активность в тесте торможения агглютинации эритроцитов человека группы О (РТГА).

2) Аэрозольный состав А готовили на растворе ФБ/3 смешиванием препарата Fab2 (производное антител класса IgG) с апротинином (в конечных концентрациях 0,05 мкг/мл), рибавирином (0,001 мкг/мл) и распыляли с помощью устройства Респимат.

3) Фармакологическое действие на размножение вируса A/Aichi/2/68 (H3N2) определяли в тесте ингибирования образования инфекционных фокусов вируса, как описано в примере 3. Обозначения: «+» - ингибирование образования вирусных фокусов не более 30 (+), 70 (++) , или более 70% (+++), соответственно, в культуре клеток кишечника человека (линия Сасо-2); «-» – отсутствие вирус ингибирующего эффекта в контрольном аэрозольном конденсате при распылении буфера ФБ/3 без активных веществ (количество фокусов принимали за 100%).

4) Фармакологическое действие аэрозольного состава по ингибированию гидролитической активности протеаз, как описано в примере 2. Аэрозольный конденсат тестировали методом ингибирования гидролитического расщепления хромогенного субстрата L-ZAPA (Z-Arg-pNA) трипсином, которое регистрируется по нарастанию окрашивания инкубационной смеси в случае отсутствия активных ингибиторов протеаз в аэрозольном составе. Оценку окрашивания реакции проводят на флюориметре при длине волны 405 нм (ОП/405). Обозначения: «++» - снижение окрашивания в пробе более 20% относительно реакции в контрольной пробе с трипсином; «+» - снижение окрашивания в пробе более 20% относительно реакции в контрольной пробе с трипсином; «+/-» - снижение окрашивания в пробе не более 15% относительно реакции в контрольной пробе с трипсином; «-» - окрашивание в контрольной пробе с трипсином без ингибиторов (интенсивность окрашивания принимали за 100%).

5) Определение активного вещества рибавирина в аэрозольном конденсате определяли спектрофотометрическим методом. С этой целью готовили разведения конденсата и определяли концентрации рибавирина по интенсивности характерного для рибавирина поглощения ультрафиолетового спектра излучения при длине волны 206 нм (оптическая плотность - ОП/206). «+» - наличие характерного пика поглощения при специфической длине волны (206 нм); «-» - отсутствие характерного пика поглощения при специфической длине волны (206 нм).

Панель Б.

6) Аэрозольный состав Б1 готовили на растворе ФБ/3 смешиванием препарата Fab2 (производное антител класса IgG) с леупептином (конечные концентрации 0,01 мкг/мл) рибавирином (0,003 мкг/мл) и проводили аэрозольное распыление с помощью устройства эжекторного типа «Бореаль».

7) Аэрозольный состав Б2 готовили на растворе ФБ/3 смешиванием препарата Fab2 (производное антител класса IgG) с леупептином (конечные концентрации 0,002 мкг/мл) рибавирином (0,001 мкг/мл) и распыляли с помощью устройства эжекторного типа «Бореаль». Результаты, представленные в таблице 14, показывают сохранение полного спектра фармакологических свойств и усиление противовирусного фармакологического эффекта комбинированного аэрозольного состава, содержащего ингибиторы протеаз,

противовирусное вещество и производное антител, после его распыления и отсутствие эффекта инактивации активных веществ фармацевтической композиции аэрозоля.

Пример 20

Аэрозольный состав с дополнительным содержанием целевых добавок растительного происхождения.

В таблице №15 представлен пример вариант реализации изобретения с добавлением масла мяты, леупептина, лютеолина, рибавирина, твин-20 с различными концентрациями веществ в комбинированном аэрозольном составе.

Таблица 15.

Фармакологическая активность аэрозольного состава, содержащего ингибитор протеаз, противовирусное вещество, масло мяты и твин-20.

Активные вещества	Фармакологическая активность			
	Анти-протеазная ²⁾	Анти-вирусная ³⁾	Рибавирин ⁴⁾	Органо-лептическая ⁵⁾
1.ЛЕУ+РИБ+МЯТА+ТВИН 20	++	+++	+	++
2.ЛЕУ+РИБ+МЯТА+ТВИН 20	+	+	+	+ / -

1. Аэрозольный состав №1 готовили на растворе ФБ/3, содержащем 0,001% неионного детергента твин-20, смешиванием леупептина (ЛЕУ) (конечная концентрация 0,01 мкг/мл), противовирусного вещества рибавирина (0,003 мкг/мл), масла мяты душистой (0,001%) и распыляли с помощью эжекторного небулайзера Бореаль. Далее собирали конденсат генерированного аэрозоля и тестировали его фармакологические свойства. Аэрозольный состав №2, содержащий 0,0001% неионного детергента твин-20, леупептина (конечная концентрация 0,001 мкг/мл), противовирусного вещества рибавирина (0,001 мкг/мл), масла мяты душистой (0,0001%) и распыляли с помощью небулайзера Бореаль.

2. Фармакологическое действие аэрозольного состава по ингибированию гидролитической активности протеаз. Аэрозольный конденсат тестировали методом ингибирования гидролитического расщепления хромогенного субстрата L-ZAPA (Z-Arg-pNA) трипсином, которое регистрируется по нарастанию окрашивания инкубационной смеси в случае отсутствия активных ингибиторов протеаз в аэрозольном составе. Оценку окрашивания реакции проводят на флюориметре при длине волны 405 нм (ОП/405). Обозначения: «++» - снижение окрашивания в пробе более 20% относительно реакции в контрольной пробе с трипсином; «+» - снижение окрашивания в пробе не более 20% относительно реакции в контрольной пробе с трипсином; «-» - окрашивание в контрольной пробе с трипсином без ингибиторов (интенсивность окрашивания принимали за 100%).

3. Фармакологическое действие конденсата аэрозольного состава на размножение вируса определяли в тесте ингибирования образования инфекционных фокусов вируса, как описано

в примере 3. Обозначения: «+++» - ингибирование образования более 80% вирусных фокусов в культуре клеток кишечника человека (линия Сасо-2) ; «++» - ингибирование образования вирусных фокусов в пределах 20-80%; «+» - ингибирование образования не более 20% вирусных фокусов в культуре клеток кишечника человека (линия Сасо-2) («-») – отсутствие вирус ингибирующего эффекта в контрольном аэрозольном конденсате при распылении буфера ФБ/3 без активных веществ.

4. Определение концентрации рибавирина в аэрозольном конденсате. Определение рибавирина осуществляли спектрофотометрическим измерением при длине волны 206 нм на спектрофотометре LKB ULTROSPEC Model II.

5. Тестирование органолептических свойств аэрозольного конденсата по запаху мяты. Обозначение: (++) – отчётливый насыщенный запах мяты; (+) – явный, но слабый запах мяты; (-) - отсутствие уловимого запаха мяты.

Результаты, представленные в таблице 15, показывают сохранение полного профиля фармакологических свойств комбинированного аэрозольного состава после его распыления и отсутствие инактивации активных веществ фармацевтической композиции аэрозоля.

Пример 21

Фармакологические свойства комбинированного аэрозольного состава на водной основе при высоких концентрациях активных веществ

Таблица 16.

Фармакологические свойства комбинированного аэрозольного состава на водной основе при высоких концентрациях активных веществ

[А].

Активные вещества в аэрозольном составе	Характеристики аэрозоля		
	Антипротеазная активность ^{*)}	Количество вещества в аэрозоле ^{**)}	Биологическая активность ^{***)}
1.АПР+А1АТ	+++	++	++
2.ЛЕУ+РИБ	+++	70-100%	+
3.АПР+ГЕНТА	+++	++	+
4.А1АТ+РИБ+ФАБ	++	70-100%	+++
5. ТРИ+РИБ+ОСТМ	НТ	70-100%	+++

[Б].

Активные вещества в аэрозольном составе	Характеристики аэрозоля		
	Антипротеазная активность ^{*)}	Количество вещества в аэрозоле ^{**)}	Биологическая активность ^{***)}
1.АПР+А1АТ	++	++	++
2.ЛЕУ+РИБ	+++	70–100%	+
3.АПР+ГЕНТА	+++	++	+
4. А1АТ+РИБ+ФАБ	++	70–100%	+++
5. ТРИ+РИБ+ОСТМ	НТ	70–100%	+++

[В].

Активные вещества в аэрозольном составе	Характеристики аэрозоля		
	Антипротеазная активность ^{*)}	Количество вещества в аэрозоле ^{**)}	Биологическая активность ^{***)}
1.АПР+А1АТ	+++	++	++
2.ЛЕУ+РИБ	+++	70–100%	+
3.АПР+ГЕНТА	+++	++	+
4. А1АТ+РИБ+ФАБ	++	70–100%	+++
5. ТРИ+РИБ+ОСТМ	НТ	70–100%	+++

1) Готовили водный раствор активных веществ апротинина (АПР), леупептина (ЛЕУ), альфа 1 антитрипсина (А1АТ), рибавирина (РИБ), осельтамивира (ОСТМ) и гентамицина (ГЕНТА). Тестируемые концентрации активных веществ были близкими к уровню их максимальной растворимости в водных растворах. Приготовленный аэрозольный состав распыляли через небулайзер «мягкое облако» (Респимат), генерируемый аэрозоль собирали методом конденсации и исследовали количество активных веществ и фармакологическую активность результирующего аэрозольного конденсата. Составы готовили на водном растворе ФБ/3 с рН 7,5 (панель А); 4,0; (Б): 9,0 (В). Согласно фармакопеи РФ ОФС 42-0072-07 растворы с рН в диапазоне 4,0 – 9,0 готовили смешиванием в определённых соотношениях фосфатные соли калия и натрия до нужной молярности, так чтобы получить заданный рН, который доводят до нужного рН с помощью хлористоводородной кислоты или натрия гидроксида и доводят объём раствора водой до нужной молярной концентрации.

2) Состав №1 готовили на водном растворе ФБ/3 растворением апротинина (50 мг/мл), альфа1-антитрипсина (30 мг/мл), рибавирина 95 (мг/мл). Количество апротинина и А1АТ определяли методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПАГе), как подробно описано

в примере №2 описания изобретения. В электрофоретической дорожке, окрашенной Кумаси-G350, выявляли белковые компоненты, соответствующие м.м. 6,5 кД (компонент аprotинина), 60 кД (компонент A1AT), 50 кД (Н цепь) и 25 кД (L цепь) антител. Количество вещества в дорожке оценивали сравнением с аналогичным компонентом в исходном аэрозольном составе. (++) – количество в конденсате не менее 80% в исходном составе; (+) – количество в конденсате на уровне 30-80% в исходном составе. Антипротеазную активность конденсата определяли по ингибированию трипсина калориметрическим методом, используя гидролитический субстрат L-ZAPA (Z-Arg-pNA), окрашивание которого при расщеплении регистрируется по нарастанию поглощения анализируемого раствора при длине волны 405 нм (ОП/405), как детально описано в примере №2 описания изобретения. Антипротеазную активность оценивали в следующей шкале: (+++) – трипсин-ингибирующая активность на уровне 80-100 в исходном составе; (++) – 50-80% уровень; (+) – на уровне 20-50% в исходном составе. НТ – обозначает отсутствие тестирования по данному параметру.

3) Состав №2 готовили на водном растворе ФБ/3 растворением леупептина (50 мг/мл), рибавирина (75 мг/мл). Количество леупептина в аэрозольном конденсате определяли тестированием антипротеазной активности по ингибированию трипсина, как описано выше в п.1. Количество рибавирина определяли спектрофотометрическим поглощением при длине волны 206 нм, как описано в примере №2 описания изобретения. Обозначения для определения антипротеазной активности: (+++) – трипсин-ингибирующая активность на уровне 80-100 в исходном составе; (++) – 50-80%, (+) – трипсин-ингибирующая активность на уровне 20-50% в исходном составе. Обозначения для количества рибавирина (**): 70-100 и 30-70% относительно уровня в аэрозольном составе до распыления. Фармакологическое действие на размножение вируса (***) определяли в тесте ингибирования образования инфекционных фокусов вируса, как описано в примере 3 описания изобретения. Обозначения: «+» – ингибирование образования более 50% вирусных фокусов в культуре клеток кишечника человека (линия Сасо-2); («-») – отсутствие вирус ингибирующего эффекта в контрольном аэрозольном конденсате при распылении буфера ФБ/3 без активных веществ.

4) Состав №3 готовили на водном растворе ФБ/3, содержащем смешиванием активных веществ аprotинина (50 мг/мл) и гентамицина (75 мг/мл) и полученный аэрозольный состав распыляли с помощью небулайзера Респимат и с последующим получением конденсата результирующего аэрозоля. Антипротеазную активность (*) и количество аprotинина (**) оценивали, как описано выше в п.1. Фармакологическое действие гентамицина в аэрозольном составе на микробы (***) оценивали по ингибированию роста микроба в жидкой среде, как описано в примере 11 описания изобретения. Обозначения: «+» – полное ингибирование роста микроба в присутствии исследуемого аэрозольного конденсата; «+/-» – частичное ингибирование роста микроба до уровня оптической плотности около 0,3 и менее; («-») – отсутствие ингибирующего эффекта на рост микроба, который достигал уровня оптической плотности 1,0 и более.

5) Состав №4 готовили на водном растворе ФБ/3 растворением трипсина (ТРИ) (50 мг/мл), рибавирина (РИБ) (75 мг/мл), антивирусный ингибитор осельтамивир (ОСТМ) (25 мг/мл) полученный аэрозольный состав распыляли с помощью небулайзера Респимат с

последующим получением конденсата результирующего аэрозоля. Количество трипсина в аэрозольном конденсате (***) определяли методом электрофореза в ПАГе по наличию в дорожке геля характерного компонента с м.м. 27 кД., а фармакологическую активность трипсина оценивали по уровню гидролиза хромогенного субстрата L-ZAPA (Z-Arg-pNA), окрашивание которого при расщеплении регистрируется по поглощению анализируемого конденсата при длине волны 405 нм (ОП/405), как детально описано выше в примере №14. Активность трипсина в конденсате сравнивали с его активностью в исходном аэрозольном составе перед распылением: (+++) – уровень 80-100%; (++) – уровень 50-80%; (+) – уровень ниже 50% в исходном аэрозольном составе. Количество рибавирина определяли спектрофотометрическим поглощением при длине волны 206 нм, как описано в примере №2 описания изобретения. Обозначения для количества рибавирина (**): 70-100 и 30-70% относительно уровня в аэрозольном составе до распыления. Фармакологическую активность рибавирина определяли методом ингибирования формирования вирусных фокусов, как описано в примере 3 описания изобретения.

б) Панель Г (фиг. 14). Структурная стабильность белковых ингибиторов протеаз АПР и А1АТ в комбинированном аэрозольном составе при различных рН: 4,0 (дорожки 1, 2, 7), 7,5 (дорожки 3, 4, 8), 9,0 (дорожки 5, 6, 9) для проб 1, 3 и 4, соответственно, показана на фигуре 14. Для определения структурной формы белка соответствующего ингибитора проводили электрофорез образцов конденсата в ПАГе, как описано в примере №2.

Результаты, представленные в таблице 16 (панели А-Г), показывают сохранение полного комплекса фармакологических свойств комбинированного аэрозольного состава, содержащего высокие концентрации активных веществ, при диапазоне рН 4,0 – 9,0, сохранение фармакологической активности и отсутствие инактивации активных веществ фармацевтической композиции аэрозоля после его распыления. Результаты, представленные на панели Г (фиг. 14) показывают сохранение структуры белков и отсутствие их агрегации при приготовлении и аэрозолировании комбинированного аэрозольного состава.

Пример 22

В данном примере исследовали синергидное фармакологическое действие комбинированного аэрозольного состава для ингибиторов протеаз и веществ иной фармакологической группы при совместном применении в смеси в одном комбинированном аэрозольном составе по предотвращению формирования форм патогена (вируса) резистентного к использованным в составе активным веществам.

Таблица 17

Синергидное действие комбинированного аэрозольного состава по предотвращению формирования резистентных вирусных мутантов.

Вещества ¹⁾	Пассаж №1	Пассаж №5	Пассаж №10
1.АПР	+	+	+
2.РЕМ	+/-	+	+++
3.ОСТВ	+/-	+	++
4.АПАР+РЕМ	-	-	-

5.АПР+ОСТВ	–	–	–
------------	---	---	---

1) Готовили аэрозольный состав на водном растворе ФБ/3. Фармакологическое действие аэрозольного состава исследовали в культуре клеток легкого человека (клеточная линия Calu-3). Клетки заражали вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) со множественностью около 0,001 ФОЕ/клетка и вносили различные композиции аэрозольного конденсата. Через 65 часов после заражения оценивали наличие вируса в культуральной жидкости методом гемагглютинации с эритроцитами человека группы О или методом титрования инфекционных фокусов с помощью окраски клеток антителами с субстратом "True Blue", как описано в примере №2. Культуральную жидкость отбирали и вносили в следующую интактную культуру клеток (пассаж №2) и через 65 часов повторяли перенос среды в новую интактную культуру клеток (пассаж №3) и т.д.

2) Результаты оценивали по общепринятой 4-уровневой шкале. (+) – ГА титр вируса ниже 2 ГАЕ/мл, отсутствие позитивных (окрашенных) на вирусные ант гены клеток; (++) – не более 4 ГАЕ/мл, единичные вирус-позитивные клетки в клеточном монослое; (+++) – титр вируса 4-16 ГАЕ/мл, позитивные на вирус клетки в 50% и более полях зрения; (+++++) – 16-128 ГАЕ/мл титр вируса в культуральной жидкости, скопление позитивных на вирус клеток в 100% полях зрения. ГАЕ – гемагглютинирующая единица обозначает минимальное количество (или разведение) вируса, при котором выявляется отчетливая агглютинация эритроцитов мыши.

Приведённые тестирование показывает, что при одномоментном совместном применении активных веществ х различных фармакологических групп, не происходит формирования и размножения мутантов вируса (синергидный эффект индукции образования резистентного вируса), тогда как при раздельном применении аэрозольного состава с активными веществами устойчивые мутанты образуются и успешно размножаются в чувствительных клеточных культурах, давая высокий урожай вируса (на уровне ++ или +++ по стандартной шкале).

Пример 23

Тестировали сохранение фармакологических и структурных свойств активных веществ белковой природы в комбинированных составах на водной основе с активными веществами иной структурной природы и фармакологической активности.

Таблица 18

Совместимость активных веществ белковой природы в комбинированном аэрозольном составе, приготовленном на водной основе

Смеси активных веществ	АПР		А1АТ		ЛЕУ		АНТ	
	Антипро ^{/2}	Струк ^{/4}	Антипро ^{/2}	Струк ^{/4}	Антипро ^{/2}	Струк ^{/4}	Антивир ^{/3}	Струк ^{/4}
1. РИБ	++	+	++	+	++	+	++	+
2. РЕМ	++	+	++	+	++	+	++	+

3. АНТ	++	+	++	+	++	+	НТ	+
4. СОД	+	+	+	+	+	+	++	+
5. АСК	+	+	+	+	+	+	++	+
6. ИНФ	+	+	++	+	++	+	++	+
7. ОСТВ	++	+	++	+	++	+	++	+
8. КОЛИС ⁽²⁾	++	+	++	+	++	+	++	+
9. ТОБРА ⁽²⁾	++	+	++	+	++	+	++	+
10. ХЕМА	+	+	+	+	++	+	НТ	+
11. КАСПЗ	+	+	++	+	++	+	++	+

(1) Готовили аэрозольные составы на водной основе, содержащем ФБ/3 с pH 7,5. Использовали следующие концентрации активных веществ: рибавирин (РИБ) – 100 мг/мл; ремантадин (РЕМ) - 50 мг/мл; противовирусные антитела (АНТ) – 25 мг/мл; супероксид дисмутаза (СОД) - 15 мг/мл; ацетил салициловая кислота (АСК) – 100 мг/мл; альфа 2 интерферон (ИНФ) -25 мг/мл; осельтамивир карбоксилат (ОСТВ) – 50 мг/мл; колистин (КОЛИС) – 100 мг/мл; тобрамицин (ТОБРА) – 50 мг/мл; хемаза (ХЕМ) - 30 мг/мл; каспаза 3 (КАСПЗ) – 10 мг/мл; апротинин (АПР) – 50 мг/мл; альфа 1 антитрипсин (А1АТ) – 75 мг/мл; леупептин (ЛЕУ) – 50 мг/мл; антитела против вируса гриппа А (АНТ) - 15 мг/мл. Полученные аэрозольные композиции распыляли с помощью небулайзера Респимат и собирали конденсат генерированного аэрозоля, который тестировали на наличие фармакологической активности и сохранение структурных свойств использованных активных веществ.

(2) Антипротеазную активность определяли методом ингибирования трипсина, используя хромогенный субстрат, как описано в примере 2. Знаком (++) обозначено наличие в пробе ингибирования гидролитической активности трипсина более, чем на 80% относительно контрольной пробы стандартного трипсина без ингибитора. Знаком (+) обозначены пробы с активностью 40-85% относительно контрольной пробы трипсина. В пробах №8 и №9 с антибиотиками тестировали антибактериальную активность, которая составляла 80-100% от исходного уровня до аэрозолирования.

(3) Антивирусную активность антител определяли в культуре клеток Сасо-2 с вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2), как описано в примере 13.

(4) Структурную стабильность белковых молекул активных веществ в исследуемых комбинированных аэрозольных составах оценивали методом электрофореза в ПАГе, как описано в примере 21. Результаты показаны на фиг. 15.

Результаты, представленные в таблице 18, показывают сохранение профиля фармакологических свойств комбинированного аэрозольного состава, содержащего высокие концентрации активных веществ, а также сохранение фармакологической активности и отсутствие инактивации активных веществ фармацевтической композиции аэрозоля после его распыления. Результаты, представленные на панели Г (фиг. 15) показывают сохранение структуры белков и отсутствие их агрегации при приготовлении и аэрозолировании комбинированного аэрозольного состава.

Пример 24

Тестировали сохранение фармакологических свойств вирусов в водном аэрозольном составе с различными ингибиторами протеаз.

Таблица №19

Сохранение активности вирусов в комбинированном аэрозольном составе с ингибиторами протеаз.

Вирусы ⁽¹⁾	АПР		ЛЕУ		А1АТ		КАМО	
	Инф	Антипро	Инф	Антипро	Инф	Антипро	Инф	Антипро
НДВ	+	+	+	+	+	+	+	+
ЭМК	+	+	+	+	+	+	+	+
ВЭЛ	+	+	+	+	+	+	+	+
KB92	+	+	+	+	+	+	+	+
Грипп	+	+	+	+	+	+	+	+

(1) Готовили комбинированные аэрозольные составы на основе ингибиторов протеаз (апротинин, А1АТ, леупептин, камостад) и вирусов различных семейств. В качестве вирусов использовали ортомиксо- (штамм A/Aichi/2/68 –H3N2), парамиксо- (вирус болезни Ньюкасла – ВБН), пикорна- (вирус энцефаломиокардита мышей), тога- (вирус венесуэльского миелита лошадей – ВЭЛ290) и коронавирусы (штамм KB92). Аэрозольные составы готовили на водном растворе ВБ/3 с концентрацией ингибиторов протеаз 5 мг/мл и содержанием вирусов 10⁵ – 10⁶ фокус образующих единиц вируса (ФОЕ) на мл состава и полученные составы аэрозолировали в небулайзере Респимат, генерируемый аэрозоль собирали и исследовали его фармакологические свойства.

(2) Антипротеазную активность (АНТИПРО) аэрозольных конденсатов тестировали методом подавления активности трипсина, с хромогенным субстратом, как описано в примере 2. Знаком (+) показано сохранение антипротеазной (трипсин ингибирующей) активности состава на уровне 75-95% от исходного уровня раствора соответствующего ингибитора перед смешиванием с вирусами перед аэрозолированием (контрольная проба).

(3) Сохранение инфекционной активности вирусов (ИНФ) определяли методом титрования цитотоксической активности вирусов в культуре клеток VERO (линия клеток почки обезьяны). Знаком «+» показано сохранение инфекционной активности вируса в аэрозольном конденсате на уровне 40-90% от начального уровня инфекционной активности вируса в исходном аэрозольном составе перед аэрозолированием.

Проведенное тестирование аэрозольных составов ингибиторов протеаз с вирусами различных семейств показало отсутствие инактивации фармакологической активности, как

ингибиторов протеаз, так и инфекционных свойств вирусов. Аналогичные результаты получены с поксвирусами и аденовирусами.

Краткое описание фигур (рисунков).

Фиг.1. Содержание рибавирина в конденсате генерированного аэрозоля. Аэрозольный составы, приготовленные согласно прописи в таблице 1, распыляли и получали растворы соответствующих аэрозольных конденсатов. Далее готовили разведения конденсата и определяли концентрации рибавирина по интенсивности характерного для рибавирина поглощения ультрафиолетового спектра излучения при длине волны 206 нм (ОП/206). Стрелкам показано положение на кривой значений для аэрозольных составов, указанных в таблице 2 составом с концентрацией рибавирина: 20, 150 и 250 мкг/мл. Калибровочная кривая построена на основании значений растворов с известной концентрацией рибавирина.

Фиг.2. Содержание аprotинина в конденсате генерированного аэрозоля. Полученные образцы аэрозольного конденсата, как указано в таблице 2, анализировали в полиакриламидном геле (ПАГе). Из собранных порций аэрозольного состава отбирают аликвоты (~15 мкл), которые смешивают с 5 мкл диссоциирующего раствора, содержащего 5% додецилсульфата натрия (ДСН) и 200 мкМ дитиотреитола (ДТТ), нагревают в течение 10 мин при 700 С и наносят на гель. Фокусирующий и разделительный гели готовили в буферной системе по методу Laemmli (1970). Электрофорез проводят при 70V на пластину ПАГ шириной 8 см в течение 2 часов. 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 при комнатной температуре. Не связавшуюся краску отмывают из геля в смеси вода: этанол: уксусная кислота в соотношении 88: 5: 7, соответственно. Для сравнения в качестве стандартного образца аprotинина используют коммерческий препарат очищенного аprotинина, выделенного из легких крупного рогатого скота (фирма Sigma, США). Стрелками показано положение аprotинина в геле, что соответствует полипептиду с молекулярной массой (м.м.) 6,5 кДа.

Эти данные показывают, что аprotинин не изменял свои структурные свойства при распылении аэрозоля из аэрозольного состава. В образцах аэрозольного конденсата не обнаружено белковых агрегатов в высокомолекулярной зоне (ВМЗ) с м.м. массой 120-275 кДа, что указывало на отсутствие агрегатов и денатурации аprotинина в процессе смешивания и распыления аэрозольных составов. Дорожки №2, №2, №3 – образцы согласно таблице 2. Дорожка №4 – маркерные белки определенной молекулярной массы.

Фиг. 3. Подавление трипсина ингибитором протеаз после генерирования аэрозоля. Готовили стандартный раствор трипсина, который смешивали с аэрозольным конденсатом и инкубировали в течении часа при комнатной температуре. Исследовали конденсаты, полученные из свежесготовленных аэрозольных составов и из составов, хранившихся 5 лет при температуре +10 град. С. После инкубации смеси конденсата с трипсином определяли остаточную активность трипсина методом торможения гидролитического расщепления хромогенного субстрата L-ZAPA (Z-Arg-pNA), ведущего к образованию нитроанилида (NA), дающего желтое окрашивание, которое регистрируется при длине волны 405 нм (ОП/405). Для тестирования в исследуемую смесь вносят субстрат L-ZAPA (25 мкл

раствора с концентрацией 1 мг/мл), инкубируют 15 мин при 20 град. С, гидролитическую реакцию останавливают добавлением 25 мкл 1М раствора соляной кислоты и измеряют величину ОП/405, которая показывает уровень остаточного активного (не ингибированного) трипсина (Фиг. 3).

Аэрозольные составы ингибиторов протеаз готовили на буфере ФБ/3, содержащем 1% глицерина и следующие ингибиторы протеаз: апротинин (20 мкг/мл), камостад (0,5 мкг/мл), леупептин (2 мкг/мл), смесь трёх перечисленных ингибиторов с теми же концентрациями, соответственно пробы 2-5 по оси абсцисс. По оси ординат откладывали активность трипсина, которую выражали в оптических единицах поглощения при ОП/405, при этом величину ОП/405 контрольной пробы с трипсином без аэрозольного конденсата (столбик №1) принимали за 100%. Как показано на фиг.3, исследуемые пробы аэрозольного конденсата и их разведения в 10 раз полностью ингибировали активность трипсина. Таким образом, это тестирование показывает, что ингибитор протеаз остается стабильным в аэрозольном составе и устойчиво сохраняет антипротеазную активность на исходном уровне в процессе хранения. Сохранение антипротеазной активности состав наблюдалось, по крайней мере, в течение 5 лет.

Фиг. 4. Ингибирование размножения вируса гриппа комбинированным аэрозольным составом после генерирования аэрозоля.

Для тестирования фармакологической активности аэрозоля ингибиторов протеаз и их комбинаций с веществами иного механизма действия использовали метод подавления вирусных инфекционных фокусов в культуре клеток млекопитающих, формирующихся под действием патогенных для человека вирусов гриппа. Вирус гриппа формировал цитолитические инфекционные фокусы в культуре клеток кишечника человека (линия СаСо-2), формирование которых подавлялось исследуемыми аэрозольными составами после их аэрозольного распыления. Данные такого тестирования приведены на фиг. 4.

Аэрозольные составы ингибиторов протеаз (апротинин и леупептин) в комбинации с противовирусными веществами, а именно: фавипиравиром, рибавирином, ацетил салициловой кислотой, осельтамивиром готовили на фосфатном буферном растворе ФБ/3. Далее производили распыление в устройстве эжекторного типа «Бореаль», собирали и осаждали аэрозольный конденсат, который добавляли в клеточную питательную среду и вносили равную дозу вируса гриппа человека А/Аичи/2/68 (H3N2). Через 15-17 часов после инкубации при 37 град. С клеточную культуру фиксировали 4%-ым раствором параформальдегида и вирусные фокусы окрашивали с помощью специфических противовирусных антител (субтип анти-Н3) и пероксидазных конъюгатов, используя в качестве хромогенного субстрата препарат "True Blue". Результаты, представленные на фиг. 4, показывают количество инфицированных вирусом клеток и отражают снижение их количества, которое формировалось под действием аэрозольных составов.

Окрашенные с помощью противовирусных антител клеточные культуры фотографировали в световом микроскопе под увеличением х80. Лунка 1 – показывают клеточные пробы, инкубированные без конденсата (состав №7), 2 – лунка с 30 мкл конденсата, полученного

распылением из устройства (состав №2), 3 – лунка с 30 мкл конденсата аэрозольного состава, хранившегося 5 лет (состав №2), соответственно.

Фиг. 5. Ингибирование размножения коронавируса конденсатом аэрозольного состава после генерирования аэрозоля. Для тестирования фармакологической активности аэрозоля ингибиторов протеаз и их комбинаций с веществами иного механизма действия использовали метод подавления вирусных инфекционных фокусов в культуре клеток млекопитающих, формирующихся под действием патогенных коронавирусов крупного рогатого скота. Коронавирус штамм KD92 формировал цитолитические инфекционные фокусы в культуре клеток почки быка (линия MDBK), формирование которых подавлялось исследуемыми аэрозольными составами после их аэрозольного распыления. Данные такого тестирования приведены на фиг. 5.

Аэрозольные составы ингибиторов протеаз (апротинин и леупептин) в комбинации с противовирусными веществами, а именно: фавипиравиром, рибавирином готовили на фосфатном буферном растворе ФБ/3, содержащем 0,05% ДМСО. Далее производили распыление в устройстве мягкого облака Респимат, собирали и осаждали аэрозольный конденсат, который добавляли в клеточную питательную среду и вносили начальную дозу коронавируса (штамм KD92), равную 0,001 ФОЕ на клетку, и инкубировали при 36,5 град С в СО₂-атмосферном инкубаторе. Через 48-72 часов после инкубации определяли противовирусную фармакологическую активность при 37 град. С клеточную культуру фиксировали 4%-ым раствором параформальдегида и вирусные фокусы окрашивали с помощью специфических противовирусных антител и пероксидазных конъюгатов, используя в качестве хромогенного субстрата препарат “True Blue”. Результаты показаны на фиг. 5. Результаты показывают количество инфицированных вирусом клеток и отражало уровень вирусного поражения, снижение которых формировалось под действием аэрозольных составов.

Конденсаты исследуемых аэрозолей вносили в культуру клеток почки быка, инфицированных коронавирусом, и инкубировали в течение 50-70 часов при 36 град С. Клеточные культуры окрашивали противовирусными антителами, указывающими на наличие инфицированных клеток в клеточном монослое. Количество и размер окрашенных зон показывает интенсивность развития коронавируса в клеточной пробе. Пробы: (1) – контрольная инфицированная культура с конденсатом плацебо (состав №7); (2) клеточная культура с конденсатом аэрозольного состава №6; (3) – клеточная культура с конденсатом аэрозольного состава №1; (4) - культура клеток с конденсатом аэрозольного состава №5. Результат показывает существенное усиление фармакологического вирус ингибирующего действия комбинации ингибитора протеаз и противовирусного вещества.

Фиг. 6. Определение концентрации фавипиравира в конденсате аэрозольного состава. Калибровочная кривая построена по поглощению раствора фавипиравира с известной концентрацией по поглощению при длине волны 206 нм (спектр поглощения характерный для вещества фавипиравира). Стрелками показаны образцы аэрозольного конденсата полученное после генерирования аэрозоля составов №1, №2 и №3, представленных в таблице 3, соответственно. По оси абсцисс показаны величины поглощения при длине волны 325 нм, по оси ординат отложены Lg концентрации фавипиравира в растворе. Оптическую

плотность (ОП) измеряли на спектрофотометре ULTRASPEC II model 4050 при максимальной длине поглощения 325 нм.

Фиг. 7. Торможение размножения коронавируса комбинированным аэрозольным составом. Аэрозольные составы ингибитора протеаз (леупептин) в комбинации с антивирусным веществом (фавипиравир) готовили на фосфатном буферном растворе ФБ/3. Далее производили распыление в устройстве эжекторного типа «Бореаль, модель F4000», собирали и осаждали аэрозольный конденсат, который добавляли в клеточную питательную среду и вносили коронавирус KB92 в дозе около 30 ФОЕ на одну лунку, содержащую около 105 клеток MDBK. Через 65 часов после инкубации при 37 град. в культуральной жидкости клеток определяли количество накопившегося вируса методом гемагглютинации мышиных эритроцитов. Полученные результаты показывают, что в присутствии аэрозольного конденсата заметно (в 5 и более раз) снижается размножение и накопление вируса. Методом световой микроскопии клеточного монослоя регистрировали практически 100% гибель в контрольных клетках без аэрозольного конденсата, частичную гибель в пробах с аэрозольным составом леупептина и фавипиравира. В клетках с комбинированным составом леупептина и фавипиравира отмечалось заметное снижение гибели клеток. Проведенные исследования показали, что комбинированный аэрозольный состав фавипиравира (антивирусного вещества) и леупептина (ингибитора протеаз) сохранял фармакологические свойства активных веществ после аэрозольной генерации состава.

Фиг. 8. Фармакологическое действие ингибиторов протеаз в комбинации с антивирусными веществами против коронавируса. Аэрозольные составы готовили на ФБ/3 с концентрациями активных веществ: апротинин (50 мкг/мл), рибавирин (20 мкг/мл), фавипиравир (65 мкг/мл), леупептин (15 мкг/мл). По оси абсцисс показаны номера проб аэрозольного состава, содержащего: (1) – контрольный аэрозольный состав без активных веществ; (2) – апротинин; (3) – рибавирин; (4) – фавипиравир; (5) – апротинин + рибавирин; (6) – апротинин + фавипиравир; (7) – леупептин; (8) – леупептин + рибавирин; (9) – леупептин + фавипиравир. По оси ординат отложены двоичный логарифм разведения исследуемой культуральной, в которой наблюдалась вирус-индуцированная гемагглютинация эритроцитов.

Представленные данные показывают сохранение фармакологических свойств ингибиторов протеаз и их комбинаций с антивирусными веществами различного механизма действия после аэрозольного распыления. Приведённый пример дополнительно показывает усиление фармакологического противовирусного эффекта комбинированного аэрозольного состава, содержащего ингибиторы протеаз и антивирусное вещество, по сравнению с применением индивидуального фармакологического вещества.

Фиг. 9. Белковый профиль используемого в аэрозольном составе слабо инфекционного вируса гриппа A/Aichi/2/68. Дорожка 1 – исходный вирус гриппа, выращенный в культуре клеток МДСК и содержащий нерасщепленный гемагглютинин HA0 (м.м. 75 кДа). вирус гриппа; 2 – вирус гриппа после инкубации аэрозольного конденсата, содержащего вирус и апротинин, с клетками Calu-3, содержит нерасщеплённый HA0; 3 – вирус гриппа в аэрозольном составе, содержащем трипсин, содержит расщеплённый HA1 (м.м. 55 кДа); (4) –

вирус гриппа в аэрозольном конденсате без апротинина после контакта с клетками Calu-3 содержит расщеплённый HA1 (м.м. 55 кДа).

Фиг. 10. Сохранение фармакологической активности ингибитора протеаз и протеазы после распыления смешанного аэрозольного состава с данными активными веществами. Для определения сохранения активности ингибитора протеаз в аэрозольном конденсате смешивали конденсат и раствор активной каспазы 3, инкубировали 20 мин при 30 град С и определяли интенсивность поглощения при длине волны 405 нм. Для определения сохранения активности трипсина после его аэрозольного распыления комбинированного состава конденсат смешивали с субстратом БАПНА, инкубировали 20 мин при 30 град С и определяли интенсивность окрашивания раствора при 405 нм. Панель А: (1) – контрольный раствор исходной активной протеазы; (2) раствор трипсина с конденсатом исследуемого конденсата; (3) – раствор субстрата без протеазы (негативный контроль). (4) – конденсат, полученный из аэрозольного состава трипсина без ингибитора каспазы. Панель Б: (1) – контрольный раствор исходной активной каспазы 3 (положительный контроль); (2) раствор каспазы 3 с исследуемым конденсатом; (3) – раствор субстрата без конденсата и без протеазы (негативный контроль). (4) – конденсат, полученный из аэрозольного состава ингибитора каспазы без трипсина.

Полученные результаты показывают сохранение фармакологической активности как ингибитора протеазы, так и протеазы иной специфичности при распылении их комбинированного аэрозольного состава.

Фиг. 11. Фармакологическое действие аэрозоля антител на клетки-мишени, инфицированные вирусом гриппа. В культуру прикрепленных клеток МДСК вносили вирус гриппа A/Aichi/2/68, инкубировали в присутствии исследуемых аэрозольных конденсатов и далее окрашивали для выявления клеток, инфицированных вирусом. Цифрами показаны пробы: (1) – контрольные клетки, инфицированные вирусом и инкубированные без аэрозольного конденсата; (2) – клетки с вирусом гриппа, инкубированные с аэрозольным конденсатом, содержащим ингибиторы протеаз апротинин, леупептин и противовирусные антитела.

Как показано на фиг. 11, в пробе с ингибиторами протеаз и антителами практически полностью отсутствуют признаки инфекции вирусом. Этот пример демонстрирует сохранение фармакологических свойств антител против вируса после его образования из комбинированного аэрозольного состава с ингибиторами протеаз и глицерина.

Фиг. 12. Фармакологическое действие аэрозольного состава с интерфероном на клетки-мишени, инфицированные вирусом гриппа. В культуру прикрепленных клеток человека Calu-3 вносили конденсат аэрозольного состава с рекомбинантным интерфероном альфа-2в и ингибитором протеаз (апротинином), дополнительно для заражения клеток вносили вирус гриппа A/PR/8/34 и инкубировали 10 часов для развития инфекции. Затем клетки фиксировали и окрашивали для выявления клеток, инфицированных вирусом. Цифрами показаны пробы: (1) – контрольные клетки, инфицированные вирусом и инкубированные без аэрозольного конденсата; (2) – клетки с вирусом гриппа, инкубированные в присутствии

конденсата с ингибитором протеаз апротинина; (3) – клетки, инкубированные с аэрозольным конденсатом, содержащим ингибитор протеаз и интерферон.

Как демонстрирует на фиг. 12, в пробе с интерфероном значительно снижены признаки инфекции вирусом и количество инфекционных фокусов. Этот пример демонстрирует сохранение фармакологических свойств интерферона по подавлению размножения вируса после его аэрозолирования из комбинированного аэрозольного состава с ингибиторами протеаз и глицерина.

Фиг. 13. Профиль дисперсности аэрозоля. По оси ординат показано содержание (%) фракции в аэрозольном облаке. По оси абсцисс цифрами показаны диапазоны диаметра частиц в аэрозольном облаке: 1 - (0,1-10 мкм); 2 – (10-50 мкм); 3 – (50-100 мкм); 4 – (100-240 мкм) ; 5 – (> 250 мкм).

Фиг. 14 (Пример 21; панель Г). Белковый профиль активных веществ в аэрозольном составе при различных рН. На электрофореграмме показаны результаты исследования образцов ингибиторов протеаз АПР и А1АТ в комбинированном аэрозольном составе при различных рН: 4,0 (дорожки 1, 2, 7), 7,5 (дорожки 3, 4, 8), 9,0 (дорожки 5, 6, 9) для проб, указанных в таблице 16 под номерами 1, 3 и 4, соответственно. Для определения структурной формы белка соответствующего ингибитора проводили электрофорез образцов конденсата в ПАГе, как описано в примере №2. Стрелками показано положение белка в геле с указанием величины мол. веса исследуемого активного вещества: апротинин (~6,5 кДа), А1АТ (~60 кДа), который определяли относительно электрофоретической подвижности в геле маркерных белков. Дорожка «к» (контроль) показывает нативную форму соответствующего белка в аэрозольном составе до аэрозолирования. Верхняя часть геля (старт, показано стрелкой справа от геля) свободна от белков, что доказывает отсутствие агрегации активных веществ в указанных композициях комбинированного аэрозольного состав.

Фиг. 15 (пример 23). Сохранение белковой структуры активных веществ в комбинированных аэрозольных составах. На электрофореграмме показаны результаты исследования образцов ингибиторов протеаз апротинина (АПР), альфа 1 антитрипсина (А1АТ), антител (АТ) в комбинированных аэрозольных составах, приготовленных согласно композиции в таблице 18. Для определения структурной формы белка соответствующего ингибитора проводили электрофорез образцов конденсата в ПАГе, как описано в примере №2. Стрелками показано положение белка в геле с указанием величины молекулярной массы (м.м.) исследуемого активного вещества: апротинин (~6,5 кДа), А1АТ (~60 кДа), антитела (лёгкая цепь “L” с м.м. 25 кДа; тяжёлая цепь “H” с м.м. 50 кДа), который определяли относительно электрофоретической подвижности в геле маркерных белков. Дорожка «к» (контроль) показывает нативную форму соответствующего белка в аэрозольном составе до аэрозолирования. Номера дорожек в геле соответствуют номерам образцов, указанных в первой колонке слева в таблице 18. Как видно на фигуре, верхняя часть геля (старт) свободна от белков, что доказывает отсутствие агрегации активных веществ в указанных композициях комбинированного аэрозольного состав.

Источники литературы.

1. Терехова Е.П. 2014. Ингаляционные устройства, применяемые для лечения бронхиальной астмы. Практическая Пульмонология. № 4, стр. 45-52.
2. Терехова 2013 Современные ингаляционные устройства, применяемые для лечения бронхиальной астмы (лекции для врачей). Эффективная фармакотерапия 2013, т.39 (№3), стр. 24-39.
3. 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.
4. Мещерякова Н.Н. 2006. Модулит – новая технология в дозированных аэрозольных ингаляторах. Ингаляционная терапия. Атмосфера. Пульмонология и аллергология. №2, 40-42.
5. Black D.L., McQuay M.Q., M.P.Bonin. 1996. Laser-based techniques for particle-size measurement: A review of sizing methods and their industrial applications. Progress in Energy and Combustion Science. Vol. 22 (3), pages 267-306.
6. Патент ЕАПО №034991. «Фармацевтический аэрозольный состав ингибитора протеаз».
7. Патент РФ №2657523. «Фармацевтический аэрозольный состав ингибиторов протеаз с озон-сберегающим пропеллентом и его получение».
8. Патент РФ №2711080. «Комбинированный аэрозольный состав на основе ингибиторов протеаз и его получение».
9. George M. Rusch (2018) The development of environmentally acceptable fluorocarbons, Critical Reviews in Toxicology, 48:8, 615-665, DOI: 10.1080/10408444.2018.1504276
10. Laemmli U. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227, 680–685 (1970). <https://doi.org/10.1038/227680a0>

Автор изобретения: О.П.Жирнов,
чл.-корр. РАН,
профессор, доктор медицинских наук



Коды классификации: А61 К009/08; А61 К009/12; А61 К009/38; А61 Р031/04; А61 Р031/12; А61 Р031/14; А61 Р031/16; А61 Р031/22; А61 Р037/08.

О.П.Жирнов

**Комбинированный фармацевтический аэрозольный состав ингибиторов
протеаз на водной основе и его применение**

Формула

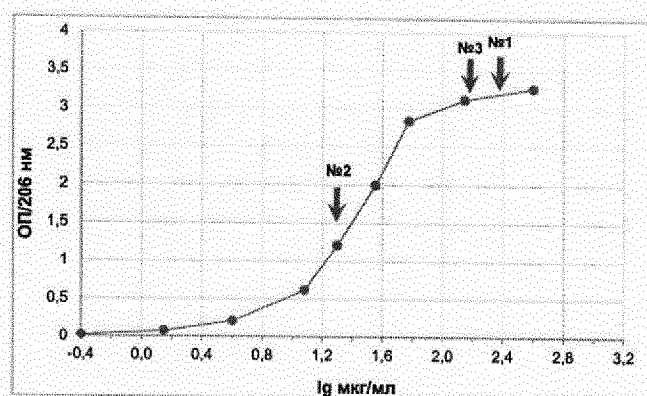
1. Комбинированный фармацевтический аэрозольный состав поливалентного действия на основе ингибиторов протеаз для использования в устройствах с аэрозольным распылением непропеллентного типа, отличающийся тем, что содержит водный раствор ингибиторов протеаз или их комбинаций с концентрацией активных веществ в терапевтически эффективном количестве 0,001 мкг – 100 мг на мл состава в диапазоне рН 4,0 – 9,0, который дополнительно содержит одно и более активных веществ с иным механизмом фармакологического или патогенетического действия или их комбинации, выбранные из группы гидролитических ферментов трипсин, гиалуронидаза, хемаза, каспаза, противовирусных веществ, выбранных из группы ремантадин, осельтамивир, рибавирин, фавипиравир, противовирусные антитела, противомикробных веществ, выбранных из группы тобрамицин, колистин, гентамицин, тетрациклин, противовоспалительных веществ, выбранных из группы ацетилсалициловая кислота, интерферон, антитела против цитокинов, супероксиддисмутаза, вирусных средств или их субвирусных компонентов, выбранных из группы ортомиксо-, парамиксо-, пикорна-, ортопокс-, адено-, тогавирусов, в конечной концентрации 0,001 мкг – 100 мг на мл состава, предназначенный для генерирования аэрозоля с дисперсностью аэрозольных частиц 0,1 – 300 мкм для поливалентного фармакологического воздействия на организм.
2. Состав по п.1 отличается тем, что содержит ингибиторы протеаз различной специфичности и механизма действия, преимущественно альфа 1-антитрипсин, апротинин, леупептин, камостад, фамотидин, эpsilon-аминокапроновую кислоту, тканевой ингибитор Куница, ингибитор ангиотензин-превращающего фермента, тканевой ингибитор металлопротеаз, или их производные.
3. Состав по п.1 отличается тем, что водный раствор активного вещества содержит поверхностно активные соразтворители в терапевтически приемлемых количествах, преимущественно твин-20, твин-80, спан-20, спан-80, бета-октилглюкозид,

диметилсульфоксид, глицерин, этанол, полиэтилен гликоль, бензалкониум, в концентрации 0,0001% и более.

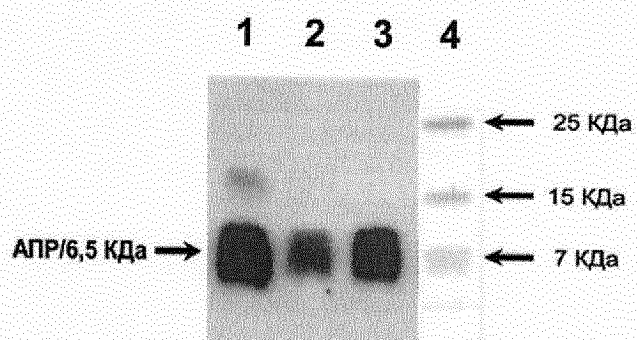
4. Состав по п.1 отличается тем, что содержит солевой буферный раствор с диапазоном рН 4,0 – 9,0, преимущественно хлорид натрия, одно- и двузамещенные натриевые-калиевые соли фосфорной, салициловой, уксусной кислоты, в терапевтически приемлемой концентрации 0,1 мкМ и более.
5. Состав по п.1, отличающийся тем, что содержит добавки растительного происхождения и растительных экстрактов, преимущественно масло мяты, настой мелисы, настой термопсиса, экстракт душицы, лютеолин, дигидрокверцетин в терапевтически приемлемой концентрации 0, 0001% по объему и более.
6. Аэрозоль по п.1, отличающийся тем, что используется в терапевтически эффективном количестве для воздействия на патологический очаг с нарушенным протеазо-ингибиторным балансом при лечении и профилактике расстройств и повреждений с преимущественной локализацией в респираторном тракте, кишечнике, коже, органах зрения, мозге.

* * *

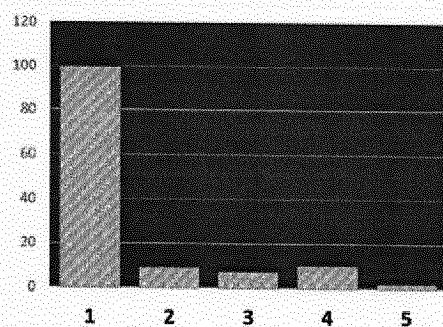




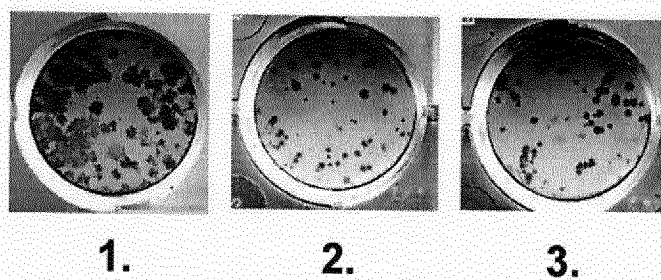
Фиг.1. Содержание рибавирина в конденсате генерированного аэрозоля.



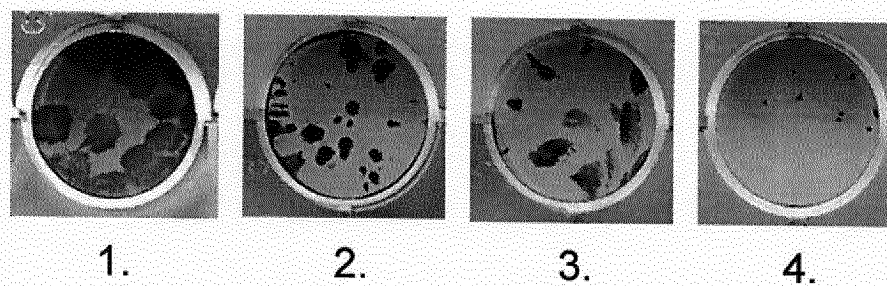
Фиг.2. Содержание апротинина в конденсате генерированного аэрозоля.



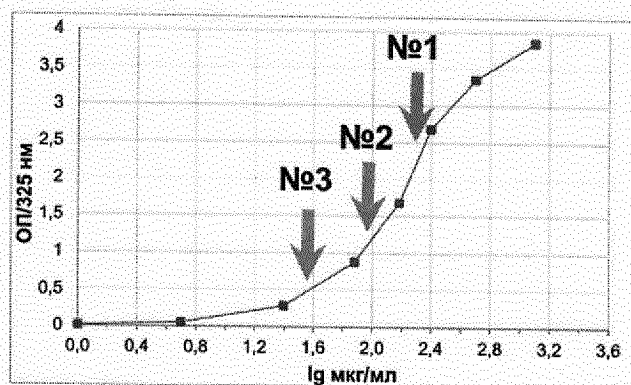
Фиг. 3. Подавление трипсина ингибитором протеаз после генерирования аэрозоля.



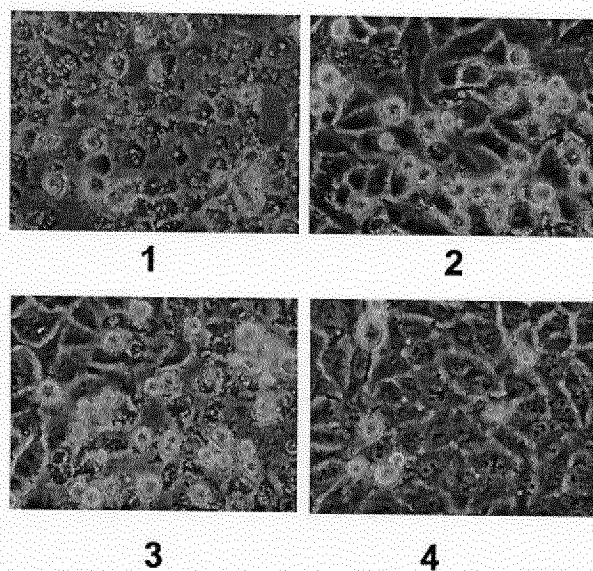
Фиг. 4. Ингибирование размножения вируса гриппа комбинированным аэрозольным составом после генерирования аэрозоля.



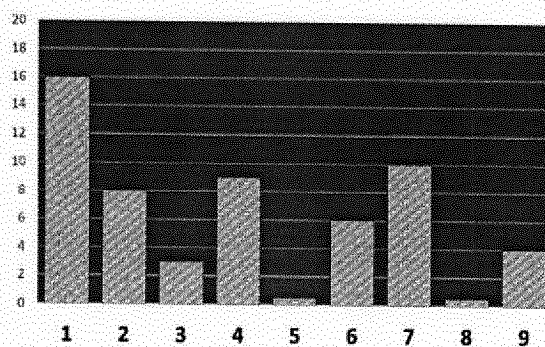
Фиг. 5. Ингибирование размножения коронавируса конденсатом аэрозольного состава после генерирования аэрозоля.



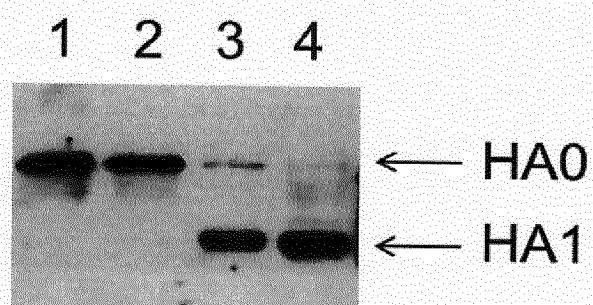
Фиг. 6. Определение концентрации фавипиравира в конденсате аэрозольного состава.



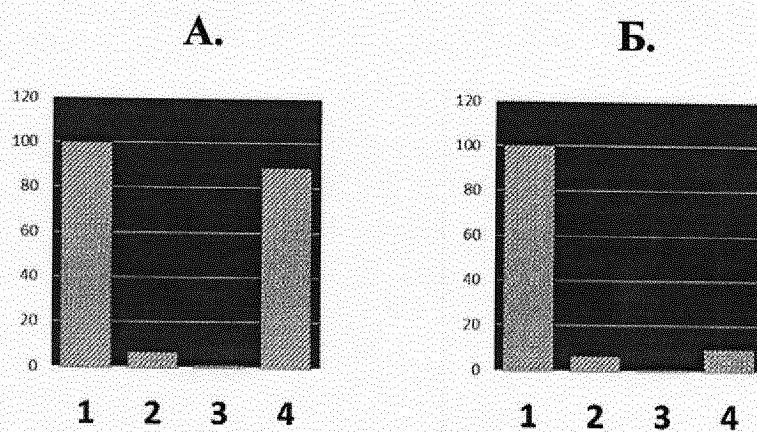
Фиг.7. Торможение инфекционного процесса коронавируса комбинированным аэрозольным составом в культуре клеток млекопитающих.



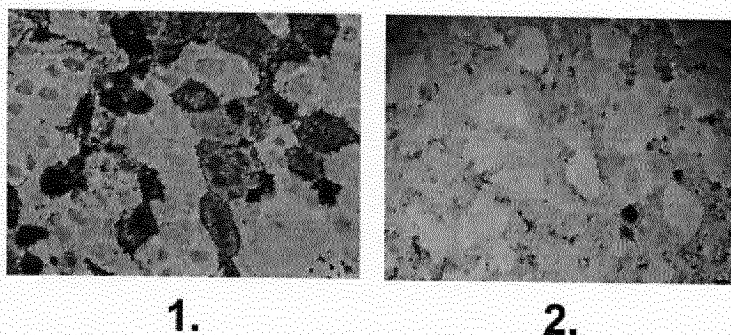
Фиг. 8. Фармакологическое действие ингибиторов протеаз в комбинации с антивирусными веществами против коронавируса.



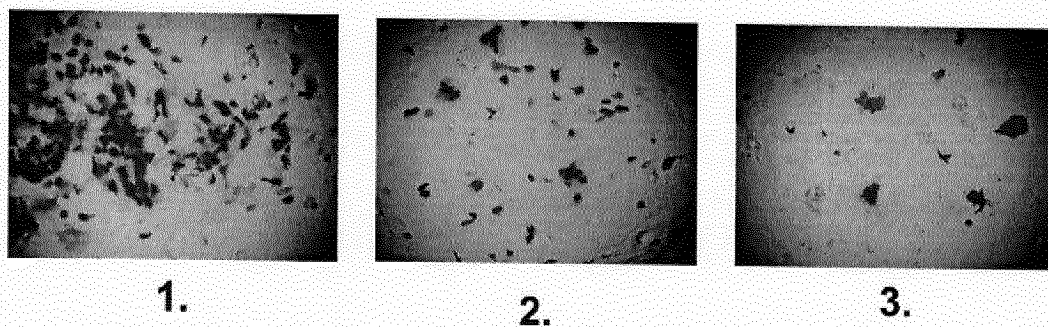
Фиг. 9. Белковый профиль используемого в аэрозольном составе слабо инфекционного вируса гриппа A/Aichi/2/68.



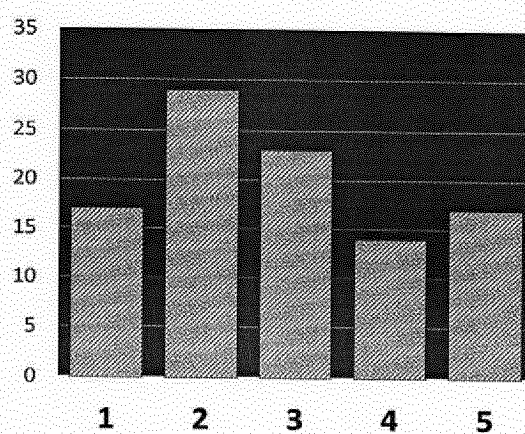
Фиг. 10. Сохранение фармакологической активности ингибитора протеаз и протеазы после распыления смешанного аэрозольного состава с данными активными веществами.



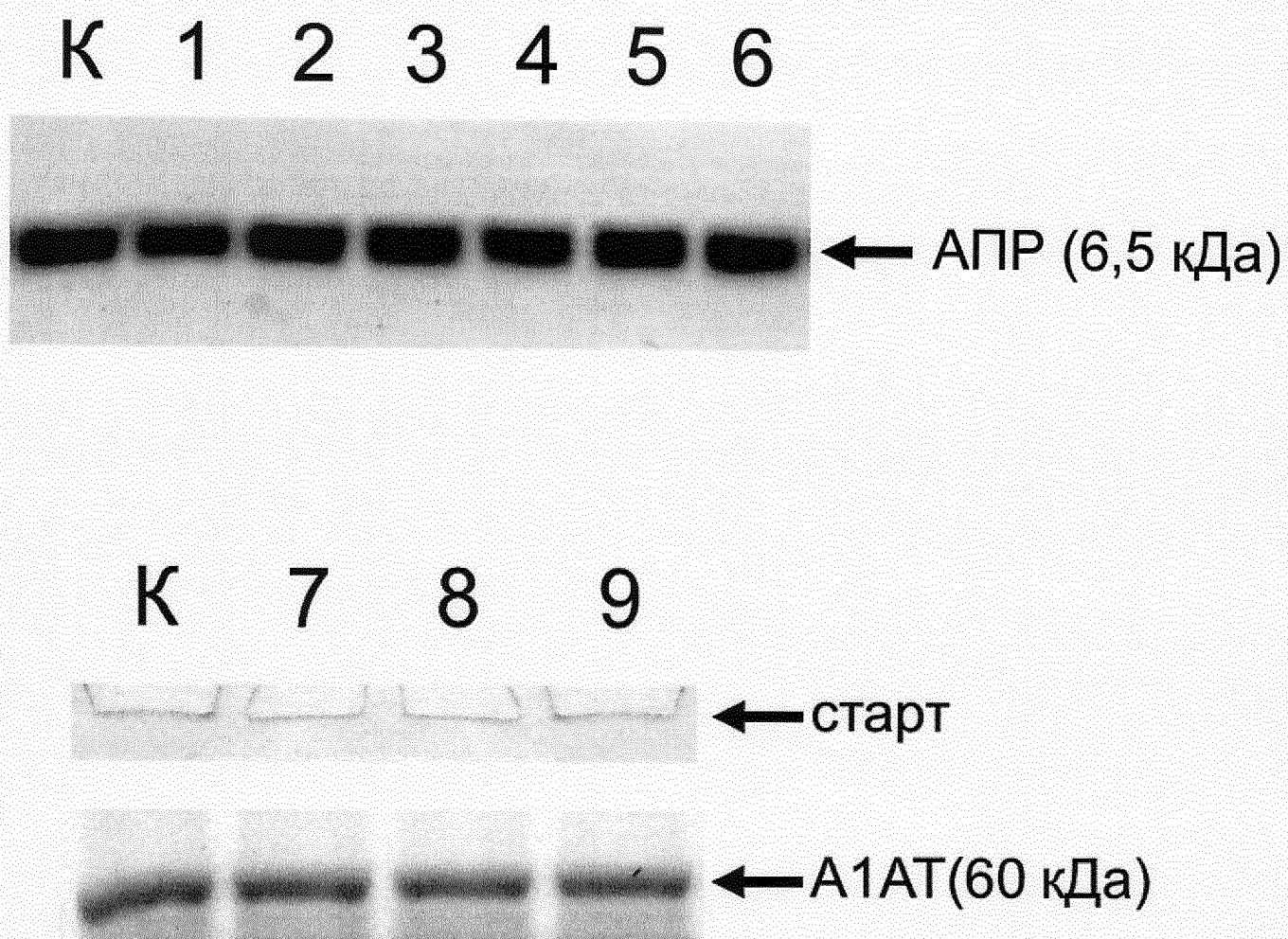
Фиг. 11. Фармакологическое действие аэрозоля антител на клетки-мишени, инфицированные вирусом гриппа.



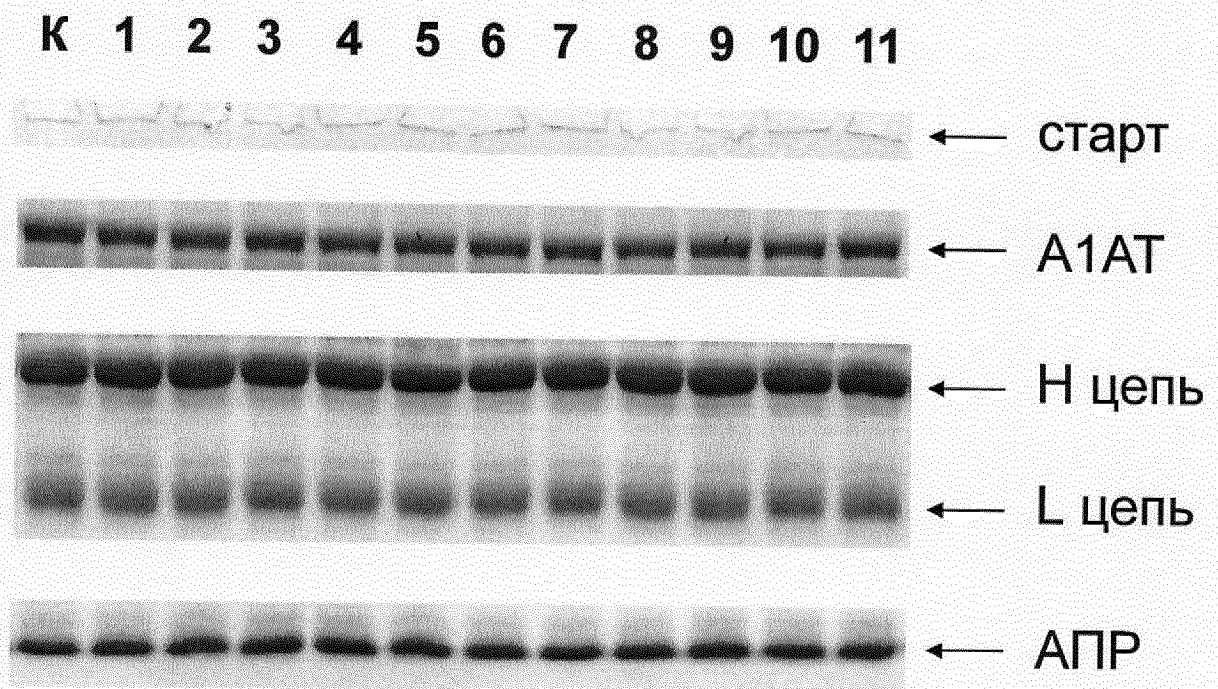
Фиг. 12. Фармакологическое действие аэрозольного состава с интерфероном на клетки-мишени, инфицированные вирусом гриппа.



Фиг. 13. Профиль дисперсности аэрозоля.



Фиг. 14



Фиг. 15