

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **023107**(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2016.04.29**

**(21)** Номер заявки  
**201070746**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2008.12.18**

**(51)** Int. Cl. *A61K 9/00* (2006.01)  
*A61K 9/08* (2006.01)  
*A61K 9/20* (2006.01)  
*A61K 47/02* (2006.01)  
*A61K 38/00* (2006.01)

---

**(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ПО МЕНЬШЕЙ МЕРЕ ОДИН БЕЛКОВЫЙ АКТИВНЫЙ ИНГРЕДИЕНТ, ЗАЩИЩЕННЫЙ ОТ РАСЩЕПЛЕНИЯ ФЕРМЕНТАМИ**

---

**(31)** 0759971  
**(32)** 2007.12.19

**(33)** FR

**(43)** 2011.02.28

**(86)** PCT/FR2008/052357

**(87)** WO 2009/083686 2009.07.09

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**БЕННИС ФАРИД (МА)**

**(56)** US-A1-2002132757  
US-A1-2007154559  
WO-A-9733531  
US-A1-2003017203  
WO-A-02072075  
FR-A-2123524  
WO-A-0136656  
WO-A-2007032018  
US-A-4692433

**(72)** Изобретатель:  
**Беннис Фарид (МА), Серрано Жан-Жак (FR)**

**(74)** Представитель:  
**Липатова И.И., Новоселова С.В., Рыбаков В.М., Хмара М.В., Дощечкина В.В. (RU)**

---

**(57)** Изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим по меньшей мере один белковый активный ингредиент, защищенный от пищеварительных ферментов. Указанные фармацевтические композиции содержат указанный по меньшей мере один белковый активный ингредиент в свободной форме, а также для жидкостей содержат системы, способные их буферизовать при pH больше 4 и меньше или равном 8, или для твердых веществ содержат системы, которые при помещении их в жидкую среду оказывают буферный эффект между pH больше 4 и pH меньше или равном 8.

---

**B1****023107****023107****B1**

Основным объектом изобретения являются композиции (композиции для применения в качестве лекарственного средства, или фармацевтические композиции), содержащие по меньшей мере один белковый активный ингредиент, защищенный от пищеварительных ферментов. В рамках указанной композиции указанный по меньшей мере один активный ингредиент составлен таким образом, чтобы быть устойчивым к метаболизированию в желудочной и кишечной среде. Указанные композиции являются композициями для введения пероральным путем (через желудочно-кишечный тракт) указанного по меньшей мере одного белкового активного ингредиента (чувствительного к пищеварительным ферментам).

На сегодняшний день белковые активные ингредиенты, чувствительные таким образом к пищеварительным ферментам, в частности к инсулину и его аналогам (точнее, чувствительные к протеазам, таким как пепсин в желудке и прежде всего трипсин в кишечнике), в основном продолжают вводиться парентерально, несмотря на многочисленные исследования, которые были предприняты для исследования альтернативных путей доставки (в частности, более удобных для пациентов).

В статье Simona Cernea и Itamar Raz, опубликованной в *Timely Top. Med. Cardiovasc. Dis.* 2006 Nov. 1; Vol 10: E29, 2006, обобщены альтернативы инъекционному введению инсулина. Также существует большое количество патентных документов по этому вопросу, например WO 85/05029, патент США 5824638 и WO 2006/127361.

Самая передовая работа, вероятно, связана с введением назальным путем. Этот путь введения действительно будет менее технически ограничивающим, чем парентеральный путь. Слизистая оболочка носа с большим количеством сосудов обладает способностью абсорбировать белки и передавать их в кровеносную систему, что делает ее потенциально хорошим кандидатом. Тем не менее существует определенная трудность в контроле дозы, вводимой с помощью ингаляторов, в зависимости от состояния больного (особенно если пациент простужен и т.д.).

В данной области уже были раскрыты белковые активные ингредиенты, которые были химически модифицированы в соответствии с многочисленными вариантами и которые были составлены в соответствии с многочисленными вариантами. Это

патент США 4692433 раскрывает введение полипептидных гормонов пероральным путем. Указанные гормоны вводят преимущественно в буферных водных растворах, инкапсулированных в липосомы. Их не вводят в свободной форме;

документы WO 97/33531, WO 02/072075 и патент США 2003/0017203 раскрывают устойчивые к расщеплению в желудке формы для введения пептидов пероральным путем. Эти формы совмещают покрытие, защищающее от расщепления в желудке, и агент, снижающий pH. Указанное покрытие защищает активный ингредиент при пассаже его через желудок. При попадании в кишечник указанное покрытие растворяется, высвобождая как активный ингредиент, так и агент, снижающий pH. В результате действия указанного агента, снижающего pH, pH в кишечнике локально снижается, фактически уменьшая протеолитическую активность находящихся в кишечнике протеаз. Защита в желудке и на входе в кишечник, таким образом, обеспечивается двумя различными способами, действие которых развивается последовательно. Пептиды в данном случае не вступают в процесс ни в свободной форме, ни в присутствии буфера. В этой связи следует отметить, что в табл. 1 на стр. 23 заявки WO 97/33531 представлены показатели биодоступности буферизованных растворов кальцитонина. Испытания проводили с целью изучения влияния pH раствора, вводимого местно (непосредственно в кишечник крыс), на абсорбцию активного ингредиента. Эти испытания проводили с целью оптимизации характера агента, снижающего pH, предложенного в устойчивой к желудочному расщеплению форме. Эти испытания не описывают и не предлагают пероральные композиции изобретения (фармацевтические композиции или лекарственные средства), раскрытые ниже;

заявка США 2002/0132757 относится к введению кальцитонина в виде твердых частиц через эпителиальные мембраны через слизистую оболочку ротовой или носовой полости. Для этого специфического типа введения, который не связан с желудочно-кишечным трактом, активный ингредиент обрабатывают следующим образом. Вначале растворяют в буфере (просто технологическая добавка). Полученный раствор, дополненный одним или более поверхностно-активным веществом и одним или более усилителем абсорбции, подвергают лиофилизации. В конце полученные сухие частицы упаковывают в герметичный контейнер с подходящим растворителем или носителем (этанолом, например). Функцией этого растворителя или носителя является распространение под давлением указанных частиц по всей, как можно большей, области слизистых оболочек. Указанные частицы не вводят в присутствии буфера;

заявка США 2007/0154559 раскрывает сложный способ составления активных ингредиентов для введения пероральным путем. Проводился поиск улучшенной желудочно-кишечной абсорбции. В данном случае говорится об абсорбции наночастиц, содержащих указанные активные ингредиенты. В соответствии с раскрытым способом активный ингредиент вначале растворяют в буфере (просто технологическая добавка), а затем объединяют в комплекс с противоионом. Полученный комплекс находится в растворе в присутствии полимеров и липидов в органическом растворителе. Затем создают эмульсию из полученного органического раствора и водного раствора, содержащего эмульгатор. В конце путем эвапорации указанного органического растворителя формируют наночастицы. Таким образом, активный ингредиент не вводят ни в свободной форме, ни в присутствии буфера;

заявка WO 2007/032018 раскрывает сложный способ составления активных ингредиентов для введения пероральным путем того же типа, который раскрыт в заявке США выше. Активный ингредиент также доставляется в форме наночастиц. Указанные наночастицы (на основе жирных кислот и полимеров) чувствительны к pH. Они уменьшаются в размерах в кислой среде. Активный ингредиент, таким образом, лучше защищен при его прохождении через желудок. Здесь опять же активный ингредиент не вводят ни в свободной форме, ни в присутствии буфера;

заявка FR 2123524 раскрывает производное инсулина, полученное путем ацилирования. Химическая реакция в данном случае осуществляется в буферной среде. Заявка WO 01/36656 раскрывает комплекс биомолекулы и гиалуроновой кислоты. Эти два документа по уровню техники не раскрывают и не предлагают фармацевтические композиции, содержащие их активный ингредиент в свободной форме или в защитной буферной системе.

Изложенные выше комментарии обобщают уровень техники, касающийся принципов пероральной композиции, свободной формы белкового активного ингредиента и буфера, в той мере, в которой указанные принципы составляют основу данного изобретения, описанного ниже.

Техническая проблема перорального пути введения белкового активного ингредиента (таким образом, чувствительного к пищеварительным ферментам) является двойственной, поскольку система предоставляемой защиты должна априори быть эффективной как в желудке, так и на входе в кишечник. Она априори должна быть устойчивой вначале к действию желудочного сока, а затем к действию панкреатического сока. Действительно, на выходе из желудка, в привратнике, когда кислый химус переходит в двенадцатиперстную кишку, секретин высвобождается из кишечника и стимулирует поджелудочную железу к выделению как бикарбоната (чтобы уменьшить кислотность указанного химуса), так и холецистокинина (панкреозимина), который стимулирует секрецию панкреатического сока, богатого ферментами (трипсиногеном и химотрипсиногеном, превращающимися в трипсин и химотрипсин с помощью энтерокиназы). Когда кислотность нейтрализуется в двенадцатиперстной кишке в результате секреции гидрокарбоната, возникает обратная связь и происходит торможение секреции поджелудочной железы. Этот нормальный пищеварительный механизм хорошо знаком специалистам в данной области.

Столкнувшись с указанной технической проблемой введения белкового активного ингредиента пероральным путем, изобретатели предлагают совершенно новое решение, основанное не на двойной системе защиты, а на системе защиты в желудке, что также тормозит секрецию поджелудочной железы (что устраняет проблему деградации активного ингредиента при входе в кишечник). Изобретатели апостериори так объясняют хорошие результаты, полученные с композициями изобретения. Новая система защиты предполагается буферной системой. Совершенно удивительным образом указанная новая система защиты, буферная система, позволяет вводить пероральным путем (через желудочно-кишечный тракт) белковый активный ингредиент в свободной форме.

В соответствии со своим первым предметом данное изобретение, таким образом, относится к новым композициям для применения в качестве лекарственного средства или фармацевтических композиций, предназначенных для (подходящих для) введения пероральным путем по меньшей мере одного белкового активного ингредиента; указанные композиции являются буферными.

Точнее композиции изобретения представлены в жидкой или твердой форме. Указанные композиции являются пероральными композициями, содержащими по меньшей мере один белковый активный ингредиент. Они подходят для введения указанного активного ингредиента пероральным путем.

Характерно, что указанные композиции являются жидкостями, содержащими систему (буферную систему), способную их буферизовать при pH больше 4 и меньше или равном 8;

твердыми веществами, содержащими систему (буферную систему), которая оказывает, когда они находятся в жидкой (как правило, водной) среде, буферный эффект между pH больше 4 и pH меньше или равном 8.

В соответствии со своим первым предметом данное изобретение, таким образом, относится к композициям в жидкой или твердой форме которые содержат по меньшей мере один белковый активный ингредиент в свободной форме, а также для жидкостей систему (буферную систему), способную их буферизовать при pH больше 4 и меньше или равном 8, а для твердых веществ систему (буферную систему), которая оказывает, когда они находятся в жидкой среде, буферный эффект между pH больше 4 и pH меньше или равном 8, для применения в качестве лекарственного средства для введения пероральным путем (через желудочно-кишечный тракт) указанного по меньшей мере одного белкового активного ингредиента;

фармацевтическим композициям в жидкой или твердой форме для введения пероральным путем (через желудочно-кишечный тракт), содержащим по меньшей мере один белковый активный ингредиент, который содержит указанный белковый активный ингредиент в свободной форме, а также для жидкостей систему (буферную систему), способную их буферизовать при pH больше 4 и меньше или равном на 8, а для твердых веществ систему (буферную систему), которая оказывает, когда они находятся в жидкой среде, буферный эффект между pH больше 4 и pH меньше или равном 8.

Указанные композиции изобретения получают путем (простого) составления указанного по мень-

шей мере одного белкового активного ингредиента в свободной форме с системой (буферной системой), способной их буферизовать в жидкой форме при pH больше 4 и меньше или равном 8, а в твердом виде - с системой (буферной системой), которая оказывает, когда они находятся в жидкой среде, буферный эффект между pH больше 4 и pH меньше или равном 8.

Характерно, что жидкие или твердые (в любом случае монофазные (однофазные)) композиции изобретения являются пероральными композициями, которые сочетают в себе по меньшей мере один белковый активный ингредиент в свободной форме и буферную систему. Указанная буферная система позволяет, как указывалось выше, вводить перорально белковый активный ингредиент в свободной форме. Он эффективно защищает указанную свободную форму в желудочно-кишечном тракте.

В композициях изобретения белковый активный ингредиент, таким образом, присутствует "как есть", не является непосредственно защищенным, в частности не защищен физическим барьером. Он присутствует "как есть" или в простой смеси с эксципиентами, необходимыми для его составления. "Свободная форма указанного активного ингредиента" означает прежде всего указанный активный ингредиент без физической системы защиты, более или менее сложной, такой как покрытие, матрица или стенка капсулы (указанный активный ингредиент является не покрытым, не закрепленным на матрице и не инкапсулированным (в частности, в липосоме) и т.д.).

Буферная система с учетом изложенных значений pH способна буферизовать композиции изобретения в желудочной среде и в кишечной среде. Это, конечно, может быть ее буферным эффектом в течение всего пищеварения: по меньшей мере 2 ч, преимущественно до 3 ч (в кислых условиях желудка и щелочных условиях кишечника). Специалистам в данной области знакомы такие буферные системы. В качестве неограничивающего примера природа таких систем указана ниже.

Композиции изобретения объединяют

по меньшей мере один белковый активный ингредиент в свободной форме (см. выше), как правило, один такой активный ингредиент (но комбинированное участие нескольких активных ингредиентов этого типа (или по меньшей мере одного активного ингредиента этого типа и по меньшей мере одного другого активного ингредиента), в смеси или по отдельности, не исключается из сферы изобретения); и

систему (буферную систему), способную оказывать буферный эффект в диапазоне pH, изложенном выше.

Действие указанного буферного эффекта в указанном диапазоне pH ( $4 < \text{pH} \leq 8$ ), конечно, совместимо со стабильностью указанного по меньшей мере одного белкового активного ингредиента (в любом случае со стабильностью имеющегося активного ингредиента(ов)).

Композиции изобретения являются буферными при  $\text{pH } 4 < \text{pH} \leq 8$ . Они преимущественно являются буферными при pH от 4,5 до 7,5 ( $4,5 \leq \text{pH} \leq 7,5$ ), более преимущественно являются буферными при pH между 5 и 7 ( $5 \leq \text{pH} \leq 7$ ), более того при pH больше 5 и меньше или равном 7 ( $5 < \text{pH} \leq 7$ ). В частном предпочтительном варианте они являются буферными при pH 6,5 или близко к 6,5 ( $6,5 \pm 0,2$ ). Эта величина является вполне особенно предпочтительной в контексте композиции изобретения, содержащей инсулин.

Композиции изобретения содержат по меньшей мере один белковый активный ингредиент, который они способны защитить от пищеварительных ферментов. Инсулин уже упоминался как один из таких активных ингредиентов, чувствительных к пищеварительным ферментам. Изобретение было разработано специально в связи с этим активным ингредиентом (см. примеры и тесты, представленные ниже). Тем не менее специалисты в данной области четко понимают, что область применения, безусловно, является более широкой. Рассматриваемый механизм априори (что изобретатели предполагают апостериори) - защита при прохождении в желудке (при  $\text{pH} > 4$  пепсин больше не активен (или почти не активен) и торможение (более или менее последовательное) секреции поджелудочной железы, поскольку кислый химус не проходит в двенадцатиперстную кишку - подходит для защиты всех белковых активных ингредиентов от пищеварительных ферментов.

Таким образом, композиции изобретения содержат преимущественно по меньшей мере один белковый активный ингредиент (в свободной форме), выбранный среди инсулина, его аналогов и их производных (как правило и преимущественно содержат инсулин или аналог или его производное в качестве единственного активного ингредиента этого типа или в качестве единственного активного ингредиента). Специалисты в данной области знакомы с аналогами инсулина, такими как, например, инсулин лизпро, инсулин аспарт, инсулин гларгин и инсулин детемир. Специалистам в данной области также знакомы производные инсулина, такие которые описаны в заявке FR 2123524.

Таким образом, композиции изобретения содержат преимущественно в качестве активного ингредиента (в свободной форме)

инсулин или его аналог или их производное,

соматотропин (человеческий гормон роста) или его производное, кальцитонин, или

аналог LHRH (рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона), такой как трипторелин.

Напомним, что композиции изобретения могут содержать несколько таких активных ингредиентов и что перечень выше является далеко не исчерпывающим и никаким образом не ограничивающим.

Буферные системы, подходящие для целей изобретения, являются обычными буферными системами, преимущественно высокой емкости. Специалисты в данной области знакомы с такими системами и способны оптимизировать сочетание в контексте изобретения: по меньшей мере один белковый активный ингредиент (в свободной форме)/буферная система (например, инсулин/буферная система).

В полностью неограничивающей манере можно констатировать, что система, ответственная за буферный эффект в композиции изобретения, является преимущественно буфером, выбранным среди фосфатного, ацетатного, малеатного, фталатного, сукцинатного, цитратного, имидазольного, тетрабутиламмонийного, 2-амино-2-гидроксиметил-1,3-пропандиольного (или тригидроксиметиламинометанового, или трометамольного или Там или Tris), трис-глицинового, барбиталового, трис-ЭДТА BSA, меднокупоросного и цвиттерионного буферов.

В целом, буферная система композиций изобретения может быть выбрана из списка буферных систем, данных в Европейской фармакопее, текущее издание (монография 4.1.3).

Указанная буферная система преимущественно является фосфатным или Tris-буфером.

Предложенный фосфатный буфер содержит от 2 до 3 вес.% дигидрофосфата натрия и от 97 до 98 вес.% гидрофосфата натрия и преимущественно содержит примерно 2,8 вес.% дигидрофосфата натрия и примерно 97,2 вес.% гидрофосфата натрия.

Пероральные композиции изобретения (сочетающие в новой манере по меньшей мере один белковый активный ингредиент в свободной форме и выбранную буферную систему:  $4 < \text{pH} \leq 8$ ) могут существовать в соответствии с двумя вариантами.

Согласно первому, более традиционному, варианту указанные композиции собирают в единой форме. Все основные ингредиенты, включая буферные системы, собирают вместе. В рамках этого первого варианта существует много возможностей. Композиции изобретения, в частности, могут быть предложены в жидких формах (непосредственно буферизованных до подходящего pH), таких как растворы, суспензии и сиропы, либо в твердых формах (которые развивают буферный эффект при разведении в жидкости, как правило, в воде, или после их потребления, в желудке), таких как таблетки (обычные (могут быть проглочены), для рассасывания, подъязычные, растворимые, растворимые в полости рта, шипучие), капсулы, порошки, шипучие порошки, гранулы, шипучие гранулы и лиофилизаты. Эти списки не являются исчерпывающими. Специалистам в данной области известно, как собрать ту или иную единую форму, описанную выше, из активного ингредиента данного случая и подходящей системы, ответственной за требуемый буферный эффект.

В ходе изготовления шипучих лекарственных форм целесообразно добавлять ингредиенты, которые обеспечивают ожидаемый шипучий характер. Эти типы ингредиентов (реагентов (как правило, два реагента), которые реагируют с выделением газа) знакомы специалистам в данной области.

В рамках данного первого варианта композиции изобретения преимущественно предложены в виде твердых лекарственных препаратов, в частности растворимых таблеток или шипучих таблеток.

В соответствии со вторым вариантом композиции изобретения являются композициями по меньшей мере с двумя отдельными компонентами, в частности композициями, которые включают отдельно один компонент, содержащий по меньшей мере один белковый активный ингредиент в свободной форме, а также другой компонент, содержащий по меньшей мере одну систему, которая создает желаемый буферный эффект.

Эти два разделенных компонента будут вводиться одновременно или почти одновременно, таким образом, конечно, чтобы буферный эффект развивался при прохождении активного ингредиента в пищеварительном тракте (в первую очередь в желудке).

Композиции изобретения (в соответствии с первым или вторым вариантом выше), содержащие по меньшей мере один белковый активный ингредиент в свободной форме (или указанный по меньшей мере один белковый активный ингредиент в свободной форме и по меньшей мере один активный ингредиент) и составную буферную систему, обычно в фармацевтически приемлемом эксципиенте (при необходимости, с ингредиентами, делающими их шипучими), конечно, могут содержать другие ингредиенты, которые присутствуют в обычных фармацевтических композициях, такие как подсластители, ароматизаторы и/или технологические добавки (смазочные материалы и т.д.). Жидкие композиции могут содержать только указанный по меньшей мере один белковый активный ингредиент (или указанный по меньшей мере один белковый активный ингредиент в свободной форме и по меньшей мере один активный ингредиент) и подходящую буферную систему. Как правило, они содержат, помимо этих двух компонентов, ингредиенты для состава, традиционно используемые в фармацевтических составах (например ингредиенты, перечисленные выше). Твердые композиции помимо указанного по меньшей мере одного белкового активного ингредиента (или в дополнение к указанному по меньшей мере одному белковому активному ингредиенту в свободной форме и по меньшей мере одному активному ингредиенту) и буферной системы, как правило, содержат твердый эксципиент (основу, возможно с ингредиентами, ответственными за выделение пузырьков газа) с различными добавками (такими как перечисленные выше ингредиенты).

Изготовление композиций изобретения, в единой форме или нет, как описано выше, является вторым предметом данного изобретения. Указанное изготовление представляет собой изготовление фармацевтической композиции, которая является забуферизованной или комбинируется с буфером. Характер-

но, что она содержит (простую) форму по меньшей мере с одним белковым активным ингредиентом в свободной форме и системой (буферной системой), способной буферизовать указанную композицию в жидкой форме (в частности, в желудочной среде и в кишечной среде) при pH больше 4 и меньше или равном 8, а в твердом виде с системой (буферной системой), которая оказывает, при помещении указанной твердой формы в жидкую среду, в частности в водную среду (в частности, в желудочную и в кишечную среду), буферный эффект между pH больше 4 и pH меньше или равном 8. Термин "состав" нужно понимать и использовать в общепринятом смысле этого термина (галеновый препарат) для изготовления единых композиций, а также в более широком смысле (состав - упаковка) для изготовления композиций с отдельными компонентами.

Условно другие ингредиенты могут быть включены в изготовление композиций изобретения.

Специалисты в данной области понимают важность данного изобретения, которая подтверждается примерами и результатами испытаний, приведенными ниже. "Двойной положительный эффект" буфера - гастропротекция и торможение секреции поджелудочной железы - является особенно эффективным. Этот двойной эффект и его эффективность являются действительно удивительными.

В соответствии с другими его аспектами изобретение предлагает новое применение буферных систем и, следовательно, также относится к применению буферной системы, указанной выше, в частности, выбранной из числа указанных выше, для защиты по меньшей мере одного белкового активного ингредиента в свободной форме при его прохождении через желудочно-кишечный тракт. Иными словами, изобретение предлагает новый способ защиты белковых активных ингредиентов в отношении пищеварительных ферментов (при прохождении через желудочно-кишечный тракт). Указанный способ, по существу, включает составление, в единой форме или нет, указанных активных ингредиентов в свободной форме с буферной системой, такой как указано выше, в частности выбранной из числа указанных выше.

Наконец, изобретение можно рассматривать как способ терапевтического лечения, содержащий введение пероральным путем по меньшей мере одного белкового активного ингредиента, и/или как способ перорального введения по меньшей мере одного белкового активного ингредиента. Характерно, что в контексте указанного способа указанный по меньшей мере один белковый активный ингредиент вводят (сформированный в твердой или жидкой композиции, в единой форме или нет) в свободной форме с буферной системой, указанной выше, т.е. буферизованным до pH, указанного выше,  $4 < \text{pH} \leq 8$  (в случае жидкой формы), либо он может быть буферизован до такого pH при помещении его в жидкую среду (в случае твердой формы). Рассматриваемое лечение касается заболеваний или расстройств, уточненных далее: сахарный диабет (в случае введения инсулина), замедление роста (в случае введения соматотропина), остеопороз (в случае введения кальцитонина), рак предстательной железы (в случае введения LHRH (релизинг-фактора лютеинизирующего гормона)).

Изобретение теперь можно проиллюстрировать путем приведения на чисто иллюстративной основе формулы двух буферных инсулиновых таблеток изобретения, а также ниже будет продемонстрировано большое значение указанного изобретения, представлены сравнительные результаты физико-химических испытаний, проведенных *in vitro*, и фармакологических испытаний, проведенных *in vivo* с инсулином.

#### I. Формулы.

Два типа таблеток изобретения были изготовлены в соответствии со способом, известным как таковой (обычный способ составления), из указанных ингредиентов, используемых в указанных количествах растворимые таблетки А; а также шипучие таблетки В.

##### Таблетки А

человеческий инсулин	:	3,5 мг (100 U)
триметамол (TRIS)	:	100 мг
фосфат кальция (гидрофосфат)	:	250 мг
микросталлическая	:	250 мг
целлюлоза		
маннитол	:	250 мг
стеарат магния	:	10 мг
коллоидный кремнезем	:	1 мг
кросповидон	:	50 мг
бензоат натрия	:	30 мг
тальк	:	10 мг
лимонная кислота	}	q.s. pH 6,5
цитрат натрия		
однозамещенный		

Вес таблетки: 1 грамм

## Таблетки В

человеческий инсулин	:	3,5 мг (100 U)
безводный цитрат натрия	:	1142,7 мг
однозамещенный		
безводный бикарбонат натрия	:	2076 мг
бензоат натрия	:	152,60 мг
ортофосфат натрия однозамещенный	:	120 мг
этанол 96 %	}	q.s. для грануляции
деминерализованная вода		

Для таблетки с теоретическим весом: 3,5 г

в растворе pH 6,8.

## II. Испытания in vitro.

Испытания проводили in vitro для подтверждения метаболической роли пепсина в кислой среде, метаболической роли трипсина в щелочной среде и инактивации обоих этих пищеварительных ферментов в буферной среде в соответствии с изобретением.

Во время этих различных тестов инсулин анализировали с помощью жидкостной хроматографии.

## Тест 1'.

Раствор человеческого инсулина (100 U)

+ 0,1 N HCl (50 мл), pH 1

+ перемешивание при температуре 37°C в течение 1, 2, 3 ч

Время	Содержание инсулина
Время 0	99,00 U
1 ч	99,87 U
2 ч	100,13 U
3 ч	100,30 U

В кислой среде при pH 1 без пепсина инсулин стабилен в течение более 3 ч при температуре 37°C.

## Тест 2'.

Раствор человеческого инсулина (100 U)

+ 0,1 N HCl (50 мл), pH 1

+ пепсин (160 мг)

+ перемешивание при температуре 37°C в течение 1 ч

Время	Содержание инсулина
Время 0	0 U
1 ч	0 U

В присутствии желудочного фермента (пепсина) при pH 1 инсулин немедленно деградирует.

## Тест 1 (изобретение).

Раствор человеческого инсулина (100 U)

+ 0,1 N HCl (50 мл), pH 1

+ пепсин (160 мг)

+ фосфатный буфер pH 6,8 (50 мл)

+ перемешивание при температуре 37°C в течение 1, 2, 3 ч

Время	Содержание инсулина
Время 0	101,32 U
1 ч	101,73 U
2 ч	99,72 U
3 ч	101,60 U

В среде, буферизованной до pH 6,8, пепсин уже не активен, а инсулин стабилен в течение более 3 ч при температуре 37°C.

## Тест 3'.

Раствор человеческого инсулина (100 U)

+ 0,1 N HCl

+ фосфатный буфер pH 8,5

+ перемешивание при температуре 37°C в течение 1, 2, 3 ч

Время	Содержание инсулина
Время 0	100 U
1 ч	99,59 U
2 ч	100,24 U
3 ч	100,48 U

С помощью этого анализа проверяли эффективность буфера и тот факт, что в отсутствие фермента инсулин стабилен в щелочной среде.

Тесты 2а, 2b, 2с (изобретение).

Раствор человеческого инсулина (100 U)

+ фосфатный буфер pH 6 (тест 2а), pH 6,5 (тест 2b), pH 6,8 (тест 2с)

+ перемешивание при температуре 37°C в течение 1, 2 ч

Время	Содержание инсулина		
	pH 6	pH 6,5	pH 6,8
Время 0	100 U	100 U	98 U
1 ч	92 U	83 U	56 U
2 ч	86 U	72 U	48 U

В среде, буферизованной до указанного pH, метаболический эффект трипсина в основном ослаблен. Тест 4'.

Раствор человеческого инсулина (100 U)

+ фосфатный буфер pH 8,5

+ трипсин 750 U

+ перемешивание при температуре 37°C в течение 1, 2 ч

Время	Содержание инсулина
Время 0	89 U
1 ч	14,5 U
2 ч	1,5 U

В присутствии кишечного фермента (трипсина) при pH 8,5 инсулин сильно деградирует.

Рассмотрение этих результатов (при щелочном pH) показывает, что чем сильнее pH стремится в сторону щелочности, тем сильнее трипсин оказывает свой метаболический эффект.

Оптимальной точкой представляется pH 6,5 (близко к нейтральной pH), при котором через 2 ч, несмотря на наличие трипсина, обнаруживается высокий процент инсулина: 72%.

III. Испытания *in vivo*.

Гипогликемическую активность двух типов шипучих таблеток (с буферной системой изобретения: таблетки В (см. выше) и без буферной системы изобретения: контрольные шипучие таблетки (таблетки В, но без буфера)) изучали на крысах, у которых формировали диабет (гипергликемию) путем введения стрептозотоцина.

Стрептозотоцин, антибиотик, химически связанный с нитрозомочевинной, обладает свойством вызывать диабет в связи с деструкцией островков Лангерганса поджелудочной железы.

Этот тест хорошо знаком специалистам в данной области. Его принцип приводится ниже.

Введение самцам крыс линии Вистар (средний вес 200 г) внутривентриально 70 мг/кг стрептозотоцина вызывает у животных через 72 ч тяжелую гипергликемию в сочетании с полифагией, полидипсией и полиурией.

Животных делили на три группы по 8 особей.

Группа 1: нормальные животные, без гипергликемии, получающие пероральным путем с помощью пищеводного зонда 30 ед. инсулина, содержащиеся в таблетке, буферизованной до pH 6,8 (шипучая таблетка В (см. выше)), в объеме 10 мл/кг.

Группа 2: животные с диабетом, получающие пероральным путем с помощью пищеводного зонда 30 ед. инсулина, содержащиеся в небуферизированной таблетке (шипучая таблетка В, но без буфера), в объеме 10 мл/кг.

Группа 3: животные с диабетом, получающие пероральным путем с помощью пищеводного зонда 30 ед. инсулина, содержащиеся в таблетке, буферизованной до pH 6,8 (шипучая таблетка В (см. выше)), в объеме 10 мл/кг.

Каждые 15 мин в течение 3 ч из хвоста животного брали образцы крови и оценивали гликемию с помощью глюкометра Abbott.

Результаты представлены в таблице ниже. Они выражены в граммах глюкозы на литр, а также в миллиэквивалентах (табл. 1) и в процентах снижения гликемии (табл. 2).



Таблица 1. Гликемия (г/л и мЭкв/л)

Время (мин)		0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180
Группа 1	г/л	0,99 ±0,04	0,99 ±0,03	0,98 ±0,05	0,90 ±0,03	0,85 ±0,04	0,82 ±0,05	0,82 ±0,06	0,84 ±0,06	0,91 ±0,05	0,95 ±0,04	0,99 ±0,03	1,01 ±0,02	0,99 ±0,03
	мЭкв/л	5,50 ±0,2	5,50 ±0,16	5,45 ±0,3	5 ±0,16	4,72 ±0,2	4,56 ±0,3	4,56 0,33	4,7 ±0,33	5 ±0,16	5,3 ±0,2	5,50 ±0,16	5,6 ±0,1	5,5 ±0,16
Группа 2	г/л	3,94 ±0,18	3,92 ±0,16	3,91 ±0,16	3,88 ±0,15	3,84 ±0,16	3,81 ±0,14	3,82 ±0,15	3,87 ±0,13	3,91 ±0,14	3,94 ±0,15	3,95 ±0,15	3,95 ±0,16	3,92 ±0,17
	мЭкв/л	22 ±1	21,7 ±0,9	21,7 ±0,9	21,6 ±0,8	21,3 ±0,9	21,2 ±0,8	21,2 ±0,8	21,5 ±0,7	21,7 ±0,8	21,9 ±0,8	21,9 ±0,8	21,9 ±0,9	21,8 ±0,9
Группа 3	г/л	3,8 ±0,5	3,7 ±0,5	3,2 ±0,4	2,5 ±0,3	2,5 ±0,4	1,76 ±0,3	1,64 ±0,4	1,6 ±0,4	1,65 ±0,5	1,8 ±0,5	2,3 ±0,6	2,78 ±0,8	3,4 ±0,8
	мЭкв/л	21,1 ±2,8	20,6 ±2,8	17,8 ±2,2	14 ±1,7	11,4 ±2,2	9,8 ±1,7	9,1 ±2,2	8,9 ±2,2	9,2 ±2,8	10 ±2,8	12,8 ±3,3	15,4 ±4,5	19 ±4,5

Таблица 2. Процент уменьшения гликемии

Время (мин)	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180
Группа 1	0	1	9	14	17	17	15	8	4	0	0	0
Группа 2	0,50	0,75	1,5	2,5	3,3	3	1,8	0,75	0,50	0	0	0
Группа 3	1	16	33	46	54	56	57	57	52	39	27	11

Результаты из табл. 2 были отмечены на одном графике в приложении (процент снижения гликемии в зависимости от времени (выраженном в минутах))

- ■ - кривая демонстрирует результаты в группе 1,
- ◆ - кривая демонстрирует результаты в группе 2,
- ▲ - кривая демонстрирует результаты в группе 3.

Изучение результатов показывает

у нормальных (без гипергликемии) животных (группа 1) введение буферизованного инсулина приводит через 45 мин к некоторому снижению гликемии с максимумом на 75-й мин, а затем гликемия возвращается к нормальным значениям после 150-й мин. Эти животные с интактной поджелудочной железой компенсируют секрецию глюкагона, который является гипергликемическим;

у животных с диабетом (группа 2) введение небуферизованного инсулина приводит к очень небольшому, незначительному снижению гликемии. В ходе эксперимента у животных сохраняется очень высокий уровень гликемии;

у животных с диабетом (группа 3) введение буферизованного инсулина приводит через 45 мин к весьма значительному снижению гликемии с максимумом на 105-й мин, а затем наблюдается постепенное повышение гликемии. У всех животных значительно улучшилось состояние, хотя они и не вернулись к нормальному уровню гликемии в связи с тяжестью диабета.

Эти результаты показывают, что используемая буферная система позволяет сохранить гипогликемическую активность инсулина при введении пероральным путем (что полностью согласуется с результатами, полученными *in vitro*), и подтверждают хорошую биодоступность указанного инсулина.

Результаты, как *in vitro*, так и *in vivo*, демонстрируют эффективность буферной системы в сохранении активности инсулина

*in vitro*

в кислой среде, без буферизации, инсулин метаболизируется пепсином (тест 2'). В среде, буферизованной до pH 6,8, пепсин не проявляет активности, и в результате через 3 ч инсулин находится на уровне 100% (тест 1),

в щелочной среде инсулин метаболизируется трипсином (тест 4'). В средах, буферизованных до pH 6, 6,5 и 6,8, активность указанного трипсина ингибирована, более или менее уменьшена;

*in vivo*

небуферизованный препарат не проявляет практически никакой активности. Напротив, буферизованный препарат проявляет сильную гипогликемическую активность.

Во всех анализах, как *in vitro*, так и *in vivo*, использовали человеческий инсулин. Очевидно, что полученные результаты применимы ко всем аналогам инсулина.

Учитывая эти результаты, важность данного изобретения является совершенно очевидной. Эта важность была подтверждена предварительными испытаниями на людях.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере один белковый активный ингредиент в свободной форме, выбранный среди инсулина, аналогов инсулина и производных инсулина, а также буферную систему, которая стабилизирует pH на уровне между 5 и 7.

2. Композиция по п.1 в жидкой форме, содержащая по меньшей мере один белковый активный ингредиент в свободной форме, выбранный среди инсулина, аналогов инсулина и производных инсулина, и систему, способную стабилизировать pH на уровне между 5 и 7.

3. Композиция по п.1 в твердой форме, содержащая по меньшей мере один белковый активный ингредиент в свободной форме, выбранный среди инсулина, аналогов инсулина и производных инсулина, и буферную систему, которая при помещении в жидкую среду стабилизирует pH на уровне между 5 и 7.

4. Композиция по любому из пп.1-3, характеризующаяся тем, что указанная система, ответственная за буферный эффект, является буфером, выбранным среди фосфатного, ацетатного, малеатного, фталатного, сукцинатного, цитратного, имидазольного, тетрабутиламмонийного, тригидроксиметиламинометанового, трис-глицинового, барбиталового, трис-ЭДТА BSA, меднокупоросного и цвиттерионного буферов.

5. Композиция по любому из пп.1-4, характеризующаяся тем, что она представлена в единой лекарственной форме.

6. Композиция по любому из пп.1, 2, 4 или 5, характеризующаяся тем, что она находится в форме раствора, суспензии или сиропа.

7. Композиция по любому из пп.1, 3-5, характеризующаяся тем, что она находится в форме таблеток, в том числе диспергируемых таблеток, ородиспергируемых таблеток, шипучих таблеток, либо капсул, порошков, шипучих порошков, гранул, шипучих гранул или лиофилизата.

8. Композиция по любому из пп.1, 3-5 или 7, характеризующаяся тем, что она находится в форме диспергируемых таблеток, шипучих таблеток или шипучих гранул.

9. Композиция по любому из пп.1-4, характеризующаяся тем, что указанная система, ответственная за буферный эффект, и указанный по меньшей мере один белковый активный ингредиент представлены в отдельных лекарственных формах.

10. Применение композиции по любому из пп.1-9 для лечения диабета пероральным путем.

11. Применение буферной системы, которая способна стабилизировать pH на уровне между 5 и 7, для изготовления фармацевтической композиции для лечения диабета пероральным путем, содержащей по меньшей мере один белковый активный ингредиент в свободной форме, выбранный среди инсулина, аналогов инсулина и производных инсулина, вместе с указанной буферной системой.

12. Способ лечения диабета, включающий пероральное введение фармацевтической композиции в соответствии с любым из пп.1-9.

13. Применение композиции, содержащей по меньшей мере один белковый активный ингредиент в свободной форме, выбранный среди инсулина, аналогов инсулина и производных инсулина, а также буферной системы, которая стабилизирует pH на уровне между 5 и 7, в качестве перорального лекарственного препарата для лечения диабета.

