



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

A61K 31/436 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 9/12 (2006.01)

A61K 9/14 (2006.01)

A61P 9/02 (2006.01)

A61P 9/08 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61J 1/00 (2020.05); A61K 31/436 (2020.05); A61K 31/557 (2020.05); A61K 45/06 (2020.05); A61K 9/0075 (2020.05); A61K 9/12 (2020.05); A61K 9/1617 (2020.05); A61K 9/1623 (2020.05); A61P 11/00 (2020.05); A61P 43/00 (2020.05); A61P 9/12 (2020.05)

(21)(22) Заявка: 2017115990, 07.10.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
07.10.2015

Дата регистрации:
24.09.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
07.10.2014 US 62/060,988;
07.04.2015 US 62/144,145

(43) Дата публикации заявки: 13.11.2018 Бюл. № 32

(45) Опубликовано: 24.09.2020 Бюл. № 27

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 10.05.2017

(86) Заявка РСТ:
US 2015/054550 (07.10.2015)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2016/057712 (14.04.2016)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

АРМЕР Томас (US),
МЕЛВИН Лоуренс С., Мл. (US),
РОТБЕРГ Джонатан М. (US),
ЛИХЕНШТЕЙН Хенри (US)

(73) Патентообладатель(и):

ЭйАй ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2008/137148 A2, 13.11.2008. WO
2006094507 A1, 14.09.2006. US 2014/0037548 A1,
06.02.2014. EP 1104760 B1, 06.06.2001. US 2013/
0203717 A1, 08.08.2013. KR 0178798B1, 25.11.1998.

(54) ИНГАЛЯЦИОННАЯ ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА РАПАМИЦИНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЛЕГОЧНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики легочной артериальной гипертензии (РАН) у человека, причем способ включает введение субъекту путем ингаляции фармацевтической аэрозольной композиции в форме сухого порошка, содержащей микрочастицы рапамицина, где частицы рапамицина имеют среднемассовый

аэродинамический диаметр (MMAD) от 1 до 5 мкм, и частицы носителя, где лекарственная форма является эффективной для доставки терапевтического количества рапамицина в легкие, где композиция содержит от 5 до 500 мкг рапамицина и соотношение рапамицина и носителя в порошке составляет от 0,5 до 2% по массе. Техническим результатом настоящего

изобретения является возможность безопасной доставки рапамицина в легкие в форме сухого порошка, содержащего микрочастицы рапамицина, путём ингаляции, уменьшение или

исключение токсичности и неблагоприятных побочных эффектов. 15 з.п. ф-лы, 11 пр., 16 табл., 9 ил.

R U 2 7 3 2 9 0 8 C 2

R U 2 7 3 2 9 0 8 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 31/436 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 9/12 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61P 9/02 (2006.01)
A61P 9/08 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61J 1/00 (2020.05); *A61K 31/436* (2020.05); *A61K 31/557* (2020.05); *A61K 45/06* (2020.05); *A61K 9/0075* (2020.05); *A61K 9/12* (2020.05); *A61K 9/1617* (2020.05); *A61K 9/1623* (2020.05); *A61P 11/00* (2020.05); *A61P 43/00* (2020.05); *A61P 9/12* (2020.05)

(21)(22) Application: **2017115990, 07.10.2015**

(24) Effective date for property rights:
07.10.2015

Registration date:
24.09.2020

Priority:

(30) Convention priority:
07.10.2014 US 62/060,988;
07.04.2015 US 62/144,145

(43) Application published: **13.11.2018 Bull. № 32**

(45) Date of publication: **24.09.2020 Bull. № 27**

(85) Commencement of national phase: **10.05.2017**

(86) PCT application:
US 2015/054550 (07.10.2015)

(87) PCT publication:
WO 2016/057712 (14.04.2016)

Mail address:
129090, Moskva, ul. B.Spasskaya, 25, stroenie 3,
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i
Partnery"

(72) Inventor(s):

ARMER Tomas (US),
MELVIN Lourens S., Ml. (US),
ROTBERG Dzhonatan M. (US),
LIKHENSHTJEJN Khenri (US)

(73) Proprietor(s):

EjAj THERAPYUTIKS, INK. (US)

(54) INHALATION DOSAGE FORM OF RAPAMYCIN FOR TREATING PULMONARY HYPERTENSION

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: present invention relates to a method of treating or preventing pulmonary arterial hypertension (PAH) in a human, the method comprising administering to a subject by inhalation a pharmaceutical aerosol composition in the form of a dry powder containing rapamycin microparticles, where the rapamycin particles have a weight average aerodynamic diameter (MMAD) of 1 to 5 mcm, and carrier particles, where the dosage form is effective for

delivering a therapeutic amount of rapamycin to the lungs, where composition contains 5 to 500 mcg of rapamycin and ratio of rapamycin and carrier in powder is 0.5 to 2 % by weight.

EFFECT: technical result of the present invention is the possibility of safe delivery of rapamycin to the lungs in the form of a dry powder containing rapamycin microparticles, by inhalation, reducing or eliminating toxicity and adverse side effects.

16 cl, 11 ex, 16 tbl, 9 dwg

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[01] Настоящая заявка РСТ испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 62/060988, зарегистрированной 7 октября 2014 года, и предварительной заявки на патент США № 62/144145, зарегистрированной 7 апреля 2015 года, содержание

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[02] Настоящее изобретение относится к способам и фармацевтическим композициям, включающим рапамицин, для ингаляционной доставки в легкие с целью профилактики и лечения легочной гипертензии.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[03] Легочная гипертензия (РН) представляет собой повышение кровяного давления в легочной артерии, легочной вене или легочных капиллярах, которые вместе называют легочной сосудистой сетью, что приводит к боли в груди, предобморочному состоянию, обмороку, утомляемости, отеку ног, головокружению при физической нагрузке, одышке при физической активности и/или слабости. Симптомы легочной гипертензии аналогичны симптомам других наиболее распространенных сердечных и легочных нарушений. Эти нарушения включают астму, пневмонию, хроническое обструктивное заболевание легких (COPD), недостаточность левых отделов сердца и/или коронарную болезнь сердца, что часто усложняет постановку диагноза легочной гипертензии.

Исходная причина возникновения легочной гипертензии остается неизвестной. При легочной гипертензии наблюдаются сужение или сжатие кровеносных сосудов, соединенных с легкими или находящихся внутри легких. Стенки самых мелких кровеносных сосудов утолщаются и больше не способны нормально переносить кислород и диоксид углерода между кровью и легкими. Сердцу становится тяжелее прокачивать кровь через легкие. В течение времени, в результате протекания процесса, называемого фиброзом, пораженные кровеносные сосуды становятся более жесткими и утолщенными. Это дополнительно повышает кровяное давление в легких и нарушает кровоток, увеличивает нагрузку на сердце и вызывает гипертрофию правого желудочка. Сердце в меньшей степени способно перекачивать кровь через легкие, что приводит к сердечной недостаточности и смерти пациентов. Нормальное легочное артериальное давление у человека, живущего на уровне моря, в состоянии покоя имеет среднюю величину 8-20 мм рт. ст. Наличие легочной гипертензии диагностируют в том случае, когда среднее значение величины легочного артериального давления в состоянии покоя превышает 25 мм рт. ст.

[04] Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) подразделяет легочную гипертензию на различные группы, такие как: группа 1 по классификации ВОЗ - легочная артериальная гипертензия (РАН) (например, идиопатическая, наследственная (BMPR2, ALK1, эндоглин, неизвестные причины), вызванная воздействием лекарственных препаратов и токсических веществ, легочная гипертензия, связанная с заболеванием соединительной ткани, с ВИЧ-инфекцией, портальной гипертензией, врожденными пороками сердца, шистосомиазом или хронической гемолитической анемией (в том числе серповидноклеточной анемией), персистирующая легочная гипертензия новорожденных), группа 1' по классификации ВОЗ - окклюзионное поражение легочных вен (PVOD) и/или легочный капиллярный гемангиоматоз (PCH), группа II по классификации ВОЗ - легочная гипертензия, обусловленная заболеванием левых отделов сердца (например, систолической или диастолической дисфункцией, пороком клапанов), группа III по классификации ВОЗ - легочная гипертензия, обусловленная заболеванием легких и/или гипоксией (например, хроническим обструктивным заболеванием легких,

интерстициальной легочной болезнью, другими легочными заболеваниями со смешанными рестриктивным и обструктивным компонентами, нарушением дыхания во сне, нарушениями альвеолярной гиповентиляции, постоянным нахождением в условиях высокогорья, развитием пороков дыхательной системы), группа IV по классификации ВОЗ - хроническая тромбоэмболическая легочная гипертензия (СТЕРН), и/или группа V по классификации ВОЗ - легочная гипертензия, обусловленная неясными многофакторными механизмами (например гематологическими заболеваниями: миелопролиферативным заболеванием, удалением селезенки, системными заболеваниями: саркоидозом, легочным гистиоцитозом из клеток лангерганса: лимфангиолейомиоматозом, нейрофиброматозом, васкулитом, метаболическими нарушениями: гликогенозом, болезнью Гоше, заболеваниями щитовидной железы, и другими: опухолевой обструкцией, фиброзирующим медиастинитом, хронической почечной недостаточностью у больных на диализе).

[05] Легочная гипертензия (РН) является неизлечимым заболеванием. Лечение только облегчает симптомы и замедляет прогрессирование заболевания. Не смотря на значительные достижения в лекарственной терапии легочной гипертензии, летальность в отдаленном периоде остается высокой, преимущественно за счет сердечной недостаточности и других сердечно-сосудистых заболеваний.

[06] Некоторые типы легочной гипертензии могут быть подвергнуты лечению, если известно лежащее в их основе заболевание легких. В настоящий момент, варианты лечения, применяемые для пациентов, страдающих легочной гипертензией по невыясненным причинам, направлены на клеточную дисфункцию, которая приводит к сужению сосудистого русла. Такие лекарственные препараты, как простагландин, простаноиды, ингибиторы фосфодиэстеразы-5, антагонисты рецепторов эндотелина и другие сосудорасширяющие средства вызывают в основном расширение сосудов легких. Например, простагландин, вводимый внутривенно через катетер, имплантированный хирургическим путем в кожу, повышает качество жизни, увеличивает выживаемость и снижает количество случаев неотложной трансплантации легкого. Сосудорасширяющие средства, такие как блокаторы кальциевых каналов, окись азота и простагландин, часто применяют при легочной гипертензии, обусловленной склеродермией, хроническим заболеванием печени и ВИЧ-инфекцией. И напротив, эти лекарственные средства являются неэффективными для пациентов с легочной гипертензией, обусловленной легочным заболеванием. В случае легочной артериальной гипертензии (РАН), часто назначают диуретики, диксогин и кислородную терапию. К сожалению, на многих пациентов эти лекарственные средства не оказывают существенного действия, или пациенты перестают отвечать на лечение ими в течение времени. Тогда единственным выходом для лечения легочной гипертензии является односторонняя и/или двухсторонняя трансплантация легкого или трансплантация сердце-легкое. Хотя некоторые данные свидетельствуют о том, что применяющиеся терапии оказывают вторичные воздействия на ремоделирование сосудов, тем не менее, в настоящее время не существует терапий, которые целенаправленно воздействуют на аномальную пролиферацию клеток при легочной гипертензии.

[07] Молекулярный механизм легочной гипертензии не изучен, но считается, что эндотелиальная дисфункция приводит к уменьшению синтеза эндотелиальных сосудорасширяющих факторов, таких как окись азота и простагландин. Гиперплазия клеток гладких мышц легочной артерии (PA-SMCs) является патологическим признаком всех форм легочной гипертензии, которая приводит к структурному ремоделированию и окклюзии легочных сосудов. Ремоделирование легочных сосудов является следствием

аномальной пролиферации и резистентности клеток к апоптозу, образующих стенку сосуда, в том числе клеток гладких мышц легочной артерии, эндотелиальных клеток и легочных адвентициальных фибробластов. Известно, что внутриклеточные сигнальные пути, включающие серин/треонинкиназа Akt и мишень рапамицина в клетках

5 млекопитающих (mTOR), играют особо важную роль при клеточной пролиферации и раке, и они могут также принимать участие в пролиферации клеток гладких мышц сосудов при легочной гипертензии. Передача сигнала в клетках гладких мышц легочной артерии, серин/треонинкиназы и мишени рапамицина в клетках млекопитающих может

10 быть активирована при воздействии многочисленных факторов роста, а также физического раздражителя, такого как механическое раздражение и гипоксия. Так, сигнальный путь Akt-mTOR является общим для различных физических и биологических раздражителей, которые воздействуют на клетки гладких мышц легочной артерии и могут вызывать легочную гипертензию.

[08] Рапамицин представляет собой макроциклический триеновый антибиотик,

15 который продуцируют бактерии *Streptomyces hygroscopicus* (смотрите Патент США № 3929992). Рапамицин является ингибитором mTOR. Иммуносупрессивные и противовоспалительные свойства рапамицина изначально предполагали его применение при трансплантации и лечении аутоиммунных заболеваний. Например, было показано, что он предотвращает образование гуморальных (IgE-подобных) антител в ответ на

20 стимуляцию аллергической реакции альбумином, ингибирует активацию Т-клеток мыши и увеличивает продолжительность нормального функционирования трансплантированных органов у гистонесовместимых грызунов. В моделях аутоиммунных заболеваний на грызунах, рапамицин подавляет иммуно-

опосредованные осложнения, связанные с системной красной волчанкой, коллаген-

25 индуцированным артритом, аутоиммунным диабетом типа I, аутоиммунным миокардитом, экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом, реакцией "трансплантат против хозяина" и аутоиммунным увеоретиниом.

[09] Рапамицин также имеет международное непатентованное название сиролимус (смотрите, например, ANDA #201578, by Dr. Reddys Labs Ltd., approved May 28, 2013).

30 Сиролимус одобрен Управлением по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США (FDA) и продается под торговым названием рапамун фирмой Wyeth Pharmaceuticals Inc. (дочерней структурой фирмы Pfizer) для предотвращения отторжения трансплантированных органов и при трансплантации почек. Рапамун применяют в форме перорального раствора (1 мг/мл) или таблеток (с

35 различной дозой). Фирма Wyeth Pharmaceuticals Inc. (Pfizer) также продает производное под торговым названием торизел (темсиролимус) для лечения на поздних стадиях почечно-клеточной карциномы путем внутривенного введения. Темсиролимус представляет собой водорастворимое пролекарство сиролимуса. Фирма Cordis, подразделение фирмы Johnson & Johnson, продает под торговым названием CYPHER

40 коронарные стенты, выделяющие сиролимус. В данном случае, антипролиферативное действие сиролимуса позволяет предотвращать рестеноз в коронарных артериях после баллонной ангиопластики. В патентном документе US 2010/0305150 to Berg et al. (Novartis) описаны производные рапамицина для лечения и предотвращения нейрокожных нарушений, таких как нарушения, опосредованные комплексом туберозного склероза

45 (TSC), включая туберкулезный склероз, а также нарушений, опосредованных нейрофиброматозом типа 1 (NF-1). Кроме того, рапамицин и его производные описаны в публикации Nishimura, T. et al. (2001) Am. J. Respir. Crit. Care Med. 163:498-502 и в патентах США № 6384046 и 6258823.

[10] Клинически одобренное применение рапамицина может сопровождаться несколькими хорошо известными побочными эффектами, включающими легочную токсичность (на этикетке упаковки препарата рапамун имеется предупреждение, что он не должен применяться в случае пациентов с трансплантированным легким),

5 повышенный риск развития рака и симптомы, подобные диабету. Рапамицин связывают с возникновением легочной токсичности обычно в форме интерстициального пневмонита, но также зарегистрированы случаи легочного альвеолярного протеиноза. Смотрите, например, Nocera et al., Sirolimus Therapy in Liver Transplant Patients: An Initial Experience at a Single Center, *Transplantation Proceedings* (2008), 40(6), 1950-1952; Perez et al.,

10 *Interstitial Pneumonitis Associated With Sirolimus in Liver Transplantation: A Case Report, Transplantation Proceedings* (2007), 39(10), 3498-3499; Hashemi-Sadraei et al., Sirolimus-associated diffuse alveolar hemorrhage in a renal transplant recipient on long-term anticoagulation, *Clinical Nephrology* (2007), 68(4), 238-244; Pedroso et al., Pulmonary alveolar proteinosis - a rare pulmonary toxicity of sirolimus, *Transplant International* (2007), 20(3), 291-296. Причина

15 вызываемой рапамицином легочной токсичности неизвестна. И именно легочная токсичность рапамицина должна в первую очередь учитываться при его применении для лечения легочной гипертензии.

[11] Тяжелые респираторные осложнения были также выявлены при применении сиролимуса в качестве противоракового препарата при длительном введении, в

20 результате чего его концентрация в циркулирующей крови превышала 1 нанограмм/мл. Например, о легочной токсичности пролекарства сиролимуса, темсиролимуса, сообщалось в отчете за 2009 год, в котором отмечается, что "интерстициальная болезнь легких является редким побочным эффектом у больных раком почки при терапии темсиролимусом". Aparicio et al., *Clinical & Translational Oncology* (2009), 11(8), 499-510;

25 Vahid et al., Pulmonary complications of novel antineoplastic agents for solid tumors, *Chest* (2008) 133:528-538. Кроме того, в мета-анализе за 2012 год был сделан вывод о том, что 10% больных раком, получавших темсиролимус или эверолимус, могли испытывать токсичность в легкой форме при ухудшении качества жизни, и, в некоторых случаях, приходилось прерывать данную терапию. Смотрите Iacovelli et al., Incidence and risk of

30 pulmonary toxicity in patients treated with mTOR inhibitors for malignancy. A meta-analysis of published trials, *Acta oncologica* (2012), 51(7), 873-879. Кроме того, исследования фармакологической безопасности темсиролимуса, проведенные на крысах (смотрите Pharm/Tox section of temsirolimus NDA), показали снижение частоты дыхания, а также инфильтрацию и воспаление альвеолярных макрофагов в легких (смотрите Pharmacology

35 Review for Temsirolimus NDA 22088, доступный на веб-сайте Управления по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США (US FDA website)). Эти побочные эффекты наблюдались в условиях относительно высоких концентраций лекарственного средства в объеме циркулирующей крови в результате системного введения.

[12] Несмотря на вероятность проявления рапамицином легочной токсичности, он был исследован на различных моделях животных в качестве потенциального

40 лекарственного препарата для легочной гипертензии (Ghofrani et al *J. Am. Coll. Cardiol.* 54(1):S108-S118 (2009); Paddenberget al *BioMed Central* 8 (15): 1-12 (2007)). В патентных документах US Patent Application WO 2014/0271871 и WO2008/137148 (в совокупности

45 "заявки на патенты США фирмы Abraxis BioScience, Inc.") описаны способы лечения, стабилизации, предотвращения и/или отсрочки возникновения легочной гипертензии в результате введения наночастиц рапамицина и белка-носителя, такого как альбумин. В целом, описаны различные способы введения этих наночастиц рапамицина, в том

числе и ингаляция. Но применение аэрозольной лекарственной формы рапамицина для его доставки непосредственно в легкие является весьма маловероятным в связи с хорошо известной легочной токсичностью рапамицина, примеры которой были приведены в упомянутых выше статьях. И на самом деле, возможные схемы клинических испытаний, описанные в заявках на патенты США фирмы Abraxis BioScience, Inc., включают только внутривенное введение. В заявках на патенты США фирмы Abraxis BioScience, Inc. отсутствуют данные, которые убедили бы специалиста в этой области, что решены проблемы, связанные с легочной токсичностью рапамицина. В заявке на патент США от Lehrer, опубликованной в 2013 году, выражено мнение о том, что "рапамицин (сиролимус) небезопасно вдыхать в силу его легочной токсичности, возникновения интерстициального пневмонита, что убедительно подтверждается соответствующими данными". Смотрите патентный документ US 20130004436, в котором приводится ссылка Chhajed et al. (2006) 73:367-374. Заявка на патент США от Lehrer относится к композициям и способам лечения и предотвращения рака легких и лимфангиолейомиоматоза. Хотя в некоторых более ранних публикациях, таких как патент США №5080899, Sturm et al. (выданный в феврале 1991 года) и патент США № 5635161 (выданный в июне 1995 года), содержится некоторое общее описание рапамицина для доставки с помощью ингаляции, тем не менее, такие общие описания не подкреплялись какими-либо доказательствами и они были опубликованы до появления многочисленных сообщений о случаях легочной токсичности, индуцированной рапамицином, при его широком применении в качестве иммунодепрессанта при трансплантации и в качестве ингибитора клеточной пролиферации при лечении рака, о чем свидетельствуют приведенные выше сообщения.

[13] В патентном документе WO 2011/163600 описан аэрозольный препарат такролимуса, который, так же как рапамицин, представляет собой макролидный лактон. Но такролимус имеют химическую структуру, отличающуюся от сиролимуса, и молекулярной мишенью для такролимуса является кальцинейрин, а не mTOR, и в отличие от рапамицина, такролимус не проявляет легочной токсичности и, по факту, он предназначен для предотвращения отторжения после трансплантации легкого.

[14] Ввиду широко распространенного признания того факта, что использование рапамицина может оказывать легочную токсичность, применение фармацевтической композиции, содержащей рапамицин, для доставки в легкие в качестве варианта способа лечения людей не считалась возможным.

[15] Доставка лекарственных средств в легкие путем ингаляции является важным способом лечения целого ряда болезненных состояний, в том числе таких общих местных болезненных состояний, как муковисцидоз, пневмония, бронхиальная астма и хроническая обструктивная болезнь легких, некоторых системных болезненных состояний, включающих гормональную заместительную терапию, обезболивание, иммунодефицит, эритропоэз, диабет, рак легких и других подобных состояний. Смотрите обзор Yi et al. J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv. 23:181-7 (2010). Лекарственные средства, применяемые для лечения рака легких путем ингаляции, включают цисплатин, карбоплатин, таксаны и антрациклины. Смотрите, например, патенты США № 6419900, № 6419901, № 6451784, № 6793912 и публикации заявок на патент США № 2003/0059375 и № 2004/0039047. Кроме того, для лечения легочных метастазов были предложены доксорубицин и темозоломид, вводимые путем ингаляции. Смотрите, например, патент США № 7288243 и публикацию заявки на патент США № 2008/0008662.

[16] Существует необходимость в фармацевтических композициях рапамицина, его пролекарств, производных и аналогов, которые позволяли бы безопасно доставлять

их непосредственно в легкие, предпочтительно путем ингаляции, для создания более эффективной лекарственной формы для лечения и предотвращения заболеваний и нарушений, связанных с сигнальным путем TOR, которая бы позволяла уменьшить или исключить токсичность и неблагоприятные побочные эффекты, свойственные для пероральных лекарственных форм рапамицина.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[17] Фигура 1: LC-MS/MS хроматограмма (хроматограмма, полученная методом жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией) 10,6 нг/мл рапамицина (верхняя часть фигуры) и внутреннего стандарта (нижняя часть фигуры) в крови мыши.

[18] Фигура 2: Типичные хроматограммы 10,6 нг/мл рапамицина (верхняя часть фигуры) и внутреннего стандарта (нижняя часть фигуры) в гомогенате мышинного легкого.

[19] Фигура 3: Калибровочная кривая для определения рапамицина в крови мыши.

[20] Фигура 4: Калибровочная кривая для определения рапамицина в гомогенате мышинного легкого.

[21] Фигура 5: Типичные хроматограммы рапамицина (верхняя часть фигуры) и внутреннего стандарта (нижняя часть фигуры) в крови мыши 2-07, которой вводили рапамицин путем распыления через ротолотку (OPA).

[22] Фигура 6: Типичные хроматограммы рапамицина (верхняя часть фигуры) и внутреннего стандарта (нижняя часть фигуры) в гомогенате легкого мыши 2-07, которой вводили рапамицин путем распыления через ротолотку (OPA).

[23] Фигура 7: Ингибирование рапамицином роста TSC2 мутантных клеток (нижняя часть фигуры) и S6 фосфорилирования (верхняя часть фигуры).

[24] Фигуры 8A и B: S6 фосфорилирование в мышинном легком после (A) введения рапамицина путем распыления через ротолотку и перорально и после (B) введения путем ингаляции.

[25] Фигура 9: Ожидаемые концентрации рапамицина в крови при многократном в течении времени ингаляционном введении один раз в сутки.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[26] Настоящее изобретение основано, помимо всего прочего, на разработке безопасной и эффективной аэрозольной лекарственной формы композиции рапамицина, которая позволяет доставлять количества композиции рапамицина в ткани-мишени, которые являются эффективными для проявления высокой биологической активности в этих тканях-мишенях, минимизируя при этом связанную с рапамицином токсичность.

Кроме того, в изобретении используется открытие поразительной фармакокинетики композиции рапамицина, приготовленной как описано выше. Как обсуждается более подробно ниже, композиция рапамицина, доставляемая непосредственно в легкие, создавала значительно более высокие концентрации лекарственного средства в ткани легких. Количество лекарственного средства в ткани легких было более высоким, чем можно было ожидать на основе проведенных ранее исследований по пероральному и внутривенному введению. И удивительно, что даже относительно высокие количества рапамицина, доставляемые непосредственно в легкие, не проявляли токсичности в отношении легочной ткани. Более того, продемонстрировано, что количество лекарственного средства в легочной ткани, достигаемое с помощью описанных в изобретении способов, является эффективным для проявления высокой биологической активности, включающей ингибирование клеточного роста и жизнеспособности, а также ингибирование S6 фосфорилирования в ткани-мишени. Эта биологическая активность указывает на то, что доставляемая доза композиции рапамицина с помощью

заявленных способов является достаточной для ингибирования сигнального пути mTOR в тканях-мишенях. Таким образом, эти результаты демонстрируют способность описанных в изобретении аэрозольных лекарственных форм доставлять низкую, но терапевтически эффективную, дозу рапамицина, обеспечивая при этом очень низкое системное воздействие лекарственного средства при высокой эффективности. В результате значительно повышается терапевтический индекс для рапамицина при его введении по настоящему изобретению.

[27] Настоящее изобретение предлагает аэрозольные лекарственные формы композиции рапамицина для доставки непосредственно в легкие. В этом контексте, термин "аэрозольная лекарственная форма" может относиться к водной композиции, сухой порошковой композиции или композиции на основе пропеллента, описанным более подробно ниже. Аэрозольная лекарственная форма по изобретению может быть доставлена субъекту различными способами, например, назально или перорально, например, путем ингаляции. Используемый в изобретении термин "композиция рапамицина" может относиться к рапамицину как таковому, предпочтительно, в аморфной форме, называемой сиролимусом, или к его пролекарству или производному. В одном варианте осуществления, композиция рапамицина по изобретению обеспечивает количество рапамицина, которое является эффективным для ингибирования mTOR сигнального пути в ткани-мишени при низкой токсичности или ее отсутствии в отношении ткани, и одновременно низкие уровни рапамицина в крови, которые составляют менее чем приблизительно 1 нг/мл.

[28] Предполагается, что композиции по изобретению обеспечивают улучшенный профиль безопасности, особенно при их постоянном или длительном применении, по сравнению с современными лекарственными формами рапамицина, которые дают в результате устойчивые концентрации в крови в диапазоне от 1 нг/мл до 15 нг/мл. Это предположение основано на низкой легочной токсичности композиций по настоящему изобретению в сочетании с возможным полным отсутствием побочных эффектов или существенно меньшей частотой их возникновения в результате системного воздействия рапамицина, что связано с низкими продуцируемыми уровнями рапамицина в крови. Соответственно, предполагается, что композиции по изобретению характеризуются значительно более высоким терапевтическим индексом по сравнению с существующими лекарственными формами, вводимыми через желудочно-кишечный тракт или внутривенно.

[29] В одном варианте осуществления, композиция рапамицина по изобретению обеспечивает улучшенный профиль безопасности, о чем свидетельствует более высокий терапевтический индекс, особенно при ее постоянном или длительном применении, по сравнению с другими лекарственными формами рапамицина, например, пероральными или внутривенными лекарственными формами.

[30] Настоящее изобретение относится к композициям и способам для лечения и предотвращения легочной артериальной гипертензии (РАН), используя фармацевтическую композицию, включающую рапамицин, предназначенную для введения в легкие, предпочтительно, путем ингаляции. В одном варианте осуществления, изобретение предлагает способ лечения и предотвращения легочной артериальной гипертензии у человека, который нуждается в таком лечении, где способ включает введение субъекту аэрозольной лекарственной формы, содержащей описанную в изобретении композицию рапамицина. В одном варианте осуществления, настоящее изобретение предлагает композиции и способы для лечения и предотвращения легочной артериальной гипертензии путем введения один раз в сутки человеку, который в этом

нуждается, аэрозольной лекарственной формы, содержащей композицию рапамицина в количестве, эффективном для достижения максимального уровня композиции рапамицина в крови от приблизительно 0,25 до 0,75 нг/мл и остаточной концентрации в крови от приблизительно 0,075 до 0,25 нг/мл. В одном варианте осуществления, максимальный уровень в крови составляет приблизительно 0,5 нг/мл, остаточная концентрация в крови составляет приблизительно 0,1 нг/мл, и количество композиции рапамицина в лекарственной форме составляет от приблизительно 25 до 100 микрограмм, или 50 микрограмм, при введении один раз в сутки.

[31] Аэрозольные лекарственные формы по изобретению могут быть приготовлены только на основе композиции рапамицина или на основе ее комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими средствами в одной и той же лекарственной форме. Кроме того, аэрозольные лекарственные формы по изобретению могут быть введены отдельно или в комбинации с одним или более дополнительными лекарственными средствами, каждое из которых вводится или одним и тем же способом, или отличающимся способом, например, перорально, внутривенно и другими способами. В одном варианте осуществления, аэрозольные лекарственные формы по изобретению могут быть введены в комбинации с одной или более дополнительными схемами лечения легочной артериальной гипертензии.

[32] В одном варианте осуществления, настоящее изобретение предлагает аэрозольную лекарственную форму, включающую композицию рапамицина, которая является эффективной для достижения терапевтического уровня композиции в ткани-мишени. В одном варианте осуществления, ткань-мишень представляет собой легкое. В одном варианте осуществления, терапевтический уровень определяют через 12 или 24 часа после введения, предпочтительно, через 24 часа после введения. В одном варианте осуществления, терапевтический уровень сохраняется в течение, по меньшей мере, 24 часов после введения. В одном варианте осуществления, отношение концентрации композиции в легком к концентрации композиции в крови через 24 часа после введения составляет приблизительно от 5 до 50 или приблизительно от 10 до 30.

[33] В одном варианте осуществления, количество композиции рапамицина в аэрозольной лекарственной форме составляет от 5 до 500 микрограмм, от 10 до 250 микрограмм, от 15 до 150 микрограмм или от 20 до 100 микрограмм. В одном варианте осуществления, количество композиции рапамицина в аэрозольной лекарственной форме составляет 20, 40, 50, 100, 125 или 250 микрограмм.

[34] В одном варианте осуществления, композиция рапамицина представляет собой сиролimus. В одном варианте осуществления, композицию рапамицина выбирают из группы, состоящей из эверолимуса, темсиролимуса, ридафоролимуса, умиролимуса и зотаролимуса.

[35] В одном варианте осуществления, композиция рапамицина представляет собой сиролimus и имеет изомерное В:С отношение более чем 30:1 или более чем 35:1. В одном варианте осуществления, композиция рапамицина имеет изомерное В:С отношение от 3,5% до 10%.

[36] В одном варианте осуществления, на стадии введения композиции субъекту формируют содержащие рапамицин частицы, имеющие среднюю величину диаметра в диапазоне от 0,1 до 10 микрон. В одном варианте осуществления, на стадии введения композиции субъекту формируют содержащие рапамицин частицы, имеющие среднюю величину диаметра в диапазоне от 0,5 до 6 микрон.

[37] В одном варианте осуществления, способ дополнительно включает одну или более дополнительных терапий или схем лечения.

[38] В одном варианте осуществления, аэрозольная лекарственная форма по изобретению предназначена для введения один раз в сутки и, в соответствии с описанными в изобретении способами, аэрозольную лекарственную форму вводят один раз в сутки.

5 [39] В одном варианте осуществления, аэрозольная лекарственная форма представляет собой сухую порошкообразную композицию, подходящую для доставки путем ингаляции. В одном варианте осуществления, сухой порошок включает композицию рапамицина в форме микрочастиц (то есть, микрочастиц рапамицина), частицы носителя и одно или более необязательных вспомогательных веществ. В одном варианте
10 осуществления, микрочастицы состоят из частиц лекарственного средства, имеющих средний диаметр приблизительно от 0,1 до 10 микрон или приблизительно от 1 до 5 микрон. В одном варианте осуществления, частицы имеют средний диаметр приблизительно от 1,5 до 4 микрон, приблизительно от 1,5 до 3,5 микрон или приблизительно от 2 до 3 микрон. Носитель может быть выбран из группы, состоящей
15 из арабинозы, глюкозы, фруктозы, рибозы, маннозы, сахарозы, трегалозы, лактозы, мальтозы, крахмалов, декстрана, маннита, лизина, лейцина, изолейцина, дипальмитилфосфатидилхолина, лецитина, полимолочной кислоты, сополимера молочной и глутаминовой кислот и ксилита и смеси из любых упомянутых выше веществ. В одном варианте осуществления, носитель включает или состоит из смеси двух
20 различных носителей. Частицы носителя могут иметь диаметр в диапазоне до 200 микрон, от 30 до 100 микрон или менее чем 10 микрон. В случае, когда носитель состоит из смеси двух различных носителей, каждый носитель состоит из частиц с различным гранулометрическим составом, выражаемым через средний диаметр частиц. В одном варианте осуществления, носитель состоит из смеси двух различных носителей, первого
25 носителя и второго носителя. Первый носитель состоит из частиц, имеющих диаметр в диапазоне приблизительно от 30-100 микрон, и второй носитель состоит из частиц, имеющих диаметр менее чем 10 микрон. Соотношение двух различных носителей составляет от 3:97 до 97:3. В одном варианте осуществления, соотношение двух различных носителей составляет от 97:3 или от 95-98:2-5. В одном варианте
30 осуществления, носитель состоит из смеси двух различных носителей из лактозы. Отношение лекарственного средства к носителю в порошке может составлять от 0,5% до 2% (по массе). В одном варианте осуществления, отношение лекарственного средства к носителю в порошке составляет 1% (по массе).

[40] Количество композиции рапамицина в аэрозольной лекарственной форме
35 составляет приблизительно от 0,1% до 20% (по массе) в расчете на суммарную массу композиции. В одном варианте осуществления, количество составляет приблизительно от 0,25% до 2% (по массе).

[41] В одном варианте осуществления, в композиции присутствует одно или более необязательных вспомогательных веществ, и их выбирают из фосфолипида и соли
40 металла и жирной кислоты, и из смесей упомянутых выше веществ. В одном варианте осуществления, фосфолипид выбирают из дипальмитилфосфатидилхолина и лецитина. В одном варианте осуществления, соль металла и жирной кислоты представляет собой стеарат магния. В одном варианте осуществления, вспомогательные вещества или
45 вспомогательные вещества наносят в виде слоя на частицы носителя при массовом отношении вспомогательного вещества к крупной частице носителя в диапазоне от 0,01 до 0,5%.

[42] В одном варианте осуществления, количество композиции рапамицина в аэрозольной лекарственной форме представляет собой количество, которое является

эффективным для ингибирования биологической активности mTORC1. В одном варианте осуществления, количество представляет собой количество, которое является эффективным для ингибирования фосфорилирования S6K белка.

[43] В одном варианте осуществления, количество композиции рапамицина в аэрозольной лекарственной форме представляет собой количество, которое является эффективным для достижения доставляемой в легкие вдыхаемой дозы от 5 до 500 микрограмм. В одном варианте осуществления, вдыхаемая доза составляет приблизительно 5, приблизительно 20, приблизительно 50, приблизительно 100 или приблизительно 250 микрограмм. В одном варианте осуществления, вдыхаемая доза составляет приблизительно 20 микрограмм, приблизительно до 50 микрограмм или приблизительно 100 микрограмм. В одном варианте осуществления, количество представляет собой количество, которое является эффективным для создания концентрации композиции рапамицина в легочной ткани от 1 нг/г до 1 микрограмм (мкг)/г. В одном варианте осуществления, концентрация композиции рапамицина в легочной ткани составляет приблизительно от 5-30 нг/г. В одном варианте осуществления, концентрация в легочной ткани составляет приблизительно 5 нг/г, приблизительно 10 нг/г, приблизительно 15 нг/г, приблизительно 20 нг/г, приблизительно 25 нг/г, приблизительно 30 нг/г, приблизительно 50 нг/г, приблизительно 60 нг/г, приблизительно 100 нг/г или приблизительно 200 нг/г. В соответствии с упомянутыми выше вариантами осуществления, одновременный уровень композиции рапамицина в крови составляет менее чем 5 нг/мл, менее чем 2 нг/мл, менее чем 1 нг/мл, менее чем 0,5 нг/мл или менее чем 0,25 нг/мл.

[44] В одном варианте осуществления, композиция рапамицина поддерживается в легком на терапевтических уровнях приблизительно 1 нг/г, приблизительно 5 нг/г, приблизительно 10 нг/г, приблизительно 15 нг/г, приблизительно 20 нг/г, приблизительно 25 нг/г, приблизительно 50 нг/г или приблизительно 100 нг/г в течение периода времени после введения, предпочтительно, человеку, где период времени выбирают приблизительно от 6 до 10 часов, приблизительно от 6 до 14 часов, приблизительно от 6 до 24 часов и приблизительно от 6 до 72 часов. В одном варианте осуществления, период времени выбирают приблизительно 12 часов, приблизительно 14 часов, приблизительно 24 часа и приблизительно 72 часа.

[45] В одном варианте осуществления, композиция рапамицина поддерживается в легком на терапевтических уровнях приблизительно от 5 до 100 нг/г или приблизительно от 5 до 30 нг/г в течение периода времени, который составляет приблизительно 12 или 24 часа. В одном варианте осуществления, композиция рапамицина поддерживается в легком на терапевтических уровнях приблизительно 5 нг/г, приблизительно 10 нг/г, приблизительно 20 нг/г, приблизительно 30 нг/г, приблизительно 50 нг/г, приблизительно 60 нг/г, приблизительно 70 нг/г, приблизительно 80 нг/г или приблизительно 90 нг/г. В одном варианте осуществления, композиция рапамицина поддерживается в легком на терапевтических уровнях, по меньшей мере, 5 нг/г, по меньшей мере, 20 нг/г, или, по меньшей мере, 30 нг/г. В одном варианте осуществления, композиция рапамицина поддерживается в легком на терапевтических уровнях от приблизительно 20 нг/г до приблизительно 30 нг/г или от приблизительно 50 нг/г до приблизительно 80 нг/г.

[46] В одном варианте осуществления, лекарственная форма имеет фракцию тонкодисперсных частиц (FPF) более чем 20% с соответствующей дозой тонкодисперсных частиц (FPD) в диапазоне от 5 микрограмм до 2 миллиграмм, предпочтительно, менее чем 0,5 миллиграмм, после хранения в течение от 1 до 12 месяцев или от 1 до 36 месяцев. В одном варианте осуществления, вдыхаемая доза, которая представляет собой дозу,

доставляемую в легкое, называемая также доставляемой дозой (DD) или испускаемой дозой (ED), изменяется в диапазоне от 10 микрограмм до 2,5 миллиграмм, предпочтительно, менее 0,5 миллиграмм. В одном варианте осуществления, доставляемая доза составляет приблизительно от 20 до 100 микрограмм, приблизительно, от 10 до 25 микрограмм или приблизительно от 30 до 60 микрограмм. В одном варианте осуществления, доставляемая доза составляет 20 или 50 микрограмм. В одном варианте осуществления, доставляемая доза составляет 100 микрограмм.

[47] В одном варианте осуществления, вдыхаемая доза композиции рапамицина составляет приблизительно 20 микрограмм, концентрация лекарственного средства в легочной ткани составляет приблизительно от 5 до 25 нг/г, максимально достигаемая концентрация C_{max} в крови составляет менее чем 1,0 нг/мл или приблизительно от 0,50 нг/мл до 1,0 нг/мл, или приблизительно от 0,50 нг/мл до 0,90 нг/мл, остаточная концентрация в крови лекарственного средства через 24 часа после дозирования составляет менее чем приблизительно 0,20 нг/мл, и стабильная равновесная концентрация лекарственного средства в крови через 14 дней после дозирования составляет менее чем приблизительно 0,90 нг/мл или составляет менее чем приблизительно 0,80 нг/мл.

[48] В одном варианте осуществления, вдыхаемая доза композиции рапамицина составляет приблизительно 50 микрограмм, концентрация лекарственного средства в легочной ткани составляет приблизительно от 2 до 15 нг/г, C_{max} в крови составляет менее чем 2,0 нг/мл или приблизительно от 0,25 нг/мл до 0,1 нг/мл, или приблизительно от 0,10 нг/мл до 0,5 нг/мл, остаточная концентрация в крови лекарственного средства после однократного дозирования через 24 часа после введения дозы составляет менее чем приблизительно 0,10 нг/мл, и остаточная концентрация в крови лекарственного средства после 5 дней ежедневного введения один раз в сутки составляет менее чем приблизительно 1,0 нг/мл, или составляет менее чем приблизительно 0,50 нг/мл. В одном варианте осуществления, лекарственная форма предназначена для введения один раз в сутки.

[49] В одном варианте осуществления, лекарственная форма дополнительно включает одно или более дополнительных терапевтических средств.

[50] Изобретение также предлагает применение композиций по изобретению для лечения и профилактики легочной артериальной гипертензии у человека, который нуждается в таком лечении. В одном варианте осуществления, изобретение предлагает способ лечения и профилактики легочной артериальной гипертензии у человека, который нуждается в таком лечении или профилактике, где способ включает введение субъекте путем ингаляции описанной в изобретении композиции или лекарственной формы с однократной дозировкой.

[51] В одном варианте осуществления, композиция доставляет количество лекарственного средства, которое является эффективным для улучшения функции легких субъекта, измеряемой по форсированной жизненной емкости (FVC) и объему форсированного выдоха (FEV1).

[52] Изобретение также предлагает лекарственную форму с однократной дозировкой, включающую аэрозольную лекарственную форму, содержащую описанную в изобретении композицию рапамицина, где количество композиции рапамицина составляет приблизительно от 5 до 2500 микрограмм, от 20 до 500 микрограмм или от 50 до 250 микрограмм. В одном варианте осуществления, количество композиции рапамицина составляет приблизительно от 50 до 125 микрограмм. В одном варианте осуществления, количество композиции рапамицина составляет приблизительно 40, приблизительно 50, приблизительно 100, приблизительно 125 или приблизительно 250

микрограмм. В одном варианте осуществления, количество композиции рапамицина составляет приблизительно 250 микрограмм.

[53] В одном варианте осуществления, лекарственная форма с однократной дозировкой представляет собой капсулу, подходящую для применения в порошковом ингаляторе. В одном варианте осуществления, капсула содержит от 1 мг до 100 мг порошка (суммарное количество, включающее композицию рапамицина, носитель и любое необязательное вспомогательные вещества) или 10 мг или 40 мг порошка. Капсула может представлять собой желатиновую, пластмассовую или целлюлозную капсулу или находиться в форме блистера из алюминиевой фольги или блистера из алюминиевой фольги и пластика для применение в порошковом ингаляторе.

[54] Изобретение также предлагает упаковку или набор лекарственного средства, включающие описанные в изобретении композицию или лекарственную форму с однократной дозировкой и инструкции по применению.

[55] В одном варианте осуществления, лекарственную форму получают методом влажного полирования, включающим стадии приготовления водной суспензии лекарственного средства, микрофлюидизации суспензии лекарственного средства и распылительной сушки полученных частиц с получением сухого порошка.

[56] В одном варианте осуществления, композиция рапамицина представляет собой сиролimus, носитель состоит из смеси двух различных лактозных носителей, первый носитель состоит их частиц, имеющих средний диаметр в диапазоне приблизительно 30-100 микрон, и второй носитель состоит их частиц, имеющих средний диаметр менее чем 10 микрон, отношение двух различных носителей составляет приблизительно от 97:3 до 3:97, и количество рапамицина составляет от 25 до 1400 микрограмм.

[57] Изобретение также предлагает устройство для доставки сухого порошка, включающее резервуар, содержащий описанные в изобретении композицию или лекарственную форму с однократной дозировкой. Резервуар может представлять собой встроенную в устройство камеру, капсулу или блистер. В одном варианте осуществления, устройство выбирают из ингаляторов Plastiapе® RS01 Model 7, Plastiapе® RS00 Model 8, XCaps®, Handihaler®, Flowcaps® TwinCaps® и Aerolizer®. В одном варианте осуществления, устройство выбирают из ингаляторов Plastiapе® RS01 Model 7 или Plastiapе® RS00 Model 8. В одном варианте осуществления, устройство представляет собой ингалятор Plastiapе® RS00 Model 8.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[58] Настоящее изобретение предлагает способы и композиции для лечения и профилактики легочной артериальной гипертензии у человека, который нуждается в таком лечении. Человек, который нуждается в таком лечении, представляет собой человека, у которого была диагностирована легочная артериальная гипертензия. В одном варианте осуществления, способы включают введение субъекту путем ингаляции композиции, включающей рапамицин в подходящем носителе и необязательно одну или более добавок. Применяемый на протяжении всего изобретения общий термин "рапамицин" относится к рапамицину как таковому, также относится к сиролimusу, а также к его пролекарствам (таким как темсиролimus) и производным. Производные рапамицина включают соединения, которые структурно аналогичны рапамицину, относятся к этому же химическому классу, являются аналогами рапамицина или являются фармацевтически приемлемыми солями рапамицина или его производных. В следующем разделе приводятся дополнительное описание и примеры рапамицина, его пролекарств и производных.

[59] Описанные в изобретении композиции называют "аэрозольными лекарственными

формами" и подразумевается, что они описывают способные к распылению композиции, подходящие для получения вдыхаемых частиц или капель, содержащих композицию рапамицина, которая описана выше для рапамицина как такового, предпочтительно, в аморфной форме, описанной в виде сиролимуса, или его пролекарства или производного. В одном варианте осуществления, композицию рапамицина выбирают из сиролимуса, эверолимуса и темсиролимуса. В одном варианте осуществления, композиция рапамицина представляет собой сиролимус. Описанные в изобретении аэрозольные лекарственные формы могут включать композицию рапамицина, носитель и необязательно одну или более добавок. Аэрозольные лекарственные формы могут находиться в форме водного раствора, сухого порошка или смеси одного или более фармацевтически приемлемых пропеллентов и носителя, как описано более подробно ниже в разделе, озаглавленном "Композиции для ингаляции".

[60] Настоящее изобретение также предлагает способы лечения и профилактики легочной артериальной гипертензии у человека, который нуждается в таком лечении, где способы включают стадию ингаляционного введения аэрозольной лекарственной формы по изобретению субъекту. В одном варианте осуществления, вводимая доза композиции является достаточной для достижения терапевтических уровней композиции рапамицина в легочной ткани, поддерживая при этом ее низкий уровень в крови или остаточный уровень в крови, у субъекта. Например, терапевтические уровни композиции рапамицина могут составлять приблизительно 1 нг/г, приблизительно 5 нг/г, приблизительно 10 нг/г, приблизительно 15 нг/г, приблизительно 20 нг/г, приблизительно 25 нг/г, приблизительно 50 нг/г, и остаточный уровень в крови составляет от 0,01 до 0,15 нг/мл, от 0,075 до 0,350 нг/мл, от 0,150 до 0,750 нг/мл, от 0,750 до 1,5 нг/мл или от 1,5 до 5 нг/мл. В одном варианте осуществления, вводимая доза является достаточной для достижения терапевтического уровня композиции рапамицина в легких приблизительно от 5 нг/г до 50 нг/г или приблизительно от 5 нг/г до 20 нг/г, и остаточного уровня в крови композиции рапамицина менее чем 5 нг/мл, менее чем 2 нг/мл, менее чем 1 нг/мл или менее чем 0,5 нг/мл.

[61] Предпочтительно, чтобы упомянутые выше терапевтические уровни достигались путем введения описанной в изобретении аэрозольной лекарственной формы один раз в сутки. В одном варианте осуществления, суммарная суточная доза композиции рапамицина находится в диапазоне от 5 до 100 микрограмм, от 20 до 250 микрограмм, от 50 до 500 микрограмм (от 0,05 до 0,5 миллиграмм), от 250 до 1000 микрограмм (от 0,25 до 1 миллиграмм) или от 500 до 2000 микрограмм (от 0,5 до 2 миллиграмм). В одном варианте осуществления, суммарная суточная доза составляет менее чем 500 микрограмм, менее чем 100 микрограмм, менее чем 50 микрограмм, менее чем 20 микрограмм или менее чем 10 микрограмм. В одном варианте осуществления, суммарная суточная доза составляет менее чем 500 микрограмм, менее чем 250 микрограмм, менее чем 100 микрограмм, менее чем 50 микрограмм или менее чем 10 микрограмм. В одном варианте осуществления, суммарная суточная доза, вводимая субъекту, составляет менее чем 0,5 мг или менее чем 0,25 мг в сутки. Дополнительные аспекты ингаляционного введения и дозирования, в том числе комбинированных терапий, описаны в разделе ниже, озаглавленном "Ингаляционное введение и дозирование".

[62] В одном варианте осуществления, способы по изобретению включают введение рапамицина путем ингаляции в комбинации с одним или более дополнительными лекарственными средствами. В одном варианте осуществления, одно или более дополнительных лекарственных средств выбирают из простаноида, ингибитора фосфодиэстеразы или антагониста эндотелина. В одном варианте осуществления,

простаноид выбирают из группы, состоящей из простагландина, тромбксана и простаглицина. Одно или более дополнительных средств могут быть введены таким же способом введения как и композиция рапамицина, или разными способами введения. Например, дополнительное лекарственное средство может быть введено ингаляционно, интраназально, перорально или внутривенно.

[63] Способы и композиции по изобретению являются эффективными для лечения легочной артериальной гипертензии у субъекта, для которого является необходимым такое лечение, предпочтительно, у человека. Используемое в изобретении эффективное количество композиции по изобретению относится к количеству, которое является достаточным для уменьшения или облегчения прогрессирования, тяжести и/или продолжительности легочной артериальной гипертензии или одного или более симптомов легочной артериальной гипертензии, для предотвращения прогрессирования легочной артериальной гипертензии, достижения ремиссии легочной артериальной гипертензии, для предотвращения развития или возникновения одного или более симптомов, связанных с легочной артериальной гипертензией, или усиления или улучшения профилактического или терапевтического действия (действий) другой терапии (например, действия профилактического или терапевтического средства) в отношении тяжести или возникновения одного или более симптомов легочной артериальной гипертензии, или в отношении развития или прогрессирования легочной артериальной гипертензии. В конкретных вариантах осуществления, в отношении лечения легочной гипертензии, терапевтически эффективное количество относится к количеству лекарственного средства (например, терапевтического средства), которое ингибирует или уменьшает пролиферацию клеток сосудов, ингибирует или уменьшает пролиферацию клеток гладких мышц, или уменьшает утолщение внутрилегочных сосудов или улучшает FVC или FEV1, или уменьшает количество плеврального экссудата, определяемое с помощью рентгеновского исследования. В предпочтительном варианте осуществления, терапевтически эффективное количество лекарственного средства (например, терапевтического средства) уменьшает пролиферацию клеток сосудов или утолщение внутрилегочных сосудов, по меньшей мере, на 5%, предпочтительно, по меньшей мере, на 10%, по меньшей мере, на 15%, по меньшей мере, на 20%, по меньшей мере, на 25%, по меньшей мере, на 30%, по меньшей мере, на 35%, по меньшей мере, на 40%, по меньшей мере, на 45%, по меньшей мере, на 50%, по меньшей мере, на 55%, по меньшей мере, на 60%, по меньшей мере, на 65%, по меньшей мере, на 70%, по меньшей мере, на 75%, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95% относительно контроля (например, забуференного фосфатом физиологического раствора ("PBS")). Таким образом, применительно к способам по изобретению, термины "лечить" и "лечение" относятся к уменьшению тяжести, продолжительности или прогрессирования легочной артериальной гипертензии или одного или более симптомов, связанных с легочной артериальной гипертензией. В конкретных вариантах осуществления, эти термины могут относиться к ингибированию пролиферации или уменьшению пролиферации клеток гладких мышц, ингибированию или уменьшению утолщения внутрилегочных сосудов, развития или прогрессирования ремоделирования сосудов легких или развития или прогрессирования сердечно-сосудистого заболевания, такого как сердечная недостаточность или утолщение стенки правого желудочка, которое может быть обнаружено на эхокардиограмме или электрокардиограмме.

[64] В одном варианте осуществления способов по изобретению, композицию вводят в дозе, которая является эффективной для улучшения функции легких у субъекта,

измеряемой в форме показателей форсированной жизненной емкости (FVC) и объема форсированного выдоха (FEV1). В другом варианте осуществления, композицию вводят в дозе, которая является эффективной для улучшения градиента давления между правым желудочком и правым предсердием и/или размеров правого и левого желудочков при мониторинге с помощью эхокардиографии.

[65] В конкретных вариантах осуществления, способы включают ингаляционное введение композиции по изобретению в качестве первичной терапии. В других вариантах осуществления, введение композиции по изобретению является вспомогательной терапией. В обоих случаях, способы по изобретению предполагают введение композиции по изобретению в комбинации с одной или более дополнительными терапиями для лечения заболевания или нарушения. Термины "терапия" и "терапии" относятся к любому способу, протоколу и/или лекарственному средству, которые могут быть использованы для предотвращения, лечения, контроля течения или облегчения заболевания или нарушения, или одного или более их симптомов.

[66] Одно или более дополнительных лекарственных средств могут быть введены перед введением композиции по изобретению (например, предварительно за 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель), одновременно или после введения композиции по изобретению (например, через 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель).

[67] В некоторых вариантах осуществления, дополнительное терапевтическое средство приготавливают для совместного введения с композицией по изобретению в лекарственной форме для ингаляционного введения. В других вариантах осуществления, дополнительное терапевтическое средство вводят отдельно от лекарственной формы, которая содержит рапамицин, и таким же, как в случае рапамицина, или отличающимся способом введения. Способы по изобретению также предполагают комбинацию одного или более дополнительных терапевтических средств для введения одновременно, до или после введения лекарственной формы, содержащей рапамицин.

[68] В конкретных вариантах осуществления, способы по изобретению являются эффективными для применения схемы лечения легочной артериальной гипертензии у субъекта, страдающего легочной артериальной гипертензией. В этом контексте, термины "применять схему лечения" и "применение схемы лечения" относятся к положительным эффектам, которые достигаются у субъекта в результате проведения терапии, не приводящей к излечению. В одном варианте осуществления, применяют схему лечения легочной артериальной гипертензии у субъекта, если прогрессирование лечения легочной артериальной гипертензии замедляется или приостанавливается в процессе лечения рапамицином в соответствии со способами по изобретению. В другом варианте осуществления, применяют схему лечения легочной артериальной гипертензии у субъекта, если облегчаются или стабилизируются один или более симптомов, связанных с легочной артериальной гипертензией (то есть, симптом не усугубляется в процессе лечения).

[69] В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые изобретением композиции ингибируют и/или уменьшают аномальную пролиферацию клеток в легочной артерии. В некоторых вариантах осуществления, аномальная пролиферация клеток представляет собой аномальную пролиферацию клеток гладких мышц и эндотелиальных клеток. В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые изобретением композиции

ингибируют и/или уменьшают ангиогенез в легочной артерии. В некоторых вариантах, ангиогенез в легочной артерии ингибируют и/или уменьшают путем подавления продукции матричной металлопротеиназы. В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые изобретением композиции ингибируют и/или уменьшают воспаление в легочной артерии. В некоторых вариантах осуществления, воспаление ингибируют и/или уменьшают путем воздействия на функцию нейтрофилов и Т-клеток.

[70] В некоторых вариантах осуществления, композицию применяют в количестве, которое является достаточным для увеличения базальной активности АКТ, увеличения фосфорилирования АКТ, увеличения активности PI3-киназы, увеличения длительности активации АКТ (например, активации, индуцированной экзогенным IGF-1), ингибирования фосфорилирования серина в IRS-1, ингибирования деградации IRS-1, ингибирования или изменения подклеточной локализации CXCR4, ингибирования секреции VEGF, уменьшения экспрессии циклина D2, уменьшения экспрессии сурвивина, ингибирования IL-6-индуцированного роста клеток множественной миеломы, ингибирования пролиферации клеток, увеличения апоптоза, увеличения ареста клеточного цикла, увеличения расщепления поли(АДФ-рибоза)полимеразы, увеличения расщепления каспазы-8/каспазы-9, изменения или ингибирования сигнальных путей фосфатидилинозитол-3-киназа/АКТ/mTOR и/или циклин D1/ретинобластома, ингибирования ангиогенеза и/или ингибирования образования остеокластов.

[71] В одном варианте осуществления, рапамицин вводят в дозе, которая является эффективной для улучшения одного или более из следующих показателей: кардиопульмонального теста с физической нагрузкой, серийного инвазивного гемодинамического теста, функциональной остаточной емкости легких, VEGF-D в сыворотке крови, качества жизни и функциональной работоспособности, теста на шестиминутную ходьбу и диффузионной емкости легких по оксиду углерода. В одном варианте осуществления, рапамицин, доставляемый путем ингаляции, позволяет достигать его уровней в крови, которые являются эффективными для ограничения утолщения легочных сосудов в легких. В одном варианте осуществления, эффективность вводимой дозы рапамицина определяется по любому одному или более из упомянутых выше показателей.

[72] В одном варианте осуществления, способы по изобретению применяются в отношении субъектов, которые являются "невосприимчивыми" или "резистентными" к применяемой в настоящее время терапии легочной артериальной гипертензии. В этом контексте, термины "невосприимчивый" и "резистентный" относятся к ответной реакции субъекта на проводимую терапию, которую с клинической точки зрения нельзя считать облегчением одного или более симптомов, связанных с легочной артериальной гипертензией. Термины "субъект" и "пациент" используются взаимозаменяемо в этом описании изобретения. Термины относятся к животному, предпочтительно, млекопитающему, в том числе непримату (например, корове, свинье, лошади, кошке, собаке, крысе и мыши) и примату (например, шимпанзе, обезьяне, такой как яванский макак, и человеку), и более предпочтительно, к человеку. В предпочтительном варианте осуществления, субъектом является человек.

[73] Термины "предотвращать" и "предотвращение" относятся к предотвращению повторного проявления, развития, прогрессирования или возникновения одного или более симптомов легочной артериальной гипертензии, которое достигается в результате введения одного или более указанных соединений в соответствии со способами по изобретению или введения комбинации такого соединения и известного терапевтического средства для заболевания или нарушения.

[74] Предпочтительно, чтобы введение композиции в соответствии со способами по изобретению в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими средствами приводило к синергетической ответной реакции у субъекта, страдающего заболеванием или нарушением. В этом контексте, термин "синергетический" относится к способности комбинации обеспечивать большую эффективность, чем сумма эффектов каждого терапевтического средства, оказываемого ими в отдельности. В одном варианте осуществления, синергетический эффект комбинированной терапии с рапамицином в соответствии с изобретением позволяет применять более низкие дозы и/или менее частое введение, по меньшей мере, одного лекарственного средства в комбинации, по сравнению с его дозой и/или частотой введения без использования комбинации. В другом варианте осуществления, синергетический эффект проявляется в предотвращении или уменьшении неблагоприятных или нежелательных побочных эффектов, возникающих при применении любого терапевтического средства, входящего в комбинацию, без использования комбинированной терапии.

[75] Применительно к фармацевтическим композициям по изобретению, "носитель" обозначает, например, жидкий или твердый материал, такой как растворитель, разбавитель, стабилизатор, адъювант, наполнитель, вспомогательное вещество, пропеллент или среда, вместе с которыми приготавливают лекарственную форму рапамицина для доставки. Примеры фармацевтически приемлемых носителей для использования в композициях по изобретению включают, без ограничения, сухие порошкообразные носители, такие как лактоза, манноза, аминокислоты, циклодекстрин, дипальмитилфосфатидилхолин, углеводородные и фторуглеродные пропелленты, сжатые газы, стерильные жидкости, воду, забуференный физиологический раствор, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и другие подобные полиолы), масла, детергенты, суспендирующие средства, углеводы (например, глюкозу, лактозу, сахарозу или декстран), антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту или глутатион), хелатообразующие средства, низкомолекулярные белки или подходящие их смеси. Предпочтительно, в отношении сухих порошковых аэрозольных лекарственных форм рапамицина, чтобы носитель, в случае его использования, выбирали из группы, состоящей из сахара и сахароспирта. В одном варианте осуществления, носитель, в случае его использования, представляет собой лактозу.

[76] Термин "фармацевтически приемлемый" означает разрешение регулирующего органа федерального правительства или правительства штата или внесение в список Фармакопеи США или другие общепризнанные фармакопеи, такие как Европейская фармакопея, применения какого-либо вещества или соединения на животных, и более конкретно, на людях. Одним методом повышения растворимости плохо растворимых в воде или нерастворимых в воде лекарственных средств является образование соли лекарственного средства или получение пролекарства, которое само по себе является более растворимым или которое может быть использовано для образования водорастворимой соли пролекарства. Методы получения солей и фармацевтически приемлемых солевых форм являются хорошо известными и включают, без ограничения, соли кислотных или основных групп, которые могут присутствовать в представляющем интерес лекарственном средстве или пролекарстве. Соединения, которые по своей природе обладают основными свойствами, способны образовывать большое разнообразие солей с различными неорганическими и органическими кислотами. Кислоты, которые могут быть использованы для получения фармацевтически приемлемых солей присоединения кислоты таких соединений с основными свойствами,

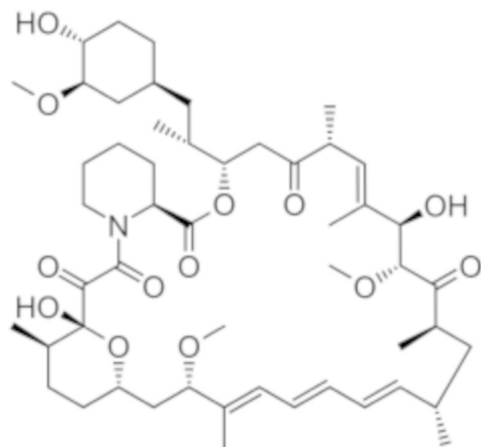
представляют собой кислоты, которые образуют нетоксичные соли присоединения кислоты, то есть, соли, содержащие фармакологически приемлемые анионы, включая, но без ограничения, сернокислые, лимоннокислые, малеиновокислые, уксуснокислые, щавелевокислый, гидрохлоридные, гидробромидные, гидройодидные, нитратные, сульфатные, бисульфатные, фосфатные, кислые фосфатные, изоникотиниатные, ацетатные, лактатные, салицилатные, цитратные, кислые цитратные, тартратные, олеатные, таннатные, пантотенатные, битартратные, аскорбатные, сукцинатные, малеатные, гентизинатные, fumarатные, глюконатные, глюкаронатные, сахаратные, формиатные, бензоатные, глутаматные, метансульфонатные, этансульфонатные, бензолсульфонатные, п-толуолсульфонатные и памоатные (то есть, 1,1'-метилден-бис-(2-гидрокси-3-нафтаатные)) соли. Соединения, которые являются по своей природе кислотными, способны образовывать соли присоединения основания с различными фармакологически приемлемыми катионами. Примеры таких солей включают соли щелочных или щелочноземельных металлов и, в частности, соли кальция, магния, натрия, лития, цинка, калия и железа.

[77] В одном варианте осуществления, в способах и композициях по изобретению используют водорастворимое пролекарство или производное рапамицина, предпочтительно, темсиролимус или родственное соединение. В одном варианте осуществления, в способах и композициях по изобретению используют рапамицин (сиролимус).

Рапамицин

[78] Рапамицин представляет собой макроциклический лактон, продуцируемый бактериями *Streptomyces hygroscopicus*. Его химическим названием по номенклатуре IUPAC является (3S,6R,7E,9R,10R,12R,14S,15E,17E,19E,21S,23S,26R,27R,34aS)-9,10,12,13,14,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-гексадекагидро-9,27-дигидрокси-3-[(1R)-2-[(1S,3R,4R)-4-гидрокси-3-метоксицикло-гексил]-1-метилэтил]-10,21-диметокси-6,8,12,14,20,26-гексаметил-23,27-эпокси-3H-пиридо[2,1-c][1,4]оксаазамакрогентириаконтин-1,5,11,28,29(4H,6H,31H)пентон.

[79] Молекулярной формулой рапамицина является $C_{51}H_{79}NO_{13}$, и его молекулярная масса составляет 914,172 г/моль. Структура рапамицина показана ниже. Известны изомеры рапамицина, например, изомер В и изомер С, имеющие структуры, приведенные в патенте США № 7384953. Обычно, рапамицин представляет собой смесь изомеров В и С. В растворе, происходит взаимопревращение изомеров В и С рапамицина, и между ними устанавливается равновесие. Как правило, в литературе структуру рапамицина изображают в форме изомера В, которая показана ниже.



[80] Рапамицин представляет собой порошок, имеющий цвет от белого до желтовато-

белового, и его считают нерастворимым в воде, так как он имеет очень низкую растворимость порядка 2,6 мкг/мл. Рапамицин хорошо растворим в бензиловом спирте, хлороформе, ацетоне и ацетонитриле. Нерастворимость рапамицина в воде создает специфические технологические трудности при приготовлении его лекарственных форм.

5 Что касается приготовления его пероральной лекарственной формы, то ее получали в виде перорального раствора в форме дисперсии твердого вещества (патентный документ WO 97/03654) и таблеток, содержащих наноразмерные (менее чем 400 нм) частицы (патент США № 5989591). Но эти методы имеют недостаток, обусловленный

10 значительным изменением растворимости активного вещества и, следовательно, его биодоступности. В другом методе приготовления лекарственной формы используют кристаллический порошок. В соответствии с принятыми в данной области методами, превращение кристаллической формы лекарственного средства с низкой растворимостью в его аморфную форму может значительно увеличить его растворимость. Это также справедливо и для рапамицина, но его аморфная форма является чрезвычайно химически

15 нестабильной. Лекарственные формы, включающие аморфный рапамицин (сиролимус), описаны в патентных документах WO 06/039237 и WO 06/094507 (лекарственная форма с модифицированной кинетикой высвобождения, включающая сиरोлимус и глицерилмоностеарат при концентрации 49,25%). Пероральная лекарственная форма рапамицина повышенной стабильности описана в патенте США № 8053444. В

20 композиции лекарственной формы используют эфир жирной кислоты и полимер (например, поливинилпирролидон (PVP), гидроксипропилцеллюлозу (HPC) или гидроксипропилметилцеллюлозу (HPMC)) для повышения стабильности сиरोлимуса без отрицательного воздействия на скорость его высвобождения. Согласно патенту США № 8053444, концентрация эфира жирной кислоты, превышающая 10% по массе,

25 уменьшает скорость высвобождения сиролимуса из лекарственной формы и, поэтому, ее следует избегать, так как это может приводить к неудовлетворительному всасыванию из желудочно-кишечного тракта. Предпочтительная концентрация эфира жирной кислоты (эфира глицерина) составляет от 1% до 5% или от 5% до 9%. В одном варианте осуществления, аэрозольные композиции рапамицина по настоящему изобретению не

30 содержат эфир жирной кислоты в комбинации с полимером. В одном варианте осуществления, аэрозольные композиции рапамицина по настоящему изобретению содержат эфир жирной кислоты при концентрации, превышающей 10% или превышающей 12% по массе в расчете на массу композиции.

[81] Рапамицин и его производные (включая аналоги) и пролекарства, подходящие

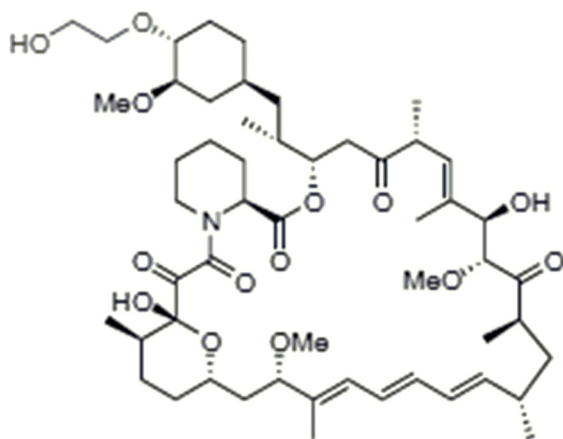
35 для использования в композициях и способах по изобретению, включают рапамицин (сиролимус) и его пролекарства или производные, которые являются ингибиторами клеточного сигнального пути mTOR, и, предпочтительно, ингибиторами mTOR самого по себе. В одном варианте осуществления, производное или пролекарство рапамицина представляет собой ингибитор mTOR, выбранный из группы, состоящей из эверолимуса

40 (афинитора; RAD001), темсиролимуса (CCI-779), ридафоролимуса (ранее называемого дефоролимусом; AP23573), умиролимуса (биолимуса A9), зотаролимуса (ABT-578), новолимуса, миолимуса, AP23841, KU-0063794, INK-128, EX2044, EX3855, EX7518, AZD08055 и OSI027. Специалистам в этой области хорошо известны и другие производные, которые включают, например, О-замещенное производное, в котором

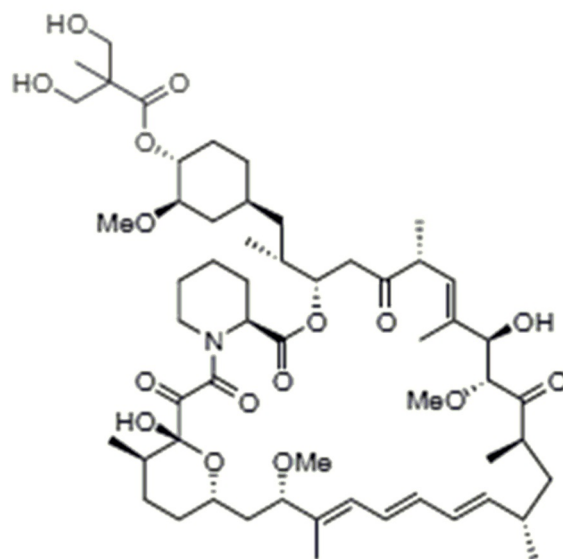
45 гидроксильная группа на циклогексильном кольце сиरोлимуса замещена на -OR₁, где R₁ необязательно представляет собой замещенный алкил, ациламиноалкил или аминокалкил.

[82] В одном варианте осуществления, соединение для использования в аэрозольных

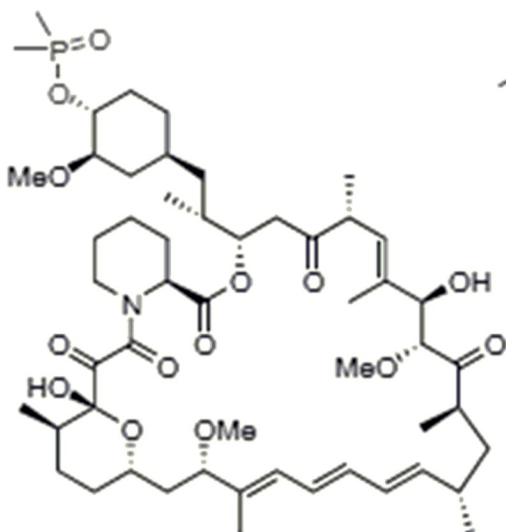
лекарственных формах и способах по изобретению представляет собой производное (аналог) рапамицина, выбранное из группы, состоящей из аналогов эверолимуса, темсиролимуса, ридафоролимуса, умиролимуса и зотаролимуса. Химические структуры аналогов рапамицина - эверолимуса, темсиролимуса, ридафоролимуса, умиролимуса и зотаролимуса показаны ниже.



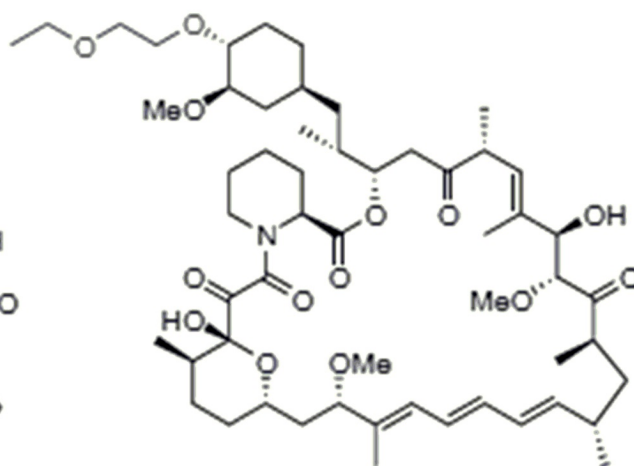
Эверолимус (афинитор)



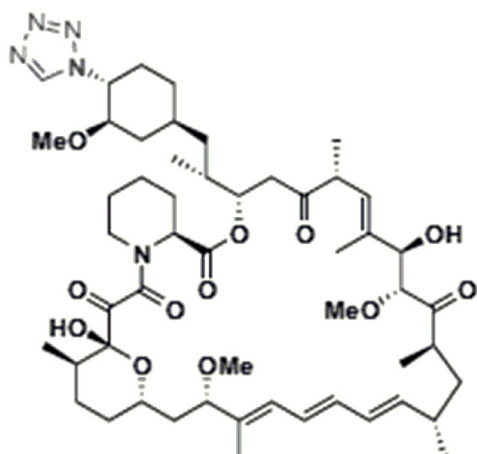
Темсиролимус (CCI-779)



Ридафоролимус (МК-8669)

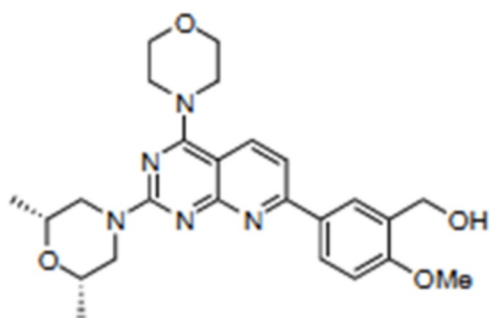


Умиролимус

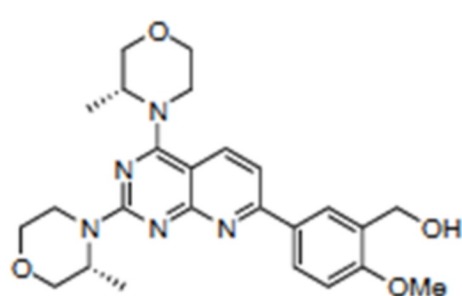


Зотаролимус (ABT-578)

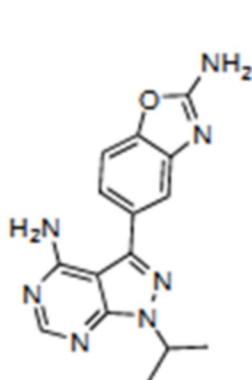
[83] В одном варианте осуществления, соединение для использования в аэрозольных лекарственных формах и способах по изобретению представляет собой ингибитор mTOR, выбранный из группы, состоящей из KU-0063794, AZD8055, INK128 и OSI-027. Химические структуры ингибиторов mTOR - KU-0063794, AZD8055, INK128 и OSI-027 показаны ниже.



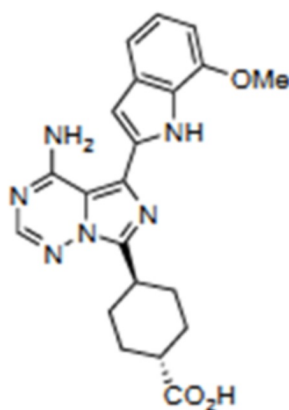
KU-0063794



AZD8055



INK128



OSI-027

[84] Особенно предпочтительными для использования в способах и композициях по изобретению являются сиролимус, темсиролимус и эверолимус. В одном варианте осуществления, соединение для использования в аэрозольных лекарственных формах

и способах по изобретению выбирают из группы, состоящей из сиролимуса, темсиролимуса и эверолимуса. В одном варианте осуществления, соединение является сиролимусом или эверолимусом.

Композиции для ингаляции

5 [85] Изобретение предлагает фармацевтические композиции, предназначенные для введения путем ингаляции, которые включают рапамицин или его пролекарство или производное, в форме водного раствора, сухого порошка или смеси одного или более фармацевтически приемлемых пропеллентов и носителя. В одном варианте осуществления, рапамицин инкапсулируют в фармацевтически приемлемый компаунд, материал или матрицу. В одном варианте осуществления, рапамицин инкапсулируют в липосомальную лекарственную форму или нелипосомальную лекарственную форму.

10 [86] Композиции по изобретению представляют собой аэрозольные лекарственные формы рапамицина, применяемые для доставки лекарственного средства в легкие человека путем ингаляции аэрозоля. Термин "аэрозоль" используют в этом контексте для обозначения коллоидной системы, в которой диспергированная фаза состоит из или из твердых, или из жидких частиц, и в которой диспергирующей средой является газ. В одном варианте осуществления, газ представляет собой воздух, и лекарственная форма представляет собой жидкую лекарственную форму, подходящую для введения с помощью небулайзера, или сухую порошкообразную лекарственную формулу, 15 подходящую для введения с помощью порошкового ингалятора. Обычно, вдыхаемые частицы или капли могут иметь средний диаметр в диапазоне от 0,10 до 10 микрон. Размер частиц или капель выбирают с целью достижения максимальной целенаправленной доставки или в сами легкие (то есть, туда, где легкие являются тканью-мишенью), или системно (когда легкие используют в качестве альтернативного способа для системного введения). Предпочтительно, чтобы размер находился в диапазоне от 0,5 до 5 микрон в случае, когда сами легкие являются терапевтической мишенью, или менее чем 3 микрона при системной доставке через легкое. Размер определяют хорошо известными методами, описанными, например, в Фармакопее США в главах 905 и 601. Например, размер определяют как масс-медианный аэродинамический диаметр (MMAD). 25 В одном варианте осуществления, средний размер или средний диаметр частиц, входящих в описанные в изобретении композиции, измеряют как MMAD.

[87] В одном варианте осуществления, диспергируемая фаза аэрозоля состоит из жидких частиц или капель. В этом контексте, термины "жидкие частицы" и "капли" используются взаимозаменяемо. В этом варианте осуществления, лекарственная форма по изобретению представляет собой раствор. В одном варианте осуществления, диспергируемая фаза аэрозоля состоит из твердых частиц. В этом варианте осуществления, лекарственная форма по изобретению представляет собой сухой порошок. Тонкодисперсные частицы этого размера могут быть получены хорошо известными методами, например, механическим измельчением (помолом), осаждением 35 из субкритических или сверхкритических растворов, распылительной сушкой, сублимационной сушкой или лиофилизацией.

[88] Обычно, вдыхаемые частицы подвержены оседанию по одному из двух механизмов: столкновение, которое обычно преобладает в случае более крупных частиц, и осаждение, которое превалирует в случае более мелких частиц. Столкновение возникает в случае, когда движущая сила вдыхаемой частицы составляет достаточно большую величину, в силу чего частица не следует за потоком воздуха и наталкивается на физиологическую поверхность. В отличие от этого, осаждение происходит главным образом глубоко в легких, когда очень мелкие частицы, которые перемещались с 45

вдыхаемым потоком воздуха, наталкиваются на физиологические поверхности в результате беспорядочной диффузии внутри воздушного потока. Для достижения требуемой терапевтической эффективности, предпочтительно, чтобы аэрозольные лекарственные формы по изобретению позволяли бы достигать их максимального оседания или в результате столкновения (в верхних дыхательных путях), или в результате осаждения (в альвеолах).

[89] Количество лекарственного средства, доставляемое пациенту из подающего устройства, такого как небулайзер, дозирующий ингалятор под давлением (pMDI) или порошковый ингалятор (DPI), называют доставляемой дозой. Она может быть оценена *in vitro* путем определения количества лекарственного средства, выпускаемого из подающего устройства имитирующим ингаляцию способом. Это количество называют выпускаемой дозой (ED), которую определяют хорошо известными методами, например, методами, описанными в Фармакопее США и в Европейских фармакопеях, например, в главе 601 и главе 905 Фармакопее США. Соответственно, "испускаемую дозу" считают эквивалентной доставляемой дозе.

[90] Количество лекарственного средства, доставленное из подающего устройства в легкие пациента называют вдыхаемой дозой. Она может быть оценена *in vitro* путем определения дозы тонкодисперсных частиц (FPD), измеряемой с помощью каскадных импакторов, таких как импактор нового поколения (Next Generation Impactor (NGI)), хорошо известными методами, например, методами, описанными в Фармакопее США и в Европейских фармакопеях, например, в главе 601 и главе 905 Фармакопее США.

[91] Количество лекарственного средства, выпускаемое в виде тонкодисперсных вдыхаемых частиц из подающего устройства, называют фракцией тонкодисперсных частиц (FPF) лекарственной формы. FPF представляет собой долю лекарственного средства в доставляемой дозе, которая является потенциально пригодной для вдыхания. Таким образом, FPF представляет собой отношение FPD к ED (испускаемой или доставляемой дозе). Эти характеристики лекарственной формы определяют хорошо известными методами, например, методами, описанными в Фармакопее США и в Европейских фармакопеях, например, в главе 601 Фармакопее США, и статье 2.9.18 Европейской фармакопее.

[92] В одном варианте осуществления, аэрозольные лекарственные формы рапамицина по настоящему изобретению имеют величину FPF более чем 20% при соответствующей величине FPD в диапазоне от 10 микрограмм до 2 миллиграмм, предпочтительно, менее чем 0,5 миллиграмм, даже после длительного хранения, например, после хранения в течение от 1 до 12 месяцев или от 1 до 36 месяцев. В одном варианте осуществления, вводимая пациенту доза, доставляемая доза (DD) или выпускаемая доза (ED), находится в диапазоне от 25 микрограмм до 2,5 миллиграмм, предпочтительно, менее чем 0,5 миллиграмм.

[93] В конкретных вариантах осуществления, рапамицин инкапсулируют в фармацевтически приемлемый компаунд, материал или матрицу. В одном варианте осуществления, рапамицин инкапсулируют с получением липосомальной лекарственной формы или нелипосомальной лекарственной формы.

Композиции водных растворов

[94] В одном варианте осуществления, аэрозольная композиция по изобретению представляет собой лекарственную форму рапамицина в виде водного раствора, предназначенную для ингаляционного введения с помощью небулайзера, в том числе струйного небулайзера, небулайзера с вибрирующим ситом и неподвижным ситом или дросселирующим отверстием. Таким образом, лекарственная форма в виде раствора

предназначена для образования аэрозольных капель с размерами при вдыхании в диапазоне приблизительно от 0,1 до 10 микрон в диаметре, как описано выше. В одном варианте осуществления, композиция представляет собой распыляемую лекарственную форму в виде водного раствора, состоящего из рапамицина (сиролимуса) или его пролекарства или производного, растворенного в воде, этаноле и низкомолекулярном полиоле, и необязательно включающего поверхностно-активное вещество. В одном варианте осуществления, лекарственная форма в виде водного раствора имеет вязкость ниже 20 мПа·с, ниже 10 мПа·с или ниже 5 мПа·с, и поверхностное натяжение, по меньшей мере, 45 дин/см, предпочтительно, более чем 60 дин/см. Предпочтительно, чтобы лекарственная форма имела вязкость ниже 5 мПа·с и поверхностное натяжение выше 45 дин/см. В одном варианте осуществления, композиция имеет вязкость ниже 20 мПа·с, вязкость ниже 10 мПа·с или вязкость ниже 5 мПа·с и поверхностное натяжение, по меньшей мере, 45 дин/см, предпочтительно, более чем 60 дин/см.

[95] В одном варианте осуществления, лекарственная форма в виде водного раствора состоит из рапамицина, воды, этанола и низкомолекулярного полиола, выбранного из глицерина и пропиленгликоля. В одном варианте осуществления, лекарственная форма в виде водного раствора состоит из рапамицина, воды и низкомолекулярного полиола, выбранного из глицерина и пропиленгликоля, при этом может необязательно присутствовать этанол. Лекарственная форма может также необязательно содержать неионогенное поверхностно-активное вещество, предпочтительно, PEG 100 или полисорбат, предпочтительно, Polysorbate 80 ("PS80"), фосфолипид, предпочтительно, природный фосфолипид, такой как лецитин, и, предпочтительно, гидрированный соевый лецитин, и антиоксидант или стабилизатор, предпочтительно, двунатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты. В одном варианте осуществления, неионогенное поверхностно-активное вещество выбирают из группы, состоящей из полиэтиленгликоля (PEG) PEG 100, PEG 1000 и Polysorbate 80 (называемого также как Tween™ 80, сорбитан моноолеат или полиоксиэтилен сорбитан моноолеат) и их смесей.

[96] Количество рапамицина в водном растворе составляет приблизительно от 0,001 масс.% до 0,01 масс.% в расчете на суммарную массу раствора. В одном варианте осуществления, рапамицин присутствует в растворе при концентрации приблизительно от 0,01 мг/мл до 0,1 мг/мл. В одном варианте осуществления, количество рапамицина составляет от 0,001 масс.% до 0,01 масс.% в расчете на суммарную массу раствора.

[97] В одном варианте осуществления, концентрация рапамицина в растворе составляет приблизительно от 0,01 до 0,1 мг/мл, количество низкомолекулярного полиола составляет от 5 до 35 масс.%, этанол присутствует в количестве 5-20 масс.%, и количество неионогенного поверхностно-активного вещества составляет от 1 до 200 частей на миллион (ppm) по массе. Предпочтительно, чтобы количество неионогенного поверхностно-активного вещества составляло менее чем 100 ppm (по массе). Количество необязательного антиоксиданта/стабилизатора составляет от нуля до менее чем 0,01 масс.%.

[98] В одном варианте осуществления, лекарственная форма в виде водного раствора по изобретению не содержит одной или более добавок или вспомогательных веществ, выбранных из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, лецитина, ЭДТА, блок-сополимера и циклодекстрина.

[99] Лекарственная форма в виде водного раствора представляет собой однофазный водный раствор, в котором in which полностью растворен рапамицин. Основными сорастворителями в лекарственной форме являются этанол и низкомолекулярный полиол, выбранный из глицерина и пропиленгликоля. Рапамицин не находится в виде

суспензии или эмульсии, и раствор не является ни коллоидным раствором, ни дисперсией. Лекарственная форма в виде водного раствора по изобретению не содержит коллоидных структур, таких как мицеллы или липосомы. Количество фосфолипида, в случае его присутствия, составляет слишком малую величину, для того чтобы образовывать

липосомы или для осаждения рапамицина. И суммарное количество фосфолипида и неионогенного поверхностно-активного вещества является слишком малым для модификации поверхностного натяжения. Следовательно, ни фосфолипид, ни

неионогенное поверхностно-активное вещество не присутствует в количествах, достаточных для традиционного проявления свойств поверхностно-активного вещества. В этом контексте, термин поверхностно-активное вещество относится к средству, которое вызывает уменьшение поверхностного натяжения раствора или поверхностного натяжения на границе раздела между жидкостью и любой твердой частицей лекарственного средства в растворе, вследствие чего поверхностно-активное вещество действует как детергент, смачивающее средство, эмульгатор или диспергирующее

средство. Вместе с тем, неионогенное поверхностно-активное вещество в лекарственной форме в виде раствора по изобретению служит для подавления адсорбции лекарственного средства на стенках полиэтиленового контейнера, в который расфасовывают готовый продукт, благодаря чему предотвращается потеря активности лекарственного средства в результате адсорбции на стенках контейнера.

[100] Соответственно, в одном варианте осуществления, лекарственная форма в виде водного раствора представляет собой однофазный водный раствор, в котором полностью растворен рапамицин, раствор не содержит мицелл или липосом, и раствор не является эмульсией, дисперсией или суспензией.

[101] В одном варианте осуществления, лекарственная форма в виде раствора является стерильной. В одном варианте осуществления, лекарственная форма в виде раствора является стерильной в результате фильтрации через фильтр с размером пор 0,2 микрона. В одном варианте осуществления, лекарственную форму в виде раствора не подвергают стерилизации нагреванием, например, обработкой в автоклаве, или излучением.

[102] В одном варианте осуществления, изобретение предлагает упаковку, содержащую один или более контейнеров или флаконов (эти термины используются взаимозаменяемо), заполненных стерильной лекарственной формой в виде водного раствора. Предпочтительно, чтобы контейнеры представляли собой контейнеры с одноразовой дозой. В одном варианте осуществления, контейнеры представляют собой полимерные флаконы, предпочтительно, полиэтиленовые флаконы. В одном варианте осуществления, контейнер или флакон, заполненный стерильной лекарственной формой в виде водного раствора по изобретению, изготавливают с помощью способа, включающего формование флакона путем литья с раздувом и, сразу вслед за этим, заполнение флакона отфильтрованной с целью стерилизации лекарственной формой по изобретению в стерильных условиях, и, затем сразу после заполнения флакона, его герметизацию путем термической сварки.

[103] В одном варианте осуществления, водная аэрозольная лекарственная форма по изобретению включает или состоит из следующих компонентов:

рапамицин (или его пролекарство или производное) - приблизительно от 0,001 масс.% до 0,01 масс.%,

пропиленгликоль - приблизительно от 5 масс.% до 35 масс.%,

этанол - приблизительно от 5 масс.% до 20 масс.%,

Polysorbate 80 - приблизительно от 1 до 200 ppm по массе,

лецитин - приблизительно от 1 до 100 ppm по массе, и

вода,

где количество воды является достаточным для достижения концентрации рапамицина от 0,01 до 0,1 миллиграмм/миллилитр. Может быть необязательно добавлена стабилизирующая добавка, такая как двунариевая соль этилендиаминтетрауксусной

5 кислоты, при концентрациях ниже 0,01 масс.%.
 [104] В случае водных и других работающих при нормальном давлении жидких систем, для аэролизации лекарственных форм применяют разнообразные небулайзеры (в том числе небулайзеры небольшого объема). В компрессорных небулайзерах применяется струйная технология и используется сжатый воздух для генерирования
 10 жидкого аэрозоля. Такие устройства производят, например, фирмы, Healthdyne Technologies, Inc., Invacare, Inc., Mountain Medical Equipment, Inc., Pari Respiratory, Inc., Mada Medical, Inc., Puritan-Bennet, Schuco, Inc., DeVilbiss Health Care, Inc. и Hospitak, Inc. Действие ультразвуковых небулайзеров основано на механической энергии в форме вибрации пьезоэлектрического кристалла для генерирования вдыхаемых капель
 15 жидкости, и их выпускают, например, фирмы Omron Healthcare, Inc. и DeVilbiss Health Care, Inc.

[105] В одном варианте осуществления, водную аэрозольную лекарственную форму по изобретению вводят с помощью вибрирующего небулайзера, производимого фирмами Aerogen, Pari, Philips or Omron. В одном варианте осуществления, водная аэрозольная
 20 лекарственная форма по изобретению расфасована в контейнер, подходящий для использования в небулайзере с вибрирующим ситом, например, с торговым названием Aeroneb® Go (фирмы Aerogen, дистрибьютор фирма Philips Respironics), I-Neb® (фирмы Philips) или E-Flow® (фирмы Pari), или аналогичном небулайзере. В одном варианте осуществления, водную аэрозольную лекарственную форму по изобретению вводят с
 25 помощью небулайзера с дросселирующим отверстием, например, с торговым названием Respimat® фирмы Boeringher-Ingelheim.

[106] Так например, в одном варианте осуществления, изобретение предлагает фармацевтическую композицию в форме распыляемого водного раствора, применяемого для введения путем ингаляции человеку, при этом водный раствор состоит из рапамицина
 30 или его пролекарства или производного, предпочтительно, выбранного из сиролимуса, эверолимуса и темсиролимуса, воды, этанола и низкомолекулярного полиола. В одном варианте осуществления, низкомолекулярный полиол представляет собой глицерин или пропиленгликоль, или их смесь. В одном варианте осуществления, композиция дополнительно включает неионогенное поверхностно-активное вещество, выбранное
 35 из группы, состоящей из PEG 100, PEG 1000 и polysorbate 80, и их смесей. В одном варианте осуществления, количество неионогенного поверхностно-активного вещества в лекарственной форме составляет от 1 до 200 ppm по массе, предпочтительно, менее чем 100 ppm по массе, в расчете на массу лекарственной формы. В одном варианте осуществления, композиция дополнительно включает фосфолипид, антиоксидант или
 40 химический стабилизатор. В одном варианте осуществления, количество антиоксиданта или химического стабилизатора в лекарственной форме составляет менее 0,01 масс.% в расчете на массу лекарственной формы. В одном варианте осуществления, антиоксидант или химический стабилизатор представляет собой этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA). В одном варианте осуществления,
 45 количество рапамицина в лекарственной форме составляет от 0,001 до 0,01 масс.% в расчете на массу лекарственной формы.

[107] В одном варианте осуществления, композиция не содержит одной или более добавок или вспомогательных веществ, выбранных из группы, состоящей из

полиэтиленгликоля, лецитина, EDTA, блок-сополимера и циклодекстрина.

[108] В одном варианте осуществления, композиция не содержит коллоидных структур, выбранных из мицелл и липосом.

[109] В одном варианте осуществления, композицию применяют для введения с помощью любого одного из струйного небулайзера, небулайзера с вибрирующим ситом, небулайзера с неподвижным ситом или небулайзера с дросселирующим отверстием.

[110] В одном варианте осуществления, композиция имеет вязкость ниже 20 мПа·с, предпочтительно, ниже 10 мПа·с, наиболее предпочтительно, ниже 5 мПа·с, и поверхностное натяжение, по меньшей мере, 45 дин/см, предпочтительно, по меньшей мере, 50 дин/см.

[111] Изобретение также предлагает способ приготовления фармацевтической композиции по изобретению в форме распыляемого водного раствора, где способ включает стерилизующую фильтрацию раствора через фильтр с размером пор 0,2 микрона или менее и сбор стерильного фильтрата в сосуде в стерильных условиях. В одном варианте осуществления, способ приготовления дополнительно включает перенос стерильного фильтрата в контейнер с герметизирующей крышкой в стерильных условиях. В одном варианте осуществления, контейнер с герметизирующей крышкой представляет собой полиэтиленовый флакон для одноразовой дозы. В одном варианте осуществления, флакон изготавливают литьем с раздувом непосредственно перед тем, как стерильный фильтрат переносят во флакон. В одном варианте осуществления, способ дополнительно включает стадию герметизации путем термической сварки флакона сразу после того, как стерильный фильтрат переносится во флакон.

Сухие порошкообразные композиции

[112] В одном варианте осуществления, распыляемая в виде аэрозоля композиция по изобретению представляет собой сухой порошок, включающий тонкоизмельченные частицы рапамицина или его пролекарства или производного в качестве терапевтического средства (называемого также "лекарственным средством"), при этом частицы имеют диаметр от 0,1 до 10 микрон и средний диаметр приблизительно от 0,5 до 4,5 микрон, приблизительно от 1 до 4 микрон, приблизительно от 1 до 3,5 микрон, приблизительно от 1,5 до 3,5 микрон, или приблизительно от 2 до 3 микрон.

Лекарственную форму в виде сухого порошка применяют или в порошковом ингаляторе (DPI) или дозирующем ингаляторе под давлением (pMDI). Количество рапамицина в сухом порошке составляет приблизительно от 0,5 до 20% (по массе) в расчете на суммарную массу порошка. В одном варианте осуществления, количество рапамицина составляет приблизительно 1% или 2% (по массе).

[113] В одном варианте осуществления, тонкоизмельченный рапамицин получают методами влажного полирования или размолла на струйной мельнице, описанными ниже, с диаметром частиц в диапазоне приблизительно от 0,5 до 4,5 микрон, приблизительно от 1 до 4 микрон, или приблизительно от 2 до 3 микрон, и частицы рапамицина смешивают с частицами лактозного носителя при отношении лекарственное средство/носитель в диапазоне 0,5-2 масс.% при предпочтительном отношении 1%.

[114] В одном варианте осуществления, частицы лекарственного средства слегка уплотняют в хрупкой матрице, которая заключена внутри подающего устройства (порошкового ингалятора). После включения подающего устройства, оно захватывает часть частиц лекарственного средства из матрицы и диспергирует их во вдыхаемом воздухе, доставляя частицы лекарственного средства в дыхательные пути. В качестве варианта, частицы лекарственного средства могут представлять собой свободнотекущий порошок, содержащийся внутри резервуара в подающем устройстве (порошковом

ингаляторе). Резервуар может представлять собой камеру, составляющую единое целое с устройством, или капсулу, блистер или аналогичный предварительно изготовленный резервуар, который вставляют в устройство перед его включением. После включения устройства, происходит захват части частиц лекарственного средства из резервуара и диспергирование их во вдыхаемом воздухе, в результате чего частицы лекарственного средства доставляются в дыхательные пути.

[115] В одном варианте осуществления, сухая порошкообразная композиция состоит из частиц лекарственного средства и носителя, выбранного из группы, состоящей из арабинозы, глюкозы, фруктозы, рибозы, маннозы, сахарозы, трегалозы, лактозы, мальтозы, крахмалов, декстрана, маннита, лейцина, лизина, изолейцина, дипальмитилфосфатидилхолина, лецитина, полимолочной кислоты, сополимера молочной и глутаминовой кислоты и ксилита или смесей упомянутых выше соединений. В одном варианте осуществления, носитель представляет собой лактозу, в частности, в форме моногидрата. В одном варианте осуществления, сухая порошкообразная композиция включает смесь двух или более носителей.

[116] В одном варианте осуществления, сухая порошкообразная композиция включает лекарственное средство и смесь, по меньшей мере двух различных носителей. В одном варианте осуществления, отношение лекарственного средства к носителю находится в диапазоне приблизительно от 0,5 до 20% (по массе). В одном варианте осуществления, частицы лекарственного средства имеют диаметр в диапазоне от 0,1 до 10 микрон при среднем диаметре приблизительно от 1 до 4, от 1 до 3,5 или от 1,5 до 3,5 или от 2 до 3 микрон. Частицы носителя могут иметь диаметр в диапазоне от 2 до 200 микрон.

[117] В одном варианте осуществления, композиция содержится в блистерной упаковке или резервуаре для использования в порошковом ингаляторе. В одном варианте осуществления, сухую порошкообразную композицию предварительно загружают в желатиновую, крахмальную, целлюлозную или полимерную капсулу, или блистер из алюминиевой фольги или блистер из алюминиевой фольги и пластмассы, подходящие для использования в порошковом ингаляторе. Каждая капсула или блистер может содержать от 1 до 100 миллиграмм сухой порошкообразной композиции. Капсулы или блистеры могут быть вставлены в порошковый ингалятор (DPI), такой как ингалятор под торговым названием Aerolizer®, Plastiapе® RS01 Model 7 и Plastiapе® RS00 Model 8, XCaps®, FlowCaps®, Arcus®, Diskhaler® или Microdose®. После включения порошкового ингалятора, капсулы или блистеры разрушаются, и порошок диспергируется во вдыхаемом воздухе, в результате чего лекарственное средство доставляется в дыхательные пути.

[118] В одном варианте осуществления, сухая порошкообразная композиция содержится в порошковом ингаляторе (DPI), выбранном из ингалятора под торговым названием Accuhaler®, ConixTM, Rotahaler®, TwinCaps®, XCaps®, FlowCaps®, Turbuhaler®, NextHaler®, CycloHaler®, RevolizerTM, Diskhaler®, Diskus®, Spinhaler, Handihaler®, Microdose Inhaler, GyroHaler®, OmniHaler®, Clickhaler®, Duohaler® (фирмы Vectura) и ARCUS® (фирмы Civitas Therapeutics). В одном варианте осуществления, изобретение предлагает порошковый ингалятор, содержащий описанную в изобретении сухую порошкообразную композицию. В одном варианте осуществления, устройство выбирают из группы, состоящей из ингаляторов XCaps, FlowCaps, Handihaler, TwinCaps, Aerolizer®, Plastiapе® RS01 Model 7 и Plastiapе® RS00 Model 8. В одном варианте осуществления, устройство, содержащее композицию, выбирают из группы, состоящей из ингаляторов под торговыми названиями GyroHaler®, OmniHaler®, Clickhaler®, Duohaler® и ARCUS®.

[119] Предпочтительно, чтобы частицы носителя имели большие размеры (более чем 5 микрон), для того чтобы предотвратить отложение материала носителя глубоко в легких. В одном варианте осуществления, частицы носителя имеют диаметр в диапазоне от 1 до 200 микрон, от 30 до 100 микрон или менее чем 10 микрон. В одном варианте осуществления, частицы носителя представляют собой смесь двух носителей, одного с размером частиц приблизительно 30-100 микрон, и другого с размером частиц менее чем 10 микрон. Соотношение двух различных носителей находится в диапазоне от 3:97 до 97:3. В одном варианте осуществления, сухая порошкообразная композиция характеризуется отношением лекарственного средства к носителю 0,5-20% (по массе), при этом частицы лекарственного средства имеют диаметр от 0,1 до 10 микрон при среднем диаметре менее чем 3,5 микрон. В одном варианте осуществления, материал носителя представляет собой кристаллический материал. Предпочтительно, чтобы носитель из кристаллического материала представлял собой носитель, который, по меньшей мере, на 90%, предпочтительно, более чем на 95%, являлся кристаллическим, и который бы не абсорбировал или практически не абсорбировал воду в условиях 80% или более низкой относительной влажности при комнатной температуре. Примерами таких кристаллических носителей являются моногидрат лактозы и моногидрат глюкозы. Количество носителя в лекарственной форме составляет от 1 до 99,0% или более в расчете на массу сухого порошка, предпочтительно, от 5 до 99%, от 10 до 99%, от 20 до 99%, от 30 до 99%, от 40 до 99% или от 50 до 99%.

[120] В одном варианте осуществления, сухая порошкообразная композиция содержится внутри резервуара в подающем устройстве (порошковом ингаляторе). Резервуар может представлять собой камеру, составляющую единое целое с устройством, или капсулу, блистер или аналогичный предварительно изготовленный резервуар, который вставляют в устройство перед его включением. После включения устройства, происходит захват части частиц лекарственного средства из резервуара и диспергирование их во вдыхаемом воздухе, в результате чего частицы лекарственного средства доставляются в дыхательные пути.

[121] В одном варианте осуществления, лекарственное средство присутствует в виде тонкодисперсного порошка вместе с фармацевтически приемлемым носителем. В этом контексте, термин "тонкодисперсный" относится к размеру частиц в ингалируемом диапазоне, обсужденном выше. Предпочтительно, чтобы лекарственное средство тонко измельчали так, чтобы частицы имели средний диаметр в диапазоне 10 микрон или менее. В одном варианте осуществления, средний диаметр (MMAD или Dv50) частиц рапамицина (или его пролекарства или производного) в описанной в изобретении сухой порошкообразной композиции составляет от 0,5 до 10 микрон, от 0,5 до 6 микрон, от 1 до 5 микрон, от 1 до 4 микрон, от 1 до 3 микрон, или от 2 до 3 микрон. Величина MMAD или Dv50 характеризует величину размера частиц, меньше которой имеют 50% из совокупности исследуемых частиц.

[122] В одном варианте осуществления, лекарственная форма в виде сухого порошка рапамицина дополнительно включает одну или более добавок, выбранных из добавок, описанных ниже. В одном варианте осуществления, одна или более добавок включают или состоят из стеарата магния. В одном аспекте этого варианта осуществления, стеарат магния присутствует в количестве от 0,001 до 10% в расчете на массу сухого порошка, предпочтительно, в количествах от 0,01 до 5% или от 0,01 до 2%. В другом варианте осуществления, добавка включает или состоит из фосфолипида, такого как лецитин (который является смесью фосфатидилхолинов), в количестве от 0,1% до 1% в расчете на массу сухого порошка, предпочтительно, от 0,2% до 0,6%. В одном аспекте этого

варианта осуществления, добавку наносят в виде слоя на материал носителя до или одновременно со стадией смешения носителя с частицами рапамицина. Это может достигаться, например, путем использования стадии смешения с высокими энергетическими затратами для нанесения слоя добавки на носитель или смешения с низкими энергетическими затратами или комбинации смешения с высокими и низкими энергетическими затратами для получения требуемого уровня слоя на материале носителя. Устройства с низким потреблением энергии для смешения сухих порошков с образованием смесей являются хорошо известными и включают, например, V-образные смесители, смесители двухконусной конфигурации, наклонные конусные смесители, смесители с кубическим барабаном, бункерные смесители, горизонтальные или вертикальные барабанные смесители, статические смесители непрерывного действия и динамические смесители непрерывного действия. Устройства с высоким потреблением энергии включают смесители с большими сдвиговыми усилиями, которые хорошо известны специалистам в этой области.

[123] В конкретных вариантах осуществления, сухой порошок содержится в капсуле. В одном варианте осуществления, капсула представляет собой желатиновую капсулу, пластмассовую капсулу или целлюлозную капсулу, или капсула имеет форму блистеров из алюминиевой фольги или алюминиевой фольги и пластмассы. В каждом случае, капсула или блистер подходит для использования в порошковом ингаляторе и, предпочтительно, чтобы в каждой капсуле содержались разовые дозы лекарственного средства вместе с носителем в количествах, выраженных через суммарную массу порошка, от 1 мг до 100 мг. В качестве варианта, сухой порошок может содержаться в резервуаре порошкового ингалятора многоразового применения.

[124] Размер частиц рапамицина может быть уменьшен до требуемого уровня микрочастиц традиционными методами, например, путем помола в воздушоструйной мельнице, шаровой мельнице или вибромельнице, путем влажного полирования, микроосаждения, распылительной сушки, лиофилизации или перекристаллизации из субкритических или сверхкритических растворов. Помол на струйной мельнице или измельчение в этом контексте относится к микронизации сухих частиц лекарственного средства механическим способом. Методы микронизации не требуют приготовления раствора, пульпы или суспензии лекарственного средства. Вместо этого, размер частиц лекарственного средства уменьшают механически. В связи с тем, что микронизация требует относительно высоких энергетических затрат, в конкретных вариантах осуществления, желательно включать материал носителя в смесь с рапамицином с целью проведения совместной микронизации. В этом контексте, материал носителя поглощает некоторую часть энергии микронизации, которая, в противном случае, могла бы оказывать отрицательное воздействие на структуру рапамицина. В одном варианте осуществления, частицы рапамицин в диапазоне размеров от 1 до 4 или от 2 до 3 микрон получают методом помола в воздушоструйной мельнице.

[125] Влажное полирование, описанное в патентном документе US2013/0203717, включает использование высокого сдвигового усилия для уменьшения размера частиц лекарственного средства в суспензии или пульпе. Влажное полирование может включать только частицы лекарственного средства или дополнительные твердые частицы, называемые средой размолла. В одном варианте осуществления, размер частиц рапамицина может быть уменьшен до требуемого уровня путем использования метода влажного полирования, который включает мокрый помол, в частности, с помощью кавитации при повышенном давлении, где рапамицин суспендируют в воде или другом растворителе, в котором он не растворяется, и затем проводят распылительную сушку

суспензии с получением рапамицина в виде сухого порошка. В одном варианте осуществления, частицы рапамицина в диапазоне размеров от 1 до 4 или от 2 до 3 микрон получают методом влажного полирования, который включает приготовление суспензии рапамицина, микрофлюидизацию суспензии и распылительную сушку полученных частиц с получением сухого порошка. Рапамицин может быть суспендирован в антирастворителе, выбранном из группы, состоящей из пропилового или бутилового спирта, воды и этилацетата. В одном варианте осуществления, суспензия представляет собой водную суспензию.

[126] Распылительная сушка обычно включает приготовление раствора, пульпы или суспензии лекарственного средства, распыление раствора, пульпы или суспензии с образованием частиц и затем испарения среды раствора, пульпы или суспензии с получением частиц. Раствор, пульпа или суспензия могут быть приготовлены при субкритических или сверхкритических условиях. Стадия испарения может быть осуществлена путем повышения температуры воздушной среды, в которой проводят распыление, или путем понижения давления, или путем комбинации обоих подходов. В одном варианте осуществления, порошковую лекарственную форму, включающую рапамицин, получают распылительной сушкой водной дисперсии рапамицина с образованием сухого порошка, состоящего из агрегированных частиц рапамицина, имеющих размер, подходящий для описанной выше ингаляционной доставки. Размер агрегированных частиц может быть скорректирован (увеличен или уменьшен) применительно к заданной мишени, которой могут быть или участки в глубине легких, или участки верхних дыхательных путей, такие как верхняя область бронхов или слизистая оболочка носа. Это может быть осуществлено, например, путем увеличения концентрации рапамицина в подвергаемой распылительной сушке дисперсии или путем увеличения размера капель, генерируемых распылительной сушилкой.

[127] В качестве варианта, сухой порошок может быть получен сублимационной сушкой (лиофилизацией) водного раствора лекарственного средства, дисперсии или эмульсии или путем использования комбинации распылительной сушки и сублимационной сушки.

[128] В одном варианте осуществления, водная дисперсия рапамицина и одной или более необязательных добавок дополнительно включает растворенный разбавитель, такой как лактоза или маннит, в результате чего при сублимационной сушке дисперсии образуются вдыхаемые частицы разбавителя, каждая из которых содержит, по меньшей мере, одну включенную в нее частицу лекарственного средства и частицу добавки, если она присутствует.

[129] В одном варианте осуществления, лекарственную форму в виде сухого порошка получают путем сублимационной сушки водной дисперсии рапамицина и одной или более необязательных добавок. В одном варианте осуществления, порошки содержат агрегаты рапамицина и добавки, если она присутствует, где размеры агрегатов находятся в диапазоне пригодных для вдыхания размеров, описанных выше.

[130] В одном варианте осуществления, сухой порошок включает рапамицин, загруженный в липосомы. Липосомы, загруженные лекарственным средством, могут быть получены хорошо известными методами, например, используя метод, описанный для такролимуса в публикации M. Chougale, *et al. Int. J. Nanomedicine* 2:625-688 (2007). Вкратце, рапамицин, гидрированный фосфатидилхолин (HSPC) и холестерин растворяют в смеси метанола и хлороформа и затем подвергают сушке с образованием тонкой пленки, например, в ротационном испарителе. Липосомы гидратируют, и липосомную дисперсию пропускают через гомогенизатор высокого давления для уменьшения

размеров. Полученные гранулы классифицируют по величине пор и проценту захваченного лекарственного средства, и гранулы, соответствующие требуемому содержанию рапамицина, затем диспергируют в подходящей среде и подвергают распылительной сушке с получением частиц для ингаляции требуемого размера.

5 Подвергнутый распылительной сушке порошок может быть засыпан в капсулы, кассеты или блистерные упаковки для применения.

[131] В одном варианте осуществления, частицы сухого порошка могут быть получены осаждением из сверхкритического или субкритического раствора.

10 [132] Сухие порошкообразные композиции могут содержаться в подходящем порошковом ингаляторе или в капсуле или блистере, которые используются в таком устройстве. Примеры таких устройств приведены выше и включают Accuhaler®, Aerolizer®, Plastiap® RS01 Model 7, Plastiap® RS00 Model 8, Conix™, Rotahaler®, TwinCaps®, XCaps®, FlowCaps®, Turbuhaler®, NextHaler®, CycloHaler®, Revolizer™, Diskhaler®, Diskus®, Spinhaler, Handihaler®, ингалятор для микродоз, GyroHaler®,
15 OmniHaler®, Clickhaler® или Duohaler® (фирмы Vectura), или активируемый вдохом ингалятор ARCUS® (фирмы Civitas Therapeutics). В одном варианте осуществления, изобретение предлагает порошковый ингалятор, содержащий описанную в изобретении сухую порошкообразную композицию. В одном варианте осуществления, устройство выбирают из группы, состоящей из ингаляторов XCaps, FlowCaps, Handihaler, TwinCaps,
20 Aerolizer®, Plastiap® RS01 Model 7 и Plastiap® RS00 Model 8.

Лекарственные формы на основе пропеллентов

[133] В другом варианте осуществления по изобретению, из рапамицина готовят лекарственную форму на основе пропеллентов, которую могут также в общем называть в изобретении "лекарственной формой для дозирующего ингалятора под давлением
25 (pMDI)". Лекарственная форма для pMDI является удобной для доставки с помощью устройства, такого как дозирующий ингалятор под давлением (pMDI). В одном варианте осуществления, композиция включает рапамицин, пропеллент и растительное масло или фармацевтически приемлемое производное растительного масла. Предпочтительно, чтобы пропеллент выбирали из 1,1,1,2-тетрафторэтана (HFA134a) и 1,1,1,2,3,3,3-
30 гептафторпропана (HFA227) или их смесей. В одном варианте осуществления, растительное масло выбирают из оливкового масла, сафлорового масла и соевого масла. Рапамицин может находиться в форме раствора или суспензии в пропелленте. В этом контексте, выражение "в форме суспензии" относится к случаю, когда рапамицин присутствует в форме частиц, диспергированных в пропелленте. В одном варианте
35 осуществления, рапамицин микронизируют и он присутствует в форме суспензии в пропелленте. В одном варианте осуществления, лекарственная форма дополнительно включает смачивающее средство или сорастворитель, такой как этанол. В одном варианте осуществления, лекарственная форма дополнительно включает многоатомный спирт, такой как пропиленгликоль.

40 [134] Подходящие пропелленты хорошо известны и включают, например, галогензамещенные углеводороды, например, фторзамещенные метаны, этаны, пропаны, бутаны, циклопропаны или циклобутаны, в частности, 1,1,1,2-тетрафторэтан (HFA134a) и 1,1,1,2,3,3,3-гептафторпропан (HFA227) или их смеси.

[135] В одном варианте осуществления, лекарственная форма включает
45 микронизированный рапамицин, этанол и подходящий пропеллент, такой как HFA134a, HFA227 или смесь подходящих пропеллентов, и необязательно одно или более поверхностно-активных веществ. В одном варианте осуществления, лекарственная форма дополнительно включает смягчающий компонент.

[136] В одном варианте осуществления, лекарственная форма включает рапамицин, пропеллент и растительное масло. В одном аспекте, лекарственная форма не включают добавку или поверхностно-активное вещество. Например, лекарственная форма не включают этанол, многоатомный спирт (например, пропиленгликоль) или поверхностно-активное вещество (например, сорбитан триолеат, сорбитан моноолеат или олеиновую кислоту).

[137] В одном варианте осуществления, лекарственная форма на основе пропеллента включает сжатый воздух, диоксид углерода, азот или сжиженный пропеллент выбранный из группы, состоящей из н-пропана, н-бутана, изобутана или их смесей, или 1,1,1,2-тетрафторэтана (HFA134a) и 1,1,1,2,3,3,3-гептафторпропана (HFA227) или их смесей, в присутствии или отсутствии полярного соразтворителя, такого как спирт. Композиция может представлять собой раствор или суспензию. Что касается суспензий, то частицы лекарственного средства в них имеют диаметр от 0,1 до 10 микрон при среднем диаметре менее чем 3,5 микрон.

[138] Лекарственную форму на основе пропеллента получают хорошо известными методами, например, мокрым помолом крупнодисперсного рапамицина и необязательной добавки в жидком пропелленте, или при атмосферном давлении, или при высоком давлении. В конкретных вариантах осуществления, добавка представляет собой поверхностно-активное вещество, которое служит для предотвращения агрегации (слеживания или кристаллизации), для обеспечения единообразного дозирования и (или в качестве варианта) для достижения благоприятной величины фракции мелкодисперсных частиц (FPF). В одном аспекте, поверхностно-активное вещество выбирают из сорбитана триолеата, сорбитана моноолеата или олеиновой кислоты. В качестве варианта, сухие порошки, содержащие частицы лекарственного средства, получают распылительной сушкой или сублимационной сушкой водных дисперсий частиц лекарственного средства, обсужденными выше, и полученные порошки диспергируют в подходящих пропеллентах для использования в традиционных дозирующих ингаляторах под давлением (pMDI). В одном варианте осуществления, устройством для ингаляции является ингалятор под торговым названием RespiMat™.

[139] В одном варианте осуществления, аэрозольные лекарственные формы рапамицина на основе пропеллентов по изобретению являются стабильными относительно роста размера частиц или изменения морфологии кристаллов рапамицина на протяжении продолжительного периода времени.

Способ получения стерильных лекарственных форм с однократной дозировкой

[140] В одном варианте осуществления, композиции по изобретению являются стерильными композициями. В одном варианте осуществления, стерильные композиции представляют собой стерильные лекарственные формы с однократной дозировкой. В одном варианте осуществления, стерильная лекарственная форма с однократной дозировкой представляет собой капсулу, подходящую для использования в небулайзере.

[141] В одном варианте осуществления, готовую композицию стерилизуют в ее контейнере с крышкой путем нагревания, например, автоклавирования, или путем облучения. В одном варианте осуществления, составляющие композицию компоненты сначала стерилизуют подходящим методом, включающим стерилизующее фильтрование для жидких компонентов и облучение или автоклавирование для твердых и жидких компонентов, при этом метод дополнительно включает сохранение стерильности стерильных компонентов путем их расфасовки в герметические контейнеры, смешение компонентов в смесителе в соответствующих пропорциях и заполнение полученным продуктом контейнера с крышкой, причем все эти манипуляции проводят в асептическом

боксе. Этот метод имеет недостатки, связанные с тем, что он требует больших затрат и применения сложных асептических методик обработки. Соответственно, он используется в основном для обработки суспензий твердых частиц или коллоидных дисперсий, липосомных лекарственных форм или эмульсий, которые не могут быть пропущены через субмикронный фильтр для стерилизации. И наконец, в одном варианте осуществления, готовую композицию стерилизуют фильтрованием через субмикронный фильтр, предпочтительно, через фильтр с размером пор 0,2 микрона. В одном варианте осуществления, композиции по изобретению представляют собой однофазные водные растворы, стерилизованные методом стерилизующей фильтрации. В отличие от этого, эмульсии и липосомные лекарственные формы обычно являются недостаточно стабильными в условиях использования высокого сдвигового усилия в методе стерилизующей фильтрации и поэтому к ним нежелательно применять этот метод.

[142] В одном варианте осуществления, композиции по изобретению представляют собой однофазные водные растворы, которыми наполняют контейнер с крышкой, например, флакон, изготовленный из полимера, предпочтительно полиэтилена, или, в качестве варианта, стеклянный флакон. Автоклавирование и облучение не подходят в тех случаях, когда флакон представляет собой полимерный флакон, вследствие высокой вероятности возникновения химической нестабильности лекарственного средства и/или вспомогательных веществ лекарственной формы, а также контейнера, и вследствие образования нежелательных примесей. В одном варианте осуществления, композиции по изобретению стерилизуют методом, который не включает нагревание (автоклавирование) или облучение, и вместо них включает стерилизующую фильтрацию. Предпочтительно, в соответствии с этим вариантом осуществления, чтобы однофазные водные растворы рапамицина стерилизовали фильтрацией через фильтр, имеющий размер пор менее чем или равный 0,2 микрона. В одном варианте осуществления, стерильный фильтрат собирают в сосуд для сбора, находящийся в асептическом боксе. В одном варианте осуществления, стерильный фильтрат переносят из сосуда для сбора в контейнер с крышкой в асептическом боксе. Предпочтительно, чтобы контейнер с крышкой представлял собой полимерный флакон, предпочтительно, флакон с одноразовой дозой, и наиболее предпочтительно, полиэтиленовый флакон с одноразовой дозой. В одном варианте осуществления, полимерный флакон формируют методом выдувания непосредственно перед его заполнением и затем его термически герметизируют сразу после заполнения. Этот метод могут также называть методом "формования-наполнения-герметизации" или методом "выдувания-наполнения-герметизации". Этот метод является особенно предпочтительным в отношении композиций по изобретению, которые представляют собой однофазные водные растворы рапамицина, так как этот метод не требует использования нагревания или облучения, которые могут вызывать разложение как самого лекарственного средства, вспомогательных веществ лекарственной формы, так и контейнера с крышкой.

Ингаляционное введение и дозирование

[143] Настоящее изобретение предлагает композиции и способы лечения и профилактики легочной артериальной гипертензии у человека путем введения рапамицина в дыхательные пути, предпочтительно, в легкие, путем ингаляции. Предпочтительно, чтобы ингаляционную доставку осуществляли путем ингаляции аэрозоля через рот и горло в легкие, но ингаляционная доставка может быть также осуществлена путем ингаляции аэрозоля через нос. Так, в одном варианте осуществления, композицию доставляют интраназально. В другом варианте осуществления, аэрозоль доставляют перорально.

[144] Композиции и способы по изобретению успешно обеспечивают направленную доставку терапевтически эффективного количества рапамицина в легкие при одновременном снижении до очень низких или необнаруживаемых уровней количества рапамицина в крови и оказывающих системное действие на организм. В одном варианте осуществления, количество рапамицина в разовой дозе сухой порошкообразной композиции, описанной в изобретении, составляет приблизительно от 5 до 500 микрограмм или приблизительно от 100 до 300 микрограмм, или приблизительно от 50 до 250 микрограмм. Направленная доставка низкой дозы рапамицина непосредственно в легкие при минимальном системном воздействии обеспечивает улучшение терапевтического индекса по сравнению с пероральными лекарственными формами.

[145] В одном варианте осуществления, введение рапамицина путем ингаляции в соответствии со способами по изобретению повышает терапевтический индекс рапамицина. В этом контексте, применительно к людям, терапевтический индекс представляет собой отношение дозы, которая оказывает терапевтический эффект (ED_{50}), к дозе, которая оказывает токсическое воздействие (TD_{50}) у 50% в группе испытуемых. Это отношение представляют как TD_{50}/ED_{50} . В одном варианте осуществления, введение рапамицина путем ингаляции в соответствии со способами по изобретению снижает одно или более токсических воздействий, связанных с пероральным введением рапамицина, благодаря чему повышается терапевтический индекс рапамицина.

[146] Изобретение включает аэрозольные лекарственные формы в виде растворов или порошков. Соответственно, рапамицин может быть введен в соответствии со способами по изобретению в форме водного аэрозоля, аэрозоля сухого порошка или аэрозоля на основе пропеллента.

[147] В одном варианте осуществления, вводимая доза рапамицина продуцирует остаточный уровень в крови у субъекта от 0,01 до 0,15 нг/мл, от 0,075 до 0,350 нг/мл, от 0,150 до 0,750 нг/мл, от 0,750 до 1,5 нг/мл или от 1,5 до 5 нг/мл. В одном варианте осуществления, вводимая доза рапамицина продуцирует остаточный уровень в крови у субъекта менее чем 5 нг/мл, менее чем 2 нг/мл, менее чем 1 нг/мл, или менее чем 0,5 нг/мл.

[148] В одном варианте осуществления, вводимая доза рапамицина является достаточной для продуцирования концентрации рапамицина в легочной ткани в диапазоне от 1 нг/г до 1 мкг/г, предпочтительно, приблизительно от 5 нг/г до 100 нг/г, приблизительно от 5 нг/г до приблизительно 20 нг/г, или приблизительно от 5 нг/г до приблизительно 30 нг/г.

[149] В одном варианте осуществления, вводимая доза рапамицина составляет от 5 до 100 микрограмм, от 20 до 100 микрограмм, от 20 до 250 микрограмм, от 50 до 500 микрограмм (от 0,05 до 0,5 миллиграмм), от 250 до 1000 микрограмм (от 0,25 до 1 миллиграмма) или от 500 до 2000 микрограмм (от 0,5 до 2 миллиграмм). В одном варианте осуществления, количество вводимого рапамицина составляет менее чем 500 микрограмм, менее чем 100 микрограмм, менее чем 50 микрограмм, менее чем 20 микрограмм или менее чем 10 микрограмм. Предпочтительно, чтобы количество вводимого рапамицина составляло менее чем 0,5 миллиграмма или менее чем 0,25 миллиграмма.

[150] В одном варианте осуществления, рапамицин вводят один раз в сутки.

[151] В одном варианте осуществления, суммарная суточная доза рапамицина составляет от 5 до 100 микрограмм, от 20 до 250 микрограмм, от 50 до 500 микрограмм

(от 0,05 до 0,5 миллиграмма), от 250 до 1000 микрограмм (от 0,5 до 1 миллиграмма) или от 500 до 2000 микрограмм (от 0,5 до 2 миллиграмм). В одном варианте осуществления, суммарная суточная доза рапамицина составляет менее чем 500 миллиграмм, менее чем 100 микрограмм, менее чем 50 микрограмм, менее чем 20 микрограмм или менее чем 10 микрограмм. В одном варианте осуществления, суммарная суточная доза рапамицина, вводимая субъекту, составляет менее чем 0,5 миллиграмм или менее чем 0,25 миллиграмма в сутки.

[152] В одном варианте осуществления, композицию по изобретению вводят субъекту один раз в сутки. В одном варианте осуществления, композицию по изобретению вводят два или три раза в сутки. Предпочтительно, чтобы композицию вводили один или два раза в сутки или менее чем один раз в сутки.

[153] В одном варианте осуществления, способы по изобретению включают введение рапамицина путем ингаляции в легкие в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими средствами, выбранными из группы, состоящей из простаноида, ингибитора фосфодиэстеразы или антагониста эндотелина. В одном варианте осуществления, простаноид выбирают из группы, состоящей из простагландина, тромбоксана и простагличина. Одно или более дополнительных средств могут быть введены одним и тем же способом введения, что и рапамицин, или отличающимся от рапамицина способом введения. Например, средство может быть введено путем ингаляции, интраназально, перорально или внутривенно.

[154] В одном варианте осуществления, способы по изобретению включают введение рапамицин путем ингаляции в комбинации с одной или более дополнительными терапиями. В одном варианте осуществления, одну или более дополнительных терапий выбирают из кислородной терапии, сосудорасширяющей терапии, гормональной терапии, сердечно-сосудистой терапии, антипролиферативной терапии, аутоиммунной терапии, противовоспалительной терапии и антиэстрогенной терапии.

[155] В конкретных вариантах осуществления, способы включают ингаляционное введение композиции по изобретению в качестве первичной терапии. В других вариантах осуществления, введение композиции по изобретению является вспомогательной терапией. В любом случае, способы по изобретению предусматривают введение композиции по изобретению в комбинации с одной или более дополнительными терапиями для лечения заболевания или нарушения. Термины "терапия" и "терапии" относятся к способу, протоколу и/или лекарственному средству, которые могут быть использованы для предотвращения, лечения, применения схемы лечения или облегчения заболевания или нарушения или одного или более их симптомов. В конкретных вариантах осуществления, терапию выбирают из кислородной терапии, сосудорасширяющей терапии, гормональной терапии, сердечно-сосудистой терапии, антипролиферативной терапии, аутоиммунной терапии, противовоспалительной терапии и антиэстрогенной терапии.

[156] Предпочтительно, чтобы введение фармацевтической композиции, включающей рапамицин или его пролекарство или производное, в соответствии со способами по изобретению в комбинации с одной или более дополнительными терапиями обеспечивало синергетический ответ у субъекта, страдающего легочной артериальной гипертензией. В этом контексте, термин "синергетический" относится к силе воздействия комбинации, которая является более эффективной, чем сумма эффектов, оказываемых каждой терапией в отдельности. В одном варианте осуществления, синергетический эффект комбинированной терапии рапамицина по изобретению позволяет использовать более низкие дозы и/или менее частое введение, по меньшей мере, одного терапевтического

средства в комбинации, по сравнению с его дозой и/или частотой введения, когда комбинацию не используют. В другом варианте осуществления, синергетический эффект проявляется в предотвращении или уменьшении неблагоприятных или нежелательных побочных эффектов, связанных с использованием любой терапии из комбинации в

5 отделимости.

Доставка с помощью небулайзера

[157] В одном варианте осуществления, рапамицин приготавливают в виде водного раствора, подходящего для распыления и доставляемого с помощью небулайзера. Для

10 водных и других жидких систем, применяемых при нормальном давлении, промышленностью производятся разнообразные небулайзеры (в том числе небулайзеры небольшого объема) для аэролизации лекарственных форм. В компрессорных небулайзерах используют струйную технологию и сжатый воздух для образования жидкого аэрозоля. Такие устройства производятся, например, фирмами Healthdyne Technologies, Inc., Invacare, Inc., Mountain Medical Equipment, Inc., Pari Respiratory, Inc.,

15 Mada Medical, Inc., Puritan-Bennet, Schuco, Inc., DeVilbiss Health Care, Inc. и Hospitak, Inc. В ультразвуковых небулайзерах используется механическая энергия в форме вибрации пьезоэлектрического кристалла для образования вдыхаемых капель жидкости, и их производят, например, фирмы Omron Healthcare, Inc. и DeVilbiss Health Care, Inc.

Небулайзер может представлять собой, например, обычный пневматический небулайзер, такой как воздушоструйный небулайзер или ультразвуковой небулайзер, которые могут

20 вмещать, например, от 1 до 50 мл, обычно от 1 до 10 мл, раствора композиции.

[158] В одном варианте осуществления, лекарственная форма в виде водного раствора по изобретению предназначена для введения с помощью небулайзера, включающего

25 вибрирующее или неподвижное сито. Например, такие устройства, как AERx® (фирмы Aradigm), RESPIMAT® (фирмы Boehringer Ingelheim), I-Neb® (фирмы Philips) или MicroAire® (фирмы Omron), в которых раствор лекарственного средства нагнетается с помощью поршня или давления сжатого воздуха или с помощью пьезоэлектрического кристалла через дросселирующее отверстие или сито. В качестве варианта, раствор может прокачиваться через небулайзер с вибрирующим ситом, таким как E-Flow®

30 (фирмы Pari) или Aeroneb® Go (фирмы Aerogen). Эти устройства позволяют использовать значительно меньшие объемы для распыления, например, от 10 до 100 мкл, и обеспечивают более высокую эффективность доставки, чем традиционные небулайзеры.

Доставка в форме сухого порошка

[159] В одном варианте осуществления, сухие порошкообразные композиции по

35 изобретению доставляют с помощью порошкового ингалятора (DPI), в котором не используются пропелленты. В одном варианте осуществления, порошок содержится в капсулах из желатина или пластмассы или в блистерах, пригодных для использования в порошковом ингаляторе. В одном варианте осуществления, из порошка приготавливают лекарственную форму с однократной дозировкой с единицей

40 дозирования от 5 мг до 100 мг порошка на одну капсулу. В другом варианте осуществления, сухой порошок содержится в резервуаре многоразового ингалятора сухого порошка. В одном варианте осуществления, ингалятор включает аэрозольный флакон, снабженный насадкой, предназначенный для доставки отмеренной дозы, такой как от 10 до 100 мкл, например, от 25 до 50 мкл, композиции, то есть устройство,

45 известное как дозирующий ингалятор.

[160] В одном варианте осуществления, порошковый ингалятор представляет собой устройство на основе блистера, такое как GyroHaler® или OmniHaler® (оба фирмы Vectura), устройство на основе резервуара, такое как Clickhaler® или Duohaler® (фирмы

Vectura), и ингалятор ARCUS® (фирмы Civitas Therapeutics). В одном варианте осуществления, порошковый ингалятор выбирают из Pulmatrix™ и Novione Twincaps и XCaps™. В одном варианте осуществления, устройство выбирают из группы, состоящей из XCaps, Plastiapе® RS01 Model 7 и Plastiapе® RS00 Model 8.

5 [161] В одном варианте осуществления, порошковый ингалятор выбирают из группы, состоящей из Accuhaler®, Aerolizer®, Plastiapе® RS01 Model 7, Plastiapе® RS00 Model 8, Conix™, Rotahaler®, TwinCaps®, XCaps®, FlowCaps®, Turbuhaler®, NextHaler®, CycloHaler®, Revolizer™, Diskhaler®, Diskus®, Spinhaler, Handihaler®, ингалятор для микродоз, GyroHaler®, OmniHaler®, Clickhaler® или Duohaler® (фирмы Vectura) или
10 активируемый вдохом ингалятор ARCUS® (фирмы Civitas Therapeutics).

[162] В одном варианте осуществления, порошковый ингалятор выбирают из группы, состоящей из Arcus™, Aspirair™, Axahaler™, Breezhaler™, Clickhaler™, Conix Dry™, Cricket™, Dreamboat™, Genuair™, Gemini™, Inspiromatic™, iSPERSE™, MicroDose™, Next DPI™, Prohaler™, Pulmojet™, Pulvinal™, Solis™, Taifun™, Taper Dry™, Trivai™, Novolizer™,
15 Podhaler™, Skyehaler™, Spiromax™, Twincaps/Flowcaps™ и Turbuhaler™. В одном варианте осуществления, порошковый ингалятор предназначен для доставки сухого порошка из капсулы или блистера, содержащих дозированную единицу сухого порошка, или многократный ингалятор сухого порошка предназначен для доставки, например, 5-25 мг сухого порошка на одно активирование вдохом.

20 Доставка с помощью дозирующего ингалятора под давлением (pMDI)

[163] В другом варианте осуществления, рапамицин доставляют в форме аэрозольных частиц из контейнера под давлением или распыляющего устройства, которые содержат подходящий пропеллент, описанный выше для лекарственных форм на основе пропеллентов. В одном варианте осуществления, ингалятор представляет собой
25 ингалятор, приводимый в действие с помощью пропеллента, такой как дозирующий ингалятор под давлением, который высвобождает отмеренную дозу рапамицина после каждого приведения в действие. Типичный дозирующий ингалятор под давлением включает контейнер, содержащий лекарственное средство, клапан, дозирующий лекарственное средство, и мундштук. В одном аспекте этого варианта осуществления,
30 рапамицин приготавливают в виде суспензии в пропелленте. В контексте этого варианта осуществления, рапамицин превращают в тонкодисперсный порошок, который суспендируют в сжиженном пропелленте или смеси пропеллентов. Суспензию затем хранят в герметизированном контейнере при давлении, достаточном для поддержания пропеллента в жидкой форме. В другом варианте осуществления, рапамицин
35 приготавливают в форме раствора. В контексте этого варианта осуществления, рапамицин растворяют в сжиженном пропелленте или смеси пропеллентов. В одном варианте осуществления, лекарственная форма дополнительно включает стабилизатор в количестве, которое способно обеспечивать стабильность лекарственной формы в отношении расслаивания, образования пены или флокуляции в течение времени,
40 которое является достаточным для воспроизводимого дозирования рапамицина после перемешивания лекарственной формы. Стабилизатор может присутствовать в избытке в количестве приблизительно от 10 частей по массе до приблизительно 5000 частей по массе в расчете на один миллион частей суммарной массы аэрозольной лекарственной формы. В одном варианте осуществления, текучий носитель представляет собой 1,1,1,2-тетрафторэтан, 1,1,1,2,3,3,3-гептафторпропан или их смесь. В другом варианте осуществления, текучий носитель представляет собой углеводород (например, н-бутан, пропан, изопентан или их смесь). Композиция может дополнительно включать сорастворитель (например, этанол или другой подходящий сорастворитель).

[164] В одном варианте осуществления способов по изобретению, аэрозольная лекарственная форма, включающая рапамицин, кроме того включает дополнительное лекарственное средство. В одном аспекте этого варианта осуществления, дополнительное лекарственное средство выбирают из группы, состоящей из

5 кортикостероидов, антагонистов эстрогеновых рецепторов, антихолинэргических средств, бета-агонистов, нестероидных противовоспалительных препаратов, макролидных антибиотиков, бронходилататоров, ингибиторов лейкотриеновых рецепторов, антагонистов мускарина, сульфата кромолина и их комбинаций.

Добавки

10 [165] Аэрозольные композиции по изобретению могут содержать одну или более добавок в дополнение к любому носителю или разбавителю (такому как лактоза или маннит), который присутствует в лекарственной форме. В одном варианте осуществления, одна или более добавок включают или состоят из одного или более поверхностно-активных веществ. Поверхностно-активные вещества обычно имеют

15 одну или более длинных алифатических цепей, таких как жирные кислоты, которые позволяют им встраиваться непосредственно в липидные структуры клеток для усиления проникновения и всасывания лекарственного средства. Эмпирическим параметром, который обычно используют для характеристики относительной гидрофильности и гидрофобности поверхностно-активных веществ является гидрофильно-липофильный

20 баланс (величина "HLB"). Поверхностно-активные вещества с более низкими значениями HLB являются более гидрофобными и имеют более высокую растворимость в маслах, в то время как поверхностно-активные вещества с более высокими значениями HLB являются более гидрофильными и имеют более высокую растворимость в водных растворах. В силу этого, обычно считается, что гидрофильные поверхностно-активные

25 вещества являются соединениями, имеющими величину HLB больше, чем приблизительно 10, а гидрофобные поверхностно-активные вещества обычно являются соединениями, имеющими величину HLB меньше, чем приблизительно 10. Однако, эти величины HLB являются просто ориентиром, так как для многих поверхностно-активных веществ величины HLB могут отличаться приблизительно на целых 8 единиц HLB, в зависимости

30 от эмпирического метода, выбранного для определения величины HLB.

[166] К поверхностно-активным веществам, используемым в аэрозольных композициях по изобретению, относятся полиэтиленгликоль (PEG)-жирные кислоты и моно- и диэфиры PEG-жирные кислоты, эфиры PEG и глицерина, продукты

35 трансэтерификации спирт-масло, полиглицериловые эфиры жирных кислот, пропиленгликолевые эфиры жирных кислот, стерол производные стерола, эфиры полиэтиленгликоля сорбитана и жирных кислот, алкиловые эфиры полиэтиленгликоля, сахар и его производные, полиэтиленгликолевые алкилфенолы, блок-сополимеры полиоксиэтилен-полиоксипропилен (POE-POP), эфиры сорбитана и жирных кислот, ионогенные поверхностно-активные вещества, жирорастворимые витамины и их соли,

40 водорастворимые витамины и их амфифильные производные, аминокислоты и их соли и органические кислоты и их эфиры и ангидриды. Каждое из этих поверхностно-активных веществ описано более подробно ниже.

Эфиры полиэтиленгликоля с жирными кислотами

[167] Хотя сам по себе полиэтиленгликоль (PEG) не действует как поверхностно-активное вещество, различные эфиры PEG с жирными кислотами обладают

45 подходящими свойствами поверхностно-активного вещества. Среди моноэфиров PEG с жирными кислотами, наиболее подходящими в вариантах осуществления по настоящему изобретению являются эфиры лауриновой кислоты, олеиновой кислоты и

стеариновой кислоты. Предпочтительные гидрофильные поверхностно-активные вещества включают PEG-8 лаурат, PEG-8 олеат, PEG-8 стеарат, PEG-9 олеат, PEG-10 лаурат, PEG-10 олеат, PEG-12 лаурат, PEG-12 олеат, PEG-15 олеат, PEG-20 лаурат и PEG-20 олеат. Величины HLB находятся в диапазоне 4-20.

5 [168] Диэфиры полиэтиленгликоля с жирными кислотами также подходят для использования в качестве поверхностно-активных веществ в композиции в вариантах осуществления настоящего изобретения. Наиболее предпочтительные гидрофильные поверхностно-активные вещества включают PEG-20 дилаурат, PEG-20 диолеат, PEG-20 дистеарат, PEG-32 дилаурат и PEG-32 диолеат. Величины HLB находятся в диапазоне 5-15.

10 [169] Обычно, в вариантах осуществления настоящего изобретения также применяют смеси поверхностно-активных веществ, в том числе смеси двух или более выпускаемых промышленностью поверхностно-активных веществ, а также смеси поверхностно-активных веществ с другой добавкой или добавками. Некоторые эфиры PEG с жирными кислотами продаются производителями в виде смесей моно- и диэфиров.

Эфиры полиэтиленгликоля и глицерина с жирными кислотами

[170] Предпочтительными гидрофильными поверхностно-активными веществами являются PEG-20 глицерил лаурат, PEG-30 глицерил лаурат, PEG-40 глицерил лаурат, PEG-20 глицерил олеат и PEG-30 глицерил олеат.

20 Продукты трансэтерификации спирта и масла

[171] Большое число поверхностно-активных веществ с различными степенями гидрофобности или гидрофильности могут быть получены реакцией спиртов или полиспирта с различными природными и/или гидрированными маслами. Чаще всего, используются касторовое масло или гидрированное касторовое масло, или пищевое растительное масло, такое как кукурузное масло, оливковое масло, арахисовое масло, косточковое пальмовое масло, косточковое абрикосовое масло или миндальное масло. Предпочтительные спирты включают глицерин, пропиленгликоль, этиленгликоль, полиэтиленгликоль, сорбит и пентаэритрит. Среди этих поверхностно-активных веществ на основе продуктов трансэтерификации спиртов с маслами, предпочтительными гидрофильными поверхностно-активными веществами являются PEG-35 касторовое масло (Incrocas-35), PEG-40 гидрированное касторовое масло (Cremophor RH 40), PEG-25 триолеат (TAGAT.RTM. TO), PEG-60 глицериды кукурузы (Crovol M70), PEG-60 миндальное масло (Crovol A70), PEG-40 косточковое пальмовое масло (Crovol PK70), PEG-50 касторовое масло (Emalex C-50), PEG-50 гидрированное касторовое масло (Emalex HC-50), PEG-8 каприловые/каприновые глицериды (Labrasol) и PEG-6 каприловые/каприновые глицериды (Softigen 767). Предпочтительные гидрофобные поверхностно-активные вещества в этом классе включают PEG-5 гидрированное касторовое масло, PEG-7 гидрированное касторовое масло, PEG-9 гидрированное касторовое масло, PEG-6 кукурузное масло (Labrafil.RTM. M 2125 CS), PEG-6 миндальное масло (Labrafil.RTM. M 1966 CS), PEG-6 косточковое абрикосовое масло (Labrafil.RTM. M 1944 CS), PEG-6 оливковое масло (Labrafil.RTM. M 1980 CS), PEG-6 арахисовое масло (Labrafil.RTM. M 1969 CS), PEG-6 гидрированное косточковое пальмовое масло (Labrafil.RTM. M 2130 BS), PEG-6 косточковое пальмовое масло (Labrafil.RTM. M 2130 CS), PEG-6 триолеин (Labrafil.RTM.b M 2735 CS), PEG-8 кукурузное масло (Labrafil.RTM. WL 2609 BS), PEG-20 глицериды кукурузы (Crovol M40), и PEG-20 глицериды миндаля (Crovol A40).

Эфиры полиглицерина с жирными кислотами

[172] Эфиры полиглицерина с жирными кислотами являются также подходящими поверхностно-активными веществами для использования в вариантах осуществления

настоящего изобретения. Среди эфиров полиглицерина с жирными кислотами, предпочтительные гидрофобные поверхностно-активные вещества включают полиглицерил олеат (Plurol Oleique), полиглицерил-2 диолеат (Nikkol DGDO), полиглицерил-10 триолеат, полиглицерил стеарат, полиглицерил лаурат, полиглицерил миристетат, полиглицерил пальмитат и полиглицерил линолеат. Предпочтительные гидрофильные поверхностно-активные вещества включают полиглицерил-10 лаурат (Nikkol Decaglyn 1-L), полиглицерил-10 олеат (Nikkol Decaglyn 1-0) и полиглицерил-10 моно, диолеат (Caprol.RTM. PEG 860), полиглицерил-10 стеарат, полиглицерил-10 лаурат, полиглицерил-10 миристетат, полиглицерил-10 пальмитат, полиглицерил-10 линолеат, полиглицерил-6 стеарат, полиглицерил-6 лаурат, полиглицерил-6 миристетат, полиглицерил-6 пальмитат и полиглицерил-6 линолеат. Полиглицерил полирицинолеаты (Polymuls) также являются предпочтительными поверхностно-активными веществами.

Эфиры пропиленгликоля с жирными кислотами

[173] Эфиры пропиленгликоля с жирными кислотами являются подходящими поверхностно-активными веществами для использования в вариантах осуществления настоящего изобретения. В этом классе поверхностно-активных веществ, предпочтительные гидрофобные поверхностно-активные вещества включают пропиленгликоль монолаурат (Lauroglycol FCC), пропиленгликоль рицинолеат (Propymuls), пропиленгликоль моноолеат (Myverol P-06), пропиленгликоль дикаприлат/дикапрат (Captex.RTM. 200) и пропиленгликоль диоктаноат (Captex.RTM. 800).

Стерол и производные стерола

[174] Стерол и производные стерола являются подходящими поверхностно-активными веществами для использования в вариантах осуществления настоящего изобретения. Предпочтительные производные включают производные полиэтиленгликоля.

Предпочтительным поверхностно-активным веществом в этом классе является эфир PEG-24 с холестерином (Solulan C-24).

Эфиры полиэтиленгликоля и сорбита с жирными кислотами

[175] Промышленностью производится целый ряд эфиров PEG-сорбита с жирными кислотами, и они являются подходящими для использования в качестве поверхностно-активных веществ в вариантах осуществления настоящего изобретения. Среди эфиров PEG-сорбита с жирными кислотами, предпочтительные поверхностно-активные вещества включают PEG-20 сорбитан монолаурат (Tween-20), PEG-20 сорбитан монопальмитат (Tween-40), PEG-20 сорбитан моностеарат (Tween-60) и PEG-20 сорбитан моноолеат (Tween-80).

Алкиловые эфиры полиэтиленгликоля

[176] Эфиры полиэтиленгликоля и алкиловых спиртов являются подходящими поверхностно-активными веществами для использования в вариантах осуществления настоящего изобретения. Предпочтительные эфиры включают PEG-3 олеиловый эфир (Volpo 3) и PEG-4 лауриловый эфир (Brij 30).

Сахар и его производные

[177] Производные сахара являются подходящими поверхностно-активными веществами для использования в вариантах осуществления настоящего изобретения. Предпочтительные поверхностно-активные вещества в этом классе включают монопальмитат сахарозы, монолаурат сахарозы, деканоил-N-метилглюкамид, н-децил-β-D-глюкопиранозид, н-децил-β-D-мальтопиранозид, н-додецил-β-D-глюкопиранозид, н-додецил-β-D-мальтозид, гептаноил-N-метилглюкамид, н-гептил-β-D-глюкопиранозид, н-гептил-β-D-тиоглюкозид, н-гексил-β-D-глюкопиранозид, нонаноил-N-метилглюкамид, н-нонил-β-D-глюкопиранозид, октаноил-N-метилглюкамид, н-октил-β-D-

глюкопиранозид и октил- β -D-тиоглюкопиранозид.

Эфиры полиэтиленгликоля с алкилфенолами

[178] Промышленность производит некоторые поверхностно-активные вещества на основе эфиров PEG с алкилфенолами, такие как эфир PEG-10-100 с нонилфенолом и эфир PEG-15-100 с октилфенолом, тилоксапол, октоксинал, ноноксинал, и они являются подходящими для использования в вариантах осуществления настоящего изобретения.

Блок-сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена (POE-POP)

[179] Блок-сополимеры POE-POP представляют собой уникальный класс полимерных поверхностно-активных веществ. Уникальная структура поверхностно-активных веществ с гидрофильными POE фрагментами и гидрофобными POP фрагментами в четко определенных соотношениях и положениях обеспечивает большое разнообразие поверхностно-активных веществ, подходящих для использования в вариантах осуществления настоящего изобретения. Эти поверхностно-активные вещества производятся промышленностью под различными торговыми названиями, в том числе серии Synperonic PE (фирмы ICI); серии Pluronic.RTM. (фирмы BASF), Emkalyx, Lutrol (фирмы BASF), Supronic, Monolan, Pluracare и Plurodac. Общим обозначением для этих полимеров является "полоксамер" (CAS 9003-11-6). Эти полимеры имеют формулу: $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a\text{H}$, где "a" и "b" обозначают число звеньев полиоксиэтилена и полиоксипропилена, соответственно.

[180] Предпочтительные гидрофильные поверхностно-активные вещества этого класса включают полоксамеры 108, 188, 217, 238, 288, 338 и 407. Предпочтительные гидрофобные поверхностно-активные вещества в этом классе включают полоксамеры 124, 182, 183, 212, 331 и 335.

Эфиры сорбита и жирных кислот

[181] Эфиры сорбита и жирных кислот являются подходящими поверхностно-активными веществами для использования в вариантах осуществления настоящего изобретения. Среди этих эфиров, предпочтительные гидрофобные поверхностно-активные вещества включают сорбитан монолаурат (Arlacel 20), сорбитан монопальмитат (Span-40), сорбитан моноолеат (Span-80), сорбитан моностеарат.

[182] Сорбитан монопальмитат, амфифильное производное витамина С (которое имеет активность витамина С), может выполнять две важных функции в системах солюбилизации. Во первых, оно обладает эффективными полярными группами, которые могут модулировать среду в ограниченном пространстве. Эти полярные группы являются теми же группами, которые делают сам по себе витамин С (аскорбиновую кислоту) одним из наиболее водорастворимых известных органических твердых соединений: аскорбиновая кислота имеет растворимость в воде приблизительно до 30 масс.% (например, очень близко к величине растворимости хлорида натрия). И во-вторых, при увеличении pH происходит превращение фракции аскорбилпальмитата в более растворимую соль, такую как аскорбилпальмитат натрия.

Ионогенные поверхностно-активные вещества

[183] Ионогенные поверхностно-активные вещества, в том числе катионные, анионные и цвиттер-ионные поверхностно-активные вещества, являются подходящими гидрофильными поверхностно-активными веществами для использования в вариантах осуществления настоящего изобретения. Предпочтительные ионогенные поверхностно-активные вещества включают четвертичные аммониевые соли, соли жирных кислот и соли желчных кислот. В частности, предпочтительные ионогенные поверхностно-активные вещества включают бензалкония хлорид, бензетония хлорид, цетилпиридиния хлорид, додецилтриметиламмония бромид, додецилсульфаты натрия,

диалкилметилбензиламмония хлорид, эдрофония хлорид, домифена бромид, диалкилэфиры натрия сульфоянтарной кислоты, диоктилсульфосукцинат натрия, холат натрия и таурохолат натрия. Эти четвертичные аммониевые соли являются предпочтительными добавками. Они могут быть растворены как в органических растворителях (таких как этанол, ацетон и толуол), так и в воде. Это обстоятельство является особенно полезным при нанесении слоя покрытия на медицинские устройства, так как это упрощает процесс приготовления и нанесения покрытия и достижение высоких адгезионных характеристик. Водонерастворимые лекарственные средства обычно растворяют в органических растворителях.

Жирорастворимые витамины и их соли

[184] Витамины А, D, Е и К во многих своих различных формах и провитаминовых формах считают жирорастворимыми витаминами, и в дополнение к ним, ряд других витаминов и источников витаминов или родственных соединений также являются жирорастворимыми и имеют полярные группы и относительно высокие коэффициенты распределения в двухфазной системе октанол-вода. Совершенно ясно, что общий класс таких соединений имеет предысторию их безопасного применения и характеризуется высоким соотношением между выгодой и риском, что делает их полезными в качестве добавок в вариантах осуществления настоящего изобретения.

[185] Следующие жирорастворимые производные витаминов и/или источников могут также применяться в качестве добавок: альфа-токоферол, бета-токоферол, гамма-токоферол, дельта-токоферол, ацетат токоферола, эргостерол, 1-альфа-гидроксиколекальциферол, витамин D2, витамин D3, альфа-каротин, бета-каротин, гамма-каротин, витамин А, фурсультиамин, метилолрибофлавин, октотиамин, просультиамин, рибофлавин, винтиамол, дигидровитамин К1, менадиол диацетат, менадиол дибутират, менадиол дисульфат, менадиол, витамин К1, витамина К1 оксид, витамины К2 и витамин К-S(II). Фолиевая кислота также относится к этому типу, и хотя она растворима в воде при физиологическом рН, она может быть получена в форме свободной кислоты. Другие производные жирорастворимых витаминов, применяемые в вариантах осуществления настоящего изобретения, могут быть легко получены с помощью хорошо известных химических реакций с гидрофильными молекулами.

Водорастворимые витамины и их амфифильные производные

[186] Витамины В, С, U, пантотеновую кислоту, фолиевую кислоту и некоторые из менадион-родственных витаминов/провитаминов во многих своих различных формах считают водорастворимыми витаминами. Они могут быть также конъюгированы или могут образовывать комплексы с гидрофобными фрагментами или многовалентными ионами с получением амфифильных форм, имеющих относительно высокие коэффициенты распределения в двухфазной системе октанол-вода и полярные группы. Кроме того, такие соединения могут иметь низкую токсичность и высокое соотношение между выгодой и риском, что позволяет их применять в качестве добавок в вариантах осуществления настоящего изобретения. Их соли могут также применяться в качестве добавок в настоящем изобретении. Примеры водорастворимых витаминов и их производных включают, без ограничения, ацетиамин, бенфотиамин, пантотеновую кислоту, цетотиамин, циклотиамин, декспантенол, ниацинамид, никотиновую кислоту, пиридоксаль-5'-фосфат, никотиамида аскорбат, рибофлавин, рибофлавина фосфат, тиамин, фолиевую кислоту, менадиола дифосфат, менадиона натрия бисульфит, менадоксим, витамин В12, витамин К5, витамин К6, витамин К6 и витамин U. Кроме того, как упоминалось выше, фолиевая кислота в форме соли растворима в воде в широком диапазоне значений рН, включая физиологическое значение рН.

[187] Соединения, в которых присутствует аминогруппа или другая группа с основными свойствами, могут быть легко модифицированы путем проведения простой кислотнo-основной реакции с кислотой, содержащей гидрофобную группу, такой как жирная кислота (в частности лауриновая, олеиновая, миристиновая, пальмитиновая, стеариновая или 2-этилгексановая кислота), плохо растворимая аминокислота, бензойная кислота, салициловая кислота или кислотный жирорастворимый витамин (такой как рибофлавин). Другие соединения могут быть получены путем реакции с такой кислотой по другой группе на витамине, такой как гидроксильная группа, с образованием связи, такой как эфирная связь, и так далее. Производные водорастворимого витамина, содержащие кислотную группу, могут быть получены в реакциях с реагентом, содержащим гидрофобную группу, таким как стеариламин или рибофлавин, например, с получением соединения, которое применяется в вариантах осуществления настоящего изобретения. Присоединение пальмитатной цепи к витамину С дает аскорбил пальмитат.

Аминокислоты и их соли

[188] Аланин, аргинин, аспарагины, аспарагиновая кислота, цистеин, цистин, глутаминовая кислота, глутамин, глицин, гистидин, пролин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, серин, треонин, триптофан, тирозин, валин и их производные являются еще одними применяемыми добавками в вариантах осуществления изобретения.

[189] Определенные аминокислоты в их цвиттер-ионной форме и/или в форме солей с одновалентным или многовалентным ионом имеют полярные группы, относительно высокие коэффициенты распределения в двухфазной системе октанол-вода, и они применяются в вариантах осуществления настоящего изобретения. В контексте настоящего изобретения, "плохо растворимая аминокислота" обозначает аминокислоту, которая имеет растворимость в незабуференной воде менее чем приблизительно 4% (40 мг/мл). Эти аминокислоты включают цистин, тирозин, триптофан, лейцин, изолейцин, фенилаланин, аспарагин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту и метионин.

Органические кислоты и их эфиры и ангидриды

[190] Примерами являются уксусная кислота и ангидрид, бензойная кислота и ангидрид, ацетилсалициловая кислота, дифлунизал, 2-гидроксиэтилсалицилат, диангидрид диэтилентриамин-пентауксусной кислоты, этилендиаминтетрауксусный диангидрид, малеиновая кислота и ангидрид, янтарная кислота и ангидрид, дигликолевый ангидрид, глутаровый ангидрид, аскорбиновая кислота, лимонная кислота, винная кислота, молочная кислота, щавелевая кислота, аспарагиновая кислота, никотиновая кислота, 2-пирролидон-5-карбоновая кислота и 2-пирролидон.

[191] Эти эфиры и ангидриды растворимы в органических растворителях, таких как этанол, ацетон, метилэтилкетон, этилацетат. Водорастворимые лекарственные средства могут быть растворены в органическом растворителе вместе с этими эфирами и ангидридами, затем легко нанесены на медицинское устройство, затем подвергнуты гидролизу при высоких значениях pH. Гидролизованые ангидриды или эфиры представляют собой кислоты или спирты, которые являются водорастворимыми и могут эффективно переносить лекарственные средства с устройства на стенки сосудов.

ПРИМЕРЫ

[192] Далее изобретение описывается с помощью примеров, которые не ограничивают объем изобретения, заявленный в пунктах формулы изобретения.

Пример 1: Водная аэрозольная лекарственная форма

Готовили приводимую в качестве примера водную лекарственную форму рапамицина, используя следующие компоненты.

Компонент	Количество (г)	Массовая доля
Рапамицин	0,1	0,01%
Этанол	250	25%
Пропиленгликоль	250	25%
Полисорбат 80	0,02	0,002%
Вода	500	50%
Суммарно	1000	

[193] Методика смешения: смешивают в мерной колбе янтарного цвета объемом 1000 мл 250 г пропиленгликоля и 250 г этанола до образования однородного раствора. Затем в растворе пропиленгликоля и этанола последовательно растворяют сначала 100 мг рапамицина, затем 20 мг полисорбата 80. Добавляют воду с целью доведения объема до 1000 мл и перемешивают или диспергируют с помощью ультразвука до тех пор, пока не образуется однородный раствор и не растворится весь рапамицин. Хранят при контролируемой температуре в защищенном от действия света месте.

Пример 2: Лекарственная форма в виде сухого порошка

[194] Партия 06RP68.HQ00008 и 06RP68.HQ00009. Каждая из этих двух лекарственных форм представляет собой смесь микронизированных частиц лекарственного средства (рапамицина), диспергированных на поверхности частиц лактозного носителя. Готовая композиция в каждой партии включает 1% (по массе) частиц лекарственного средства, имеющих средний диаметр приблизительно 2,60 микрона и 3,00 микрона, соответственно. Частицы лекарственного средства, имеющие подходящий фракционный состав, получают методом влажного полирования (партия 06RP68.HQ00008) или методом помола на струйной мельнице (партия 06RP68.HQ00009), которые описаны ниже. В этом примере использовали 1% (по массе) рапамицина, но на практике его концентрация может составлять от 0,5 до 20%. Частицы носителя состоят из смеси двух носителей, Respitose® SV003, присутствующего при концентрации 95,5% (по массе) и имеющего размер частиц приблизительно от 30 до 100 микрон (эквивалентный сферический диаметр), и Respitose® LH300 (Lactohale 300), присутствующего при концентрации 5,5% (по массе) и имеющего размер частиц менее чем 10 микрон (эквивалентный сферический диаметр). После смешения, проводили анализ смесей с целью подтверждения гомогенности и содержания лекарственного средства, равного 1%.

[195] Для уменьшения агломерации частиц лекарственного средства и для облегчения распыления частиц лекарственного средства в виде аэрозоля, необязательно включают несколько других вспомогательных веществ. Необязательные вспомогательные вещества включают фосфолипиды, такие как дипальмитилфосфатидилхолин (DPPC) и лецитин, и соли металлов с жирными кислотами, такие как стеарат магния. Они могут быть нанесены на частицы носителя при массовом отношении вспомогательного вещества к крупной частице носителя в диапазоне от 0,01 до 0,5%.

[196] Заполнение капсулы: 20 миллиграмм порошковых смесей из партии 06RP68.HQ00008 и партии 06RP68.HQ00009 загружали в капсулы размера #3 из гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMC) с получением готовой лекарственной формы. В случае этих смесей, целесообразно загружать от 5 до 35 миллиграмм лекарственного средства в капсулы размера #3 и выпускать из капсулы более чем 95% загруженной смеси после включения устройств Plastiap® RS01 Model 7 или Plastiap® RS00 Model 8 при расходах в диапазоне от 60 до 100 литров в минуту.

Пример 3: Определение рапамицина в легких и крови после его введения мышам линии C57BL/6 путем распыления через ротолотку (OPA) и путем перорального введения через зонд

[197] Это исследование проводили с целью оценки концентрации рапамицина у самцов

мышей линии C57BL/6 после введение рапамицина при самой высокой запланированной для исследования дозе 1 мг/кг через зонд и путем распыления через ротоглотку (ORA). Был разработан метод анализа рапамицина в крови и гомогенате легочной ткани мышей с использованием жидкостной хроматографии с детектированием методом тандемной масс-спектрометрии (LC-MS/MS). Калибровочные кривые рапамицина получали для диапазона от 1 нг/мл до 2000 нг/мл для крови мышей, и от 2 нг/мл до 20000 нг/мл для гомогената ткани легких мышей, определяя каждую концентрацию три раза.

Достоверность, точность и линейность соответствовали ожидаемым диапазонам.

[198] В предварительных исследованиях, оценивали эффективность доставки носителя в легкие путем распыления через ротоглотку 50 мкл голубого красителя Эванса (Evans Blue) каждой мыши. Присутствие голубого красителя только в легких подтверждали визуально, и отсутствие голубого красителя в желудке позволяло сделать вывод, что при используемой методике доставка в желудок исключается.

[199] Рапамицин вводили самцам мышей линии C57BL/6 (N=6) через зонд при дозе 1,0 мг/кг или перорально или путем распыления через ротоглотку (ORA). Пероральную дозу готовили, используя пероральную жидкую лекарственную форму Rapamune Oral® (фирмы Pfizer). Рапамицин для ORA готовили путем растворения исследуемого препарата в соответствующем объеме этанола и затем добавления соответствующего объема воды с получением 10% этанольного раствора с концентрацией 1 мг рапамицина/мл.

Рапамицин вводили 2 группам из 6 самцов мышей линии C57BL/6 распылением через ротоглотку (ORA) под анестезией изофлураном. Дополнительная группа из 6 мышей получала только плацебо (10% этанола в воде). Через 1 час после введения, группу из 6 мышей, получавших рапамицин перорально и распылением через ротоглотку (ORA) подвергали эвтаназии, и кровь собирали путем пункции сердца, а легкие удаляли.

Оставшихся мышей в каждой группе, которым вводили рапамицин или плацебо распылением через ротоглотку (ORA), наблюдали в течение еще 3 дней. При вскрытии через 72 часа, кровь собирали путем пункции сердца, а легкие удаляли. В течение 72 часов после дозирования рапамицина или плацебо у мышей не было отмечено никаких отрицательных последствий.

[200] Концентрацию рапамицина определяли в собранной крови и гомогенате легких методом LC-MS/MS. Через 1 час после распыления рапамицин через ротоглотку (ORA), концентрация рапамицина в легочной ткани была в ~6 раз выше (3794 ± 1259 нг/г tissue), чем в крови (641 ± 220 нг/мл). После перорального введения аналогичной дозы рапамицина, через 1 час концентрации рапамицина в легких и крови составляли 71 ± 43 нг/г и 23 ± 16 нг/мл, соответственно. Концентрации рапамицина в гомогенате легких после ORA были в 53 раза выше, чем концентрации рапамицина после перорального введения одной и той же высокой дозы (1 мг/кг) рапамицина. Полученные данные позволяют сделать предположение, что доставка более низких доз рапамицина в легкие (уровней доз, которые не насыщают систему) будет давать в результате уровни рапамицина в легких, которые могут быть достигнуты при пероральном дозировании, но при значительно более низком уровне рапамицина в крови, чем уровень в крови, который достигается при пероральном дозировании.

Материалы и методы

[201] Исследуемое вещество: сиролимус (рапамун, рапамицин) молекулярная масса 914,172, $C_{51}N_{79}NO_{12}$, CAS NUMBER: 53123-88-9 (номер химического вещества по реферативному журналу "Chemical Abstracts"). Исходное вещество (для перорального введения через зонд): Rapamune Oral® (фирмы Pfizer) для перорального введения, Lot No.: MWGT, Expiration: 07/16. Исходное вещество (для распыления через ротоглотку

(OPA)): твердый рапамицин (сиролимус), фирмы LC Laboratories, Woburn MA, Lot No.: ASW-127, Expiration: 12/2023.

[202] Животные: самцы мышей линии C57BL/6 в возрасте около 8 недель компании Charles River Laboratories, Inc, Raleigh, NC. Животных кормили сертифицированным кормом Purina Rodent Chow #5002 и обеспечивали без ограничения питьевой водой. Анализ каждой партии корма на содержания питательных веществ и возможных загрязняющих примесей проводила фирма-поставщик, его результаты рассматривал ответственный исполнитель исследования и фиксировал в материалах исследования. Корм хранили при температуре приблизительно 60-70°F, и период его использования не превышал шести месяцев с момента его измельчения. Мышей содержали (в каждой клетке по одной мыши) в поликарбонатных клетках с проволочными крышками из нержавеющей стали, снабженных емкостью для питьевой воды. Размеры клеток для мышей составляют приблизительно 29,2 см x 19,1 см x 12,7 см высота (площадь пола 451,6 см²). Контактная подстилка представляла собой стружки из древесины твердых пород Sani-Chips (фирмы P. J. Murphy Forest Products Co.; Montville, NJ). Мышей подвергали карантину в течение 5 дней до начала их использования в исследовании. Ветеринар или его квалифицированный помощник проводили осмотр животных перед снятием с них карантина. Температуру и относительную влажность в помещениях для содержания животных, используемых в научных исследованиях, непрерывно контролировали, регулировали и регистрировали в режиме реального времени, используя автоматизированную систему (Siebe/Barber-Colman Network 8000 System with Revision 4.4.1 for Signal® software [Siebe Environmental Controls (SEC)/Barber-Colman Company; Loves Park, IL]). Заданные диапазоны изменений окружающей среды составляли 64-79°F (18°C-26°C) для температуры и 30-70% для относительной влажности при 12 часовом цикле дня и ночи в сутки. В конце жизненной фазы, мышей подвергали эвтаназии путем избыточного воздействия диоксида углерода.

[203] Исследуемые химические препараты: краситель Evans Blue готовили с концентрацией 0,5% в отношении веса к объему в стерильной дистиллированной воде. Препарат Rapamune Oral® вводили в том виде, в котором его поставляли для перорального дозирования. Рапамицин (в твердом виде) растворяли в этаноле и разбавляли стерильной дистиллированной водой с получением конечной концентрации 0,5 мг/мл в 10% этаноле.

[204] Дозирование: каждое животное взвешивали перед дозированием для определения величины вводимой дозы. Для введения разовой дозы через зонд использовали стеклянный шприц объемом 100 мкл (Hamilton, Reno, NV), оснащенный зондом с дозирующей иглой 20-G со сферическим наконечником из нержавеющей стали (Porper & Sons Inc., New Hyde Park, NY). Дозу, вводимую каждому животному, определяли по разнице масс заполненного шприца и опорожненного шприца. Время дозирования регистрировали. Дозирование животных было разнесено по времени, для того чтобы можно было собирать кровь в соответствующие моменты времени. Лекарственные формы дозы, вводимые в каждой группе, показаны ниже.

[205] Для группы животных, которым вводили лекарственное средство путем распыления через ротоглотку, разовую дозу рапамицина (50 мкл) вводили каждой мышью под анестезией изофлураном, используя стеклянный шприц объемом 100 мкл (Hamilton, Reno, NV), оснащенный зондом с дозирующей иглой 20-G со сферическим наконечником из нержавеющей стали (Porper & Sons Inc., New Hyde Park, NY). Мышь взвешивали перед дозированием, и вводимую дозу рапамицина регистрировали по массе. Каждую мышь анестезировали изофлураном и поддерживали ее рот открытым.

Язык фиксировали к одной стороне рта с помощью зажимов, и дозу медленно впрыскивали в дистальную часть ротовой полости. Ноздри закрывали пальцем в течение двух вдохов для обеспечения распыления (Rao et al., 2003).

Таблица 1: Краткая информация по плану исследования

Группа дозирования	Способ	Соединение	Число животных	Исследуемая доза (мг/мл)	Исследуемая доза (мкл)	Исследуемая доза (мг/кг)	Момент времени отбора образцов (час)	Собранные образцы
1	ОА	Краситель голубой Эванса	6	-	50	0	1	Кровь, легкие
2	ОА	Рапамицин	6	0,5	50	1,0	1	Кровь, легкие
3	Зонд	Рапамун пероральный	6	1,0	25	1,0	1	Кровь, легкие
4	ОА	Плацебо	6	0	50	1,0	72	Кровь, легкие
5	ОА	Рапамицин	6	0,5	50	1,0	72	Кровь, легкие

[206] Сбор образцов крови и легкого: по окончании исследования (через 1 час или через 72 часа после дозирования), мышей подвергали эвтаназии путем воздействия на них CO_2 , и собирали кровь путем пункции сердца вместе с дикалием ЭДТА в качестве антикоагулянта. Легочную ткань вырезали и делили на правое и левое легкое. Левое легкое использовали для анализа, а правое легкое очень быстро замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C для последующего анализа.

[207] Анализ рапамицина в образцах методом LC-MS/MS: метод LC-MS/MS для анализа рапамицина в легком и крови был разработан на основе метода, описанного в публикации Wu et al. (2012). Объемы крови и гомогената легкого были существенно уменьшены по сравнению с опубликованным в литературе методом. Триамцинолон использовали в качестве внутреннего стандарта.

[208] Гомогенат легкого получали гомогенизацией взвешенных образцов легкого с помощью шарикоподшипников размером 2,8 мм в гомогенизаторе SPEX SamplePrep 2010 Geno/Grinder при соотношении ткани и деионизированной воды 1:3 в отношении веса к объему.

[209] Концентрации стандартов готовили таким образом, чтобы каждый стандарт представлял собой разбавление резервного исходного стандартного раствора. Для количественного определения анализируемого вещества использовали калибровочную кривую, построенную по шести точкам, определение каждой из которых проводили три раза. Для аппроксимации кривой использовали модель простой линейной регрессии с взвешиванием или без взвешивания параметров модели. Диапазон измеряемых концентраций составлял 1-2000 нг/мл в крови и 2-2000 нг/мл в гомогенате легкого.

[210] Считали приемлемыми следующие параметры применяемого метода: коэффициент смешанной корреляции, $r^2 \geq 0,98$ для зависимости концентрация-эффект; погрешность номинального значения $\leq \pm 15\%$ (для концентраций выше предела обнаружения (LOQ)) или $\leq \pm 20\%$ (для концентраций в пределах обнаружения). r^2 составлял больше 0,999 при всех анализах.

[211] Тридцать (30) микролитров анализируемого вещества, 30 мкл раствора добавки (метанол для холостых опытов и образцов), 10 мкл раствора внутреннего стандарта (в MeOH) и 90 мкл MeOH загружали с помощью пипетки в микроцентрифужные пробирки, быстро встряхивали, затем центрифугировали в течение 6 минут при 10000 об/мин при $\sim 4^\circ\text{C}$. Аликвоты (90 мкл) надосадочной жидкости переносили в вials с объемными вставками для жидкостной хроматографии, и затем анализировали методом

LC-MS/MS (таблица 2).

Таблица 2: Метод LC-MS/MS

5	Колонка	Waters Acquity UPLC HSS T3 1,8 мкм, 2,1×50 мм вместе с VanGuard 2,1×5 мм HSS T3 1,8 мкм.
	Подвижная фаза А	10 мМ ацетата аммония в воде, 0,1% уксусной кислоты
	Подвижная фаза В	MeOH
	Объем вводимой пробы	2 мкл
	Расход	0,5 мл/мин
10	Градиент	70% А в течение 1 минуты, линейный градиент до 5% А от 1 до 3 минуты, выдержка в течение 1 минуты, линейный градиент до 70% А от 4 до 5,1 минуты, и выдержка при 70% до 6 минут
	Рапамицин MRM	931,70→864,70
	Триамцинолон (IS MRM)	395,30→357,20

[212] Сбор и представление данных: полученные при исследовании данные собирали и представляли в лабораторной информационной системе Debra™ version 5.5.10.72 (фирмы Lablogic Systems Ltd., Sheffield, England). Эти данные включают массу тела животных, введенную дозу, период дозирования и время сбора образцов. Расчеты введенной дозы и время сбора образцов были представлены с помощью системы Debra™.

Результаты

[213] Анализ рапамицина: анализ рапамицина был скорректирован для объемов образцов 30 мкл крови и гомогената легкого. Примеры хроматограмм приведены для рапамицина и внутреннего стандарта в крови и легких (Фигуры 1 и 2). Перед проведением исследования образцов, для верификации применяемого метода, получали калибровочные кривые для легкого и крови, каждую точку на которых определяли три раза. Диапазон калибровки составлял 1,0-2000 нг/мл для крови и 1-20000 нг/мл для гомогената легкого. Гомогенат легкого готовили путем гомогенизации 1 г ткани легкого в 3 объемах воды с получением гомогената 1:4. Калибровочные кривые показаны на Фигурах 3 и 4 для крови, гомогената легкого и растворителя.

[214] Распыление через ротоглотку: перед введением рапамицина распылением через ротоглотку, использовали введение красителя Evans Blue для верификации того, что этот способ ОРА позволял доставлять дозу в легкие. Мышей анестезировали изофлураном и вводили им краситель Evans Blue методом распыления через ротоглотку (ОРА), используя шприц, снабженный иглой с тупым концом. Сразу после проведения ОРА, мышей подвергали эвтаназии, и легкие и желудок визуально обследовали, для того чтобы убедиться, что краситель Evans Blue попадает в легкие и не попадает в желудок. Четырем мышам был успешно введен краситель Evans Blue, при этом было обнаружено, что все количество красителя находится в легких, и он отсутствует в желудке.

[215] Введение рапамицина: Определяли массу вводимого раствора дозы путем взвешивания заполненного шприца раствором дозы перед дозированием и взвешивания шприца после дозирования. Массу вводимого раствора дозы использовали для расчета введенного количества рапамицина. Время дозирования регистрировали как 0. Животных в группах 2 и 3 подвергали эвтаназии через 1 час после дозирования. Животных в группах 4 и 5 обследовали через 72 часа после дозирования. Не было обнаружено никаких значительных клинических проявлений в любой из этих групп.

[216] Анализ рапамицина в крови и легких: рапамицин анализировали в крови и гомогенате левого легкого мышей и во всех собранных образцах (Фигуры 6 и 7). Образцы правого легкого каждого животного сохраняли для возможных дополнительных анализов. Сводные данные для образцов приведены в таблице 3.

Таблица 3: Концентрация рапамицина в крови и легких после перорального введения рапамицина или введения рапамицина путем распыления через ротолотку (ОРА) мышам (1 мг/кг)

5	Номер животного	Способ введения	Время после введения дозы (час)	Легкие (нг/г ткани)	Кровь (нг/мл)
	2-07	ОРА	1	5040	615,5
	2-08	ОРА	1	2642	455,5
	2-09	ОРА	1	4500	622
	2-10	ОРА	1	1874	364,5
10	2-11	ОРА	1	4006	937
	2-12	ОРА	1	4700	848,5
	Среднее значение			3794	641
	Стандартное отклонение			1259	220
15	3-13	Зонд	1	109,8	49,85
	3-14	Зонд	1	24,66	11,3
	3-15	Зонд	1	122,8	28,7
	3-16	Зонд	1	54	28,35
	3-17	Зонд	1	< предела обнаружения	2,845
	3-18	Зонд	1	43	19,35
20	Среднее значение			71	23
	Стандартное отклонение			43	16
25	5-25	ОРА	72	11,7	< расчетного предела обнаружения
	5-26	ОРА	72	11,4	< расчетного предела обнаружения
	5-27	ОРА	72	15,7	< расчетного предела обнаружения
	5-28	ОРА	72	10,8	< расчетного предела обнаружения
	5-29	ОРА	72	11,9	< расчетного предела обнаружения
	5-30	ОРА	72	13,6	< расчетного предела обнаружения
30	Среднее значение			12,5	
	Стандартное отклонение			1,9	

[217] Для всех наборов образцов, калибровочную кривую, полученную путем проведения трех параллельных экспериментов, анализировали с помощью следующей последовательности: стандартный набор, копия образца 1, стандартный набор, копия образца 2, стандартный набор. Через 1 час после введения рапамицина путем распыления через ротолотку (ОРА), концентрация рапамицина была ~6 раз выше в легочной ткани (3794 ± 1259 нг/г ткани), чем в крови (641 ± 220 нг/мл). После перорального введения аналогичной дозы рапамицина, через 1 час концентрации рапамицина в легком и крови составляли 71 ± 43 нг/г и 23 ± 16 нг/мл, соответственно. Концентрации в гомогенате легкого после ОРА были в 53 раза выше, чем концентрации, измеренные после перорального введения аналогичной высокой дозы (1 мг/кг) рапамицина.

Обсуждение

[218] В этом исследовании определяли концентрации рапамицина в крови и легочной ткани после введения рапамицина в виде имеющейся в продаже пероральной лекарственной формы с помощью зонда, и после введения рапамицина путем распыления через ротолотку (ОРА) в форме суспензии, приготовленной в 10% водном этаноле. После дозирования путем ОРА, в течение времени вплоть до 72 часов, у мышей, которым

вводили рапамицин или плацебо, не было обнаружено никаких отрицательных побочных воздействий. Перед введением рапамицина, был разработан метод анализа, и был верифицирован способ распыления через ротоглотку (ОРА) путем введения красителя в легкие этим способом. Концентрации рапамицина в легких после ОРА были в 6 раз
 5 выше, чем в крови. Через 72 часа после ОРА, рапамицин присутствовал в крови в концентрациях ниже предела количественного определения, но обнаруживался в легких. Это исследование показало, что рапамицин присутствует в системе организма после ингаляционного введения, и что его концентрации в легочной ткани значительно превышают концентрации в крови в ранние и более поздние моменты времени после
 10 его доставки в легкое.

[219] Эти результаты дополнительно демонстрируют, что рапамицин, доставленный непосредственно в легкое, достигает неожиданно высокой локальной концентрации в легочной ткани по сравнению с концентрацией в крови. Этот результат был полностью неожиданным, исходя из того, что известно по поводу фармакологии рапамицина, на
 15 основании которой можно было ожидать приблизительно равную концентрацию лекарственного средства в легочной ткани и в крови, так как известно, что рапамицин равномерно распространяется в тканях организма и должен быстро удаляться из легкого в силу его высокой липофильности. Соответственно, эти результаты указывают, что непосредственное введение рапамицина в легкие позволяет достигать достаточно
 20 высокой величины доставляемой дозы для оказания терапевтического эффекта, и в тоже самое время достигать почти необнаруживаемого системного воздействия, благодаря чему исключаются токсические явления, связанные с пероральным введением, которые обусловлены системным воздействием лекарственного средства. Хотя в более ранних исследованиях также выражалось беспокойство и по поводу токсического
 25 воздействия рапамицина на сами легкие, но полученные в изобретении результаты дополнительно неожиданно указывают, что относительно высокие количества рапамицина не проявляют сильной токсичности в отношении легочной ткани.

Пример 4. Ингибирование рапамицином жизнеспособности мутантных клеток TSC2 и ингибирование фосфорилирования S6

[220] Антипролиферативную активность рапамицина исследовали в отношении
 30 полученных при ангиомиолипOME (AML) клеток линии TRI-AML101, дефицитных по TSC2. Линия клеток TRI-AML101 была получена из TSC2 дефицитной первичной AML человека и предоставлена доктором Элизабет Хенске (Dr. Elizabeth Henske, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA). Опухолевые клетки были иммортализованы
 35 двухстадийным методом. Сначала клетки инфицировали амфотропным ретровирусом LXSN16E6E7, который кодирует открытые рамки считывания HPV16 E6 и E7 и кассету с геном резистентности к неомицину. Клетки экспандировали и отбирали резистентные клетки к неомицину. Индивидуальные клоны выделяли и замораживали. Далее, трансфицировали ген теломеразы (hTERT) человека кассетой с геном резистентности
 40 к гигромицину (pLXSN hTERT-hyg-плазмида) и отбирали стабильную линию путем отбора резистентных клеток к гигромицину.

Активность рапамицина исследовали на клетках TRI-AML101 путем проведения 10-точечного анализа жизнеспособности клеток от величины дозы. Две тысячи клеток в 50 мкл среды для выращивания (DMEM, 10% FBS и 1% пенициллин/стрептомицин)
 45 высевали в каждой лунке в 96-луночный планшете. Через 24 часа после посева клеток, к клеткам добавляли еще 50 мкл среды для выращивания, содержащей рапамицин (0,0005-5000 нМ, 10-кратные разведения, конечная концентрация ДМСО 0,1%), или только ДМСО. Через 72 часа после добавления соединения, определяли относительную

жизнеспособность клеток с помощью люминесцентного анализа CellTiter-Glo® (фирмы Promega), и результат выражали в процентах относительно контрольных клеток, обработанных плацебо (ДМСО). Рапамицин ингибировал жизнеспособность клеток при его концентрациях уже при 0,05 нМ (фигура 7, нижняя часть). Было также продемонстрировано ингибирование сигнального пути mTOR путем измерения уровней фосфорилированного S6 вестерн-блоттингом. Клетки AML инкубировали вместе с 20 нМ рапамицина в течение 24 часов. Затем проводили вестерн-блоттинг, на основании которого было показано, что рапамицин эффективно ингибирует фосфорилирование S6 (фигура 7, верхняя часть).

Пример 5. Фосфорилирование S6 в мышинеом легком после перорального введения рапамицина и распыления рапамицина через ротоглотку (ОРА)

[221] Как уже обсуждалось выше, проведенные эксперименты по распределению рапамицина в легочной ткани и в крови после перорального введения и распыления через ротоглотку (ОРА) показали, что непосредственное введение рапамицина в легкие позволяет достигать достаточно высокой величины доставляемой дозы для оказания терапевтического эффекта, и в то же время достигать очень низкого системного воздействия, благодаря чему одновременно повышается терапевтическая эффективность и устраняются многие токсические явления, связанные с пероральным введением рапамицина. Для подтверждения этого подхода, было использовано присутствие фосфорилированного белка S6 в легочной ткани мыши в качестве биомаркера активности mTOR. В используемом штамме мышей (C57bl/6), клетки верхнего дыхательного пути и эпителиальные клетки альвеол имеют конститутивно активный (фосфорилированный, "p") белок S6. Белок S6 обычно фосфорилируется с помощью S6K, который находится в сигнальном пути ниже mTORC1 и активируется, например, после факторов роста, таких как эпидермальный фактор роста (EGF), АКТ, ERK и RSK. mTORC1 способствует клеточному росту и пролиферации путем стимуляции анаболических процессов, таких как биосинтез липидов, белков и органелл, а также путем подавления катаболических процессов, таких как аутофагия. Сигнальный путь mTORC1 воспринимает и интегрирует внутриклеточные и внеклеточные сигналы, в том числе факторы роста, кислород, аминокислоты и энергетический статус, для регуляции широкого круга процессов, таких как синтез белка и липидов и аутофагия. mTORC1 является высоко восприимчивым к действию рапамицина.

[222] В настоящем исследовании, легочную ткань брали у мышей линии C57bl/6, подвергнутых, как обсуждалось выше, воздействию либо плацебо (n=6), либо 1 мг/кг рапамицина, вводимого путем распыления через ротоглотку (ОРА) (n=6) или через пероральный зонд (n=6), в два момента времени после дозирования, через 1 час и через 72 часа. Как уже обсуждалось выше, через 1 час после введения путем распыления через ротоглотку (ОРА), рапамицин обнаруживали с концентрацией 641 нг/мл в крови и 3794 нг/г ткани в легком, и через 72 часа все еще обнаруживали в легком с концентрацией 12,5 нг/г, при этом его не обнаруживали в крови к этому моменту времени. С другой стороны, после перорального введения (с помощью зонда), через 1 час рапамицин обнаруживали с концентрацией 23 нг/мл в крови и 71 нг/г ткани в легком, а через 72 часа его не обнаруживали ни в легких, ни в крови. Приведенные на фигуре 8А данные показывают, что уровень фосфорилированного S6 (pS6) существенно снижался, как в случае введения рапамицина путем распыления через ротоглотку (ОРА), так и в случае перорального введения рапамицина, через 1 час и оставался пониженным через 72 часа в случае ОРА. Самый высокий уровень pS6 наблюдался при контрольном эксперименте с введением плацебо, так как эти мыши имеют конститутивно активный сигнальный

путь mTOR. Эти данные показывают, что доставляемая доза рапамицина является достаточной для достижения концентрации лекарственного средства в легком приблизительно 70 мкг/г, в результате чего происходит существенное подавление сигнальной системы mTOR в легочной ткани, измеряемое белком pS6, и что сигнальная система mTOR остается подавленной даже при уровнях рапамицина 12,5 нг/г. Эти результаты подтверждают обоснованность использования ингаляции рапамицина для лечения заболеваний и нарушений, характеризующихся, по крайней мере, частично, аномально высокой активностью сигнального пути mTOR, демонстрируя, что ингалируемый рапамицин может быть доставлен в гораздо более низких дозах, чем перорально вводимый рапамицин, в результате чего одновременно достигается высокий терапевтический эффект и очень низкая токсичность.

Пример 6. Ингибирующее действие ингалируемого рапамицина в отношении фосфорилирования S6 в легочной ткани

[223] Здоровым крысам линии Sprague-Dawley ингаляционно вводили рапамицин для достижения исследуемой дозы 0,354 мг/кг рапамицина (LAM-001) (N=36), и подгруппы из 6 животных умерщвляли в следующие моменты времени (1) перед дозированием, (2) посередине дозирования, (3) сразу после дозирования, (4) через 2 часа после дозирования, (5) через 4 часа после дозирования и (6) через 12 часов после дозирования в первый день исследования. В компании Charles River Laboratories проводили определения концентраций рапамицина в легком каждого умерщвленного животного в соответствующий для их подгруппы момент времени, средняя концентрация рапамицина в нанограммах рапамицина на грамм ткани (нг/г) для каждой группы приводится в таблице ниже.

Таблица 4: Рапамицин в легочной ткани после введения путем ингаляции

Исследуемая доза 11 мкг день 1	Посередине дозирования	Сразу после дозирования	Через 2 часа после дозирования	Через 4 часа после дозирования	Через 12 часов после дозирования
Среднее содержание рапамицина в легких (нг/г):	462	560	250	192	95

[224] Образцы легких каждого животного собирали и замораживали. Отдельные замороженные образцы легкого гомогенизировали (в лабораторном гомогенизаторе Qiagen TissueLyser LT в соответствии с протоколами производителя) в буфере 1X RIPA с ингибиторами протеазы и фосфатазы. Гомогенаты легкого анализировали методом вестерн-блоттинга мишени, расположенной ниже mTOR, рибосомального белка фосфо-S6 (Ser240/244) (антитело, клон D68F8 фирмы Cell Signaling Technology) при сравнении с общим белком S6 рибосомного белка S6 (антитело, клон 5G10к фирмы Cell Signaling Technology). Изображения вестерн-блоттинга анализировали с помощью компьютерной программы NIH ImageJ v. 1.48 с целью получения соответствующей реактивности/интенсивности антитела и определения отношения фосфорилирования S6 (S6-P) к сумме интенсивностей S6 для каждого образца легкого. Отношения S6-P/сумма S6 (ось y) для образца из сформированной группы на данный момент времени (ось x) графически изображали на одном вертикальном графе диаграммы разброса группирующих переменных (программное обеспечение GraphPad, version 4.0), все выборки в группах представлены на диаграмме черными точками (●), а среднее значение изображается горизонтальной линией между точками в каждой соответствующей группе (фигура 8В).

Пример 7. Неожиданное биораспределение ингалируемого рапамицина в легких

[225] В литературе сообщалось о накоплении рапамицина в легких после введения его высоких пероральных или внутривенных доз (Yanez, J. *et. al.*, Pharmacometrics and Delivery of Novel Nanoformulated PEG-b-poly(ϵ -caprolactone) Micelles of Rapamycin, *Cancer*

Chemotherapy and Pharmacology, 61 (1), 133-144 2007). В исследовании приводились данные, что после введения разовой дозы рапамицина 10,0 миллиграмм/килограмм (мг/кг) крысам линии Sprague-Dawley (SD), количество рапамицина в легких после периода времени, достаточного для распределения через тканевые компартменты (24 часа), составило 721 нанограмм/грамм (нг/г), что приблизительно в 19 раз превышает концентрацию в крови (таблица 5).

Таблица 5. Биораспределение рапамицина в легких и в крови после его внутривенного введения по данным Yanez et al.

Yanez, введение в течение 1 дня (через 24 часа после введения разовой дозы)				
Внутривенное дозирование (мг/кг/день)	Рапамицин в легких (нг/г)	Отношение легкое/кровь	Суточный эквивалент дозы для человека (мг)	Рапамицин в крови (нг/мл)
10	721	19	600	31

[226] В более раннем независимом исследовании (Napoli, K., et. al., Distribution of Sirolimus in Rat Tissue, *Clinical Biochemistry*, 30(2):135-142, 1997) крысам линии Sprague-Dawley ежедневно вводили перорально и внутривенно ряд доз рапамицина. Через 14 дней после внутривенного введения, концентрации рапамицина в легочной ткани изменялись в определенных пределах пропорционально дозе от 200 до 900 мкг/г, что приблизительно в 23-44 раза выше, чем концентрации в крови. Но в случае перорального введения, значительно более низкие уровни рапамицина накапливались в легком при одних и тех же дозах, хотя соотношения концентраций рапамицина в легких и крови были примерно одинаковыми (таблица 6).

Таблица 6. Биораспределение рапамицина через 24 часа после завершения его внутривенного введения один раз в сутки в течение 14 дней по данным Napoli et al.

Napoli, введение в течение 14 дней один раз в сутки (через 24 часа после дозирования на 14-ый день)				
Внутривенная доза (мг/кг/день)	Рапамицин в легком (нг/г)	Отношение легкое/кровь	Суточный эквивалент дозы для человека (мг)	Рапамицин в крови (нг/мл)
0,04	219	23	2,4	9,4
0,08	457	30	4,8	15,0
0,16	677	33	9,6	20,6
0,40	868	44	24	19,6
Пероральная доза (мг/кг/день)	Рапамицин в легком (нг/г)	Отношение легкое/кровь	Суточный эквивалент дозы для человека (мг)	Рапамицин в крови (нг/мл)
0,4	42	53	3,4	0,8
0,8	59	28	6,7	2,1
1,6	175	24	13,4	7,4

[227] При исследовании авторами изобретения биораспределения рапамицина после его введения путем ингаляции было обнаружено, что рапамицин в значительно большей степени накапливается в легких, чем можно было бы ожидать, исходя из публикаций Napoli и Yanez, даже если отношения его концентраций в легких и в крови были аналогичными. В первом исследовании, рапамицин вводили крысам линии Sprague-Dawley путем ингаляции в двух дозах (1) 1,0 мг/кг/сутки и (2) 0,0360 мг/кг/сутки в течение одних суток. После распределения рапамицина в тканевых компартментах в течение 12 часов, остаточные концентрации рапамицина в легких в случае высокой дозы составляли около 14800 нг/г, и концентрация рапамицина в легких была примерно в 23 раза выше, чем в крови (таблица 7). В случае низкой дозы рапамицина, его концентрация в легких была в 24 раза выше, чем концентрация в крови (таблица 7). В таблице 8 приведены остаточные концентрации рапамицина в легких, максимальные и

минимальные концентрации в крови после повторного введения один раз в сутки в течение 5 дней при тех же самых двух дозах, которые использовались в предыдущем эксперименте, то есть, 1,0 мг/кг/сутки и 0,0360 мг/кг/сутки.

Таблица 7. Биораспределение рапамицина через 12 часов после введения его однократной дозы путем ингаляции

Ингалируемая доза (мг/кг/день)	Рапамицин в легком (нг/г)	Отношение легкое/кровь	Суточный эквивалент дозы для человека (мг)	Рапамицин в крови (нг/мл)
1,00	14831	23	60	645
0,0360	95	24	2,16	4

Таблица 8: Биораспределение рапамицина после его введения путем ингаляции один раз в сутки (измеренное после введения рапамицина в течение 5 дней)

Ингалируемая доза (мг/кг/день)	Рапамицин в легком (нг/г)	Отношение легкое/кровь	Суточный эквивалент дозы для человека (мг)	Рапамицин в крови (нг/мл)
1,0000	17163	23	60	746
0,0360	87	22	2,16	4

[228] Результаты этого предварительного исследования указывают на то, что доставка рапамицина в легкие путем ингаляции приводила к значительно более высоким концентрациям лекарственного средства в легочной ткани, чем концентрации, которые можно было бы достичь альтернативными способами введения, например пероральным или внутривенным способами, исходя из ранее проведенных исследований Yanez и Napoli. Более того, высокие количества рапамицина в легком после доставки путем ингаляции были неожиданно выше тех количеств, которые можно было бы ожидать, исходя из публикаций Napoli и Yanez. Поскольку как внутривенные, так и ингаляционные способы введения рапамицина обеспечивают его высокую биодоступность, можно было бы ожидать, что ингалируемая доза 1 мг/кг будет создавать концентрации в легком приблизительно в 2,5 раза выше, чем концентрации, которые наблюдались в исследовании Napoli при внутривенном введении дозы 0,4 мг/кг/сутки. Вместо этого, уровни рапамицина в легком были приблизительно в 17 раз при введении путем ингаляции (сравните таблицу 7, доза 1 мг/кг/сутки, введенная путем ингаляции, создавала концентрацию 14831 нг/г лекарственного средства в легком, с таблицей 6 (Napoli), внутривенно вводимая доза 0,40 мг/кг/сутки создавала концентрацию в легких 868 нг/г, $14831/868=17$). Точно так же можно было бы ожидать, что вводимая внутривенно доза 10 мг/кг в исследовании Yanez будет создавать концентрацию рапамицина в легком приблизительно в 10 раз выше, чем концентрация, создаваемая ингаляционной дозой 1 мг/кг. Вместо этого, внутривенное дозирование создавало концентрацию в легком приблизительно в 20 раз меньше, чем концентрация при ингаляционном дозировании (сравните таблицу 7, доза 1 мг/кг/сутки, введенная путем ингаляции, создавала концентрацию 14831 нг/г лекарственного средства в легком, с таблицей 5 (Yanez), внутривенно вводимая доза 10 мг/кг/сутки создавала концентрацию в легких 721 нг/г, $14831/721=21$). Это может быть обусловлено низкой метаболической активностью легких и медленным пассивным или активным переносом рапамицина из компартментов легочной ткани в системный кровоток. Независимо от конкретного механизма, эти результаты показывают, что доставка рапамицина в легкие позволяет достигать в них постоянно высоких локальных концентраций, при этом концентрации рапамицина в циркулирующей крови остаются низкими.

[229] Результаты этого предварительного исследования были воспроизведены и

расширены в дополнительных исследованиях на крысах и собаках. Эти последующие исследования были направлены на определение токсичности при многократном дозировании и токсикокинетики аэрозольной лекарственной формы в виде сухого порошка, содержащей 1% (по массе) рапамицина, смешанного с лактозой, вводимой путем ингаляции здоровым крысам линии Sprague-Dawley (SD) и собакам породы бигль. В первом исследовании, для введения лекарственной формы в виде сухого порошка крысам линии Sprague-Dawley использовали стандартные цилиндрические проточные камеры для ингаляции через нос. На протяжении пяти дней подряд, животных подвергали воздействию исследуемого препарата в течение 300 минут каждый день для достижения исследуемой дозы 0,354 мг/кг рапамицина. Для проведения токсикокинетических измерений в этом исследовании использовали две группы животных. Первую группу животных подвергали дозированию в течение 300 минут в первый день исследования, брали у животных образцы крови (N=36) и образцы легкого (N=36), животных умерщвляли в подгруппах из 6 животных в следующие моменты времени: (1) перед дозированием, (2) посередине дозирования, (3) сразу после дозирования, (4) через 2 часа после дозирования, (5) через 4 часа после дозирования и (6) через 12 часов после дозирования. Вторую группу животных подвергали дозированию в течение 300 минут на протяжении 5 дней подряд, и на пятый день исследования брали у животных образцы крови (N=36) и образцы легкого (N=36), животных умерщвляли в подгруппах из 6 животных в следующие моменты времени: (1) перед дозированием, (2) посередине дозирования, (3) сразу после дозирования, (4) через 2 часа после дозирования, (5) через 4 часа после дозирования и (6) через 12 часов после дозирования. Определяли максимальную концентрацию рапамицина в цельной крови (нг/мл) и образцах легочной ткани (нг/г), а также концентрацию рапамицина 12 часов после дозирования.

[230] Второе исследование проводили при многократном воздействии лекарственной формы для оценки токсичности при многократном дозировании и токсикокинетики аэрозольной лекарственной формы в виде сухого порошка, которую вводили крысам линии Sprague-Dawley и собакам породы бигль в течение 28 дней.

[231] При проведении исследования на крысах использовали стандартные цилиндрические проточные камеры для ингаляции через нос, упомянутые выше. На протяжении 28 дней подряд животных подвергали воздействию исследуемого препарата в течение 300 минут каждый день для достижения исследуемых доз 0,167, 4,75 и 9,50 мг/кг рапамицина, соответственно. Для каждой из трех групп дозирования, одну группу животных (N=36) дозировали в течение 300 минут каждый день на протяжении 28 дней подряд. В первый и на двадцать восьмой день исследования, у животных в подгруппах из 6 животных брали образцы крови в следующие моменты времени: (1) перед дозированием, (2) посередине дозирования, (3) сразу после дозирования, (4) через 2 часа после дозирования, (5) через 4 часа после дозирования и (6) через 12 часов после дозирования и (7) через 24 часа после дозирования.

[232] При проведении исследования на собаках использовали систему доставки потока распыляемого вещества под давлением (PFDS), состоящую из центрального нагнетательного устройства и раздаточных рукавов. Центральное устройство имело модульную конструкцию с отдельными портами, к которым были присоединены 5 раздаточных рукавов, снабженных масками для ингаляционного введения, охватывающими нос и рот, с впускными и выпускными трубками. Маску надевали на морду собаки таким образом, чтобы нос находился внутри маски, что обеспечивало ввод и выход воздуха. Во время экспозиции на животных надевали систему фиксации

и помещали их на платформу, ограничивающую их подвижность. Систему фиксации прикрепляли к двум боковым опорам на платформе для ограничения бокового движения собаки. Переднюю часть системы фиксации без натяжения привязывали к крюку на фронтальной части платформы для предотвращения поворотов животного назад.

Собак ежедневно подвергали воздействию исследуемого препарата в течение 60 минут для достижения исследуемых доз 0,020 и 0,053 мг/кг рапамицина, соответственно. Для каждой группы дозирования, один набор животных (N=6) дозировали в течение 60 минут каждый день на протяжении 28 дней подряд. В первый и на двадцать восьмой день исследования, у животных в подгруппах из 6 животных брали образцы крови в следующие моменты времени: (1) перед дозированием, (2) посередине дозирования, (3) сразу после дозирования, (4) через 2 часа после дозирования, (5) через 4 часа после дозирования и (6) через 12 часов после дозирования и (7) через 24 часа после дозирования. На двадцать девятый день собак умерщвляли, и часть их легочной ткани удаляли и измельчали для проведения анализа на содержание рапамицина.

[233] Ниже представлена максимальная концентрация рапамицина и остаточная концентрация рапамицина в цельной крови (нг/мл) животных наряду с данными по дозированию человека, полученными экстраполяцией. Кроме того, в этой таблице приведены остаточные уровни рапамицина в легком собаки (нг/г) после многократного дозирования на протяжении 28 дней.

Таблица 9. Данные по ингаляции рапамицина крысам и данные по дозированию человека, полученные экстраполяцией

	Испускаемая доза (мкг)	Многократно ингалируемая суточная доза (мкг)	Максимальные уровни рапамицина в крови (нг/мл)	Остаточные уровни рапамицина в крови (нг/мл)	Остаточные уровни рапамицина в легких через 24 часа (нг/г)
Крыса*	50	5	7,6	2	не определяли
	1425	143	70,5	23,3	не определяли
	2850	285	77,8	21,0	не определяли
Собака**	160	40	7,4	1,9	32
	424	106	27,3	5,9	61
Человек	87	35	0,65	0,15	2
	175	70	1,3	0,3	4

*крыса исследование 7300225 многократного воздействия суточной дозы в течение 28 дней подряд - данные для крови являются средним значением на 28-ой день

**собака исследование 7300227 многократного воздействия суточной дозы в течение 28 дней подряд - данные для крови и легких являются средним значением на 28-ой день

** оценки для крови и легких являются экстраполяцией данных, полученных в исследованиях 7300225 и 7300227.

[234] Следует отметить, что на основе представленных в изобретении результатов, терапевтически эффективная доза рапамицина в легком в диапазоне около 5 нг/г в случае людей может быть достигнута при ингаляционном введении в легкие менее чем 100 микрограмм рапамицина. В отличие от этого, для достижения сопоставимой концентрации рапамицина в легком при пероральном введении, согласно данным Yanez, потребовалось бы введение от 4 до 16 миллиграмм рапамицина. Для достижения сопоставимой концентрации рапамицина в легком путем внутривенного введения, согласно данным Napoli, потребовалось бы от 60 до 600 микрограмм рапамицина.

[235] Кроме того, исходя из представленных в изобретении результатов, при ингаляционной доставке рапамицина может быть достигнут терапевтический диапазон концентраций рапамицина в легком около 5 нг/г при отношении концентрации

рапамицина в легких к концентрации рапамицина в крови 13:1. Это означает, что несмотря на присутствие рапамицина в легочной ткани в диапазоне терапевтических концентраций, максимальная концентрация рапамицина в циркулирующей крови составит только от 650 до 1500 пикограмм/мл. Следует ожидать, что это низкое системное воздействие рапамицина уменьшит токсичность и частоту случаев осложнений, которые возникают при более высоком системном воздействии рапамицина в результате более высоких уровней дозирования, обусловленных пероральным или внутривенным введением.

[236] Таким образом, описанные в изобретении результаты показывают, что ингаляционное введение рапамицина в легкие позволяет использовать низкую дозу рапамицина для достижения терапевтически эффективной дозы в легких в диапазоне около 5 нг/г в сочетании с низким системным воздействием лекарственного средства, что приводит к значительному улучшению терапевтического индекса для рапамицина.

Пример 8. Уменьшение размера частиц рапамицина для ингаляционных композиций

[237] Размер частиц рапамицина уменьшали до требуемого диапазона $2,0 \text{ мкм} < D_{v50} < 3,0 \text{ мкм}$ с использованием либо влажного полирования, либо помола на струйной мельнице. Для помола на струйной мельнице использовали лабораторную установку MСOne фирмы Jetpharma при следующих условиях эксплуатации: давление в трубке Вентури 0,2-0,4 МПа, давление помола 0,3-0,5 МПа, скорость подачи 90 г/ч. Для влажного полирования, вводимую суспензию получали с использованием очищенной воды. На стадии уменьшения размера частиц использовали микрофлюидный гомогенизатор высокого давления, и полученную суспензию подвергали распылительной сушке. Подробности проведения процесса влажного полирования приведены ниже.

[238] Гомогенизатор высокого давления, используемый на стадии уменьшения размера частиц методом влажного полирования, представлял собой лабораторный микрофлюидный гомогенизатор высокого давления, оснащенный вспомогательным модулем обработки (200 мкм), и использовалась камера для взаимодействия на 100 мкм. Устройство эксплуатировали при ~ 45,5 МПа (~ 3,0 МПа в модуле повышения гидравлического давления). После микрофлюидизации, жидкость удаляли распылительной сушкой с получением сухого порошка. Лабораторная распылительная сушилка SD45 (BÜCHI, model B-290 Advanced) была оснащена двумя жидкостными соплами (колпачок и диаметр составляли соответственно 1,4 и 0,7 мм). Для сбора высушенного продукта использовали два соединенных последовательно циклона (первый из которых представлял собой стандартный циклон Buchi, а второй - циклон Buchi с высокими эксплуатационными характеристиками). В установке распылительной сушки использовался азот в однократном режиме, то есть без рециркуляции высушивающего азота. Нагнетающий азот устанавливали на 100% его производительности (расход азота при максимальной производительности составлял приблизительно 40 кг/ч). Расход азота для распыления устанавливали по расходомеру на значение $40 \pm 5 \text{ мм}$. Перед подачей полученной суспензии, распылительную сушилку подвергали стабилизации очищенной водой, в процессе которой расход доводили до 6 мл/мин (20% в перистальтическом насосе). Регулировали температуру на входе с целью достижения заданной температуры на выходе (45°C). После стабилизации температур, вместо подачи в распылительную сушилку очищенной воды в нее начинали подавать полученную суспензию (с сохранением того же расхода, который использовали в процессе стабилизации), и еще раз регулировали температуру на входе для достижения заданной температуры на выходе. После израсходования вводимой исходной суспензии, в сушилку снова подавали очищенную воду для промывки линии подачи и проведения

контролируемого отключения сушилки. Взвешивали сухой продукт в колбах для сбора, установленных под обоими циклонами, и рассчитывали выход как массовый процент сухого продукта по отношению к суммарному количеству твердых веществ в суспензии, подаваемой в гомогенизатор высокого давления.

[239] Распределение частиц по размерам определяли методом лазерной дифракции. Анализ твердого вещества (полиморфной формы и чистоты) проводили методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC), порошкового рентгеноструктурного анализа (XRPD) и дифференциальной сканирующей калориметрии (mDSC). Содержание воды определяли методом Карла Фишера.

[240] Помол на струйной мельнице позволял получить порошок кристаллического рапамицина с распределением монодисперсных частиц по размерам, имеющим Dv10 1,5 микрон, DV50 2,7 микрон и Dv 90 4,9 микрон, как показано в таблице 10 ниже.

[241] Влажное полирование позволяло получить порошок кристаллического рапамицина с распределением монодисперсных частиц по размерам, имеющим Dv10 1,0 микрон, Dv50 2,4 микрон и Dv90 5,0 микрон (таблица 11).

[242] Оба метода позволяли получать частицы рапамицина в заданном диапазоне, и ни один из процессов не оказывал влияния на полиморфную форму или чистоту рапамицина. В приведенных ниже таблицах представлены данные по регулированию процессов помола в струйной мельнице и влажного полирования. Данные показывают, что оба процесса позволяли получить размеры частиц активного фармацевтического ингредиента в требуемом диапазоне без влияния на чистоту активного фармацевтического ингредиента или его полиморфную форму.

Таблица 10. Данные по помолу в струйной мельнице

Распределение частиц по размеру	мкм	Dv10	Dv50	Dv90
		1,51	2,74	4,91
Порошковый рентгеноструктурный анализ	-	Аналогична рентгенограмме активного фармацевтического ингредиента (сиролимуса)		
Дифференциальная сканирующая калориметрия	(Т начала эффекта, °C)	182,2		
Содержание воды (по Фишеру)	% по массе	0,30		
Высокоэффективная жидкостная хроматография (% площади)	Анализ (% по массе)	99,5		
	Сиролимус	99,35		

Таблица 11: Данные по влажному полированию

Распределение частиц по размеру	мкм	Dv10	Dv50	Dv90
		1,05	2,42	4,97
Порошковый рентгеноструктурный анализ	-	Аналогична рентгенограмме активного фармацевтического ингредиента (сиролимуса)		
Дифференциальная сканирующая калориметрия	(Т начала эффекта, °C)	185,7		
Содержание воды (по Фишеру)	% по массе	0,30		
Высокоэффективная жидкостная хроматография (% площади)	Анализ (% по массе)	99,0		
	Сиролимус	99,42		

Пример 9. Определение характеристик аэрозолей сухих порошкообразных композиций

[243] Капсулы, полученные в приведенном выше примере, помещали в устройство, указанное в таблицах ниже, и приводили устройство в действие. Характеристики аэрозоля, распыляемого из устройства/капсул, содержащих смеси из партии 06RP68.HQ00008 и партии 06RP68.HQ00009, определяли с помощью импактора нового поколения (NGI) в соответствии с методами, описанными в главах 905 и 601 Фармакопеи США. Испытание аэрозолей проводили при расходе 60 и 100 литров в минуту (LPM).

Доза тонкодисперсных частиц (FPD) и фракция тонкодисперсных частиц (FPF) приведены в таблицах ниже. Также показаны масс-медианные аэродинамические диаметры (MMAD) и геометрические стандартные отклонения (GSD).

Таблица 12. Партия 06RP68.HQ00008 (влажное полирование)+порошковый ингалятор Plastiapе RS01 Model 7

	60 литров в минуту		100 литров в минуту	
	Среднее значение	% стандартное относительное отклонение	Среднее значение	% стандартное относительное отклонение
FPD (мкг)	57,31	2,37	67,21	12,46
FPF (%)	39,49	1,85	44,12	8,99
MMAD (мкм)	2,81	2,22	2,49	11,97
GSD	2,02	0,99	2,19	8,25

Таблица 13. Партия 06RP68.HQ00008 (влажное полирование)+порошковый ингалятор Plastiapе RS00 Model 8

	60 литров в минуту		100 литров в минуту	
	Среднее значение	% стандартное относительное отклонение	Среднее значение	% стандартное относительное отклонение
FPD (мкг)	58,40	0,98	62,39	6,35
FPF (%)	39,68	1,68	41,34	3,70
MMAD (мкм)	2,63	7,28	2,58	6,00
GSD	2,05	3,69	2,15	6,32

Таблица 14. Партия 06RP68.HQ00009 (помол на струйной мельнице)+порошковый ингалятор Plastiapе RS01 Model 7

	60 литров в минуту		100 литров в минуту	
	Среднее значение	% стандартное относительное отклонение	Среднее значение	% стандартное относительное отклонение
FPD (мкг)	52,33	6,72	58,51	15,84
FPF (%)	33,73	3,91	36,69	9,86
MMAD (мкм)	3,32	2,27	3,02	4,14
GSD	2,05	1,02	2,24	1,79

Таблица 15. Партия 06RP68.HQ00009 помол на струйной мельнице)+порошковый ингалятор Plastiapе RS00 Model 8

	60 литров в минуту		100 литров в минуту	
	Среднее значение	% стандартное относительное отклонение	Среднее значение	% стандартное относительное отклонение
FPD (мкг)	52,56	2,02	59,11	4,74
FPF (%)	33,97	0,86	36,01	4,20
MMAD (мкм)	3,06	1,91	2,93	0,98
GSD	2,04	0,98	2,21	2,73

[244] Основываясь на этих данных по характеристикам аэрозолей, можно сделать вывод, что предпочтительными являются частицы лекарственного средства, полученные влажным полированием. Они обеспечивали в результате более высокую дозу тонкодисперсных частиц, более высокую величину фракции мелкодисперсных частиц, распределение частиц по размерам, которое характеризовалось бы проникновением частиц как в центральную, так и в периферическую область легкого и меньшим оседанием частиц в ротовой полости.

Пример 10. Моделирование фармакокинетики рапамицина

[245] Исходя из приведенных выше характеристик аэрозоля партии 06RP68.HQ00008 (влажное полирование)+порошковый ингалятор PlasiTape RS01 Model и результатов экспериментов на животных в примере 3, можно ожидать, что ингаляционная доставка рапамицина непосредственно в легкие человека будет также приводить к постоянным концентрациям рапамицина в легких, являющимся достаточно высокими, для того чтобы проявлять терапевтическую эффективность, но при низком системном воздействии (при низких концентрациях в крови), тем самым эффективно минимизируя побочные эффекты, обусловленные системным воздействием. Для прогнозирования концентраций рапамицина в крови и легких людей после многократного ежедневного дозирования с использованием лекарственной формы из таблицы 11 и порошкового ингалятора была разработана двухкомпонентная фармакокинетическая модель. Для фармакокинетической модели использовали фармакокинетические параметры для человека из краткого обоснование регистрационного решения по заявке на регистрацию нового лекарственного средства Рапамун® (NDA 21-110 и NDA 21-083): полагая, что объем распределения составляет 780 литров, клиренс составляет 0,0003/минута, период полувыведения составляет 42,3 часа (при условии эквивалентности внутривенному дозированию рапамицина). Период полувсасывания рапамицина из легкого оценивали приблизительно в 0,5 часа, по аналогии с другими высоко липофильными соединениями, такими как пропионат флутиказона, для которого имеются данные по всасыванию в легких. Биодоступность рапамицина, осаждающегося в легких, принималась равной приблизительно 100%. Биодоступность рапамицина, всасываемого в желудочно-кишечном тракте в результате осаждения во рту и глотке или удаление из верхних дыхательных путей в результате мукоцилиарного клиренса, принималась равной 14%, как сообщалось в кратком обосновании регистрационного решения по заявке на регистрацию нового лекарственного средства Рапамун®. При обычном вдохе человека при расходе 60 литров в минуту, как показано в таблице 11, доза тонкодисперсных частиц составляла 57 микрограмм, а величина фракция мелких частиц составляла 40%.

[246] Модель предсказывает достижение средней стационарной концентрации через 11 дней, как показано на фигуре 9. На этой фигуре можно увидеть, что многократное дозирование один раз в сутки 57 микрограмм, доставляемых в легкие, приводит к остаточным концентрациям в крови приблизительно 50 пикограмм/мл и к максимальным концентрациям ниже 200 пикограмм/мл, что существенно ниже концентраций 5-15 мкг/мл, указанных в публикации McCormack *et al.* (2011), "Efficacy and safety of sirolimus in lymphangioleiomyomatosis", *N Engl J Med* 364:1595-1606. Если предположить, что масса легочной ткани составляет 850 грамм, метаболизм в легких отсутствует и период полувсасывания в легких составляет 30 минут, то доставляемые в легкие 57 микрограмм рапамицина могут приводить в результате к терапевтическим уровням в легочной ткани с локальными концентрациями рапамицина в легких вплоть до приблизительно 60 нг/грамм.

Пример 11. Исследование токсикологии при ингаляционном введении рапамицина крысам и собакам

[247] Описанное ниже исследование показало, что вводимый путем ингаляции рапамицин является менее токсичным, чем перорально вводимый рапамицин.

В результате проведения токсикологических исследований на собаках и крысах в соответствии со Сводом международных требований к лабораторным исследованиям (GLP) при многократном ингаляционном дозировании LAM-001 (ингаляционной формы рапамицина) в течение 28 дней, токсикокинетические данные показали (смотрите таблицу

16), что концентрации рапамицина в легких были приблизительно в 6 и 63 раза, соответственно, выше, чем системные эффективные концентрации в крови человека, что оказалось достаточным для ингибирования активности mTOR в легких людей, которым вводили LAM при проведении многоцентрового международного испытания эффективности и безопасности сиролимуса при лимфангиолейомиоматозе (MILES). Наиболее восприимчивые виды животных, собаки, демонстрировали отношение остаточной концентрации в легком (через 24 часа) к концентрации в плазме приблизительно 16,7 при максимальной дозе, не вызывающей обнаруживаемого вредного воздействия на здоровье (NOAEL).

Таблица 16. Результаты исследований на животных.

Группа 3, 28 день дозирования, остаточная концентрация через 24 часа						
Легкое	Мозг	Кровь	Легкое/ Кровь	Мозг/ Кровь	Легкое/ Мозг	
32,2	2,4	1,9	16,7	1,2	13,7	6 животных при t=24
Группа 4, 28 день дозирования, остаточная концентрация через 24 часа						
Легкое	Мозг	Кровь	Легкое/ Кровь	Мозг/ Кровь	Легкое/ Мозг	
106,2	6,9	5,9	18,1	1,2	15,5	5 животных при t=24
Группа 5, 21 день дозирования, остаточная концентрация через 24 часа						
Легкое	Мозг	Кровь	Легкое/ Кровь	Мозг/ Кровь	Легкое/ Мозг	
2273,2	24,4	23,4	97,3	1,0	0,6	3 животных при t=24

[248] Крысы переносили ежедневные ингаляционные дозы, превышающие приблизительно в 60-1700 раз предполагаемую терапевтическую дозу для людей. Для собак максимальная доза, не вызывающая обнаруживаемого вредного воздействия на здоровье (NOAEL), превышала в 6 раз предполагаемую терапевтическую дозу для людей.

[249] Введение рапамицина путем ингаляции только через нос не приводило к изменениям в дыхательной функции. Величины NOAEL для достигаемых респираторных доз, установленных при проведении исследований на крысах и собаках в течение 28 дней, составили 8,91 мг/кг/сутки и 0,0134 мг/кг/сутки, соответственно, что приблизительно в 1713 и 6 раз выше рекомендованной суточной терапевтической дозы (RDD) для людей при ингаляции через рот на основе эффекта, указанного в исследовании MILES. Эти данные в сочетании с клиническими данными, собранными в исследовании MILES, показывают, что при введении пациентам рапамицина путем ингаляции может быть получен существенный положительный эффект с точки зрения безопасности применения рапамицина.

[250] Кроме того, путем доставки рапамицина путем ингаляции можно избежать пресистемного метаболизма, вариабельности пероральной всасываемости и потенциальной вариабельности системного распределения в легких. Врачи способны оттитровать дозы более эффективно и точно, что позволяет пациентам получать эффективные дозы в легких при минимальном системном воздействии и токсическом действии рапамицина. Путем изменения количества капсул в порошковом ингаляторе, рапамицин может быть доставлен в номинальной эффективной дозе, благодаря чему пациенту обеспечивается индивидуальная схема лечения, чего нельзя достичь в случае применения пероральной лекарственной формы рапамун®.

[251] Ожидается, что ингаляционная лекарственная форма рапамицина сможет обеспечить существенное клиническое преимущество по сравнению с пероральной

лекарственной формой рапамицина (например, рапамуном®), обусловленное непосредственной доставкой лекарственного средства в ткань-мишень (в легочную ткань) и возможностью адаптации схем лечения с учетом индивидуальных особенностей пациентов.

5 Эквиваленты

[252] Для специалистов в данной области является очевидным или они могут удостовериться, проводя не более чем рутинные эксперименты, что существуют много эквивалентов конкретных вариантов осуществления, описанных в изобретении. Предполагается, что такие эквиваленты входят в объем изобретения, определяемый прилагаемыми пунктами формулы изобретения.

[253] Содержания всех публикаций, цитируемых в настоящем изобретении, полностью и во всех отношениях, включены в изобретение путем ссылки на них, в равной мере, как и содержание каждой отдельной публикации, патента или патентной заявки, специально и индивидуально указанной, полностью и во всех отношениях, включено в изобретение путем ссылки на нее.

[254] Настоящее изобретение не ограничивается рамками конкретных вариантов осуществления, описанных в изобретении. Более того, после ознакомления с описанием изобретения и сопутствующими чертежами, для специалистов в данной области станет очевидным существование различных модификаций изобретения, помимо описанных в изобретении. Предполагается, что такие модификации входят в объем изобретения, определяемый прилагаемыми пунктами формулы изобретения.

(57) Формула изобретения

1. Способ лечения или профилактики легочной артериальной гипертензии (РАН) у человека, причем способ включает введение субъекту путем ингаляции фармацевтической аэрозольной композиции в форме сухого порошка, содержащей микрочастицы рапамицина, где частицы рапамицина имеют среднемассовый аэродинамический диаметр (MMAD) от 1 до 5 мкм, и частицы носителя, где лекарственная форма является эффективной для доставки терапевтического количества рапамицина в легкие, где композиция содержит от 5 до 500 мкг рапамицина и соотношение рапамицина и носителя в порошке составляет от 0,5 до 2% по массе.

2. Способ по п. 1, где количество рапамицина в лекарственной форме составляет от 10 до 250 мкг, от 15 до 150 мкг или от 20 до 100 мкг.

3. Способ по п. 1 или 2, где количество рапамицина в аэрозольной лекарственной форме составляет от 0,1 до 20% по массе или от 0,25 до 2% по массе, в расчете на суммарную массу композиции.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где микрочастицы имеют масс-медианный аэродинамический диаметр (MMAD) от 1,5 до 4 мкм, от 1,5 до 3,5 мкм или от 2 до 3 мкм.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где носитель выбирают из группы, состоящей из арабинозы, глюкозы, фруктозы, рибозы, маннозы, сахарозы, трегалозы, лактозы, мальтозы, крахмалов, декстрана, маннита, лизина, лейцина, изолейцина, дипальмитилфосфатидилхолина, лецитина, полимолочной кислоты, сополимера молочной и глутаминовой кислот и ксилита или смесей любых из вышеперечисленных.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где носитель включает или состоит из смеси двух различных носителей, первого носителя и второго носителя.

7. Способ по п. 6, где носитель состоит из смеси двух различных лактозных носителей.

8. Способ по п. 6 или 7, где первый носитель состоит из частиц, имеющих диаметр в

диапазоне от 30 до 100 мкм, и второй носитель состоит из частиц, имеющих диаметр менее чем 10 мкм.

9. Способ по п. 8, где отношение двух различных носителей находится в диапазоне от 95-98 до 2-5.

5 10. Способ по любому из пп. 1-9, где отношение рапамицина к носителю в порошке составляет 1% по массе.

11. Способ по любому из пп. 1-10, где терапевтическое количество сиролимуса представляет собой количество, которое является эффективным для достижения вдыхаемой дозы от 5 до 500 мкг, доставляемой в легкое.

10 12. Способ по п. 11, где вдыхаемая доза составляет 5, 20, 50, 100 или 250 мкг.

13. Способ по любому из пп. 1-12, где композиция имеет величину фракции тонкодисперсных частиц (FPF) более чем 20% при соответствующей дозе тонкодисперсных частиц (FPD) в диапазоне от 5 мкг до 2 мг, предпочтительно менее чем 0,5 мг, после от 1 до 12 месяцев или от 1 до 36 месяцев хранения.

15 14. Способ по любому из пп. 1-13, где способ дополнительно включает введение субъекту одного или более дополнительных терапевтических средств, выбранных из простаноида, ингибитора фосфодиэстеразы или антагониста эндотелина.

15. Способ по п. 14, где простаноид выбирают из группы, состоящей из простагландина, тромбоксана и простациклина.

20 16. Способ по любому из пп. 1-15, где композиция адаптирована для введения один раз в сутки.

25

30

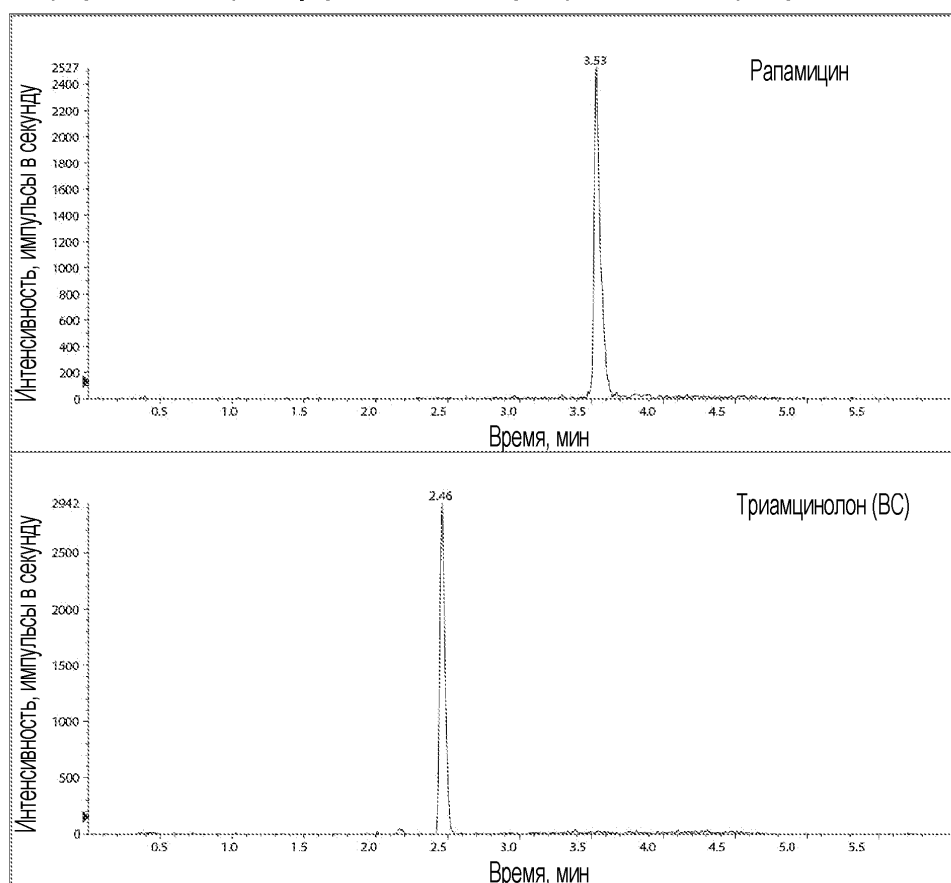
35

40

45

1/10

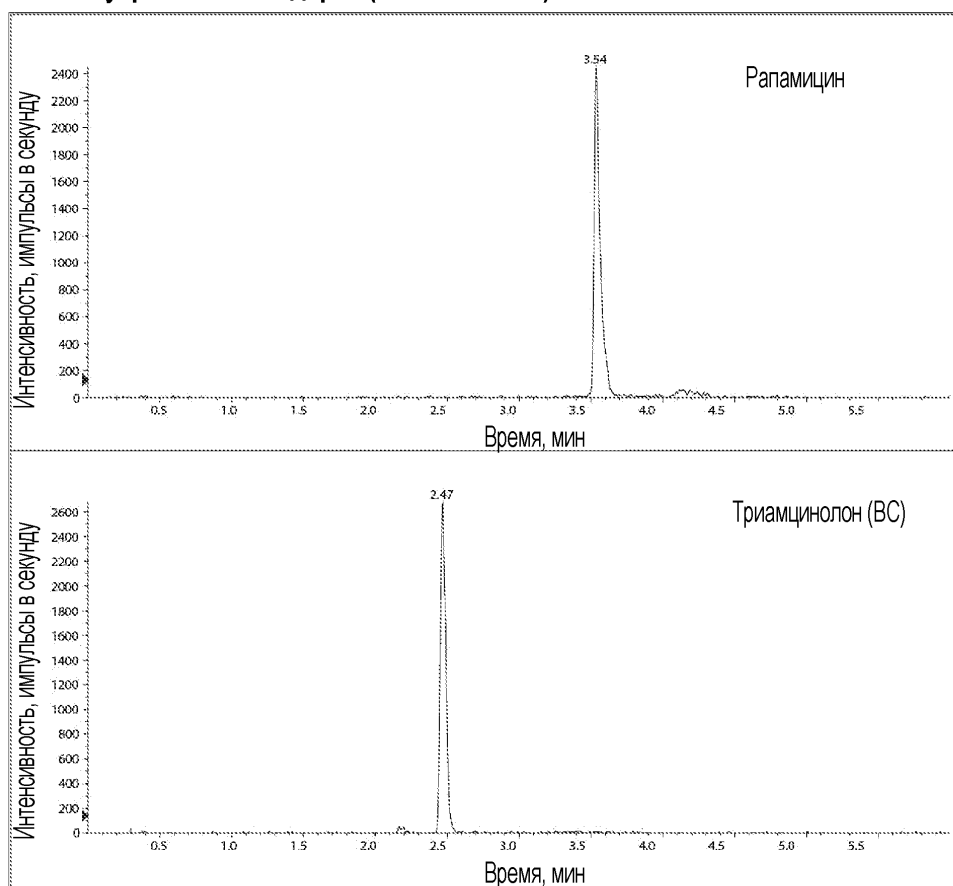
LC-MS/MS Chromatogram of 10.6 ng/ml Rapamycin (top) and Internal Standard (bottom) in Mouse Blood - LC-MS/MS хроматограмма 10,6 нг/мл рапамицина (верхняя часть) и внутреннего стандарта (нижняя часть) в крови мыши



ФИГ. 1

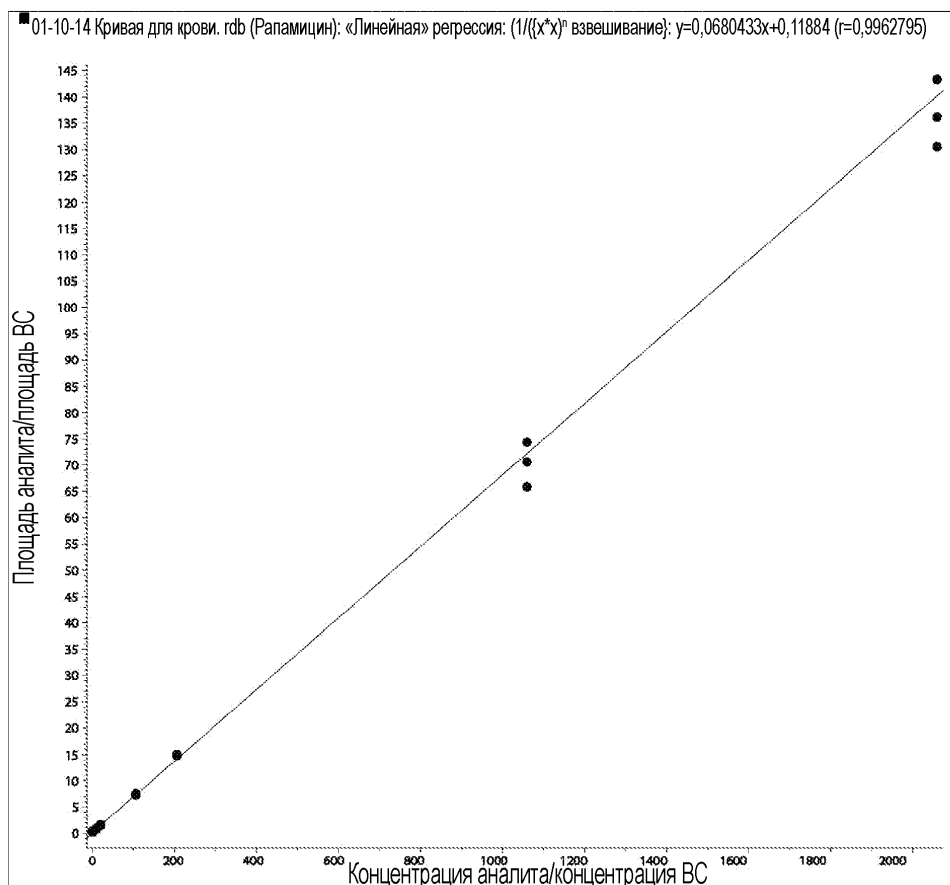
2/10

Типичные хроматограммы 10,6 нг/мл рапамицина (верхняя часть) и внутреннего стандарта (нижняя часть) в гомогенате легкого мыши



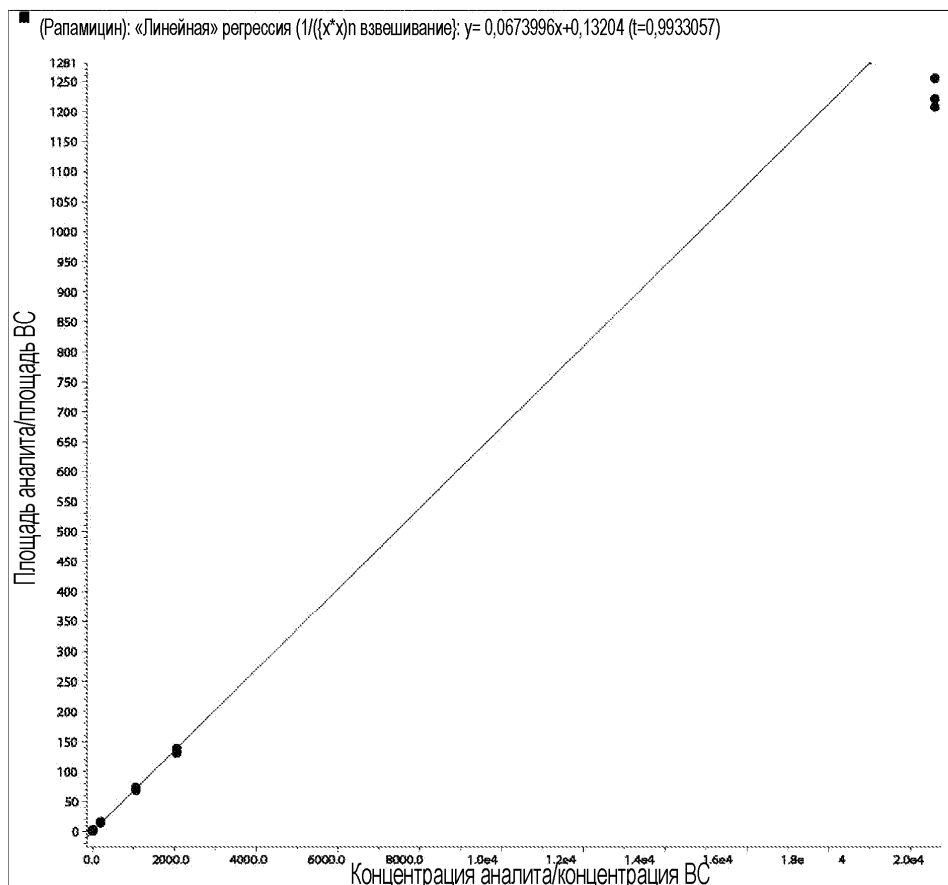
ФИГ. 2

3/10

Калибровочная кривая для определения рапамицина в крови мыши**ФИГ. 3**

4/10

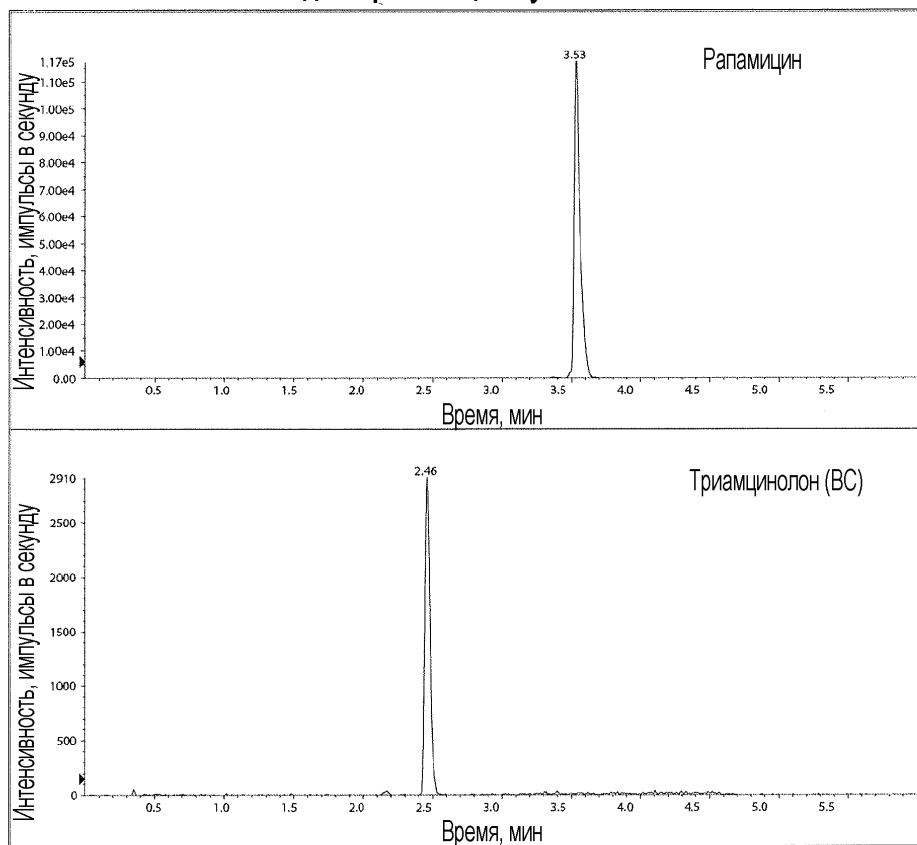
**Калибровочная кривая для определения рапамицина в гомогенате
легкого мыши**



ФИГ. 4

5/10

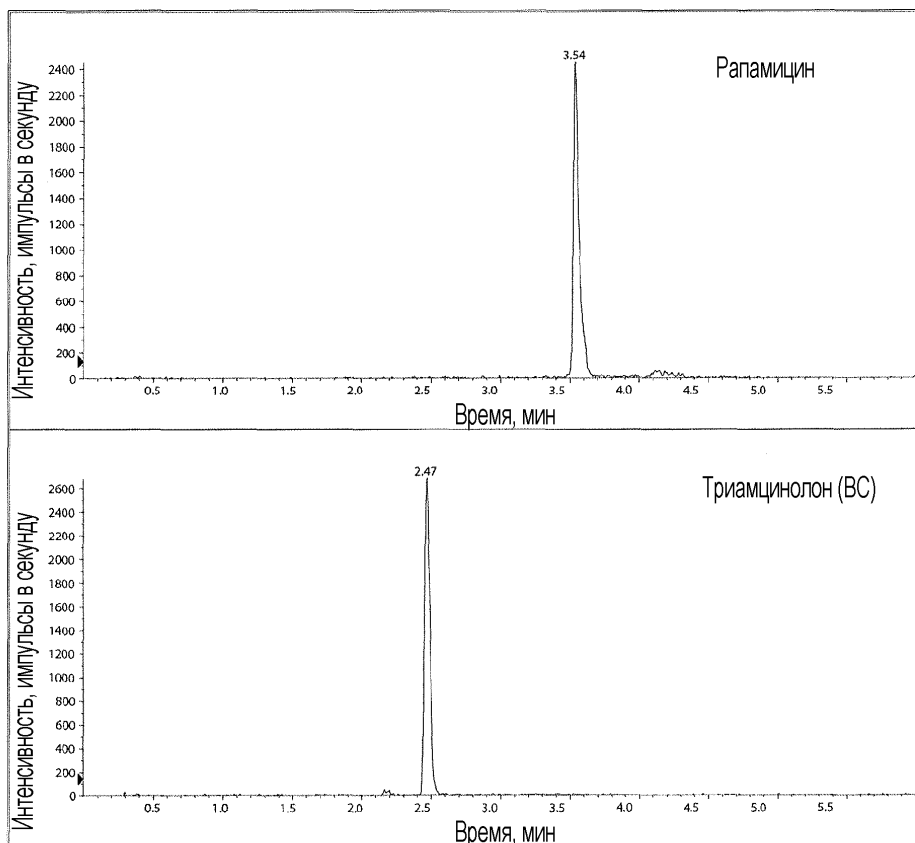
Типичные хроматограммы рапамицина (верхняя часть) и
внутреннего стандарта (нижняя часть) в крови мыши 2-07, которой_m in
вводили рапамицин путем ОРА



ФИГ. 5

6/10

Типичные хроматограммы рапамицина (верхняя часть) и внутреннего стандарта (нижняя часть) в гомогенате легкого мыши 2-07, которой вводили рапамицин путем ОРА



ФИГ. 6

7/10

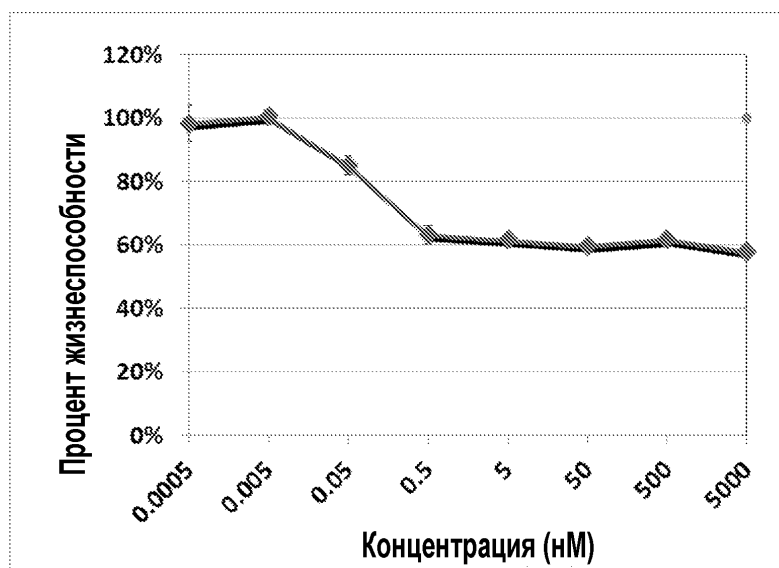
без рапамицина + рапамицин Рапамицин (20 нМ)



Фосфо-S6

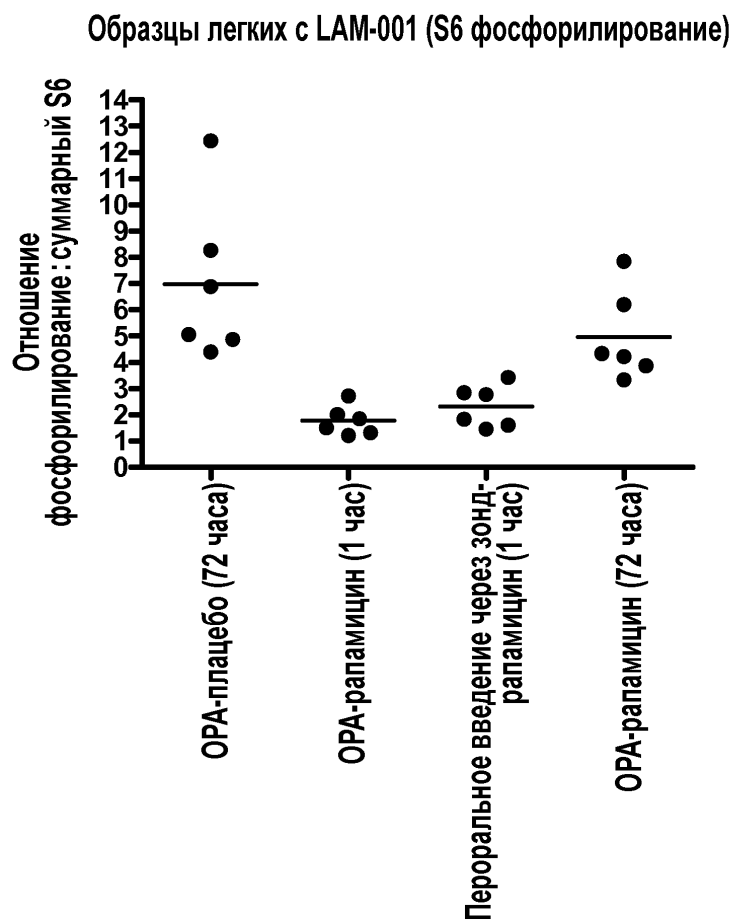


Суммарный S6



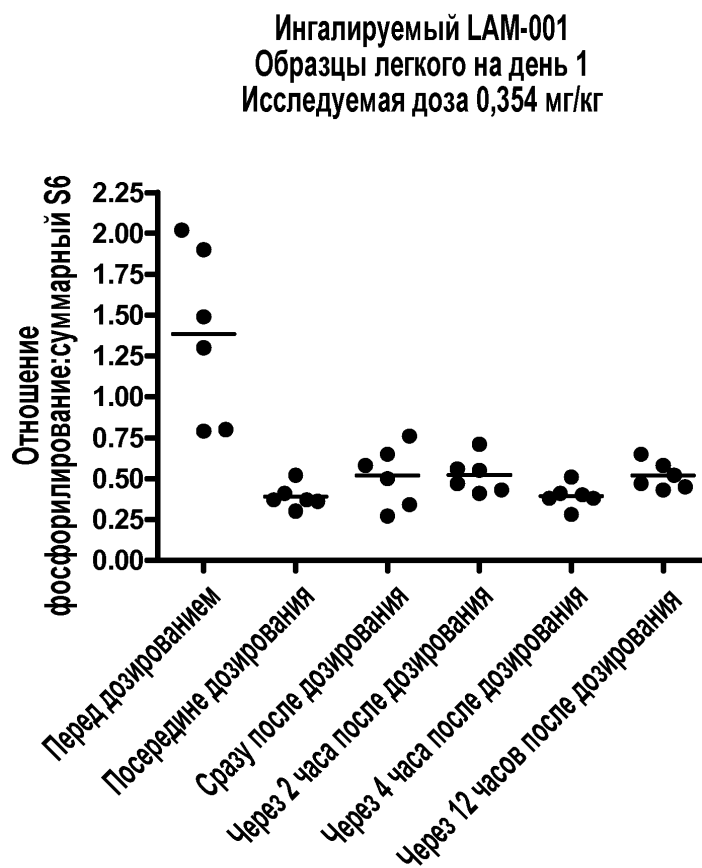
ФИГ. 7

8/10



ФИГ. 8А

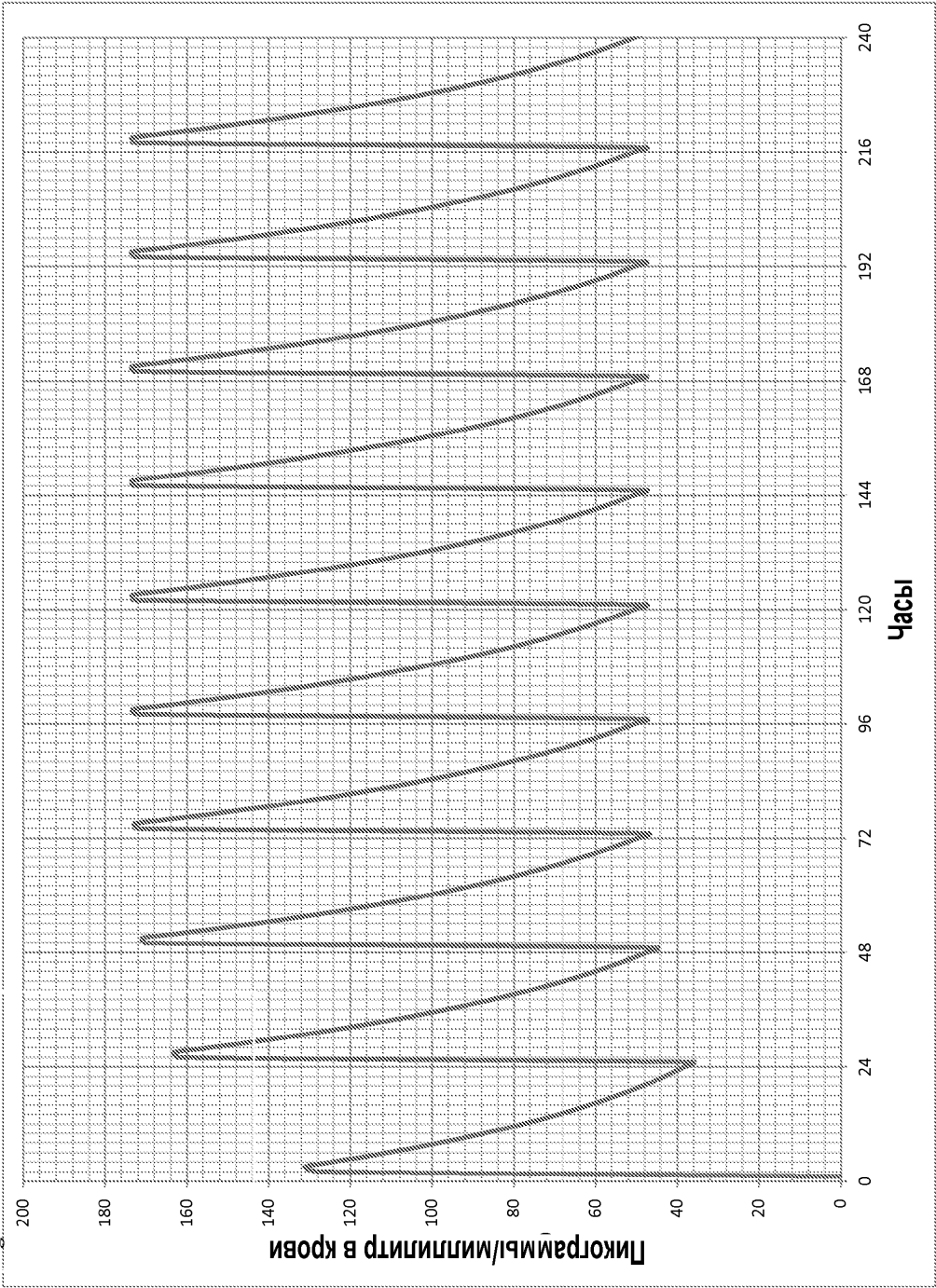
9/10



Моменты времени дозирования LAM-001

ФИГ. 8В

10/10



ФИГ. 9