

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292354** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.12.28

(22) Дата подачи заявки
2021.02.15

(51) Int. Cl. *A61K 33/36* (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(54) **СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТА-АРСЕНИТА**

(31) 2020900433; 2021900204

(32) 2020.02.16; 2021.01.29

(33) AU

(86) PCT/AU2021/050128

(87) WO 2021/159187 2021.08.19

(71) Заявитель:

**КОМИФАРМ ИНТЕРНЕСНЛ
АУСТРАЛИА ПТИ ЛТД (AU);
ПАНАФИКС, ИНК. (GB)**

(72) Изобретатель:

Ян Юн-Цзинь (KR)

(74) Представитель:

Суюндуков М.Ж. (KZ)

(57) Изобретение относится к способу уменьшения воспалительной реакции, вызванной вирусной инфекцией у субъекта, и к способу лечения или предупреждения воспалительного состояния, вызванного вирусной инфекцией, у субъекта. Настоящее изобретение также относится к способу лечения или предупреждения гиперцитокинемии, возникшей вследствие вирусной инфекции у субъекта, и к способу лечения вирусной инфекции у субъекта.

A1

202292354

202292354

A1

СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТА-АРСЕНИТА

Представленная заявка заявляет приоритет австралийской предварительной патентной заявки № 2020900433, поданной 16 февраля 2020 г., и австралийской предварительной патентной заявки № 2021900204, поданной 29 января 2021 г. Все содержание австралийской предварительной патентной заявки №. 2020900433 и 2021900204 включены в данном документе в качестве ссылки.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Представленное изобретение относится к способу снижения воспалительной реакции, вызванной вирусной инфекцией у субъекта, а также к способу лечения или предупреждения воспалительного состояния, вызванного вирусной инфекцией у субъекта.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Воспалительная реакция продуцируется организмом как ответная реакция на травму, инфекцию и другие повреждения. Воспалительная реакция представляет собой каскад как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов. Баланс между этими цитокинами часто определяет уровень состояния организма после инфекции или травмы.

Для более позитивного результата восстановления организма после инфекции или травмы продуцирование провоспалительных цитокинов приводит к увеличению лейкоцитов крови, активации тканевых макрофагов и продуцированию иммунных медиаторов.

Однако в некоторых случаях, таких как сепсис или после заражения инфекционными агентами, например, такими как, вирусы птичьего гриппа или определенные штаммы коронавируса (например, SARS-CoV и SARS-CoV-2), воспалительная ответная реакция на инфекцию может привести к острым воспалительным состояниям, при которых происходит нерегулируемое продуцирование провоспалительных цитокинов, например, таких как фактор некроза опухоли альфа (tumour necrosis factor alpha, TNF- α), интерлейкин 1 бета (interleukin 1 beta, IL-1 β) и интерлейкин 6 (interleukin 6, IL-6). Такое нерегулируемое продуцирование провоспалительных цитокинов может привести к пневмонии и/или полиорганной недостаточности, а у восприимчивых людей может привести к летальному исходу.

Чрезмерное, а в некоторых случаях нерегулируемое выделение и/или выработка провоспалительных цитокинов часто является фактором некоторых вирусных инфекций,

который может привести к быстрой эскалации симптомов заболевания. Например, коронавирусы (CoV) представляют собой большое семейство вирусов, которые вызывают заболевания, начиная от обычной простуды и заканчивая более тяжелыми заболеваниями, и, как известно, вызывают повышенное, а в некоторых случаях нерегулируемое выделение провоспалительных цитокинов. Примеры коронавируса включают MERS-CoV, SARS-CoV и SARS-CoV-2. Общие признаки заражения коронавирусом включают респираторные симптомы, лихорадку, кашель, одышку и затрудненное дыхание. В более тяжелых случаях, инфекция может вызвать пневмонию, тяжелый острый респираторный синдром, почечную недостаточность и смерть.

Таким образом, существует потребность в улучшенных фармацевтических композициях, которые применяются при лечении или предупреждении воспалительных состояний, при которых происходит нерегулируемое продуцирование провоспалительных цитокинов как следствия вирусной инфекции.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Автор настоящего изобретения обнаружил, что мета-арсенит натрия ($O=As-O^- Na^+$) (SMA) или мета-арсенит калия ($O=As-O^- K^+$) (KMA) способен уменьшать или ингибировать продуцирование провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1 β и IL-6 из макрофагов.

Соответственно, первый аспект предусматривает способ уменьшения воспалительной реакции, вызванной вирусной инфекцией у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества мета-арсенита натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^- K^+$).

Еще один первый аспект предусматривает применение мета-арсенита натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^- K^+$) для уменьшения воспалительной реакции, вызванной вирусной инфекцией у субъекта; или использование мета-арсенита натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^- K^+$) в производстве лекарственного средства для снижения воспалительной реакции, вызванной вирусной инфекцией у субъекта.

Автор изобретения предполагает, что SMA и KMA могут быть использованы для лечения или предупреждения состояний, которые возникают в результате ответной воспалительной реакции на вирусную инфекцию (воспалительное состояние, которое было вызвано вирусной инфекцией).

Соответственно, второй аспект предусматривает способ лечения или предупреждения воспалительного состояния, вызванного вирусной инфекцией у

субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества мета-арсенита натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^- K^+$).

5 Дополнительно, второй аспект предусматривает применение мета-арсенита натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^- K^+$) при лечении или предупреждении воспалительного состояния, вызванного вирусной инфекцией у субъекта; или использование мета-арсенита натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^- K^+$) в производстве лекарственного средства для лечения или предупреждения воспалительного состояния, вызванного вирусной инфекцией у субъекта.

10 Третий аспект предусматривает способ лечения или предупреждения гиперцитокинемии, которая возникает вследствие вирусной инфекции у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества мета-арсенита натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^- K^+$).

15 Дополнительно, третий аспект предусматривает применение мета-арсенита натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^- K^+$) при лечении или предупреждении гиперцитокинемии, которая возникает вследствие вирусной инфекции у субъекта; или использование мета-арсенита натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^- K^+$) в производстве лекарственного средства для лечения или предупреждения гиперцитокинемии, которая возникает вследствие вирусной инфекции у субъекта.

20 Четвертый аспект предусматривает способ лечения вирусной инфекции у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества мета-арсенита натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^- K^+$).

25 Дополнительно, четвертый аспект предусматривает применение мета-арсенита натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^- K^+$) при лечении вирусной инфекции у субъекта; или использование мета-арсенита натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^- K^+$) в производстве лекарственного средства для лечения вирусной инфекции у субъекта.

30 Пятый аспект предусматривает способ лечения коронавирусной инфекции у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества мета-арсенита натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^- K^+$).

Дополнительно, пятый аспект предусматривает применение мета-арсенита натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^- K^+$) при лечении коронавирусной инфекции у субъекта; или использование мета-арсенита натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-

арсенита калия ($O=As-O^-K^+$) в производстве лекарственного средства для лечения коронавирусной инфекции у субъекта.

5 Шестой аспект предусматривает способ снижения уровней TNF- α , IL-1 β и/или IL-6 у субъекта, при воспалительном состоянии, которое было вызвано вирусной инфекцией, включающий введение субъекту эффективного количества мета-арсенита натрия ($O=As-O^-Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^-K^+$).

10 Дополнительно, шестой аспект предусматривает применение мета-арсенита натрия ($O=As-O^-Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^-K^+$) для снижения продуцирования TNF- α , IL-1 β и/или IL-6 у субъекта, при воспалительном состоянии, которое было вызвано вирусной инфекцией; а также применение мета-арсенита натрия ($O=As-O^-Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^-K^+$) в производстве лекарственного средства для снижения продуцирования TNF- α , IL-1 β и/или IL-6 у субъекта, страдающего на воспалительное состояние, вызванного вирусной инфекцией.

15 Седьмой аспект предусматривает способ лечения коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества мета-арсенита натрия ($O=As-O^-Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^-K^+$).

20 Дополнительно, седьмой аспект предусматривает применение мета-арсенита натрия ($O=As-O^-Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^-K^+$) при лечении коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 у субъекта; или использование мета-арсенита натрия ($O=As-O^-Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^-K^+$) в производстве лекарственного средства для лечения коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 у субъекта.

25 Восьмой аспект предусматривает способ лечения или предупреждения заболевания или состояния, опосредованного повышенными уровнями TNF- α , IL-1 β и/или IL-6 вследствие вирусной инфекции у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества мета-арсенита натрия ($O=As-O^-Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^-K^+$).

30 Дополнительно, восьмой аспект предусматривает применение мета-арсенита натрия ($O=As-O^-Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^-K^+$) при лечении или профилактике заболевания или состояния, опосредованного повышенным уровнем TNF- α , IL-1 β и/или IL-6 вследствие вирусной инфекции у субъекта; или использование мета-арсенита натрия ($O=As-O^-Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^-K^+$) в производстве лекарственного средства для лечения или профилактики заболевания или состояния, опосредованного повышенным уровнем TNF- α , IL-1 β и/или IL-6, вызванного вирусной инфекцией у субъекта.

Девятый аспект предусматривает фармацевтическую композицию, которая применяется для уменьшения воспалительной реакции, вызванной вирусной инфекцией, и/или лечения или предупреждения воспалительного состояния, вызванного вирусной инфекцией, где композиция содержит мета-арсенит натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенит калия ($O=As-O^- K^+$).

Десятый аспект предусматривает фармацевтическую композицию, которая применяется для уменьшения воспалительной реакции, вызванной вирусной инфекцией, и/или лечения или предупреждения воспалительного состояния, вызванного вирусной инфекцией, путем перорального введения, где композиция содержит:

(а) твердое ядро, содержащее мета-арсенит натрия или мета-арсенит калия и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, где одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ выбирают таким образом, что окисление мета-арсенита до мета-арсената сводится к минимуму;

а также,

(b) энтеросолюбильное покрытие, которое содержит энтеросолюбильный полимер;

при этом, массовая доля энтеросолюбильного покрытия составляет от примерно 6% масс./масс. до примерно 20% масс./масс. по отношению к общей массе фармацевтической композиции, а толщина покрытия составляет от примерно 6,5% до примерно 15% от толщины фармацевтической композиции.

Одиннадцатый аспект предусматривает применение фармацевтической композиции для уменьшения воспалительной реакции, вызванной вирусной инфекцией, и/или лечения или предупреждения воспалительного состояния, вызванного вирусной инфекцией путем перорального введения, где композиция содержит:

(а) твердое ядро, содержащее мета-арсенит натрия или мета-арсенит калия и следующие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества:

(i) наполнитель или разбавитель в диапазоне примерно от 5% до 95% масс./масс.,

(ii) дезинтегрант в диапазоне примерно от 10% до 90% масс./масс.,

(iii) глидант в диапазоне примерно от 0,1% до 5% масс./масс.,

(iv) смазывающее вещество в диапазоне примерно от 0,1% до 5% масс./масс.,

и

(v) необязательно связывающее вещество в диапазоне от 0 до примерно 30% масс./масс.;

а также,

(b) энтеросолюбильное покрытие, содержащее энтеросолюбильный полимер;

5 при этом, фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества выбраны таким образом, что окисление мета-арсенита в мета-арсенат сведено к минимуму,

при этом, массовый процент энтеросолюбильного покрытия составляет от примерно 6% масс./масс. до примерно 20% масс./масс. по отношению к общей массе фармацевтической композиции, и

10 при этом, толщина покрытия составляет от примерно 6,5% до примерно 15% толщины фармацевтической композиции.

Двенадцатый аспект предусматривает способ лечения заболевания или симптома, вызванного вирусной инфекцией у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества мета-арсенита натрия ($\text{O}=\text{As}-\text{O}^- \text{Na}^+$) или мета-арсенита калия ($\text{O}=\text{As}-\text{O}^- \text{K}^+$).

Дополнительно, двенадцатый аспект предусматривает применение мета-арсенита натрия ($\text{O}=\text{As}-\text{O}^- \text{Na}^+$) или мета-арсенита калия ($\text{O}=\text{As}-\text{O}^- \text{K}^+$) при лечении заболевания или симптома, вызванного вирусной инфекцией у субъекта; или использование мета-арсенита натрия ($\text{O}=\text{As}-\text{O}^- \text{Na}^+$) или мета-арсенита калия ($\text{O}=\text{As}-\text{O}^- \text{K}^+$) в производстве лекарственного средства для лечения заболевания или симптома, вызванного вирусной инфекцией у субъекта.

Представленное изобретение предусматривает следующее:

1. Способ снижения воспалительной реакции вследствие вирусной инфекции у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества мета-арсенита натрия ($\text{O}=\text{As}-\text{O}^- \text{Na}^+$) или мета-арсенита калия ($\text{O}=\text{As}-\text{O}^- \text{K}^+$).

2. Способ по пункту 1, где вирусная инфекция представляет собой коронавирусную инфекцию.

3. Способ по пункту 2, где коронавирус представляет собой SARS-CoV-2.

4. Способ по пункту 1, где мета-арсенит натрия ($\text{O}=\text{As}-\text{O}^- \text{Na}^+$) или мета-арсенит калия ($\text{O}=\text{As}-\text{O}^- \text{K}^+$) вводят перорально.

5. Способ по пункту 1, где мета-арсенит натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенит калия ($O=As-O^- K^+$) вводят в дозе от 2 мг в сутки до 20 мг в сутки.
6. Способ лечения или предупреждения воспалительного состояния вследствие вирусной инфекции у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества мета-арсенита натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^- K^+$).
7. Способ по пункту 6, где вирусная инфекция представляет собой коронавирусную инфекцию.
8. Способ по пункту 7, где коронавирусная инфекция вызвана SARS-CoV-2.
9. Способ по пункту 6, где мета-арсенит натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенит калия ($O=As-O^- K^+$) вводят перорально.
10. Способ по пункту 6, где мета-арсенит натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенит калия ($O=As-O^- K^+$) вводят в дозе в диапазоне от 2 мг в сутки до 20 мг в сутки.
11. Способ лечения или предупреждения гиперцитокинемии, возникшей вследствие вирусной инфекции у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества мета-арсенита натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^- K^+$).
12. Способ по пункту 11, где вирусная инфекция представляет собой коронавирусную инфекцию.
13. Способ по пункту 12, где коронавирусная инфекция вызвана SARS-CoV-2.
14. Способ лечения вирусной инфекции у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества мета-арсенита натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^- K^+$).
15. Способ по пункту 14, где вирусная инфекция представляет собой коронавирусную инфекцию.
16. Способ по пункту 15, где коронавирусная инфекция вызвана SARS-CoV-2.
17. Способ по пункту 14, где мета-арсенит натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенит калия ($O=As-O^- K^+$) вводят перорально.
18. Способ по пункту 14, где мета-арсенит натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенит калия ($O=As-O^- K^+$) вводят в дозе в диапазоне от 2 мг в сутки до 20 мг в сутки.

19. Способ лечения коронавирусной инфекции у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества мета-арсенита натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^- K^+$).
20. Способ по пункту 19, где коронавирусная инфекция вызвана SARS-CoV-2.
- 5 21. Способ по пункту 19, где мета-арсенит натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенит калия ($O=As-O^- K^+$) вводят перорально.
22. Способ по пункту 19, где мета-арсенит натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенит калия ($O=As-O^- K^+$) вводят в дозе в диапазоне от 2 мг в сутки до 20 мг в сутки.
- 10 23. Способ снижения уровней TNF- α , IL-1 β и/или IL-6 у субъекта, страдающего от воспалительного состояния, вызванного вирусной инфекцией, включает введение субъекту эффективного количества мета-арсенита натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^- K^+$).
24. Способ по пункту 23, где мета-арсенит натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенит калия ($O=As-O^- K^+$) вводят перорально.
- 15 25. Способ по пункту 23, где мета-арсенит натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенит калия ($O=As-O^- K^+$) вводят в дозе в диапазоне от 2 мг в сутки до 20 мг в сутки.
26. Способ по какому-либо одному из пунктов 1 - 25, в котором мета-арсенит натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенит калия ($O=As-O^- K^+$) вводят в составе композиции, которая содержит:
- 20 (a) твердое ядро, содержащее мета-арсенит натрия или мета-арсенит калия и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, где одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ выбирают таким образом, что окисление мета-арсенита до мета-арсената сводится к минимуму;
- 25 а также,
- (b) энтеросолюбильное покрытие, содержащее энтеросолюбильный полимер;
- при этом, массовая доля энтеросолюбильного покрытия составляет от примерно 6% масс./масс. до примерно 20% масс./масс. по отношению к общей массе фармацевтической композиции, а толщина покрытия составляет от примерно 6,5% до
- 30 примерно 15% толщины фармацевтической композиции.
27. Способ по какому-либо одному из пунктов 1 - 25, в котором мета-арсенит натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенит калия ($O=As-O^- K^+$) вводят в состав композиции, которая содержит:

(а) твердое ядро, содержащее мета-арсенит натрия или мета-арсенит калия и следующие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества:

(i) наполнитель или разбавитель в диапазоне примерно от 5% до 95% масс./масс.,

(ii) дезинтегрант в диапазоне примерно от 10% до 90% масс./масс.,

5 (iii) глидант в диапазоне примерно от 0,1% до 5% масс./масс.,

(iv) смазывающее вещество в диапазоне примерно от 0,1% до 5% масс./масс., и

(v) необязательно связывающее вещество в диапазоне от 0 до примерно 30% масс./масс.;

а также,

10 (b) энтеросолюбильное покрытие, содержащее энтеросолюбильный полимер;

при этом, фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества выбраны таким образом, что окисление мета-арсенита в мета-арсенат сведено к минимуму,

при этом, массовый процент энтеросолюбильного покрытия составляет от примерно 6% масс./масс. до примерно 20% масс./масс. по отношению к общей массе фармацевтической композиции, и

15 при этом, толщина покрытия составляет от примерно 6,5% до примерно 15% толщины фармацевтической композиции.

28. Фармацевтическая композиция, которая применяется для снижения воспалительной реакции, вызванной вирусной инфекцией, и/или лечения или

20 предупреждения воспалительного состояния, вызванного вирусной инфекцией, путем перорального введения, которая содержит:

(а) твердое ядро, содержащее мета-арсенит натрия или мета-арсенит калия и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, где одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ выбирают

25 таким образом, что окисление мета-арсенита до мета-арсената сводится к минимуму;

а также,

(b) энтеросолюбильное покрытие, содержащее энтеросолюбильный полимер;

при этом, массовая доля энтеросолюбильного покрытия составляет от примерно 6% масс./масс. до примерно 20% масс./масс. по отношению к общей массе

фармацевтической композиции, а толщина покрытия составляет от примерно 6,5% до примерно 15% толщины фармацевтической композиции.

29. Фармацевтическая композиция, которая применяется для снижения воспалительной реакции, вызванной вирусной инфекцией, и/или лечения или предупреждения воспалительного состояния, вызванного вирусной инфекцией, путем перорального введения, которая содержит:

(а) твердое ядро, содержащее мета-арсенит натрия или мета-арсенит калия и следующие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества:

- (i) наполнитель или разбавитель в диапазоне примерно от 5% до 95% масс./масс.,
- (ii) дезинтегрант в диапазоне примерно от 10% до 90% масс./масс.,
- (iii) глидант в диапазоне примерно от 0,1% до 5% масс./масс.,
- (iv) смазывающее вещество в диапазоне примерно от 0,1% до 5% масс./масс., и
- (v) необязательно связывающее вещество в диапазоне от 0 до примерно 30% масс./масс.;

а также,

(b) энтеросолюбильное покрытие, содержащее энтеросолюбильный полимер;

при этом, фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества выбраны таким образом, что окисление мета-арсенита в мета-арсенат сведено к минимуму,

при этом, массовый процент энтеросолюбильного покрытия составляет от примерно 6% масс./масс. до примерно 20% масс./масс. по отношению к общей массе фармацевтической композиции, и

при этом, толщина покрытия составляет от примерно 6,5% до примерно 15% толщины фармацевтической композиции.

30. Применение мета-арсенита натрия ($\text{O}=\text{As}-\text{O}^- \text{Na}^+$) или мета-арсенита калия ($\text{O}=\text{As}-\text{O}^- \text{K}^+$) в производстве лекарственного средства для снижения воспалительной реакции, вызванной вирусной инфекцией у субъекта.

31. Применение мета-арсенита натрия ($\text{O}=\text{As}-\text{O}^- \text{Na}^+$) или мета-арсенита калия ($\text{O}=\text{As}-\text{O}^- \text{K}^+$) в производстве лекарственного средства для лечения или предупреждения воспалительного состояния, вызванного вирусной инфекцией у субъекта.

32. Применение мета-арсенита натрия ($\text{O}=\text{As}-\text{O}^- \text{Na}^+$) или мета-арсенита калия ($\text{O}=\text{As}-\text{O}^- \text{K}^+$) в производстве лекарственного средства для лечения или предупреждения гиперцитокинемии, возникшей вследствие вирусной инфекции у субъекта.
33. Применение мета-арсенита натрия ($\text{O}=\text{As}-\text{O}^- \text{Na}^+$) или мета-арсенита калия ($\text{O}=\text{As}-\text{O}^- \text{K}^+$) в производстве лекарственного средства для лечения вирусной инфекции у субъекта.
34. Использование мета-арсенита натрия ($\text{O}=\text{As}-\text{O}^- \text{Na}^+$) или мета-арсенита калия ($\text{O}=\text{As}-\text{O}^- \text{K}^+$) в производстве лекарственного средства для снижения уровней TNF- α , IL-1 β и/или IL-6 у субъекта, страдающего от воспалительного состояния, вызванного вирусной инфекцией.
35. Применение по какому-либо одному из пунктов от 30 до 34, в котором вирусная инфекция представляет собой коронавирусную инфекцию.
36. Использование мета-арсенита натрия ($\text{O}=\text{As}-\text{O}^- \text{Na}^+$) или мета-арсенита калия ($\text{O}=\text{As}-\text{O}^- \text{K}^+$) в производстве лекарственного средства для лечения коронавирусной инфекции у субъекта.
37. Применение по пункту 35 или 36, в котором коронавирусная инфекция вызвана SARS-CoV-2.
38. Применение по какому-либо одному из пунктов от 30 до 37, где лекарственное средство подготовлено для перорального введения.
39. Применение по какому-либо одному из пунктов от 30 до 38, где лекарственное средство содержит фармацевтическую композицию, которая содержит:
- (a) твердое ядро, содержащее мета-арсенит натрия ($\text{O}=\text{As}-\text{O}^- \text{Na}^+$) или мета-арсенит калия ($\text{O}=\text{As}-\text{O}^- \text{K}^+$) и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, при этом одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ выбраны таким образом, чтобы окисление мета-арсенита в мета-арсенат сведено к минимуму; а также,
 - (b) энтеросолюбильное покрытие, содержащее энтеросолюбильный полимер;
- при этом, массовая доля энтеросолюбильного покрытия составляет от примерно 6% масс./масс. до примерно 20% масс./масс. по отношению к общей массе фармацевтической композиции, а толщина покрытия составляет от примерно 6,5% до примерно 15% толщины фармацевтической композиции.

40. Применение по какому-либо одному из пунктов от 30 до 38, где лекарственное средство содержит фармацевтическую композицию, которая содержит:

(a) твердое ядро, содержащее мета-арсенит натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенит калия ($O=As-O^- K^+$) и следующие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества:

(i) наполнитель или разбавитель в диапазоне примерно от 5% до 95% масс./масс.,

(ii) дезинтегрант в диапазоне примерно от 10 % до 90% масс./масс.,

(iii) глидант в диапазоне примерно от 0,1% до 5% масс./масс.,

(iv) смазывающее вещество в диапазоне примерно от 0,1% до 5% масс./масс., и

(v) необязательно связывающее вещество в диапазоне от 0 до примерно 30% масс./масс.;

а также,

(b) энтеросолюбильное покрытие, содержащее энтеросолюбильный полимер;

при этом, фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, выбраны таким образом, что окисление мета-арсенита в мета-арсенат сведено к минимуму,

при этом массовый процент энтеросолюбильного покрытия составляет от примерно 6% масс./масс. до примерно 20% масс./масс. по отношению к общей массе фармацевтической композиции, и

при этом, толщина покрытия составляет от примерно 6,5% до примерно 15% толщины фармацевтической композиции.

41. Фармацевтическая композиция для перорального введения, которая содержит:

(a) твердое ядро, содержащее мета-арсенит натрия или мета-арсенит калия и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, где одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ выбирают таким образом, что окисление мета-арсенита до мета-арсената сводится к минимуму;

а также,

(b) энтеросолюбильное покрытие, содержащее энтеросолюбильный полимер;

при этом, массовая доля энтеросолюбильного покрытия составляет от примерно 6% масс./масс. до примерно 20% масс./масс. по отношению к общей массе фармацевтической композиции, а толщина покрытия составляет от примерно 6,5% до примерно 15% толщины фармацевтической композиции;

для применения при снижении воспалительной реакции, вызванной вирусной инфекцией у субъекта;

для применения при лечении или предупреждении воспалительного состояния, вызванного вирусной инфекцией у субъекта;

5 для применения при лечении или предупреждения гиперцитокинемии, возникшей вследствие вирусной инфекции у субъекта;

для применения при лечении вирусной инфекции у субъекта;

для применения при снижении уровней TNF- α , IL-1 β и/или IL-6 у субъекта, страдающего на воспалительное состояние, вызванное вирусной инфекцией; или же

10 для применения при лечении коронавирусной инфекции у субъекта.

42. Фармацевтическая композиция для перорального введения, которая содержит:

(a) твердое ядро, содержащее мета-арсенит натрия или мета-арсенит калия и следующие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества:

15 (i) наполнитель или разбавитель в диапазоне примерно от 5% до 95% масс./масс.,

(ii) дезинтегрант в диапазоне примерно от 10% до 90% масс./масс.,

(iii) глидант в диапазоне примерно от 0,1% до 5% масс./масс.,

(iv) смазывающее вещество в диапазоне примерно от 0,1% до 5% масс./масс., и

(v) необязательно связывающее вещество в диапазоне от 0 до примерно 30% мас./мас.;

20 а также,

(b) энтеросолюбильное покрытие, содержащее энтеросолюбильный полимер;

при этом, фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества выбраны таким образом, что окисление мета-арсенита в мета-арсенат сведено к минимуму,

25 при этом, массовый процент энтеросолюбильного покрытия составляет от примерно 6% масс./масс. до примерно 20% масс./масс. по отношению к общей массе фармацевтической композиции, и

при этом толщина покрытия составляет от примерно 6,5% до примерно 15% толщины фармацевтической композиции;

30 для применения при уменьшении воспалительной реакции, вызванной вирусной инфекцией у субъекта;

для применения при лечении или предупреждения воспалительного состояния, вызванного вирусной инфекцией у субъекта;

для применения при лечении или предупреждения гиперцитокинемии, возникшей вследствие вирусной инфекции у субъекта;

для применения при лечении вирусной инфекции у субъекта;

для применения для снижения уровней TNF- α , IL-1 β и/или IL-6 у субъекта, страдающего от воспалительного состояния, вызванного вирусной инфекцией; или же

для применения при лечении коронавирусной инфекции у субъекта.

5

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

10 Фигуры 1A-C представляют собой графики, показывающие среднее значение (\pm SEM) цитотоксичности и жизнеспособности культивируемых первичных макрофагов крысы, инкубированных в течение 24 часов в культуральной среде, содержащей липополисахарид (LPS) в концентрации 100 нг/мл и мета-арсенит натрия (A; 30, 10, 7, 5, 3, 1, 0,3 и 0,1 мкМ) или контроль (B и C); $p=3$.

15 Фигуры 2A-F представляют собой графики, показывающие среднее значение (\pm SEM) выделения TNF- α (A), IL-1 β (C) или IL-6 (E) и жизнеспособность культивируемых первичных крысиных макрофагов, инкубированных в течение 24 часов в среде, содержащей LPS, при 100 нг/мл и различные концентрации мета-арсенита натрия (30, 10, 7, 5, 3, 1, 0,3 и 0,1 мкМ) относительно позитивного (целекоксиб) и негативного (носитель) контроля (B, D и F); $p=3$; значения, не имеющие общей буквы, значительно различаются ($p \leq 0,05$).

20 Фигуры 3A и B представляют собой: A - график, показывающий выработку оксида азота клетками RAW264.7 после стимуляции с LPS и обработки мета-арсенитом натрия с различными концентрациями и без него (т. е. показывающий влияние мета-арсенита натрия на выработку оксида азота (анализ iNOS)); и B - график, показывающий жизнеспособность клеток после обработки LPS и мета-арсенитом натрия (*: $p<0,01$ по сравнению с контролем (LPS+)).

25 Фигура 4 представляет собой график, показывающий продуцирование простагландина E2 (PGE2) клетками RAW264.7 после стимуляции с LPS и обработки мета-арсенитом натрия в различных концентрациях и без них (т. е. показывающий влияние мета-арсенита натрия на выработку PGE2 (анализ PGE2). *: $p<0,01$ по сравнению с контролем (LPS +)).

30 Фигура 5 представляет собой результат вестерн-блоттинга, показывающий экспрессию протеинов iNOS и COX-2 в клетках RAW264.7, обработанных с LPS при различных концентрациях мета-арсенита натрия и без него (т.е. демонстрирующий влияние мета-арсенита натрия на экспрессию протеинов iNOS и COX-2).

Фигура 6 представляет собой результат вестерн-блоттинга, показывающий экспрессию протеинов TNF- α и IL-1 β в клетках RAW264.7, обработанных с LPS при различных концентрациях мета-арсенита натрия и без них (т.е. показывающий влияние мета-арсенита натрия на экспрессию протеинов TNF- α и IL-1 β).

5 Фигура 7 представляет собой изображение гель-электрофореза, показывающее экспрессию мРНК, определенную с помощью ОТ-ПЦР iNOS и COX-2 в клетках RAW264.7, обработанных LPS с различными концентрациями мета-арсенита натрия и без них (т.е. показывающее влияние мета-арсенита натрия на экспрессию генов iNOS и COX-2).

10 Фигура 8 представляет собой график, показывающий экспрессию мРНК iNOS в клетках RAW264.7, обработанных LPS с различными концентрациями мета-арсенита натрия и без них (т.е. показывающий влияние мета-арсенита натрия на экспрессию мРНК iNOS (ПЦР в реальном времени); *: $p < 0,01$ по сравнению с контролем (LPS+)).

15 Фигура 9 представляет собой изображение гель-электрофореза продуктов ОТ-ПЦР, показывающее экспрессию мРНК TNF- α , IL-1 β и IFN- β в клетках RAW264.7, обработанных LPS с различными концентрациями мета-арсенита натрия и без него (т.е. показывающее эффект мета-арсенита натрия на экспрессию генов TNF- α , IL-1 β и IFN- β).

20 Фигура 10 представляет собой график, показывающий транскрипционную активность NF- κ B в клетках RAW264.7, обработанных LPS с различными концентрациями мета-арсенита натрия и без них (т.е. показывающий влияние мета-арсенита натрия на индуцированную LPS транскрипционную активность NF- κ B; *: $p < 0,01$ по сравнению с контролем (LPS+)).

25 Фигура 11 представляет собой результат вестерн-блоттинга, показывающий экспрессию протеинов NF- κ B (p50) и (p65) в клетках RAW264.7, обработанных LPS с различными концентрациями мета-арсенита натрия и без них (т.е. показывающий влияние мета-арсенита натрия на экспрессию протеина NF- κ B).

Фигура 12 представляет собой результат вестерн-блоттинга, показывающий экспрессию протеинов I κ B и IKK в клетках RAW264.7, обработанных LPS с различными концентрациями мета-арсенита натрия и без них.

30 Фигура 13 представляет собой график, показывающий значение AUC (площадь под кривой) для уровней TNF- α в жидкости бронхоальвеолярного лаважа у мышинной модели ARDS после лечения PAX-1 (SMA), дексаметазоном или без лечения. Данные представлены как среднее значение \pm 95% доверительный интервал (*: $p < 0,05$, **: $P < 0,005$).

Фигура 14 представляет собой график, показывающий значение AUC (площадь под кривой) для уровней IL-6 в жидкости бронхоальвеолярного лаважа у мышинной модели ARDS после лечения PAX-1 (SMA), дексаметазоном или без лечения. Данные представлены как среднее значение \pm 95% доверительный интервал (*: $p < 0,05$, **: $P < 0,005$).

Фигура 15 представляет собой график, показывающий значение AUC (площадь под кривой) для уровней IL-1 β в жидкости бронхоальвеолярного лаважа у мышинной модели ARDS после лечения PAX-1 (SMA), дексаметазоном или без лечения. Данные представлены как среднее значение \pm 95% доверительный интервал (*: $p < 0,05$, **: $P < 0,005$).

Фигура 16 представляет собой график, показывающий выживаемость мышей в мышинной модели ARDS после лечения PAX-1 (SMA), дексаметазоном или без лечения (G1 (негативный контроль, 0 мг/кг), G2 (PAX-1, 1,03 мг/кг), G3 (PAX-1, 1,54 мг/кг), G4 (PAX-1, 2,05 мг/кг), G5 (дексаметазон, 3 мг/кг), ** $p < 0,005$, значимое отличие от негативного контроля (G1) по проверке с помощью логарифмического рангового критерия (Мантела-Кокса); *** $p < 0,0005$, достоверное отличие от негативного контроля (G1) по проверке с помощью логарифмического рангового критерия (Мантела-Кокса); **** $p < 0,0001$, достоверное отличие от негативного контроля (G1) по проверке с помощью логарифмического рангового критерия (Мантела-Кокса); $n = 10$).

Фигура 17 представляет собой графики, показывающие ингибирование репликации SARS-CoV-2 хлорохином, ремдесивиром, лопинавиром, PAX-1 (SMA) в DMSO («Комифарм (DMSO)») и PAX-1 (SMA) в PBS («Комифарм (PBS)»).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ ВОПЛОЩЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предпочтительные варианты воплощения представленного изобретения далее описаны в качестве примера.

Определения

Если в данном документе не определено иное, термины следует понимать в их обычном значении, общепринятом в данной области техники. Если не указано иное, термины, упомянутые ниже, имеют общие значения, как при самостоятельном использовании термина так и при использовании совместно, в сочетании с другими терминами.

Термин «лечение», используемый в данном документе, обозначает воздействие на субъект, ткань или клетку для получения желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта и включает ингибирование состояния, т.е. остановку его развития; или облегчение или улучшение последствий состояния, т.е. вызывает изменение или регрессию последствий состояния.

Термин «предупреждение», используемый в данном документе, обозначает предупреждение возникновения воспалительного состояния в клетке, ткани или у субъекта, которые могут подвергаться риску развития данного воспалительного состояния, но при этом, указанный термин также обозначает что, в конечном итоге, не обязательно данное воспалительное состояние будет иметь дальнейшее развитие. Предупреждение включает задержку возникновения воспалительного состояния в клетке, ткани или у субъекта.

Используемый в данном документе термин «снижение воспалительной реакции, вызванной вирусной инфекцией» обозначает снижение тяжести протекания ответной воспалительной реакции на вирусную инфекцию по сравнению с тяжестью протекания ответной воспалительной реакции, которая не поддавалась лечению. Уменьшение степени тяжести протекания воспалительной реакции может включать, например, снижение степени тяжести или количества проявляющихся симптомов воспаления, по сравнению с тяжестью или количеством симптомов, которые проявляются во время ответной реакции организма при отсутствии лечения, или снижение уровней одного или нескольких провоспалительных цитокинов в сыворотке по сравнению с уровнем одного или более провоспалительных цитокинов в сыворотке при отсутствии лечения.

Термин «воспалительное состояние, вызванное вирусной инфекцией» который используется в данном документе, относится к состоянию, возникающему в результате ответной воспалительной реакции организма на вирусную инфекцию. Как правило, воспалительное состояние вызывается, по крайней мере частично, повышенными, а в некоторых случаях нерегулируемыми уровнями одного или нескольких провоспалительных цитокинов во время вирусной инфекции. Во время заражения вирусом провоспалительные иммунные клетки мигрируют к месту инфекции и реагируют секрецией большого количества провоспалительных цитокинов в пораженном участке, таких как TNF- α , IL-1 β и IL-6, и, в частности, IL-1 β и IL-6. Секреция таких провоспалительных цитокинов способствует дальнейшей миграции иммунных клеток к очагу инфекции. Вследствие быстрого притока иммунных клеток и дальнейшей секреции провоспалительных цитокинов, а также разрушения инфицированных клеток, в пораженной области накапливается жидкость и происходит повреждение тканей. Например, коронавирус — это респираторный вирус, поражающий легкие субъекта.

Воспалительная реакция на коронавирус приводит к воспалению дыхательных путей, вызывая накопление жидкости в альвеолах, что в тяжелых случаях приводит к одышке и пневмонии. Со временем жидкость от воспаления затвердевает, что может привести к легочному фиброзу и в некоторых случаях к смерти. Даже в тех случаях, когда субъект
5 выживает, воспаление может привести к снижению функции легких.

Используемый в данном документе термин «снижение уровней TNF- α , IL-1 β и/или IL-6» относится к снижению количества TNF- α , IL-1 β и/или IL-6, которые выделяются иммунными клетками, обычно макрофагами. Количество TNF- α , IL-1 β и/или IL-6, выделяемых иммунными клетками, можно определить, например, путем определения у
10 субъекта сывороточных уровней TNF- α , IL-1 β и/или IL-6.

Используемый в данном документе термин «субъект», относится к млекопитающему. Млекопитающее может быть человеком или не человеком. К нечеловеческим примерам относятся приматы, сельскохозяйственные животные (например, овцы, коровы, лошади, ослы, свиньи), животные-компаньоны (например,
15 собаки, кошки), животные для лабораторных испытаний (например, мыши, кролики, крысы, морские свинки, хомяки), содержащиеся в неволе дикие животные (например, лиса, олень). Обычно млекопитающим является человек или примат. Наиболее типичным млекопитающим является человек.

Термин «композиция» включает композиции и составы препаратов, содержащие активный фармацевтический ингредиент («АФИ») вместе с
20 вспомогательными веществами или носителями, а также композиции и составы препаратов с инкапсулирующими материалами в качестве носителя для получения капсулы, в которой активный фармацевтический ингредиент (с другими или без других носителей) окружен инкапсулирующим носителем. В фармацевтических композициях,
25 вспомогательное вещество или носитель является «фармацевтически приемлемым», что означает, что он не является нежелательным для организма с биологической или иной точки зрения, т. е. материал может быть включен в фармацевтическую композицию, которая вводится пациенту, не вызывая при этом каких-либо нежелательных биологических эффектов или не взаимодействует нежелательным
30 образом с любым из других компонентов композиции, в которой он содержится. В композиции также могут быть включены дополнительные активные ингредиенты.

Под «фармацевтически приемлемым», например, «фармацевтически приемлемой соли» или «фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества или носителя» подразумевается материал, который не является нежелательным с
35 биологической или иной точки зрения, т. е. материал, который может быть включен в

фармацевтическую композицию, которая вводится пациенту, не вызывая при этом каких-либо нежелательных биологических эффектов или вредного взаимодействия с любыми другими компонентами композиции, в которой он содержится.

5 Термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству активного фармацевтического ингредиента, достаточного для получения желаемого терапевтического ответа без нежелательных побочных эффектов (например, таких как токсичность, раздражение или аллергическая реакция), соизмеримого в соответствии с настоящим изобретением при использовании разумного коэффициента дозы активного фармацевтического ингредиента в отношении польза/риск. Это количество, например, может быть эффективным для снижения продуцирования иммунными клетками субъекта, чаще макрофагами TNF- α , IL-1 β и/или IL-6. Конкретное эффективное количество или терапевтически эффективное количество будет варьироваться в зависимости от таких факторов, как конкретное состояние субъекта, который подлежит лечению, его возраст, масса тела, общее состояние здоровья, физическое состояние, пол и питание субъекта, продолжительность лечения, характер сопутствующей терапии (при наличии таковой) и тяжесть конкретного состояния.

20 Термин «носитель» используемый в данном документе, включает любые растворители, дисперсионные среды, носители, покрытия, разбавители, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию, буферы, растворы-носители, суспензии, коллоиды и т.п. Применение такого вида среды и агентов при использовании фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. За исключением тех случаев, когда при возможном использовании в терапевтических композициях, любая общепринятая среда или агент являются несовместимыми с активным ингредиентом.

30 Используемый в данном документе термин «вводимый» или «введение» или «который вводится» относится к назначению, применению или выбору двух или более агентов (например, мета-арсенита натрия и/или триоксида мышьяка и цисплатина, адриамицина и/или таксана, например, паклитаксела или доцетаксела) для лечения субъекта. Введение можно осуществлять путем использования любого из ряда способов, хорошо известных в данной области техники. Например, термин «введение» в контексте настоящего документа означает инфузию (внутривенное введение (в.в.)), парентеральное и/или пероральное введение. Под «парентеральным» подразумевают внутривенное, подкожное и внутримышечное введение. Следует понимать, что предпочтительный способ и порядок введения также будут варьироваться в зависимости от конкретной используемой композиции SMA или KMA. Способ и порядок введения

SMA или КМА для данного набора состояний могут быть установлены специалистами в данной области с использованием обычных методов и с учетом информации, изложенной в настоящем документе.

Используемый в данном документе термин «примерно, приблизительно» обозначает незначительное отклонение указанного значения, предпочтительно в пределах 10 процентов от указанного значения. Тем не менее, термин «примерно, приблизительно» может обозначать более высокую степень вариативности в зависимости, например, от используемого способа исследования. Упомянутые варианты конкретного значения понятны специалисту в данной области техники и находятся в контексте настоящего изобретения. Кроме того, для обеспечения более краткого описания некоторые из количественных выражений, используемых в данном документе, не обозначены термином «примерно, приблизительно». Понятно, что независимо от того, используется ли термин «примерно, приблизительно» явно или нет, каждая величина, приведенная здесь, подразумевается как относящаяся к фактическому заданному значению, а также относится к приближению к такому заданному значению, которое можно разумно вывести на основе обычного опыта в данной области техники, включая эквиваленты и приближения, обусловленные условиями эксперимента и/или измерения для такого заданного значения.

Если не указано иное, все значения количества выражены в данном документе в процентах по массе (% масс./масс.).

И само собой разумеется, что любой материал, который используется при изготовлении описанных в данном документе фармацевтических композиций, должен быть фармацевтически чистым, без примесей и по существу являться не токсичным в тех количествах, которые используются.

Воспалительная ответная реакция

В одном аспекте предусматривается способ снижения воспалительной реакции вследствие вирусной инфекции у субъекта, который включает введение субъекту эффективного количества мета-арсенита натрия ($\text{O}=\text{As}-\text{O}^- \text{Na}^+$) или мета-арсенита калия ($\text{O}=\text{As}-\text{O}^- \text{K}^+$).

Воспалительная реакция, вызванная вирусной инфекцией, представляет собой иммунный ответ на вирусную инфекцию, при котором иммунными клетками, обычно макрофагами, в ответ на данную вирусную инфекцию выделяются провоспалительные цитокины. В одном варианте воплощения, провоспалительные цитокины включают TNF- α , IL-1 β и/или IL-6. В некоторых вариантах воплощения,

воспалительная реакция включает гиперцитокинемию (также известную под названием «цитокиновый шторм»).

5 Воспалительная реакция, вызванная вирусной инфекцией, может быть острой или хронической. Острое воспаление обычно длится всего несколько дней. Напротив, хроническое воспаление обычно длится недели, месяцы или неопределенно долгое время и может вызывать повреждение тканей.

10 В одном аспекте предусматривается способ лечения или предупреждения воспалительного состояния, вызванного вирусной инфекцией у субъекта, который включает введение субъекту эффективного количества мета-арсенита натрия ($O=As-O^-Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^-K^+$). Воспалительное состояние, вызванное вирусной инфекцией, представляет собой состояние, возникающее в результате воспалительной реакции, вызванной вирусной инфекцией.

15 В одном варианте воплощения, воспалительное состояние представляет собой синдром системной воспалительной реакции (SIRS), вызванный вирусной инфекцией. В одном варианте воплощения, вирусная инфекция обусловлена РНК-вирусом.

20 В одном варианте воплощения, воспалительное состояние обусловлено гриппозной инфекцией. В одном варианте воплощения, грипп представляет собой птичий грипп. В одном варианте воплощения, воспалительное состояние, вызванное гриппозной инфекцией, представляет собой пневмонию.

25 В одном варианте воплощения, воспалительное состояние обусловлено коронавирусной инфекцией. В одном варианте воплощения, коронавирус выбран из группы, состоящей из 229E, NL63, OC43, HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV и SARS-CoV-2. В одном варианте воплощения, коронавирус представляет собой MERS-CoV. В одном варианте воплощения, коронавирус представляет собой SARS-CoV. В одном варианте воплощения, коронавирус представляет собой SARS-CoV-2 (также известный как «новый коронавирус 2019 года»).

30 В различных вариантах воплощения, воспалительное состояние выбрано из ближневосточного респираторного синдрома (Middle East Respiratory Syndrome (MERS, вызванного MERS-CoV)) и тяжелого острого респираторного синдрома (severe acute respiratory syndrome (SARS, вызванного SARS-CoV)) или состояния (например, COVID 19), вызванного новым вирусом 2019 г.- коронавирусом (SARS-CoV-2).

В одном варианте воплощения, воспалительное состояние представляет собой пневмонию, вызванную COVID-19.

Описанные в данном документе способы включают введение эффективного количества мета-арсенита натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^- K^+$).

5 Как описано в примерах, изобретателем было обнаружено, что мета-арсенит натрия способен уменьшать или ингибировать продуцирование и/или выделение про-воспалительных цитокинов TNF- α , IL-1 β и/или IL-6 из макрофагов.

10 В одном аспекте предусматривается способ снижения уровней TNF- α , IL-1 β и/или IL-6, обычно уровней в сыворотке, у субъекта, страдающего от воспалительного состояния, вызванного вирусной инфекцией, который включает введение субъекту эффективного количества мета-арсенита натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^- K^+$).

В одном варианте воплощения, способ снижает уровни TNF- α у субъекта. Как правило, способ снижает уровни TNF- α в сыворотке субъекта.

В одном варианте воплощения, способ снижает уровни IL-1 β у субъекта. Как правило, способ снижает уровни IL-1 β в сыворотке субъекта.

15 В одном варианте воплощения, способ снижает уровни TNF- α и IL-1 β у субъекта. Как правило, способ снижает уровни TNF- α и IL-1 β в сыворотке субъекта.

В одном варианте воплощения, способ снижает уровни IL-6 у субъекта. Как правило, способ снижает уровни IL-6 в сыворотке субъекта.

20 В одном варианте воплощения, способ снижает уровни IL-1 β и IL-6 у субъекта. Как правило, способ снижает уровни IL-1 β и IL-6 в сыворотке субъекта.

В одном варианте воплощения, способ снижает уровни TNF- α , IL-1 β и IL-6 у субъекта. Как правило, способ снижает уровни TNF- α , IL-1 β и IL-6 в сыворотке субъекта.

25 В одном аспекте предусматривается способ лечения или предупреждения заболевания или состояния, опосредованного повышенными уровнями TNF- α , IL-1 β и/или IL-6 вследствие вирусной инфекции у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества мета-арсенита натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^- K^+$).

30 В одном варианте воплощения, заболевание или состояние представляет собой пневмонию. В одном варианте воплощения, вирусная инфекция представляет собой коронавирусную инфекцию. В одном варианте воплощения, коронавирус представляет собой SARS-CoV-2.

В одном варианте воплощения, заболевание или состояние представляет собой MERS или SARS.

В одном варианте воплощения, заболевание или состояние представляет собой гиперцитокинемию. В одном варианте воплощения, вирусная инфекция представляет собой коронавирусную инфекцию. В одном варианте воплощения, коронавирус представляет собой SARS-CoV-2.

В одном аспекте предусматривается способ лечения заболевания или симптома, вызванного вирусной инфекцией у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества мета-арсенита натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^- K^+$).

В одном варианте воплощения, заболевание или симптом представляет собой заболевание, такое как лихорадка, озноб, гриппоподобные симптомы, воспаление или туман в голове или их комбинацию. Таким образом, в одном варианте воплощения, заболевание или симптом представляет собой лихорадку. В другом варианте воплощения, заболевание или симптом представляет собой озноб. В другом варианте воплощения, заболевание или симптом представляет собой гриппоподобные симптомы. В другом варианте воплощения, заболевание или симптом представляет собой воспаление. В другом варианте воплощения, заболевание или симптом представляет собой туман в голове.

Гриппоподобные симптомы включают головную боль, лихорадку, кашель, учащенное дыхание (одышку), затрудненное дыхание, выделение мокроты, стеснение в груди, утомляемость, боль в горле, насморк, потерю аппетита и боль (включая мышечную боль и ломоту в теле).

В одном варианте воплощения, вирусная инфекция представляет собой коронавирусную инфекцию. В одном варианте воплощения, коронавирус представляет собой SARS-CoV-2.

В одном варианте воплощения, лечение заболевания или симптома проводят мета-арсенитом натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенитом калия ($O=As-O^- K^+$) посредством противовоспалительного механизма и/или посредством подавления репликации вируса. В одном варианте воплощения, лечение заболевания или симптома проводят мета-арсенитом натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенитом калия ($O=As-O^- K^+$) посредством противовоспалительного механизма. В одном варианте воплощения, заболевание или симптом лечат мета-арсенитом натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенитом калия ($O=As-O^- K^+$) посредством подавления репликации вируса. В одном

варианте воплощения, заболевание или симптом лечат мета-арсенитом натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенитом калия ($O=As-O^- K^+$) за счет противовоспалительного механизма и подавления репликации вируса.

5 Обычно, мета-арсенит натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенит калия ($O=As-O^- K^+$) вводят в виде фармацевтической композиции, в которой содержится мета-арсенит натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенит калия ($O=As-O^- K^+$) и фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых вариантах воплощения, носитель представляет собой неприродный носитель.

10 **Фармацевтические композиции**

Как описано выше, обычно мета-арсенит натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенит калия ($O=As-O^- K^+$), используемые в способах и применениях, описанных в настоящем документе, вводят в форме фармацевтической композиции, содержащей мета-арсенит натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенит калия ($O=As-O^- K^+$) и фармацевтически приемлемый носитель.

15 Фармацевтические композиции могут содержать другие агенты или дополнительные активные агенты, как описано выше, и могут быть составлены, например, с использованием обычных твердых или жидких носителей или разбавителей, а также фармацевтических добавок, согласно способу желаемого введения (например, вспомогательные вещества, связывающие вещества, консерванты, стабилизаторы, ароматизаторы и т. д.) в соответствии с методами, хорошо известными в области создания фармацевтических препаратов (см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Ed., 2005, Lippincott Williams & Wilkins).

25 Фармацевтическая композиция может быть приемлемой для внутривенного, перорального, назального, местного (включая кожное, буккальное и подъязычное) или парентерального (включая внутримышечное, подкожное и внутривенное) введения или в форме, подходящей для введения путем ингаляции или инфузии.

30 Таким образом, соединения, описанные в настоящем документе, вместе с фармацевтически приемлемым носителем, могут быть внесены в форму фармацевтических композиций и их стандартных доз. Фармацевтическая композиция может быть твердой, такой как таблетка или наполненная капсула, или может быть в жидком виде для перорального введения, например, в виде раствора, суспензии, эмульсии, эликсира или наполненной ими капсулы. Фармацевтическая композиция

может представлять собой жидкость, такую как раствор, суспензия или эмульсия, для интравитреального введения.

Такие фармацевтические композиции и их стандартные лекарственные формы могут содержать обычные общепринятые ингредиенты в обычных пропорциях, с
5 дополнительными активными соединениями или без них, а также такие стандартные лекарственные формы могут содержать любое подходящее эффективное количество применяемого активного ингредиента, которое соизмеримо с предполагаемым диапазоном суточной дозы.

Для приготовления фармацевтических композиций из соединений, которые
10 описаны в данном документе, фармацевтически приемлемые носители могут быть либо твердыми, либо жидкими. Препараты в твердой форме включают порошки, таблетки, пилюли, капсулы, облатки, леденцы (твердые или жевательные), суппозитории и одноразовые гранулы. Твердый носитель может представлять собой одно или несколько веществ, которые также могут действовать как разбавители, ароматизаторы,
15 солюбилизаторы, смазывающие вещества, суспендирующие агенты, связывающие вещества, консерванты, агенты, которые разрыхляют таблетки, или инкапсулирующий материал.

Подходящими носителями являются карбонат магния, стеарат магния, тальк, сахар, лактоза, пектин, декстрин, крахмал, желатин, трагакант, метилцеллюлоза,
20 карбоксиметилцеллюлоза натрия, низкоплавкий воск, масло какао и т.п. Таблетки, порошки, капсулы, пилюли, облатки и леденцы могут быть использованы как твердые формы лекарственного препарата, которые подходят для перорального введения.

Препараты в жидкой форме включают растворы, суспензии и эмульсии, например, водные или водно-пропиленгликолевые растворы. Например, жидкие
25 препараты для парентеральных инъекций могут быть приготовлены в виде растворов на основе физиологического раствора, воды или водного раствора полиэтиленгликоля.

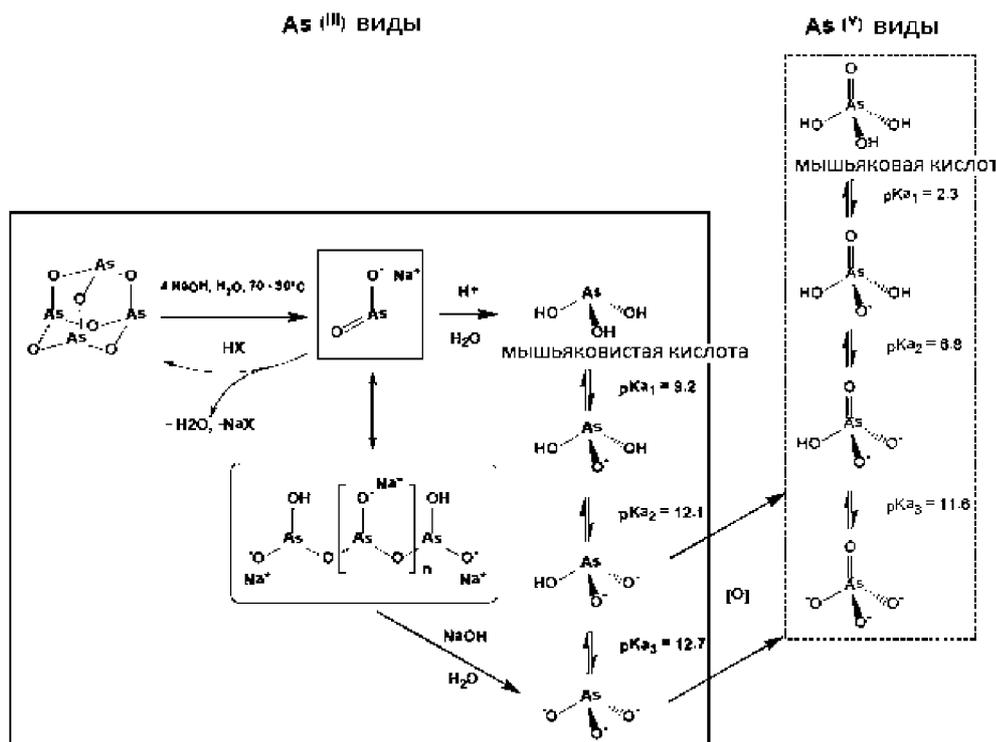
Композиции стерильных жидких форм включают стерильные растворы, суспензии, эмульсии, сиропы и эликсиры. Активный ингредиент может быть растворен или суспендирован в фармацевтически приемлемом носителе, таком как стерильная
30 вода, стерильный органический растворитель или их смесь.

В одном варианте воплощения, мета-арсенит натрия и мета-арсенит калия составлены для перорального введения. Композиция для перорального введения может быть в виде твердого или жидкого препарата.

В одном варианте воплощения, композиция для перорального введения представляет собой твердую форму препарата.

5 Мета-арсенит натрия и мета-арсенит калия могут быть синтезированы из триоксида мышьяка (As_2O_3). Например, мета-арсенит натрия можно синтезировать путем взаимодействия триоксида мышьяка (As_2O_3) с водным раствором гидроксида натрия с образованием трехвалентного мета-арсенита натрия (см. вверху слева на **Схеме 1**, представленной ниже). Раствор охлаждают, отфильтровывают мета-арсенит натрия и выпаривают воду. Образовавшийся мета-арсенит натрия затем промывают с метанолом для удаления воды, фильтруют под вакуумом и затем сушат. Мета-арсенит калия может
10 быть получен аналогично способу получения мета-арсенита натрия с использованием водного гидроксида калия вместо водного гидроксида натрия.

Однако, основной проблемой мета-арсенитовой соли (соли $\text{O}=\text{As}-\text{O}^-$) является ее химический состав и ее способность превращаться в ряд различных форм в растворе, например, когда пероральная лекарственная форма, содержащая мета-арсенит натрия
15 ($\text{O}=\text{As}-\text{O}^- \text{Na}^+$) или мета-арсенит калия ($\text{O}=\text{As}-\text{O}^- \text{K}^+$) растворяется в желудке. Например, мета-арсенит натрия ($\text{O}=\text{As}-\text{O}^- \text{Na}^+$) хорошо растворим в сильной кислоте, сильном основании и в нейтральных условиях. Присутствующие формы зависят от pH раствора и склонности мета-арсенита натрия к окислению (**Схема 1**, представленная ниже). Мета-арсенит калия ведет себя аналогично мета-арсениту натрия. Таким образом, условия от
20 нейтрального до щелочного способствуют образованию (или удержанию) As(III) (арсенита), в то время как кислые условия (особенно в присутствии ионов хлорида, например, в желудке) способствуют образованию As (V) (арсената).

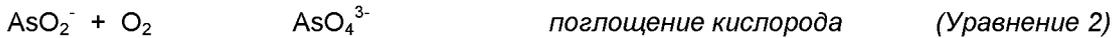
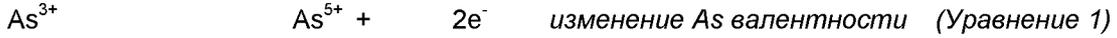


Кроме того, мета-арсенит ($O=As-O^-$) может окисляться до мета-арсената при хранении в присутствии хлорида, ионов металлов или влаги (например, в растворяющих средах или вспомогательных веществах; вспомогательные вещества могут катализировать окисление, например, вспомогательные вещества с ионами металлов, в частности железа) или в присутствии атмосферного кислорода. Окисление мета-арсенита может происходить довольно быстро при низком pH. Мета-арсенит натрия ($O=As-O^- Na^+$) и мета-арсенит калия ($O=As-O^- K^+$) оба являются гигроскопичными.

В растворе, основным продуктом разложения мета-арсенита натрия является пятивалентный мета-арсенат натрия (AsO_4^{3-} или $As(V)$), образующийся в результате реакции окисления. Предусматривается, что это может происходить, как показано ниже во **Вставке 1**, однако теоретически, окисление (изменение валентности) может происходить без поглощения кислорода (например, при взаимодействии с наполнителем или в результате реакции с ионами металлов, присутствующими в мета-арсените натрия или композициях).

Восстановленная Окисленная форма

форма



5

Вставка 1

Еще одним осложнением, возникающим при растворении мета-арсенита натрия ($O=As-O^- Na^+$) или мета-арсенита калия ($O=As-O^- K^+$) в желудке, является образование хлорида мышьяка (III) ($AsCl_3$) из ионов хлорида в желудке. Если присутствует хлорид, то окисление мета-арсенита может происходить быстрее. Хлорид мышьяка (III) токсичен для человека и вызывает серьезные побочные эффекты.

В некоторых вариантах воплощения, в которых композиция предназначена для перорального введения, предусматривается твердая фармацевтическая композиция с энтеросолюбильным покрытием, содержащая мета-арсенит натрия или мета-арсенит калия, которая подходит для перорального введения и которая проходит через желудок и начинает растворяться в тонком кишечнике (где кислотность находится в пределах pH 6,5 - 7,5). Риск окисления формы мета-арсенита в форму мета-арсената (в желудке или во время хранения) и риск образования токсичного хлорида мышьяка (III) из ионов хлорида в желудке сводятся к минимуму за счет использования подходящих наполнителей и носителей, а также подходящего энтеросолюбильного покрытия нужной толщины. Растворение твердой фармацевтической композиции с энтеросолюбильным покрытием в тонком кишечнике может быстро происходить или происходить в течение длительного периода времени (например, 0,5 часа, 0,75 часа, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 часов, предпочтительно в течение 2 часов).

Предпочтительные варианты воплощения фармацевтической композиции для перорального введения описаны ниже. Фармацевтическая композиция для перорального введения может быть изготовлена согласно эффективным способам, которые описаны ниже.

Фармацевтическая композиция для перорального введения

В одном варианте воплощения, фармацевтическая композиция, которая подходит для перорального введения, содержит:

- (а) твердое ядро, содержащее мета-арсенит натрия или мета-арсенит калия и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, где одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ выбирают таким образом, что окисление мета-арсенита до мета-арсената сводится к минимуму;

а также,

(b) энтеросолюбильное покрытие, содержащее энтеросолюбильный полимер;

при этом, массовая доля энтеросолюбильного покрытия составляет от примерно 6% масс./масс. до примерно 20% масс./масс. по отношению к общей массе фармацевтической композиции, а толщина покрытия составляет от примерно 6,5% до примерно 15% толщины фармацевтической композиции.

Например, в приведенном выше варианте воплощения, одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ могут быть выбраны из наполнителя или разбавителя, дезинтегранта, глиданта, смазывающего вещества и связывающего вещества. В некоторых вариантах воплощения, твердое ядро может содержать два или более из этих вспомогательных веществ, три или более из этих вспомогательных веществ, четыре или более из этих вспомогательных веществ или все эти вспомогательные вещества. Таким образом, в некоторых вариантах воплощения, твердое ядро содержит наполнитель или разбавитель, разрыхлитель, дезинтегрант, смазывающее вещество и связывающее вещество.

В одном варианте воплощения, фармацевтическая композиция, которая подходит для перорального введения, содержит:

(a) твердое ядро, содержащее мета-арсенит натрия или мета-арсенит калия и следующие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества:

(i) наполнитель или разбавитель в диапазоне примерно от 5% до 95% масс./масс.,

(ii) дезинтегрант в диапазоне примерно от 10% до 90% масс./масс.,

(iii) глидант в диапазоне примерно от 0,1% до 5% масс./масс.,

(iv) смазывающее вещество в диапазоне примерно от 0,1% до 5% масс./масс.,

и

(v) необязательно связывающее вещество в диапазоне от 0 до примерно 30% масс./масс.;

а также,

(b) энтеросолюбильное покрытие, содержащее энтеросолюбильный полимер;

при этом, фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества выбраны таким образом, что окисление мета-арсенита в мета-арсенат сведено к минимуму,

при этом, массовый процент энтеросолюбильного покрытия составляет от примерно 6% масс./масс. до примерно 20% масс./масс. по отношению к общей массе фармацевтической композиции, и

5 при этом, толщина покрытия составляет от примерно 6,5% до примерно 15% толщины фармацевтической композиции.

Фармацевтическая композиция может быть в форме таблетки с энтеросолюбильным покрытием или капсулы с энтеросолюбильным покрытием. В некоторых вариантах воплощения, фармацевтическая композиция представляет собой таблетку с энтеросолюбильным покрытием. В некоторых вариантах воплощения, фармацевтическая композиция представляет собой капсулу с энтеросолюбильным покрытием.

Активным фармацевтическим ингредиентом (АФИ) в фармацевтической композиции является мета-арсенит натрия или мета-арсенит калия.

15 Мета-арсенит натрия и мета-арсенит калия в промышленных масштабах можно получить с высокой степенью чистоты (> 98% As (III) и минимальными уровнями As (V)). Мета-арсенит натрия и мета-арсенит калия являются гигроскопичными.

20 Являясь неорганическими соединениями, как мета-арсенит натрия так и мета-арсенит калия имеют более высокую (истинную) плотность частиц (например, приблизительно от 2,1 до 2,3 г/см³ для мета-арсенита натрия и около 8,76 г/см³ для мета-арсенита калия) по сравнению с типичными вспомогательными веществами в таблетке (как правило, типичными вспомогательными веществами для таблеток являются органические вещества с плотностью приблизительно от 1,2 до 1,6 г/см³).

25 В том случае, если имеются различия в размерах частиц АФИ и размерах частиц наполнителей, то тогда присутствует большая вероятность разделения АФИ в композициях. Специалисту в данной области должно быть понятно, что использование предпочтительного размера частиц АФИ преимущественно приводит к улучшенному смешиванию порошков и однородности смеси, сводит к минимуму или устраняет сегрегацию в порошках при прессовании и обеспечивает удовлетворительную однородность содержания в композициях.

30 В некоторых вариантах воплощения для перорального введения, размер частиц АФИ составляет примерно от 50 до 150 микрон. В некоторых вариантах воплощения, размер частиц АФИ составляет примерно от 70 до 120 микрон. В некоторых вариантах воплощения, размер частиц АФИ составляет примерно от 90 до 100 микрон.

В некоторых вариантах воплощения, АФИ представляет собой мета-арсенит натрия.

В некоторых вариантах воплощения, АФИ представляет собой мета-арсенит калия.

5 В некоторых вариантах воплощения, количество АФИ в твердом ядре фармацевтической композиции для перорального введения составляет примерно от 0,1% до 5,0% масс./масс. твердого ядра, предпочтительно примерно от 0,5% до 3,0% масс./масс. твердого ядра, более предпочтительно примерно от 1,0% до 2,5% масс./масс. твердого ядра, еще более предпочтительно примерно от 1,5% до 2,0%
10 масс./масс. твердого ядра и наиболее предпочтительно примерно от 1,6% до 1,8% масс./масс. твердого ядра, например, примерно 1,65% масс./масс., примерно 1,66% масс./масс., примерно 1,67% масс./масс., примерно 1,68% масс./масс., примерно 1,69% масс./масс., примерно 1,70% масс./масс., примерно 1,71% масс./масс., примерно 1,72% масс./масс., примерно 1,73% масс./масс., примерно 1,74% масс./масс. или примерно
15 1,75% масс./масс. твердого ядра.

В некоторых вариантах воплощения, размер частиц АФИ и размер частиц фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ являются аналогичными. Преимущество заключается в том, что использование АФИ и наполнителей с одинаковыми размерами частиц может привести к улучшению смешивания порошков и
20 однородности смеси, может свести к минимуму или устранить сегрегацию в порошках при прессовании и может обеспечить удовлетворительную однородность содержания в композициях.

В некоторых вариантах воплощения, АФИ является микронизированным. Специалисту в данной области должно быть понятно, что когда АФИ присутствует в
25 малых количествах, то уменьшение размера частиц АФИ путем микронизации может улучшить однородность смеси и однородность содержания в дозированных формах (таких как таблетки).

В некоторых вариантах воплощения, АФИ не является микронизированным. Специалисту в данной области должно быть понятно, что микронизация гигроскопичных
30 АФИ (таких как мета-арсенит натрия и мета-арсенит калия) может привести к повышенному риску разложения из-за более высокой площади поверхности и реакционной способности.

В одном варианте воплощения, фармацевтическая композиция для перорального введения в дополнение к мета-арсениту натрия или мета-арсениту калия может

содержать один или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, которые выбирают таким образом, чтобы минимизировать окисление мета-арсенита в мета-арсенат.

5 В некоторых вариантах воплощения, фармацевтически приемлемые наполнители выбирают таким образом, чтобы менее чем примерно 10% масс./масс., предпочтительно, менее чем примерно 5% масс./масс., более предпочтительно, менее чем примерно 2% масс./масс., еще более предпочтительно, менее чем примерно 1% масс./масс. и наиболее предпочтительно, менее чем примерно 0,5% масс./масс. мета-арсенита натрия или мета-арсенита калия окислялось до мета-арсената натрия или мета-арсената калия в результате хранения при комнатной температуре в течение по
10 меньшей мере примерно 1 месяца, предпочтительно по меньшей мере на протяжении примерно 2 месяцев, более предпочтительно, по крайней мере, на протяжении примерно 3 месяцев, еще более предпочтительно, по крайней мере, на протяжении примерно 4 месяцев и наиболее предпочтительно, по крайней мере, на протяжении
15 примерно 6 месяцев.

В другом варианте воплощения, помимо мета-арсенита натрия или мета-арсенита калия, фармацевтическая композиция для перорального введения содержит следующие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества:

- (i) наполнитель или разбавитель,
- 20 (ii) дезинтегрант,
- (iii) глидант,
- (iv) смазывающее вещество, а также
- (v) необязательно связывающее вещество.

25 Специалистам в данной области должно быть понятно, что некоторые вспомогательные вещества являются мультифункциональными. Если вспомогательное вещество, которое входит в состав фармацевтической композиции, выполняет несколько функций, то считается, что фармацевтическая композиция включает вспомогательные вещества с такими функциями. Например, если вспомогательное вещество действует и как связующее, и как дезинтегрант, тогда подразумевается, что фармацевтическая
30 композиция содержит связующее и дезинтегрант.

Как правило, один или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ совместимы с мета-арсенитом натрия или калия. Предпочтительно, фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества имеют

низкий уровень влажности или низкую активность воды, для того чтобы свести к минимуму возможность окисления мета-арсенита в мета-арсенат. Таким образом, фармацевтическая композиция для перорального введения предпочтительно не содержит вспомогательные вещества с высоким уровнем влажности или высокой активностью воды (такие вспомогательные вещества могут катализировать окисление, например, вспомогательные вещества с ионами металлов, в частности железа). Однако специалистам в данной области техники будет понятно, что существует предел практичности такого состояния в фармацевтической композиции для перорального введения, поскольку для удовлетворительного сжатия необходима некоторая доступная влага.

В некоторых вариантах воплощения, размер частиц АФИ и размер частиц фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ аналогичны. Преимущество заключается в том, что использование АФИ и наполнителей с одинаковыми размерами частиц может привести к улучшенному смешиванию порошков и однородности смеси, а также может свести к минимуму или устранить сегрегацию в порошках при прессовании и может обеспечить удовлетворительную однородность содержания в твердом ядре.

В некоторых вариантах воплощения, где это возможно, варианты основных наполнителей с более высокой плотностью выбирают, чтобы соответствовать плотности мета-арсенита натрия или мета-арсенита калия (оценочная истинная плотность мета-арсенита натрия составляет приблизительно от 2,1 до 2,3 г/см³, а мета-арсенит калия имеет расчетную истинную плотность приблизительно 8,76 г/см³); типичные вспомогательные вещества таблеток, представляющие собой органические вещества, имеют плотность приблизительно от 1,2 до 1,6 г/см³.

Наполнитель или разбавитель могут быть выбраны, например, из безводного двухосновного фосфата кальция, частично прежелатинизированного крахмала, силикатизированной микрокристаллической целлюлозы, микрокристаллической целлюлозы, дигидрата сульфата кальция, лактозы, гидрофосфата кальция, карбоната кальция, карбоната натрия, фосфата кальция, фосфата натрия или их смеси. В некоторых вариантах воплощения, наполнитель или разбавитель представляет собой безводный двухосновный фосфат кальция, частично прежелатинизированный крахмал или их смесь. В некоторых вариантах воплощения, наполнитель или разбавитель представляет собой безводный двухосновный фосфат кальция. В некоторых вариантах воплощения, наполнитель или разбавитель представляет собой частично прежелатинизированный крахмал. В некоторых вариантах воплощения, разбавитель может представлять собой разбавитель прессуемого вещества, например,

силикатированная микрокристаллическая целлюлоза, микрокристаллическая целлюлоза или частично прежелатинизированный крахмал.

Наполнитель или разбавитель могут присутствовать в твердом ядре фармацевтической композиции для перорального введения в количестве от примерно 5% до 95% масс./масс. твердого ядра. В некоторых вариантах воплощения, наполнитель или разбавитель присутствует в твердом ядре фармацевтической композиции в количестве примерно от 10% до 90% масс./масс. твердого ядра, т.е. приблизительно около 10% масс./масс. твердого ядра, приблизительно около 15% масс./масс. твердого ядра, приблизительно около 20% масс./масс. твердого ядра, приблизительно около 25% масс./масс. твердого ядра, приблизительно около 30% масс./масс. твердого ядра, приблизительно около 35% масс./масс. твердого ядра, приблизительно около 40% масс./масс. твердого ядра, приблизительно около 45% масс./масс. твердого ядра, приблизительно около 50% масс./масс. твердого ядра, приблизительно около 55% масс./масс. твердого ядра, приблизительно около 60% масс./масс. твердого ядра, приблизительно около 65% масс./масс. твердого ядра, приблизительно около 70% масс./масс. твердого ядра, приблизительно около 75% масс./масс. твердого ядра, приблизительно около 80% масс./масс. твердого ядра, приблизительно около 85% масс./масс. твердого ядра или приблизительно около 90% масс./масс. твердого ядра.

Дезинтегрант может быть выбран, например, из L-гидроксипропилцеллюлозы, частично прежелатинизированного крахмала, кросповидона, картофельного крахмала, кукурузного крахмала, крахмалгликолята натрия и альгиновой кислоты. Крахмалгликолят натрия и кросповидон являются супер дезинтегрантами. В некоторых вариантах воплощения, дезинтегрант представляет собой L-гидроксипропилцеллюлозу, частично прежелатинизированный крахмал, крахмалгликолят натрия или смесь двух или более из них. В некоторых вариантах воплощения, дезинтегрант представляет собой L-гидроксипропилцеллюлозу. В некоторых вариантах воплощения, дезинтегрант представляет собой частично прежелатинизированный крахмал. В некоторых вариантах воплощения, дезинтегрант представляет собой крахмалгликолят натрия.

Дезинтегрант может присутствовать в твердом ядре фармацевтической композиции для перорального введения в количестве примерно от 10% до 90% масс./масс. твердого ядра, например примерно от 10% до 50% масс./масс. твердого ядра. В некоторых вариантах воплощения, разрыхлитель присутствует в твердом ядре фармацевтической композиции для перорального введения в количестве примерно от 15% до 85% масс./масс. твердого ядра, например приблизительно около 15% масс./масс. твердого ядра, приблизительно около 20% масс./масс. твердого ядра, приблизительно около 25% масс./масс. твердого ядра, приблизительно около 30% масс./масс. твердого

ядра, приблизительно около 35% масс./масс. твердого ядра, приблизительно около 40% масс./масс. твердого ядра, приблизительно около 45% масс./масс. твердого ядра, приблизительно около 50% масс./масс. твердого ядра, приблизительно около 55% масс./масс. твердого ядра, приблизительно около 60% масс./масс. твердого ядра, приблизительно около 65% масс./масс. твердого ядра, приблизительно около 70% масс./масс. твердого ядра, приблизительно около 75% масс./масс. твердого ядра, приблизительно около 80% масс./масс. твердого ядра, или приблизительно около 85% масс./масс. твердого ядра.

Регулятор сыпучести (глидант) может быть выбран, например, из коллоидного диоксида кремния и талька. В некоторых вариантах воплощения, регулятор сыпучести (глидант) представляет собой коллоидный диоксид кремния. В некоторых вариантах воплощения, глидант представляет собой тальк.

Глидант может присутствовать в твердом ядре фармацевтической композиции для перорального введения в количестве примерно от 0,1% до 5% масс./масс. твердого ядра. В некоторых вариантах воплощения, глидант присутствует в твердом ядре фармацевтической композиции для перорального введения в количестве примерно от 0,3% до 4% масс./масс. твердого ядра, например примерно 0,3% масс./масс. твердого ядра, примерно 0,4% масс./масс. твердого ядра, примерно 0,5% масс./масс. твердого ядра, примерно 0,6% масс./масс. твердого ядра, примерно 0,7% масс./масс. твердого ядра, примерно 0,8% масс./масс. твердого ядра, примерно 0,9% масс./масс. твердого ядра, примерно 1,0% масс./масс. твердого ядра, примерно 1,1% масс./масс. твердого ядра, примерно 1,2% масс./масс. твердого ядра, примерно 1,3% масс./масс. твердого ядра, примерно 1,4% масс./масс. твердого ядра, примерно 1,5% масс./масс. твердого ядра, примерно 1,6% масс./масс. твердого ядра, примерно 1,7% масс./масс. твердого ядра, примерно 1,8% масс./масс. твердого ядра, примерно 1,9 % масс./масс. твердого ядра, примерно 2,0 % масс./масс. твердого ядра, примерно 2,1 % масс./масс. твердого ядра, примерно 2,2 % масс./масс. твердого ядра, примерно 2,3 % масс./масс. твердого ядра, примерно 2,4 % масс./масс. твердого ядра, примерно 2,5 % масс./масс. твердого ядра, примерно 2,6 % масс./масс. твердого ядра, примерно 2,7% масс./масс. твердого ядра, примерно 2,8% масс./масс. твердого ядра, примерно 2,9% масс./масс. твердого ядра, примерно 3,0% масс./масс. твердого ядра, примерно 3,1% масс./масс. твердого ядра, примерно 3,2% масс./масс. твердого ядра, примерно 3,3% масс./масс. твердого ядра, примерно 3,4% масс./масс. твердого ядра, примерно 3,5% масс./масс. твердого ядра, примерно 3,6% масс./масс. твердого ядра, примерно 3,7% масс./масс. твердого ядра, примерно 3,8% масс./масс. твердого ядра, примерно 3,9% масс./масс. твердого ядра или примерно 4,0% масс./масс. твердого ядра.

Смазывающее вещество как может быть выбрано, например, из стеарилфумарата натрия, стеарата магния, стеариновой кислоты, талька и диоксида кремния. В некоторых вариантах воплощения, смазывающее вещество представляет собой стеарилфумарат натрия. В некоторых вариантах воплощения, смазывающее вещество представляет собой стеарат магния. В некоторых вариантах воплощения, смазывающее вещество представляет собой стеариновую кислоту. В некоторых вариантах воплощения, смазывающее вещество представляет собой тальк. В некоторых вариантах воплощения, смазывающее вещество представляет собой диоксид кремния.

Смазывающее вещество может присутствовать в твердом ядре фармацевтической композиции для перорального введения в количестве примерно от 0,1% до 5% масс./масс. твердого ядра. В некоторых вариантах воплощения, смазывающее вещество присутствует в твердом ядре фармацевтической композиции для перорального введения в количестве примерно от 0,3% до 4% масс./масс. твердого ядра, например примерно 0,3% масс./масс. твердого ядра, примерно 0,4% масс./масс. твердого ядра, примерно 0,5% масс./масс. твердого ядра, примерно 0,6% масс./масс. твердого ядра, примерно 0,7% масс./масс. твердого ядра, примерно 0,8% масс./масс. твердого ядра, примерно 0,9% масс./масс. твердого ядра, примерно 1,0% масс./масс. твердого ядра, примерно 1,1% масс./масс. твердого ядра, примерно 1,2% масс./масс. твердого ядра, примерно 1,3% масс./масс. твердого ядра, примерно 1,4% масс./масс. твердого ядра, примерно 1,5% масс./масс. твердого ядра, примерно 1,6% масс./масс. твердого ядра, примерно 1,7% масс./масс. твердого ядра, примерно 1,8 % масс./масс. твердого ядра, примерно 1,9% масс./масс. твердого ядра, примерно 2,0 % масс./масс. твердого ядра, примерно 2,1% масс./масс. твердого ядра, примерно 2,2 % масс./масс. твердого ядра, примерно 2,3% масс./масс. твердого ядра, примерно 2,4 % масс./масс. твердого ядра, примерно 2,5% масс./масс. твердого ядра, примерно 2,6 % масс./масс. твердого ядра, примерно 2,7% масс./масс. твердого ядра, примерно 2,8 % масс./масс. твердого ядра, примерно 2,9% масс./масс. твердого ядра, примерно 3,0 % масс./масс. твердого ядра, примерно 3,1% масс./масс. твердого ядра, примерно 3,2% масс./масс. твердого ядра, примерно 3,3% масс./масс. твердого ядра, примерно 3,4% масс./масс. твердого ядра, примерно 3,5% масс./масс. твердого ядра, примерно 3,6% масс./масс. твердого ядра, примерно 3,7% масс./масс. твердого ядра, примерно 3,8% масс./масс. твердого ядра, примерно 3,9% масс./масс. твердого ядра или примерно 4,0% масс./масс. твердого ядра.

Если в композиции присутствует связывающее вещество, тогда оно может быть выбрано, например, из силикатированной микрокристаллической целлюлозы, микрокристаллической целлюлозы, частично прежелатинизированного крахмала, L-

гидроксипропилцеллюлозы (низкозамещенной гидроксипропилцеллюлозы), гидроксипропилцеллюлозы, коповидона (поливинилпирролидона), прежелатинизированного кукурузного крахмала, гидроксипропилметилцеллюлозы, крахмала, аравийской камеди, кукурузного крахмала и желатина. В некоторых вариантах воплощения, связывающее вещество представляет собой L-гидроксипропилцеллюлозу (низкозамещенную гидроксипропилцеллюлозу). В некоторых вариантах воплощения, связывающее вещество представляет собой смесь L-гидроксипропилцеллюлозы (низкозамещенной гидроксипропилцеллюлозы) и гидроксипропилцеллюлозы. В некоторых вариантах воплощения, связывающее вещество представляет собой частично прежелатинизированный крахмал.

Связывающее вещество может присутствовать в твердом ядре фармацевтической композиции для перорального введения в количестве примерно от 0 до 30% масс./масс. твердого ядра. В некоторых вариантах воплощения, связывающее вещество присутствует в твердом ядре фармацевтической композиции для перорального введения в количестве примерно от 1% до 30% масс./масс. твердого ядра, например, примерно от 5% до 25% масс./масс. твердого ядра. Например, связывающее вещество может присутствовать в твердом ядре фармацевтической композиции в количестве примерно 5% масс./масс. твердого ядра, примерно 10% масс./масс. твердого ядра, примерно 15% масс./масс. твердого ядра, примерно 20% масс./масс. твердого ядра, примерно 25% масс./масс. твердого ядра, примерно 30% масс./масс. твердого ядра.

Фармацевтическая композиция для перорального введения может необязательно содержать антиоксидант в твердом ядре. Антиоксиданты действуют как восстановители за счет: (а) снижения окислительно-восстановительного потенциала, (б) поглощения кислорода или (в) прекращения свободнорадикальных реакций (действуя как ингибиторы свободных радикалов). Механизмы (а) и (б) в наибольшей степени относятся к разложению мета-арсенита натрия или мета-арсенита калия до мета-арсената натрия или мета-арсената калия. В композиции, антиоксидант преимущественно снижает или предотвращает окисление As(III) до As(V).

Примеры антиоксидантов, которые могут быть использованы в твердом ядре, включают: сульфит натрия, бисульфит натрия, метабисульфит натрия, сульфат натрия, тиосульфат натрия, гидрохлорид цистеина, аскорбиновую кислоту, пропилгаллат, бутилированный гидрокситолуол (БГТ) и бутилированный гидроксианизол (БГА).

Антиоксидант может присутствовать в твердом ядре в количестве примерно от 0,01% до 0,2% масс./масс., например, 0,01% масс./масс., 0,02% масс./масс., 0,03%

масс./масс., 0,04% масс./масс., 0,05% масс./масс., 0,06% масс./масс., 0,07% масс./масс., 0,08% масс./масс., 0,09% масс./масс., 0,10% масс./масс., 0,11% масс./масс., 0,12% масс./масс., 0,13% масс./масс., 0,14% масс./масс., 0,15% масс./масс., 0,16% масс./масс., 0,17% масс./масс., 0,18% масс./масс., 0,19% масс./масс. или 0,20% масс./масс. твердого ядра.

Следует понимать, что специалисту в данной области должно быть известно, что количества АФИ (мета-арсенита натрия или мета-арсенита калия), наполнителей и других ингредиентов в твердом ядре отрегулированы так, чтобы они составляли 100% твердого ядра.

Преимущественно твердое ядро фармацевтической композиции для перорального введения имеет хорошую однородность смеси и однородность содержимого благодаря использованию подходящих вспомогательных веществ, как описано выше.

В некоторых вариантах воплощения, твердое ядро фармацевтической композиции для перорального введения не содержит одного или нескольких из следующих компонентов: силикатированной микрокристаллической целлюлозы, микрокристаллической целлюлозы, дигидрат сульфата кальция, коповидон (поливинилпирролидон), кросповидон, стеариновую кислоту, тальк и натрия метабисульфит.

Фармацевтическая композиция для перорального введения может включать энтеросолюбильное покрытие, содержащее энтеросолюбильный полимер. Энтеросолюбильное покрытие может быть нанесено с использованием подходящих способов покрытия, известных в данной области техники. Материал энтеросолюбильного покрытия может быть диспергирован или растворен либо в воде, либо в подходящих органических растворителях.

Для энтеросолюбильного покрытия в качестве полимеров могут быть использованы один или несколько, по отдельности или в комбинации, следующие вещества из представленных: растворы или дисперсии сополимеров акриловых кислот и их сложных эфиров или метакриловых кислот или их сложных эфиров, полисорбаты, ацетат-фталатные полимеры целлюлозы, полимеры фталата гидроксипропилметилцеллюлозы, сукцинат ацетата гидроксипропилметилцеллюлозы, фталат поливинилацетата, тримеллитат ацетата целлюлозы, карбоксиметилэтилцеллюлоза, шеллак или другой подходящий полимер(ы) для энтеросолюбильного покрытия.

В некоторых вариантах воплощения, энтеросолюбильное покрытие представляет собой покрытие на основе метакрилата, например, содержащее сополимер метакриловой кислоты и этилакрилата. Некоторые из используемых продуктов являются коммерчески доступными в продаже.

5 Полимерные продукты для энтеросолюбильного покрытия доступны от Rohm GmbH & Co., Darmstadt, Germany, под торговой маркой EUDRAGIT®, включая L100, L100- 55 и S100. Примеры используемых продуктов EUDRAGIT® включают EUDRAGIT L100-55, EUDRAGIT S100 и EUDRAGIT L30D-55. EUDRAGIT L100-55 представляет собой сополимер метакриловой кислоты и этилакрилата (1:1). EUDRAGIT S100 представляет собой сополимер метакриловой кислоты и метилметакрилата (1:2). EUDRAGIT L30D 55 представляет собой водную дисперсию pH-зависимого полимера, растворимого при pH 5,5 или выше, используемый для адресной доставки в двенадцатиперстную кишку. Соплимер метакриловой кислоты EUDRAGIT L30D-55 представляет собой сополимер метакриловой кислоты и этилакрилата в соотношении 1:1 и имеет формулу
15 $(C_5H_2O_2 \cdot C_4H_6O_2)_x$.

Acryl-EZE® от Colorcon представляет собой водную акриловую энтеросолюбильную систему, диспергируемую в воде, для нанесения энтеросолюбильного пленочного покрытия на твердые лекарственные формы, такие как таблетки, гранулы и шарики. Примеры используемых продуктов Acryl-EZE® включают
20 Acryl-EZE II white (493Z180022) и Acryl-EZE Green (93O11863).

Энтеросолюбильное покрытие может дополнительно содержать фармацевтически приемлемые пластификаторы для получения желаемых механических свойств, таких как гибкость и твердость энтеросолюбильного покрытия. Такими пластификаторами являются, например, но не ограничиваясь ими, триацетин, сложные эфиры лимонной кислоты, сложные эфиры фталевой кислоты, дибутилсебацат, цетиловый спирт, полиэтиленгликоли, полисорбаты или другие пластификаторы. Агенты, препятствующие слипанию, такие как, например, стеарат магния, диоксид титана, тальк и другие добавки, также могут быть включены в энтеросолюбильное покрытие.
25

В некоторых вариантах воплощения изобретения, энтеросолюбильное покрытие предусматривает увеличение массы твердого ядра примерно на 7-17% масс./масс., т.е. увеличение массы примерно от 8% до 14% масс./масс. твердого ядра. В некоторых вариантах воплощения, энтеросолюбильное покрытие обеспечивает увеличение массы примерно на 8% масс./масс., увеличение массы примерно на 8,5% масс./масс., увеличение массы примерно на 9% масс./масс., увеличение массы примерно на 9,5% масс./масс., увеличение массы примерно на 10% масс./масс., увеличение массы
35

примерно на 10,5% масс./масс., увеличение массы примерно на 11% масс./масс., увеличение массы примерно на 11,5% масс./масс., увеличение массы примерно на 12% масс./масс., увеличение массы примерно на 12,5% масс./масс., увеличение массы примерно на 13% масс./масс., увеличение массы примерно на 13,5% масс./масс. или
5 увеличение массы примерно на 14% масс./масс. В некоторых вариантах воплощения, энтеросолюбильное покрытие обеспечивает увеличение массы твердого ядра примерно на 12% масс./масс.

В некоторых вариантах воплощения, перед нанесением энтеросолюбильного покрытия, на твердое ядро может быть нанесено внутреннее покрытие с
10 использованием полимеров, известных в данной области техники как пригодные для внутреннего покрытия.

Фармацевтическая композиция для перорального введения в одном варианте воплощения является твердой, покрытой энтеросолюбильным покрытием и подходящей для перорального введения, т.е. представляет собой таблетки с энтеросолюбильным
15 покрытием или капсулы с энтеросолюбильным покрытием.

В некоторых вариантах воплощения, фармацевтическая композиция для перорального введения представляет собой таблетку с энтеросолюбильным покрытием, которая имеет твердое ядро диаметром примерно от 5 мм до 8 мм. Диаметр представляет собой диаметр самого широкого измерения твердого ядра. В некоторых
20 вариантах воплощения, диаметр твердого ядра составляет примерно от 5,5 мм до 7,5 мм. В некоторых вариантах воплощения, диаметр твердого ядра составляет примерно от 6,0 мм до 7 мм, например, приблизительно 6 мм, приблизительно 6,5 мм или приблизительно 7 мм. Предпочтительно фармацевтическая композиция для перорального введения представляет собой таблетку с энтеросолюбильным покрытием,
25 имеющую твердое ядро диаметром 6,5 мм. Более предпочтительно, фармацевтическая композиция, согласно данному изобретению, представляет собой таблетку с энтеросолюбильным покрытием, которая имеет твердое ядро диаметром 6,5 мм и содержит мета-арсенит натрия.

В некоторых вариантах воплощения, толщина твердого ядра таблетки с энтеросолюбильным покрытием может составлять приблизительно от 2 мм до 6 мм,
30 например, приблизительно от 2 мм до 5 мм. Толщина твердого ядра таблетки с энтеросолюбильным покрытием представляет собой глубину твердого ядра, то есть высоту твердого ядра, измеренную, когда твердое ядро лежит на плоской поверхности. В некоторых вариантах воплощения, толщина твердого ядра таблетки с
35 энтеросолюбильным покрытием составляет приблизительно от 3 мм до 4,5 мм. В

некоторых вариантах воплощения, толщина твердого ядра таблетки с энтеросолюбильным покрытием составляет приблизительно от 3,1 мм до 4,2 мм, например, приблизительно 3,1 мм, приблизительно 3,2 мм, приблизительно 3,3 мм, приблизительно 3,4 мм, приблизительно 3,5 мм, приблизительно 3,6 мм, приблизительно 3,7 мм, приблизительно 3,8 мм, приблизительно 3,9 мм, приблизительно 4,0 мм, приблизительно 4,1 мм или приблизительно 4,2 мм. Предпочтительно толщина твердого ядра таблетки с энтеросолюбильным покрытием составляет приблизительно 3,4 мм, приблизительно 3,5 мм, приблизительно 3,6 мм, приблизительно 3,7 мм, приблизительно 3,8 мм или приблизительно 3,9 мм.

В некоторых вариантах воплощения, фармацевтическая композиция для перорального введения представляет собой капсулу с энтеросолюбильным покрытием, которая имеет твердое ядро, имеющее длину приблизительно от 8,0 мм до 16 мм. В некоторых вариантах воплощения, длина твердого ядра составляет приблизительно от 8,5 мм до 15 мм. В некоторых вариантах воплощения, длина твердого ядра составляет приблизительно от 8,5 мм до 14,5 мм, например, приблизительно 8,5 мм, приблизительно 9,0 мм, приблизительно 9,5 мм, приблизительно 10,0 мм, приблизительно 10,5 мм, приблизительно 11,0 мм, приблизительно 11,5 мм, приблизительно 12,0 мм, приблизительно 12,5 мм, приблизительно 13,0 мм, приблизительно 13,5 мм, приблизительно 14 мм или приблизительно 14,5 мм. Предпочтительно фармацевтическая композиция для перорального введения представляет собой капсулу с энтеросолюбильным покрытием, которая имеет твердое ядро длиной приблизительно 14,3 мм. Более предпочтительно, фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению представляет собой капсулу с энтеросолюбильным покрытием, которая имеет твердое ядро длиной приблизительно 14,3 мм и содержит мета-арсенит натрия.

В некоторых вариантах воплощения, толщина твердого ядра капсулы с энтеросолюбильным покрытием может составлять примерно от 3 мм до 8 мм, например, примерно от 4,0 мм до 7,0 мм. Толщина твердого ядра капсулы с энтеросолюбильным покрытием представляет собой глубину твердого ядра, то есть высоту твердого ядра, измеренную, когда твердое ядро лежит на плоской поверхности. В некоторых вариантах воплощения, толщина твердого ядра составляет примерно от 4,5 мм до 6,5 мм, например, примерно 4,5 мм, примерно 4,6 мм, примерно 4,7 мм, примерно 4,8 мм, примерно 4,9 мм, примерно 5,0 мм, примерно 5,1 мм, примерно 5,2 мм, примерно 5,3 мм, примерно 5,4 мм, примерно 5,5 мм, примерно 5,6 мм, примерно 5,7 мм, примерно 5,8 мм, примерно 5,9 мм, примерно 6,0 мм, примерно 6,1 мм, примерно 6,2 мм, примерно 6,3 мм,

примерно 6,4 мм или примерно 6,5 мм. Предпочтительно толщина твердого ядра капсулы с энтеросолюбильным покрытием составляет примерно 5,31 мм.

В некоторых вариантах воплощения, твердость твердого ядра составляет от около 50 Н до около 200 Н, например, от примерно 50 Н до примерно 150 Н или от примерно 70 Н до примерно 120 Н. В некоторых вариантах воплощения, твердость твердого ядра составляет от примерно 80 Н до примерно 115 Н, например, примерно 85 Н, примерно 90 Н, примерно 95 Н, примерно 100 Н, примерно 105 Н или примерно 110 Н. В некоторых вариантах воплощения, твердость твердого ядра составляет по меньшей мере приблизительно 50 Н, по меньшей мере приблизительно 55 Н, по меньшей мере приблизительно 60 Н, по меньшей мере приблизительно 65 Н, по меньшей мере приблизительно 70 Н, по меньшей мере приблизительно 75 Н, по меньшей мере приблизительно 80 Н, по меньшей мере приблизительно 85 Н, по меньшей мере приблизительно 90 Н, по меньшей мере приблизительно 95 Н, по меньшей мере приблизительно 100 Н, по меньшей мере приблизительно 105 Н, по меньшей мере приблизительно 110 Н, по меньшей мере приблизительно 115 Н, по меньшей мере приблизительно 120 Н, по меньшей мере приблизительно 125 Н, по меньшей мере приблизительно 130 Н, по меньшей мере приблизительно 135 Н, по меньшей мере приблизительно 140 Н, по меньшей мере приблизительно 145 Н по меньшей мере приблизительно 150 Н, по меньшей мере приблизительно 155 Н, по меньшей мере приблизительно 160 Н, по меньшей мере приблизительно 165 Н, по меньшей мере приблизительно 170 Н, по меньшей мере приблизительно 175 Н, по меньшей мере приблизительно 180 Н, по меньшей мере приблизительно 185 Н, по меньшей мере приблизительно 190 Н, по меньшей мере приблизительно 195 Н или примерно 200 Н. Предпочтительно твердость твердого ядра составляет по меньшей мере приблизительно 85 Н, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90 Н, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 100 Н, а наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно 110 Н. Обычно, твердость твердого ядра не превышает примерно 210 Н.

В некоторых вариантах воплощения, хрупкость твердого ядра составляет менее чем приблизительно 0,5%, предпочтительно менее чем приблизительно 0,45%, более предпочтительно менее чем приблизительно 0,4%, еще более предпочтительно менее чем приблизительно 0,35% и наиболее предпочтительно менее чем приблизительно 0,3%. В некоторых вариантах воплощения, хрупкость твердого ядра составляет менее чем приблизительно 0,25%. В некоторых вариантах воплощения, хрупкость твердого ядра составляет менее чем приблизительно 0,2%. В некоторых вариантах воплощения, хрупкость твердого ядра составляет менее чем приблизительно 0,15%. В некоторых

вариантах воплощения, хрупкость твердого ядра составляет менее чем приблизительно 0,1%, например, приблизительно 0,08%.

В некоторых вариантах воплощения, масса твердого ядра составляет примерно от 50 мг до 250 мг. В некоторых вариантах воплощения, масса твердого ядра составляет примерно от 80 мг до 220 мг. В некоторых вариантах воплощения, масса твердого ядра составляет примерно от 100 мг до 200 мг. В некоторых вариантах воплощения, масса твердого ядра составляет примерно от 120 мг до 180 мг. В некоторых вариантах воплощения, масса твердого ядра составляет примерно от 140 мг до 160 мг, например, примерно 140 мг, примерно 145 мг, примерно 150 мг, примерно 155 мг или примерно 160 мг. Предпочтительно, масса твердого ядра составляет 150 мг.

В некоторых вариантах воплощения, фармацевтическая композиция для перорального введения содержит твердое ядро, выбранное из следующего:

- твердое ядро, содержащее мета-арсенит натрия, безводный двухосновный фосфат кальция, L-гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, коллоидный диоксид кремния и стеарилфумарат натрия;

- твердое ядро, содержащее мета-арсенит натрия, безводный порошок двухосновного фосфата кальция, частично прежелатинизированный крахмал, безводный двухосновный фосфат кальция, гликолят крахмала натрия, коллоидный диоксид кремния и стеарилфумарат натрия;

- твердое ядро, содержащее мета-арсенит натрия, безводный порошок двухосновного фосфата кальция, безводный двухосновный фосфат кальция, L-гидроксипропилцеллюлозу, крахмалгликолят натрия, коллоидный диоксид кремния и стеарилфумарат натрия;

- твердое ядро, содержащее мета-арсенит натрия, безводный двухосновный фосфат кальция, частично прежелатинизированный крахмал, гликолят крахмала натрия, коллоидный диоксид кремния и стеарилфумарат натрия; а также

- твердое ядро, состоящее из мета-арсенита натрия, безводного двухосновного фосфата кальция, силикатированной микрокристаллической целлюлозы, крахмалгликолята натрия, коллоидного диоксида кремния и стеарилфумарата натрия.

В некоторых вариантах воплощения, фармацевтическая композиция для перорального введения представляет собой таблетку с энтеросолюбильным покрытием, содержащую 1,67% масс./масс. мета-арсенита натрия твердого ядра, имеющую диаметр твердого ядра около 6,5 мм, массу твердого ядра 150 мг и энтеросолюбильное покрытие, которое имеет увеличение массы твердого ядра приблизительно 12% масс./масс.

В некоторых вариантах воплощения, фармацевтическая композиция для перорального введения представляет собой таблетку с энтеросолюбильным покрытием, содержащую 1,67% масс./масс. мета-арсенита натрия твердого ядра, имеющую диаметр твердого ядра около 6,5 мм, массу твердого ядра 150 мг и энтеросолюбильное покрытие, имеющее толщину покрытия около 0,2 мм.

В некоторых вариантах воплощения, после введения фармацевтической композиции для перорального введения, фармацевтическая композиция имеет следующие свойства растворения: не менее 75% за 45 минут, предпочтительно не менее 75% за 30 минут.

В некоторых вариантах воплощения, растворение фармацевтической композиции согласно представленному изобретению и высвобождение АФИ в тонком кишечнике происходит быстро или может происходить в течение длительного периода времени (например, 0,5 часа, 0,75 часа, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 часов), предпочтительно в течение 2 часов).

В некоторых вариантах воплощения, при растворении энтеросолюбильного покрытия твердая сердцевина распадается менее чем за 10 минут, предпочтительно менее чем за 8 минут, более предпочтительно менее чем за 6 минут, еще более предпочтительно менее чем за 5 минут и наиболее предпочтительно менее чем за 4 минуты.

Фармацевтическая композиция для перорального введения предпочтительно представлена в виде стандартных лекарственных форм. Стандартная лекарственная форма может представлять собой упакованный препарат, где упаковка, содержит дискретные количества фармацевтической композиции, такие как упакованные таблетки или капсулы. Кроме того, стандартная лекарственная форма может представлять собой таблетку или капсулу, либо их может быть соответствующее количество в упакованной форме. Упакованная форма может, например, содержать металлическую или пластиковую фольгу, такую как блистерная упаковка, например, такая как блистеры Alu-Alu, которые являются непроницаемыми или менее проницаемыми для кислорода. Упакованная форма может сопровождаться инструкцией по применению.

В некоторых вариантах воплощения, фармацевтическая композиция для перорального введения может храниться при температуре окружающей среды или комнатной температуре в течение по меньшей мере трех месяцев, предпочтительно по меньшей мере шести месяцев, более предпочтительно по меньшей мере одного года и наиболее предпочтительно в течение 18-24 месяцев. В некоторых вариантах

воплощения, фармацевтическую композицию для перорального введения можно хранить в холодильнике (например, при температуре около 2-8°C).

Фармацевтическая композиция может быть изготовлена согласно способам, которые раскрыты в WO 2019/178643 A1.

5 ***Композиции для неперорального введения***

При определенных обстоятельствах, фармацевтические композиции, раскрытые в данном документе, будет желательно применять, парентерально, внутривенно, внутримышечно или даже внутрибрюшинно. Растворы активных соединений в виде свободного основания или фармакологически приемлемых солей могут быть
10 приготовлены в воде, которая соответствующим образом смешана с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсии также могут быть приготовлены в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, а также в маслах. При обычных условиях хранения и применения, эти препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов.

15 Фармацевтические формы, пригодные для инъекций, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Во всех случаях форма должна быть стерильной и жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко набирать шприцем. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения, а
20 также должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их подходящие смеси и/или растительные масла. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования
25 покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае диспергирования и за счет использования поверхностно-активных веществ. Предотвращению действия микроорганизмов могут способствовать различные антибактериальные и противогрибковые средства, например, парабены, хлорбутанол, фенол, сорбиновая кислота, тимеросал и тому подобное. Во многих случаях
30 предпочтительно включать изотонические агенты, например, сахара или хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций может быть обеспечено за счет использования в композициях агентов, замедляющих всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

Например, для парентерального введения, в водном растворе, если это
35 необходимо, раствор следует соответствующим образом забуферить, а жидкий

разбавитель сначала сделать изотоническим с помощью достаточного количества физиологического раствора или глюкозы. Эти конкретные водные растворы особенно подходят для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутривенного введения. В свете настоящего изобретения, стерильная водная среда, которую можно использовать, хорошо известна специалистам в данной области техники. Например, одна доза может быть растворена в 1 мл изотонического раствора NaCl и либо добавлена к 1000 мл жидкости для гиподермолиза, либо введена в предполагаемое место инфузии. Некоторое изменение дозировки обязательно будет иметь место в зависимости от состояния субъекта, которого лечат. Лицо, ответственное за введение, в любом случае определяет соответствующую дозу для отдельного субъекта. Более того, для введения человеку препараты должны соответствовать стерильности, пирогенности и общим стандартам безопасности и чистоты, как того требуют национальные или региональные ведомства по стандартам биологических препаратов.

Стерильные растворы для инъекций готовят путем включения активных соединений в необходимом количестве в соответствующий растворитель с несколькими другими ингредиентами, перечисленными выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии готовят путем включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными методами приготовления являются методы вакуумной сушки и лиофилизации, которые позволяют получить порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

Препараты легко вводятся в различных дозированных формах, таких как растворы для инъекций, капсулы с высвобождением лекарственного средства и т.п.

Терапевтические агенты могут быть подготовлены для парентерального введения путем инъекции, например, болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Такие составы стерильны. Препараты для инъекций могут быть представлены в виде стандартной лекарственной формы, например, в ампулах или в многодозовых контейнерах, с добавлением консерванта. Композиции могут принимать такие формы, как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях, и могут содержать рецептурные агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. В качестве альтернативы, активный ингредиент может быть в форме порошка для растворения с подходящим носителем, например, стерильной апиrogenной водой.

В дополнение к составам, описанным ранее, соединения также могут быть приготовлены в виде препарата пролонгированного действия. Такие составы длительного действия можно вводить путем имплантации (например, подкожно или внутримышечно) или внутримышечной инъекции. Так, например, соединения могут быть
5 составлены с подходящими полимерными или гидрофобными материалами (например, в виде эмульсии в приемлемых маслах) или ионообменными смолами, или в виде труднорастворимых производных, например, в виде труднорастворимой соли. Липосомы и эмульсии являются хорошо известными примерами средств доставки или носителей для гидрофильных лекарственных средств.

10 Подходящие фармацевтически приемлемые носители и разбавители, используемые в фармацевтических препаратах согласно данного изобретения, хорошо известны специалистам в области составления соединений в фармацевтические композиции. Фармацевтические препараты, в форме, подходящей для парентерального введения согласно представленного изобретения, могут быть приготовлены для
15 внутривенной инфузии или инъекции с помощью многих способов, которые хорошо известны специалистам в данной области, с фармацевтически приемлемыми носителями. В некоторых вариантах воплощения, такие фармацевтические препараты находятся в форме лиофилизированной смеси активных ингредиентов в стандартной лекарственной форме, приготовленной обычными методами, которую можно
20 восстановить водой или другой подходящей инфузионной жидкостью во время введения.

Дозировки

Подходящие дозы мета-арсенита натрия или мета-арсенита калия могут быть легко определены специалистом в данной области.

Соответствующий уровень дозы мета-арсенита натрия или мета-арсенита калия, вводимого субъекту, обычно составляет около 0,01-0,8 мг/кг массы тела субъекта в день,
25 например, приблизительно 0,05-0,7 мг/кг массы тела субъекта в день, приблизительно 0,1-0,6 мг/кг массы тела субъекта в день или приблизительно 0,2-0,5 мг/кг массы тела субъекта в день, которые могут быть введены однократно или многократно в течении суток.

30 Например, подходящий уровень дозы мета-арсенита натрия или мета-арсенита калия, вводимого пациенту (например, пациенту, страдающему коронавирусной инфекцией, такой как инфекция SARS-CoV-2), может составлять от 2,0 до 30 мг/день/человек, например, приблизительно от 2,5 до 20,0 мг/день/человек или приблизительно от 2,5 до 17,5 мг/день/человек. Предпочтительно уровень дозировки
35 вводимого мета-арсенита натрия или мета-арсенита калия составляет приблизительно

от 5,0 до 12,5 мг/день/человек, более предпочтительно приблизительно от 10,0 до 12,5 мг/день/человек, например 5,0 мг/день/человек, 5,5 мг/день/человек, 6,0 мг/день/человек, 6,5 мг/день/человек, 7,0 мг/день/человек, 7,5 мг/день/человек, 8,0 мг/день/человек, 8,5 мг/день/человек, 9,0 мг/день/человек, 9,5 мг/день/человек, 10,0 мг/день/человек, 10,5 мг/день/человек, 11,0 мг/день/человек, 11,5 мг/день/человек, 12,0 мг /день/человек или 12,5 мг/день/человек. В некоторых вариантах воплощения, уровень дозы мета-арсенита натрия или мета-арсенита калия, вводимого пациенту, составляет 7,5 мг в день.

Следует понимать, что конкретный уровень дозы и частота дозирования для любого конкретного субъекта могут варьироваться и будут зависеть от множества факторов, включая возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и диету субъекта, режим и время приема, скорость выведения, комбинации лекарственных средств и тяжесть конкретного состояния.

Фармацевтическую композицию, согласно представленного изобретения, можно принимать до (например, за 30 минут до) еды, во время еды или после еды (например, через 30 минут после еды). Предпочтительно фармацевтическую композицию, согласно представленного изобретения, принимают сразу после еды.

Примерный режим дозирования для таблетки, согласно представленного изобретения, содержащей 2,5 мг мета-арсенита натрия (SMA), приведен ниже:

- Прием 5,0 мг SMA: 1 таблетка сразу после завтрака, 1 таблетка сразу после ужина;

- Прием 7,5 мг SMA: 2 таблетки сразу после завтрака, 1 таблетка сразу после ужина;

- Прием 10,0 мг SMA: 2 таблетки сразу после завтрака, 2 таблетки сразу после ужина.

Введение с другими агентами

В некоторых вариантах воплощения, фармацевтическую композицию можно использовать в сочетании с одним или несколькими другими агентами.

Например, фармацевтическую композицию, описанную в настоящем документе, можно вводить с другими терапевтическими средствами, такими как анальгетики, анестетики, противогрибковые средства, антибиотики, антигистаминные средства, антигипертензивные средства, противомаларийные средства, противомикробные средства, антисептики, средства против артрита, антитромбиновые средства,

противотуберкулезные средства, противокашлевые средства, противовирусные средства, кардиоактивные средства, отхаркивающие средства, иммунодепрессанты, седативные средства, симпатомиметики, токсины (например, холерный токсин), транквилизаторы и мочегонные противоинфекционные средства.

5 Последовательное или по существу одновременное введение каждого терапевтического агента можно осуществлять любым подходящим путем, включая, но не ограничиваясь этим, пероральный путь, внутривенный путь, внутримышечный путь, прямое всасывание через ткани слизистой оболочки и их комбинации. Терапевтические агенты можно вводить одним и тем же путем или разными путями. Например, первое
10 терапевтическое средство из выбранной комбинации можно вводить внутривенной инъекцией, например, цисплатин или триоксид мышьяка, тогда как другое терапевтическое средство, например, мета-арсенит натрия, можно вводить перорально. Альтернативно, например, оба или все терапевтические агенты можно вводить внутривенной инъекцией или инфузией. Последовательность, в которой вводят
15 терапевтические агенты, не имеет решающего значения.

Комплекты

 Также, представленное изобретение предусматривает наборы для воплощения терапевтических схем изобретения. Такие наборы содержат в одном или нескольких
20 контейнерах терапевтически эффективные количества SMA или KMA в фармацевтически приемлемой форме. SMA или KMA во флаконе набора, согласно представленного изобретения, могут быть в форме фармацевтически приемлемого раствора, например, в сочетании со стерильным физиологическим раствором, раствором декстрозы или буферным раствором или другой фармацевтически приемлемой стерильной жидкостью. Альтернативно, SMA или KMA могут быть
25 лиофилизированы или высушены; в этом случае набор необязательно дополнительно содержит в контейнере фармацевтически приемлемый раствор (например, физиологический раствор, раствор декстрозы и т. д.), предпочтительно стерильный, для восстановления комплекса с образованием раствора для инъекций. Набор в необходимом количестве, также может включать другое терапевтическое средство(а)
30 для лечения боли и/или воспаления. Такое другое терапевтическое средство может быть приготовлено в виде комбинированного лекарственного средства с SMA или KMA, содержащимися в наборе, или может быть приготовлено отдельно.

 Представленное изобретение, с ссылкой на следующие неограничивающие примеры, дополнительно описано ниже.

35 **ПРИМЕРЫ**

Пример 1. Ингибирование продуцирования провоспалительных цитокинов

Материалы и способы

Все материалы, используемые для производства фармацевтических композиций, приведенные в качестве примеров ниже, были приобретены из коммерческих источников.

5 **Среда для выращивания макрофагов**

В качестве макрофагов использовали первичные перитонеальные макрофаги крысы. Макрофаги выращивали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы, пирувата (Invitrogen, кат. № 11995) с добавлением инактивированной нагреванием эмбриональной бычьей сыворотки (Invitrogen, кат. № 10099-141) до конечной
10 концентрации 10%, пенициллина/стрептомицина (Invitrogen, кат. № 15140-122) до конечной концентрации 100 ЕД/мл/100 мкг/мл, глутамакса (Invitrogen, кат. № 35050-061) до конечной концентрации 2 мМ и MEM NEAA (Invitrogen, кат. № 11140-050) до конечной концентрации, соответствующей среде MEM (Invitrogen кат. № 11095).

Клетки THP-1 и макрофаги THP-1 выращивали в RPMI, модификация ATCC
15 (Invitrogen, кат. № A10491-01) с добавлением инактивированной нагреванием эмбриональной бычьей сыворотки (Invitrogen, кат. № 10099-141) до конечной концентрации 10 % и 2-меркаптоэтанола до конечной концентрации 0,05 мМ.

Все клетки инкубировали во влажной атмосфере при 37°C, 5% CO₂.

Анализы на цитотоксичность и жизнеспособность клеток (на основе МТТ)

20 Цитотоксичность и жизнеспособность культивируемых первичных макрофагов, инкубированных с рядом концентраций NaAsO₂ по сравнению с контролем-наполнителем, определяли через 24 часа после обработки с использованием набора CytoTox-GLO (цитотоксичность) и анализа МТТ (жизнеспособность).

В 1 день, клетки макрофагов высевали в 96-луночные планшеты, путем
25 добавления 125 мкл 1×10⁶ клеток/мл питательной среды в каждую лунку 96-луночного планшета, покрытого 10% поли-L-лизина. Не прилипшие клетки удаляли через 3 часа.

На 2-й день, питательную среду осторожно заменяли 100 мкл/лунку свежей
бессывороточной средой DMEM на 3 часа. Бессывороточную среду заменяли средой
объемом 63 мкл, содержащей диапазон концентраций NaAsO₂ (30, 10, 7, 5, 3, 1, 0,3, 0,1 и
30 0 мкМ) и 100 нг/мл LPS или контроли и инкубировали в течение 24 часов.

На 3 день:

1. Цитотоксичность определяли с помощью набора CytoTox-GLO согласно инструкции производителя.

2. МТТ восстановлен с помощью DMEM до конечной концентрации 5 мг/мл.

3. Через 24 часа после обработки в каждую лунку добавляли 6,3 мкл восстановленного раствора МТТ и инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 4 часов.

4. Полученные кристаллы формазана растворяли путем добавления 70 мкл солюбилизующего раствора МТТ в каждую лунку и повторного пипетирования 10х.

5. Измеряли поглощение каждой лунки при длине волны 570 нм с использованием спектрофотометра с вычитанием фонового поглощения при 690 нм.

10 **Выделение цитокинов**

Для исследования влияния NaAsO₂ на выделение цитокинов из первичной культуры крысиных макрофагов, супернатант из лунок макрофагов, инкубированных с различными концентрациями NaAsO₂ и LPS в течение 24 часов, анализировали на концентрации про-воспалительных цитокинов с использованием наборов MesoScale Discovery V-PLEX.

1 день

Клетки макрофагов высевали в 24-луночные планшеты путем добавления 323 мкл 1×10⁶ клеток/мл питательной среды в каждую лунку 24-луночного планшета, покрытого 10% поли-L-лизина. Не прилипшие клетки удаляли через 3 часа, а среду заменяли свежей средой DMEM в количестве 500 мкл/лунку.

День 2

1. Среду для выращивания осторожно заменяли на 500 мкл/лунку свежей бессывороточной среды DMEM на 3 часа.

2. Бессывороточную среду заменяли 250 мкл питательной среды, содержащей диапазон концентраций NaAsO₂ (30, 10, 7, 5, 3, 1, 0,3, 0,1 и 0 мкМ) и 100 нг/мл LPS (для индукции воспалительное состояние) или контролей и инкубировали в течение 24 часов.

День 3

1. Через 24 часа после обработки супернатант клеток собирали и хранили при -80 °С.

2. Провоспалительные цитокины измеряли с помощью наборов MesoScale Discovery V-PLEX в соответствии с инструкциями производителя.

Дифференцировка клеток ТНР-1

35 1 день

Клетки ТНР-1 высевали в 96-луночные планшеты путем добавления 250 мкл 2 х

10⁵ клеток/мл в среде для выращивания THP-1, содержащей 1 мкл/мл форбол-12-миристата-13-ацетата (ФМА), в каждую лунку 96-луночного планшета, покрытого 10% поли-L-лизинном.

5 День 2

Среду для выращивания осторожно заменяли на 100 мкл/лунку свежей бессывороточной среды для выращивания на 2 часа. Бессывороточную среду заменяли на 63 мкл питательной среды, содержащей диапазон концентраций NaAsO₂ (30, 10, 7, 5, 3, 1, 0,3, 0,1 и 0 мкМ) и 100 нг/мл LPS (для индукции воспалительного состояния) или контролей и инкубировали в течение 24 часов.

10 День 3

Через 24 часа после обработки проводили анализ МТТ, как подробно описано выше.

15 **Анализ данных**

Данные представлены как среднее значение (\pm SEM), а различия в первичных контролях секреции цитокинов макрофагами определяли с помощью ANOVA с апостериорным тестом множественного сравнения Тьюки. Версия Prism 6.05 использовалась для всех фигур данных, статистического анализа и расчетов IC₅₀. Критерий статистической значимости был $p \leq 0,05$.

20 **Полученные результаты**

У крыс собирали первичные перитонеальные макрофаги, затем культивировали в течение 24 часов в LPS (100 нг/мл) и мета-арсените натрия в диапазоне концентраций (0,1–30 мкМ) с последующей оценкой цитотоксичности и жизнеспособности клеток с использованием CytoTox-GLO и наборов для анализа МТТ (Фигура 1А). Дигитонин, детергент, который является цитотоксичным для клеток, вызывал высокую токсичность по сравнению с носителем в наборе CytoTox-GLO (Фигура 1В). Кроме того, Triton-X, другой детергент, вызывал низкую жизнеспособность клеток по сравнению с носителем в анализе МТТ (Фигура 1С). При инкубации с мета-арсенитом натрия наблюдалось зависящее от концентрации увеличение цитотоксичности и соответствующее снижение жизнеспособности, которое зависело от концентрации. Графики цитотоксичности и жизнеспособности клеток, использованные для получения значений EC₅₀ и IC₅₀, демонстрируют аналогичную, но обратную зависимость, указывая на то, что снижение жизнеспособности во время инкубации с мета-арсенитом натрия, более вероятно связано с гибелью клеток, а не просто сбоем внутриклеточного механизма.

Также наблюдалось зависящее от концентрации снижение выделения TNF- α , IL-1 β и IL-6, таким образом, что значения IC₅₀ составляли 2,3, 0,8 и 0,5 мкМ соответственно (Фигура 2А, С и Е). Важно отметить, что IC₅₀ для жизнеспособности клеток была выше при 5,7 мкМ, что свидетельствует о том, что мета-арсенит натрия ингибирует высвобождение представляющих интерес цитокинов из культивируемых первичных макрофагов при концентрациях ниже, чем IC₅₀ для жизнеспособности клеток. Эти результаты позволяют предположить, что мета-арсенит натрия может ингибировать выделение цитокинов TNF- α , IL-1 β и IL-6 из культивируемых крысиных макрофагов в концентрации, не убивающей клетки. Важно отметить, что целекоксиб (10 мкМ) успешно ингибировал выделение всех трех провоспалительных цитокинов (Фигура 2В, D и E).

Суть

Итак, наблюдалось зависящее от концентрации снижение выделения провоспалительных цитокинов, таким образом, что инкубация клеток с мета-арсенитом натрия в концентрации 3 мкМ вызвала полное ингибирование выделения IL-1 β и высвобождение IL-6 из этих клеток при отсутствии значительной гибели клеток.

Наблюдалось значительное ингибирование выделения TNF- α , IL-1 β и IL-6 макрофагами при концентрациях мета-арсенита натрия, которые значительно не снижали жизнеспособность клеток.

В заключение, приведенные здесь данные *in vitro* показывают, что инкубация культивируемых первичных макрофагов крысы с мета-арсенитом натрия в течение 24 часов приводит к зависимому от концентрации ингибированию выделения провоспалительных цитокинов.

Пример 2

В этом исследовании было изучено, может ли мета-арсенит натрия подавлять липополисахаридные (LPS) индуцированные воспалительные реакции в клетках мышинных макрофагов Raw 264.7. Макрофаги, активированные липополисахаридом, продуцируют многочисленные молекулы и протеины, такие как фактор некроза опухоли- α (TNF- α), интерлейкин-6 (IL-6), IL-1 β , индуцибельную синтазу оксида азота (iNOS), циклооксигеназу-2 (COX -2) и свободные радикалы, которые связаны с острым воспалением. Ответная реакция индуцировалась внутриклеточными каскадами, путем NF- κ B. Таким образом, регуляция этого пути очень важна для контроля воспаления.

Клеточные культуры

Клеточную линию мышинных макрофагов RAW 264.7 (American Type Culture Collection, ATCC; Manassas, VA, USA) выращивали в среде DMEM с добавлением 10% инактивированной сывороткой FBS и антибиотиков-антимикотиков (100 ЕД/мл пенициллина G натрия, 100 мкг/мл стрептомицина сульфата и 0,25 мг/мл амфотерицина). Клетки RAW 264.7, стабильно трансфицированные плазмидой рNF-κB-SEAP-NPT (клетки SEAP-RAW), были любезно предоставлены д-ром Yeong Shik Kim (Seoul National University, Korea). Клетки SEAP-RAW поддерживали в среде DMEM, содержащей 500 мкг/мл G418. Все клетки инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в увлажненной атмосфере.

10 **Анализ оксида азота (NO)**

Клеточные линии макрофагов RAW 264.7 инкубировали с липополисахаридом (LPS, эндотоксин E.coli) и затем измеряли уровни NO, индуцированные COX-2 и iNOS. Цитотоксичность определяли с использованием анализа сульфородамина В или бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ).

15 **Измерение накопления PGE2**

Для оценки ингибирующей активности тестируемых материалов в отношении COX-2, клетки RAW 264.7 инкубировали с 1 мкг/мл LPS. После дополнительных 20 часов инкубации, среду удаляли и анализировали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа PGE2 (PGE2-ELISA). В этих анализах активность определялась как разница между накоплением PGE2 при отсутствии и в присутствии мета-арсенита натрия.

Анализ активности фермента COX-2

Для измерения ферментативной ингибирующей активности сверхэкспрессии COX-2 клетки RAW 264.7 обрабатывали LPS (1 мкг/мл) в течение 20 часов, при этом клетки обрабатывали мета-арсенитом натрия в течение 30 минут. Затем клетки обрабатывали субстратом COX-2 (арахидоновая кислота, 10 мкМ) и определяли уровни PGE2 с помощью PGE2-ELISA.

ОТ-ПЦР-анализ

Для выделения общей РНК, клетки RAW 264.7 предварительно были обработаны мета-арсенитом натрия в течение 30 минут, также клетки были обработаны LPS (1 мкг/мл) в течение 5 часов. Влияние мета-арсенита натрия на экспрессию генов iNOS, мРНК COX-2 и цитокинов определяли с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

Анализ вестерн-блоттинга

Клетки RAW 264.7 предварительно обрабатывали мета-арсенитом натрия в течение 30 минут и культивировали в течение 16 часов с последующей обработкой LPS (1 мкг/мл). Концентрацию протеина, полученного из разрушенных клеток, определяли с помощью анализа BSA. Влияние мета-арсенита натрия на экспрессию протеинов iNOS, COX-2, цитокинов и NF-κB, Akt определяли с помощью анализа вестерн-блоттинга.

Анализ репортерного гена

После предварительной обработки клеток SEAP-RAW мета-арсенитом натрия в течение 2 часов клетки инкубировали с LPS (1 мкг/мл) в течение 18 часов. Собранные супернатанты нагревали при 65°C в течение 5 минут, затем добавляли буфер для анализа SEAP (2M диэтанолamina, 1 mM MgCl₂, 500 мкM 4-метилумбеллиферилфосфата (MUP)] в темноте при 37°C в течение 1 часа. Флуоресценцию продуктов SEAP/ MUP измеряли с использованием 96-луночного микропланшетного флуориметра при раздражении 360 нм и эмиссии при 449 нм и нормализовали по концентрации протеина. Данные выражали как пропорцию контрольных клеток, обработанных мета-арсенитом натрия, по отношению к контрольным клеткам, обработанным носителем, без LPS.

Полученные результаты

Влияние мета-арсенита натрия на образование оксида азота (NO)

Оксид азота (NO) является хорошо известным провоспалительным медиатором в патогенезе воспаления. Большая часть NO синтезируется индуцибельной синтазой оксида азота (iNOS). iNOS представляет собой фермент, тесно связанный с воспалительной реакцией и образованием рака. Было описано, что NO, продуцируемый iNOS, влияет на активность и экспрессию COX-2. Чтобы выяснить, обладает ли мета-арсенит натрия ингибирующей активностью в отношении NO, определяли продуцирование NO в присутствии мета-арсенита натрия в концентрации 0,625~10 мкM в клетках макрофагов мыши RAW 264.7, индуцированных LPS.

Значительное образование NO было ослаблено мета-арсенитом натрия в зависимости от концентрации (при концентрациях 10, 5, 2,5, 1,25 и 0,625 мкM) 100,2, 77,2, 42,2, 21,5 и 12,5% соответственно. Значение IC₅₀ для ингибирования образования NO мета-арсенитом натрия составляло около 2,87 мкM (Фигура 3A).

Влияние мета-арсенита натрия на продуцирование PGE2

iNOS высоко экспрессируется в макрофагах, что приводит к деструкции органов при некоторых воспалительных и аутоиммунных заболеваниях. COX-2, также провоспалительный фермент, продуцирует простагландин E2 (PGE2) путем превращения арахидоновой кислоты в простагландины. PGE2 также является еще одним важным медиатором, который вырабатывается из метаболитов арахидоновой кислоты, которые катализируются COX-2 при воспалительных реакциях. В исходном состоянии продукты iNOS и COX-2, включая NO и простагландины, участвуют в модуляции клеточных функций и гомеостаза.

Чтобы выяснить, может ли мета-арсенит натрия регулировать образование PGE2 посредством COX-2, образование PGE2 измеряли в клетках RAW264.7 после обработки мета-арсенитом натрия (2,5, 5, 7,5 и 10 мкМ). Мета-арсенит натрия ингибировал образование PGE2 в зависимости от дозы. При максимальной дозе (10 мкМ) мета-арсенита натрия продуцирование PGE2 ингибировалось на 20% (Фигура 4).

Оценка влияния мета-арсенита натрия на экспрессию протеина

Влияние мета-арсенита натрия на экспрессию протеинов iNOS и COX-2

Для того, чтобы оценить ингибирующее действие мета-арсенита натрия на индуцированное iNOS образование COX-2, уровни протеина iNOS и COX-2 анализировали с помощью вестерн-блоттинга. Необработанные клетки RAW 264.7 предварительно обрабатывали 2,5, 5, 7,5 или 10 мкМ мета-арсенита натрия в течение 30 минут и стимулировали 1 мкг/мл LPS в течение 16 часов. Как показано на Фигуре 5, экспрессия iNOS значительно ингибируется мета-арсенитом натрия в зависимости от концентрации. При этом, экспрессия COX-2 ингибировалась мета-арсенитом натрия в легкой форме.

Влияние мета-арсенита натрия на экспрессию протеинов TNF- α и IL-1 β

Воспалительный цитокин, фактор некроза опухоли- α (TNF- α), считается основным медиатором воспалительной реакции. В ответ на LPS он также опосредует воспалительную реакцию, выделяя различные провоспалительные медиаторы, включая IL-1 β и PGE2. IL-1 β представляет собой провоспалительный цитокин, отличающийся широким спектром функций. Влияние мета-арсенита натрия на уровни протеинов TNF- α и IL-1 β анализировали с помощью вестерн-блоттинга. Необработанные клетки RAW 264.7 предварительно обрабатывали 2,5, 5, 7,5 или 10 мкМ мета-арсенита натрия в течение 30 минут и стимулировали 1 мкг/мл LPS в течение 8 часов. Экспрессия TNF- α и IL-1 β значительно ингибировалась мета-арсенитом натрия в зависимости от концентрации (Фигура 6).

Оценка влияния мета-арсенита натрия на экспрессию генов

Влияние мета-арсенита натрия на мРНК экспрессию iNOS и COX-2

Влияние мета-арсенита натрия на экспрессию мРНК iNOS и COX-2 изучали с помощью ОТ-ПЦР. Необработанные клетки RAW 264.7 предварительно обрабатывали 2,5, 5, 7,5 или 10 мкМ мета-арсенита натрия в течение 30 минут и стимулировали 1 мкг/мл LPS в течение 8 часов. Затем 1 мкг полученной общей РНК использовали для ОТ-ПЦР.

Экспрессия iNOS значительно ингибировалась мета-арсенитом натрия в зависимости от концентрации (Фигура 7 и Фигура 8). Мета-арсенит натрия не влиял на экспрессию COX-2 (Фигура 7).

Это подтвердило, что мета-арсенит натрия оказывает ингибирующее действие скорее на iNOS, а не на COX-2, что позволяет предположить, что мета-арсенит натрия сильно ингибирует воспалительную реакцию посредством регуляции экспрессии iNOS (Фигура 6). Экспрессию генов iNOS и COX-2 анализировали с помощью вестерн-блоттинга. Уровень мРНК iNOS измеряли с помощью ПЦР в реальном времени, и он значительно ингибировался мета-арсенитом натрия в зависимости от концентрации (Фигура 8).

Влияние мета-арсенита натрия на мРНК экспрессию TNF- α и IL-1 β

Воспалительный цитокин TNF- α считается основным медиатором воспалительной реакции. В ответ на LPS они также опосредуют воспалительную реакцию, секретируя различные провоспалительные медиаторы, включая TNF- α , IL-1 β и PGE2. Среди провоспалительных цитокинов, IL-1 β или IFN- β обладают одним из самых высоких потенциалов вызывать повреждение тканей хозяина, а различные механизмы лечения предназначены для сдерживания его внутриклеточной активности путем тщательного контроля его транскрипции и процессинга воспалительной реакции. Таким образом, с помощью анализа ОТ-ПЦР исследовали влияние мета-арсенита натрия на уровни мРНК TNF- α , IL-1 β и IFN- β .

Необработанные клетки RAW 264.7 предварительно обрабатывали 2,5, 5, 7,5 или 10 мкМ мета-арсенита натрия в течение 30 минут и стимулировали 1 мкг/мл LPS в течение 5 часов. Затем 1 мкг полученной общей РНК использовали для ОТ-ПЦР. Уровень мРНК TNF- α значительно снижался мета-арсенитом натрия в зависимости от концентрации, но мета-арсенит натрия не влиял на экспрессию мРНК IL-1 β и IFN- β в макрофагах RAW 264.7 (Фигура 9).

Влияние мета-арсенита натрия на транскрипционную активность ядерного фактора каппа В (NF-κB)

Было показано, что транскрипционный фактор NF-κB играет значительную роль в индуцированной липополисахаридами экспрессии провоспалительных медиаторов, включая iNOS. Промоторная область гена, кодирующего iNOS, содержит мотивы связывания NF-κB, и это показывает, что связывание NF-κB с сайтами NF-κB перед промотором iNOS играет важную роль в индуцированной липополисахаридами активации гена iNOS. Чтобы исследовать молекулярный механизм ингибирования транскрипции NF-κB, опосредованного мета-арсенитом натрия, транскрипционную активность NF-κB исследовали с использованием системы анализа репортерного гена. Клетки RAW 264.7 были стабильно трансфицированы плазмидой pNF-κB-секреторной щелочной фосфатазы (SEAP)-NPT, содержащей четыре копии последовательности κB, слитой с SEAP, в качестве репортера. Плазмида pNF-κB-SEAP-NPT, содержащая ген неомифосфотрансферазы (NPT) для устойчивости к генетицину в клетках-хозяевах, была сконструирована и трансфицирована в макрофаги RAW 264.7. Аликвоты культуральной среды нагревали, а затем подвергали реакции с 4-метилумбеллиферилфосфатом (MUP). Активность SEAP измеряли в относительных единицах флуоресценции (ОЕФ) (relative fluorescence units (RFU)). Обработка трансфицированных клеток LPS в течение 18 ч увеличивала экспрессию SEAP приблизительно в 3 раза по сравнению с исходным уровнем по сравнению с контрольными клетками без LPS. Обработка клеток мета-арсенитом натрия значительно ингибировала индуцированную LPS экспрессию SEAP в зависимости от концентрации (Фигура 10).

Для того чтобы выяснить, регулирует ли мета-арсенит натрия пути передачи сигнала NF-κB, макрофаги RAW264.7 обрабатывали LPS (1 мкг/мл) в течение 15 минут при предварительной обработке мета-арсенитом натрия (2,5, 5, 7,5 или 10 мкМ) в течение 30 минут, а уровни p65, p50, IκB и IKK также анализировали с помощью вестерн-блоттинга.

Мета-арсенит натрия заметно снижал уровень протеина NF-κB в зависимости от концентрации (Фигура 11). Мета-арсенит натрия заметно ингибировал деградацию IκB зависимым от концентрации образом (Фигура 12).

Пример 3 – Приготовление пероральных композиций

Пероральная композиция

Мета-арсенит натрия ("SMA") был получен от Sigma Aldrich Fine Chemicals. Лекарственное вещество SMA в состоянии поставки имело очень высокую чистоту (>98% As(III)) и минимальные уровни As(V). В приведенной ниже **Таблице 1** представлены свойства поставляемой лекарственной субстанции SMA.

5 **Таблица 1: Свойства поставляемой лекарственной субстанции SMA**

Качество	Значение/Наблюдение
Вид	Порошок от белого до почти белого цвета
Температура плавления	615°C
Растворимость	прибл. 950 мг/мл
Стандартный анализ (As(III))	98 – 99%
Стандартный уровень примеси (As(V))	≤ 0,2%
Стандартное содержание воды	< 1,0%
Гигроскопичность (поглощение влаги)	~ 40% при относительной влажности 75% > 80% при относительной влажности 80% > 130% при относительной влажности 90%
Плотность (истинная/частица)	2,1 – 2,3 г/см ³

10 Материалы, перечисленные в **Таблице 2** представленной ниже, использовали для приготовления 2,5 мг мета-арсенита натрия ("SMA") с энтеросолюбильным покрытием. Там, где это возможно, были выбраны версии основных вспомогательных веществ с более высокой плотностью, чтобы соответствовать плотности SMA (неорганический материал с предполагаемой истинной плотностью приблизительно от 2,1 до 2,3 г/см⁻³, который является очень плотным по сравнению с большинством вспомогательных веществ).

Таблица 2: Перечень материалов

Материалы	Функция	Торговое название/ Поставщик
Мета-арсенит натрия («SMA») (чистота >98%)	активный фармацевтический ингредиент	Sigma Aldrich Fine Chemicals (Madison, Wisconsin, USA)
Дигидрат сульфата кальция	Наполнитель	Compactrol/JRS pharma
Карбонат кальция	Наполнитель	PressCAL MD 92.5/JRS
Карбонат кальция высший сорт	Наполнитель	Not applicable/JRS

Материалы	Функция	Торговое название/ Поставщик
Двухосновный фосфат кальция безводный	Наполнитель	Fujicalin/Fuji chemicals
Двухосновный фосфат кальция безводный порошок	Наполнитель	A Comprez/JRS pharma
Двухосновный фосфат кальция безводный высший сорт	Наполнитель	A-Comprez/JRS pharma
Силикатизированная микрокристаллическая целлюлоза (sMCC) марки высокой плотности	наполнитель, разбавитель прессования	Prosolv HD 90
Микрокристаллическая целлюлоза (MCC) марки высокой плотности	Связывающее вещество	Avicel PH302/FMC
Частично прежелатинизированный крахмал	Связывающее вещество, дезинтнгрант, наполнитель	Lycatab C-LM/Roquette
Частично прежелатинизированный крахмал	Связывающее вещество, дезинтегрант, наполнитель	Starch 1500/Colorcon
Гидроксипропилцеллюлоза	Связывающее вещество	Klucel EXF/Ashland
L-гидроксипропилцеллюлоза	Связывающее вещество, дезинтегрант	LH-B1/Shin-EtSu
Коллоидный диоксид кремния	глидант	Aerosil 200/Evonik
Крахмалгликолят натрия	Супер дезинтегрант	Explotab/JRS Pharma
Кроскармеллоза натрия	Супер дезинтегрант	Ac-di-Sol/FMC
Стеарилфумарат натрия	Смазывающее вещество	PRUV/JRS pharma
Опадри II (20A280013)	подслой	Colorcon
Акрил-EZE II белый (493Z180022)	полимер покрытия	Colorcon

Оборудование, указанное в **Таблице 3** представленной ниже, использовалось при приготовлении и анализе композиций SMA с энтеросолюбильным покрытием.

Таблица 3: Перечень оборудования

Название оборудования	Производитель	Применение
Весы	Sartorius	Взвешивание материалов и таблеток
Блендер Turbula	Turbula	Смешивание/ измельчение
Чаша для смешивания Turbula 2л	Turbula	Смешивание/измельчение
Измеритель плотности	Copley	Измерение плотности
Пресс Manesty F3 (с одним пуансоном)	Manesty	таблетирование
Роторный пресс (7 отделений)	SCI	таблетирование
6,5 мм круглые нормальные обоюдоогнутые инструменты NCCP	Natoli	таблетирование
0,25-дюймовый таблеточный станок инструмент Key International	Key International	таблетирование
Измеритель твердости	Copley	измерение твердости таблеток
Микрометр	Mitsuyi	Измерение толщины таблеток
Измеритель хрупкости	Copley	Измерение хрупкости таблеток
Дезинтеграционная ванна	Copley	Измерение дезинтеграции таблеток
15-дюймовый барабан для покрытия	Thai Coater	покрытие

5

Пример изготовления 1

Таблетки с энтеросолюбильным покрытием из примеров по изготовлению препаратов 1.1-1.4, содержащие мета-арсенит натрия («SMA») в качестве активного фармацевтического ингредиента (АФИ), были подготовлены в соответствии с процедурой, которая описана дальше.

10

В целом, как подробно описано ниже, мета-арсенит натрия («SMA») и эксципиенты (вспомогательные вещества) смешивали вместе (на протяжении трехстадийного процесса смешивания без использования воды или растворителя) с образованием порошковой смеси. Затем порошковую смесь прессовали для образования твердого ядра таблетки. Твердое ядро таблетки затем покрывали энтеросолюбильным покрытием.

15

Смешивание

Описанный ниже процесс смешивания использовали для смешивания ингредиентов.

АФИ и другие ингредиенты композиции дозировали и взвешивали. Поскольку концентрация АФИ была очень низкой, для улучшения однородности смеси был использован трех-стадийный процесс смешивания (с использованием «премикса АФИ» и «основной смеси»).

АФИ просеивали через сито с размером отверстий 200 мкм (ручное сито). Время просеивания составляло от 5 до 8 минут.

10 Премикс, содержащий АФИ («премикс АФИ»), был приготовлен путем смешивания просеянного АФИ с несколькими граммами (20 г для партии 500 г и 30 г для партии 700 г) наполнителя в соответствующем контейнере (100 мл контейнер для размера партии 500 г и контейнер 150 мл для размера партии 700 г) в течение 10 минут при 49 об/мин с помощью блендера Turbula.

15 Глидант (коллоидный диоксид кремния) просеивали через сито с размером ячеек 500 мкм для де-агломерации. Затем в 2-литровую стеклянную чашу Turbula добавляли все остальные дозированные ингредиенты, включая просеянный глидант, за исключением смазывающего вещества (стеарилфумарат натрия). Премикс АФИ, был помещен в середину порошковой массы.

20 Полученную смесь («основной микс») смешивали в течение от приблизительно 10 минут до приблизительно 20 минут при 49 об/мин, используя блендер Turbula, с образованием перемешанного порошка («основная смесь»).

25 Смазывающее вещество (стеарилфумарат натрия) совместно просеивали с небольшой порцией основной смеси, используя сито с размером ячеек 500 мкм, а затем совместно просеянную смесь добавляли к основной смеси. Эту стадию смазывания выполняли отдельно, для того чтобы избежать возможные осложнения из-за избыточного смазывания (например, снижения твердости таблеток или проблем с растворением).

30 Полученную смесь перемешивали в течение 2 минут при 49 об/мин в блендере Turbula, получая таким образом порошкообразную смесь. Порошкообразная смесь характеризовалась по свойствам текучести.

Прессование

Порошковую смесь прессовали на таблеточном прессе с одним пуансоном Manesty F3 с использованием 6,5-миллиметрового вогнутого плоского инструмента (NCCP) при целевой массе таблетки 150 мг. Manesty F3 имеет только произвольные единицы (AU) для силы сжатия, и это не позволяет напрямую измерить приложенную силу. Целевой уровень твердости был выше 90 Н.

Энтеросолюбильное покрытие

Дисперсию энтеросолюбильного покрытия с содержанием твердого вещества 20% масс./масс. готовили путем диспергирования Acryl EZE II white (493Z180022) в деионизированной воде. Дисперсию перемешивали с помощью лопастной мешалки в течение 45 минут перед использованием и в течение всего процесса нанесения покрытия. Перед использованием дисперсию просеивали через сито с размером ячеек 250 мкм.

15-дюймовый барабан для покрытия (Thai Coater) уравнивали до заданной температуры перед загрузкой твердых ядер таблеток. Из-за небольшого размера партии и для того чтобы удовлетворить требования по загрузке барабана для нанесения покрытия, к твердым ядрам АФИ были добавлены «объемные инертные вещества». Твердым ядрам таблеток давали уравниваться в сушильном шкафу в течение 10 минут перед нанесением покрытия. Для фазы нагрева, нанесения покрытия и сушки использовалась одинаковая температура воздушного потока. После нанесения покрытия, таблетки сушили в барабане в течение 10 минут. Образцы собирали после увеличения массы на 8, 10 и 12% масс./масс.

Исследования по растворению таблеток

Исследования по растворению таблеток проводили с использованием 500 мл среды и Способа USP, при первоначальной скорости 2-х лопастной мешалки 100 об/мин. Исследовали один набор из шести таблеток с энтеросолюбильным покрытием (n=6). Образцы растворенной среды брали через 2 часа после нахождения в кислоте и определяли уровни мета-арсенита натрия для оценки резистентности желудка. Среду перемещали в фосфатный буфер с pH 6,8, и образцы отбирали с интервалом в 15 минут для получения профилей растворения.

Этот способ основан на фармакопейном способе для энтеросолюбильных лекарственных форм (EP.2.9.3 и USP <711>), как показано в **Таблице 4** ниже.

Таблица 4: Условия исследования растворения

Этап	Условия	Описание	Цель	Требования
1	0,01M HCl	Кислотная фаза	Кислото резистентность	Выход не более 10% за 2 часа
2	pH 6,8 фосфатный буфер	Буферная фаза	Кривая высвобождения	Обычно, не меньше чем 75% за 30 – 45 минут

Формулировка

Твердую фармацевтическую композицию (Р63), содержащую мета-арсенит натрия (SMA) в качестве активного фармацевтического ингредиента (АФИ), готовили с использованием способа, описанного выше в Примере изготовления 1.

Композицию изготавливали в пределах 700 г. Образцы однородности смеси и однородности содержимого отбирали для оценки однородности после основного времени перемешивания, равного 20 минутам.

В таблице 5 представленной ниже, показано состав твердого ядра таблетки, включающей 2,53 мг мета-арсенита натрия (до стадии покрытия). (В Таблице 5.1 ниже представлен другой возможный состав твердого ядра таблетки, содержащий 2,50 мг мета-арсенита натрия (до стадии покрытия)).

Таблица 5: Состав твердого ядра таблетки Р63

Материал	Функция	мг/таблетку	% масс./масс.
Мета-арсенит натрия	АФИ	2,53	1,69
Двухосновный фосфат кальция безводный (мелкокристаллические гранулы A-Comprez)	Наполнитель	82,22	54,81
L-гидроксипропилцеллюлоза (марка LH-B1)	Связывающее вещество, дезинтегрант	60,00	40,00
Гидроксипропилцеллюлоза (Klucel EXF)	Связывающее вещество	3,00	2,00
Коллоидный диоксид кремния (Aerosil 200)	Глидант	0,75	0,50
Стеарилфумарат натрия (PRUV)	Смазывающее вещество	1,50	1,00
ИТОГО		150,00	100,00

После стадии смешивания, порошковая смесь продемонстрировала хорошие свойства текучести, о чем свидетельствует индекс Карра (29,3%). Порошковая смесь перед прессованием имела следующие свойства:

- Плотность в азрированном состоянии: 0,64 г/см³
- Плотность на утряске: 0,91 г/см³

- Индекс Карра: 29,3%
- Коэффициент Хауснера: 1,30

Порошковая смесь очень хорошо спрессовывалась, и на протяжении всего цикла не наблюдалось никаких изменений веса и/или визуального расслоения. Были достигнуты высокая твердость таблетки (104,8 Н) и низкая ломкость (0,08%), а время дезинтеграции (34 секунды) было относительно коротким. Средняя толщина твердого ядра таблетки составляла 3,63 мм.

Образцы однородности смеси отбирали после перемешивания в течение 20 минут, а образцы однородности содержимого отбирали в начале, середине и конце цикла прессования. Результаты однородности смеси продемонстрировали превосходную однородность со значением относительного стандартного отклонения (RSD) 1,3 в %. Однородность содержания твердого ядра таблетки в течение цикла прессования (начало, середина и конец) показала хорошую однородность, поскольку было достигнуто значение максимального приемлемого значения (AV) <7,4 (значение AV <15 является приемлемым).

После стадии прессования твердое ядро таблетки покрывали полимерной системой энтеросолюбильного покрытия Acryl EZE II white (493Z180022), которую готовили, как описано в Примере изготовления 1. Параметры покрытия показаны в **Таблице 6**, представленной ниже.

Таблица 6: Параметры покрытия

Параметр	Результат
Барабан для покрытия	15-дюймовый Thai Coater
Температура на входе	90 - 110°C
Температура на выходе	~50°C
Скорость барабана	16 об/мин
Скорость распыления	10-11 г/мин
Температура таблеточного слоя	~35°C
Вход и выход закрыты	Оба в середине
Расстояние от пистолета-распылителя до таблеточного слоя	5 см (Лопасты не видны)
Распылительная форсунка (мм)	1,2 мм
Давление воздуха вентилятора	20 фунтов на квадратный дюйм
Давление воздуха пистолета-распылителя	10 фунтов на квадратный дюйм
Масса инертного наполнителя (г)	2500,0 г
Масса таблеток с активным веществом (г)	473,0 г

Параметр	Результат
Масса таблеточного слоя (г)	2973,0 г
Первоначальная масса 20 таблеток (г)	3,017 г
Целевой прирост массы для 12% покрытия (г)	3,379 г
Масса 20 таблеток после увеличения массы на 12% (г)	3,381 г (увеличение массы 12,06%)

5 Таблетка с энтеросолюбильным покрытием продемонстрировала приемлемый профиль растворения (500 мл среды, скорость лопастной мешалки 100 об/мин). Через 120 минут композиция оставалась интактной в кислой среде (рН 1,0) с высвобождением АФИ 0%. Через 135 минут при рН 6,8 высвобождалось 91% АФИ. Через 150 минут при рН 6,8 высвобождалось 98% АФИ. Через 165 минут при рН 6,8 высвобождалось 100% АФИ.

10 Таблетка с энтеросолюбильным покрытием продемонстрировала удовлетворительную устойчивость к действию желудочного сока и соответствовала предложенной предварительной спецификации высвобождения не менее 75% за 45 минут для энтеросолюбильных лекарственных форм.

15 В таблице 5.1 представленной ниже, показан другой возможный состав твердого ядра таблетки, содержащий 2,50 мг мета-арсенита натрия (до этапа покрытия). Твердое ядро, имеющее компоненты, описанные в таблице 5.1, может быть приготовлено способом, аналогичным описанному выше для твердого ядра, содержащего компоненты, описанные в таблице 5.

Таблица 5.1: Альтернативный состав твердого ядра таблетки Р63

Материал	Функция	мг/таблетку	% масс./масс.
Мета-арсенит натрия	АФИ	2,50	1,67
Двухосновный фосфат кальция безводный (мелкокристаллические гранулы А-Comprez)	наполнитель	82,25	54,83
L-гидроксипропилцеллюлоза (марка LH-B1)	связывающее вещество, дезинтегрант	60,00	40,00
Гидроксипропилцеллюлоза (Klucel EXF)	связывающее вещество	3,00	2,00
Коллоидный диоксид кремния (Aerosil 200)	Глидант	0,75	0,50
Стеарилфумарат натрия (PRUV)	Смазывающее вещество	1,50	1,00
ИТОГО		150.00	100.00

Пример препарата 1.2

5 Твердую фармацевтическую композицию (P23), содержащую мета-арсенит натрия (SMA) в качестве активного фармацевтического ингредиента (АФИ), готовили с использованием способа, описанного выше в Примере изготовления 1.

Композицию изготавливали в пределах 500 г. Образцы однородности смеси отбирали через 10, 15 и 20 минут основного времени блендирования. Смесь прессовали с образованием твердого ядра таблетки, а затем на твердое ядро таблетки наносили покрытие.

10 В таблице 7 представленной ниже, показан состав твердого ядра таблетки, включающей 2,50 мг мета-арсенита натрия (до стадии покрытия).

Таблица 7: Состав твердого ядра таблетки P23

Материал	Функция	мг/таблетку	масс./масс.
Мета-арсенит натрия	АФИ	2,50	1,67
Двухосновный фосфат кальция безводный порошок (A-Comprez powder)	наполнитель	37,50	25,00
Частично прежелатинизированный крахмал (Starch 1500)	Связывающее вещество, дезинтегрант, наполнитель	45,00	30,00
Двухосновный фосфат кальция безводный гранулы (Fujicalin)	наполнитель	58,25	38,83
Крахмалгликолят натрия (Explotab)	Супер дезинтегрант	4,50	3,00
Коллоидный диоксид кремния (Aerosil 200)	глидант	0,75	0,50
Стеарилфумарат натрия (PRUV)	Смазывающее вещество	1,50	1,00
ИТОГО		150.00	100.00

После стадии смешивания, порошковая смесь продемонстрировала хорошие свойства текучести, о чем свидетельствует индекс Карра (26,37%). Порошковая смесь до прессования имела следующие свойства:

- Плотность в аэрированном состоянии: 0,67 г/см³
- Плотность на утряске: 0,91 г/см³
- Индекс Карра: 26,37%
- Коэффициент Хауснера: 1,36
- Угол естественного откоса: 24,32°

10 Образцы однородности смеси отбирали после смешивания в течение 10, 15 и 20 минут основного времени смешивания. Композиция показала хорошую гомогенность при времени смешивания 20 минут.

Прессование выполняли на однопуансонном станке Manesty F3 с использованием инструментов НССР 6,5 мм. Средняя твердость твердого ядра составила 94,3 Н, средняя толщина 3,62 мм, хрупкость 0,33%, время дезинтеграции 39 секунд.

15 Масса твердого ядра была постоянной на протяжении всего цикла прессования, и качество полученных твердых ядер было приемлемым. Визуального разделения не наблюдалось. Образцы (10 твердых ядер в двух экземплярах) отбирали в начале, середине и конце цикла прессования и отправляли на тестирование однородности содержимого.

20 После стадии прессования твердое ядро таблетки покрывали белой полимерной системой энтеросолюбильного покрытия Acryl EZE II white (493Z180022), которую готовили, как описано в Примере изготовления 1, а образцы отбирали после 8%, 10% и 12% масс./масс. увеличение веса. Параметры покрытия показаны в Таблице 8, представленной ниже.

25 **Таблица 8: Параметры покрытия**

Параметр	Результат
----------	-----------

Параметр	Результат
Барабан для покрытия	Thai Coater
Температура на входе	81 - 90°C
Температура на выходе	~50°C
Скорость барабана	18 об/мин снижено до 16 об/мин
Начальная скорость распыления	7г/мин
Скорость распыления через 30 минут	11г/мин
Температура общей массы таблеточного слоя в барабане	~35°C
Впуск и выпуск воздуха закрыты	Надходятся оба в середине

Параметр	Результат
Расстояние от пистолета-распылителя до таблеточного слоя	5 см (лопасти не видно)
Скорость насоса	05
Распылительная форсунка (мм)	1,2 мм
Давление воздуха в пистолете-распылителе	10 фунтов на квадратный дюйм
Давление воздуха вентилятора	20 фунтов на квадратный дюйм
Масса инертного наполнителя (г)	3000 г
Масса таблеток с активным веществом (г)	240 г
Масса таблеточного слоя (г)	3240 г
Начальная масса 20 таблеток (г)	3,015 г
% масс./масс. целевого показателя для покрытия таблетки	8%
Целевой прирост массы для 8% покрытия (г)	3,256 г
Количество распыляемой дисперсии для достижения увеличения массы на 8% (г)	1900 г
Масса 20 таблеток после увеличения веса на 8% (г)	3,248 г
% масс./масс. целевого показателя для покрытия таблетки	10%
Целевое увеличение массы для 10% покрытия (г)	3,317 г
Количество распыляемой дисперсии для достижения увеличения массы на 10% (г)	2400 г
Масса 20 таблеток после увеличения массы на 10% (г)	3,328 г
% масс./масс. целевого показателя для покрытия таблетки	12%

Параметр	Результат
Целевой прирост массы для 12% покрытия (г)	3,377 г
Количество распыляемой дисперсии для достижения увеличения массы на 12% (г)	2900 г
Масса 20 таблеток после увеличения веса на 12% (г)	3,384 г

Для определения подходящих уровней энтеросолюбильного покрытия, таблетки с энтеросолюбильным покрытием при увеличении массы на 8%, 10% и 12% масс./масс. подвергали испытанию на растворение (500 мл растворяющей среды, скорость лопастной мешалки 75 об/мин). Результаты растворения показаны в **Таблице 9**, представленной ниже.

Таблица 9: Результаты растворения

Название образца	Среднее значение (% высвобожденного препарата)				
	120	135	150	165	195
Время (мин)					
Среда	pH 1,0	pH 6,8	pH 6,8	pH 6,8	pH 6,8
8% масс./масс. таблетки с энтеросолюбильным покрытием	00	67	80,5	87	90
10% масс./масс. таблетки с энтеросолюбильным покрытием	00	26	82	89	Не определено
12% масс./масс. таблетки с энтеросолюбильным покрытием	00	27	83	90	92

Таблетки с энтеросолюбильным покрытием оставались неповрежденными в кислой среде через 120 минут. Таблетки с энтеросолюбильным покрытием продемонстрировали удовлетворительную устойчивость к действию желудочного сока и соответствовали предложенной предварительной спецификации не менее 75% высвобождения за 45 минут для энтеросолюбильных лекарственных форм.

На основании результатов растворения было обнаружено, что оптимальным приростом массы покрытия является 12% масс./масс.

Пример препарата 1.3

Твердую фармацевтическую композицию (P31), содержащую мета-арсенит натрия (SMA) в качестве активного фармацевтического ингредиента (АФИ), готовили с использованием способа, описанного выше в Примере изготовления 1.

5 Композицию изготавливали в пределах 500 г. Образцы однородности смеси отбирали через 10, 15 и 20 минут основного времени смешивания. Смесь прессовали с образованием твердого ядра таблетки, а затем на твердое ядро таблетки наносили покрытие. Использовали L-гидроксипропилцеллюлозу (L-НРС; низкозамещенная гидроксипропилцеллюлоза марка LH-B1), так как она действует как связывающее
10 вещество и дезинтегрант. Поскольку L-НРС нерастворима в воде, ожидалось, что это приведет к получению твердых таблеток.

В приведенной ниже **Таблице 10** представлен состав твердого ядра таблетки, включающей 2,50 мг мета-арсенита натрия (до стадии покрытия).

Таблица 10: Состав твердого ядра таблетки P31

Материал	Функция	Мг/таблетку	% масс./масс.
Мета-арсенит натрия	АФИ	2,50	1,67
Безводный Двухосновный фосфат кальция, порошок (порошок A-Comprez)	наполнитель	37,50	25,00
Безводный двухосновный фосфат кальция в гранулах (Fujicalin)	наполнитель	80,75	53,83
L-гидроксипропилцеллюлоза (марка LH-B1)	связывающее вещество, дезинтегрант	22,50	15,00
Крахмалгликолят натрия (Explotab)	супер дезинтегрант	4,50	3,00
Коллоидный диоксид кремния (Aerosil 200)	глидант	0,75	0,50
Стеарилфумарат натрия (PRUV)	Смазывающее вещество	1,50	1,00
ИТОГО		150.00	100.00

После этапа смешивания порошковая смесь продемонстрировала хорошие свойства текучести, о чем свидетельствует индекс Карра (23,68%). Порошковая смесь до прессования имела следующие свойства:

- 5 • Плотность в азрированном состоянии: 0,58 г/см³
- Плотность на утряске: 0,76 г/см³
- Индекс Карра: 23,68%
- Коэффициент Хауснера: 1,31
- Угол естественного откоса: 27,96°

10 Образцы однородности смеси отбирали после смешивания в течение 10, 15 и 20 минут основного времени смешивания. Композиция показала хорошую гомогенность при времени смешивания 20 минут.

15 Прессование выполняли на однопуансонном станке Manesty F3 с использованием инструментов НССР 6,5 мм. Средняя твердость твердого ядра составила 104,3 Н, средняя толщина 3,52 мм, хрупкость 0,23%, время дезинтеграции 30 секунд.

20 Масса твердых ядер была постоянной на протяжении всего цикла прессования, и качество полученных твердых ядер было приемлемым. Визуального разделения не наблюдалось. Образцы (10 твердых ядер в двух экземплярах) отбирали в начале, середине и конце цикла прессования и отправляли на исследование однородности содержимого.

После стадии прессования твердое ядро таблетки покрывали белой полимерной системой энтеросолюбильного покрытия Acryl EZE II white (493Z180022), которую готовили, как описано в Примере изготовления 1, а образцы отбирали после 8%, 10% и 12% масс./масс. увеличения массы таблеток. Параметры покрытия показаны в **Таблице 11**, представленной ниже.

Таблица 11: Параметры покрытия

Барабан для покрытия	Thai Coater
Температура воздушного потока на входе	81 - 90°C
Температура воздушного потока на выходе	50°C
Скорость барабана	18 об/мин снижена до 16 об/мин
Начальная скорость распыления	7 г/мин
Скорость распыления через 30 минут	11 г/мин
Температура общей массы таблеточного слоя в барабане	35°C
Впуск и выпуск воздуха закрыты	Находятся оба в середине
Расстояние от пистолета-распылителя до общего слоя таблеток	5 см (лопасти не видно)
Скорость насоса	05
Распылительная форсунка (мм)	1,2мм
Давление воздуха в пистолете-распылителе	10 фунтов на квадратный дюйм
Давление воздуха вентилятора	20 фунтов на квадратный дюйм
Масса инертного наполнителя (г)	3000 г
Масса таблеток активного вещества (г)	260 г
Общая масса таблеточного слоя (г)	3260 г

Барабан для покрытия	Thai Coater
Начальная масса 20 таблеток (г)	2,995 г
% мас./мас. целевого показателя для покрытия таблетки	8%
Целевой прирост массы для 8% покрытия (г)	3,235 г
Количество распыляемой дисперсии для достижения увеличения массы на 8% (г)	1900 г
Масса 20 таблеток после увеличения веса на 8% (г)	3,231 г
% масс./масс. целевого показателя для покрытия таблетки	10%
Целевое увеличение массы для 10% покрытия (г)	3,295 г
Количество распыляемой дисперсии для достижения увеличения массы на 10% (г)	2400 г
Масса 20 таблеток после увеличения веса на 10% (г)	3,282 г
% мас./мас. целевого показателя для покрытия таблетки	12%
Целевой прирост массы для 12% покрытия (г)	3,354 г
Количество распыляемой дисперсии для достижения увеличения массы на 12% (г)	2900 г
Масса 20 таблеток после увеличения веса на 12% (г)	3,362 г

Для определения подходящих уровней энтеросолюбильного покрытия, таблетки с энтеросолюбильным покрытием при увеличении массы на 8%, 10% и 12% масс./масс. подвергали исследованию на растворение (500 мл растворяющей среды, скорость лопастной мешалки 75 об/мин). Результаты растворения представлены в **таблице 12** ниже.

Таблица 12: Результаты растворения

Название образца	Среднее значение (% высвобожденного препарата)
-------------------------	---

Название образца	Среднее значение (% высвобожденного препарата)				
	120	135	150	165	195
Время (мин) Time (min)					
Среда pH	pH 1,0	pH 6,8	pH 6,8	pH 6,8	pH 6,8
8% масс./масс. таблетки с энтеросолюбильным покрытием	19,6	0*	0*	0*	0*
10% масс./масс. таблетки с энтеросолюбильным покрытием	00	55	74	86	Не определено
12% масс./масс. таблетки с энтеросолюбильным покрытием	00	67	81	88	91

*Все таблетки распадались в кислоте. 0% лекарственного средства, растворенного в среде с pH 6,8, так как распавшиеся таблетки привели бы к разложению на кислотной стадии, и поэтому АФИ не обнаруживали на стадии буфера.

5 Таблетки с энтеросолюбильным покрытием, с увеличением массы 8%, не прошли тест на кислотоустойчивость. Таблетки с энтеросолюбильным покрытием с увеличением массы на 10% и таблетки с энтеросолюбильным покрытием с увеличением массы на 12% продемонстрировали удовлетворительную устойчивость к действию желудочного сока и соответствовали предложенным предварительным спецификациям высвобождения не менее 75% за 45 минут для энтеросолюбильных лекарственных форм.

10 На основании результатов растворения было обнаружено, что оптимальным приростом массы покрытия является 12% масс./масс.

Пример препарата 1.4

Твердую фармацевтическую композицию (P66), содержащую мета-арсенит натрия (SMA) в качестве активного фармацевтического ингредиента (АФИ), готовили с использованием способа, описанного выше в Примере изготовления 1.

- 5 Композицию изготавливали в пределах 700 г. Образцы однородности смеси и однородности содержимого отбирали для оценки однородности после основного времени перемешивания, равного 20 минутам.

В приведенной ниже **Таблице 13** представлен состав твердого ядра таблетки, содержащей 2,53 мг мета-арсенита натрия (до стадии покрытия).

10 **Таблица 13: Состав твердого ядра таблетки P66**

Материал	Функция	Мг/таблетку	% масс./масс.
Мета-арсенит натрия	АФИ	2,53	1,69
Двухосновный фосфат кальция безводный (мелкокристаллические гранулы A-Comprez)	наполнитель	71,55	47,70
Частично прежелатинизированный крахмал (Starch 1500)	связывающее вещество, дезинтегрант, наполнитель	67,67	45,11
Крахмалгликолят натрия (Explotab)	супер дезинтегрант	6,00	4,00
Коллоидный диоксид кремния (Aerosil 200)	глидант	0,75	0,50
Стеарилфумарат натрия (PRUV)	Смазывающее вещество	1,50	1,00
ИТОГО		150,00	100,00

После этапа смешивания, порошковая смесь продемонстрировала хорошие свойства текучести, о чем свидетельствует индекс Карра (25,74%). Порошковая смесь до прессования имела следующие свойства:

- Плотность в аэрированном состоянии: 0,75 г/см³

5 • Плотность на утряске: 1,01 г/см³

- Индекс Карра: 25,74%

- Коэффициент Хауснера: 1,35

10 Порошковая смесь очень хорошо спрессовывалась, и на протяжении всего цикла не наблюдалось никаких изменений массы и/или визуального расслоения. Были достигнуты высокая твердость твердого ядра (87,4 Н) и низкая хрупкость (0,11%), а время дезинтеграции (2 минуты 52 секунды) было относительно быстрым. Средняя толщина твердого ядра составила 3,66 мм.

15 Образцы однородности смеси отбирали после перемешивания в течение 20 минут, а образцы однородности содержимого отбирали в начале, середине и конце цикла прессования. Результаты по однородности смеси продемонстрировали превосходную однородность со значением относительного стандартного отклонения (RSD) 2,1 в %. Однородность содержания твердого ядра на всем протяжении цикла прессования (начало, середина и конец) показала хорошую однородность, так как было достигнуто значение максимального приемлемого значения (AV) <6,3 (значение AV <15 является приемлемым).

20 После стадии прессования твердое ядро таблетки покрывали полимерной системой энтеросолюбильного покрытия Acryl EZE II white (493Z180022), которую готовили, как описано в Примере изготовления 1. Параметры покрытия показаны в **таблице 14**, представленной ниже.

25 **Таблица 14: Параметры покрытия**

Параметр	Результат
Барабан для покрытия	15" Thai Coater
Температура воздушного потока на входе	90 - 110°C
Температура воздушного потока на выходе	~50°C

Параметр	Результат
Скорость барабана	16 об/мин
Скорость распыления	10-11 г/мин
Температура общей массы таблеточного слоя в барабане	~35°C
Впуск и выпуск воздуха закрыты	Находятся оба в середине
Расстояние от пистолета-распылителя до общего слоя таблеток	5 см (лопасти не видны)
Распылительная форсунка (мм)	1,2 мм
Давление воздуха вентилятора	20 фунтов на квадратный дюйм
Давление воздуха в пистолете-распылителе	10 фунтов на квадратный дюйм
Масса инертного наполнителя (г)	2600,0 г
Масса таблеток активного вещества (г)	350,0 г
Общая масса таблеточного слоя (г)	2950,0 г
Начальная масса 20 таблеток (г)	3,010 г
Целевой прирост массы для 12% покрытия (г)	3,371 г
Масса 20 таблеток после увеличения массы на 12% (г)	3,380 г (12,2% увеличение массы)

5 Таблетка с энтеросолюбильным покрытием демонстрировала приемлемый профиль растворения (500 мл среды, скорость лопастной мешалки 100 об/мин). Через 120 минут композиция оставалась интактной в кислой среде (рН 1,0) с высвобождением АФИ 0%. Через 135 минут при рН 6,8 высвобождается 21% АФИ. Через 150 минут при рН 6,8 высвобождается 86% АФИ. Через 165 минут при рН 6,8 высвобождается 96% АФИ. Через 195 минут при рН 6,8 высвобождается 98% АФИ.

10 Таблетка с энтеросолюбильным покрытием продемонстрировала удовлетворительную устойчивость к действию желудочного сока и соответствовала предложенной предварительной спецификации высвобождения не менее 75% за 45 минут для энтеросолюбильных лекарственных форм.

Пример изготовления 2

15 В приведенной ниже **Таблице 15** представлен состав таблетки с энтеросолюбильным покрытием, содержащей 2,5 мг мета-арсенита натрия в качестве активного фармацевтического ингредиента (АФИ). Таблетку с энтеросолюбильным покрытием готовили с использованием способа, описанного ниже.

Таблица 15: Состав таблетки с энтеросолюбильным покрытием из примера изготовления 2

Материал	Функция	мг/таблетку	%масс./масс.
Мета-арсенит натрия (SMA)	АФИ	2,50	1,67
Двухосновный фосфат кальция безводный, USP (порошок)	разбавитель, наполнитель	37,50	25,00
Силицифицированная микрокристаллическая целлюлоза (Prosolv HD90)	наполнитель, разбавитель прессования	107,00	71,33
Крахмалгликолят натрия (Explotab)	супер дезинтегрант	1,50	1,00

Коллоидный диоксид кремния (Cab-o-sil)	глицерин	0,75	0,50
Стеарилфумарат натрия (PRUV)	Смазывающее вещество	0,75	0,50
Итого – ядро:		150,00	100
Acryl-EZE Green (93O11863) энтеросолюбильное полимерное покрытие	энтеросолюбильное покрытие	16,50	
Итого – в виде таблетки с покрытием:		166,50	

В целом, как подробно описано ниже, мета-арсенит натрия («SMA») и вспомогательные вещества смешивали вместе (двух-стадийный процесс смешивания без использования воды или растворителя) с образованием порошковой смеси.

5 Порошковую смесь затем прессовали с образованием твердого ядра таблетки. Твердое ядро таблетки затем покрывали энтеросолюбильным покрытием.

Смешивание

Описанный ниже процесс смешивания использовали для смешивания ингредиентов.

10 АФИ и другие ингредиенты композиции дозировали и взвешивали. Поскольку концентрация АФИ была очень низкой, для улучшения однородности смеси был использован двух-стадийный процесс смешивания (с использованием «премикса АФИ» и «основной смеси»).

15 АФИ просеивали через сито с размером ячеек 106 мкм (время просеивания составляло от 5 до 8 минут).

Часть двухосновного фосфата кальция добавляли к просеянному АФИ, и полученную смесь перемешивали в течение 30 минут, чтобы получить «премикс АФИ».

20 Премикс АФИ затем смешивали с оставшимся двухосновным фосфатом кальция и другими вспомогательными веществами (такими как силикатизированная микрокристаллическая целлюлоза, крахмалгликолят натрия, коллоидный диоксид кремния и стеарилфумарат натрия) для получения «основной смеси». Основную смесь

перемешивали с помощью интенсификатора в течение 4 минут, чтобы получить порошкообразную смесь.

Прессование

5 Порошковую смесь прессовали на таблетировочной машине Key International с использованием инструмента размером 0,25 дюйма до целевой массы таблетки 150 мг + 5% (диапазон 142,5–157,5 мг). Твердые ядра были очищены от пыли.

Конечные твердые ядра не показали значительной хрупкости (0,00%), а твердость составила 156,9 Н (16 кПа).

Энтеросолюбильное покрытие

10 Дисперсию энтеросолюбильного покрытия с содержанием твердого вещества 25% масс./масс. получали путем диспергирования зеленого порошка Acryl EZE в деионизированной воде. Дисперсию перемешивали около 30 минут (до гомогенности).

15 Обеспыленные твердые ядра покрывали распылением (350 г/мин) дисперсии с увеличением веса примерно от 10% до 12% масс./масс. Скорость вращения барабана составляла около 6-8 об/мин. После нанесения покрытия, таблетки с покрытием поддавали сушке.

Пример 4. Ингибирующий эффект однократной дозы SMA в LPS-индуцированной модели ARDS у мышей BALB/c.

20 В этом исследовании оценивалась способность вещества контролировать острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) (acute respiratory distress syndrome (ARDS) у модели ARDS, вызванного интратрахеальным введением LPS домовой мыши *Mus musculus* (BALB/c), путем измерения уровня цитокинов в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (BALF) после перорального введения SMA, исследуемого вещества, и дексаметазона, в качестве позитивного контрольного вещества.

25 Было выбрано пять групп мышей от G1 до G5: (G1) негативный контроль; (G2) доза SMA 1,03 мг/кг; (G3) доза SMA 1,54 мг/кг; (G4) доза SMA 2,05 мг/кг; и (G5) 3 мг/кг дозы дексаметазона - вещества позитивного контроля. В каждой группе было по 10 мышей.

30 Исследуемое вещество SMA вводили перорально один раз за 2 часа до индукции ARDS, а дексаметазон - вещество позитивного контроля, вводили перорально один раз за 1 час до индукции ARDS.

Общие симптомы наблюдались один раз в сутки после окончания периода карантинной акклиматизации. Массу животных измеряли дважды, перед их приобретением и началом испытания. До конца испытания во всех группах не наблюдалось никаких отклонений от нормы, связанных с введением веществ.

5 При распределении по группам у всех животных измеряли массу тела, затем животных рандомно распределяли в каждую группу, и статистической значимости массы тела животных во всех группах не было.

10 Анализ выживаемости показал, что выживаемость увеличивалась за счет введенного исследуемого вещества со статистической значимостью (G3: $p < 0,005$ (48 часов после применения LPS); G4: $p < 0,0005$ (48 часов после применения LPS); G5: $p < 0,0001$ (48 часов после применения LPS)).

15 Анализ TNF- α показал, что измерения превышали предел количественного определения (LoQ) во все моменты времени, а экспрессия мишени была подавлена путем введения исследуемого вещества статистически значимым образом (G4: $p < 0,005$ (1 час, 2 часа, 6 часов и через 12 ч после применения LPS); G5: $p < 0,0005$ (4 ч после применения LPS) и $p < 0,0001$ (1 ч, 2 ч, 6 ч и 12 ч после применения LPS)), за исключением предварительного применения LPS (0 ч) и 24 ч.

20 Анализ IL-6 показал, что измерения превышали LoQ во все моменты времени, а экспрессия мишени была подавлена путем введения исследуемого вещества статистически значимым образом (G4: $p < 0,05$ (через 2 часа и 4 часа после применения LPS) и $p < 0,005$ (через 6 ч и 12 ч после применения LPS); G5: $p < 0,05$ (1 ч, 2 ч, 4 ч и 24 ч после применения LPS) и $p < 0,0005$ (6 ч после применения LPS), и $p < 0,0001$ (12 ч после применения LPS)), за исключением для предварительного применения LPS (0h).

25 Анализ IL-1 β показал, что измерения IL-1 β превышали LoQ через 4 часа и 6 часов, и было обнаружено, что экспрессия мишени статистически значимо была подавлена путем введения исследуемого вещества (G4: $p < 0,005$ (4 часа и 6 часов после применения LPS); G5: $p < 0,0005$ (через 4 и 6 ч после применения LPS)), за исключением предварительного применения LPS (0 ч), 1 ч, 2 ч, 12 ч и 24 ч. Было обнаружено, что экспрессия является статистически значимой (G4: $p < 0,005$; G5: $p < 0,0005$) через 12 часов
30 после применения LPS, но она была исключена, поскольку измерения не превышали LoQ.

Данные IFN- γ были исключены из анализа из-за невозможности превышения LoQ во всех точках измерения.

В результате анализа GM-CSF, все измеренные значения были исключены из анализа, поскольку они не превышали LoQ, за исключением группы G1, для которой измерения проводились через 6 часов после применения LPS. Экспрессия через 4 ч после применения LPS была проанализирована как статистически значимая (G2: $p < 0,05$, G3: $p < 0,05$, G4: $p < 0,05$, G5: $p < 0,05$), но была исключена, поскольку измеренные значения не превышали LoQ. .

Это исследование было проведено для изучения ингибирующей способности исследуемого вещества SMA в отношении стимулируемых LPS провоспалительных медиаторов путем введения исследуемого вещества SMA модели ARDS, вызванного повторным интратрахеальным введением LPS домашним мышам *Mus musculus* (BALB/c). В этом исследовании влияние исследуемого вещества и вещества позитивного контроля на LPS-стимулированные провоспалительные медиаторы оценивали в группах, которым вводили исследуемое вещество или вещество позитивного контроля. Было обнаружено, что при исследовании BALF, уровень цитокина (TNF- α , IL-6, и IL-1 β), известного как основной медиатор ARDS, был значительно снижен в группах, которым вводили исследуемое вещество, так и в группах, которым вводили вещество позитивного контроля.

Было подтверждено, что исследуемое вещество SMA ингибирует продукцию LPS-стимулированных TNF- α и IL-6 в конкретной точке измерения дозо-зависимым образом, доказывая эффективность SMA в качестве терапевтического средства для предотвращения ARDS.

В случае IFN-gamma, GM-CSF и IL-1 β аналитические значения были исключены из объема анализа LoQ в некоторых точках измерения, но было обнаружено, что исследуемое вещество SMA дозо-зависимо ингибирует выработку IL-1 β в некоторых точках измерения.

В заключение можно сказать, что SMA оказывает быстрое ингибирующее действие на выработку провоспалительных медиаторов, таких как TNF- α , IL-6 и IL-1 β , и, таким образом, может использоваться для увеличения выживаемости за счет облегчения острого респираторного синдрома.

На Фигурах и в таблицах примера 4, SMA обозначен как «PAX-1».

4.1 Обзор исследования

Это исследование было проведено для оценки способности контролировать острый респираторный дистресс-синдром (ARDS) путем измерения высвобождения цитокинов в жидкостях бронхоальвеолярного лаважа после перорального введения SMA,

как исследуемого вещества и дексаметазона, в качестве позитивного контроля, у индуцированной липополисахаридами модели ARDS путем интратрахеального введения препарата домашним мышам *Mus musculus* (BALB/c).

4.2. Учебный материал и процедуры

5 4.2.1 Исследуемое вещество

Название вещества	SMA
Физические свойства	Белый порошок
Условия хранения	Хранение при комнатной температуре
Меры предосторожности при обращении	Хранить при комнатной температуре перед применением
Специальное примечание	Защищать от света

4.2.2 Вещество позитивного контроля

Название вещества	Дексаметазон (Dexamethasone (cat. D2915; приобретено у Sigma-Aldrich Korea Inc.)
Физические свойства	Белый порошок
Условия хранения	Хранить в холодильнике (при 4°C)
Меры предосторожности при обращении	Хранить при комнатной температуре перед применением
Специальное примечание	Хранить в холодильнике до применения; подготовить и использовать в день применения

4.2.3 Наполнитель

Название вещества	Стерильная вода для инъекций (serial no. C4V1AF3, приобретенная у Dai Han Pharm Co., Ltd., KOREA)
Условия хранения	При комнатной температуре

4.2.4 Приготовление исследуемого вещества и анализ состава

Исследуемое вещество (SMA) было приготовлено путем взвешивания ингредиента до необходимых дозированных концентраций 1,03, 1,54 и 2,05 мг/кг.

4.2.5 Генерация модели острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS)

5 4.2.5.1 Индуцирующее вещество

Название	Липополисахарид; LPS(O111:B4) от <i>Escherichia coli</i> (cat. L4130; приобретенный у Sigma-Aldrich Korea, Inc.)
Растворимость	5 мг/мл

4.2.5.2 Способ приготовления и применения

Подготовка (BALF)

10 В день применения LPS готовили необходимый объем в расчете на массу тела животного путем взвешивания 100 мкг LPS и добавления 500 мкл воды для инъекций. Пробирку, содержащую смесь, в достаточной степени перемешивали с помощью вихревой мешалки и хранили во льду до применения.

Название	Композиция
LPS	1 мг
Вода для инъекций	5 мл
Общий объем	5 мл

15 *Подготовка (Выживаемость)*

20 В день обработки LPS готовили необходимый объем в расчете на массу тела животного путем взвешивания 48 мг LPS и добавления 12 мл воды для инъекций. Пробирку, содержащую смесь, тщательно перемешивали с помощью вихревого миксера и хранили во льду до введения.

Название	Композиция
LPS	48 мг
Вода для инъекций	12 мл
Общий объем	12 мл

4.2.6 Животное для исследования

25 Вид и порода BALB/cAnNTac
Производитель DaehanBiolink co., Ltd., Корея
Возраст 8 недель
Дата рождения 2020.02.10 ~ 12 (BALF)

Дата рождения 2020.04.01 ~ 03 (Выживаемость)
Пол Мужской (BALF), Женский (Выживаемость)
Место для приобретения DaehanBiolink co., Ltd., Корея

5 Пол, количество животных, возраст и диапазон массы тела на входе (BALF)
Самцы, 360 мышей, возраст 8 недель, 19,2 г ~ 25,0 г

Пол, количество животных и диапазон массы тела на входе (выживаемость)
Самка, 60 мышей, возраст 6 недель, 18,2 г ~ 21,3 г

10

Индукция ARDS

BALF

После измерения массы тела мышей через сутки после окончания периода карантинной акклиматизации с помощью одноразового наконечника пипетки набирали
15 50 мкл смеси LPS и проводили принудительное введение 10 мкг/50мкл/голову уже анестезированным мышам интратрахеально. Пока мыши выходили из под анестезии после введения, все это время они были под наблюдением. Мышам вводили LPS два раза, и лечение проводили в день 1 и день 5. После применения препарата, мышей осматривали по общим симптомам один раз в день.

20 *Выживаемость*

После измерения массы тела через сутки после завершения периода карантинной акклиматизации, смесь LPS вводили с помощью одноразового шприца (1 мл, 26G) в брюшную полость в концентрации 20 мг/кг. Обработанных мышей каждый час осматривали на наличие общих симптомов и проверяли на наличие мертвых мышей.

25

Групповое действие

BALF

Из первично обработанных LPS мышей те, у которых не было проблем со здоровьем до вторичного введения (бустер-инъекция), были разделены в общей сложности на 5 групп по 70 мышей в группе, как можно более равномерно в зависимости от массы тела каждой группы.

30 *Выживаемость*

После периода карантинной акклиматизации животных без аномалий разделяли на группы в общей сложности на 5 групп по 10 мышей в группе как можно более равномерно в зависимости от массы тела каждой группы.

35

4.2.7 Лечение

Курс лечения

5	Исследуемое вещество:	перорально (принудительное введение в желудок).
	LPS (BALF):	Принудительное введение в бронхи (интратрахеальная инъекция)
	LPS (выживаемость):	внутрибрюшинно

10

Способ применения и частота

Введение проводилось однократно с использованием одноразового шприца (шприц BD 1 мл, cat.: REF301321, Lot: 9326990 BD, U.S.A.) и каждое исследуемое вещество вводили в зависимости от времени, которое потребовалось для индуцирования острого респираторного дистресс-синдрома (применение LPS).

15

SMA (Исследуемое вещество)	За 2 часа
Дексаметазон (вещество позитивного контроля)	За 1 час

20

4.2.8 Групповой состав и лечебная доза

4.2.8.1 Групповой состав (BALF)

25

	Группа	BALF моменты отбора проб	Доза введения (мг/кг)	Объем введения (мл/кг)	№ животных* (образец №)
G1	Негативного контроля	Перед LPS	0	10	70 (2101 ~ 2170)
G2	SMA (низкий)	введение (0h)	1,03	10	70 (2201 ~ 2270)
G3	SMA (средний)	1ч, 2ч, 4ч, 6ч, 12ч	1,54	10	70 (2301 ~ 2370)
G4	SMA (высокий)	24ч	2,05	10	70 (2401 ~ 2470)
G5	Dexamethasone Дексаметазон	(всего 7 раз)	3	10	70 (2501 ~ 2570)

* Отбор проб BALF включал 10 мышей в группе и выполнялся 7 раз, всего 70 мышей.

4.2.8.2 Групповой состав (Выживаемость)

	Группа	LPS (мг/кг)	Доза введения (мг/кг)	Объем введения (мл/кг)	№ животных (образец №)
G1	Негативного контроля	20	0	10	10 (2101 ~ 2110)
G2	SMA (низкий)	20	1,03	10	10 (2201 ~ 2210)
G3	SMA (средний)	20	1,54	10	10 (2301 ~ 2310)
G4	SMA (высокий)	20	2,05	10	10 (2401 ~ 2410)
G5	Дексаметазон	20	3	10	10 (2501 ~ 2510)

5 4.2.8.3 Определение лечебной дозы

Лечебная доза исследуемого вещества (SMA) планировалась в размере 5мг, 7,5мг и 10мг, которые возможны для применения в клинических условиях для здорового взрослого человека с массой тела 60 кг. Эквивалентная доза для человека (HED) была рассчитана методом расчета согласно Инструкции FDA* с использованием площади поверхности тела. Затем путем подстановки, для отрегулирования площади поверхности тела подопытного животного (мыши), была установлена лечебная доза в размере 1,03 мг/кг, 1,54 мг/кг и 2,05 мг/кг.

*Взято из Инструкции для промышленности, где устанавливается максимально безопасная первоначальная доза терапевтических средств во время клинических испытаний на взрослых здоровых добровольцах.

Преобразование дозы для животных в эквивалентную дозу для человека (HED) на основе площади поверхности тела			
Вид	Чтобы преобразовать дозу животного в мг/кг в дозу в мг/м ² , умножьте на k_m	Чтобы преобразовать дозу животного в мг/кг в HED* в мг/кг, выполните одно из следующих действий:	
		Разделите дозу для животных на	Умножьте дозу для животных на
Человек	37	-	-
Мышь	3	12,3	0,08

*из расчета на взрослого человека весом 60 кг

4.2.9 Наблюдение и измерение массы тела

Наблюдение за общими симптомами

В течение периода наблюдения, у испытуемых один раз в день проверяли общие симптомы, такие как внешний вид, поведение и фекалии, а также наличие мертвых животных.

Избавление от мертвых животных

5 Всего за период наблюдения произошло 8 случаев летального исхода, которые были исключены из анализа.

Измерение массы тела

10 Массу тела измеряли в день трансплантации клеточной линии, один раз в неделю и в день умерщвления. Если массу тела измеряли в день лечения, ее измеряли до введения.

4.2.10 Отбор проб BALF и анализ цитокинов

Забор жидкости бронхоальвеолярного лаважа; BALF

15 У анестезированного с помощью анестетика субъекта разрезали дыхательные пути, обнажали бронхи и в бронх вставляли одноразовый катетер 22G (BD, Cat.: REF382423, U.S.A). Вставленный катетер и бронх зашивали (AILEE, Cat.: SK521, Lot: 7908772U, KOREA) для фиксации во избежание утечки инфузии, внутреннюю часть легких дважды медленно промывали через катетер 600 мкл PBS (welgene, Cat.: ML008-01, Lot: ML08200201, KOREA), загружали в одноразовый шприц (BD 1 мл шприц, BD, Cat.: REF301321, Lot: 9326990, U.S.A.), а лаваж переносили в микропробирку (SPL, Cat.: 60015, 20 Lot: LAOC16A60015, KOREA). Перенесенный BALF (лаваж легких) немедленно центрифугировали (Hanil, HI_SM-13/A2.0, KOREA) для разделения клеток и супернатанта, а супернатант переносили в новую пробирку и хранили после мгновенной заморозки с использованием жидкого азота в морозильной камере до начала анализа по высвобождению цитокинов.

25 *Цитокиновый анализ*

Образец для анализа	Цель	Способ анализа
BALF	IL-1 β , IL-6, TNF- α , GM-CSF, IFN-gamma	Мультиплекс
	iNOS, COX-2, NF-kB	ELISA*

*Комплект для проведения анализа прилагался

4.2.11 Анализ выживаемости

Наличие мертвых животных проверяли каждый час до 24 часов после обработки LPS и через 48 часов.

4.2.12 Статистический анализ данных

5 Критерий равной дисперсии был выполнен с использованием обобщенного теста Д'Агостино-Пирсона на нормальность распределения для определения достоверности показателей. Поскольку аналитические результаты образцов, за исключением данных о массе тела, отсутствовали в количестве образцов, тест равной дисперсии был отклонен. Для анализа массы тела, выполнялся однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA; 10 уровень значимости: 0,05), и если значимость наблюдалась, выполнялись множественные тесты t-критерия Даннета для подтверждения значимости между каждой группой исследования (G2~G5) по сравнению с группой негативного контроля (G1) (уровень значимости: односторонний 0,05 и 0,01). Поскольку тесты были отклонены для

15 цитокинов, был проведен тест Крускала-Уоллиса (уровень значимости: 0,05), и, если значимость наблюдалась, были выполнены несколько тестов t-критерия Данна для подтверждения значимости между каждой группой исследования (G2~G5) и группой негативного контроля (G1) (уровень значимости: односторонний 0,05 и двусторонний 0,1). 20

Для получения результатов по анализу выживаемости был проведен тест логарифмического ранга (Мантела-Кокса), для подтверждения значимости между каждой группой исследования (G2~G5) и группой негативного контроля (G1) (уровень значимости: односторонний 0,05 и двусторонний 0,1).

4.3. Результаты и обсуждение

4.3.1 Оценка продуцирования и ингибирования цитокинов

25 4.3.1.1. Анализ продуцирования цитокинов (Фигуры 13~15, таблицы 16–19)

Мультиплекс (Luminex, Austin, TX, USA) использовали для анализа TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN-gamma и GM-CSF, который измеряет медианную интенсивность флуоресценции (MFI). Путем сортировки каждого образца по группам и приобретенным временным точкам BALF, для анализа было использовано в общей сложности 7 наборов, и он был 30 разработан для исследования одного образца из каждой группы в наборе.

Весь анализ был рассчитан путем замены полученного значения MFI формулой стандартной кривой каждого набора, рассчитанной из полинома четвертой степени. Было подтверждено, что стандартное значение R^2 равно 1 во всех анализах, и подтверждено, что данные измерений в высшей степени являются достоверными.

Те образцы, которые были исключены из анализа из-за предела количественного определения, были разбавлены с использованием реагента из протокола исследования.

5 Поскольку коэффициент разбавления применялся для анализа стимулированного липополисахаридами высвобождения цитокинов высокого уровня, было подтверждено, что те, у которых были низкие значения, были измерены ниже предела количественного определения и были включены как неточные измерения. Хотя они были исключены из анализа из-за амплификации в соответствии с коэффициентом разбавления, были составлены Таблицы и Фигуры, включающие все данные.

Анализ TNF- α (Фигура 13, Таблица 16)

10 Экспрессия TNF- α во всех группах составила 2 пг/мл и 11~12 пг/мл при лечении до введения LPS (0 ч) и при 24-часовом анализе. Однако он был исключен из анализа данных, поскольку был ниже предела количественного определения MFI. Анализ проводили через 1 час, 2 часа, 6 часов и 12 часов после применения LPS.

Таблица 16: Сводные показатели среднего уровня TNF-α в BALF

Группа/ Доза (мг/кг)		TNF-альфа в BALF (пг/мл)						
		Время после введения (часы)						
		0	1	2	4	6	12	24
G1	Среднее значение	2	1,997	1,417	1,036	735	249	11
0	Стандартное отклонение	0	578	315	454	188	23	2
	N	7	7	7	7	7	7	7
G2	Среднее значение	2	1,303	1,004	794	502	174	12
1,03	Стандартное отклонение	0	225	377	187	188	21	2
	N	7	7	7	7	7	7	7
G3	Среднее значение	2	1,062	707	611	407	120	12
1,54	Стандартное отклонение	0	445	227	297	49	17	2
	N	7	7	7	7	7	7	7
G4	Среднее значение	2	729	559	539	303	38	12
2,05	Стандартное отклонение	0	139	60	137	111	5	2
	N	7	7	7	7	7	7	7
			##	##		##	##	
G5	Среднее значение	2	508	394	338	204	23	11
3	Стандартное отклонение	0	140	87	48	24	5	2
	N	7	7	7	7	7	7	7
			####	####	###	####	####	

G1 (негативный контроль, 0 мг/кг), G2 (PAX -1, 1,03 мг/кг), G3 (PAX -1, 1,54 мг/кг), G4 (PAX -1, 2,05 мг/кг), G5 (дексаметазон, 3 мг/кг)

5 Каждая точка представляет среднее значение + S.D. (стандартное отклонение) (n=7)
 ## p<0,005, Достоверное отличие от негативного контроля (G1) по критерию Данна
 ### p<0,0005, достоверное отличие от негативного контроля (G1) по критерию Данна
 #### p<0,0001, достоверное отличие от негативного контроля (G1) по критерию Данна
 Результаты 0h и 24h были исключены из-за предела количественного определения.

10 N: количество животных

Изменение продуцирования TNF-α в группе негативного контроля (G1) началось с 1,997 пг/мл, а затем составило 1,417 пг/мл, 1,036 пг/мл, 735 пг/мл и 249 пг/мл; было замечено, что индуцированное LPS продуцирование TNF-α увеличивалось, а затем уменьшалось в зависимости от времени.

Изменение продуцирования TNF- α в группе, получавшей 1,03 мг/кг SMA (G2), составило 1,303 пг/мл, 1,004 пг/мл, 794 пг/мл, 502 пг/мл и 174 пг/мл. Было замечено, что индуцированное LPS продуцирование TNF- α увеличивалось, а затем уменьшалось в зависимости от времени; однако не было статистической значимости ($p < 0,05$) при сравнении зависимого от времени продуцирования TNF- α с группой негативного контроля (G1).

Изменение продуцирования TNF- α в группе, получавшей 1,54 мг/кг SMA (G3), составило 1,062 пг/мл, 707 пг/мл, 611 пг/мл, 407 пг/мл и 120 пг/мл. Было замечено, что индуцированное LPS продуцирование TNF- α увеличивалось, а затем уменьшалось в зависимости от времени; однако не было статистической значимости ($p < 0,05$) при сравнении зависимого от времени продуцирования TNF- α с группой негативного контроля (G1).

Изменение продуцирования TNF- α в группе, получавшей 2,05 мг/кг SMA (G4), составило 729 пг/мл, 559 пг/мл, 539 пг/мл, 303 пг/мл и 38 пг/мл. Было замечено, что индуцированное LPS продуцирование TNF- α увеличивалось, а затем уменьшалось в зависимости от времени, и в некоторые моменты времени значения TNF- α были статистически значимыми ($p < 0,005$: 1 час, 2 часа, 6 часов и 12 часов) по сравнению с группой негативного контроля (G1).

Изменение продуцирования TNF- α в группе, получавшей 3 мг/кг вещества положительного контроля, дексаметазона (G5), составило 508 пг/мл, 394 пг/мл, 338 пг/мл, 204 пг/мл и 23 пг/мл. Было замечено, что индуцированное LPS продуцирование TNF- α увеличивалось, а затем уменьшалось в зависимости от времени, и в некоторые моменты времени значения TNF- α были статистически значимыми ($p < 0,0005$: 4 часа, $p < 0,0001$: 1 час, 2 часа, 6 часов, 12 часов) по сравнению с группой негативного контроля (G1).

Изменение продуцирования TNF- α во всех группах (G1–G5) наносили на график с течением времени (данные не показаны), из которого получали доступ к общему снижению TNF- α путем расчета значения AUC (площадь под кривой) для каждой группы (Фигура 13). Статистически значимое снижение продуцирования TNF- α было очевидным во всех группах, получавших SMA или дексаметазон ($p < 0,005$: G2–G5), по сравнению с группой негативного контроля (G1). В Таблице 19 представленной ниже показаны числовые значения и статистический анализ значений AUC для каждой группы лечения лекарственным средством.

Анализ IL-6 (Фигура 14, Таблица 17)

В анализе перед применением LPS (0 ч) экспрессия IL-6 во всех группах была измерена на уровне 12~13 пг/мл. Однако, поскольку эти значения были ниже предела количественного определения MFI, они были исключены из анализа данных, и для анализа использовались данные через 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов и 24 часа после применения LPS.

Таблица 17: Сводная информация о среднем уровне IL-6 в BALF

Группа/ Доза (мг/кг)		IL-6 в BALF (пг/мл)						
		Время после введения (часы)						
		0	1	2	4	6	12	24
G1	Среднее значение	13	3,663	10,238	13,015	10,298	8,169	3,513
0	Стандартное отклонение	3	1,062	2,529	2,255	1,692	1,021	1,496
	N	7	7	7	7	7	7	7
G2	Среднее значение	13	2,984	10,188	12,871	8,954	7,276	3,402
1,03	Стандартное отклонение	3	332	3,985	3,450	1,714	2,255	1,249
	N	7	7	7	7	7	7	7
G3	Среднее значение	13	3,152	7,107	9,842	6,814	5,094	3,623
1,54	Стандартное отклонение	3	610	2,473	2,427	1,075	1,541	936
	N	7	7	7	7	7	7	7
G4	Среднее значение	13	2,193	4,701	8,209	4,341	2,629	2,096
2,05	Стандартное отклонение	3	764	2,376	2,321	798	652	335
	N	7	7	7	7	7	7	7
				#	#	##	##	
G5	Среднее значение	12	2,172	4,411	7,727	2,064	1,294	1,804
3	Стандартное отклонение	2	416	770	2,308	274	467	550
	N	7	7	7	7	7	7	7
			#	#	#	###	####	#

10 G1 (негативный контроль, 0 мг/кг), G2 (PAX -1, 1,03 мг/кг), G3 (PAX -1, 1,54 мг/кг), G4 (PAX -1, 2,05 мг/кг), G5 (дексаметазон , 3 мг/кг)

Каждая точка представляет среднее значение + S.D. (стандартное отклонение) (n=7)

p<0,05, достоверное отличие от негативного контроля (G1) по критерию Данна

p<0,005, Достоверное отличие от негативного контроля (G1) по критерию Данна

p<0,0005, достоверное отличие от негативного контроля (G1) по критерию Данна

$p < 0,0001$, достоверное отличие от негативного контроля (G1) по критерию Данна
Результат 0h был исключен из-за предела количественного определения.

N: количество животных

5 Изменение продуцирования IL-6 в группе негативного контроля (G1) началось с
3,663 пг/мл, а затем 10,238 пг/мл, 13,015 пг/мл, 10,298 пг/мл, 8,169 пг/мл и 3,513 пг/мл;
было замечено, что индуцированное LPS продуцирование IL-6 увеличивалось, а затем
снижалось в зависимости от времени.

10 Изменение продуцирования IL-6 в группе, получавшей 1,03 мг/кг СМА (G2),
составило 2,984 пг/мл, 10,188 пг/мл, 12,871 пг/мл, 8,954 пг/мл, 7,276 пг/мл и 3,402 пг/мл.
Было замечено, что индуцированное LPS продуцирование IL-6 увеличивалось, а затем
снижалось в зависимости от времени; однако не было статистической значимости
($p < 0,05$) при сравнении зависимой от времени выработки IL-6 с группой негативного
контроля (G1).

15 Изменение продуцирования IL-6 в группе, получавшей 1,54 мг/кг СМА (G3),
составило 3,152 пг/мл, 7,107 пг/мл, 9,842 пг/мл, 6,814 пг/мл, 5,094 пг/мл и 3,623 пг/мл.
Было замечено, что индуцированное LPS продуцирование IL-6 увеличивалось, а затем
снижалось в зависимости от времени; однако не было статистической значимости
($p < 0,05$) при сравнении зависимой от времени и IL-6 с группой негативного контроля (G1).

20 Изменение продуцирования IL-6 в группе, получавшей 2,05 мг/кг СМА (G4),
составило 2,193 пг/мл, 4,701 пг/мл, 8,209 пг/мл, 4,341 пг/мл, 2,629 пг/мл и 2,096 пг/мл.
Было замечено, что индуцированное LPS продуцирование IL-6 увеличивалось, а затем
снижалось в зависимости от времени, и в некоторые моменты времени значения IL-6
были статистически значимыми ($p < 0,05$: 2 часа и 4 часа, $p < 0,005$: 6 часов и 12 часов) по
сравнению с группой негативного контроля (G1).

25 Изменение продуцирования IL-6 в группе, получавшей 3 мг/кг вещества
позитивного контроля, дексаметазона (G5), составило 2,172 пг/мл, 4,411 пг/мл, 7,727
пг/мл, 2,064 пг/мл, 1,294 пг/мл. и 1,804 пг/мл. Было замечено, что индуцированное LPS
продуцирование IL-6 увеличивалось, а затем снижалось в зависимости от времени, и в
некоторые моменты времени значения IL-6 были статистически значимыми ($p < 0,05$: 1
30 час, 2 часа, 4 часа и 24 часа, $p < 0,0005$: 6h, $p < 0,0001$: 12h) по сравнению с группой
негативного контроля (G1).

35 Изменение продуцирования IL-6 во всех группах (G1-G5) было нанесено на
график с течением времени (данные не показаны), из которого было получено общее
снижение IL-6 путем расчета значения AUC (площадь под кривой) для каждой группы
(Фигура 14). Статистически значимое снижение продуцирования IL-6 было очевидно в

некоторых группах, получавших СМА или дексаметазон ($p < 0,005$: G3, G5), по сравнению с группой негативного контроля (G1). В Таблице 19 представленной ниже, показаны числовые значения и статистический анализ значений AUC для каждой группы лечения лекарственным средством.

5 Анализ IL-1 β (Фигура 15, Таблица 18)

При анализе лечения до применения LPS (0 часов) и через 1 час, 2 часа и 24 часа после применения LPS экспрессия IL-1 β во всех группах составила 203~295 пг/мл. Однако, поскольку эти значения были ниже предела количественного определения MFI, они были исключены из анализа данных, а для анализа использовались данные через 4
10 часа, 6 часов и 12 часов после применения LPS.

Таблица 18: Сводная информация о среднем уровне IL-1 β в BALF

Группа/ Доза (мг/кг)		IL-1 β in BALF (пг/мл)						
		Время после введения (часы)						
		0	1	2	4	6	12	24
G1	Среднее значение	212	210	246	510	686	414	295
0	Стандартное отклонение	16	15	24	46	77	17	28
	N	7	7	7	7	7	7	7
G2	Среднее значение	215	210	249	468	600	405	294
1,03	Стандартное отклонение	13	15	29	49	37	34	25
	N	7	7	7	7	7	7	7
G3	Среднее значение	209	205	256	413	517	382	285
1,54	Стандартное отклонение	14	14	25	48	18	16	32
	N	7	7	7	7	7	7	7
G4	Среднее значение	212	203	251	374	483	335	288
2,05	Стандартное отклонение	14	9	24	31	36	15	26
	N	7	7	7	7	7	7	7
					##	##	##	
G5	Среднее значение	208	210	241	350	458	318	258
3	Стандартное отклонение	12	19	23	30	37	28	25
	N	7	7	7	7	7	7	7
					###	###	###	

G1 (негативный контроль, 0 мг/кг), G2 (PAX -1, 1,03 мг/кг), G3 (PAX -1, 1,54 мг/кг), G4 (PAX -1, 2,05 мг/кг), G5 (дексаметазон , 3 мг/кг)

Каждая точка представляет среднее значение + S.D. (Стандартное отклонение) (n=7)

p<0,005, Достоверное отличие от негативного контроля (G1) по критерию Данна

p<0,0005, достоверное отличие от негативного контроля (G1) по критерию Данна

Результаты 0h, 1h, 2h и 24h были исключены из-за предела количественного определения.

N: количество животных

Изменение продуцирования IL-1 β в группе негативного контроля (G1) началось с 510 пг/мл, а затем с 686 пг/мл и 414 пг/мл. Было замечено, что индуцированное LPS продуцирование IL-1 β увеличивалось, а затем уменьшалось в зависимости от времени.

Изменение продуцирования IL-1 β в группе, получавшей 1,03 мг/кг SMA (G2), составило 468 пг/мл, 600 пг/мл и 405 пг/мл. Было замечено, что индуцированное LPS продуцирование IL-1 β увеличивалось, а затем уменьшалось в зависимости от времени; однако не было статистической значимости ($p < 0,05$) при сравнении зависимого от времени продуцирования IL-1 β с группой негативного контроля(G1).

Изменение продуцирования IL-1 β в группе, получавшей 1,54 мг/кг SMA (G3), составило 413 пг/мл, 517 пг/мл и 382 пг/мл. Было замечено, что индуцированное LPS продуцирование IL-1 β увеличивалось, а затем уменьшалось в зависимости от времени; однако не было статистической значимости ($p < 0,05$) при сравнении зависимого от времени продуцирования IL-1 β с группой негативного контроля (G1).

Изменение продуцирования IL-1 β в группе, получавшей 2,05 мг/кг SMA (G4), составило 374 пг/мл, 483 пг/мл и 335 пг/мл. Было замечено, что индуцированное LPS продуцирование IL-1 β увеличивалось, а затем уменьшалось в зависимости от времени, и в некоторые моменты времени значения IL-1 β были статистически значимыми ($p < 0,005$: 4 часа, 6 часов и 12 часов) по сравнению с таковыми в группе негативного контроля(G1).

Изменение продуцирования IL-1 β в группе, получавшей 3 мг/кг вещества положительного контроля, дексаметазона (G5), составило 350 пг/мл, 458 пг/мл и 318 пг/мл. Было замечено, что индуцированное LPS продуцирование IL-1 β увеличивалось, а затем уменьшалось в зависимости от времени, и в некоторые моменты времени значения IL-1 β были статистически значимыми ($p < 0,0005$: 4 часа, 6 часов и 12 часов) по сравнению с таковыми в группе негативного контроля(G1).

Изменение продуцирования IL-1 β во всех группах (G1-G5) наносили на график с течением времени (данные не показаны), из которого получали доступ к общему снижению IL-1 β путем расчета значения AUC (площадь под кривой) для каждой группы (Фигура 15). Статистически значимое снижение продуцирования IL-1 β было очевидно в некоторых группах, получавших SMA или дексаметазон ($p < 0,005$: G3, G5), по сравнению с группой негативного контроля(G1). В Таблице 19 представленной ниже, показаны числовые значения и статистический анализ значений AUC для каждой группы лечения лекарственным средством.

Таблица 19: Параметры цитокинов

Цитокины	Группа	Лечение	Среднее AUC ⁺ (ч*пг/мл)	p-значение*
TNF-alpha (Фигура	G1	Негативный контроль (n=7)	11390,1	
	G2	PAX-1 1,03 мг/кг (n=7)	7984,4	0,0073

13)	G3	РАХ-1 1,54 мг/кг (n=7)	6064,8	0,0022
	G4	РАХ-1 2,05 мг/кг (n=7)	4215,8	0,0022
	G5	Дексаметазон 3 мг/кг (n=7)	2815,4	0,0022
IL-6 (Фигура 14)	G1	Негативный контроль (n=7)	180548,1	
	G2	РАХ-1 1,03 мг/кг (n=7)	165404,0	0,6093
	G3	РАХ-1 1,54 мг/кг (n=7)	128034,8	0,0022
	G4	РАХ-1 2,05 мг/кг (n=7)	78963,1	0,0022
	G5	Дексаметазон 3 мг/кг (n=7)	54684,9	0,0022
IL-1 beta (Фигура 15)	G1	Негативный контроль (n=7)	4866,3	
	G2	РАХ-1 1,03 мг/кг (n=6)	4272,9	0,1004
	G3	РАХ-1 1,54 мг/кг (n=7)	3738,3	0,0049
	G4	РАХ-1 2,05 мг/кг (n=7)	3045,8	0,0022
	G5	Дексаметазон 3 мг/кг (n=7)	2637,5	0,0022

+ С поправкой на исходный уровень

* Критерий суммы рангов Уилкоксона по сравнению с негативным контролем

5 Анализ IFN-гамма

Анализ IFN-гамма был исключен из анализа данных, поскольку его MFI был ниже предела количественного определения во все моменты времени.

Анализ GM-CSF

10 Анализ GM-CSF был исключен из анализа данных, поскольку его MFI был ниже предела количественного определения во все моменты времени.

4.3.1.2 Анализ продуцирования

15 Стандартизируя группу негативного контроля за 100%, рассчитывали скорость ингибирования продуцирования цитокинов в группах, обработанных исследуемым веществом и веществом позитивного контроля.

Анализ TNF-α

Анализ продуцирования TNF-α был выполнен с данными за 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов и 12 часов, а данные за 0 часов и 24 часа были исключены.

20 Уровень ингибирования продуцирования TNF-α составлял 65%, 71%, 77%, 68% и 70% в группе, получавшей 1,03 мг/кг SMA (G2), и при этом не наблюдалось существенной разницы ($p < 0,05$) по сравнению со всеми статистическими анализами.

Уровень ингибирования продуцирования TNF- α составил 53%, 50%, 59%, 55% и 48% в группе, получавшей 1,54 мг/кг SMA (G3), и при этом не наблюдалось существенной разницы ($p < 0,05$) по сравнению со всеми статистическими анализами.

5 Уровень ингибирования продуцирования TNF- α составил 37%, 39%, 52%, 41% и 15% в группе, получавшей 2,05 мг/кг SMA (G4). В некоторые моменты времени было замечено, что восстанавливающий эффект SMA был статистически значимым ($p < 0,005$: 1 час, 2 часа, 6 часов и 12 часов).

10 Уровень ингибирования продуцирования TNF- α составлял 25%, 28%, 33%, 28% и 9% в группе, получавшей 3 мг/кг дексаметазона, вещества позитивного контроля (G5). В некоторые моменты времени наблюдалось статистически значимое восстанавливающее действие дексаметазона ($p < 0,0005$: 4 часа, $p < 0,0001$: 1 час, 2 часа, 6 часов и 12 часов).

Анализ IL-6

Анализ продуцирования IL-6 проводили с данными за 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов и 24 часа, а данные за 0 часов были исключены.

15 Уровень ингибирования продуцирования IL-6 составлял 81%, 100%, 99%, 87%, 89% и 97% в группе, получавшей 1,03 мг/кг SMA (G2), и не было значимой разницы ($p < 0,05$) по сравнению со всеми статистическими анализами.

20 Уровень ингибирования продуцирования IL-6 составил 86%, 69%, 76%, 66%, 62% и 103% в группе, получавшей 1,54 мг/кг SMA (G3), и без существенных различий ($p < 0,05$) по сравнению со всеми статистическими анализами.

Уровень ингибирования продуцирования IL-6 составлял 60%, 46%, 63%, 42%, 32% и 60% в группе, получавшей 2,05 мг/кг SMA (G4). В некоторые моменты времени было замечено, что восстанавливающий эффект SMA был статистически значимым ($p < 0,05$: 2 часа и 4 часа, $p < 0,005$: 6 часов и 12 часов).

25 Уровень ингибирования продуцирования IL-6 составлял 59%, 43%, 59%, 20%, 16% и 51% в группе, получавшей 3 мг/кг дексаметазона, вещества позитивного контроля (G5). В некоторые моменты времени наблюдалось статистически значимое восстанавливающее действие дексаметазона ($p < 0,05$: 1 час, 2 часа, 4 часа и 24 часа, $p < 0,0001$: 6 часов и 12 часов).

30 Анализ IL-1 β

Анализ продуцирования IL-1 β выполняли с данными за 4 часа, 6 часов и 12 часов, а данные за 0 часов, 1 час, 2 часа и 24 часа были исключены.

Степень ингибирования продуцирования IL-1 β составляла 92%, 87% и 98% в группе, получавшей 1,03 мг/кг SMA (G2), и не наблюдалось существенной разницы ($p < 0,05$) сравнению со всеми статистическими анализами.

5 Уровень ингибирования продуцирования IL-1 β составлял 81%, 75% и 92% в группе, получавшей 1,54 мг/кг SMA (G3), и не наблюдалось существенной разницы ($p < 0,05$) сравнению со всеми статистическими анализами.

10 Уровень ингибирования продуцирования IL-1 β составил 73%, 70% и 81% в группе, получавшей 2,05 мг/кг SMA (G4). В некоторые моменты времени было замечено, что восстанавливающий эффект SMA был статистически значимым ($p < 0,05$: 4 часа, 6 часов и 12 часов).

Уровень ингибирования продуцирования IL-1 β составлял 69%, 67% и 77% в группе, получавшей 3 мг/кг дексаметазона, вещества позитивного контроля (G5). В некоторые моменты времени было замечено, что восстанавливающий эффект дексаметазона был статистически значимым ($p < 0,0001$: 4 часа, 6 часов и 24 часа).

15 Анализ IFN-gamma

Анализ IFN-gamma был исключен из анализа продуцирования, поскольку его MFI был ниже предела количественного определения во все моменты времени.

Анализ GM-CSF

20 Анализ GM-CSF был исключен из анализа продуцирования, поскольку его MFI был ниже предела количественного определения во все моменты времени.

4.3.2 Анализ выживаемости

4.3.2.1 Анализ выживаемости (Фигура 16)

25 Мертвых мышей проверяли каждый час после обработки 20 мг/кг LPS. Было подтверждено, что показатель выживаемости увеличился по сравнению с группой негативного контроля (G1) со статистической значимостью (G3: $p < 0,005$, G4: $p < 0,0005$, G5: $p < 0,0001$).

4.3.3 Масса тела и общие симптомы

Масса тела

30 Средняя масса тела всех мышей составила 22,3 г при поступлении и 24,1 г при групповом распределении. В период карантинной акклиматизации наблюдалась нормальная прибавка массы тела.

Распределение по группам выполняли таким образом, чтобы все группы имели среднюю массу тела. Не было статистической значимости ($p < 0,05$) по сравнению с группой негативного контроля (G1).

Общие симптомы

5 В период карантинной акклиматизации, когда ежедневно проводилось наблюдение за общими симптомами, отклонений от нормы не наблюдалось.

10 Всего за период исследования произошло 8 смертей из-за инфузии жидкости в легких путем интратрахеального способа при применении LPS. Сразу после окончания интратрахеального введения у субъектов возникал симптом дыхательной недостаточности. Хотя временный респираторный дистресс наблюдался у всех мышей, получавших LPS, кажется, что временный респираторный дистресс был связан с объемом жидкости в результате введения LPS, а не с респираторным дистресс-синдромом, индуцированным LPS. Тем не менее, у 8 мышей симптомы не исчезли. Такие действия, как сердечно-легочная реанимация и поддержание температуры тела, 15 были выполнены для 8 мышей с тяжелой дыхательной недостаточностью; однако они умерли, а образцы для анализа не были получены.

4.4. Заключение

20 Это исследование было проведено для подтверждения ингибирующего действия исследуемого вещества SMA, на индуцированные LPS провоспалительные медиаторы в модели острого респираторного синдрома (ARDS) мыши домашней *Mus musculus* (BALB/c), который был индуцирован повторным введением LPS путем интратрахеального введения. Результаты этого исследования подтвердили ингибирующее действие исследуемого вещества и вещества позитивного контроля на индуцированные LPS провоспалительные медиаторы и показали, что экспрессия 25 цитокинов, известных как основные медиаторы (TNF- α , IL-6, IL-1 β) при остром респираторном дистресс-синдроме (ARDS) был значительно подавлена в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (BALF).

30 Это исследование подтвердило, что исследуемое вещество SMA ингибирует выработку TNF- α и IL-6 в определенные моменты времени и что исследуемое вещество SMA эффективно в качестве профилактического средства для лечения острого респираторного синдрома.

Хотя аналитические значения IFN- γ , GM-CSF, и IL-1 β в некоторые моменты времени были ниже предела количественного определения и, следовательно, были

исключены из анализа, исследуемое вещество SMA, ингибировало выработку IL-1 β дозозависимым образом в некоторые моменты времени.

В заключение, SMA оказывает быстрое ингибирующее действие на продуцирование провоспалительных медиаторов, таких как TNF- α , IL-6 и IL-1 β , и, таким образом, может использоваться для увеличения выживаемости за счет облегчения острого респираторного синдрома.

Пример 5. Эксперименты *in vitro*, которые показывают положительное влияние SMA на подавление вируса SARS-CoV-2

Эксперименты *in vivo*, описанные выше в Примере 4, подтвердили, что PAX-1 (SMA) эффективен в ингибировании воспалительных цитокинов, подобно дексаметазону, препарату, одобренному в Европе для лечения пневмонии, связанной с SARS-CoV-2.

В Примере 5, описано исследование *in vitro*, которое также показало, что PAX-1 проявляет эффект подавления вирусов, аналогичный эффекту, который проявляет противовирусное лекарственное средство ремдесивир. PAX-1 обладает противовирусными и противовоспалительными свойствами и эффективен для лечения таких заболеваний, как пневмония, вызванная вирусной инфекцией. Ожидается, что лечение PAX-1 приведет к значительному сокращению периода восстановления до одной недели. При приеме PAX-1 на ранних стадиях воспалительной инфекции, можно предотвратить прогрессирование заболевания, которое связано с COVID-19.

5.1 Механизм подавления/гибели вируса и ингибирования воспалительных цитокинов

Механизм действия PAX-1 включает специфическое связывание PAX-1 с теломерами клеточных линий солидных опухолей человека, что приводит к повреждению ДНК, связанных с теломерами, теломерной эрозии и гибели клеток (Phatak P, Dai F, Butler M, et al. (2008) KML001 Cytotoxic Activity Is Associated with Its Binding to Telomeric Sequences and Telomere Erosion in Prostate Cancer Cells. *Cancer Therapy: Preclinical* 14(14): 4593–4603). PAX-1 также демонстрирует подавление пролиферации раковых клеток за счет снижения экспрессии факторов транскрипции, которые участвуют в транскрипции мРНК теломеразы. Кроме того, связывание PAX-1 с теломерными последовательностями в соотношении одна молекула на три повтора TTAGGG приводит к перемещению каталитической субъединицы теломеразы, называемой обратной транскриптазой теломеразы (hTERT), в цитоплазму, тем самым ингибируя активность теломеразы и в конечном итоге убивая раковые клетки. Недавнее исследование обнаружило структурное и функциональное сходство домена hTERT с вирусной РНК-

зависимой РНК-полимеразой (RdRP) за счет наличия консервативных мотивов обратной транскриптазы, состоящих из правосторонней архитектуры (домены пальцев, большого пальца и ладони) (Machitani M, Yasukawa M, Nakashima J, Furuichi Y, Masutomi K. RNA-dependent RNA polymerase, RdRP, a promising therapeutic target for cancer and potentially COVID-19. *Cancer Sci.* 2020 Aug 17;111(11):3976–84. doi: 10.1111/cas.14618). Вирусный RdRP выполняет важную функцию в транскрипции вирусного генома и репликации, а подавление RdRP считается одной из основных мишеней для противовирусных препаратов. Учитывая доказанный ингибирующий эффект PAX-1 на hTERT и структурное сходство вирусных RdRP и домена RdRP hTERT, можно предположить, что ингибирование активности RdRP hTERT с помощью PAX-1 может применяться для ингибирования активности RdRP коронавируса. Более того, противовирусное свойство PAX-1 не ограничивается коронавирусом, но также может быть применимо к более широкому кругу вирусов, что указывает на универсальное терапевтическое свойство PAX-1 для противоракового и антивирусного лечения (Machitani M, Yasukawa M, Nakashima J, Furuichi Y, Masutomi K. RNA-dependent RNA polymerase, RdRP, a promising therapeutic target for cancer and potentially COVID-19. *Cancer Sci.* 2020 Aug 17;111(11):3976–84. doi: 10.1111/cas.14618).

Было показано, что мета-арсенит натрия является мощным ингибитором теломеразы человека.

Чрезмерное продуцирование цитокинов в ответ на вирусную инфекцию было признано основной причиной пневмонии (воспаления), вызванной COVID-19.

Вирусная инфекция сопровождается аномальной клеточной активацией экспрессии генов, что приводит к избыточному высвобождению цитокинов, что, в свою очередь, вызывает воспаление (пневмонию). В Примере 4 показано, что PAX-1 ингибирует или снижает выработку/секрецию провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1 β и IL-6.

5.2 Оценка *in vitro* противовирусного действия PAX-1 в отношении клеток, которые были инфицированы SARS-CoV-2

5.2.1. Обзор

Целью этого исследования было проверить противовирусную эффективность PAX-1 против SARS-CoV-2. Противовирусную эффективность соединения определяли с помощью эксперимента с кривой зависимости «доза-эффект» (DRC) на модели клеточной инфекции SARS-CoV-2. Инфицированные клетки визуализировали с помощью иммунофлуоресценции с использованием специфического антитела к протеину

вирусного нуклеокапсида (N), а полученные изображения анализировали с использованием программного обеспечения Columbus (Perkin Elmer).

Согласно экспериментам, проведенным Институтом Пастера, противовирусный эффект PAX-1 ($IC_{50} = 4,25$ мкМ) несколько выше, чем у ремдесивира ($IC_{50} = 5,27$ мкМ), что свидетельствует о том, что PAX-1 обладает противовирусным свойством, сравнимым с ремдесивиром.

5.2.2. Материалы и способы

5.2.2.1 Вирусы и клеточные линии

SARS-CoV-2 был предоставлен Корейским центром по контролю и профилактике заболеваний (KCDC), а клетки Vero были получены от ATCC (ATCC-CCL81).

5.2.2.2 Реагент

Хлорохин, лопинавир и ремдесивир использовали в качестве эталонных соединений и приобретали соответственно у компаний Sigma-Aldrich, SelleckChem и MedChemExpress. Первичное антитело, специфичное к протеину N против SARS-CoV-2, было приобретено у Sino Biological, а вторичные антитела Alexa Fluor 488 козьего антикроличьего IgG и Hoechst 33342 были приобретены у Molecular Probes.

5.2.2.3 Анализ кривой зависимости «доза-эффект» способом иммунофлуоресценции

384-луночный планшет для тканевых культур инокулировали $1,2 \times 10^4$ клеток Vero на лунку. Через 24 часа после посева готовили 10 различных концентраций соединения путем серийного разведения в DMSO и PBS, и клетки обрабатывали при максимальной концентрации 50 мкМ. Через час после обработки лекарством клетки инфицировали SARS-CoV-2 (0,0125 MOI) в установке BSL3 и инкубировали при 37°C в течение 24 часов. После этого клетки фиксировали 4% параформальдегидом (PFA) с последующей пермеабиллизацией. Затем клетки окрашивали первичным антителом нуклеокапсида (N) анти-SARS-CoV-2, вторичным антителом анти-кроличьего IgG козы, конъюгированного с Alexa Fluor 488, и Hoechst 33342. Флуоресцентные изображения инфицированных клеток получали с использованием устройства для анализа изображений, Operetta (Perkin Elmer).

5.2.2.4 Анализ изображения

Полученные изображения анализировали с помощью программного обеспечения Columbus. Подсчитывали общее количество клеток на лунку, окрашенных Hoechst, и

принимали за общее количество клеток. Количество клеток, экспрессирующих протеин N вируса, принимали за общее количество инфицированных клеток. Коэффициент инфицирования рассчитывали как количество клеток, экспрессирующих протеин N, к общему количеству клеток.

5 Степень заражения на лунку нормировали до средней инфекционности лунок с неинфицированными клетками (ложными) в том же планшете и средней инфекционности лунок с инфицированными клетками, обработанными 0,5% DMSO (об./об.).

10 Цитотоксичность соединения была нормирована, путем нормирования количества клеток в каждой лунке к среднему количеству клеток в лунках с имитацией группы, и выражали на графике как «количество клеток для имитации».

15 Кривая ответа, полученная для каждой концентрации лекарственного средства, и значения IC_{50} и CC_{50} были получены с использованием уравнения $Y = Bottom + (Top - Bottom)/(1 + (IC_{50}/X)^{Hillslope})$ программного обеспечения XLFit 4 (IDBS). Все значения IC_{50} и CC_{50} рассчитывали по аппроксимированной кривой доза-реакция, полученной в двух повторах независимых экспериментов, а значение индекса селективности (SI) рассчитывали как CC_{50}/IC_{50} .

5.2.3. Результаты - анализ кривой доза-реакция соединения (DRC)

20 В этом исследовании изучалось противовирусное действие PAX-1 на репликацию SARS-CoV-2 (вируса COVID-19) в клетках Vero, а также его возможные цитотоксические эффекты по сравнению с ремдесивиром (то есть первым разрешенным противовирусным препаратом) для использования во время пандемии COVID-19) и лопинавиром (то есть препаратом, который в настоящее время проходит оценку в качестве противовирусного средства для лечения COVID-19 в комбинации с ритонавиром).

30 Клетки Vero представляют собой широко используемую клеточную модель, которая принята для репликации и выделения SARS-CoV-2. Вкратце, клетки Vero (ATCC-CCL81) инфицировали SARS-CoV-2 (полученным от Корейского агентства по контролю и профилактике заболеваний) (Korea Disease Control and Prevention Agency) при множественности заражения (MOI) 0,0125 в присутствии различных концентраций исследуемых препаратов или DMSO/PBS (контроль). Зараженные клетки фиксировали через 24 часа после заражения и окрашивали нуклеокапсидными антителами против SARS-CoV-2 и Hoechst 33342 для определения общего количества инфицированных клеток с использованием метода иммунофлуоресцентного окрашивания. Анализ

изображений выполняли с помощью Operetta (Perkin Elmer). Значения полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC_{50}) и полумаксимальной цитотоксической концентрации (CC_{50}) для каждого лекарственного средства определяли с использованием построенных кривых доза-реакция.

5 Результаты показаны на Фигуре 17. Синяя точка указывает на ингибирование инфекции SARS-CoV-2 соединением, а красный квадрат указывает на цитотоксичность соединения.

10 Как показано на Фигуре 17, репликация SARS-CoV-2 ингибировалась PAX-1 («Комифарм (PBS)» на Фигуре 17) при сравнении с ремдесивиром и более эффективно, чем лопинавиром. Значение IC_{50} для ингибирования PAX-1 инфекции SARS-CoV-2 составило 4,25 мкМ, а именно того же порядка, что и у ремдесивира ($IC_{50} = 5,27$ мкМ), и на порядок ниже, чем у лопинавира ($IC_{50} = 13,11$ мкМ). Значение CC_{50} для PAX-1 составляло 21,05 мкМ, тогда как у ремдесивира и лопинавира оно превышало 50 мкМ. Несмотря на то, что PAX-1 показал несколько большее ингибирование

15 жизнеспособности клеток по сравнению с двумя другими соединениями, его SI для противовирусной активности по сравнению с цитотоксичностью, рассчитанный как CC_{50}/IC_{50} , был сравним с таковым для лопинавира. Таким образом, PAX-1 эффективно ингибировал репликацию SARS-CoV-2 *in vitro*.

5.2.4. Обсуждение

20 Цитотоксическая концентрация (CC_{50}) PAX-1 на нормальных клетках составила 21,05 мкМ, что в 4,96 раза превышало показатель его противовирусной активности (IC_{50} , 4,25 мкМ), что свидетельствует о безопасности препарата. Нет необходимости принимать концентрацию PAX-1, в 5 раз превышающую значение IC_{50} , для достижения противовирусного эффекта.

25 Недавние исследования токсичности PAX-1 включали одновременное тестирование ремдесивира и лопинавира для сравнения. Экспериментальные результаты показали следующие показатели для лопинавира: $IC_{50} = 13,11$ мкМ, $CC_{50} > 50$ мкМ и значение SI 3,81, что свидетельствует о более высокой цитотоксичности по сравнению с PAX-1. Лопинавир в настоящее время проходит клинические испытания в

30 качестве средства для лечения COVID-19 под руководством US FDA.

Учитывая вышеуказанные факторы, PAX-1 также можно использовать в качестве противовирусного средства, не вызывая побочных эффектов или серьезных побочных эффектов во время лечения.

РАХ-1 связывается с теломерной последовательностью, обладающей пролиферативным потенциалом, прикрепленным к концам хромосом. Концентрация РАХ-1, при которой используется ингибирование воспалительных цитокинов, не оказывает цитотоксического действия на нормальные иммунные клетки. Кроме того, РАХ-1 полностью метаболизируется и выводится из организма через 72 часа после приема.

Часть пациентов, участвовавших в клинических испытаниях РАХ-1 (472 пациента, участвовавших в клинических испытаниях на данный момент), получали до 20 мг/сутки (8 таблеток в сутки). О случаях смерти из-за токсичности препарата не сообщалось, что указывает на то, что РАХ-1 является очень безопасным веществом.

Растущее количество данных указывает на то, что антитела к коронавирусу быстро ослабевают, а коронавирус от животных видов может мутировать и переходить к человеку, создавая риск повторного заражения. Без сомнения, существует большая потребность в быстрой разработке противовирусных препаратов против COVID-19.

15 **Пример 6 – Дневник пациента с COVID-19 (лечение SMA)**

В Примере 6, описывается ежедневный отчет 59-летней женщины (без ранее существовавших заболеваний), которая заразилась SARS-CoV-2 и принимала SMA для терапии. Этот пример показывает, что SMA является эффективным для облегчения или лечения симптомов инфекции SARS-CoV-2, т.е. стеснения в груди, затрудненного дыхания, учащенного дыхания (одышки), лихорадки, потери аппетита, насморка, кашля, образования мокроты и боли.

День	Время	Наблюдения
1		Внезапное появление симптомов (не может нормально питаться в течение 3 дней).
4		Симптомы обезвоживания (включая сухость во рту).
	3 часа после полудня	Доставлена в отделение неотложной помощи, получен раствор электролита в/в.
		Единственным симптомом была легкая лихорадка, поэтому ее выписали.
		Пероральные электролиты самостоятельно.
6	3 часа до полудня	Посещение медицинского центра из-за одышки.
		Вызвана скорая помощь, на машине скорой помощи (с кислородной терапией) доставлена в крупную больницу.
	3:30 до полудня	Начаты диагностические тесты на SARS-CoV-2, назначены лекарства.

День	Время	Наблюдения
	4 часа до полудня	Выписана
7	2 часа до полудня	Обратилась в медицинский центр по поводу одышки с симптомами обезвоживания.
		Вызвана скорая помощь, увезли на скорой (без кислородной терапии) в крупную больницу.
	3 часа до полудня	Никакого специального лечения, кроме рецепта для подтверждения SARS-CoV-2.
		Рецепт (на 5 дней) <ul style="list-style-type: none"> • Мейакт таб 100 мг/1 таблетка, 3 раза в день (цефдиторен пивоксил) • Рулид таб 150 мг / 1 таблетка, два раза в день • Гастер Д таб 20мг / 1 таблетка, два раза в день (фамотидин) • Сироп от кашля 20 мл, 3 раза в день • Залтопрофен 80 мг / 1 таблетка, три раза в день
	4 часа до полудня	Выписана
	9 часов до полудня	Диагноз SARS-CoV-2 подтвержден
	10 часов до полудня	Второй запрос на госпитализацию в Центр общественного здравоохранения (кроватей нет, ожидание инструкций по домашнему лечению).
		* Лекарства, отпускаемые по рецепту, пациент принимает, но улучшения нет. * Присутствует лихорадка. * Соки, отвары, супы вводятся постепенно.
	3 часа после полудня	SMA принимает после еды
	4 часа после полудня	Стеснение в груди и легкая боль.
7:30 после полудня	SMA принимает после еды	
8 часов после полудня	Стеснение в груди и боль уменьшились.	
8	2 часа до полудня	SMA принимается из-за рецидива стеснения в груди и затрудненного дыхания.
		Временное облегчение симптомов.
	11 часов до полудня	SMA принимает после еды.
		Временное облегчение симптомов.
		* Страдает от недосыпания. * Беспокойство из-за задержки в госпитализации.
	5:30 после полудня	Прием SMA после еды.
		Доставка рецепта для пациентов с подтвержденным COVID-19 из Центра общественного здоровья.

День	Время	Наблюдения
		Рецепт (на 5 дней) <ul style="list-style-type: none"> • Тамитра Полу таб /1 таблетка, 3 раза в день (ацетаминофен/трамадол) • Леводропропизин 60 мг таб / 1 таблетка, 3 раза в день • Нукомит Кэп. 200мг/1 капсула, 3 раза в день (ацетилцистеин) • Стрептокиназа таб 10мг/1 таблетка, 3 раза в день • Мукосил таб/по 1 таблетка 3 раза в день (ацетилцистеин)
	6 часов после полудня	Получение лекарств по рецепту для пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19.
	6 часов после полудня	Поступил звонок из Центра общественного здоровья.
		(Получила рекомендации вести активный образ жизни, хорошо питаться и спать, чтобы поддерживать физическую форму). Ей объяснили, что седативные средства можно принимать вместе с лекарствами, отпускаемыми по рецепту, если это необходимо. * У пациента есть собственный P.R.N. седативное применяли 2-3 раза в неделю (начали за 3 мес).
	7 часов после полудня	При приеме SMA стеснение в груди уменьшается. При приеме лекарств, отпускаемых по рецепту Управления общественного здравоохранения, стеснение в груди и воспаление усиливаются в течение 30 минут.
	12 часов полночь	Прием SMA после еды. Лекарства Управления общественного здравоохранения и успокоительные принимаются через 30 минут после приема.
9	10 часов до полудня	Заснула из-за успокоительного. Однако чувствует себя немного сонливой как побочный эффект.
	11:30 до полудня	Принимает SMA после еды.
	12 часов полдень	Принимаются лекарства Управления общественного здравоохранения.
		Отсутствие симптомов одышки. Вздремнула (из-за длительного седативного побочного эффекта).
	5:20 после полудня	Лекарства Управления общественного здравоохранения, принимаемые после еды.
	5:40 после полудня	Принимает SMA после еды.
		* Отсутствие стеснения в груди и одышки с утра
		* Восстановление состояния за счет дополнительного сна. * Аскорбиновая кислота (витамин С) 3000 мг 1 раз в день. * Может снова есть обычную пищу.
	6 часов после полудня	Ответ Центра общественного здравоохранения - возможность госпитализации в лечебном центре.
	8 часов после полудня	Лихорадка, сухость во рту.
		Принимаются жаропонижающие и гастропротекторные препараты.
		* Затруднения дыхания нет, но есть некоторое выделение мокроты. (В целом самочувствие лучше, чем при начальных симптомах).

День	Время	Наблюдения
	11:40 после полудня	Принимает SMA после еды.
10	8 часов до полудня	SMA и лекарства от Управления общественного здравоохранения принимаются после еды.
		С 9-го дня плохой сон. Лихорадка, сухость во рту.
		Стеснение в груди, выделение мокроты и легкий кашель (одышки нет).
		* Недостаток сна оказывает существенное влияние на состояние.
	4 часа после полудня	SMA и лекарства от Управления общественного здравоохранения принимаются после еды.
		Постоянная сухость во рту.
	8 часов после полудня	Стеснение в груди проходит.
		Сухость во рту, грудной кашель, головная боль.
		Принят сироп от кашля/седативное.
	10:30 после полудня	Сонливость из-за успокоительного.
	11:50 после полудня	SMA и лекарства от Управления общественного здравоохранения принимаются после еды.
11		Спала из-за успокоительного.
	8 часов до полудня	SMA и лекарства от Управления общественного здравоохранения принимаются после еды.
		Спала из-за успокоительного.
	11 часов до полудня	Состояние улучшилось за счет сна.
		Продолжающийся грудной кашель; сухость во рту и стеснение в груди исчезли.
	4 часа после полудня	SMA и лекарства от Управления общественного здравоохранения принимаются после еды.
		Постоянный грудной кашель.
	6 часов после полудня	Доставлена машиной скорой помощи в лечебный центр (госпитализирована).
	10 часов после полудня	SMA и лекарства от Управления общественного здравоохранения принимаются после еды.

День	Время	Наблюдения
12	9 часов до полудня	SMA и лекарства от Управления общественного здравоохранения принимаются после еды.
		Состояние хорошее, кашель/мокрота незначительные, но легкие.
		Никаких других симптомов. Температура тела 36,8°C (норма).
	11 часов до полудня	Отсутствие других симптомов, связанных с SARS-CoV-2.
		* Никакие другие лекарства в Лечебном центре не назначаются.
	2:30 после полудня	SMA принимаются после еды.
		Небольшой насморк, лекарства Минздрава прекратились (новые лекарства после обеда).
	8 часов после полудня	Нормальная температура тела (38°C). Легкий кашель и желудочно-кишечные симптомы
	8:40 после полудня	SMA принимаются после еды.
9 после полудня	Принимаются жаропонижающие и гастропротекторные препараты.	
13	9:30 до полудня	SMA принимаются после еды.
		Улучшается аппетит и общее состояние очень хорошее (восстанавливается нормальная повседневная деятельность).
		Мягкая мокрота. Нормальная температура тела (36,4°C).

5 Следует понимать, что если в данном документе упоминается какая-либо публикация предшествующего уровня техники, такая ссылка не является признанием того, что публикация является частью общеизвестных знаний в данной области техники в Австралии или любой другой стране.

10 В последующей формуле изобретения и в предшествующем описании изобретения, за исключением случаев, когда контекст требует иного из-за явной формулировки или необходимого подтекста, слово «содержать» или варианты, такие как «содержит» или «содержащий», используются во включающем смысле, т.е. указать наличие заявленных признаков, но не исключить наличие или добавление дополнительных признаков в различных вариантах осуществления изобретения.

Формула изобретения

1. Способ снижения воспалительной реакции вследствие вирусной инфекции у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества натрия мета-арсенита ($O=As-O^- Na^+$) или калия мета-арсенита ($O=As-O^- K^+$).
- 5 2. Способ лечения или предупреждения воспалительного состояния вследствие вирусной инфекции у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества натрия мета-арсенита ($O=As-O^- Na^+$) или калия мета-арсенита ($O=As-O^- K^+$).
3. Способ лечения или предупреждения гиперцитокинемию вследствие вирусной инфекции у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества натрия
10 мета-арсенита ($O=As-O^- Na^+$) или калия мета-арсенита ($O=As-O^- K^+$).
4. Способ снижения уровней TNF- α , IL-1 β и/или IL-6 у субъекта, страдающего на воспалительное состояние вследствие вирусной инфекции, включающий введение субъекту эффективного количества натрия мета-арсенита ($O=As-O^- Na^+$) или калия мета-арсенита ($O=As-O^- K^+$).
- 15 5. Способ по какому-либо одному из пунктов 1 - 4, в котором вирусная инфекция представляет собой коронавирусную инфекцию.
6. Способ лечения коронавирусной инфекции у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества натрия мета-арсенита ($O=As-O^- Na^+$) или калия мета-арсенита ($O=As-O^- K^+$).
- 20 7. Способ по пункту 5 или 6, в котором коронавирусная инфекция вызывается SARS-CoV-2.
8. Способ по какому-либо одному из пунктов 1 - 7, в котором натрия мета-арсенит ($O=As-O^- Na^+$) или калия мета-арсенит ($O=As-O^- K^+$) вводится перорально.
9. Способ по какому-либо одному из пунктов 1 - 8, в котором натрия мета-арсенит
25 ($O=As-O^- Na^+$) или калия мета-арсенит ($O=As-O^- K^+$) вводится дозой в диапазоне от 2 мг на день до 20 мг на день.
10. Способ по какому-либо одному из пунктов 1 - 9, где способ включает снижение репликации SARS-CoV-2.
11. Натрия мета-арсенит ($O=As-O^- Na^+$) или калия мета-арсенит ($O=As-O^- K^+$) для
30 применения в:
снижении воспалительной реакции вследствие вирусной инфекции у субъекта;

лечении или предупреждении воспалительного состояния вследствие вирусной инфекции у субъекта;

лечении или предупреждении гиперцитокинемии вследствие вирусной инфекции у субъекта;

5 лечении вирусной инфекции у субъекта;

снижении уровней TNF- α , IL-1 β и/или IL-6 у субъекта, страдающего на воспалительное состояние вследствие вирусной инфекции; или

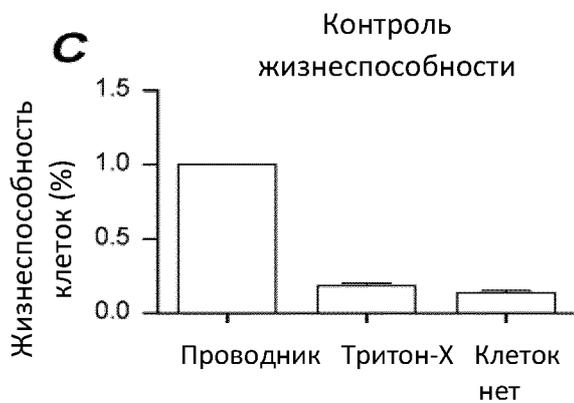
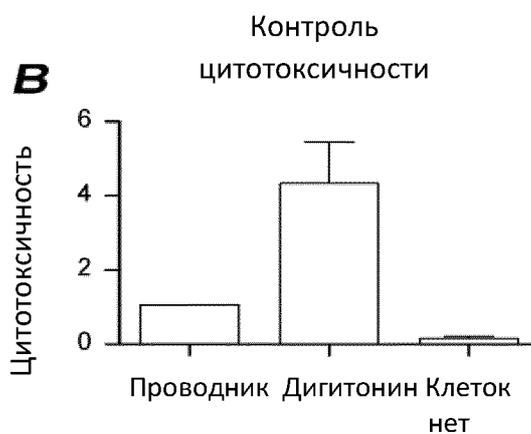
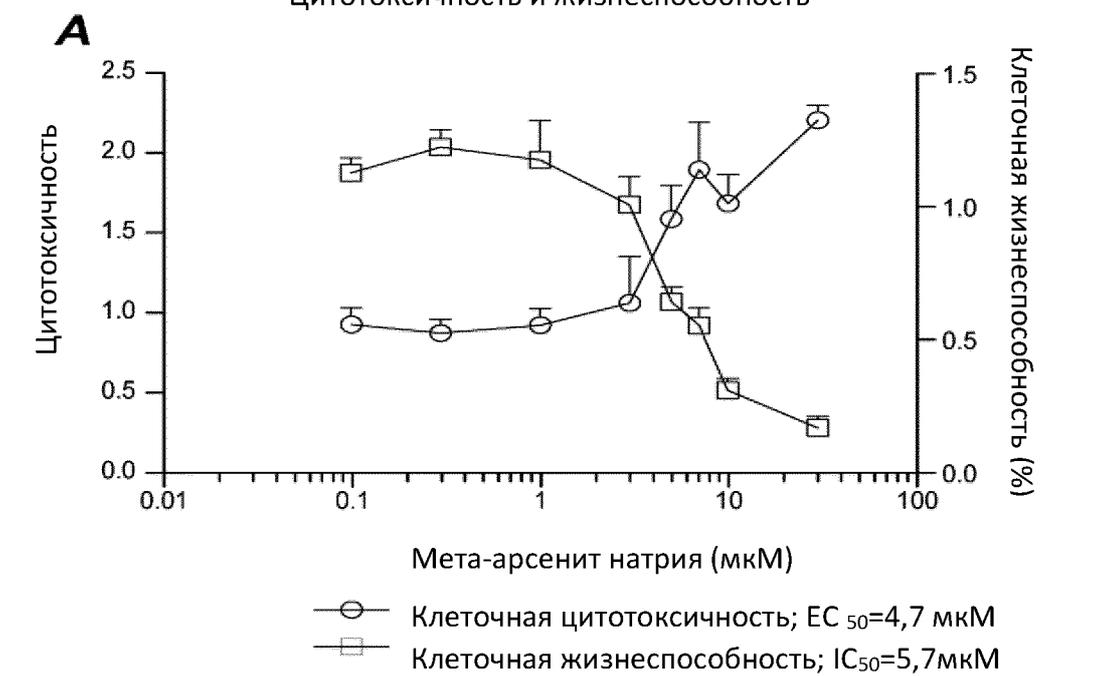
лечении коронавирусной инфекции у субъекта.

10 12. Натрия мета-арсенит (O=As-O⁻ Na⁺) или калия мета-арсенит (O=As-O⁻ K⁺) для применения по пункту 11, причем вирусная инфекция представляет собой коронавирусную инфекцию, предпочтительно где коронавирусная инфекция вызывается SARS-CoV-2.

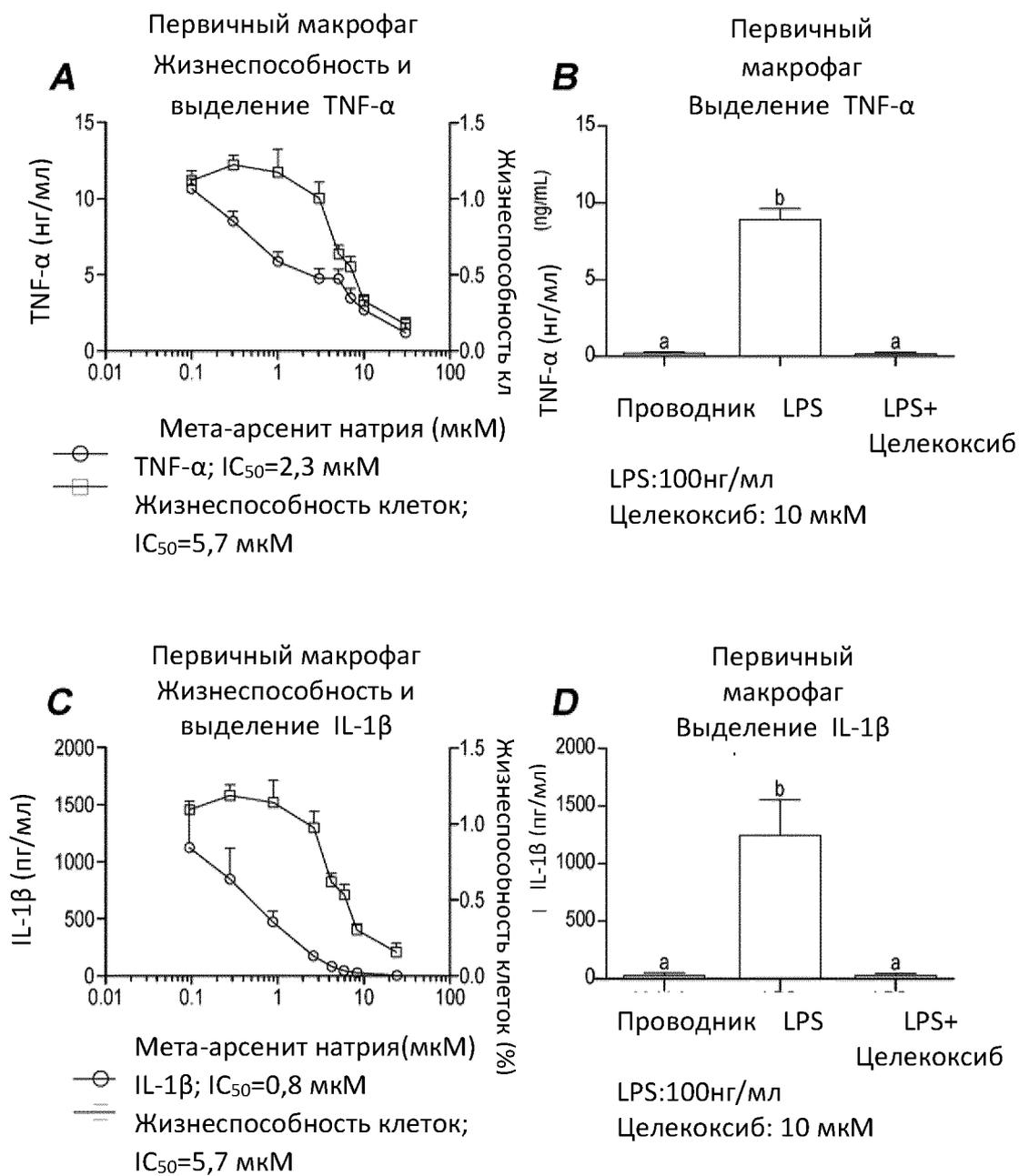
15 13. Натрия мета-арсенит (O=As-O⁻ Na⁺) или калия мета-арсенит (O=As-O⁻ K⁺) для применения по пункту 11 или 12, где натрия мета-арсенит (O=As-O⁻ Na⁺) или калия мета-арсенит (O=As-O⁻ K⁺) вводится перорально; и/или где натрия мета-арсенит (O=As-O⁻ Na⁺) или калия мета-арсенит (O=As-O⁻ K⁺) вводится дозой в диапазоне от 2 мг на день до 20 мг на день.

20 14. Натрия мета-арсенит (O=As-O⁻ Na⁺) или калия мета-арсенит (O=As-O⁻ K⁺) для применения по какому-либо одному из пунктов 11 - 13, для снижения репликации SARS-CoV-2.

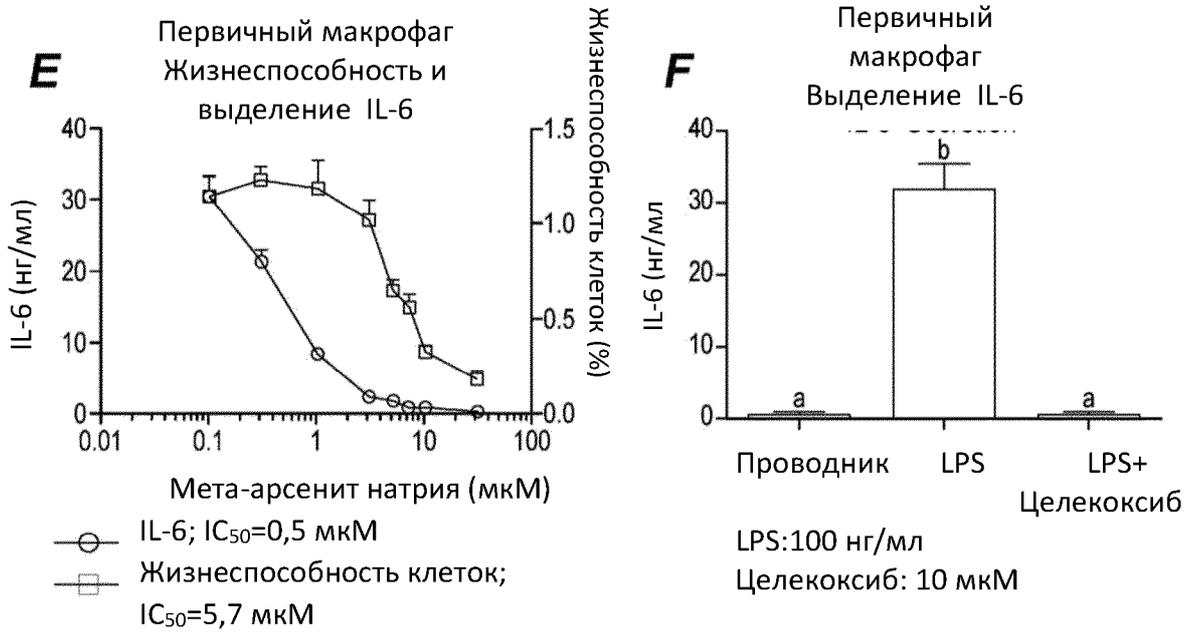
Первичный макрофаг
Цитотоксичность и жизнеспособность



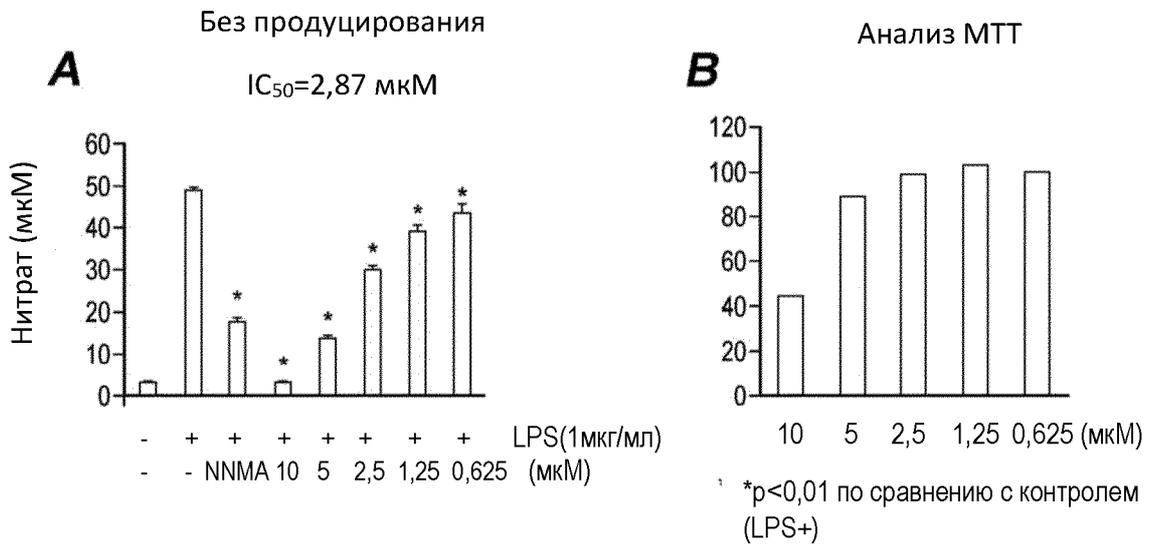
ФИГУРА 1



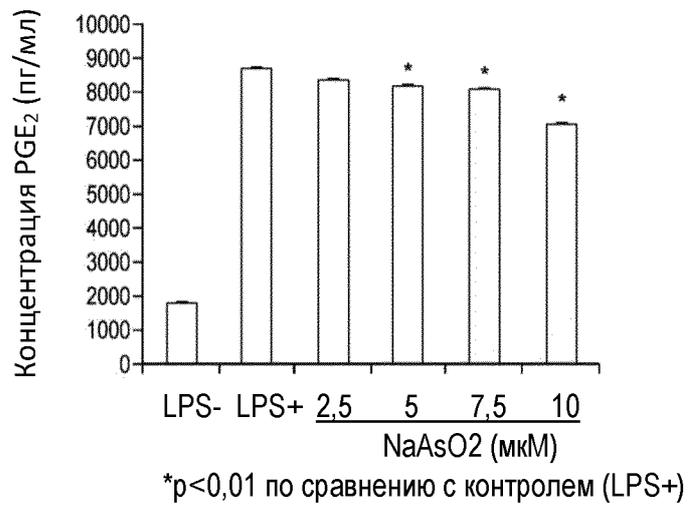
ФИГУРА 2



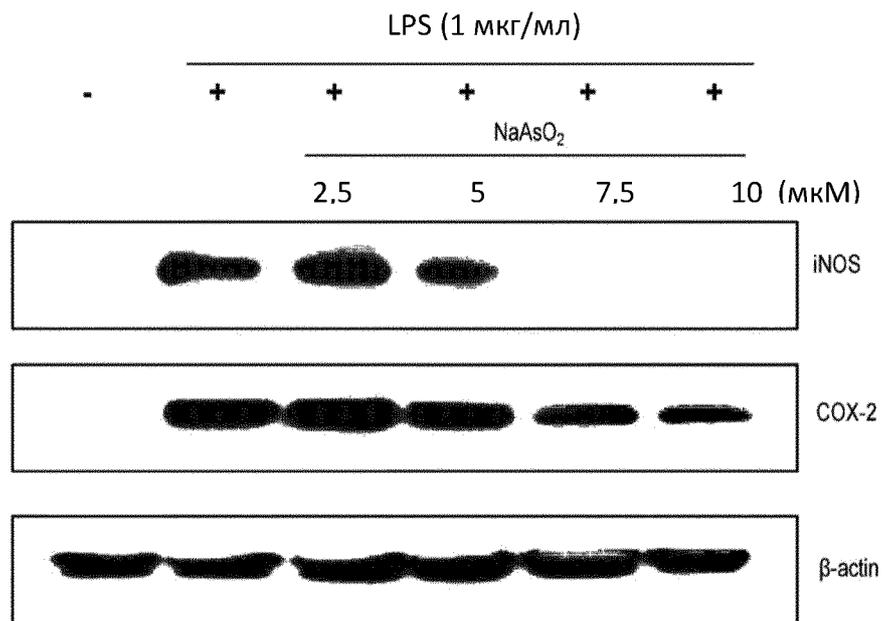
ФИГУРА 2



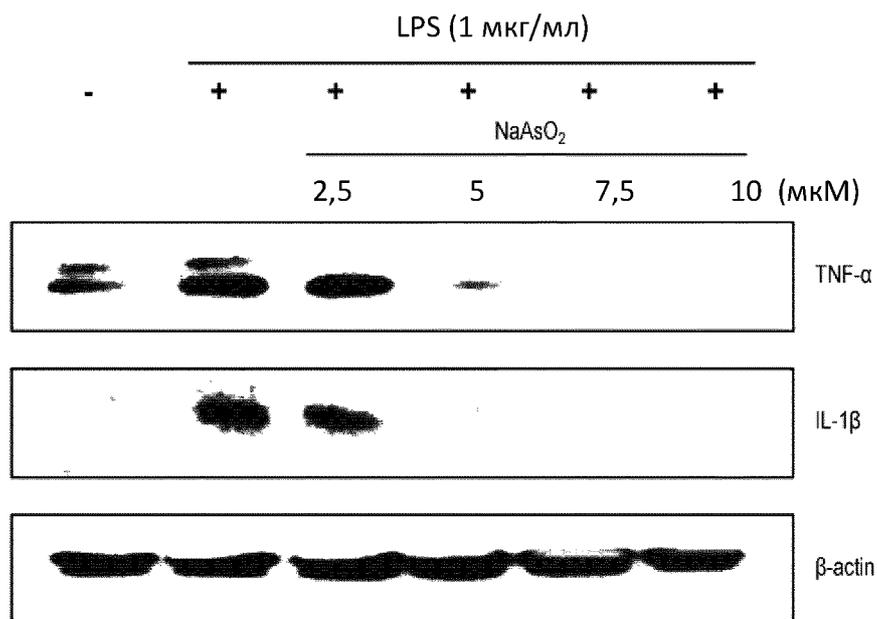
ФИГУРА 3



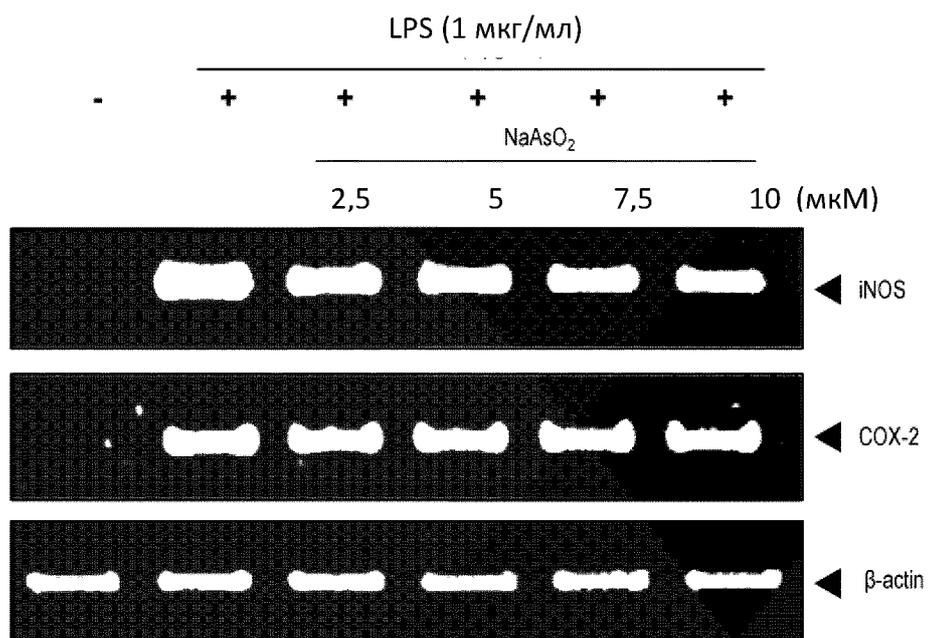
ФИГУРА 4



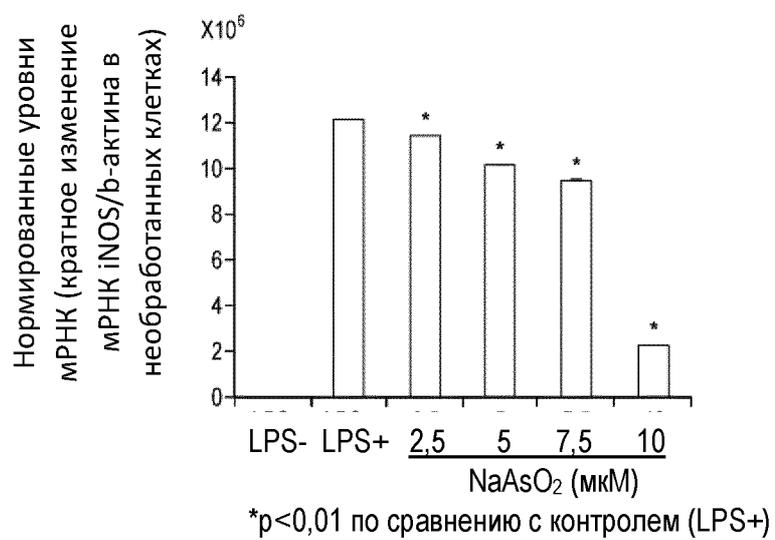
ФИГУРА 5

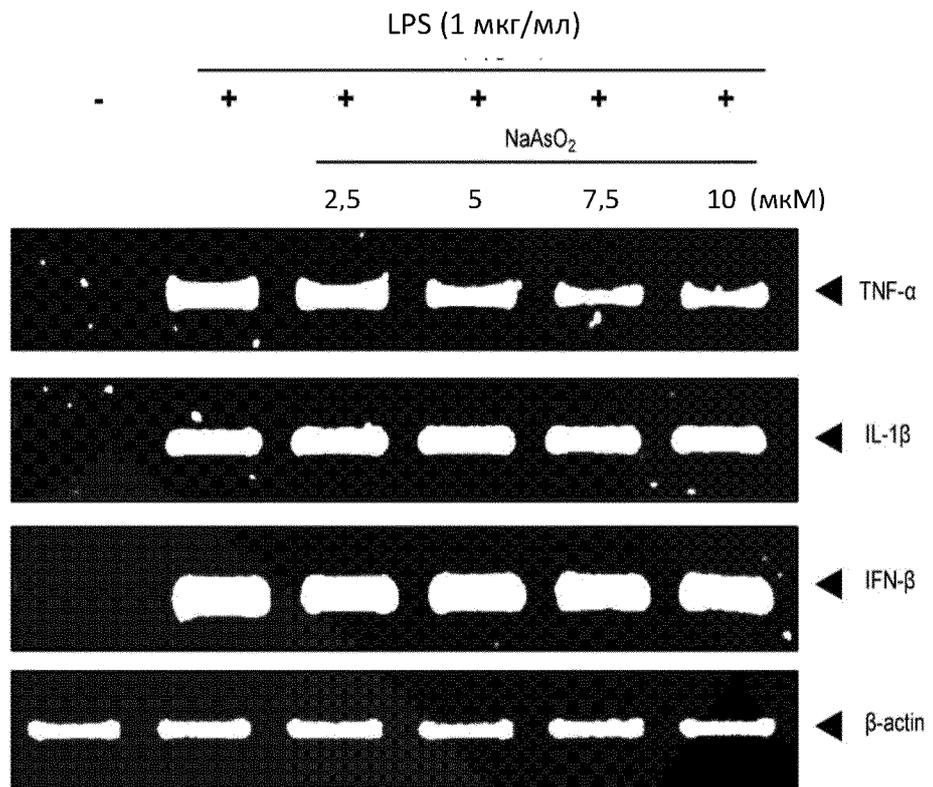


ФИГУРА 6

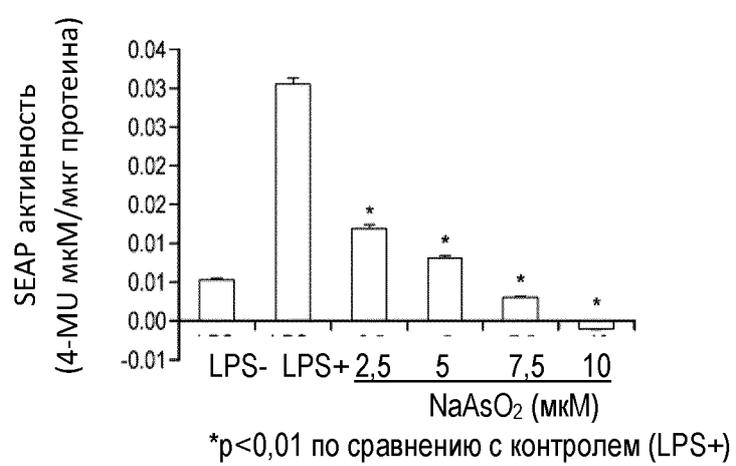


ФИГУРА 7

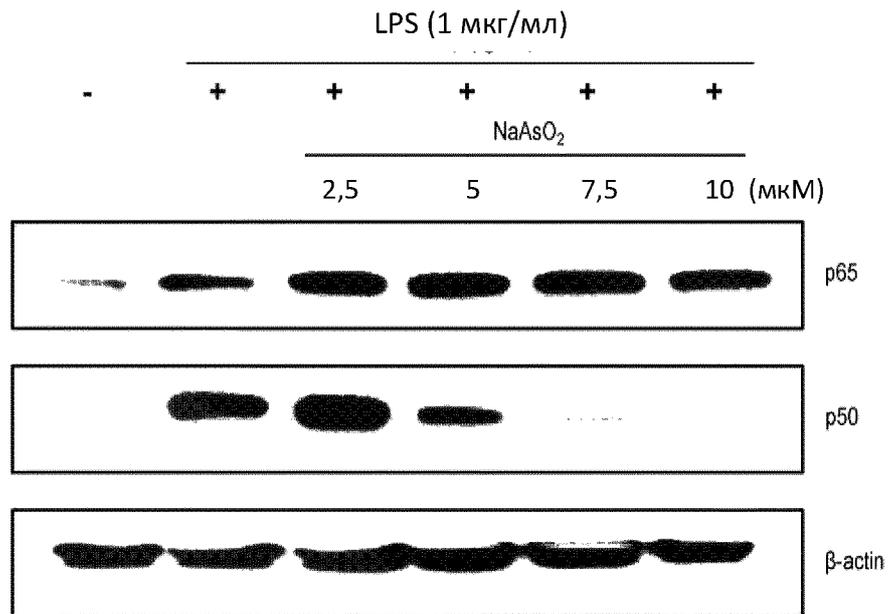
**ФИГУРА 8**



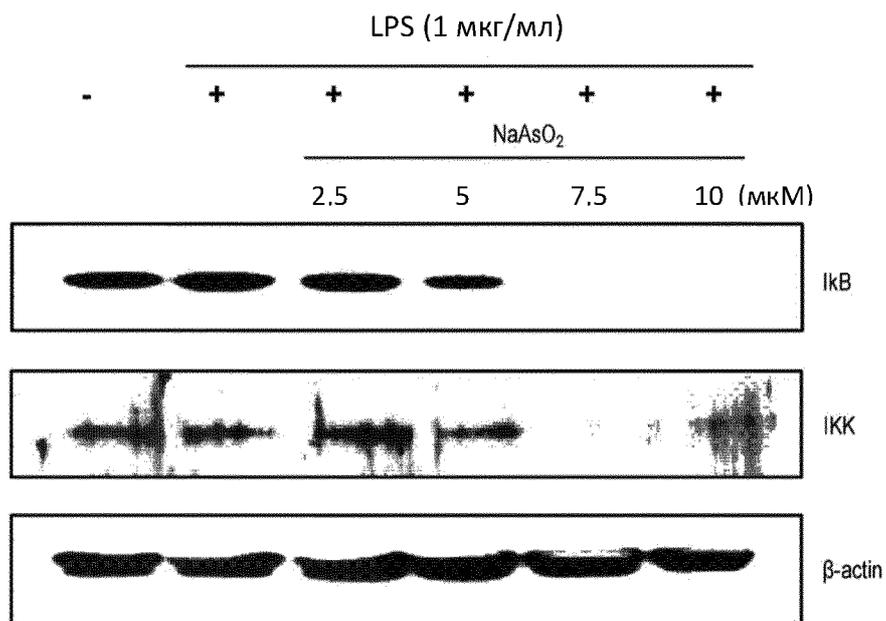
ФИГУРА 9



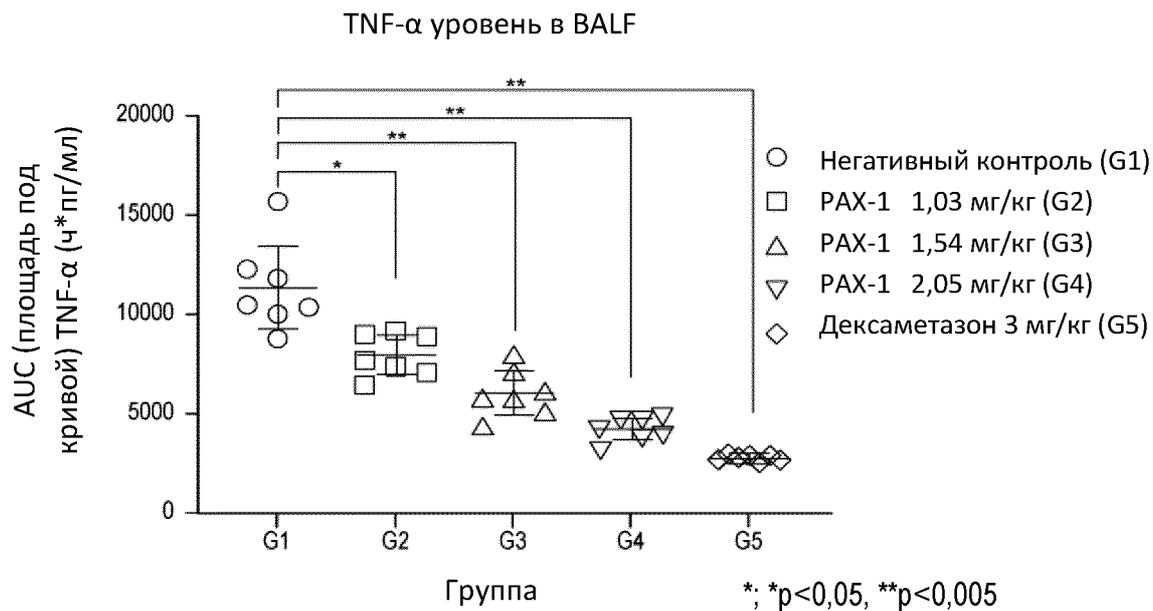
ФИГУРА 10



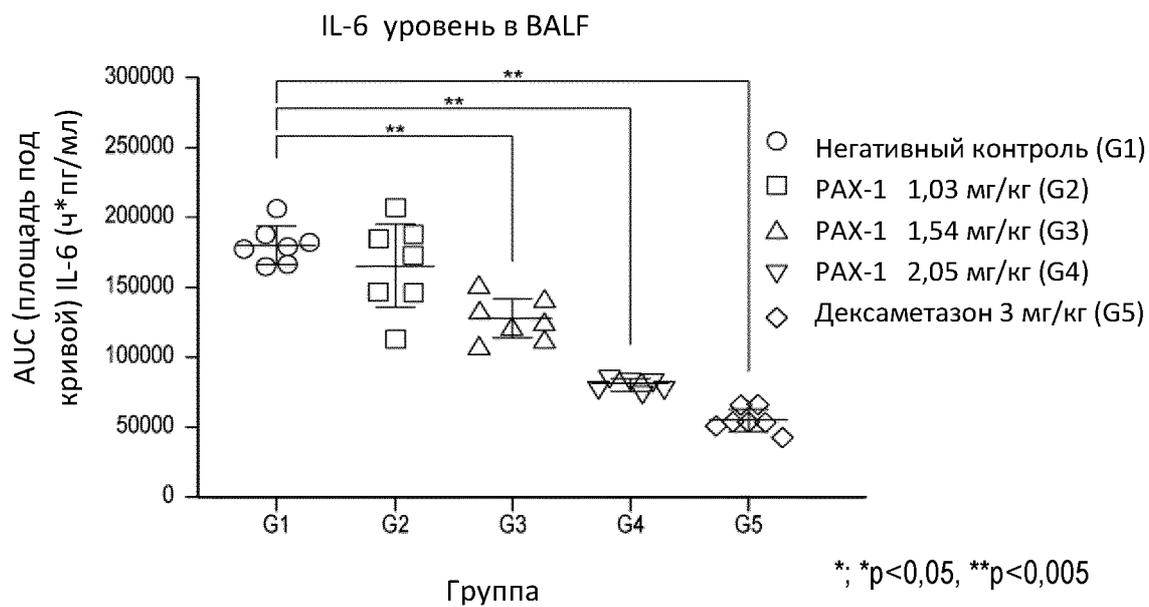
ФИГУРА 11



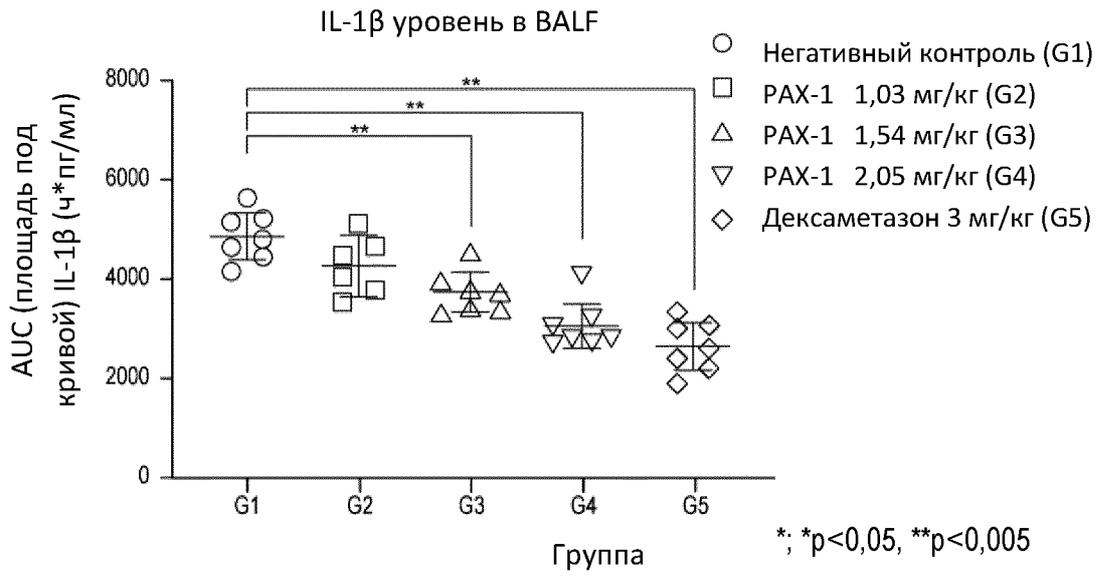
ФИГУРА 12



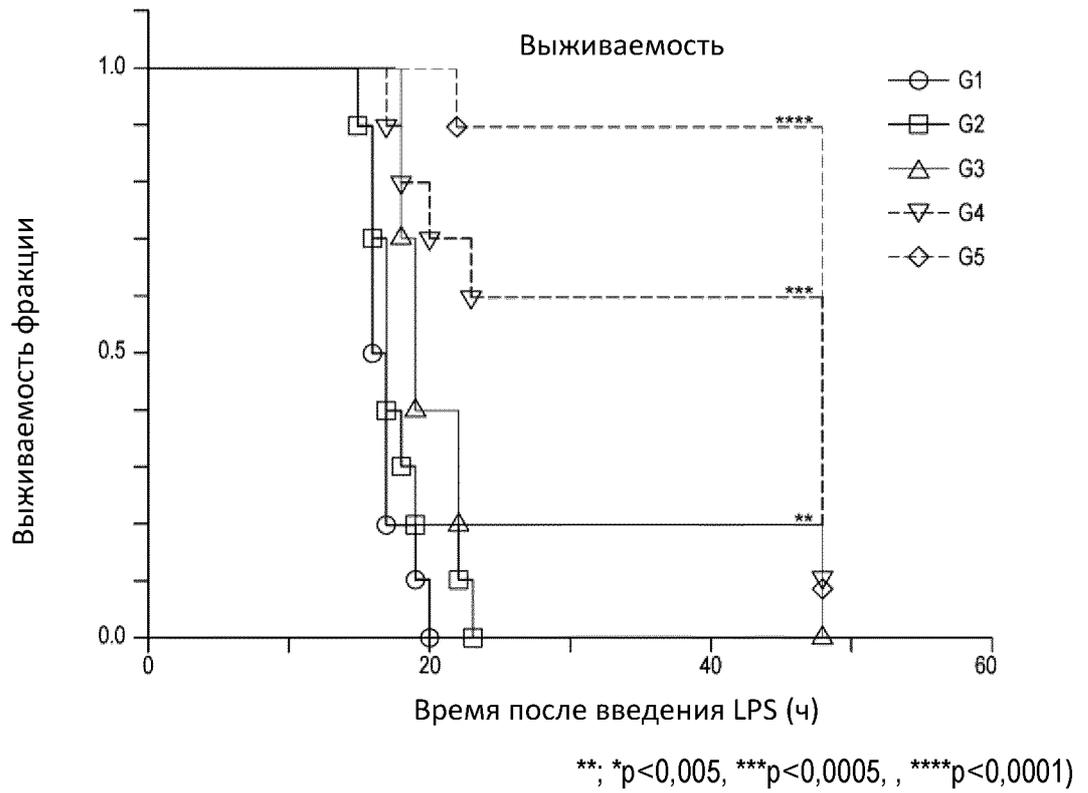
ФИГУРА 13



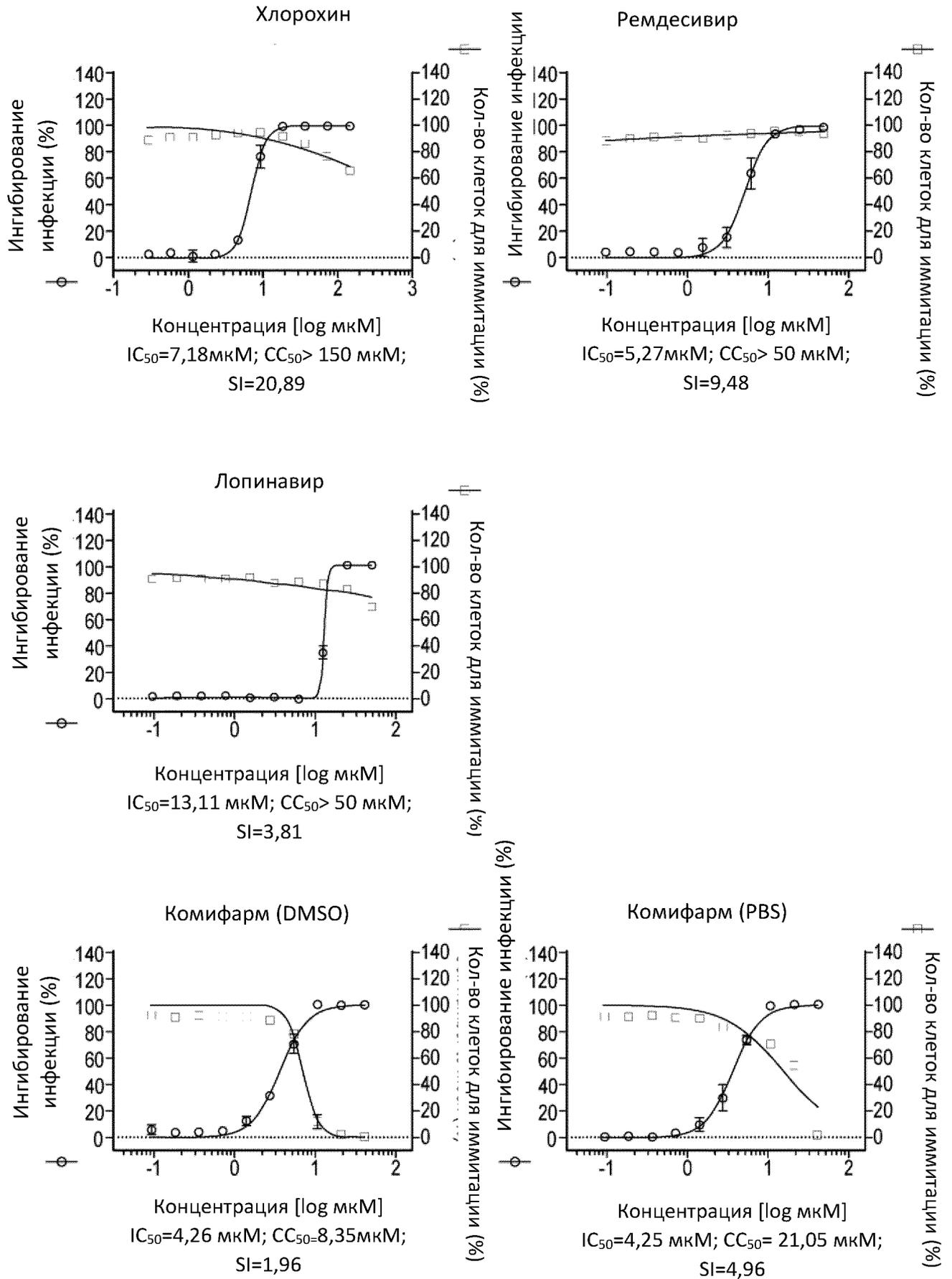
ФИГУРА 14



ФИГУРА 15



ФИГУРА 16



ФИГУРА 17