

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 042652

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.09

(21) Номер заявки
202092751

(22) Дата подачи заявки
2019.05.17

(51) Int. Cl. A61K 9/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/145 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01)
A61P 11/12 (2006.01)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОЧАСТИЦ ЦИСТЕАМИНА ГИАЛУРОНАТА

(31) 18425038.9

(32) 2018.05.22

(33) EP

(43) 2021.03.12

(86) PCT/EP2019/062872

(87) WO 2019/224130 2019.11.28

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
РЕКОРДАТИ ИНДАСТРИАЛ
ХИМИКА Е ФАРМАСЬЮТИКА СПА
(IT)

(72) Изобретатель:
Коломбо Паоло, Росси Алессандра,
Адорни Грета, Барчелли Марко (IT)

(74) Представитель:
Рыбина Н.А. (RU)

(56) US-A1-2017348254

(57) В изобретении предложены ингалируемые микрочастицы, содержащие соль цистеамина гиалуроната. Также предложены способ их получения и их фармацевтическая композиция.

B1

042652

042652

B1

Уровень техники

Цистеамин представляет собой активный ингредиент, который, как известно, применим при лечении цистиноза. На сегодняшний день несколько фармацевтических продуктов, например, Cystagon® (капсулы цистеамина битартрата), Procybi® (кишечнорастворимые капсулы цистеамина битартрата) и Cystadrops® (глазные капли цистеамина гидрохлорида), были разрешены к использованию в Европе с этим терапевтическим показанием.

Относительно недавно цистеамину был присвоен статус орфанного препарата для лечения муковисцидоза. Муковисцидоз (CF) - это наследственное заболевание, поражающее клетки лёгких и железы кишечника/поджелудочной железы, которые секретируют жидкости, например, слизь или пищеварительные соки, соответственно. Как следствие, эти жидкости становятся густыми и вязкими, блокируя дыхательные пути и отток пищеварительных соков. Это приводит не только к проблемам с перевариванием и всасыванием пищи, но, что еще хуже, к хроническим инфекционным болезням и воспалению лёгких. Из-за снижения функции лёгких обострения или эпизоды острого ухудшения симптомов CF в лёгких, часто в результате бактериальной инфекции, являются основной причиной заболеваемости и смертности.

На сегодняшний день заболевание лёгких при муковисцидозе лечат, главным образом, с использованием комбинации антибиотиков, противовоспалительных средств, бронхорасширяющих средств и муколитиков.

Было показано, что цистеамин успешно лечит симптомы CF за счет уменьшения толщины слизи, что позволяет ей легче выводиться (муколитическая активность), одновременно действуя непосредственно против бактерий в лёгких (антибактериальная активность).

Таким образом, общие мультиактивные свойства цистеамина (снижение чрезмерного количества слизи в дыхательных путях, уничтожение бактерий, ответственных за рецидивирующие инфекции дыхательных путей и разрушение биопленок, в которых они колонизируются) могут быть терапевтически эффективны для пациентов с CF (см. Graham Devereux et al. "Cysteamine as a Future Intervention in Cystic Fibrosis Against Current and Emerging Pathogens: A Patient-based ex vivo Study Confirming its Antimicrobial and Mucoactive Potential in Sputum", EBioMedicine (2015) 1507-1512; и Charrier et al., 2014: <http://dx.doi.org/10.1188/st.3023-014-0189-21>).

Как следствие этих наблюдений, необходимы ингаляционные составы цистеамина для лечения заболеваний лёгких. Фактически, для повышения эффективности цистеамина в лёгких, лекарственное средство должно доставляться в виде аэрозоля непосредственно в дыхательные пути пациента.

Доставка лекарственного средства в лёгкие обладает множеством преимуществ с точки зрения введения лекарственного средства, например, неинвазивный способ введения, более низкая метаболическая активность, предотвращение пресистемного метаболизма, быстрое системное всасывание и, прежде всего, высокая локальная концентрация лекарственного средства, которая позволяет контрастировать инфекцию слизистой оболочки лёгких/воспаление и улучшать заживление тканей. Однако, для противостояния инородным частицам, попавшим в организм, лёгкие имеют несколько механизмов очистки (мукоцилиарный транспорт, альвеолярные макрофаги, абсорбционная и метаболическая деградация), которые, к сожалению, могут действовать как барьеры для вдыхаемых лекарственных средств, снижая их терапевтическую эффективность. Следовательно, чтобы ограничить механизмы легочного клиренса и обеспечить усиление терапевтического эффекта и/или контролируемое высвобождение лекарственного средства, системы доставки лекарственного средства на основе частиц стали инновационной и многообещающей альтернативой обычным растворам для ингаляции лекарственных средств.

Например, в патенте США 2017/0348254 раскрыты микрочастицы цистеамина битартрата, полученные посредством распылительной сушки активного ингредиента вместе со стабилизирующими агентами, например, трегалозой и лейцином. Однако, аэродинамические характеристики полученного порошка были низкими, а дозы мелкодисперсных частиц были минимальными: после аэрозолизации высушенного распылением порошка в количестве приблизительно от 160 до 270 мг доза мелкодисперсных частиц цистеамина битартрата составляла лишь от 3 до 6,9 мг. Следовательно, с учетом этого очень небольшого количества лекарственного средства, попадающего в лёгкие после аэрозолизации более 100 мг порошка, все еще необходим эффективный вдыхаемый состав цистеамина, обладающий высокой респираторностью.

Другая задача, которую необходимо решить - это нестабильность цистеамина в твердом состоянии, принимая во внимание введение посредством ингаляции. К сожалению, вдыхаемые ингаляционные микрочастицы, изготовленные с использованием существующих солей цистеамина (например, описанных в патенте США 2017/0348254), к тому же в диапазоне оптимальных размеров для доставки в лёгкие (1-5 мкм), показали очень плохое проникновение в лёгкие, в основном из-за высокой чувствительности действующего вещества к условиям окружающей среды. Указанные соли, по сути, гигроскопичны, расплываются за счёт поглощения влаги и склонны к окислительному разложению. Кроме того, соли цистеамина, известные из коммерчески доступных продуктов, например, гидрохлорид и битартрат, имеют неблагоприятный размер частиц, который определяет плохие аэродинамические свойства, что делает указан-

ные соли непригодными для ингаляции в виде сухого порошка.

В патенте CN 101367884, кроме того, раскрыт конъюгат тиолированной гиалуроновой кислоты, ковалентно связывающий (амидной связью) цистеамин, и способ его получения. Указанный способ включает добавление 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида (EDAC) и N-гидроксисукцинимид (NHS) в раствор гиалуроновой кислоты для того, чтобы активировать карбоксильную группу; затем добавление цистеамин гидрохлорида и лиофилизацию реакционной смеси с получением конъюгата "полимер - лекарственное средство", применимого в качестве биоадгезивного материала для неинъекционных препаратов. Однако, в указанном способе используются как EDAC, так и NHS - реагенты, не признанные безопасными для ингаляции. Более того, конъюгат представляет собой новое химическое соединение, которое изменяет признанную безопасность цистеамина для использования человеком. Наконец, полученный конъюгат, представляющий собой лиофилизированный порошок, не подходит даже для ингаляции порошковыми ингаляторами.

Таким образом, использование цистеамина в виде сухого порошка для ингаляций при лечении заболеваний лёгких дополнительно требует открытия новых стабильных и респираторных сухих производных лекарственного средства.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 проиллюстрированы СЭМ изображения а) частиц цистеаминового основания и б) высушенных распылением микрочастиц цистеамина гиалуроната. Высушенные распылением микрочастицы характеризуются округлыми структурами и сморщенной поверхностью, тогда как цистеаминовое основание характеризуется частицами, похожими на хлопья.

На фиг. 2 проиллюстрированы ИК-Фурье спектры а) частиц цистеаминового основания, б) гиалуроната натрия и с) высушенных распылением микрочастиц гиалуроновой кислоты.

На фиг. 3 проиллюстрирован ИК-Фурье спектр высушенных распылением микрочастиц цистеамина гиалуроната. На фиг. 4 проиллюстрированы спектры ЯМР ^{13}C гиалуроната натрия, высушенных распылением микрочастиц цистеамина гиалуроната, высушенного распылением порошка гиалуроновой кислоты и цистеаминового основания. При сравнении спектра цистеамина гиалуроната с другими, о солеобразовании явно свидетельствует присутствие пиков обоих противоионов: гиалуроновой кислоты и цистеамина. Однако спектр высушенных распылением микрочастиц цистеамина гиалуроната показывает отличия от спектров одних только противоионов и гиалуроната натрия.

На фиг. 5 проиллюстрированы СЭМ изображения высушенных распылением микрочастиц цистеамина гиалуроната:

- а) состав № 2: 2,2% цистеамина/87,8% гиалуроната натрия;
- б) состав № 5: 13,1% цистеамина/78,2% гиалуроната натрия/8,7% L-лейцина;
- с) состав № 7: 13,4% цистеамина/69,1% гиалуроната натрия/17,5% L-лейцина;
- д) состав № 8: 12,1% цистеамина/70,2% гиалуроната натрия/17,7% L-лейцина.

Определения

Для целей данного изобретения термин "респираторность" относится к количеству лекарственного средства, попавшего в лёгкие, по отношению к количеству порошка в виде аэрозоля.

Термин "доза тонкодисперсных частиц" (Fine Particle Dose, FPD) означает количество лекарственного средства в доставленной дозе, частицы в которой имеют аэродинамический диаметр менее 5 мкм. Эти частицы способны проникать в лёгкие при вдыхании. Термин "фракция мелкодисперсных частиц" (Fine Particle Fraction, FPF) означает FPD, выраженную в процентах от доставленной дозы, что означает количество порошка, покинувшего ингалятор.

Термин "средний размер частиц" описывает диаметр частиц в мкм, где распределение частиц по размерам делится поровну на две совокупности. Для целей данного изобретения средний размер частиц рассчитывается по объёмному распределению (D_{V50}).

Термин "общая активность" применительно к ионообменной смоле означает общее количество доступных участков на единицу массы, с которыми противоион может связываться для ионного обмена. Выражается в миллиэквивалентах на грамм (мэкв./г).

Термин "болезнь лёгких" включает в себя любое респираторное заболевание, поражающее лёгкие, например, муковисцидоз и COPD.

Аббревиатура "NaГК" означает гиалуронат натрия, при этом "ГК" означает гиалуроновая кислота. Термин "около" применительно к значению означает заявленное значение плюс или минус 5%, при этом применительно к диапазону означает крайние значения плюс или минус 5%.

Подробное описание изобретения

На сегодняшний день такое полимерное вещество, как гиалуроновая кислота, никогда не использовалось для получения новых солей цистеамина.

ГК представляет собой природный полисахарид, состоящий из линейной цепи D-глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина, и является имеющимся в избытке компонентом внеклеточного матрикса соединительной ткани, синовиальной жидкости, эмбриональной мезенхимы и стекловидного тела. Несмотря на то, что гиалуроновая кислота известна своей противовоспалительной активностью, она никогда не рассматривалась в качестве противоиона для получения соли цистеамина. Фактически, из-за низ-

кой кислотности ГК не ожидается, что она образует стабильную соль со слабым основанием цистеамином в твердой форме. Более того, ГК коммерчески доступна в форме натриевой соли гиалуроновой кислоты, которая препятствует образованию соли ГК со слабым основанием цистеамином.

После продолжительных экспериментов авторы данного изобретения неожиданно обнаружили, что можно легко получить соль цистеамина гиалуроната, которая является стабильной в твердой форме и может успешно использоваться для получения высокореспирабельных микрочастиц.

Следовательно, первым объектом данного изобретения является способ получения микрочастиц цистеамина гиалуроната, причем указанный способ включает следующие стадии:

- a) растворения гиалуроната натрия;
- b) добавления ионообменной смолы;
- c) фильтрации полученного раствора;
- d) добавления цистеаминового основания;
- e) распылительной сушки полученного раствора.

Более конкретно, на стадии a) предлагается растворение гиалуроната натрия, имеющего молекулярную массу в интервале между 22 кДа и 2 МДа, предпочтительно в интервале между 30 кДа и 1 МДа, в подходящем растворителе. Указанный растворитель может быть полярным растворителем, предпочтительно водой. Значение pH раствора гиалуроната находится в диапазоне между 6,1 и 6,9.

На стадии b) предлагается добавление ионообменной смолы, предпочтительно катионообменной смолы, к раствору гиалуроната. В предпочтительном варианте осуществления изобретения используется сильнокислотная катионообменная смола (например, Dowex Monosphere™ 650C (H) матрица стирола-DVB гелевого и сульфоновой кислоты в качестве функциональной группы). Сильная катионная смола может быть использована в периодическом или непрерывном режиме. Предпочтительно, смола используется в периодическом режиме, что означает, что раствор гиалуроната находится в непосредственном взаимодействии со смолой в течение времени, необходимого для завершения ионного обмена, а затем удаляется. Для того, чтобы увеличить взаимодействие между гиалуронатом натрия и смолой, раствор может быть выдержан при перемешивании в течение подходящего периода времени, например, от 1 до 3 ч. Таким образом, из раствора гиалуроната получают свободную гиалуроновую кислоту за счёт использования способности смолы обменивать ионы H^+ на ионы Na^+ . Значение pH полученного раствора ГК находится в диапазоне между 2,2 и 2,8.

Затем отработанную смолу удаляли из раствора ГК посредством фильтрации (стадия c). Термин "фильтрация" охватывает любой способ фильтрации, известный специалистам в данной области техники, например, фильтрацию с использованием воронки Бюхнера или мембраны. После восстановления раствора ГК добавляли свободное основание цистеамин (стадия d) с образованием солевого раствора цистеаминового основания и гиалуроновой кислоты. Солевой раствор, полученный на стадии d) имел массовое соотношение (мас./мас.) цистеаминового основания к гиалуроновой кислоте (в виде гиалуроната) в диапазоне между 1:3 и 1:10, предпочтительно в диапазоне между 1:5 и 1:8, более предпочтительно около 1:7. Значение pH полученного солевого раствора находится в диапазоне между около 3,7 и 6,9.

В заключение, солевой раствор подвергали процессу распылительной сушки (стадия e). Распылительную сушку выполняли с использованием подходящей распылительной сушилки, например, распылительной мини-сушилки BGchi B-191 или B-290. Для целей данного изобретения предпочтительные, но не ограничивающие диапазоны рабочих условий могут быть следующими: температура на входе в интервале между 120 и 160°C, распыление в интервале между 80 и 100%, скорость подачи в интервале между 2 и 6 мл/мин и скорость потока воздуха в интервале между 400 и 700 л/ч. Кроме того, интервал очистки сопла отрегулировали на уровне 5 (одна продувка каждые 7 с).

Предпочтительно, указанная стадия сушки e) позволяет легко получать ингалируемые микрочастицы цистеамина гиалуроната.

Указанные микрочастицы, по существу, имеют логарифмически нормальное распределение по размеру, со средним размером частиц (D_{V50}) менее 10 мкм, предпочтительно менее 5 мкм, и стандартное отклонение среднего значения менее или равное $\pm 0,5$ мкм. Распределение частиц по размеру высушенных распылением порошков определяли методом рассеянием лазерного излучения (SprayTec, Малверн, Великобритания). Приблизительно 10 мг порошка диспергировали в 20 мл раствора 0,1% (мас./об.) Span 80 в циклогексане и обрабатывали ультразвуком в течение 5 мин. Среди составов № 2 и № 8, представленных в табл. 1, значения D_{V50} и стандартное отклонение составляли $2,66 \pm 0,03$ и $2,57 \pm 0,06$, соответственно.

Морфологические характеристики высушенных распылением микрочастиц изучали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ, SUPRA 40, Carl Zeiss NTS GmbH, Оберкохен, Германия). Более конкретно, цистеаминовое основание (фиг. 1(a)) характеризуется частицами, похожими на хлопья, при этом высушенные распылением микрочастицы цистеамина гиалуроната (b) характеризуются округлыми структурами со сморщенной поверхностью. Эта структура показывает, что частицы соли пустые, что дает важное преимущество для респирабельности из-за низкого значения насыпной плотности порошка, созданного пустыми частицами. Насыпную плотность порошков определяли в соответствии с

последним изданием Европейской фармакопеи. Полученные значения насыпной плотности составляли $(0,24 \pm 0,02)$ г/см³ для порошка № 2 и $(0,22 \pm 0,01)$ г/см³ для порошка № 8.

Кроме того, условия распылительной сушки обеспечивают получение порошка из микрочастиц, который является физически и химически стабильным. Как было рассмотрено выше, свободное основание цистеамин (pK_a 9,42) представляет собой молекулу, довольно нестабильную в условиях окружающей среды не только в растворе, но и в виде порошка. Гиалуроновая кислота, как солевой противоион, стабилизирует тиолатамин. Полученный высушенный распылением порошок из микрочастиц для вдыхания, из-за встраивания цистеамина в полимерную структуру гиалуроновой кислоты, более устойчив к условиям окружающей среды при хранении, чем другие соли цистеамина.

В другом аспекте, данное изобретение относится к микрочастицам, содержащим цистеамина гиалуронат и, необязательно, фармацевтически приемлемую добавку. В этом смысле стадия d. может дополнительно включать добавление к раствору гиалуроновой кислоты добавки(ок), применимой(ых) для улучшения формы частиц или повышения стабильности частиц. Фармацевтически приемлемая(ые) добавка(и), например, может(гут) быть выбрана(ы) из группы, состоящей из аминокислот, например, лейцина, Сахаров, например, трегалозы, или органических кислот, например, аскорбиновой кислоты или уксусной кислоты.

Еще в одном аспекте данное изобретение относится к покрытым микрочастицам цистеамина гиалуроната. В этом смысле стадия e. может обеспечивать одновременное распыление двух отдельных растворов: одного раствора активного ингредиента с внутренней стороны (внутреннее отверстие) и одного раствора добавки(ок) с наружной стороны (наружное отверстие) применительно к соплу. Более конкретно, во внутреннее отверстие подается раствор цистеаминового основания и гиалуроновой кислоты, при этом в наружное отверстие подается раствор, содержащий добавку(и). Затем оба раствора одновременно, но по отдельности, распыляют через сопло, предпочтительно, через коаксиальное сопло, имеющее диаметр в диапазоне от 0,5 до 0,9 мм, предпочтительно равный 0,7 мм, что позволяет получать высушенные распылением покрытые микрочастицы с однородными характеристиками.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения выбранная добавка представляет собой L-лейцин. Лейцин известен как смазка, подходящая для получения ингалируемых частиц. Однако, в соответствии с данным изобретением лейцин, осажденный снаружи, способствует защитному действию поверх цистеамина гиалуроната, тем самым повышая физическую/химическую стабильность микрочастиц цистеамина гиалуроната. По существу, авторы изобретения неожиданно обнаружили, что лейцин обладает ценным свойством препятствовать как липкости гиалуроновой кислоты, так и гигроскопичности цистеамина.

Микрочастицы в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления изобретения содержат:

- от 10 до 30% мас./мас. цистеамина,
- от 50 до 80% мас./мас. гиалуроновой кислоты, и
- от 6 до 20% мас./мас. лейцина.

Способ по данному изобретению позволяет получать порошок, частицы которого имеют размер, плотность и форму, подходящие для образования стабильного аэрозоля с медленным потоком воздуха. Полученный аэрозоль облегчает транспортировку частиц лекарственного средства в лёгкие посредством ингаляции для достижения предсказуемым и воспроизводимым образом бронхиальной и альвеолярной части дыхательных путей.

В соответствии с любым аспектом данного изобретения, респирабельная фракция (FPF) полученного порошка микрочастиц может неожиданно достигать значений выше 60%. Это особенно заметно в порошках, в которые добавлена добавка лейцин. Оптимальные результаты могут быть получены при использовании коаксиального сопла для распыления раствора лейцина, имеющего процентное содержание лейцина более 10% мас./об. Напротив, растворы с более низкой концентрацией лейцина более эффективны с классическим соплом.

В другом аспекте, данное изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей микрочастицы цистеамина гиалуроната в соответствии с данным изобретением. Еще в одном аспекте, данное изобретение относится к применению микрочастиц цистеамина гиалуроната или его композиций в порошковом ингаляторе.

В данном изобретении рассматривается и решается важная проблема, которая заключается в получении нового стабильного солевого производного цистеамина. Предпочтительно, способ по данному изобретению позволяет получить новую соль цистеамина, которая представляет собой цистеамина гиалуронат. Следовательно, еще одним объектом данного изобретения является соль цистеамина гиалуроната.

Образование новой соли цистеамина гиалуроната по способу данного изобретения было продемонстрировано инфракрасной спектроскопией с преобразованием Фурье (Фурье-ИКС).

Спектральные измерения ИК-Фурье проводились при комнатной температуре с использованием спектрометра Jasco FT/IR-460 Plus Jasco в режиме пропускания в диапазоне волновых чисел 4000-650 см⁻¹. Исследуемый образец готовили диспергированием порошка с KBr в соотношении 1:9 (мас./мас.) в

ступке и затем уплотняли смесь гидравлическим прессом. ИК-Фурье спектр высушенных распылением микрочастиц гиалуроновой кислоты (фиг. 2(с)) отличается от ИК-Фурье спектра порошка гиалуроната натрия (b) наличием вилочной полосы, состоящей из трех пиков, приписываемой валентному колебанию пика $C=O$ карбоксильной группы (1734 см^{-1}), валентному колебанию пика $C=O$ вторичной амидной группы (1641 см^{-1}) и деформации NH (II амид) (1561 см^{-1}). Кроме того, наблюдается изменение интенсивности и сдвигов пиков при 1417 , 1378 и 1320 см^{-1} по отношению к гиалуронату натрия. Наконец, заметна разница в полосе 1043 см^{-1} , где плечо при 1077 см^{-1} становится пиком.

Что касается ИК-Фурье спектра высушенного распылением порошка цистеамина гиалуроната (фиг. 3), то полоса при 1645 см^{-1} соответствует как растяжению $-NH_2$ группы цистеамина, так и растяжению $C=O$ карбоксильной группы гиалуроновой кислоты. По сравнению с ИК-Фурье спектрами свободного основания цистеамина и гиалуроновой кислоты очевидна разница, указывающая на взаимодействие этих функциональных групп в высушенном распылении порошке цистеамина гиалуроната. Более того, из анализа ИК-Фурье спектра высушенного распылением порошка соли гиалуроната цистеамина обнаруживается уменьшение интенсивности пика при 1370 см^{-1} (валентное колебание метильной группы гиалуроната), переходящего в плечо полосы на 1410 см^{-1} . Интенсивность пика при 1077 см^{-1} , соответствующего валентному колебанию $C-O$ карбоксильной группы, снижается, что демонстрируется его преобразованием в плечо (как в спектре гиалуроната натрия). Это дополнительно поддерживает взаимодействие между цистеаминовым основанием и гиалуроновой кислотой на уровне карбоксильной группы гиалуроновой кислоты и аминогруппы цистеамина.

Образование новой соли цистеамина гиалуроната было дополнительно исследовано методом ЯМР ^{13}C анализа в твердом состоянии. Спектры свободного основания цистеамина, гиалуроната натрия, высушенного распылением порошка гиалуроновой кислоты и высушенного распылением порошка цистеамина гиалуроната были получены с использованием спектрометра ЯМР JNM-ECZR 400 (Jeol, Пибоди, США) в режиме твердого тела. При сравнении спектра цистеамина гиалуроната с другими, о солеобразовании явно свидетельствует присутствие пиков обоих противоионов (фиг. 4) с небольшим сдвигом этих пиков из-за влияния разных соседей, по сравнению с только противоионами (гиалуроновой кислоты и цистеамина). Более того, наблюдаются существенные различия в спектрах гиалуроната натрия и гиалуроновой кислоты. В частности, в спектре гиалуроновой кислоты плечо появляется на пике при около 175 м.д. , а пик при около 69 м.д. , который присутствует в спектре гиалуроната натрия, исчезает.

Цистеамина гиалуронат стабилен в условиях окружающей среды, не подвержен окислительному разложению, негигроскопичен и не расплывается.

Фактически, через месяц при $25^\circ C/60\%$ относительной влажности была оценена химическая стабильность посредством ВЭЖХ анализа и физическая стабильность с использованием теста на респираторную стабильность *in vitro*. В отношении высушенного распылением порошка цистеамина гиалуроната в момент времени 0 никаких изменений не наблюдалось касательно содержания примесей цистеамина и фракции мелкодисперсных частиц.

Более того, было обнаружено, что гиалуронат натрия ограничивает множественные механизмы лёгочного клиренса, позволяя получать более эффективное и продолжительное терапевтическое действие на лёгкие переносимого лекарственного средства (см. Ibrahim M. El-Sherbiny et al. "Inhaled nano- and microparticles for drug delivery", Glob Cardiol Sci Pract (2015), 2, 1-14). Таким образом, терапевтический эффект соли цистеамина гиалуроната должен быть приписан как цистеаминовому, так и гиалуроновому фрагментам.

Таким образом, авторы изобретения неожиданно обнаружили, что новая соль цистеамина преодолевает недостатки известных в данной области техники солей цистеамина не только благодаря эффективным химическим/физическим характеристикам, но также и благодаря более эффективному и длительному терапевтическому воздействию на эпителий лёгких.

Данным изобретением также предлагается применение цистеамина гиалуроната в качестве лекарственного препарата, в частности, при лечении заболеваний лёгких, более конкретно, при лечении инфекционных состояний муковисцидоза.

В заключение, технология изготовления по данному изобретению позволяет получать стабильную соль - производное цистеамина, то есть гиалуронат цистеамина, уже в форме легко ингалируемых микрочастиц.

Описание предпочтительных вариантов осуществления изобретения

Описанные в данном документе варианты осуществления изобретения имеют только иллюстративную цель и не предназначены для ограничения объёма данного изобретения. Более того, модификации и изменения приведенных ниже вариантов осуществления изобретения, очевидные для специалиста в данной области техники, предназначены для включения в прилагаемую формулу изобретения.

Характеристика высушенных распылением микрочастиц цистеамина гиалуроната.

Начиная с гиалуроната натрия $0,35\text{ МДа}$ (№ 2-6) или $0,9\text{ МДа}$ (№ 1), высушенные распылением порошки цистеамина гиалуроната, с или без добавки(ок), были приготовлены в соответствии с данным изобретением (табл. 1). Использование гиалуроната натрия с разной молекулярной массой не оказывает отрицательного влияния на свойства конечного продукта в отношении количественного анализа цистеами-

на, насыпной плотности и распределения частиц высушенного распылением порошка по размеру.

Таблица 1

Композиции высушенных распылением порошков цистеамина

Состав	Композиция (%, мас./мас.)	Параметры распылительной сушилки	Выход (%)	Остаточная вода (%)	Содержание цистеамина (%)	FPF (%)
№1	12,9 цистеамина 87,1 NaГК	B290, T _{вход} 150°C, T _{выход} 75°C, скорость подачи 5 мл/мин	62,5	7,35	13,4	29,0
№2	12,2 цистеамина 87,8 NaГК	B191, T _{вход} 120°C, T _{выход} 62°C, скорость подачи 5 мл/мин	68,1	8,4	10,4	22,8
№3	12,7 цистеамина 87,1 NaГК 0,2 аскорбиновой кислоты	B191, T _{вход} 120°C, T _{выход} 64°C, скорость подачи 5 мл/мин	24	7,9	10,8	31,8
№4	15 цистеамина 85 NaГК 0,8 мл уксусной кислоты	B290, T _{вход} 120°C, T _{выход} 58°C, скорость подачи 5 мл/мин	64,2	7,5	12,7	27,0
№5	12,8 цистеамина 78,5 NaГК 8,7 L-лейцина	B290, T _{вход} 120°C, T _{выход} 60°C, скорость подачи 5 мл/мин	66,1	5,9	10,9	65,9
№6	13,1 цистеамина 78,2 NaГК 8,7 L-лейцина	B290, T _{вход} 120°C, T _{выход} 63°C, скорость подачи 4 мл/мин коаксиальное сопло	44,3	7,3	11,2	33,4
№7	13,4 цистеамина 69,1 NaГК	B290, T _{вход} 120°C, T _{выход} 62°C, скорость подачи 4 мл/мин коаксиальное сопло	61,1	6,0	11,4	62,3
	17,5 L-лейцина					
№8	12,1 цистеамина 70,2 NaГК 17,7 L-лейцина	B290, T _{вход} 150°C, T _{выход} 75°C, скорость подачи 4 мл/мин коаксиальное сопло	60,8	5,8	10,3	69,8

Количество остаточной воды оценивали методом термогравиметрического анализа (ТГА) в диапазоне температур от 25 до 150°C.

Содержание цистеамина в высушенных распылением порошках определяли посредством ВЭЖХ анализа в градиентном режиме. Более конкретно, ВЭЖХ была оборудована хроматографом Shimadzu LC-10AT, оснащенным насосами LC-10AS и УФ-вид спектрометром SPD-10A. Колонку C18 использовали в качестве стационарной фазы, а подвижная фаза состояла из растворителя А (11,52 г додецилсульфата натрия, растворенного в 380 мл воды качества Milli-Q/300 мл ацетонитрила/320 мл метанола и 1,4 мл 85% об./об. H₃PO₄) и растворителя В (ацетонитрила), смешанных градиентным способом при расходе 1,4 мл/мин. Длина волны обнаружения была установлена на 210 нм.

Значение респираторности порошка для применения в качестве ингалируемых порошков было охарактеризовано с точки зрения определения аэродинамического диаметра.

Оценку аэродинамических характеристик *in vitro* высушенных распылением порошков, полученных в соответствии с данным изобретением, проводили с использованием импактора быстрого скрининга (Fast Screening Impactor (FSI)) (Copley Scientific, Великобритания). FSI классифицирует порошок, выпускаемый из ингалятора, по двум фракциям аэродинамических частиц, а именно по крупнодисперсной фракции и мелкодисперсной фракции (аэродинамический диаметр выше и ниже 5 мкм, соответственно). Коллектор крупнодисперсной фракции (Coarse Fraction Collector (CFC)) оборудован вставкой, которая обеспечивает определенный размер отсеивания при 60 л/мин: все частицы более 5 мкм собираются, а все частицы меньшего размера проходят. Частицы, не уловленные CFC, составляют респираторную фракцию аэрозольного порошка и продолжают следовать за воздушным потоком. Все они улавливаются последующим коллектором тонкодисперсной фракции (FFC), например, фильтром (стеклянный фильтр типа А/Е, 76 мм (Pall 183 Corporation, США)).

Для того, чтобы измерить респираторность, точно взвешенное количество высушенного распылением порошка (около 20 мг) вручную вводили в твердую капсулу размера 3 из НРМС (ГПИМЦ).

Капсулу вставляли в держатель камеры устройства для сухого порошка (RS01®, Plastiapе Spa, Osipago LC, Италия) и прокалывали. Устройство присоединяли к FSI и активировали потоком воздуха в течение 4 с при 60 л/мин (что соответствует перепаду давления 4 кПа для этого ингалятора). Следовательно, процентное содержание цистеамина, осажденного на фильтре FFC, по сравнению с количеством, загруженным в капсулу, также определяемым как фракция мелкодисперсных частиц (FPF), количественно определяли посредством ВЭЖХ анализа. Каждый порошок испытывали в двух повторностях.

Оценку морфологической характеристики высушенных распылением микрочастиц цистеамина гиалуроната проводили методом сканирующей электронной микроскопии (SEM). Высушенные распылением микрочастицы демонстрировали как округлые структуры, так и небольшую сморщенную поверхность. В частности, когда раствор L-лейцина распыляли из внешнего отверстия коаксиального сопла, были получены губчатые микрочастицы (фиг. 5 b-d). Такая форма частиц может уменьшать взаимодей-

ствие между частицами, повышая эффективность их аэрозолизации.

Примеры

Способность раствора гиалуроновой кислоты вступать в реакцию с основанием.

25 мл раствора гиалуроновой кислоты, содержащего 63,25 мг NaГК 0,35 МДа, титровали с использованием бромтимола синего в качестве индикатора. Титрант (0,01 н. раствор NaOH) медленно добавляли, пока индикатор не изменял цвет с желтого на синий (pH около 7,0). Для нейтрализации раствора ГК требовалось 12,13 мл 0,01 н. NaOH (т.е. 0,1213 мэкв.); таким образом, 63,25 мг NaГК 0,35 МДа в среднем содержат 0,1213 миллиэквивалента ГК. Следовательно, количество цистеаминового основания (ММ 77,15), которое может вступать в реакцию с гиалуроновой кислотой, полученной из 63,25 мг гиалуроната натрия, рассчитывали следующим образом: $0,1213 \times 77,15 = 9,358$ мг.

Массовое соотношение цистеаминового основания к гиалуроновой кислоте (в виде гиалуроната натрия ММ 0,35 МДа) в растворе составляло около 1:7 мас./мас.

Растворы для распылительной сушки готовили в соответствии с этим оценочным расчетом.

Получение высушенных распылением микрочастиц цистеамина гиалуроната.

Пример № 1.

500 мг гиалуроната натрия (ММ 0,9 МДа) вводили в колбу, содержащую 170 мл очищенной воды при 50°C и в условиях перемешивания магнитной мешалкой. Затем, учитывая, что емкость смолы Dowex Monosphere 650C (H) составляет 2 мэкв/мл (плотность 1,22 г/мл), 500 мг смолы добавляли к раствору гиалуроната и оставляли взаимодействовать при комнатной температуре в условиях магнитного перемешивания в течение около двух часов, пока значение pH не становало стабильным (pH 3,03). Полученный раствор, содержащий гиалуроновую кислоту, фильтровали с использованием воронки Бюхнера и собирали в мерную колбу объемом 200 мл. Смола, оставшуюся на фильтре, промывали очищенной водой объемом 10 мл для экстракции остаточной гиалуроновой кислоты на смоле и воронке. После этого 74 мг цистеаминового основания растворяли в колбе с ГК при перемешивании с получением раствора соли цистеамина и гиалуроновой кислоты, и объем в мерной колбе доводили очищенной водой.

Массовое соотношение цистеаминового основания: гиалуроновая кислота (в виде гиалуроната натрия ММ 0,35 МДа) в растворе составляло около 1:7 мас./мас. Растворы, полученные как описано выше, затем подвергали распылительной сушке. Были установлены следующие рабочие условия распылительной сушилки (Buchi mini B-290):

Т на входе (°C)	150
Т на выходе (°C)	75
Распыление (%)	100
Скорость подачи (мл/мин)	5
Поток воздуха (л/ч)	600

Выход процесса составлял 62,5%. Содержание лекарственного средства в высушенных распылением микрочастицах определялось посредством ВЭЖХ анализа. Содержание цистеамина в полученном порошке составляло $(13,4 \pm 1,5)\%$. Остаточную воду в порошке определяли посредством термогравиметрического анализа (ТГА) в диапазоне температур от 25 до 150°C. Порошок имел содержание воды 7,35%.

Примеры №№ 3-5.

Высушенные распылением микрочастицы цистеамина гиалуроната, содержащие добавку, получали в соответствии с примером № 1 с той лишь разницей, что добавку дополнительно добавляли к раствору гиалуроновой кислоты, полученному как описано выше, перед добавлением цистеаминового основания.

Пример № 6.

Высушенные распылением микрочастицы цистеамина гиалуроната, содержащие добавку лейцин, изготавливали посредством распылительной сушки раствора соли цистеамина и гиалуроновой кислоты, приготовленного с модификацией способа, описанного для примера № 5. Более конкретно, гиалуронат натрия вводили в колбу, содержащую 80 мл очищенной воды, при 50°C в условиях магнитного перемешивания. Затем к раствору гиалуроната добавляли смолу и оставляли взаимодействовать при комнатной температуре в условиях магнитного перемешивания в течение около двух часов, пока значение pH не становало стабильным. Полученный раствор, содержащий гиалуроновую кислоту, фильтровали с использованием воронки Бюхнера и собирали в мерную колбу объемом 100 мл. Смола, оставшуюся на фильтре, промывали очищенной водой объемом 10 мл для экстракции остаточной гиалуроновой кислоты на смоле и воронке. После этого цистеаминовое основание растворяли в колбе с ГК при перемешивании с получением раствора соли цистеамина и гиалуроновой кислоты, и объем в мерной колбе доводили очищенной водой.

Раствор добавки готовили посредством растворения лейцина в мерной колбе объемом 100 мл с очищенной водой.

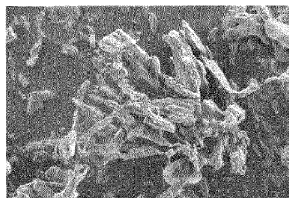
Раствор добавки добавляли к раствору цистеамина и гиалуроновой кислоты в процессе распылительной сушки с использованием коаксиального сопла, в котором два раствора лекарственного средства и добавки содержались отдельно и распылялись таким образом, чтобы поток раствора, выходящий из сопла, был образован внутренним потоком раствора соли цистеамина и гиалуроновой кислоты (концен-

трация 0,46% мас./об.) и внешним потоком раствора лейцина (концентрация 0,04% мас./об.).

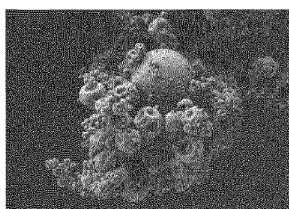
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения микрочастиц цистеамин гиалуроната, включающий следующие стадии:
 - a) растворение гиалуроната натрия;
 - b) добавление ионообменной смолы;
 - c) фильтрация полученного раствора;
 - d) добавление цистеаминового основания;
 - e) распылительная сушка полученного раствора.
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что раствор, полученный на стадии d), имеет массовое соотношение цистеаминового основания к гиалуроновой кислоте в диапазоне между 1:3 и 1:10, предпочтительно в диапазоне между 1:5 и 1:8, более предпочтительно равное 1:7.
3. Способ по п.1, отличающийся тем, что стадия d) дополнительно включает добавление фармацевтически приемлемой добавки.
4. Способ по п.1, отличающийся тем, что стадия e) обеспечивает одновременное распыление раствора, содержащего цистеамин гиалуронат, с внутренней стороны (внутреннее отверстие), и раствора, содержащего добавку, с наружной стороны (наружное отверстие) применительно к соплу.
5. Способ по п.3 или 4, отличающийся тем, что указанная добавка выбрана из группы, состоящей из лейцина, трегалозы, аскорбиновой кислоты и уксусной кислоты.
6. Способ по п.5, отличающийся тем, что указанная добавка представляет собой лейцин.
7. Микрочастицы, содержащие соль цистеамин гиалуроната.
8. Микрочастицы по п.7, имеющие средний размер частиц менее 5 мкм.
9. Микрочастицы по п.7, имеющие FPF (фракцию мелкодисперсных частиц) более 60%.
10. Фармацевтическая композиция, содержащая микрочастицы по любому из пп.7-9.
11. Применение микрочастиц по любому из пп.7-9 в порошковом ингаляторе.
12. Соль цистеамин, которая представляет собой цистеамин гиалуронат.
13. Применение цистеамин гиалуроната в качестве лекарственного средства.
14. Применение цистеамин гиалуроната для лечения заболеваний лёгких.
15. Применение цистеамин гиалуроната для лечения цистиноза.

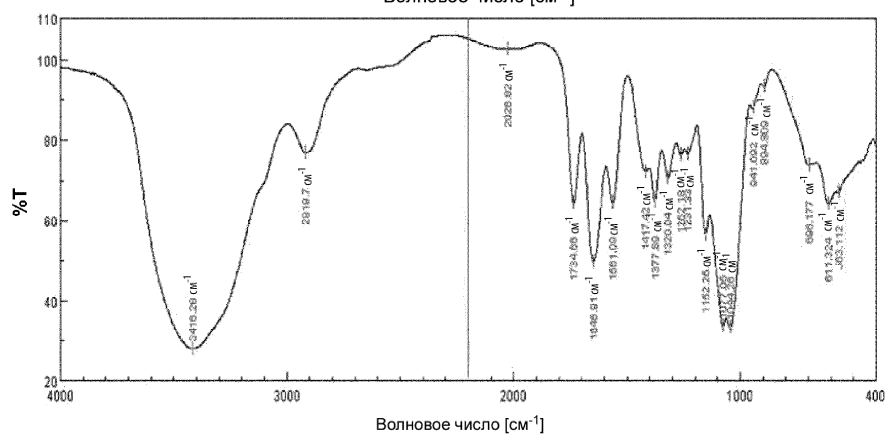
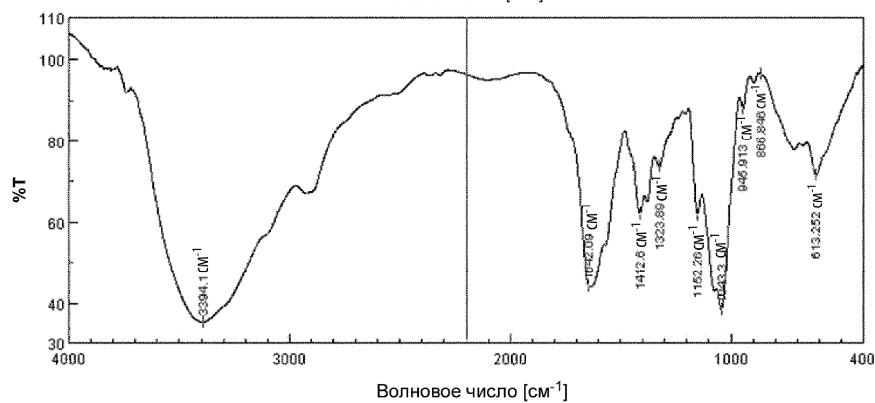
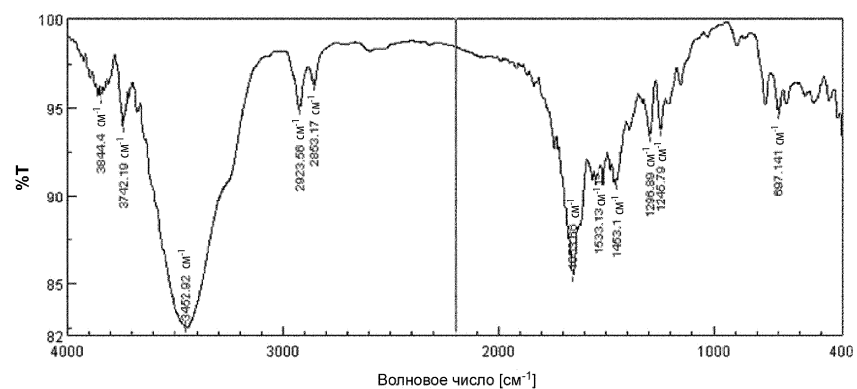
a)



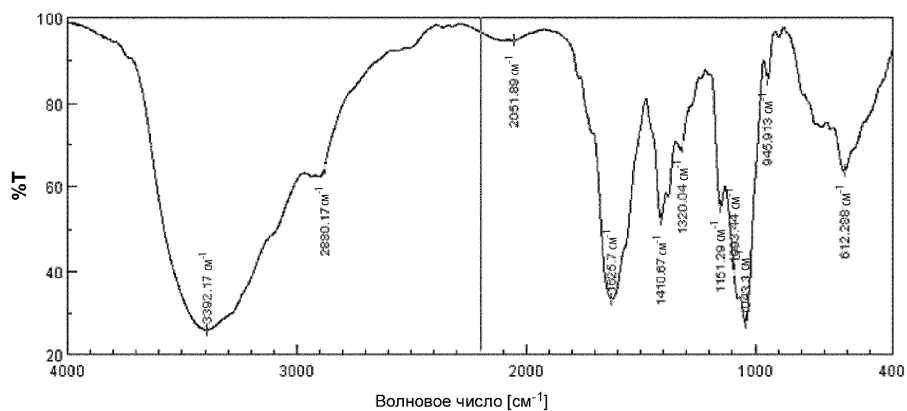
b)



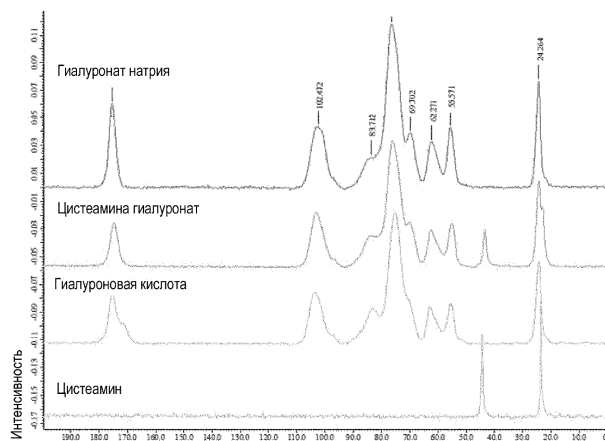
Фиг. 1



Фиг. 2

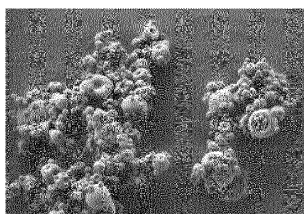


Фиг. 3

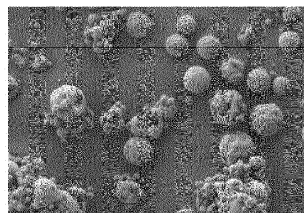


Фиг. 4

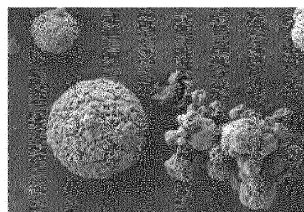
a)



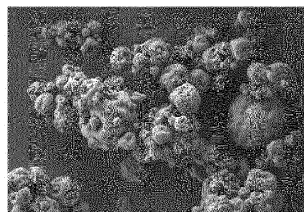
b)



c)



d)



Фиг. 5

