



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: **2008114361/15**, **14.09.2006**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
14.09.2006

(30) Конвенционный приоритет:
14.09.2005 US 60/717,524
14.04.2006 US 60/744,882

(43) Дата публикации заявки: **20.10.2009**

(45) Опубликовано: **27.05.2010** Бюл. № 15

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: **US 2003/0013641 A1**, **16.01.2003. WO**
2005/020964 A1, **10.03.2005. WO 02/058735 A1**,
01.08.2002. WO 02/067995 A1, **06.09.2002.**

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную
фазу: **14.04.2008**

(86) Заявка РСТ:
US 2006/035822 (14.09.2006)

(87) Публикация РСТ:
WO 2007/033316 (22.03.2007)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул.Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городиский и
Партнеры", пат.пов. А.В.Мишу, рег.№ 364

(72) Автор(ы):

ХОУКНСОН Марк (US),
ОБЕРГ Кит А. (US)

(73) Патентообладатель(и):

МАННКАЙНД КОРПОРЕЙШН (US)

**(54) СПОСОБ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА, ОСНОВАННЫЙ НА
УВЕЛИЧЕНИИ СРОДСТВА АКТИВНЫХ АГЕНТОВ К ПОВЕРХНОСТЯМ
КРИСТАЛЛИЧЕСКИХ МИКРОЧАСТИЦ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к способу адсорбирования активного агента, представляющего собой белок или пептид, на поверхности заранее сформированной кристаллической дикетопиперазиновой микрочастицы, который включает стадию модифицирования химического потенциала активного агента, которое предусматривает энергетически благоприятное взаимодействие между активным агентом и

дикетопиперазиновой микрочастицей и не включает удаление растворителя, и стадию адсорбирования активного агента на поверхности заранее сформированной кристаллической дикетопиперазиновой микрочастицы. Модифицирование химического потенциала включает изменение условий раствора путем добавления модификатора активного агента к раствору. Изобретение направлено на увеличение адсорбции активного агента на поверхности

микрочастицы со снижением его тенденции оставаться в растворе. 2 н. и 29 з.п. ф-лы, 17 ил.

RU 2 3 9 0 3 2 5 C 2

RU 2 3 9 0 3 2 5 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

A61J 3/00 (2006.01)**A61K 9/16** (2006.01)**A61K 38/00** (2006.01)**A61K 47/22** (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2008114361/15, 14.09.2006**(24) Effective date for property rights:
14.09.2006(30) Priority:
14.09.2005 US 60/717,524
14.04.2006 US 60/744,882(43) Application published: **20.10.2009**(45) Date of publication: **27.05.2010 Bull. 15**(85) Commencement of national phase: **14.04.2008**(86) PCT application:
US 2006/035822 (14.09.2006)(87) PCT publication:
WO 2007/033316 (22.03.2007)Mail address:
129090, Moskva, ul.B.Spaskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. A.V.Mitsu, reg.№ 364

(72) Inventor(s):

KhOUKNSON Mark (US),
OBERG Kit A. (US)

(73) Proprietor(s):

MANNKAJND KORPOREJShN (US)**(54) METHOD FOR PREPARING DRUG BASED ON HIGHER AFFINITY OF ACTIVE AGENTS TO CRYSTALLINE MICROPARTICLE SURFACES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to methods for adsorption of an active agent representing protein or peptide, on a surface in a pre-formed crystalline diketopiperazine microparticles which includes the stage: modifying of chemical potential of the active agent which provides energy-favourable reaction of the active agent and the diketopiperazine microparticle and does not include solvent removal,

and the stage of adsorption of the active agent on a surface of the pre-formed crystalline diketopiperazine microparticle. The modifying stage of chemical potential includes change of the solution medium by adding a modifier of the active agent to the solution.

EFFECT: higher adsorption of the active agent on the surfaces of the microparticle with reduced tendency to remain in the solution.

31 cl, 17 dwg, 7 ex

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает преимущества на основании 35 USC §119(e) по предварительной заявке США серийный №60/717524, поданной 14 сентября 2005, и предварительной заявке США серийный №60/744882, поданной 14 апреля 2006, все
5 содержание которых приведено здесь в качестве ссылки в полном объеме.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к приготовлениям лекарственных препаратов и, в частности, относится к способам. Более определенно, оно раскрывает прикрепление
10 или адсорбирование активных агентов на поверхности кристаллических микрочастиц.

Уровень техники

Доставка терапевтических средств является главной проблемой. Пероральное введение является одним из самых распространенных и предпочтительных путей доставки вследствие легкости введения, соблюдения схемы лечения и сниженной
15 стоимости. Однако неудобства этого пути включают низкую или непостоянную эффективность и неэффективную адсорбцию лекарства. Это особенно очевидно, когда доставляемое соединение является нестабильным при условиях, с которыми оно сталкивается в желудочно-кишечном тракте. В данной области техники было
20 разработано множество покрытий и способов заключения в оболочку, но только немногие являются эффективными в решении этого вопроса. Однако имеются терапевтические соединения, которые имеют тенденцию быть менее активными в условиях желудочно-кишечного тракта и которые нужно вводить в более высоких дозировках для их адсорбции в кровоток в эффективном количестве.

Широкий диапазон систем для приготовления лекарственных препаратов был разработан для решения проблемы оптимальной доставки лекарственного препарата и основывается на включении лекарственного препарата в матрицу, которая действует как переносчик. Факторы, которые учитывают при приготовлении лекарственного
30 препарата, включают условия, при которых система должна быть нетоксичной и нереактивной с доставляемым лекарственным препаратом, экономичной в изготовлении, сформированной из легко доступных компонентов и постоянной относительно окончательного состава и физических характеристик, включая стабильность и скорость высвобождения. Также предпочтительно, чтобы система для
35 доставки лекарственного препарата была сформирована из материалов, легко выводимых из организма с помощью нормальных физиологических процессов.

Прогресс в микротехнологии помог разработать улучшенные композиции лекарственных препаратов. Однако, несмотря на эти достижения, все еще сохраняется
40 потребность в области техники для устойчивых композиций лекарственных препаратов, имеющих долгосрочную эффективность и оптимальную адсорбцию при введении в качестве фармацевтического препарата, особенно с помощью легочных средств. Один подход к устранению этого дефицита состоит в том, чтобы нацелиться на структурные характеристики/свойства активного агента, которые стимулировали
45 бы его адсорбцию на поверхности микрочастицы и уменьшали бы его тенденцию оставаться в растворе.

Сущность изобретения

Предоставляются способы прикрепления, покрытия или адсорбирования активного
50 агента на поверхности кристаллической микрочастицы. В большинстве случаев микрочастицы покрывают активным агентом с помощью модифицирования системы, включающей микрочастицы и такой растворенный активный агент, что активный агент имеет большее сродство к поверхности микрочастицы, чем к тому, чтобы

остаться в растворе. В особенности, настоящее изобретение стремится дополнительно стимулировать адсорбцию активного агента на поверхности микрочастицы с помощью модифицирования/использования свойств активного агента под влиянием множества условий в растворе.

Таким образом, в настоящем изобретении предоставляется способ стимуляции фиксации активного агента к заранее сформированной кристаллической микрочастице в суспензии, включающий стадии: I) модифицирование химического потенциала активного агента, где изменение предусматривает энергетически благоприятное взаимодействие между активным агентом и микрочастицей, независимое от удаления растворителя; и II) адсорбирование активного агента на поверхности микрочастицы.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения модифицирование химического потенциала включает модифицирование структуры, гибкости, жесткости, растворимости или стабильности активного агента, индивидуально или в комбинации. Модифицирование химического потенциала активного агента включает изменение состояния раствора. Изменение состояний раствора включает добавление модификатора активного агента к раствору.

В конкретных вариантах осуществления модификатор активного агента отбирают из группы, состоящей из солей, сурфактантов, ионов, осмолитов, спиртов, хаотропов, космотропов, кислот, оснований и органических растворителей. В одном варианте осуществления соль является хлоридом натрия.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает стадию растворения активного агента в жидкой фазе суспензии микрочастиц и изменение pH жидкой фазы. В одном аспекте стадия растворения активного агента в жидкой фазе относится к растворению твердой частицы. В другом аспекте стадия растворения активного агента относится к добавлению концентрированного раствора активного агента.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения модификатор активного агента улучшает структурную стабильность активного агента.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения активный агент является белком, пептидом, полипептидом, маленькой молекулой или молекулой нуклеиновой кислоты. В другом варианте осуществления настоящего изобретения активный агент отбирают из группы, состоящей из инсулина, грелина, гормона роста и паратгормона (PTH). Активный агент может включать антитело или фрагмент антитела. В различных аспектах изобретения антитело может распознавать ассоциированный с заболеванием антиген, включая, без ограничения, опухоль-ассоциированный антиген или инфекционный антиген, связанный с патогенным микроорганизмом.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения маленькая молекула является ионизируемой молекулой или гидрофобной молекулой, такой как циклоспорин А, но не ограниченной им.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения модифицирование химического потенциала активного агента включает модуляцию одного или более энергетически благоприятных взаимодействий, таких как, но не ограниченных ими, электростатические взаимодействия, гидрофобные взаимодействия и/или водород-связывающие взаимодействия между активным агентом и поверхностью микрочастицы. В одном варианте осуществления микрочастица включает дикетопиперазин, такой как фумарил дикетопиперазин, но не ограниченный им.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения способ

дополнительно включает стадию удаления или смены растворителя. Применяемый здесь термин растворитель относится к жидкой среде, в которой "купаются" активный агент и микрочастица. Это не должно интерпретироваться как требование, чтобы все компоненты находились в растворе. Действительно во многих случаях он может

использоваться в отношении жидкой среды, в которой суспендируются микрочастицы. В другом варианте осуществления настоящего изобретения предоставляется способ получения композиции для доставки лекарственного препарата, включающего активный агент и кристаллическую микрочастицу, включающий стадии: обеспечение раствора активного агента, включающего молекулу активного агента; модифицирование химического потенциала активного агента; обеспечение микрочастицы в суспензии или порошке; и комбинирование раствора активного агента с суспензией микрочастиц или порошком. Порошок может быть, например, фильтрован, но не высушен.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения процесс модифицирования химического потенциала активного агента предусматривает взаимодействие между активным агентом и микрочастицей. В одном варианте осуществления модифицирование химического потенциала активного агента включает добавление модификатора активного агента к раствору. Такой модификатор активного агента может быть отобран из группы, состоящей из солей, сурфактантов, ионов, осмолитов, спиртов, хаотропов, космотропов, кислоты, основания и органических растворителей. В еще одном варианте осуществления модификатор уменьшает растворимость молекулы активного агента, стимулирует ассоциацию между активным агентом и микрочастицей, такой как частица дикетопиперазина, и/или улучшает структурную стабильность молекулы активного агента.

Краткое описание чертежей

Следующие чертежи являются частью настоящего описания изобретения и включены для дополнительной демонстрации определенных аспектов примеров, раскрытых здесь. Изобретение может быть более понятным, исходя из одного или более чертежей в комбинации с детальным описанием определенных вариантов осуществления, представленным здесь.

На фиг. 1А-1С представлены воздействия хаотропов и космотропов на кривые загрузки активных агентов на микрочастицы фумарил дикетопиперазина (FDKP) в виде функции pH и 100 ммоль хаотропных/космотропных агентов согласно идеям настоящего изобретения. На фиг. 1А представлена загрузка 0,75 мг/мл инсулина на 5 мг/мл микрочастиц FDKP в присутствии хаотропов и космотропов при pH от 3,0 до 5,0. На фиг. 1В представлена загрузка 0,25 мг/мл глюкагонподобного пептида 1 (GLP-1) на 5 мг/мл микрочастиц FDKP в присутствии хаотропов и космотропов при pH от 2,0 до 4,0. На фиг. 1С представлена загрузка 0,25 мг/мл паратгормона (PTH) на 5 мг/мл микрочастиц FDKP в присутствии сильных хаотропов, NaSCN и NaClO₄ при pH между 4,0 и 5,0.

На фиг. 2А-2С представлены воздействия осмолитов на кривые загрузки активных агентов на микрочастицы FDKP в виде функции pH и осмолитов (100 ммоль) согласно идеям настоящего изобретения. На фиг. 2А представлена загрузка 0,75 мг/мл инсулина на 5 мг/мл микрочастиц FDKP в присутствии осмолитов при pH от 3,0 до 5,0. На фиг. 2В представлена загрузка 0,25 мг/мл GLP-1 на 5 мг/мл микрочастиц FDKP в присутствии осмолитов при pH между 2,0 и 4,0. На фиг. 2С представлена загрузка 0,10 мг/мл пептида грелина на 5 мг/мл микрочастиц FDKP в присутствии сильных осмолитов при pH от 4,0 до 5,0.

На фиг. 3А-3D представлены воздействия спиртов на кривые загрузки активных агентов на микрочастицы FDKP в виде функции pH и спиртов согласно идеям настоящего изобретения. На фиг.3А представлена загрузка 0,10 мг/мл грелина на 5 мг/мл микрочастиц FDKP в присутствии гексафлюороизопропанола (HFIP) 5%, 10%, 15% и 20% объем/объем при pH между 2,0 и 4,0. На фиг.3В представлена загрузка 0,10 мг/мл грелина на 5 мг/мл микрочастиц FDKP в присутствии трифлюороэтанола (TFE) 5%, 10%, 15% и 20% объем/объем при pH между 2,0 и 4,0. На фиг.3С и 3D представлена загрузка 0,25 мг/мл GLP-1 на 5 мг/мл микрочастиц FDKP при pH от 2,0 до 5,0 в присутствии HFIP и TFE, соответственно.

На фиг. 4А-4D представлены воздействия соли на кривые загрузки активных агентов на микрочастицы FDKP в виде функции pH и концентрации NaCl согласно идеям настоящего изобретения. На фиг.4А представлена загрузка 0,75 мг/мл инсулина на 5 мг/мл микрочастиц FDKP в присутствии 0-500 ммоль NaCl при pH от 2,0 до 5,0. На фиг.4В представлена загрузка 0,25 мг/мл GLP-1 на 5 мг/мл микрочастиц FDKP в присутствии 0-500 ммоль NaCl при pH от 2,0 до 5,0. На фиг.4С представлена загрузка 0,25 мг/мл пептида РТН на 5 мг/мл микрочастиц FDKP в присутствии 0-1000 ммоль NaCl при pH от 2,0 до 5,0. На фиг.4D представлен анализ вторичной структуры РТН при различных концентрациях соли (20°C). CD короткого ультрафиолетового излучения 4,3 мг/мл РТН при pH 5,8 иллюстрирует, что с увеличением концентрации NaCl вторичная структура пептида принимает более спиральную конформацию.

На фиг. 5А-5В представлена адсорбция гидрофобных молекул на микрочастицы согласно идеям настоящего изобретения. На фиг.5А представлена фиксация циклоспорина А на микрочастицах FDKP с увеличением антирастворителя (вода) до 60%, 80% и 90% концентрации. На фиг.5В представлен процент теоретического максимума загрузки, достигнутого для циклоспорина А в переменных массовых соотношениях циклоспорин А/микрочастицы FDKP в присутствии 90%-ного антирастворителя.

На фиг.6 представлена фармакокинетика отдельной внутривенной инъекции (IV) и легочного вдывания (IS) у крыс с использованием различных массовых соотношений циклоспорин А/микрочастицы FDKP в 90%-ном антирастворителе согласно идеям настоящего изобретения.

Подробное описание изобретения

Здесь описаны способы, пригодные для того, чтобы стабилизировать фармацевтические активные агенты в комбинации с кристаллическими микрочастицами. Получающиеся составы предоставляют устойчивые активные агенты, нанесенные на поверхности кристаллических микрочастиц.

Вещество для нанесения или адсорбирования на кристаллическую микрочастицу упоминается здесь как активный агент. Примеры классов активных агентов включают фармацевтические составы, синтетические соединения и органические макромолекулы, которые имеют терапевтическую, профилактическую и/или диагностическую пользу.

Как правило, большинство активных агентов может быть нанесено или адсорбировано на поверхность кристаллических микрочастиц, включая, но не ограничиваясь ими, органические макромолекулы, нуклеиновые кислоты, синтетические органические соединения, полипептиды, пептиды, белки, полисахариды и другие сахара и липиды. Пептиды, белки и полипептиды - все являются цепями аминокислот, связанных с помощью пептидных связей. Как правило, считают, что

пептиды состоят из менее 30 остатков аминокислот, но могут включать больше. Белки являются полимерами, которые могут содержать более 30 остатков аминокислот. Как известно в данной области техники и применяется здесь, термин полипептид может относиться к пептиду, белку или любой другой цепи аминокислот любой длины, содержащей многочисленные пептидные связи, хотя, как правило, содержащей по крайней мере 10 аминокислот. Активные агенты, используемые в наносимой композиции, могут подпадать под разнообразие биологических классов активности, такие как вазоактивные агенты, нейроактивные агенты, гормоны, антикоагулянты, иммуномодулирующие агенты, цитотоксические агенты, антибиотики, противовирусные агенты, антигены и антитела.

Примеры активных агентов, которые могут использоваться в настоящем изобретении, включают без ограничения: гормон роста, антитела и их фрагменты, алкины, циклоспорин (например, циклоспорин А), РРАСК (D-фенилаланил-L-пролил-L-аргинин хлорометил кетон), CMFDA (5-хлорометилфлюоресцин диацетат), тexasовый красный, клопиогрель, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), глюкагонподобный пептид 1 (GLP-1), грелин, паратгормон (PTH), инсулин и аналоги инсулина (например, инсулин аспарт и инсулин) и антитела и их фрагменты, включая, но не ограничиваясь ими, гуманизированные или химерные антитела; F(ab), F(ab)₂, или одноцепочечное антитело, в чистом виде или в соединении с другими полипептидами; терапевтические или диагностические моноклональные антитела к раковым антигенам, цитокинам, инфекционным агентам, медиаторам воспаления, гормонам и поверхностным клеточным антигенам. Неограниченные примеры антител к опухолевым антигенам включают анти-SSX-241-49 (синовиальная саркома, Х контрольная точка 2), анти-NY-ESO-1 (антиген, ассоциированный с опухолью пищевода), анти-PRAME (предпочтительно экспрессируемый антиген меланомы), анти-PSMA (простат-специфический мембранный антиген), анти-Melan-A (антиген, ассоциированный с меланомой), антиитрозилазу (антиген, ассоциированный с меланомой) и анти-MOPC-21 (белок плазмацита миеломы).

Микрочастицы

По существу, термин "микрочастица" относится к частице диаметром приблизительно 0,5-1000 мкм независимо от точной внешней или внутренней структуры. В пределах широкой категории микрочастиц "микросферы" относятся к микрочастицам с однородной сферической формой. Применяемые здесь кристаллические микрочастицы относятся к микрочастицам, которые имеют внутреннюю структуру кристалла, хотя необязательно его наружную форму, и имеют упорядоченное расположение атомов в пространственной решетке. Ионизируемые кристаллические поверхности относятся к кристаллическим микрочастицам, которые имеют дополнительную способность нести электрический заряд. В некоторых вариантах осуществления микрочастица может быть отдельным симметричным кристаллом. В различных предпочтительных вариантах осуществления микрочастица является несимметричной, пористой, имеет доступные для растворенного активного агента внутренние поверхности или включает многочисленные кристаллы в любой комбинации. Такие характеристики будут, как правило, увеличивать площадь поверхности и, таким образом, загрузочную способность. Такие характеристики также могут содействовать выгодным аэродинамическим свойствам, важным, если активный агент нужно доставить с помощью ингаляции сухого порошка, включающего микрочастицы.

Предпочтительно, чтобы химическое вещество, составляющее кристаллическую

микрочастицу, являлось обратимо реактивным с доставляемым активным агентом, нетоксичным, а также неметаболизируемым грызунами и людьми. Несмотря на вышесказанное, некоторые уровни токсичности являются допустимыми в зависимости, например, от серьезности состояния, которое лечат, или количества
 5 вещества, воздействию которого подвергается пациент. Точно так же не требуется, чтобы вещество было полностью метаболически инертно. Кроме того, кристаллическая структура предпочтительных микрочастиц несущественно разрушается в процессе нанесения или связывания с активным агентом. Состав
 10 кристаллической микрочастицы определяет, какими химическими взаимодействиями можно манипулировать, чтобы управлять адсорбцией активного агента на поверхности микрочастицы.

Для формирования кристаллических микрочастиц может использоваться множество веществ. Микрочастицы также имеют поверхности, свойствами которых можно
 15 управлять в процессе нанесения, как раскрыто в находящейся в процессе одновременного рассмотрения патентной заявке США No. / (Attorney Docket №51300-00025), зарегистрированной той же самой датой, что и заявка, рассматриваемая в данный момент, и предварительной заявке США серийный № 60/717524,
 20 зарегистрированной 14 сентября 2005, которые приведены здесь в качестве ссылки в полном объеме. Показательные материалы, из которых могут быть сформированы кристаллические микрочастицы, включают, но не ограничиваются ими, ароматические аминокислоты или соединения с ограниченной растворимостью в определенном диапазоне pH, такие как дикетопиперазины и сульфаты морфолина.

Как предполагается в настоящем изобретении, одним конкретным примером микрочастиц являются микрочастицы дикетопиперазина (DKP). Обсуждаемые здесь микрочастицы DKP используют для облегчения адсорбции активного агента. Патенты
 25 США №№ 5352461 и 5503852, которые приведены здесь в качестве ссылки в полном объеме, описывают систему для доставки лекарственного препарата, основанную на формировании микрочастиц дикетопиперазина (DKP) из производных дикетопиперазина, таких как 3,6-бис[N-фумарил-N-(n-бутил)амино] (также называемый фумарил дикетопиперазин или FDKP; также называемый (E)-3,6-бис[4-(N-карбокси-2-пропенил)амидобутил]-2,5-дикетопиперазин), которые являются
 30 стабильными при низком pH и растворяются при pH крови или тонкой кишки. Система, основанная на структурных элементах дикетопиперазина или одной из его альтернативных производных, включающих, но не ограниченных ими, дикетоморфолины и дикетодиоксаны, формирует микрочастицы с желательными
 35 распределениями по размерам и диапазонами pH, а также хорошей переносимостью полезной нагрузки. Широкий диапазон стабильных, воспроизводимых характеристик может быть создан с помощью соответствующих манипуляций с замещающими группами. Эти патенты раскрывают осаждение DKP в присутствии активного агента для формирования микрочастиц, включающих активный агент. Дальнейшее
 40 подробное описание синтеза, приготовления и применения дикетопиперазинов и микрочастиц дикетопиперазина раскрывается в патентах США 6071497; 6331318; 6428771 и патентных публикациях США №№ 20060040953 и 20060041133, которые приведены здесь в качестве ссылки в полном объеме. Составы, включающие частицы дикетопиперазина, раскрываются в патенте США № 6991779 и патентной публикации
 45 США № 20040038865, которые приведены здесь в качестве ссылки в полном объеме.

Другие дикетопиперазины, предполагаемые в настоящем изобретении, включают 3,6-ди(4-аминобутил)-2,5-дикетопиперазин; 3,6-ди(сукцинил-4-аминобутил)-

2,5-дикетопиперазин (сукцинил дикетопиперазин или SDKP); 3,6-ди(малеил-4-аминобутил)-2,5-дикетопиперазин; 3,6-ди(цитраконил-4-аминобутил)-2,5-дикетопиперазин; 3,6-ди(глутарил-4-аминобутил)-2,5-дикетопиперазин; 3,6-ди(малонил-4-аминобутил)-2,5-дикетопиперазин; 3,6-ди(оксалил-4-аминобутил)-2,5-дикетопиперазин и их производные. Соли дикетопиперазина также могут использоваться в настоящем изобретении и могут включать, например, фармацевтически приемлемые соли, такие как Na, K, Li, Mg, Ca, аммоний, или моно-, ди- или триалкиламмоний (как полученный из триэтиламина, бутиламина, диэтанолamina, триэтанолamina или пиридинов и т.п.). Соль может быть моно-, ди- или смешанной солью. Соли высшего порядка также предполагаются для дикетопиперазинов, в которых группы R содержат более одной кислотной группы. В других аспектах изобретения основная форма агента может быть смешана с дикетопиперазином для формирования солевой связи между лекарственным препаратом и дикетопиперазином, такой что лекарственный препарат является противокатионом дикетопиперазина. Соли DKP для доставки лекарственного препарата раскрываются в дальнейших деталях в публикации патентной заявки США № 20060040953, приведенной здесь в качестве ссылки в полном объеме.

Патенты США №№ 6444226 и 6652885, которые приведены здесь в качестве ссылки в полном объеме, описывают подготовку и обеспечение микрочастиц DKP в водной суспензии, к которой добавляют раствор активного агента, и затем решающую стадию лиофилизирования суспензии для получения микрочастиц, покрытых активным агентом. Основой этой технологии приготовления является то, что покрытие микрочастицы активным агентом проводят с помощью удаления жидкой среды путем лиофилизации (см. также патент США № 6440463, который приведен здесь в качестве ссылки в полном объеме). В отличие от идей в предшествующей области техники настоящее изобретение предоставляет средства для регулирования ассоциации активного агента с микрочастицей до удаления растворителя. Таким образом, удаление жидкой среды с помощью основных физических способов (например, фильтрация или осаждение) или испаряющих способов (например, лиофилизация или распылительная сушка) может приводить к сопоставимым нагрузкам.

Стимуляция адсорбции активных агентов

Адсорбирование активного агента на поверхности кристаллической микрочастицы может приводить к изменению свойств активного агента в растворе или жидкой суспензии при различных состояниях раствора и, таким образом, к стимуляции адсорбции на поверхности микрочастицы и сокращению количества активного агента, остающегося в растворе. Изменение или модификации активного агента могут происходить с применением модификаторов, таких как, но не ограниченных ими, хаотропы и космотропы, соли, органические вещества, такие как, но не ограниченные ими, спирты, осмолиты и сурфактанты. Эти модификаторы могут действовать на активный агент для изменения его химического потенциала и, таким образом, его структуры, гибкости, жесткости или стабильности без химического изменения самого агента. Термин "химический потенциал" является известным любому специалисту в данной области техники. В вариантах осуществления настоящего изобретения "химический потенциал" относится к свободной энергии, необходимой для проведения химической реакции, такой как, например, взаимодействие между активным агентом и растворителем или адсорбция активного агента на микрочастицу. Применяемый здесь термин "энергетически благоприятный" относится к понижению свободных

энергетических уровней при состояниях абсорбции активного агента на микрочастице относительно свободного энергетического уровня непокрытой микрочастицы или несвязанного активного агента и/или нерастворимых форм (включая агрегацию или преципитацию) активного агента. Применяемый здесь термин "структура" относится к вторичной структуре молекулы активного агента и включает альфа-спиральную конформацию, бета-складчатые слои или случайный клубок (неупорядоченный) из молекулы активного агента, такой как белок. Кроме того, термин "структура" может также включать третичные и четвертичные структуры молекулы, но не ограничивается этим и может также относиться к самоассоциации, агрегации, мультимеризации, димеризации и т.п. молекулы. Применяемый здесь термин "стабильность" относится к стабилизации или дестабилизации структуры активного агента в присутствии модификатора.

Кроме того, изменение свойств активного агента в растворе или жидкой суспензии способно затрагивать взаимодействия благодаря гидрофобным свойствам, способностям к образованию водородных связей и электростатическим свойствам активного агента и/или микрочастицы.

Гидрофобные взаимодействия являются ассоциациями неполярных групп друг с другом в водных растворах из-за их нерастворимости в воде. Гидрофобные взаимодействия могут затрагивать множество молекулярных процессов, включая, но не ограничиваясь этим, стабилизацию структуры (отдельных молекул, комплексов двух или трех молекул или больших скоплений) и динамические свойства, и вносить существенный вклад в процессы связывания белка с белком и белка с лигандом. Также известно, что эти взаимодействия играют роль в ранних явлениях сворачивания белка и вовлекаются в сложные явления организации и самоорганизации (например, построение мембран).

Водородсвязывающие взаимодействия являются особенно сильными диполь-дипольными силами между молекулами; атом водорода в полярной связи (например, H-F, H-O или H-N) может испытывать силу притяжения с соседней электроотрицательной молекулой или ионом, который имеет неразделенную пару электронов (типично F, O или атом N на другой молекуле). Водородные связи ответственны за уникальные свойства воды и очень важны в организации биологических молекул, особенно во влиянии на структуру белков и ДНК.

Электростатические взаимодействия являются притяжениями между противоположными зарядами или отталкиваниями между подобными зарядами, которые усиливаются с приближением зарядов друг к другу. Электростатические взаимодействия составляют ключевой компонент в понимании взаимодействий между заряженными телами в ионных растворах. Например, стабильность коллоидных частиц, рассеянных в растворителе, можно описать с помощью оценки конкуренции между отталкивающими электростатическими взаимодействиями и притягивающими Ван-дер-Ваальсовыми взаимодействиями. Электростатические взаимодействия также важны для оценки взаимодействия и адгезии между частицами.

Соли

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения свойства активного агента изменяют с использованием соли, такой как хлорид натрия, но не ограниченной им. Активные агенты, например РТН и GLP-1, подвергаются в присутствии соли значимым структурным изменениям. Как показано в примере 5 (фиг.4D), наличие соли усиливает вторичную структуру РТН с помощью стимуляции большей спиральной конформации пептида. Соли также продемонстрировали

действие на структуру GLP-1, как раскрыто в предварительной патентной заявке США серийный № 60/744882, зарегистрированной 14 апреля 2006 и приведенной здесь в качестве ссылки в полном объеме. Кроме того, соли и другие ионные соединения способны или к стабилизации, или к дестабилизации белков и пептидов, особенно
 5 когда разница между pH раствора и pI белка или пептида увеличивается с помощью связывания с определенно заряженными остатками (Antosiewicz J, et al., J. Mol. Biol. 238:415-436, 1994).

Хаотропы

В данной области техники известно, что хаотропы являются ионами, которые проявляют слабые взаимодействия с водой и поэтому дестабилизируют молекулы, такие как белки или пептиды. Эти соединения разрушают связанную водородной связью структуру воды и уменьшают ее поверхностное натяжение, таким образом стимулируя большую структурную свободу и денатурацию белков и пептидов.

Примеры хаотропов включают, но не ограничиваются ими, NaSCN, (CH₃)₃N-HCl, Na₂NO₃ и NaClO₄ и хлорид цезия (CsCl).

Космотропы или лиотропы, с другой стороны, являются ионами, которые проявляют сильные взаимодействия с водой и, как правило, стабилизируют
 20 макромолекулы, такие как белки и пептиды. Это стабилизирующее воздействие вызывается с помощью упорядочения структуры и увеличения ее поверхностного натяжения. Примеры космотропов включают, но не ограничиваются ими, цитрат натрия (цитрат Na) и сульфат натрия (Na₂SO₄).

Спирты

Другим классом модификаторов активного агента, используемых в настоящем изобретении, являются спирты. Спирты могут разрушать природную структуру белков и пептидов и также могут стабилизировать и индуцировать α-спиральные конформации в макромолекулах, особенно в пределах неструктурированных белков и
 30 полипептидов. Такие спирты могут включать, но не ограничиваются ими, метанол (MeOH), этанол (EtOH), трифлюороэтанол (TFE) и гексафлюороизопропанол (HFIP). Из них TFE и HFIP являются одними из самых сильных спиртов, индуцирующих спиральные преобразования в пептидах и белках (Hirota et al., Protein Sci., 6:416-421; 1997, приведено здесь в качестве ссылки для
 35 всего, что относится к спиральным преобразованиям в пептидах и белках). Эти спирты могут затрагивать структуру белков и пептидов посредством их способности нарушать водородсвязывающие свойства растворителя (см. Eggers and Valentine, Protein Sci., 10:250-261; 2001, приведено здесь в качестве ссылки для всего, что
 40 относится к воздействию спиртов на структуру белков).

Осмолиты

Другим классом модификаторов, который затрагивает сродство активного агента к микрочастице, являются осмолиты. Специалистам в данной области техники известно, что осмолиты являются маленькими соединениями, которые продуцируются клетками
 45 большинства организмов в стрессовых ситуациях (таких как экстремальные температурные колебания, высокое содержание соли в окружающей среде и т.д.) для стабилизации их макромолекул. Они не взаимодействуют с макромолекулой непосредственно, а действуют с помощью изменения растворяющих свойств окружающей среды клетки и, таким образом, их наличие косвенно модифицирует
 50 стабильность белков. Эти соединения включают различные полиолы, сахара, полисахариды, органические растворители и различные аминокислоты и их производные. Хотя механизм осмолитов еще должен быть выявлен, предполагается,

что эти соединения действуют, вероятно, с помощью повышения химического потенциала денатурированного состояния относительно природного состояния, таким образом увеличивая (позитивную) разницу энергии Гиббса (ΔG) между природными и денатурированными группами (Arakawa and Timasheff, Biochemistry 29:1914-1923;1990).

Как предполагается в настоящем изобретении, осмолиты включают без ограничения гексиленгликоль (Hex-Gly), трегалозу, глицин, полиэтиленгликоль (PEG), триметиламин N-оксид (ТМАО), маннит и пролин.

Общее описание способа

В способах по настоящему изобретению по крайней мере три компонента комбинируют в жидкой среде: по крайней мере один активный агент, (заранее сформированные) микрочастицы и по крайней мере один модификатор активного агента, как описанные выше. Компоненты этой системы могут быть скомбинированы в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления модификатор и активный агент комбинируют друг с другом перед тем, как эту смесь комбинируют с суспензией микрочастиц. В других вариантах осуществления сначала комбинируют агент и микрочастицы и затем добавляют модификатор. В некоторых вариантах осуществления обеспечивают активный агент или модификатор и комбинируют с другим компонентом или компонентами как раствор. В других вариантах осуществления любой из компонентов можно предоставить в твердой форме и растворить или в случае микрочастиц суспендировать в жидкой среде, содержащей другой из компонентов. Дальнейшие варианты будут очевидны любому специалисту в данной области техники.

Микрочастицы формируют перед тем, как скомбинировать с другими компонентами системы, и они также присутствуют в качестве суспензии. Тем не менее жидкая среда, в которой суспендируются микрочастицы, время от времени упоминается здесь как растворитель. Используемая в способе жидкая среда является чаще всего водной. Однако в некоторых случаях жидкая среда может включать больше органического соединения, например спирта, используемого в качестве модификатора, чем воды.

После объединения всех компонентов системы активный агент будет адсорбироваться на поверхности микрочастицы. Во все более и более предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения по крайней мере 50, 60, 70, 80, 90, 95% или, по существу, весь активный агент в системе будет адсорбироваться на микрочастицах до 100%. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения доступная площадь поверхности микрочастиц достаточна для того, чтобы весь адсорбируемый активный агент находился в прямом контакте с поверхностью микрочастицы, то есть покрытие являлось монослоем. Однако необходимо понимать, что могут присутствовать дополнительные взаимодействия. В некоторых случаях, например, самоассоциация активного агента может быть также энергетически предпочтительна, чтобы многочисленные слои активного агента покрывали частицу. Не требуется, чтобы любой из этих слоев являлся сплошным или чтобы толщина покрытия была однородной. Могут быть распознаны две формы самоассоциации: мультимеризация и агрегация. Мультимеризацию характеризуют с помощью специфических межмолекулярных взаимодействий и фиксированной стехиометрии. Агрегацию характеризуют с помощью неспецифических межмолекулярных взаимодействий и неопределенной стехиометрии. Необходимо понимать, что мультимерные активные агенты могут адсорбироваться в мультимерном состоянии или диссоциировать на мономеры или мультимеры более

низкого порядка и адсорбироваться на поверхности в таком состоянии. В любом случае, агрегация может содействовать наплаиванию активного агента на микрочастицу.

5 Нагруженные микрочастицы образуют состав для доставки лекарственного препарата, который может использоваться в разнообразных формах. Частицы можно использовать как порошки в твердых лекарственных формах, таких как таблетки, или заключать в капсулы, или суспендировать в жидком переносчике. Как правило, это потребует смены и/или удаления жидкой среды, в которой происходила загрузка. Это
10 может быть выполнено с помощью любого из разнообразных средств, включая физические способы, такие как, но не ограничиваясь этим, осаждение или фильтрацию, и испаряющие способы, такие как, но не ограничиваясь этим, лиофилизацию или распылительную сушку. Эти методы известны специалистам в данной области техники. В одном варианте осуществления настоящего изобретения растворитель
15 удаляют с помощью распылительной сушки. Способы распылительной сушки микрочастиц дикетопиперазина раскрываются в, например, предварительный патентной заявке США №60/776605, зарегистрированной 22 февраля 2006, приведенной здесь в качестве ссылки для всего, что относится к распылительной сушке микрочастиц дикетопиперазина.
20

Если загрузка произошла не полностью, то варианты осуществления изобретения с использованием физических способов удаления растворителя будут в основном освобождать неадсорбируемый активный агент, но, например, могут быть пригодными для обеспечения того, чтобы покрытие не превышало пределов
25 монослоя. Наоборот, варианты осуществления с использованием сушки выпариванием для удаления растворителя могут в некоторых случаях осаждать дополнительный активный агент на частицах и таким образом избежать его потери, но вовлеченные адсорбционные взаимодействия могут отличаться от установленных молекулами, связанными на более ранних стадиях способа. В других вариантах
30 осуществления удаление растворителя с помощью упаривания не приводит к достоверному дальнейшему отложению активного агента, включая случай, в котором в основном весь активный агент уже адсорбировался на частице.

Примеры

35 Следующие примеры включены для демонстрации предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения. Специалисту в данной области техники необходимо принять во внимание, что способы, раскрытые в последующих примерах, представляют собой способы, изобретенные автором, для хорошего
40 функционирования в практическом осуществлении изобретения, и, таким образом, могут рассматриваться как предпочтительные способы его практического осуществления. В то время как обсуждение может сосредотачиваться на конкретном механизме, необходимо понимать, что некоторые модификаторы могут иметь множественные воздействия на агент или, более того, также на поверхность частицы,
45 каждое из которых может содействовать стимуляции адсорбции агента на частице. Однако специалисты в данной области техники с учетом настоящего раскрытия оценят, что в раскрытых специфических вариантах осуществления можно сделать много изменений и все же получить такой же или подобный результат, не отступая от сущности и объема изобретения.
50

Пример 1. Экспериментальный метод: исследования адсорбции активный агент/микрочастицы FDKP

Активные агенты: инсулин, PTH, грелин и GLP-1 приобретали или у American Peptide

(Sunnyvale, CA), или у AnaSpec (San Jose, CA), или готовили на месте (MannKind Corporation, Valencia, CA). Водные образцы анализировали при различном pH и при 20°C (если не отмечено иначе). Как правило, готовили свежие образцы и смешивали с конкретной добавкой (например, солью, pH буфером и т.д. при наличии) перед
 5 добавлением микрочастиц FDKP.

Ассоциацию активного агента с частицами дикетопиперазина (DKP) в суспензии оценивали с помощью проведения исследований адсорбции. Параметры, изученные в исследованиях адсорбции, выявляли воздействия электростатических взаимодействий, образования водородной связи, водной структуры, гибкости белка и специфических
 10 соединяющих соли взаимодействий на взаимодействие активного агента/микрочастиц фумарил дикетопиперазина (FDKP). Кроме того, несколько обычных стабилизаторов белка тестировали на противодействие адсорбции активного агента на поверхности микрочастиц FDKP.

Изучали различные состояния, стимулирующие адсорбцию активного агента на поверхности заранее сформированных частиц FDKP. 15 мг/мл суспензии микрочастиц FDKP комбинировали с 3X pH буфера и 3X раствора добавки или наполнителя. Окончательный раствор содержал микрочастицы FDKP в концентрации 5 мг/мл и GLP-1 в концентрации 0,25 мг/мл (5% вес./вес.), или РТН в концентрации 0,25 мг/мл (5% вес./вес.), или инсулин в концентрации 0,75 мг/мл (15% вес./вес.), или грелин в концентрации 0,10 мг/мл (2% вес./вес.). Несвязанный активный агент в супернатанте отфильтровывали от суспензии. Частицы FDKP со связанным активным агентом растворяли (восстанавливали) в 100 ммоль бикарбоната аммония и
 25 фильтровали для выделения любых агрегированных молекул активного агента. С помощью ВЭЖХ производили количественный анализ активного агента в супернатанте и восстановленных фракциях. Проводили ряд экспериментов, в условиях которых использовали предусмотренные к применению добавки, такие как соли, осмолиты, хаотропы и космотропы, и спирты. Следствия этих исследований описаны
 30 ниже.

Пример 2. Воздействия хаотропов и космотропов на адсорбцию активного агента на частицы FDKP

Ионные частицы, которые затрагивают структуру воды и белков (хаотропы и космотропы), изучали для исследования адсорбции активного агента на поверхности микрочастицы FDKP с помощью гидрофобного механизма (при низком pH). Загрузку активного агента на частицы FDKP выполняли, используя 5 мг/мл микрочастиц и GLP-1 в концентрации 0,25 мг/мл (5% вес./вес.), или РТН в концентрации 0,25 мг/мл (5% вес./вес.), или инсулин в концентрации 0,75 мг/мл (15% вес./вес.). Концентрацию хаотропа или космотропа в образцах поддерживали постоянной на уровне 100 ммоль и pH варьировали от 2,0 до 5,0. Хаотропы или космотропы отбирали из следующих солей: NaSCN, CsCl, Na₂SO₄, (CH₃)₃N-HCl, Na₂NO₃, цитрат Na и NaClO₄. Контроль показывает, что никакой хаотроп или космотроп не добавляли.

На фиг. 1A-1C представлены кривые загрузки для инсулина, GLP-1 и РТН соответственно, на поверхность микрочастицы FDKP в виде функции pH в присутствии различных хаотропов или космотропов. При низком pH (3,0) все анализированные хаотропы и космотропы улучшали сродство инсулина к поверхности микрочастицы и демонстрировали достоверную загрузку по сравнению с контролем. При pH 4 это воздействие не наблюдали (фиг. 1A). При более высоком pH (5,0) хаотропы и космотропы препятствовали адсорбции инсулина на поверхности микрочастицы по сравнению с контролем путем осаждения белка инсулина. Таким образом, эти агенты

стимулируют фиксацию инсулина к частицам FDKP при более низком pH, но имеют незначительное или даже вредное воздействие в условиях более высокого pH.

GLP-1 в присутствии хаотропов и космотропов демонстрирует повышенное сродство к микрочастицам FDKP при pH от 2,0 до 4,0 с большим воздействием при более низком pH (фиг.1B). Подобные наблюдения раскрываются в предварительной заявке США серийный №60/744882. Там отмечается, что приблизительно от 0,02 до 0,04 мг/мл пептида GLP-1 (что соответствует массовому соотношению 0,004 к 0,008) обнаружили в восстановленных образцах контроля без микрочастиц в присутствии NaSCN, NaClO₄, Na₂SO₄, NaNO₃ и цитрата Na, что демонстрирует, что маленькая доля GLP-1 преципитировалась вместо того, чтобы адсорбироваться на частице.

Сродство РТН к поверхности микрочастицы FDKP являлось большим при pH от 4,0 до приблизительно 4,5 в присутствии сильных хаотропов NaSCN и NaClO₄ (фиг.1C).

Эти данные подтверждают, что хаотропные и космотропные агенты играют роль в стимуляции адсорбции активного агента на поверхности микрочастиц FDKP, что в основном касается низкого pH. Так как эти модификаторы имеют большее воздействие при низком pH, когда поверхность микрочастицы является менее ионной, вероятно, что адсорбция является следствием гидрофобного механизма. Уменьшение адсорбции, наблюдаемое при более высоком pH, может являться следствием более высокого заряда поверхности частицы в комбинации с воздействиями хаотропных и космотропных агентов на увеличение гидрофобности активных агентов. Кроме того, как ионные частицы эти агенты могут конкурировать с активным агентом за связи с микрочастицей или разрушать электростатические взаимодействия между активным агентом и микрочастицей. Наконец также отмечается, что дебаевское экранирование может содействовать уменьшению адсорбции к более высоко заряженной поверхности.

Пример 3. Воздействия осмолитов на адсорбцию активного агента на частицы FDKP

Для оценки важности стабильности активного агента для адсорбции воздействие осмолитов на фиксацию активного агента к частицам FDKP исследовали с помощью анализа ВЭЖХ. На фиг. 2A-2C представлены кривые загрузки для инсулина (фиг.2A), GLP-1 (фиг.2B) и грелина (фиг.2C) на частицы FDKP в виде функции pH в присутствии обычных стабилизаторов (осмолитов). Загрузку активного агента на микрочастицы FDKP выполняли, используя 5 мг/мл микрочастиц и инсулин в концентрации 0,75 мг/мл (15% вес./вес.), или GLP-1 в концентрации 0,25 мг/мл (5% вес./вес.), или грелин в концентрации 0,10 мг/мл (2% вес./вес.). Концентрацию осмолита (стабилизатора) в образцах поддерживали постоянной на уровне 100 ммоль и pH варьировали от приблизительно 2,0 до приблизительно 5,0. Осмолиты отбирали из гексиленгликоля (Hex-Gly), трегалозы, глицина, PEG, ТМАО, маннита и пролина; контроль показывает отсутствие осмолита.

Из изученных активных агентов инсулин демонстрирует значительно повышенное сродство к поверхности частицы FDKP в присутствии осмолитов (PEG, глицин, трегалоза, маннит и Hex-Gly) в диапазоне pH от 3,0 до 5,0 (фиг.2A). Из изученных осмолитов PEG и пролин улучшают сродство GLP-1 к адсорбции на поверхности частицы FDKP в диапазоне pH от 2,0 до 4,0. Осмолит ТМАО является более эффективным, чем PEG или пролин, при фиксации GLP-1 на поверхность микрочастицы FDKP при низком pH (2,0), но является умеренно вредным при pH 3,0 и выше (фиг.2B). Грелин, однако, демонстрирует большее сродство к поверхности микрочастицы в присутствии 100 ммоль маннита, PEG, глицина, Hex-Gly и трегалозы по сравнению с контролем в диапазоне pH от приблизительно 4,0 до 5,0 (фиг.2C).

Эти кривые загрузки означают, что осмолиты способны к усилению адсорбции активного агента на поверхности микрочастицы FDKP. Вероятно, что это воздействие является следствием способности модификаторов стабилизировать активный агент, которая позволяет адсорбции быть более энергетически благоприятной.

Пример 4. Воздействия спиртов на сродство активного агента к частицам FDKP

Воздействие спиртов исследовали в оценке воздействия модификаторов на активный агент, которое предусматривает адсорбцию на поверхности микрочастицы с помощью гидрофобного механизма. Спирты, известные способностью к индуцированию спиральной конформации в неструктурированных пептидах и белках путем усиления образования водородных связей, оценивали для определения роли, которую спиральная конформация играет в адсорбции активного агента на поверхности частиц FDKP. Анализировали активные агенты, такие как GLP-1 и грелин. Загрузку активного агента на частицы FDKP выполняли, используя 5 мг/мл микрочастиц и GLP-1 в концентрации 0,25 мг/мл (5% вес./вес.) или грелин в концентрации 0,10 мг/мл (2% вес./вес.). Воздействие каждого спирта наблюдали в диапазоне pH от 2,0 до 5,0. Используемыми спиртами являлись трифлюороэтанол (TFE) и гексафлюороизопропанол (HFIP). Каждый спирт оценивали в различных концентрациях, которые включают 5%, 10%, 15% или 20% объем/объем.

На фиг. 3A-3D представлены кривые загрузки активного агента на микрочастицы FDKP в виде функции pH для каждого спирта и каждого активного агента. При pH от 2,0 до 4,0 грелин демонстрирует значительно повышенное сродство к поверхности микрочастицы в присутствии HFIP и TFE при всех тестируемых концентрациях (5%, 10%, 15% и 20%), как демонстрируется с помощью массового соотношения грелина к частицам FDKP (фиг. 3A-3B).

При pH от 2,0 до 5,0 GLP-1 демонстрирует повышенное сродство к поверхности микрочастицы в присутствии HFIP и TFE при показанных концентрациях (5% и 10%) (фиг. 3C-3D). Воздействие TFE является менее выраженным и при более низких тестируемых pH является вредным. Отмечено, что существенное количество пептида GLP-1 (от 0,13 до 0,19 мг/мл, что соответствует массовому соотношению 0,026 к 0,038) обнаружили в восстановленных образцах контроля без микрочастиц в присутствии 10% HFIP и TFE при pH 4,0, что показывает, что часть GLP-1 преципитировалась. Однако при более низком pH (от 2,0 до 3,0) количество пептида GLP-1, обнаруженного в восстановленном контроле без микрочастиц в присутствии 10% HFIP или TFE, было значительно снижено. При pH 3,0 обнаружили пептид GLP-1 в количестве от 0 до 0,02 мг/мл (что соответствует массовому соотношению 0 к 0,004), тогда как в образцах контроля при pH 2,0 GLP-1 не обнаружили. Массовые соотношения на фиг. 3C-D отражают и адсорбированный, и преципитированный активный агент, хотя преципитация является все более и более незначительным компонентом, поскольку pH уменьшается до 3,0.

Данные показывают, что спирты могут повышать адсорбцию активного агента на микрочастицы FDKP. Это увеличение адсорбции, вероятно, является следствием расширенных гидрофобных взаимодействий между активным агентом и поверхностью микрочастицы в присутствии спиртов.

Пример 5. Воздействие соли на адсорбцию активного агента на частицы FDKP

Чтобы дополнительно рассмотреть гидрофобный механизм прикрепления, воздействия соли на адсорбцию активного агента на микрочастицы FDKP наблюдали с помощью анализа ВЭЖХ.

Загрузку активного агента на микрочастицы FDKP выполняли, используя 5 мг/мл

микрочастиц и инсулин в концентрации 0,75 мг/мл (15% вес./вес.) или GLP-1 в концентрации 0,25 мг/мл (5% вес./вес.), или РТН в концентрации 0,25 мг/мл (5% вес./вес.) в присутствии 0, 25, 50, 100, 250 и 500 ммоль NaCl (фиг. 4А-4С). Загрузку РТН на частицы FDKP также оценивали в 1000 ммоль NaCl. Количество активного агента, обнаруженного в восстановленных образцах контроля без микрочастиц, оценивали в виде функции рН и концентрации NaCl. рН управляли с помощью смеси 20 ммоль фосфата калия/20 ммоль ацетата калия.

Как представлено на фиг.4А, усиление фиксации (адсорбции) инсулина к частицам FDKP является очевидным при высоких концентрациях соли от 100 до 500 ммоль при рН от приблизительно 2,5 до приблизительно 3,5. При рН от приблизительно 4,0 до приблизительно 5,0 для всех тестируемых концентраций соли наблюдали снижение адсорбции инсулина на частице FDKP.

При рН от приблизительно 2,0 до приблизительно 3,5 увеличение фиксации (адсорбции) GLP-1 к частицам FDKP является очевидным при всех тестируемых концентрациях соли (фиг.4В). При рН 4,0 и выше также отмечали снижение фиксации.

Подобные исследования с использованием РТН в качестве активного агента демонстрировали увеличение фиксации РТН к частицам FDKP при высоких концентрациях соли от 250 до 1000 ммоль при рН от приблизительно 2,0 до приблизительно 3,5 (фиг.4С). При рН от приблизительно 3,5 до приблизительно 5,0 фиксация РТН к микрочастице уменьшается в присутствии соли.

При низком рН, неблагоприятном для адсорбции, добавление соли может модифицировать химический потенциал активного агента для усиления его сродства к поверхности микрочастицы. Такое повышение фиксации, вероятно, является следствием гидрофобного механизма. Кроме того, данные показывали, что при повышении рН адсорбция уменьшалась с увеличением концентрации соли. Поскольку поверхность микрочастицы становится более заряженной при увеличении рН, можно ожидать, что вероятный гидрофобный механизм будет менее эффективным при стимуляции адсорбции активного агента. Это снижение, возможно, также является следствием конкуренции соли за связывающие участки на поверхности микрочастицы. Отмечено, что дебаевское экранирование также может содействовать снижению наблюдаемой адсорбции.

Эти данные также демонстрируют, что соль способна к изменению структуры активных агентов. Например, измерения циркулярного дихроизма РТН демонстрируют, что с увеличением концентрации соли вторичная структура пептида принимает более спиральную конформацию (фиг.4D). Это означает, что изменение структуры РТН может стимулировать его фиксацию к поверхности микрочастицы при низком рН.

Также показано, что присутствие соли в водном растворе распределяет краситель техасовый красный по поверхности микрочастицы.

Пример 6. Воздействия на адсорбцию циклоспорина на частицы FDKP

Воздействия на адсорбцию маленьких гидрофобных молекул на частицы FDKP исследовали и *in vitro*, и *in vivo* с использованием циклоспорина в качестве активного агента. Адсорбцию стимулировали с помощью изменения растворимости активного агента.

Циклоспорин А, липофильный циклический полипептид изучили, чтобы показать, каким образом нужно изготовить гидрофобную молекулу, чтобы она адсорбировалась к микрочастицам. Кроме того, размер циклоспорина А (1202,61 MW) использовали для демонстрации загрузочных способностей микрочастиц для меньших

соединений.

Для выполнения загрузки использовали метод растворитель-антирастворитель. Основной принцип этой методологии заключается в растворении соединения в растворителе (метанол) и затем использовании антирастворителя (вода) для
 5 выведения соединения из раствора на поверхность микрочастиц. Циклоспорин А успешно загружали на поверхность микрочастиц с использованием этого подхода растворитель-антирастворитель.

В предварительном эксперименте для определения профиля растворимости
 10 циклоспорин А растворяли до 10 мг/мл в метаноле и анализировали его растворимость в 1 мг/мл с различными концентрациями антирастворителя (10-90% H₂O с шагом 10%) с помощью ВЭЖХ. Площади пика циклоспорина сравнивали с образцом, содержащим один метанол для определения потери в процентах на
 15 осаждение. Наблюдалось, что растворимость большей частью сохранялась ниже 60% H₂O. При 70% H₂O достоверно большая часть агента была нерастворимой и при 80-90% H₂O оставалась менее чем 5% растворимость.

Для оценки загрузки частицы микрочастицы FDKP суспендировали в растворах циклоспорина А в метаноле. Воду затем добавляли пошаговым способом до
 20 окончательных концентраций 60, 80 и 90%. Половину образца гранулировали и другую половину лиофилизировали. Каждую половину затем повторно растворяли так, что окончательное процентное содержание составляло 20% микрочастиц FDKP/циклоспорина А, 20% 0,5 моль бикарбоната аммония (AmBicarb) и 60%
 25 метанола (концентрации, необходимые для растворения и микрочастицы, и циклоспорина А). Содержание циклоспорина А в каждом случае анализировали с помощью ВЭЖХ и сравнивали для определения доли, которая адсорбировалась на частице. Результаты представлены на фиг.5А. При 60% H₂O наблюдали, что приблизительно 20% циклоспорина А связаны с частицей. При 80% и 90% H₂O загрузки
 30 составляли приблизительно 90% и 95%, соответственно, что показывает сильную фиксацию циклоспорина А к микрочастицам FDKP.

Загрузочную способность микрочастиц для циклоспорина А анализировали при 90% антирастворителя с помощью варьирования ввода циклоспорина так, чтобы
 35 окончательное содержание восстановленных твердых частиц составляло от 2% до 20%, предполагая, что весь циклоспорин А адсорбировался. Наблюдали, что по мере того как ввод увеличивали в этом диапазоне процент доступного циклоспорина А, связанного с микрочастицей, увеличивался от 50% до 95% от введенного (рис.5В). Необходимо отметить, что, принимая во внимание, что растворимость
 40 циклоспорина А составляет 0,05 мг/мл в 90% H₂O, эти результаты показывают, что в основном весь нерастворенный циклоспорин А адсорбировался к частицам вместо того, чтобы преципитироваться.

Пример 7. Легочное вдувание циклоспорина А/частиц DKP

Для исследования фармакокинетики циклоспорина А/микрочастиц FDKP оценивали
 45 концентрации в плазме циклоспорина А у самок крыс Sprague Dawley, которым вводили различные композиции циклоспорина А/микрочастиц FDKP посредством легочного вдувания или внутривенной инъекции. Эти исследования проводили с использованием циклоспорина А/микрочастиц FDKP, приготовленных в 90%-ном
 50 антирастворителе и теоретическом максимальном массовом соотношении 0,05, 0,10 или 0,20, как описано в примере выше. Они указаны как 5%, 10% и 20% загрузки.

Однократную дозу 2,5 мг циклоспорина А/микрочастиц FDKP доставляли восьми группам крыс посредством легочного вдувания или внутривенной инъекции. Образцы

крови брали в день введения дозы в каждой группе до введения дозы (время 0) и через 5, 20, 40, 60, 240, 480 минут и через 24 часа после введения дозы. В каждый момент времени приблизительно 100 мкл цельной крови забирали из боковой вены хвоста в криопробирку, переворачивали и помещали в лед. Образцы крови

5 центрифугировали при 4000 об/мин, и приблизительно 40 мкл плазмы отмеривали пипеткой в 96-луночные планшеты, которые хранили при -80°C до проведения анализа.

Как представлено на фиг.6, введение 2,5 мг микрочастиц FDKP/циклоспорина А посредством легочного вдывания имело результатом максимальные сывороточные

10 уровни циклоспорина через 24 часа после введения дозы у самок крыс Sprague Dawley. 10%-ная загрузка достигла C_{max} 32,4 нг/мл на тот момент времени. Животные, которым вводили 2,5 мг микрочастиц FDKP/циклоспорина А в 0,1 мл посредством внутривенной инъекции, показывали минимальные уровни циклоспорина к 24 часам после введения дозы. Наблюдали, что уровни микрочастиц FDKP достигали

15 максимума через 20 минут после введения дозы и возвращались к базовым уровням через 4 часа и для внутривенной группы, и для группы легочного вдывания.

В целом, данные показывают биодоступность циклоспорина А/микрочастиц FDKP. Отмечено, что отдельный пик на 240-й минуте является аномалией. Для всех

20 обработанных животных данные лабораторных методов исследования, определенные с помощью макроскопического и микроскопического наблюдения, были нормальными.

Если иначе не обозначено, все числа, выражающие количества ингредиентов, свойства, такие как молекулярная масса, условия реакции и т.д., используемые в

25 описании изобретения и формуле изобретения, необходимо понимать как модифицируемые во всех случаях с помощью термина "приблизительно". Соответственно, если не обозначено обратное, числовые параметры, изложенные в следующем описании изобретения и присоединенной формуле изобретения, являются

30 приближенными значениями, которые могут варьировать в зависимости от желаемых свойств, которые необходимо получить с помощью настоящего изобретения. Как минимум и не как попытка ограничить применение доктрины эквивалентов объемом формулы изобретения, каждый числовой параметр должен быть по крайней мере интерпретирован с учетом числа представленных значащих разрядов и с помощью

35 применения обычных методов округления. Несмотря на то, что числовые диапазоны и параметры, предлагающие широкие возможности изобретения, являются приближенными значениями, числовые значения, изложенные в конкретных примерах, представлены настолько точно, насколько возможно. Любое числовое значение,

40 однако, неотъемлемо содержит определенные ошибки, обязательно следующие из стандартного отклонения, найденного для соответствующих измерений, полученных при испытаниях.

Формы единственного числа и подобные ссылки, используемые в контексте описания изобретения (особенно в контексте следующей формулы изобретения)

45 необходимо рассматривать как охватывающие и единственное, и множественное, если здесь не обозначено иначе или ясно не противоречит контексту. Предполагается, что перечисление диапазонов значений здесь может только служить ускоренным методом обращений индивидуально к каждому отдельному значению, находящемуся в

50 пределах диапазона. Если здесь не обозначено иначе, каждое индивидуальное значение включено в описание изобретения, как будто оно индивидуально изложено здесь. Все описанные здесь способы могут выполняться в любом подходящем порядке, если здесь не обозначено иначе или ясно не противоречит контексту.

Представленное здесь использование любого и всех примеров или типовой формулировки (например "такой как") предполагается только для лучшего освещения изобретения и не накладывает ограничения на возможности иначе заявленного изобретения. Никакая формулировка в описании изобретения не должна рассматриваться как указание какого-либо незаявленного элемента, необходимого для практического осуществления изобретения.

Использование термина "или" в формуле изобретения используется для обозначения "и/или", если явно не обозначено обращение только к альтернативам, или альтернативы являются взаимно исключающими, хотя раскрытие подтверждает определение, которое обращается только к альтернативам и "и/или".

Группировки альтернативных элементов или вариантов осуществления изобретения, раскрытых здесь, не должны рассматриваться как ограничения. Каждый член группы может быть упомянут и заявлен индивидуально или в любой комбинации с другими членами группы или другими элементами, встречающимися здесь. Ожидается, что один или более членов группы могут быть включены в или удалены из группы по причинам удобства и/или патентоспособности. Когда происходит любое такое включение или удаление, описание изобретения считается содержащим группу как измененную, таким образом, выполняя письменные описания всех групп Маркуша, используемых в приложенной формуле изобретения.

Здесь описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, включая лучший вариант, известные авторам изобретения для осуществления изобретения. Конечно, варианты этих предпочтительных вариантов осуществления станут очевидными любому специалисту в данной области техники после прочтения предшествующего описания. Автор изобретения ожидает, что квалифицированные специалисты используют такие варианты соответствующим образом, и авторы изобретения предполагают, что изобретение может быть осуществлено иначе, чем конкретно описано здесь. Соответственно, настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты объекта, перечисленные в формуле изобретения, приложенной к нему, как разрешено действующим законодательством. Более того, любая комбинация вышеописанных элементов во всех возможных вариантах охвачена изобретением, если здесь не обозначено иначе или ясно не противоречит контексту.

Кроме того, на всем протяжении данного описания изобретения сделаны многочисленные ссылки к патентам и печатным публикациям. Каждая из вышеупомянутых процитированных ссылок и печатных публикаций приведена здесь в качестве ссылки в полном объеме.

Дополнительно необходимо понимать, что варианты осуществления раскрытого здесь изобретения являются иллюстрациями принципов настоящего изобретения. Другие модификации, которые могут использоваться, находятся в рамках изобретения. Таким образом, посредством примера, но не ограничения, альтернативные конфигурации настоящего изобретения могут использоваться в соответствии с идеями, изложенными здесь. Соответственно, настоящее изобретение не ограничивается тем, как показано и описано.

Формула изобретения

1. Способ стимуляции прикрепления или адсорбирования активного агента к заранее сформированной кристаллической дикетопиперазиновой микрочастице в суспензии, включающий указанную последовательность стадий:

I) модифицирования химического потенциала активного агента, где вышеуказанная модификация предусматривает энергетически благоприятное взаимодействие между активным агентом и заранее сформированной кристаллической дикетопиперазиновой микрочастицей, где указанное модифицирование не включает удаление растворителя и

II) адсорбирования активного агента на поверхности заранее сформированной кристаллической дикетопиперазиновой микрочастицы;

где указанная стадия модифицирования вызывает указанное адсорбирование указанного активного агента на поверхности указанной заранее сформированной кристаллической дикетопиперазиновой микрочастицы для обеспечения покрытия указанного активного агента на поверхности указанной сформированной микрочастицы.

2. Способ по п.1, в котором модифицирование химического потенциала включает изменение структуры, гибкости, жесткости, растворимости или стабильности активного агента.

3. Способ по п.2, в котором модифицирование химического потенциала активного агента включает изменение условий раствора.

4. Способ по п.3, в котором изменение условий раствора включает добавление модификатора активного агента к раствору.

5. Способ по п.4, в котором модификатор активного агента выбирают из группы, состоящей из солей, сурфактантов, ионов, осмолитов, спиртов, хаотропов, космотропов, кислоты, основания и органических растворителей.

6. Способ по п.5, в котором вышеуказанная соль является хлоридом натрия.

7. Способ по п.1, дополнительно включающий стадию растворения активного агента в жидкой фазе суспензии заранее сформированных кристаллических дикетопиперазиновых микрочастиц до указанной стадии модифицирования и указанная стадия модифицирования включает изменение pH жидкой фазы.

8. Способ по п.7, в котором pH изменяют перед добавлением активного агента.

9. Способ по п.7, в котором pH изменяют после добавления активного агента.

10. Способ по п.5, в котором модификатор активного агента повышает структурную стабильность или фармакодинамику активного агента.

11. Способ по п.1, в котором активный агент является белком, пептидом, полипептидом, маленькой молекулой или молекулой нуклеиновой кислоты.

12. Способ по п.11, в котором активный агент выбирают из группы, состоящей из инсулина, грелина, гормона роста и паратгормона (PTH).

13. Способ по п.11, в котором активный агент включает антитело или фрагмент антитела.

14. Способ по п.11, в котором маленькая молекула является гидрофобной молекулой.

15. Способ по п.14, в котором маленькая молекула является циклоспорином А.

16. Способ по п.11, в котором маленькая молекула является ионизируемой молекулой.

17. Способ по п.2, в котором модифицирование химического потенциала активного агента включает модуляцию одного или более энергетически благоприятных взаимодействий с поверхностью заранее сформированной кристаллической дикетопиперазиновой микрочастицы.

18. Способ по п.17, в котором одно или более энергетически благоприятных взаимодействий между активным агентом и заранее сформированной кристаллической

дикетопиперазиновой микрочастицей включают электростатическое взаимодействие.

19. Способ по п.17, в котором одно или более энергетически благоприятных взаимодействий между активным агентом и микрочастицей включают гидрофобное взаимодействие.

20. Способ по п.17, в котором одно или более энергетически благоприятных взаимодействий между активным агентом и микрочастицей включают водородсвязывающие взаимодействия.

21. Способ по п.1, в котором микрочастица включает дикетопиперазин.

22. Способ по п.21, в котором дикетопиперазин является фумарил дикетопиперазином.

23. Способ по п.1, дополнительно включающий стадию удаления растворителя после стадии адсорбирования.

24. Способ получения композиции для доставки лекарственного средства, включающего активный агент и кристаллическую дикетопиперазиновую микрочастицу, включающий указанную последовательность стадий:

(i) обеспечение раствора активного агента, включающего молекулу активного агента, где указанный активный агент представляет собой пептид или белок, и обеспечение заранее сформированной кристаллической дикетопиперазиновой микрочастицы в суспензии или порошке; далее

(ii) объединение раствора указанного активного агента с суспензией или порошком указанной заранее сформированной кристаллической дикетопиперазиновой микрочастицы с образованием жидкой фазы; и затем

(iii) модифицирование химического потенциала активного агента в жидкой фазе, где указанная стадия модифицирования вызывает адсорбирование указанного активного агента на поверхности указанной заранее сформированной кристаллической дикетопиперазиновой микрочастицы для обеспечения покрытия указанного активного агента на поверхности указанной заранее сформированной кристаллической дикетопиперазиновой микрочастице.

25. Способ по п.24, в котором модифицирование химического потенциала активного агента предусматривает взаимодействие между активным агентом и заранее сформированной кристаллической дикетопиперазиновой микрочастицей.

26. Способ по п.24, в котором модифицирование химического потенциала активного агента включает добавление модификатора активного агента к жидкой фазе.

27. Способ по п.26, в котором модификатор активного агента выбирают из группы, состоящей из солей, сурфактантов, ионов, осмолитов, спиртов, хаотропов, космотропов, кислоты, основания и органических растворителей.

28. Способ по п.24, в котором стадия модифицирования включает добавление воды и где указанное модифицирование уменьшает растворимость молекулы активного агента.

29. Способ по п.24, в котором модифицирование химического потенциала активного агента включает добавление модификатора активного агента к жидкой фазе и модификатор активного агента стимулирует ассоциацию между активным агентом и заранее сформированной кристаллической дикетопиперазиновой микрочастицей.

30. Способ по п.27, в котором модифицирование химического потенциала активного агента включает добавление модификатора активного агента к жидкой фазе и модификатор активного агента повышает структурную стабильность

молекулы активного агента

31. Способ по п.24, в котором дикетопиперазин является фумарил дикетопиперазином.

5

10

15

20

25

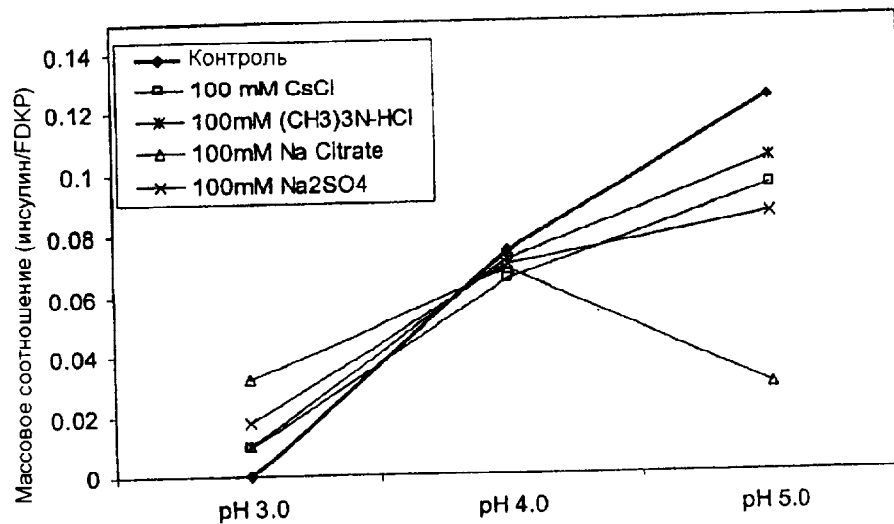
30

35

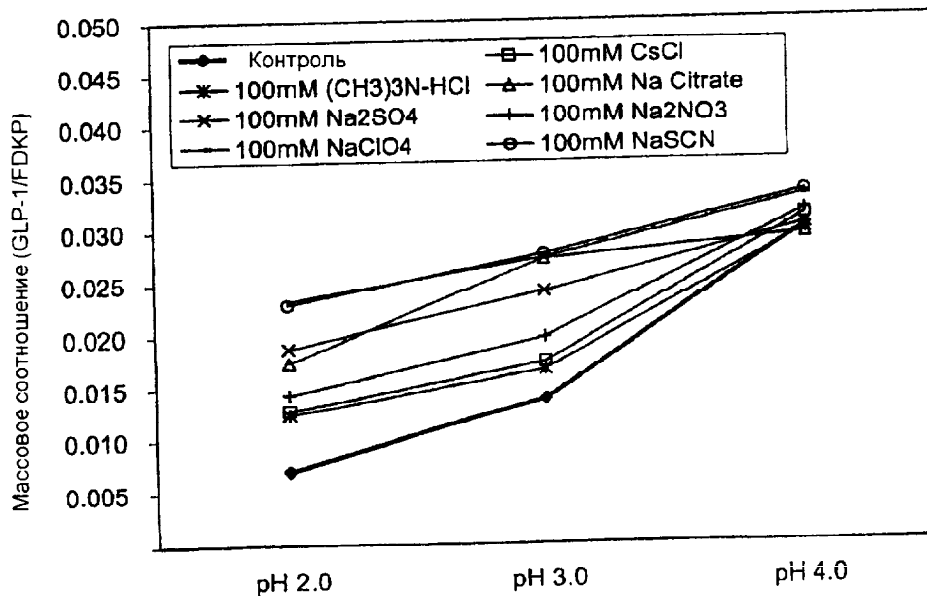
40

45

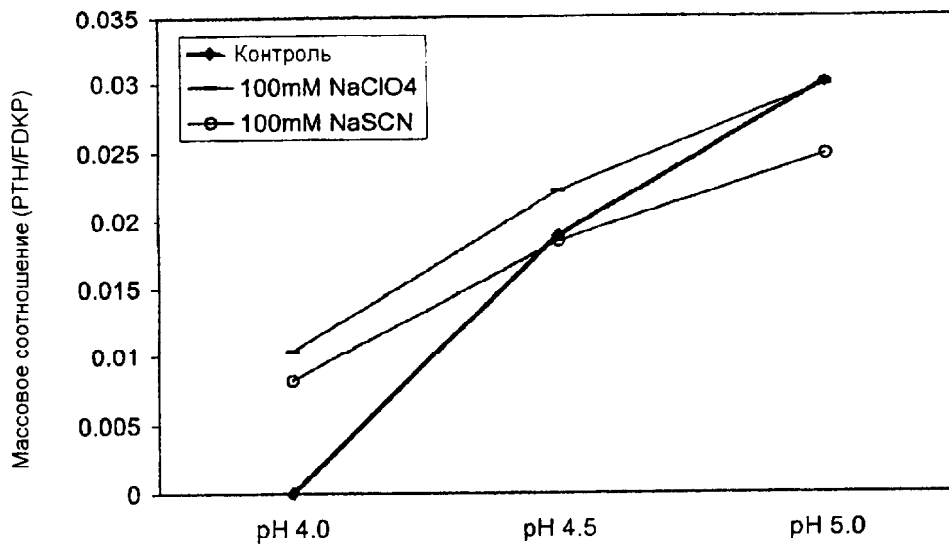
50



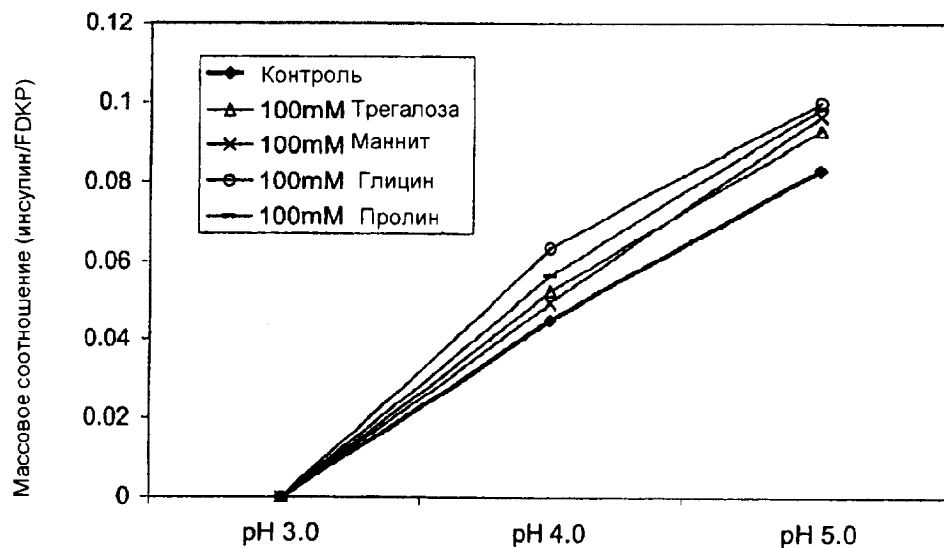
ФИГ.1А



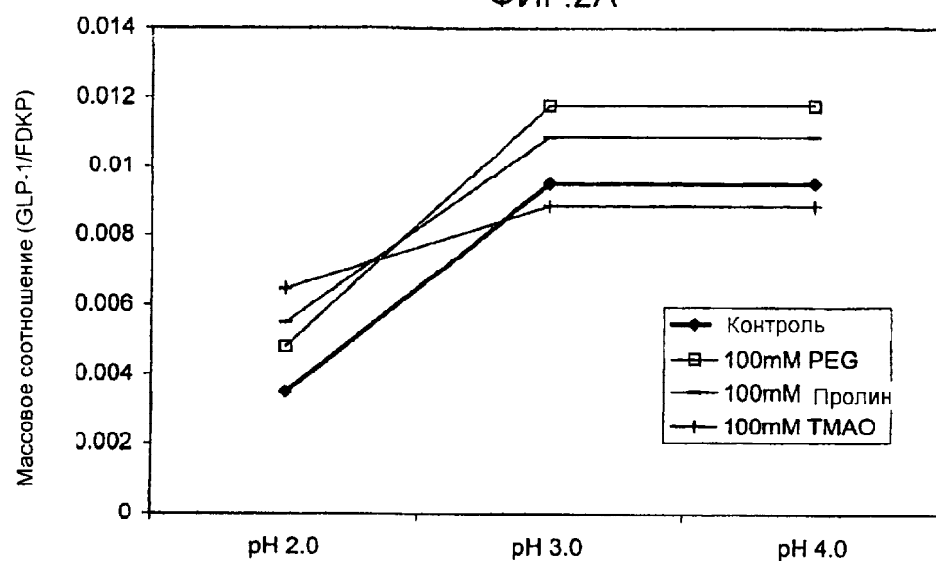
ФИГ.1В



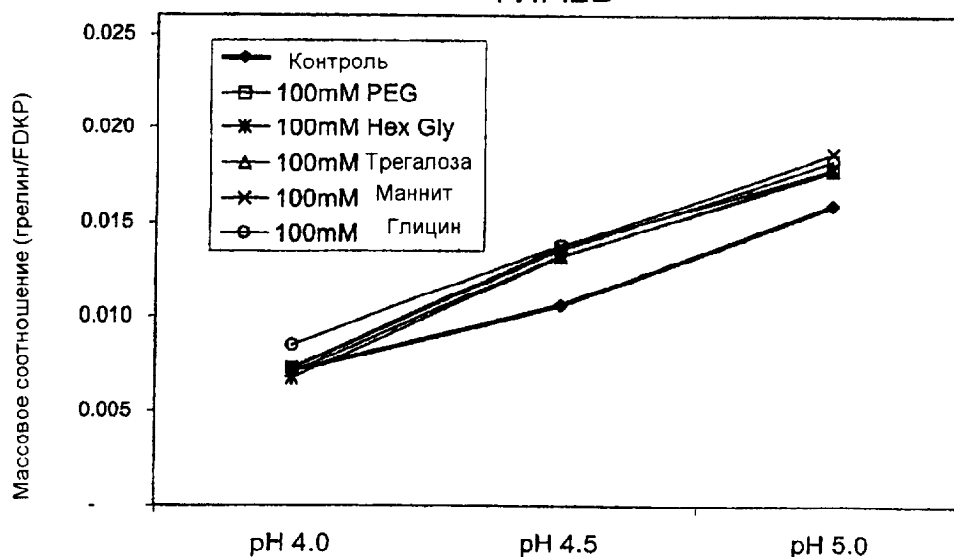
ФИГ.1С



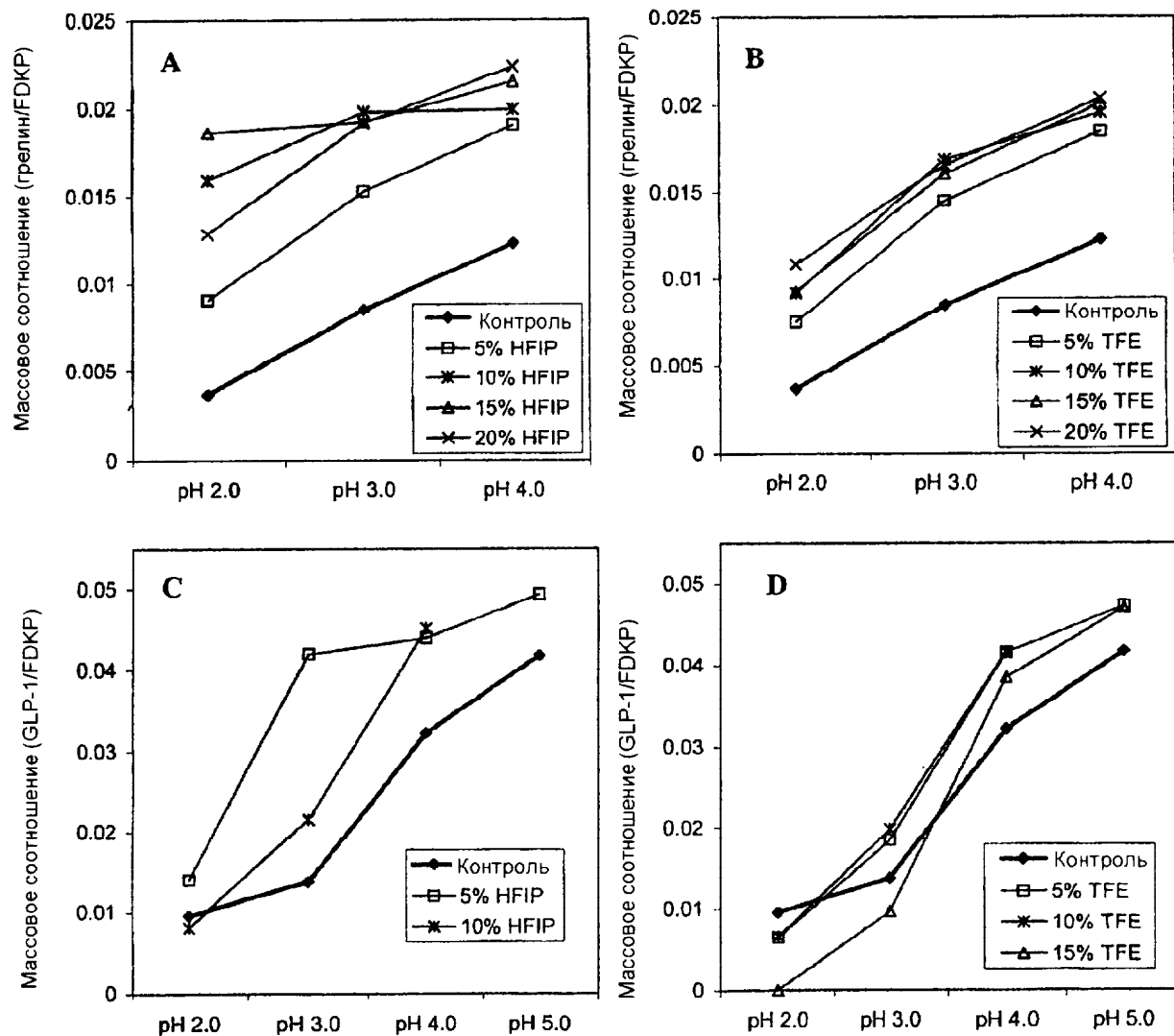
ФИГ.2А



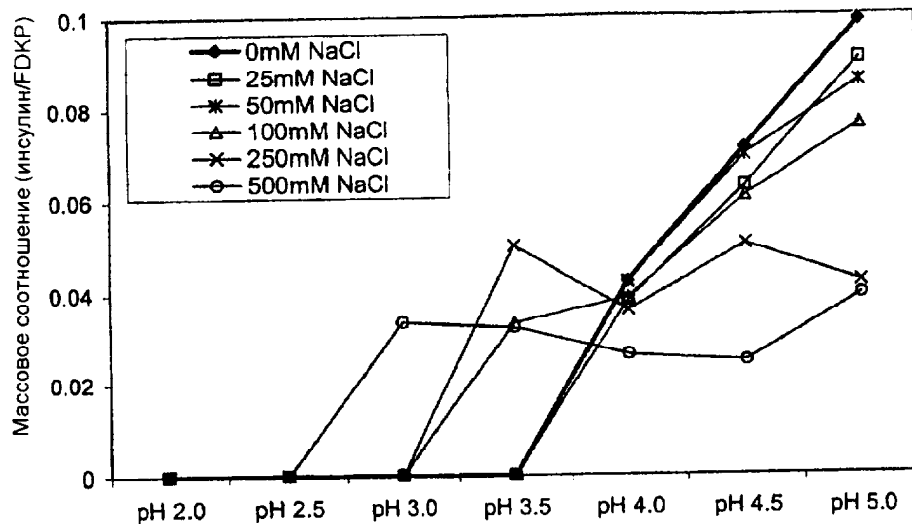
ФИГ.2В



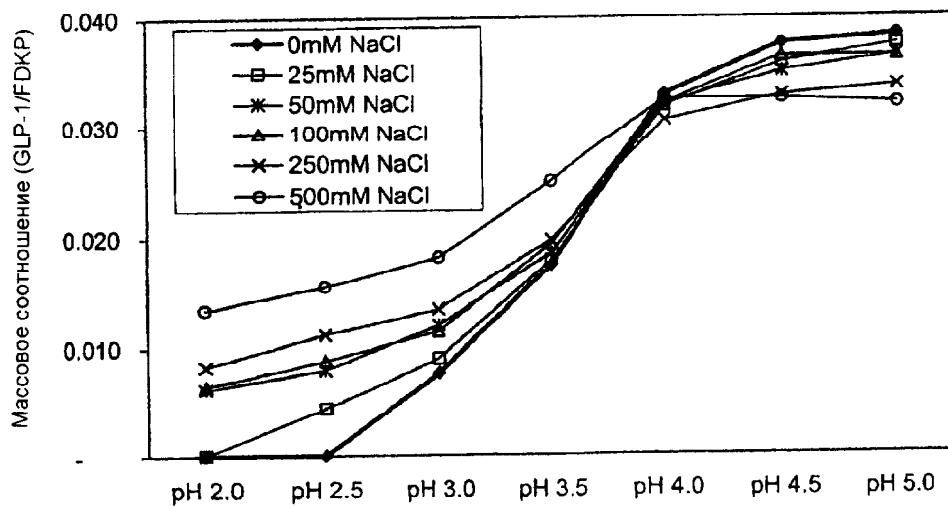
ФИГ.2С



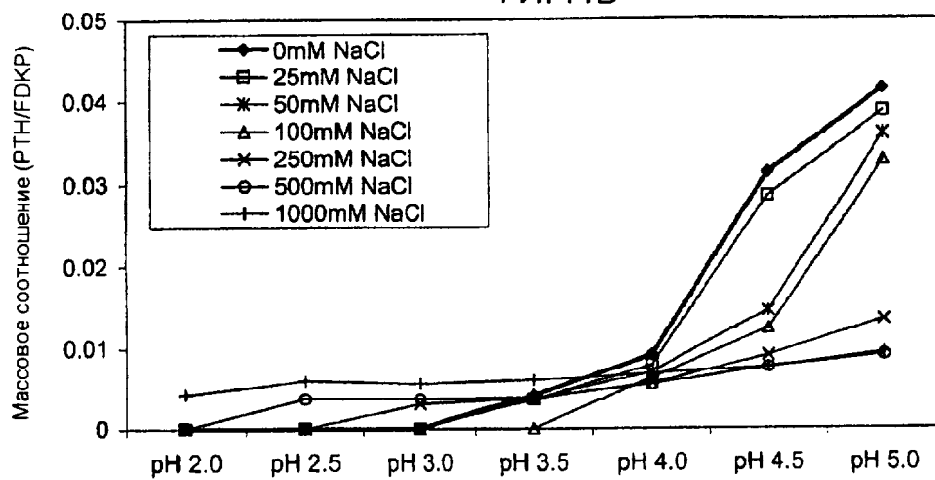
ФИГ.3А-3Д



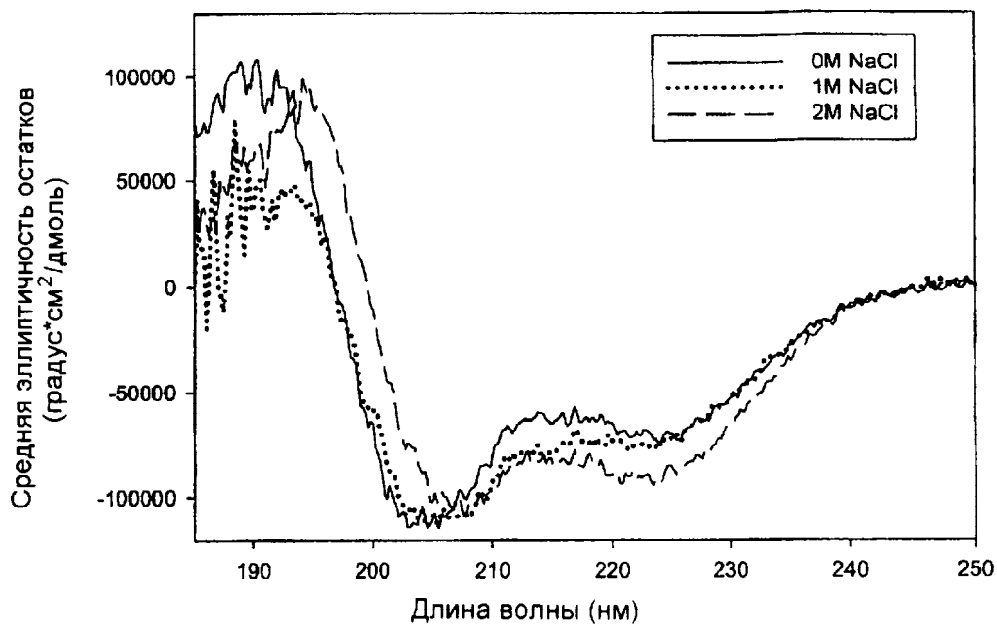
ФИГ.4А



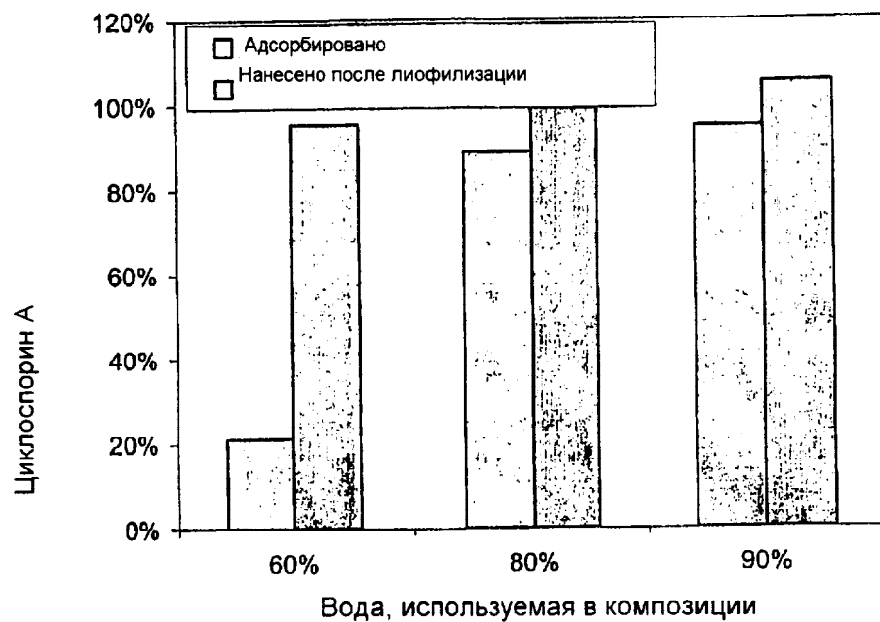
ФИГ.4В



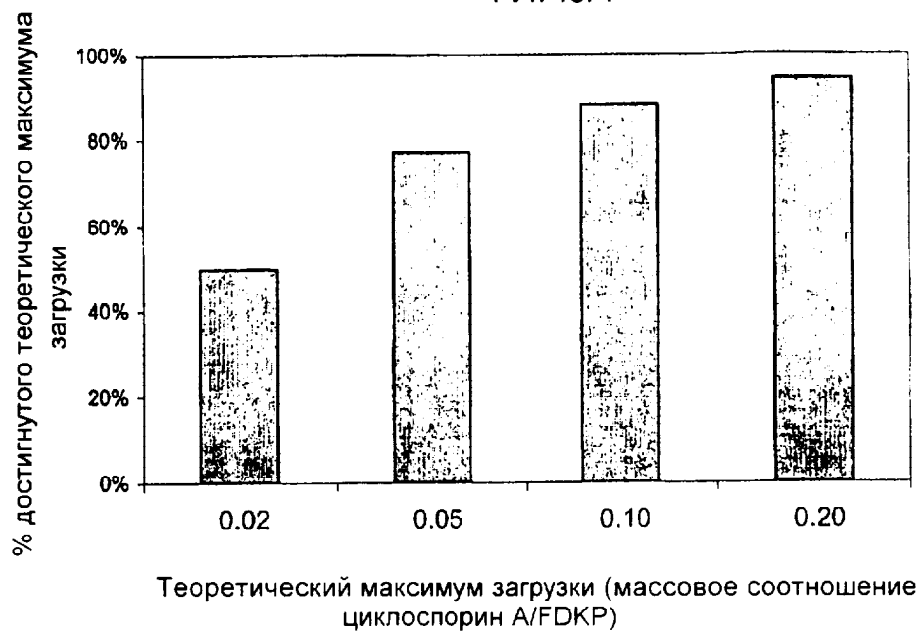
ФИГ.4С



ФИГ.4D



ФИГ.5А



ФИГ.5В

Фармакокинетическое исследование с введением циклоспорина/FDKP посредством легочного вдвухания или внутривенной инъекции самкам крыс Sprague Dawley

