

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040273**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.05.16

(21) Номер заявки
201490047

(22) Дата подачи заявки
2012.06.18

(51) Int. Cl. *A61K 9/127* (2006.01)
A61K 47/24 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

(54) **ИНГАЛЯЦИОННЫЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ**

(31) **61/498,505**

(32) **2011.06.17**

(33) **US**

(43) **2014.08.29**

(86) **PCT/US2012/043001**

(87) **WO 2012/174559 2012.12.20**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БЕРГ ЛЛК (US)

(72) Изобретатель:
**Нараин Нивен Раджин, Маккук Джон
Патрик (US)**

(74) Представитель:
**Лыу Т.Н., Угрюмов В.М., Кондакова
Е.В., Соболев А.Ю. (RU)**

(56) **WO-A1-2009073843**

(57) Ингаляционные фармацевтические композиции могут содержать водную дисперсию частицы, включающую в себя гидрофобное биоактивное средство (например, CoQ10), подходящую для непрерывного аэрозольного распыления. Вследствие их химического состава и способов получения фармацевтические композиции проявляют отличительные физико-химические свойства, которые обеспечивают преимущественную передачу и выход аэрозоля.

B1

040273

040273

B1

Ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет согласно предварительной заявке США № 61/498505, поданной 17 июня 2011 г., раскрытие которой включено в настоящий документ посредством ссылки в ее полноте.

Область техники

Настоящее изобретение относится в общем к ингаляционным фармацевтическим композициям, включая способы их получения и применения. Настоящее изобретение относится более конкретно в различных вариантах осуществления к ингаляционным фармацевтическим композициям, содержащим водную дисперсию частиц, включающую в себя гидрофобное биоактивное средство (например, CoQ10) и являющуюся подходящей для непрерывного аэрозольного распыления. Вследствие их химического состава и способов получения фармацевтические композиции проявляют отличительные физико-химические свойства, которые обеспечивают преимущественную передачу и выход аэрозоля.

Уровень техники

Злокачественная опухоль в настоящее время является одной из ведущих причин смертности в развивающихся странах. Рак легкого представляет собой один пример злокачественной опухоли с высоким коэффициентом смертности и низким коэффициентом длительного выживания. Несмотря на то что исследование значительно увеличило понимание многих молекулярных механизмов онкогенеза и обеспечило многочисленные новые подходы в лечении злокачественной опухоли, стандартными способами лечения для большинства злокачественных опухолей остаются обширная резекция, химиотерапия и лучевая терапия. Будучи в возрастающей степени успешным, каждый из этих способов лечения может вызывать многочисленные нежелательные побочные эффекты. Например, операция может приводить к болевым ощущениям, травматическому повреждению здоровой ткани и образованию рубцов. Лучевая терапия и химиотерапия могут вызывать тошноту, подавление иммунитета, образование язвы желудка и вторичный онкогенез. Более того, такие чрезвычайные побочные эффекты могут не сопровождаться соответствующе высоким коэффициентом выживания.

Доставка терапевтического средства к дыхательным путям представляет собой один из подходов для лечения многочисленных локальных и/или системных заболеваний, включающих в себя рак легкого. Тем не менее общепринятые техники доставки средств к легкому могут быть неэффективными, нерезультативными и/или недостаточными. Например, многие известные способы производят аэрозоли, которые содержат капли, слишком большие для доставки фармацевтического средства к легкому и/или слишком разнородные для надежной доставки специфической дозы. Технологии образования частиц, разработанные для решения таких вопросов, как размер частиц, например способы механической микронизации и способы фазового разделения на основе растворов, могут характеризоваться дополнительными ограничениями. Такие способы механической микронизации, как помол, могут вызывать температурное и/или механическое разложение фармацевтического средства. Высушивание распылением - другой способ, используемый для тонкого измельчения лекарственных веществ, - может привести к сложности в сборе мелких частиц.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к ингаляционным фармацевтическим композициям, содержащим водную дисперсию частиц, включающую в себя гидрофобное биоактивное средство. Вследствие их химического состава и способов получения фармацевтические композиции проявляют отличительные физико-химические свойства, которые обеспечивают преимущественную передачу и выход аэрозоля, включая непрерывное аэрозольное распыление. Соответственно настоящее изобретение относится к улучшенным способам лечения заболеваний, включающих в себя злокачественную опухоль, и композициям, способным доставлять биоактивные средства для содействия в лечении заболеваний и других состояний, включая доставку к легким путем ингаляции.

Поскольку большая часть доступной площади поверхности легкого расположена в нижних отделах легкого, доставке лекарственного средства может способствовать аэрозольная доставка частиц к периферическим альвеолам нижних отделов легкого. Напротив, частицы, осажденные в верхних дыхательных путях, могут быстро удаляться с помощью мукоцилиарного эскалатора, впоследствии транспортироваться в глотку и проглатываться или удаляться с помощью кашля. Настоящее изобретение в различных аспектах и вариантах осуществления относится к доставке гидрофобных биоактивных средств (например, включая в себя лекарственные средства, которые являются строго гидрофобными, липофильными и/или слабо растворимыми в воде), которые, как правило, трудно надлежащим образом распылить в виде аэрозоля, к нижним отделам легкого (а также другим участкам дыхательных путей). В частности, настоящее изобретение может относиться к непрерывной небулизации нанодисперсий гидрофобных лекарственных средств для терапевтического применения.

Другие преимущества различных аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения включают в себя без ограничения

высокий выход аэрозоля (например, что измеряется с помощью общего выхода аэрозоля, ГАО);

высокую передачу аэрозоля (например, что измеряется с помощью средней процентной передачи, АРТ);

высокую общую выпущенную дозу (TED), непрерывные и стабильные аэрозоли (например, в течение заданного дозирующего события, не прерываясь);
однородную доставку (например, воспроизводимую в различных событиях);
способность к доставке высоких доз (например, высокая осажденная массовая доля и/или непрерывная доставка);
способность отмерять дозы (например, от малых до больших);
способность доставлять лекарственное средство местно, локально и/или системно;
высокую респираторную фракцию; и
их комбинации.

Существенным является то, что настоящее изобретение может достигать таких преимуществ с помощью водных нанодисперсий гидрофобных лекарственных средств (например, по сравнению со способами предшествующего уровня техники, направленными на простые, гомогенные растворы лекарственных средств).

Согласно одному аспекту настоящее изобретение представляет собой ингаляционную фармацевтическую композицию, содержащую дисперсию липосомных частиц, подходящую для непрерывного аэрозольного распыления. Композиция содержит дисперсию липосомных частиц, характеризующуюся средним диаметром, составляющим приблизительно 30-500 нм, причем каждая липосомная частица содержит гидрофобное биоактивное средство, фосфолипид и носитель водной дисперсии. Соотношение гидрофобного биоактивного средства к фосфолипиду составляет от приблизительно 5:1 до приблизительно 1:5, гидрофобное биоактивное средство составляет приблизительно 0,1-30 мас.% композиции, фосфолипид составляет приблизительно 0,1-30 мас.% композиции и липосомные частицы диспергированы в носителе водной дисперсии. И при введении субъекту композиция характеризуется непрерывным распылением аэрозоля, достаточным для предоставления терапевтической дозы гидрофобного биоактивного средства субъекту.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение представляет собой ингаляционную фармацевтическую композицию, содержащую дисперсию липосомных частиц, подходящую для непрерывного аэрозольного распыления. Композиция содержит дисперсию липосомных частиц, характеризующуюся средним диаметром, составляющим приблизительно 30-500 нм, причем каждая липосомная частица содержит гидрофобное биоактивное средство, фосфолипид и носитель водной дисперсии. Соотношение гидрофобного биоактивного средства к фосфолипиду составляет от приблизительно 5:1 до приблизительно 1:5, гидрофобное биоактивное средство составляет приблизительно 0,1-30 мас.% композиции, фосфолипид составляет приблизительно 0,1-30 мас.% композиции и липосомные частицы диспергированы в носителе водной дисперсии. И при непрерывном распылении аэрозоля композиция способна достигать концентрации биоактивного средства, составляющей по меньшей мере приблизительно 500 мкг/г сырой ткани легкого.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение представляет собой ингаляционную фармацевтическую композицию, содержащую дисперсию липосомных частиц, подходящую для непрерывного аэрозольного распыления. Композиция содержит дисперсию липосомных частиц, характеризующуюся средним диаметром, составляющим приблизительно 30-500 нм, причем каждая липосомная частица содержит гидрофобное биоактивное средство, фосфолипид и носитель водной дисперсии. Соотношение гидрофобного биоактивного средства к фосфолипиду составляет от приблизительно 5:1 до приблизительно 1:5, гидрофобное биоактивное средство составляет приблизительно 0,1-30 мас.% композиции, фосфолипид составляет приблизительно 0,1-30 мас.% композиции и липосомные частицы диспергированы в носителе водной дисперсии. И при непрерывном распылении аэрозоля композиция способна достигать общей выпущенной дозы (TED), составляющей по меньшей мере приблизительно 2900 мкг в течение 15 с.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение представляет собой ингаляционную фармацевтическую композицию, содержащую дисперсию липосомных частиц, подходящую для непрерывного аэрозольного распыления. Композиция содержит дисперсию липосомных частиц, характеризующуюся средним диаметром, составляющим приблизительно 30-300 нм, причем каждая липосомная частица содержит CoQ10, дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC) и носитель водной дисперсии. Соотношение CoQ10:DPPC составляет от приблизительно 5:1 до приблизительно 1:5, CoQ10 составляет приблизительно 0,1-6 мас.% композиции и липосомные частицы диспергированы в носителе водной дисперсии. И при введении субъекту композиция характеризуется непрерывным распылением аэрозоля, достаточным для предоставления терапевтической дозы гидрофобного биоактивного средства субъекту (или альтернативно композиция может характеризоваться другим фармакокинетическим свойством, таким как способность достигать концентрации биоактивного средства, составляющей по меньшей мере приблизительно 500 мкг/г сырой ткани легкого, или общей выпущенной дозы (TED), составляющей по меньшей мере приблизительно 2900 мкг в течение 15 с).

Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение представляет собой ингаляционную фармацевтическую композицию, содержащую дисперсию липосомных частиц, подходящую для непрерывного аэрозольного распыления. Композиция содержит дисперсию липосомных частиц, характеризующуюся средним диаметром приблизительно 30-300 нм, причем каждая липосомная частица содержит CoQ10,

дистеароилфосфатидилхолин (DSPC) и носитель водной дисперсии. Соотношение CoQ10:DSPC составляет от приблизительно 5:1 до приблизительно 1:5, CoQ10 составляет приблизительно 0,1-6 мас.% композиции и липосомные частицы диспергированы в носителе водной дисперсии. И при введении субъекту композиция характеризуется непрерывным распылением аэрозоля, достаточным для предоставления терапевтической дозы гидрофобного биоактивного средства субъекту (или альтернативно композиция может характеризоваться другим фармакокинетическим свойством, таким как способность достигать концентрации биоактивного средства, составляющей по меньшей мере приблизительно 500 мкг/г сырой ткани легкого, или общей выпущенной дозы (TED), составляющей по меньшей мере приблизительно 2900 мкг в течение 15 с).

Согласно другому аспекту настоящее изобретение представляет собой ингаляционную фармацевтическую композицию, содержащую дисперсию липосомных частиц, подходящую для непрерывного аэрозольного распыления. Композиция содержит дисперсию липосомных частиц, характеризующуюся средним диаметром приблизительно 30-300 нм, причем каждая липосомная частица содержит CoQ10, димристоилфосфатидилхолин (DMPC) и носитель водной дисперсии. Соотношение CoQ10:DMPC составляет от приблизительно 5:1 до приблизительно 1:5, CoQ10 составляет приблизительно 0,1-6 мас.% композиции и липосомные частицы диспергированы в носителе водной дисперсии. И при введении субъекту композиция характеризуется непрерывным распылением аэрозоля, достаточным для предоставления терапевтической дозы гидрофобного биоактивного средства субъекту (или альтернативно композиция может характеризоваться другим фармакокинетическим свойством, таким как способность достигать концентрации биоактивного средства, составляющей по меньшей мере приблизительно 500 мкг/г сырой ткани легкого, или общей выпущенной дозы (TED), составляющей по меньшей мере приблизительно 2900 мкг в течение 15 с).

Согласно другому аспекту настоящее изобретение представляет собой способ получения ингаляционной фармацевтической композиции. Способ включает стадии

- (i) гидратирования фосфолипида с образованием таким образом гидратированного фосфолипида;
- (ii) смешивания гидратированного фосфолипида, гидрофобного биоактивного средства и носителя водной дисперсии с получением таким образом смеси; и
- (iii) гомогенизации смеси с получением таким образом дисперсии липосомных частиц, содержащей фосфолипид и гидрофобное биоактивное средство, диспергированные в носителе водной дисперсии, и характеризующейся средним диаметром приблизительно 30-500.

Соотношение гидрофобного биоактивного средства к фосфолипиду составляет от приблизительно 5:1 до приблизительно 1:5, гидрофобное биоактивное средство составляет приблизительно 0,1-30 мас.% композиции и фосфолипид составляет приблизительно 0,1-30 мас.% композиции. И при введении субъекту композиция характеризуется непрерывным распылением аэрозоля, достаточным для предоставления терапевтической дозы гидрофобного биоактивного средства субъекту (или альтернативно композиция может характеризоваться другим фармакокинетическим свойством, таким как способность достигать концентрации биоактивного средства, составляющей по меньшей мере приблизительно 500 мкг/г сырой ткани легкого, или общей выпущенной дозы (TED), составляющей по меньшей мере приблизительно 2900 мкг в течение 15 с).

Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение представляет собой способ введения ингаляционной фармацевтической композиции. Способ включает стадии

- (i) аэрозольного распыления дисперсии липосомных частиц с образованием таким образом респираторного аэрозоля, содержащего множество капель, характеризующихся средним массовым аэродинамическим диаметром (MMAD), составляющим приблизительно 1-5 мкм; и
- (ii) доставки терапевтически эффективного количества гидрофобного биоактивного средства к легкому нуждающегося в лечении субъекта.

Дисперсия липосомных частиц характеризуется средним диаметром, составляющим приблизительно 30-500 нм, причем каждая липосомная частица содержит гидрофобное биоактивное средство и фосфолипид, диспергированные в носителе водной дисперсии. Соотношение гидрофобного биоактивного средства к фосфолипиду составляет от приблизительно 5:1 до приблизительно 1:5, гидрофобное биоактивное средство составляет приблизительно 0,1-30 мас.% композиции и фосфолипид составляет приблизительно 0,1-30 мас.% композиции. И при введении субъекту композиция характеризуется непрерывным распылением аэрозоля, достаточным для предоставления терапевтической дозы гидрофобного биоактивного средства субъекту (или альтернативно композиция может характеризоваться другим фармакокинетическим свойством, таким как способность достигать концентрации биоактивного средства, составляющей по меньшей мере приблизительно 500 мкг/г сырой ткани легкого, или общей выпущенной дозы (TED), составляющей по меньшей мере приблизительно 2900 мкг в течение 15 с).

Согласно другому аспекту настоящее изобретение представляет собой ингаляционную фармацевтическую композицию, полученную с помощью способа, включающего стадии

- (i) гидратирования фосфолипида с образованием таким образом гидратированного фосфолипида;
- (ii) смешивания гидратированного фосфолипида, гидрофобного биоактивного средства и носителя водной дисперсии с получением таким образом смеси; и

(iii) гомогенизации смеси с получением таким образом дисперсии липосомных частиц, содержащей фосфолипид и гидрофобное биоактивное средство, диспергированные в носителе водной дисперсии, и характеризующейся средним диаметром приблизительно 30-500,

причем соотношение гидрофобного биоактивного средства к фосфолипиду составляет от приблизительно 5:1 до приблизительно 1:5, гидрофобное биоактивное средство составляет приблизительно 0,1-30 мас.% композиции и фосфолипид составляет приблизительно 0,1-30 мас.% композиции.

И при введении субъекту композиция характеризуется непрерывным распылением аэрозоля, достаточным для предоставления терапевтической дозы гидрофобного биоактивного средства субъекту (или альтернативно композиция может характеризоваться другим фармакокинетическим свойством, таким как способность достигать концентрации биоактивного средства, составляющей по меньшей мере приблизительно 500 мкг/г сырой ткани легкого, или общей выпущенной дозы (TED), составляющей по меньшей мере приблизительно 2900 мкг в течение 15 с).

Согласно другому аспекту настоящее изобретение представляет собой способ адаптации системы лазерной дифракции анализа размера частиц для непрерывного измерения непрерывного аэрозоля. Способ включает следующие стадии:

(i) предоставление системы лазерной дифракции анализа размера частиц, содержащей резервуар небулайзера, мембрану, лазерный пучок, линзу и источник всасывания воздуха;

(ii) размещение резервуара небулайзера с мембраной выше верхней границы лазерного пучка и на расстоянии между линзой и центром камеры аэрозольного облака; и

(iii) установка источника всасывания воздуха ниже лазерного пучка.

Адаптированная система предотвращает запотевание линзы путем непрерывного откачивания воздуха из камеры аэрозольного облака при непрерывном измерении передачи аэрозоля во время непрерывного аэрозольного распыления.

Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение представляет собой систему лазерной дифракции анализа размера частиц для непрерывного измерения непрерывного аэрозоля. Система включает в себя

(i) резервуар небулайзера, установленный с мембраной выше верхней границы лазерного пучка и на расстоянии между линзой и центром камеры аэрозольного облака; и

(ii) источник всасывания воздуха, установленный ниже лазерного пучка.

Система предотвращает запотевание линзы путем непрерывного откачивания аэрозольного облака при непрерывном измерении передачи аэрозоля во время непрерывного аэрозольного распыления.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение представляет собой способ непрерывного измерения непрерывного аэрозоля. Способ включает следующие стадии:

(i) предоставление непрерывного аэрозоля в систему лазерной дифракции анализа размера частиц, причем система содержит резервуар небулайзера, установленный с мембраной выше верхней границы лазерного пучка и на расстоянии между линзой и центром камеры аэрозольного облака, и источник всасывания воздуха, установленный ниже лазерного пучка; и

(ii) непрерывное измерение передачи аэрозоля наряду с тем, что система предотвращает запотевание линзы путем непрерывного откачивания воздуха из камеры аэрозольного облака.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение представляет собой способ получения и верификации средней процентной передачи (АРТ) ингаляционной фармацевтической композиции. Способ включает стадии

(i) гидратирования фосфолипида с образованием таким образом гидратированного фосфолипида;

(ii) смешивания гидратированного фосфолипида, гидрофобного биоактивного средства и носителя водной дисперсии с получением таким образом смеси;

(iii) гомогенизации смеси с получением таким образом дисперсии липосомных частиц, содержащей фосфолипид и гидрофобное биоактивное средство, диспергированные в носителе водной дисперсии, и характеризующейся средним диаметром приблизительно 30-500,

причем соотношение гидрофобного биоактивного средства к фосфолипиду составляет от приблизительно 5:1 до приблизительно 1:5, гидрофобное биоактивное средство составляет приблизительно 0,1-30 мас.% композиции и фосфолипид составляет приблизительно 0,1-30 мас.% композиции;

(iv) аэрозольного распыления дисперсии липосомных частиц с образованием таким образом респираторного аэрозоля, содержащего множество капель,

причем каждая капля содержит дисперсию липосомных частиц и характеризуется средним массовым аэродинамическим диаметром (MMAD), составляющим приблизительно 1-5 мкм;

(v) предоставления респираторного аэрозоля в систему лазерной дифракции анализа размера частиц,

причем система содержит резервуар небулайзера, установленный с мембраной выше верхней границы лазерного пучка и на расстоянии между линзой и центром камеры аэрозольного облака, и источник всасывания воздуха, установленный ниже лазерного пучка; и

(vi) непрерывного измерения передачи аэрозоля с помощью системы лазерной дифракции анализа размера частиц с определением таким образом, характеризуется ли композиция заданным значением

АРТ.

Согласно различным вариантам осуществления любой из вышеизложенных аспектов может комбинироваться с каким-либо одним или несколькими перечисленными ниже признаками, а также каким-либо одним или несколькими признаками в подробном изложении настоящего изобретения и примерах.

Согласно различным вариантам осуществления носитель водной дисперсии содержит воду или водный солевой раствор. Носитель водной дисперсии может представлять собой буфер, такой как фосфатно-солевой буфер.

Согласно некоторым вариантам осуществления дисперсия липосомных частиц находится в форме непрерывного респирабельного аэрозоля, содержащего множество водных капель, содержащих дисперсию липосомных частиц и характеризующихся средним массовым аэродинамическим диаметром (MMAD), составляющим приблизительно 1-5 мкм.

Согласно определенным вариантам осуществления композиция характеризуется АРТ, составляющей приблизительно 50-100% в течение по меньшей мере 15 мин непрерывного аэрозольного распыления. Композиция может характеризоваться АРТ приблизительно 50-100%, приблизительно 60-100%, приблизительно 70-100%, приблизительно 80-100%, приблизительно 90-100%, приблизительно 50-95%, приблизительно 60-95%, приблизительно 70-95%, приблизительно 80-95%, приблизительно 90-95%, приблизительно 50-90%, приблизительно 60-90%, приблизительно 70-90%, приблизительно 80-90%, менее чем приблизительно 50%, менее чем приблизительно 55%, менее чем приблизительно 65%, менее чем приблизительно 70%, менее чем приблизительно 75%, менее чем приблизительно 80%, менее чем приблизительно 85%, менее чем приблизительно 90%, менее чем приблизительно 95%, менее чем приблизительно 100% или любой поддиапазон или значение между ними. Непрерывное аэрозольное распыление может характеризоваться длительностью, составляющей приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 или 60 мин. Множество капель могут характеризоваться MMAD, составляющим приблизительно 1-5 мкм в течение по меньшей мере 15 мин непрерывного аэрозольного распыления.

Согласно различным вариантам осуществления композиция характеризуется АРТ, составляющей приблизительно 50-100% по меньшей мере через семь дней хранения. Липосомные частицы характеризуются средним диаметром, составляющим приблизительно 30-500 нм по меньшей мере через семь дней хранения. Хранение может происходить при условиях окружающей среды или других контролируемых условиях (например, в холодильнике).

Согласно некоторым вариантам осуществления композиция может характеризоваться одним или несколькими физико-химическими свойствами. Композиция может характеризоваться индексом текучести, составляющим приблизительно 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2 или 1,3. Композиция может характеризоваться вязкостью, составляющей приблизительно 0,1, 0,15, 0,2, 1, 100 или 110 сП. Композиция может характеризоваться дзета-потенциалом, составляющим приблизительно 2,5, 1,5, -2,5, -10, -50, -55 или -60 мВ. Композиция может характеризоваться поверхностным натяжением, составляющим приблизительно 25, 30, 35, 40, 45 или 50 мН/м. Композиция может характеризоваться пределом текучести, составляющим приблизительно 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 мПа. Дисперсия липосомных частиц может характеризоваться средним диаметром приблизительно 30-100, 50-150, 30-300, 100-400 или 200-300 нм. Композиция может характеризоваться индексом полидисперсности (PDI), составляющим приблизительно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 или 0,7. Композиция может характеризоваться ТАО, составляющим по меньшей мере приблизительно 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100%. Композиция может характеризоваться TED, составляющей по меньшей мере приблизительно 3600, 3900, 4300 или 4600 мкг в течение 15 с (например, измеряется с помощью DUSA; см. пример 2). Композиция может характеризоваться поведением неньютоновской жидкости.

Согласно различным вариантам осуществления множество капель может характеризоваться средним массовым аэродинамическим диаметром (MMAD), составляющим приблизительно 1, 2, 3, 4 или 5 мкм. Множество капель может характеризоваться геометрическим стандартным отклонением (GSD), составляющим менее чем приблизительно 2,5, 2,4, 2,3, 2,2, 2,1, 2,0, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1,0, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6 или 0,5.

Согласно некоторому варианту осуществления гидрофобное биоактивное средство включает в себя одно или несколько из следующего: болеутоляющие средства, противовоспалительные средства, антигельминтные средства, антиаритмические средства, антибактериальные средства, противовирусные средства, антикоагулирующие средства, антидепрессивные средства, противодиабетические средства, противозлептические средства, противогрибковые средства, противоподагрические средства, антигипертензивные средства, противомаларийные средства, противомигренозные средства, антиму斯卡риновые средства, противоопухолевые средства, средства для улучшения эректильной дисфункции, иммунодепрессанты, противопрозоидные средства, антииреозидные средства, анксиолитические средства, седативные средства, снотворные средства, нейролептические средства, β-блокаторы, кардиологические инотропные средства, кортикостероиды, диуретики, противопаркинсонические средства, желудочно-кишечные средства, антагонисты рецептора гистамина, кератолитики, средства регуляции липидов, антиангинальные средства, ингибиторы соx-2, ингибиторы лейкотриена, макролиды, мышечные релаксанты, биологиче-

ски-активные добавки, опиоидные болеутоляющие средства, ингибиторы протеазы, половые гормоны, стимулирующие средства, мышечные релаксанты, антиостеопорозные средства, средства против ожирения, средства для улучшения когнитивной функции, средства для лечения недержания мочи, пищевые масла, средства для лечения доброкачественной гипертрофии простаты, незаменимые жирные кислоты, не являющиеся незаменимыми жирные кислоты, и их комбинации. Гидрофобное биоактивное средство может включать в себя одно или несколько из следующего: гидрофобный противовоспалительный стероид, НПВП средство, антибактериальное средство, противогрибковое средство, химиотерапевтическое средство, вазодилататор или их комбинацию.

Согласно определенным вариантам осуществления гидрофобное биоактивное средство включает в себя одно или несколько из следующего: ацитретин, альбендазол, альбутерол, аминоклутемид, амиодарон, амлодипин, амфетамин, амфотерицин В, аторвастатин, атоваквон, азитромицин, баклофен, беклометазон, бенезеприл, бензонатат, бетаметазон, бикалутамид, будесонид, бупропион, бусульфид, бутенафин, кальцифедиол, кальцитриол, камптотекан, кандесартан, капсаицин, карбамезепин, каротины, цефекоксид, церивистатин, цетиризин, хлорфенирамин, холекальциферол, цилостазол, циметидин, циннаризин, ципрофлоксацин, цисаприд, кларитромицин, клемастин, кломифен, кломипрамин, клопидогрел, кодеин, кофермент Q10, циклобензаприл, циклоспорин, даназол, дантролен, дексхлорфенирамин, диклофенак, дикумарол, дигоксин, дигидроэпиандростерон, дигидроэрготамин, дигидротахистерол, диритромицин, донепезил, эфавиренз, эпросартан, эргокальциферол, эрготамин, источники незаменимых жирных кислот, этодолак, этопозид, фамотидин, фенофибрат, фентанил, фексофенадин, финастерид, флюконазол, флурбипрофен, флувастатин, фосфенитоин, фроватриптан, фуразолидон, габапентин, гемфиброзил, глибенкламид, глипизид, глибурид, глимепирид, гризеофульвин, галофантрин, ибупрофен, ирбесартан, иринотекан, изосорбид динитрат, изотретиноин, итраконазол, ивермектин, кетоконазол, кеторолак, ламотригин, ланоспразол, лефлуномид, лизиноприл, лоперамид, лоратадин, ловастатин, L-тироксин, лютеин, ликопен, медроксипрогестерон, мефепристон, мефлохин, мегестерол ацетат, метадон, метоксален, метронидазол, миконазол, мидазолам, миглитол, миноксидил, митоксантрон, монтелукаст, набуметон, нальбуфин, наратриптан, нелфинавир, нифедипин, нилсолидипин, нилутанид, нитрофурантоин, низатидин, омепразол, опревелкин, остерадиол, оксапрозин, паклитаксел, парикальцитол, пароксетин, пентазоцин, пиоглитазон, пизофетин, правастатин, преднизолон, пробукол, прогестерон, псевдоэфедрин, пиридистигмин, рабепразол, ралоксифен, рефококсид, репаглинид, рифабутин, рифапентин, римексолол, ритановир, ризатриптан, розиглитазон, саквинавир, сертралин, сибутрамин, силденафил цитрат, симвастатин, сиروهимус, спиронолактон, суматриптан, такрин, такролимус, тамоксифен, тамсулозин, таргретин, тазаротен, телмисартан, тенипозид, тербинафин, теразозин, тетрагидроканнабинол, тиагабин, тиклидопин, тирофибран, тизанидин, топирамат, топотекан, торемифен, трамадол, третиноин, троглитазон, тровафлоксацин, валсартан, венлафаксин, вертопорфин, вигабатрин, витамин А, витамин D, витамин Е, витамин К, зафирлукаст, зилеутон, золмитриптан, золпидем, зопиклон и их комбинации.

Согласно различным вариантам осуществления гидрофобное биоактивное средство также включает в себя добавку, выбранную из группы, состоящей из следующего: дезоксиглюкозы, соли дезоксиглюкозы, дигидроксиацетон, сукцината, пируваты, цитраты, фумараты, манаты, малонаты, лактаты, глутараты и их комбинации. Добавка может представлять собой 2-дезоксиглюкозу, 2-дезоксиглюкозафосфат, 6-дезоксиглюкозу, 6-дезоксиглюкозафосфат, дигидроксиацетон и их комбинации.

Согласно некоторым вариантам осуществления гидрофобное биоактивное средство включает в себя СоQ10. СоQ10 может быть замещен добавкой в положении 1, положении 4 или их комбинациях.

Согласно определенным вариантам осуществления гидрофобное биоактивное средство составляет приблизительно 4 мас.% композиции или менее. Гидрофобное биоактивное средство может составлять приблизительно 6, 5, 4, 3, 2 или 1 мас.% композиции или менее.

Согласно различным вариантам осуществления фосфолипид включает в себя одно или несколько из следующего: лецитин, лизолецитин, фосфатидилхолин, фосфатидилэтанолламин, фосфатидилинозитол, фосфатидилглицерол, фосфатидная кислота, фосфатидилсерин, лизофосфатидилхолин, лизофосфатидилэтанолламин, лизофосфатидилглицерол, лизофосфатидная кислота, лизофосфатидилсерин, PEG-фосфатидилэтанолламин, PVP-фосфатидилэтанолламин и их комбинации. Фосфолипид может включать в себя DPPC, DSPC, DMPC или их комбинацию. Фосфолипид может являться по существу чистым фосфолипидом. Фосфолипид может составлять приблизительно 3 мас.% композиции или менее.

Согласно некоторым вариантам осуществления соотношение гидрофобного биоактивного средства к фосфолипиду составляет приблизительно 1:1, 4:3 или 4:2,5. Соотношение гидрофобного биоактивного средства к фосфолипиду может составлять приблизительно 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 или любое значение между ними.

Согласно определенным вариантам осуществления фосфолипид находится в комбинации с одним или несколькими из следующего: абсорбирующие средства, противовспенивающие средства, подкисляющие средства, подщелачивающие средства, буферы, противомикробные средства, антиоксиданты, связующие средства, солилизирующие средства, растворители, модификаторы вязкости, увлажняющие средства, загустители и их комбинаций. Альтернативно композиция может состоять по сути из гидрофобного биоактивного средства, фосфолипида и носителя водной дисперсии.

Согласно различным вариантам осуществления композиция включает в себя хлорид натрия в количестве менее чем приблизительно 1,0% мас./об. композиции. Композиция может включать в себя соль в количестве, делающем композицию по сути изотонической в отношении легкого человека.

Согласно некоторым вариантам осуществления дисперсия представляет собой суспензию, наносуспензию, эмульсию или микроэмульсию.

Согласно определенным вариантам осуществления способ также включает аэрозольное распыление дисперсии липосомных частиц с образованием таким образом респираторного аэрозоля, содержащего множество капель, причем каждая капля содержит дисперсию липосомных частиц и характеризуется средним массовым аэродинамическим диаметром (MMAD), составляющим приблизительно 1-5 мкм.

Согласно различным вариантам осуществления смешивание включает смешивание с большим сдвигом в течение приблизительно до 5 мин приблизительно при 10000-20000 об/мин и приблизительно при 50-65°C. Смешивание может длиться приблизительно до 1, 2, 3, 4 или 5 мин. Смешивание может происходить приблизительно при 10000, 11000, 12000, 13000, 14000, 15000, 16000, 17000, 18000, 19000 или 20000 об/мин. Смешивание может происходить приблизительно при 50, 55, 60 или 65°C. Температура может изменяться в зависимости от температуры плавления используемого гидрофобного биоактивного средства.

Согласно некоторым вариантам осуществления гомогенизация включает микрофлюидизацию. Гомогенизация может включать ультразвуковую гомогенизацию. Гомогенизация может включать гомогенизацию под высоким давлением в течение приблизительно 1-50 проходов приблизительно при 30000 фунт/дюйм² и приблизительно при 50-65°C. Гомогенизация может происходить в течение приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 проходов. Давление может составлять приблизительно 25000, 26000, 27000, 28000, 29000, 30000, 31000, 32000, 33000, 34000 или 35000 фунт/дюйм². Температура может составлять приблизительно 50, 55, 60 или 65°C. Температура может изменяться в зависимости от температуры плавления используемого гидрофобного биоактивного средства.

Согласно определенным вариантам осуществления аэрозольное распыление включает небулизацию с технологией вибрирующей сетки-мембраны. Любой подходящий способ для непрерывной небулизации может быть адаптирован для применения согласно настоящему изобретению.

Согласно различным вариантам осуществления доставка достигает осажденной массовой доли, составляющей по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20%.

Согласно некоторым вариантам осуществления доставка достигает локальной доставки к легкому по существу без системной доставки.

Согласно определенным вариантам осуществления доставка достигает повышенного количества гидрофобного биоактивного средства в легком в течение по меньшей мере 48 ч после введения.

Согласно различным вариантам осуществления при непрерывном распылении аэрозоля композиция способна достигать концентрации биоактивного средства, составляющей по меньшей мере приблизительно 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 или 100 мкг/г сырой ткани легкого. Следует понимать, что на достигнутую концентрацию в сырой ткани легкого, среди прочего, будет влиять субъект, способ введения и состав. Следовательно, согласно различным вариантам осуществления концентрация биоактивного средства может представлять собой терапевтически адекватное или терапевтически необходимое количество конкретного используемого биоактивного средства.

Согласно некоторым вариантам осуществления доставка терапевтически эффективного количества гидрофобного биоактивного средства включает отмеривание дозы биоактивного средства.

Согласно определенным вариантам осуществления у субъекта присутствует злокачественная опухоль. Злокачественная опухоль может представлять собой рак легкого. В более общем смысле у субъекта может присутствовать любое одно или несколько заболеваний, поражающих дыхательные пути, включая в себя без ограничения одно или несколько из следующего: астма, аллергии, хроническое обструктивное заболевание легких, хронический бронхит, острый бронхит, эмфизема, кистозный фиброз, пневмония, туберкулез, отек легких, синдром острой дыхательной недостаточности, пневмокониоз, интерстициальное заболевание легких, отек легких, эмболия сосудов легких, легочная гипертензия, плевральный выпот, пневмоторакс, мезотелиома, амиотрофический латеральный склероз, тяжелая миастения и заболевания легких.

Согласно различным вариантам осуществления композиция не содержит снижающее опсонизацию средство (например, снижающее опсонизацию средство, которое препятствует распылению аэрозоля). Например, композиция может не содержать такой блок-полимер полиоксиэтилена и полиоксипропилена, как полуксамер (например, полуксимер 188), плуроник, лутрол и супероник. Согласно другому примеру композиция может специально не содержать полиэтиленгликоль (PEG) с различной длиной цепи, полисахариды, другие содержащие PEG сополимеры, полуксамины и подобное. Альтернативно составы согласно настоящему изобретению могут содержать один или несколько усилителей опсонизации в количестве, которое по существу не влияет на аэрозольное распыление, например, если количество усилителя опсонизации придает иным образом желательное свойство составу. Согласно одному варианту осуществления композиция включает в себя блок-полимер полиоксипропилена и полиоксиэтилена в количестве 0,001-5% по массе общей композиции.

Настоящее изобретение описано более подробно с помощью представленных ниже фигур и примеров, которые используются только в иллюстративных целях, а не для ограничения.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1А показано схематическое представление аэрозольного распыления дисперсий лекарственного средства с использованием небулайзера с вибрирующей сеткой-мембраной.

На фиг. 1В показана схема некоторых способов получения.

На фиг. 2 показана дифракционная рентгенограмма порошкообразного CoQ10 с большим размером частиц.

На фиг. 3 показана термограмма дифференциальной сканирующей калориметрии порошкообразного CoQ10 с большим размером частиц.

На фиг. 4 показана фотография сканирующей электронной микроскопии (SEM) порошкообразного CoQ10 с большим размером частиц.

На фиг. 5 показаны распределения по размерам частиц CoQ10 дисперсий, полученных с использованием различных способов получения.

На фиг. 6 показаны распределения по размерам частиц, полученные с помощью лазерной дифракции (LD), водных дисперсий CoQ10 после получения в микрофлюидизаторе и через 7 дней (состав А, табл. 1).

На фиг. 7 показаны значения Z-среднего и PdI водных дисперсий CoQ10 после получения в микрофлюидизаторе и через 7 дней (состав А, табл. 1). Статистически значимые различия не были обнаружены для характеристик распределения по размерам частиц лекарственного средства (Z-среднее и PdI) ни в составах, полученных с различным количеством проходов микрофлюидизации и проанализированных после получения, ни когда те же составы сравнивали через 0 и 7 дней.

На фиг. 8 показаны гидродинамические диаметры и полидисперсность водных дисперсий CoQ10 (состав В, табл. 1) после получения в микрофлюидизаторе с использованием лецитина (вверху) или DPPC (внизу). (* $P \leq 0,05$ при сравнении с 10 проходами; § не отличающийся статистически при сравнении с лецитиновых дисперсий, полученной с помощью такого же числа проходов микрофлюидизации.)

На фиг. 9А показан Malvern Spraytec®, соединенный с ингаляционной ячейкой.

На фиг. 9В показано схематическое представление Malvern Spraytec® с ингаляционной ячейкой в горизонтальном положении.

На фиг. 9С показано схематическое представление способа "открытого рабочего стола", обсуждаемое в связи с представленными ниже примерами (расстояния: между мембраной и верхней границей лазерного пучка - 25 мм; между линзой и центром аэрозольного облака - 25 мм; всасывание воздуха ниже лазерного пучка - 10 см).

На фиг. 10 показаны диаграммы передачи лецитиновых дисперсий CoQ10 (состав С, табл. 1). Результаты выражены как средние значения ($n=3$) процентной передачи относительно небулизации дисперсий CoQ10 в течение 15 мин. Значения наклона из анализа линейной регрессии кривых оценивают как измерения непрерывности продукции аэрозоля.

На фиг. 11 показан наклон диаграмм передачи (вверху) и общего выхода аэрозоля (ТАО - внизу) для небулизации лецитиновых дисперсий CoQ10 (состав С, табл. 1) во время 15-минутных событий небулизации. (* $P \leq 0,05$ по сравнению с другими составами.)

На фиг. 12 показан анализ распределения по размерам частиц водных дисперсий CoQ10 (состав С, табл. 1) после получения в микрофлюидизаторе с использованием лазерной дифракции (слева) и динамического рассеяния света (справа). (* $P \leq 0,05$ по сравнению с составами, проанализированными после получения; § $P \leq 0,05$ по сравнению с другими составами на 7 день.)

На фиг. 13 показаны значения дзета-потенциала и поверхностного натяжения относительно составов CoQ10, обработанных при различном количестве проходов микрофлюидизации (состав С, табл. 1). Столбики и планки погрешностей представляют средние значения и среднеквадратические погрешности соответственно ($n=10$ для дзета-потенциала и $n=5$ для поверхностного натяжения). Температура во время измерения поверхностного натяжения составляла 25°C. (* $P \leq 0,05$ при сравнении с 10 проходами, § не отличающийся статистически.)

На фиг. 14А, 14В показаны элементы модели Гершеля-Балкли для водных дисперсий CoQ10, обработанных с различным числом проходов микрофлюидизации (состав С, табл. 1). Не были обнаружены статистически значимые различия.

На фиг. 15 показано схематическое представление прибора для забора образцов для определения однородности дозы (DUSA) для порошковых ингаляторов (DPI), адаптированного для небулайзеров.

На фиг. 16 показаны распределения по размерам частиц, полученные из техники лазерной дифракции, водных дисперсий CoQ10 после 50 проходов в микрофлюидизаторе. Результаты выражают как средние значения \pm среднеквадратические отклонения ($n=3$). Некоторые среднеквадратические отклонения слишком малы, чтобы быть видимыми на графиках.

На фиг. 17 показаны значения Z-среднего и PdI водных дисперсий CoQ10 после 50 проходов в микрофлюидизаторе. Результаты выражают как средние значения \pm среднеквадратические отклонения ($n=3$).

Некоторые среднеквадратические отклонения слишком малы, чтобы быть видимыми на графике (n=3). § Не отличающийся статистически.

На фиг. 18 показан дзета-потенциал дисперсий CoQ10. Результаты выражают как средние значения \pm среднеквадратическое отклонение (n=3). *P<0,05 при сравнении с синтетическими фосфолипидами.

На фиг. 19 показано поверхностное натяжение дисперсий CoQ10. Результаты выражают как средние значения \pm среднеквадратическая погрешность (n \geq 5). Температурные значения во время измерения составляли 25, 19 и 17°C соответственно. § Не отличающийся статистически.

На фиг. 20 показаны элементы модели Гершеля-Балкли для водных дисперсий CoQ10, выраженные как средние значения \pm среднеквадратические отклонения (n=3). Предел текучести состава DSPC не представлен, поскольку он следует степенной модели. Некоторые среднеквадратические отклонения слишком малы, чтобы быть видимыми на графике. *P<0,05; § не отличающийся статистически.

На фиг. 21 показана иллюстративная схема общей кривой текучести водных дисперсий.

На фиг. 22 показано реологическое поведение дисперсий CoQ10. Графики, представленные в разных шкалах, выражают как средние значения \pm среднеквадратические отклонения (n=3).

На фиг. 23 показаны диаграммы передачи солевых (контрольных) и лецитиновых, DMPC, DPPC и DSPC дисперсий CoQ10. Результаты выражают как средние значения (n=3) процентной передачи относительно небулизации дисперсий CoQ10 в течение 15 мин. Значения наклона из анализа линейной регрессии кривых оценивают как измерение непрерывности в продукции аэрозоля.

На фиг. 24 показан наклон диаграмм передачи (вверху) и общего выхода аэрозоля, ТАО (внизу), выраженный как средние значения \pm среднеквадратические отклонения (n=3) относительно небулизации дисперсий CoQ10 в течение 15 мин. § Не отличающийся статистически.

На фиг. 25 показана TED дисперсий CoQ10 из NGI (вверху) и из DUSA для DPI, адаптированного для небулайзеров (внизу). Результаты выражают как средние значения \pm среднеквадратические отклонения (n=3) общего количества лекарственного средства, осажденного в пределах 15-секундного периода в начальную и конечную фазу 15-минутного события небулизации. TED: общая выпущенная доза; DUSA: установка для забора образца для определения однородности дозы; DPI: порошковый ингалятор. *P<0,05 при сравнении с синтетическими фосфолипидами; †P<0,05 в пределах события небулизации; § не отличающийся статистически по сравнению друг с другом; ‡ не отличающийся статистически по сравнению с другими синтетическими фосфолипидами.

На фиг. 26 показаны *in vitro* профили депозиции лецитиновых, DMPC, DPPC и DSPC дисперсий CoQ10 с объемной скоростью потока, составляющей 15 л/мин с использованием небулайзера Aeroneb Pro®. Результаты выражают как средние значения \pm среднеквадратические отклонения (n=3) процентного отношения общего количества лекарственного средства, осажденного в пределах 15-секундного периода в начальной и конечной фазах 15-минутного события небулизации.

На фиг. 27 показаны *in vitro* профили депозиции лецитиновых, DMPC, DPPC и DSPC дисперсий CoQ10 при объемной скорости потока, составляющей 15 л/мин с использованием небулайзера Aeroneb Pro®. Результаты выражают как средние значения \pm среднеквадратические отклонения (n=3) количества лекарственного средства, осажденного в пределах 15-секундного периода в начальной и конечной фазах 15-минутного события небулизации.

На фиг. 28 показаны аэродинамические свойства лецитиновых, DMPC, DPPC и DSPC дисперсий CoQ10 при объемной скорости потока, составляющей 15 л/мин с использованием небулайзера Aeroneb Pro®. Результаты выражают как средние значения \pm среднеквадратические отклонения (n=3) MMAD или GSD в пределах 15-секундного периода на начальной и конечной фазах 15-минутного события небулизации. *P<0,05 в пределах события небулизации; §P<0,05 при сравнении друг с другом.

На фиг. 29А показаны значения TED NGI и TED DUSA для исследуемых составов.

На фиг. 29В показана расчетная общая доза (FPDet) и фракция (FPF) аэрозольных тонкодисперсных частиц из лецитиновых, DMPC, DPPC и DSPC дисперсий CoQ10 при объемной скорости потока, составляющей 15 л/мин с использованием небулайзера Aeroneb Pro®. Результаты выражают как средние значения \pm среднеквадратические отклонения (n=3), относящиеся к 15-секундному периоду на начальной и конечной фазах 15-минутного события небулизации. *P<0,05 при сравнении с синтетическими фосфолипидами; †P<0,05 в пределах события небулизации; § не отличающийся статистически по сравнению друг с другом; ‡P<0,05 при сравнении друг с другом.

На фиг. 30 показано среднее Dv(50) дисперсий CoQ10, распыленных в виде аэрозоля с использованием небулайзера Aeroneb Pro® в течение 15 мин (n=3).

На фиг. 31 показан иллюстративное предназначенное только для носа дозирующее устройство, используемое для распыления CoQ10 в виде аэрозоля мышам. Шесть мышей отдельно закрепляют в трубке, располагая их носы в камеру. Небулайзер устанавливают между камерой и вентилятором, который будет обеспечивать достаточный воздушным потоком для заполнения камеры аэрозолем лекарственного средства. Систему трубок открывают для предотвращения рециркуляции лекарственного средства.

На фиг. 32 показаны расчетные профили зависимости концентрации лекарственного средства от

времени для CoQ10 внутри предназначенной только для носа ингаляционной камеры.

На фиг. 33 показано суммарные расчетные дозы CoQ10 из составов синтетических фосфолипидов, распыленных в виде аэрозоля мышам в предназначенной только для носа ингаляционной камере в течение 15 мин.

На фиг. 34 показаны средние концентрации CoQ10 в легких, приведенные к сырой ткани легкого, из дисперсий синтетических фосфолипидов после аэрозольного распыления мышам в предназначенной только для носа ингаляционной камере в течение 15 мин. Планки погрешностей показывают среднеквадратическое отклонение (n=6).

На фиг. 35 показаны средние концентрации CoQ10 в легких, приведенные к массе тела животного, из дисперсий синтетических фосфолипидов после аэрозольного распыления мышам в предназначенной только для носа ингаляционной камере в течение 15 мин. Планки погрешностей показывают среднеквадратическое отклонение (n=6).

На фиг. 36 показана депозиция CoQ10 в носовую полость мышей через 0,5 и 1 ч после 15-минутного дозирования с помощью небулайзера. Результаты выражают как средние значения \pm среднеквадратические отклонения (n=6). *P<0,05 при сравнении с контрольной группой; †P<0,05 при сравнении в пределах одной группы.

На фиг. 37 показаны диаграммы передачи аэрозольного распыления стабилизированных DMPC дисперсий с различными концентрациями CoQ10.

На фиг. 38 показаны диаграммы передачи аэрозольного распыления стабилизированных DMPC и DSPC дисперсий по сравнению с внутривенным составом, который включает в себя конкретное снижающее опсонизацию средство.

На фиг. 39-41 показано дополнительное определение характеристик исследуемых составов в связи с фиг. 38. Другие признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из следующего подробного изложения, примеров и формулы изобретения.

Подробное описание изобретения

Как обсуждалось выше, настоящее изобретение относится к ингаляционным фармацевтическим композициям, содержащим водную дисперсию частиц, содержащую гидрофобное биоактивное средство. Вследствие их химического состава и способов получения фармацевтические композиции проявляют отличительные физико-химические свойства, которые обеспечивают преимущественную передачу и выход аэрозоля, включая стабильное и непрерывное аэрозольное распыление.

CoQ10 применялся в качестве иллюстративного гидрофобного биоактивного средства. Кофермент Q10, также известный как CoQ10, убихинон или убидекаренон, в естественных условиях встречается в организме. CoQ10 участвует в транспорте электронов и переносе протонов в митохондриальном дыхании. Следовательно, изменение уровней указанного антиоксиданта может повлиять на такие биологические активности, как старение, нейродегенеративные и сердечно-сосудистые заболевания и злокачественная опухоль.

CoQ10 представляет собой слабо растворимое в воде соединение, представленное в виде желтого или оранжевого кристаллического порошка. Самая высокая концентрация CoQ10 в плазме, о которой сообщалось в литературе, составляет 10,7 мкмоль/л (приблизительно 9 мкг/мл), которая была получена путем введения солибутилизированных пероральных составов (например, коммерчески доступной пищевой добавки или "нутрицевтического средства"). Тем не менее максимальную переносимую дозу (MTD) еще предстоит определить. Настоящее изобретение относится к составам CoQ10 для легочной доставки с преимущественными фармакокинетическими профилями, которые будут улучшать фармакодинамические ответы на лечение злокачественных опухолей дыхательной системы. При доставке большого количества лекарственного средства в место локализации заболевания, может быть использована меньшая доза (по сравнению с внутривенным или пероральным введением).

Последующее изложение относится к дополнительному подробному рассмотрению композиций согласно настоящему изобретению (содержащих гидрофобные биоактивные средства, фосфолипиды, носители водной дисперсии и другие компоненты), способов получения (включающих смешивание, гомогенизацию и аэрозольное распыление) и способов лечения (включающих фармакокинетику, фармакодинамику и назначения). В конечном счете подробное изложение относится к иллюстративным примерам настоящего изобретения, содержащим

пример 1: разработка и определение характеристик стабилизированных фосфолипидами субмикронных водных дисперсий CoQ10, адаптированных для непрерывной небулизации;

пример 2: прогнозирование *in vitro* профилей аэрозольного распыления на основании реологического поведения водных дисперсий CoQ10;

пример 3: легочная депозиция и системное распределение ингаляционных составов CoQ10 у мышей;

пример 4: определение диапазона низких концентраций гидрофобных лекарственных средств с использованием ВЭЖХ;

пример 5: определение подходящих концентраций гидрофобных лекарственных средств в фосфо-

липидных нанодисперсиях, подходящих для непрерывной небулизации; и

пример б: измерение воспалительного ответа на легочное введение дисперсий инкапсулированных в фосфолипиды гидрофобных биоактивных средств.

Композиции.

Согласно различным вариантам осуществления ингаляционные фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению содержат водную дисперсию частиц, подходящую для непрерывного аэрозольного распыления. Каждая из частиц содержит гидрофобное биоактивное средство и фосфолипид, и они диспергированы в носителе водной дисперсии. Согласно некоторым вариантам осуществления частицы представляют собой липосомные частицы или содержат фракцию липосомных частиц. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция может состоять по сути из гидрофобного биоактивного средства, фосфолипида и носителя водной дисперсии. Тем не менее возможны другие варианты осуществления, включающие один или несколько дополнительных компонентов. Различные компоненты для включения в композиции по настоящему изобретению обсуждаются, в свою очередь, ниже.

Гидрофобные биоактивные средства.

Согласно различным вариантам осуществления одно или несколько гидрофобных биоактивных средств (также известных как липофильные биоактивные средства) могут быть получены в виде ингаляционных фармацевтических композиций. Гидрофобные биоактивные средства являются относительно нерастворимыми в воде. Например, гидрофобное биоактивное средство может характеризоваться растворимостью в воде, составляющей менее чем приблизительно 1 часть биоактивного средства приблизительно в 1000 частях воды.

Подходящие липофильные биоактивные средства могут включать в себя без ограничения следующие болеутоляющие средства, противовоспалительные средства, антигельминтные средства, антиаритмические средства, антибактериальные средства, противовирусные средства, антикоагулирующие средства, антидепрессивные средства, противодиабетические средства, противоэпилептические средства, противогрибковые средства, противоподагрические средства, антигипертензивные средства, противомалярийные средства, противомигренозные средства, антимиокардиальные средства, противоопухолевые средства, средства для улучшения эректильной дисфункции, иммунодепрессанты, противопротозойные средства, антииреодные средства, анксиолитические средства, седативные средства, снотворные средства, нейролептические средства, β -блокаторы, кардиологические инотропные средства, кортикостероиды, диуретики, противопаркинсонические средства, желудочно-кишечные средства, антагонисты рецептора гистамина, кератолитики, средства регуляции липидов, антиангинальные средства, ингибиторы соx-2, ингибиторы лейкотриена, макролиды, мышечные релаксанты, биологически-активные добавки, опиоидные болеутоляющие средства, ингибиторы протеазы, половые гормоны, стимулирующие средства, мышечные релаксанты, антиостеопорозные средства, средства против ожирения, средства для улучшения когнитивной функции, средства для лечения недержания мочи, пищевые масла, средства для лечения доброкачественной гипертрофии простаты, незаменимые жирные кислоты, не являющиеся незаменимыми жирные кислоты, их комбинации и подобное.

Не ограничивающие примеры подходящих гидрофобных активных средств включают в себя без ограничения следующие: ацитретин, альбендазол, альбутерол, аминоклутемид, амиодарон, амлодипин, амфетамин, амфотерицин В, аторвастатин, атоваквон, азитромицин, баклофен, беклометазон, бензеприл, бензонатат, бетаметазон, бикалутамид, будесонид, бупропион, бусульфид, бутенафин, кальцифедиол, кальцитриол, камптотекан, кандесартан, капсаицин, карбамезепин, каротены, цефексим, церивистатин, цетиризин, хлорфенирамин, холекальциферол, цилостазол, циметидин, циннаризин, ципрофлоксацин, цисаприд, кларитромицин, клемастин, кломифен, кломипрамин, клопидогрел, кодеин, кофермент Q10, циклобензаприл, циклоспорин, даназол, дантролен, дексхлорфенирамин, диклофенак, дикумарол, дигоксин, дигидроэпиандростерон, дигидроэрготамин, дигидротрахистерол, диритромицин, донепезил, эфавиренз, эпосартан, эргокальциферол, эрготамин, источники незаменимых жирных кислот, этодолак, этопозид, фамотидин, фенофибрат, фентанил, фексофенадин, финастерид, флюконазол, флурбипрофен, флувастатин, фосфенитоин, фроватриптан, фуразолидон, габапентин, гемфиброзил, глибенкламид, глипизид, глибурид, глимеприн, гризеофульвин, галофантрин, ибупрофен, ирбесартан, иринотекан, изосорбид динитрат, изотретиноин, итраконазол, ивермектин, кетоконазол, кеторолак, ламотригин, ланоспрозол, лефлуноמיד, лизиноприл, лоперамид, лоратадин, ловастатин, L-тироксин, лютеин, ликопен, медроксипрогестерон, мефепристон, мефлохин, мегестерол ацетат, метадон, метоксален, метронидазол, миконазол, мидазолам, миглитол, миноксидил, митоксантрон, монтелукаст, набуметон, нальбуфин, наратиптан, нелфинавир, нифедипин, нилсолидипин, нилутанид, нитрофурантоин, низатидин, омепразол, опревелкин, остерадиол, оксапрозин, паклитаксел, парикальцитол, пароксетин, пентазоцин, пиоглитазон, пизофетин, правастатин, преднизолон, пробукол, прогестерон, псевдоэфедрин, пиридостигмин, рабепразол, ралоксифен, рефококсид, репаглинид, рифабутин, рифапентин, римексолол, ритановир, ризатриптан, розиглитазон, саквинавир, сертралин, сибутрамин, силденафил цитрат, симвастатин, сирилимус, спиронолактон, суматриптан, такрин, такролимус, тамоксифен, тамсулозин, таргретин, тазаротен, телмисартан, тенипозид, тербинафин, теразозин, тетрагидроканнабинол, тиагабин, тиклидопин, тирофибран, тизанидин, топирамат, топотекан, торемифен, трамадол, третиноин, троглитазон, тровафлоксацин, валсартан,

венлафаксин, вертопорфин, вигабатрин, витамин А, витамин D, витамин Е, витамин К, зафирлукаст, зилеутон, золмитриптан, золпидем, зопиклон, их комбинации и подобное. Также могут использоваться соли, изомеры и/или другие производные вышеперечисленных биоактивных средств, а также их комбинации.

Согласно различным вариантам осуществления CoQ10 может представлять собой гидрофобное биоактивное средство (например, отдельно или в комбинации с одним или несколькими дополнительными биоактивными средствами). CoQ10, иногда в настоящем документе имеющий название CoQ10 или убидекаренон, представляет собой популярную пищевую добавку и его можно найти в форме капсул в магазинах пищевых добавок, магазинах диетических продуктов, аптеках и подобном в виде витаминоподобной добавки, которая, как предполагается, помогает защитить иммунную систему благодаря антиоксидантным свойствам убихинола, восстановленной формы CoQ10 (убихинона). Используемый в настоящем документе CoQ10 может также включать его производные, включающие в себя, например, убихинол. Аналогично CoQ10 может также включать в себя аналоги убихинона и убихинола и соединения-предшественники, а также их комбинации.

Согласно различным вариантам осуществления такое липофильное биоактивное средство, как кофермент Q10, может комбинироваться с другими биоактивными средствами или соединениями для введения *in vivo*. Аналогично любое биоактивное средство может комбинироваться с дополнительными добавками и/или вспомогательными веществами. Другие биоактивные средства, добавки и/или вспомогательные вещества могут являться гидрофобными или гидрофильными.

Комбинации биоактивных средств могут быть использованы согласно настоящему раскрытию для лечения злокачественных опухолей, включающих в себя без ограничения рак легкого. Например, липофильное биоактивное средство, такое как CoQ10, может быть скомбинировано с дезоксиглюкозами, включающими в себя 2-дезоксиглюкозу и/или соли 2-дезоксиглюкозы, 6-дезоксиглюкозу и/или соли 6-дезоксиглюкозы, в виде комбинации или смеси и введено пациенту *in vivo*. Подходящие соли могут включать фосфаты, лактаты, пируваты, гидроксibuтираты, их комбинации и подобное. Согласно некоторым вариантам осуществления соль может представлять собой фосфат, такой как фосфат 2-дезоксиглюкозы, фосфат 6-дезоксиглюкозы, их комбинации и подобное. Согласно другим вариантам осуществления хиноновое или хинольное кольцо убихинона или убихинола может быть замещено в положении 1, положении 4 или обоих положениях дезоксиглюкозой или ее солью, такой как 2-дезоксиглюкоза или 6-дезоксиглюкоза или их соли, включающие в себя фосфат 2-дезоксиглюкозы или фосфат 6-дезоксиглюкозы, причем замещенный убихинон или убихинол затем вводят пациенту.

Аналогично дигидроксиацетон может быть скомбинирован с CoQ10 в виде комбинации или смеси и введен пациенту *in vivo*. Согласно таким вариантам осуществления хиноновое или хинольное кольцо убихинона или убихинола может быть замещено в положении 1, положении 4 или обоих положениях дигидроксиацетоном, причем замещенный убихинон или убихинол затем вводят пациенту. Согласно другим вариантам осуществления соединения, которые могут быть введены вместе с таким липофильным биоактивным средством, как кофермент Q10, включают в себя сукцинаты, пируваты, цитраты, fumarаты, малаты, малонаты, лактаты, глутараты, их комбинации и подобное, причем специфические примеры включают без ограничения сукцинат натрия, сукцинат калия, их комбинации и подобное.

Фосфолипиды.

Согласно различным вариантам осуществления биоактивное средство заключено в липосому и/или иным образом стабилизировано вместе с фосфолипидом. Липосомы могут быть образованы из одного или нескольких образующих липосомы соединений, таких как фосфолипиды. Аналогично биоактивное средство и фосфолипид могут формировать другую физическую конфигурацию, такую как смеси и дисперсии. Композиции согласно настоящему изобретению могут включать преимущественно липосомную конфигурацию, фракцию липосом вместе с другими конфигурациями или могут по сути не содержать липосом. Несмотря на то что возможны различные соединения и их комбинации, конечная композиция должна в конечном итоге проявлять отличительные физико-химические свойства согласно настоящему изобретению, которые обеспечивают преимущественную передачу и выход аэрозоля, фармакокинетические и/или фармакодинамические параметры.

Подходящие фосфолипиды и/или производные/аналоги фосфолипидов для образования липосом включают в себя без ограничения лецитин, лизолецитин, фосфатидилхолин (например, дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC) или димиристоилфосфатидилхолин (DMPC), фосфатидилэтаноламин, фосфатидилинозитол, фосфатидилглицерол, фосфатидную кислоту, фосфатидилсерин, лизофосфатидилхолин, лизофосфатидилэтаноламин, лизофосфатидилглицерол, лизофосфатидную кислоту, лизофосфатидилсерин, PEG-фосфатидилэтаноламин, PVP-фосфатидилэтаноламин, их комбинации и подобное.

Согласно одному варианту осуществления фосфолипид представляет собой лецитин. Лецитин может быть получен из яйца или сои. Такие лецитины включают в себя коммерчески доступные в виде PHOSPHOLIPON® 8SG, PHOSPHOLIPON® 90G и PHOSPHOLIPON® 90H (полностью гидрогенизированный вариант PHOSPHOLIPON® 90G) от American Lecithin Company, Оксфорд, Коннектикут (часть Lipo Chemicals, Inc. - каталог фосфолипидов от Lipo перечисляет другие потенциально подходящие фос-

фолипиды, например подходящие для парентерального применения). Другие подходящие лецитины включают в себя лецитин LECINOL S-10® доступный, например, от Nikko Chemicals, NOF (Япония), Lipo Chemicals, Inc. и Genzyme Corporation, а также других коммерческих поставщиков. Альтернативно согласно некоторым вариантам осуществления может быть предпочтительным выбрать один или несколько фосфолипидов, которые являются менее гидрофильными, чем лецитин.

Фосфолипиды могут быть выбраны так, чтобы придавать отрицательный поверхностный заряд полученным липосомным носителям, что может снижать время обработки и энергетические затраты способа и что может способствовать образованию стабильных липосом и аэрозольного распыления. Например, лецитин с высоким содержанием фосфатидилхолина (например, дипальмитоилфосфатидилхолина или димиристоилфосфатидилхолина) может использоваться для образования липосомы. Пример лецитина с высоким содержанием фосфатидилхолина представляет собой PHOSPHOLIPON® 85G, который содержит минимум 85% фосфатидилхолина на основе линолевой кислоты. Этот лецитин является легким в применении и способен производить субмикронные липосомы при низких температурах способа (от приблизительно 20°C до приблизительно 55°C) без добавления каких-либо других специальных добавок. PHOSPHOLIPON® 85G содержит, кроме фосфатидилхолина, приблизительно 5-7% фосфатидной кислоты.

Носители водной дисперсии.

Водная среда, например вода, необходима для образования водной дисперсии согласно настоящему изобретению. Пример носителей водной дисперсии включает в себя воду, солевой раствор (например, изотонический солевой раствор, солевой раствор, который будет делать конечный состав изотоническим относительно легкого субъекта) и водные буферы (например, фосфатно-солевой буфер). Другие подходящие носители водной дисперсии могут включать другие водные растворы, которые являются совместимыми с необходимой химической композицией, способом получения и/или медицинским применением.

Дополнительные компоненты.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут включать в себя один или несколько дополнительных компонентов в дополнение к одному или нескольким биоактивным средствам, одному или нескольким фосфолипидам и одному или нескольким носителям водной дисперсии. Дополнительные компоненты могут использоваться, например, для повышения образования состава липосом, содержащих липофильное биоактивное средство, для улучшения общих реологических и технологических свойств липосом и для обеспечения микробиологической целостности полученного липосомного концентрата во время хранения. Такие компоненты включают в себя без ограничения абсорбирующие средства, противовспенивающие средства, подкисляющие средства, подщелачивающие средства, буферы, противомикробные средства, антиоксиданты (например, аскорбаты, токоферолы, бутилированный гидрокситолуол (BHT), полифенолы, фитиновую кислоту), связующие средства, биологические добавки, хелатирующие средства (например, динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), тетранатриевую соль EDTA, метасиликат натрия и подобное), денатурирующие средства, наружные болеутоляющие средства (например, аспирин, нестероидные противовоспалительные средства и подобное), стероидные противовоспалительные лекарственные средства (такие как гидрокортизон и подобное), консерванты (например, имидазолидинилмочевину, диазолидинилмочевину, феноксиэтанол, метилпарабен, этилпарабен, пропилпарабен и подобное), восстанавливающие средства, солибутилирующие средства, растворители, модификаторы вязкости, увлажняющие средства, сурфактанты, загустители, наполнители, стабилизаторы, полимеры, ингибиторы протеазы, антиоксиданты, усилители абсорбции и их комбинации. Такие дополнительные компоненты могут присутствовать в количестве от приблизительно 0,001% по массе до приблизительно 10% по массе дисперсии.

Вспомогательные вещества и адъюванты, которые могут использоваться согласно настоящему раскрытию, наряду с тем что они сами по себе потенциально характеризуются некоторой активностью, например, в качестве антиоксидантов, как правило, включают в себя соединения, которые усиливают активность и/или эффективность активных средства. Также возможно, чтобы присутствовало более чем одно вспомогательное вещество, адъювант или даже активные средства в данной респираторной комбинации.

Вспомогательные вещества могут быть выбраны и добавлены либо до, либо после образования частиц лекарственного средства или биоактивного средства, для того чтобы обеспечить гомогенное перемешивание частиц лекарственного средства или биоактивного средства для подходящего введения. Вспомогательные вещества могут включать в себя такие средства, которые описаны выше в качестве подходящих для образования липосом. Другие подходящие вспомогательные вещества включают в себя полимеры, усилители абсорбции, усиливающие растворимость средства, увеличивающие скорость растворения средства, усиливающие стабильность средства, биоадгезивные средства, средства контролируемого высвобождения, средства для повышения текучести и технологические вспомогательные средства. Согласно некоторым вариантам осуществления подходящие вспомогательные вещества включают в себя простые эфиры целлюлозы, полимеры акриловой кислоты, желчные соли и их комбинации. Дру-

гие подходящие вспомогательные вещества включают в себя подробно описанные в Handbook of Pharmaceutical Excipients, опубликованном совместно с American Pharmaceutical Association and The Pharmaceutical Society of Great Britain, the Pharmaceutical Press, 1986, соответствующие части которого включены в настоящий документ посредством ссылки. Такие вспомогательные вещества коммерчески доступны и/или могут быть получены с помощью техник в пределах компетенции специалистов в настоящей области техники.

Вспомогательные вещества также могут быть выбраны отдельно или в комбинации для модификации предусмотренной функции эффективных ингредиентов путем улучшения текучести, или биодоступности, или для контроля или задержки высвобождения активного средства. Конкретные не ограничивающие примеры вспомогательных веществ включают в себя следующее: SPAN 80, TWEEN 80, BRIJ 35, BRIJ 98, PLURONICS, SUCROESTER 7, SUCROESTER II, SUCROESTER 15, лаурилсульфат натрия, олеиновая кислота, лаурет-9, лаурет-8, лауриновая кислота, витамин E, TPGS, GELUCIRE 50/13, GELUCIRE 53/1 0, LABRAFIL, дипальмитоилфосфатидилхолин, гликолевая кислота и соли, дезоксиколовая кислота и соли, фузидат натрия, циклодекстрины, полиэтиленгликоли, лабразол, поливиниловый спирт, поливинилпирролидоны, тилоксапол, производные целлюлозы, полиэтоксилированные производные касторового масла, их комбинации и подобное.

Примеры подходящих увлажняющих средства включают в себя без ограничения следующее: полиолы и производные полиолов, включая в себя глицерол, диглицерол, триглицерол, этиленгликоль, пропиленгликоль, бутиленгликоль, пентиленгликоль (иногда в настоящем документе имеющий название 1,2-пентандиол), изопренгликоль (1,4-пентандиол), 1,5-пентандиол, гексиленгликоль, эритритол, 1,2,6-гексантириол, такие полиэтиленгликоли ("PEG"), как PEG-4, PEG-6, PEG-7, PEG-8, PEG-9, PEG-10, PEG-12, PEG-14, PEG-I 6, PEG-18, PEG-20 и их комбинации, сахара и производные сахаров (включая в себя, среди прочего, фруктозу, глюкозу, мальтозу, мальтит, маннит, инозит, сорбит, сорбитилсиландиол, сахарозу, трегалозу, ксилозу, ксилит, глюкуроновую кислоту и их соли), этоксилированный сорбит (Sorbeth-6, Sorbeth-20, Sorbeth-30, Sorbeth-40), их комбинации и подобное. Согласно другим вариантам осуществления такие гликоли, как бутиленгликоль, 1,2-пентандиол, глицерин, 1,5-пентандиол, их комбинации и подобное, могут использоваться в качестве увлажняющего средства. Если оно используется, любое из вышеупомянутых увлажняющих средств, включая их комбинации, может присутствовать в количествах от приблизительно 0,1% по массе до приблизительно 20% по массе второй дисперсии, согласно вариантам осуществления от приблизительно 1% по массе до приблизительно 5% по массе второй дисперсии.

Согласно некоторым вариантам осуществления такой консервант, как феноксиэтанол, и такое увлажняющее средство, как пропиленгликоль, могут оба быть включены в состав. Пропиленгликоль может обеспечивать активность увлажняющего средства и способствовать консервации концентрата при комбинации с феноксиэтанолом. Смесь феноксиэтанола и пропиленгликоля может быть растворимой в воде и нелетучей. Настоящий вариант осуществления отличается от применения этанола для консервации, который часто используется поставщиками липосомных дисперсий. Если они имеют место, то такие консерванты могут присутствовать в количествах от приблизительно 0,01% по массе до приблизительно 3% по массе состава.

Согласно определенным вариантам осуществления может включаться стабилизирующее дисперсию средство. Примеры стабилизирующих дисперсию средств включают в себя полиэтоксилированное (также известное как пегилированное) касторовое масло (Cremophor® EL), полиэтоксилированное гидрогенизированное касторовое масло (Cremophor® RH 40), токоферолполиэтиленгликольсукцинат (пегилированный витамин E, витамин E TPGS), полисорбаты (Tweens®), эфиры сорбита и жирных кислот (Spans®), желчные кислоты и соли желчных кислот и DMPC.

Определенные варианты осуществления могут не включать снижающие опсонизацию средства (например, снижающие опсонизацию средства, которые могут влиять на аэрозольное распыление). Например, композиция может специально исключать такой блок-полимер полиоксиэтилена и полиоксипропилена, как полксамер (например, полксимер 188), плуроник, лутрол и супероник. Согласно другому примеру композиция может специально исключать полиэтиленгликоль (PEG) с различной длиной цепи, полисахариды, другие содержащие PEG сополимеры, полксамины и подобное. Альтернативно составы согласно настоящему изобретению могут включать в себя один или несколько усилителей опсонизации в количестве или такого типа (например, подходящий HLB), который по существу не влияет на аэрозольное распыление, например, если количество усилителя опсонизации придает иным образом желательное свойство составу. Согласно одному варианту осуществления композиция включает в себя блок-полимер полиоксипропилена и полиоксиэтилена в количестве 0,001-5% по массе общей композиции. Согласно другому варианту осуществления состав включает в себя относительно небольшое количество одного или нескольких гидрофильных полимеров для улучшения стабильности и увеличения ТАО наряду с поддержанием эффективного и непрерывного аэрозольного распыления.

Составы могут включать в себя легочные сурфактанты и/или муколитические средства. Подходящие легочные сурфактанты включают в себя без ограничения препараты легочных сурфактантов, характеризующиеся функцией естественного легочного сурфактанта. Они могут включать в себя как естест-

венные, так и синтетические легочные сурфактанты. Согласно различным вариантам осуществления могут использоваться композиции, которые содержат фосфолипиды и/или легочные поверхностно-активные белки.

Иллюстративные фосфолипиды, которые могут использоваться в качестве легочных сурфактантов, включают в себя дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), пальмитоилолеилфосфатидилглицерол (POPG) и/или фосфатидилглицерол (PG). Другие подходящие фосфолипиды включают в себя смеси различных фосфолипидов, например смеси дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC) и пальмитоилолеилфосфатидилглицерола (POPG) в соотношении, составляющем от приблизительно 7:приблизительно 3 до приблизительно 3:приблизительно 7.

Коммерческие продукты, которые могут использоваться в качестве легочных сурфактантов, включают в себя CUROSURF® (INN: PORACTANT ALFA) (Serono, Pharma GmbH, Унтершляйсхайм), естественный сурфактант из гомогенизированных легких свиньи; SURVANTA® (INN: BERACTANT) (Abbott GmbH, Висбаден), экстракт легких коровы; ALVEOFACT® (INN: BOVACTANT) (Boehringer Ingelheim), экстракт легких коровы; EXOSURF® (INN: COLFOSCERIL PALMITATE) (GlaxoSmithKline), содержащий синтетический фосфолипид вспомогательные вещества; SURFACTEN® (INN: СУРФАКТАНТ-ТА) (Mitsubishi Pharma Corporation), легочный сурфактант, экстрагированный из легких коровы; INFASURF® (INN: CALFACTANT) (Forest Pharmaceuticals), сурфактант, экстрагированный из легких теленка; ALEC® (INN: PUMACTANT) (Britannia Pharmaceuticals), искусственный сурфактант DPPC и PO; и BLES® (BLES Biochemical Inc.), сурфактант из липидного экстракта коровы.

Подходящие легочные поверхностно-активные белки включают в себя как белки, полученные из таких естественных источников, как легочный лаваж или экстракция из амниотической жидкости, так и белки, полученные с помощью генной инженерии или химического синтеза. Легочные поверхностно-активные белки, обозначенные SP-B (поверхностно-активный белок-B) и SP-C (поверхностно-активный белок-C), и их модифицированные производные, включая в себя рекомбинантные формы белков, могут использоваться согласно некоторым вариантам осуществления.

Подходящие муколитические средства включают в себя без ограничения гвайфенезин, йодированный глицерол, глицерилгваяколат, терпин гидрат, хлорид аммония, N-ацетилцистеин, бромгексин, амброксол, йодид, их фармацевтически приемлемые соли и их комбинации.

Согласно некоторым вариантам осуществления количество используемых в композиции согласно настоящему раскрытию консервантов, включающих в себя липофильное биоактивное средство в липосомах, также может быть снижено путем включения дополнительных добавок. Например, количество консервантов в композиции согласно настоящему раскрытию может быть снижено путем добавления многофункциональных доиолов, включающих в себя без ограничения 1,2-пентандиол, 1,4-пентандиол, гексиленгликоль, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, глицерол или диглицерол, их комбинации и подобное, и путем снижения водной активности, A_w , посредством добавления вышеизложенных увлажняющих средств и посредством добавления растворимых ингредиентов. Другие примеры включают в себя растворимые ингредиенты, такие как регулирующие pH и буферные средства, регулирующие точность средства, смачивающие средства и подобное, например ацетат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, сорбитанмонолаурат, триэтаноламинолеат и подобное. Другие буферы, которые могут быть добавлены, включают в себя гидроксид натрия, гидроксид калия, гидроксид аммония, моноэтанолламин, диэтанолламин, триэтанолламин, диизопропаноламин, аминотетрапропанол, трометамин, тетрагидроксипропилэтилендиамин, лимонную кислоту, уксусную кислоту, молочную кислоту и соли молочной кислоты, включающие в себя лактат натрия, лактат калия, лактат лития, лактат кальция, лактат магния, лактат бария, лактат алюминия, лактат цинка, цитрат натрия, ацетат натрия, лактат серебра, лактат меди, лактат железа, лактат марганца, лактат аммония, их комбинации и подобное.

Согласно некоторым вариантам осуществления сольubilизация такого липофильного биоактивного средства, как CoQ10, в материале, который характеризуется как липофильными, так и гидрофильными свойствами, может содействовать образованию липосомного состава путем формирования диспергируемого в воде CoQ10 для инкапсулирования с помощью лецитина с высоким содержанием фосфатидилхолина, такого как PHOSPHOLIPON® 85G.

Подходящие сольubilизирующие средства для липофильного биоактивного средства включают в себя, например, декстраны полиоксиалкилена, сложные эфиры жирных кислоты и сахарозы, простые эфиры жирных спиртов и олигоглюкозидов (например, такие алкилполиглюкозиды, как TRITON™), сложные эфиры жирных кислот и глицерола (например, глицеролмоно/дистеарат или глицеролмонолаурат) и соединения типа полиоксиэтилена (например, полиоксиэтилен, полиэтиленгликоль, полиэтиленоксид, SOLUTOL™ CREOMOPHOR™, MACROGOL™, CARBOWAX™, POLYOXYL™). Подходящие сольubilизаторы также включают в себя полиэтоксильированные сложные эфиры жирных кислот и сорбитана (например, такие полисорбаты, как TWEEN™, SPAN™, включая в себя полисорбат 20 и полисорбат 80), сложные эфиры жирных кислот и поли(этиленоксида) (например, полиоксиэтиленстеараты), простые эфиры жирных спиртов и поли(этиленоксида) (например, полиоксиэтилированный лариловый эфир, олеиловый эфир полиоксиэтилена-20 (BRIJ 98)), алкилфеноловые простые эфиры поли(этиленоксида) (на-

пример, полиэтоксилированный октилфенол), блок-сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена (также известные как полосамеры, такие как "плюроники", включая в себя плюроник F-127, стабилизатор полосамер 407) и этоксилированные жиры и масла (например, этоксилированное касторовое масло или полиоксиэтилированное касторовое масло, также известное как полиэтиленгликоль-глицерилтририцинолеат), а также их комбинации.

Согласно некоторым вариантам осуществления подходящие солюбилизующие средства включают в себя полисорбаты, например, которые продаются под торговым названием TWEEN™. Примеры таких полисорбатов включают в себя полисорбат 80 (TWEEN™ 80), полисорбат 20 (TWEEN™ 20), полисорбат 60 (TWEEN™ 60), полисорбат 65 (TWEEN™ 65), полисорбат 85 (TWEEN™ 85) и подобное, а также комбинации, включающие в себя эти материалы с другими аналогичными сурфактантами, включающими в себя сурфактанты ARLACEL®, при условии, что HLB (гидрофильно-липофильный баланс) сурфактанта и смеси сурфактанта содействует в образовании эмульсионной системы типа масло в воде.

Согласно некоторым вариантам осуществления активное(ые) средство(а) может(могут) находиться в растворе с одним или несколькими органическими растворителями или их комбинацией. Органические растворители могут быть смешивающимися с водой или не смешивающимися с водой. Подходящие органические растворители включают в себя без ограничения этанол, метанол, тетрагидрофуран, ацетонитрил, ацетон, трет-бутиловый спирт, диметилсульфоксид, N,N-диметилформамид, диэтиловый эфир, метилхлорид, этилацетат, изопропилацетат, бутилацетат, пропилацетат, толуол, гексан, гептан, пентан, 1,3-диоксолан, изопропанол, n-пропанол, пропиональдегид, их комбинации и подобное.

Способы получения.

Способы получения ингаляционных фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению включают

- (i) гидратирование фосфолипида с образованием таким образом гидратированного фосфолипида;
- (ii) смешивание гидратированного фосфолипида, гидрофобного биоактивного средства и носителя водной дисперсии с получением таким образом смеси; и
- (iii) гомогенизацию смеси с получением таким образом дисперсии липосомных частиц, содержащей фосфолипид и гидрофобное биоактивное средство, диспергированные в носителе водной дисперсии, и характеризующейся средним диаметром, составляющим приблизительно 30-500 нм.

Соотношение гидрофобного биоактивного средства к фосфолипиду составляет от приблизительно 5:1 до приблизительно 1:5, гидрофобное биоактивное средство составляет приблизительно 0,1-30 мас.% композиции и фосфолипид составляет приблизительно 0,1-30 мас.% композиции. Как результат конкретного состава и способа получения композиция характеризуется преимущественными свойствами, например средней процентной передачей (АРТ), составляющей приблизительно 50-100% при непрерывном аэрозольном распылении. Альтернативно композиция может характеризоваться другими фармакокинетическими свойствами, такими как то, что при непрерывном аэрозольном распылении композиция способна достигать концентрации биоактивного средства, составляющей по меньшей мере приблизительно 500 мкг/г сырой ткани легкого или общей выпущенной дозы (TED), составляющей по меньшей мере приблизительно 2900 мкг в течение 15 с.

Несмотря на то что конкретные варианты осуществления обсуждаются в настоящем документе, дисперсии и аэрозоли согласно настоящему изобретению могут быть получены с использованием различных техник в пределах компетенции специалистов в настоящей области техники. Такие способы включают способы быстрого замораживания, способы преципитации, эмульсионные способы и способы гомогенизации под высоким давлением, например, описанные в международной патентной заявке PCT/US2008/085669, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Водные дисперсии согласно настоящему изобретению могут быть получены с использованием любого подходящего способа (например, микрофлюидизации), такого как описанный в заявках на патенты США № 61/313605, 61/313632, 61/385194 и 61/385107, полное содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Перед смешиванием и гомогенизацией может быть полезным применить солюбилизатор и/или нагревание для содействия солюбилизации липофильного биоактивного средства. Температура нагревания и время нагревания могут зависеть от конкретного липофильного биоактивного средства, собственной термической стабильности биоактивного средства и используемого солюбилизатора. Например, согласно некоторым вариантам осуществления липофильное биоактивное средство и солюбилизатор могут быть нагреты до температуры приблизительно от 40°C до приблизительно 65°C, или от приблизительно 50°C до приблизительно 60°C, или от приблизительно 50°C до приблизительно 55°C в течение периода времени от приблизительно 1 мин до приблизительно 60 мин, или от приблизительно 15 мин до приблизительно 45 мин, или от приблизительно 20 мин до приблизительно 30 мин. Массовое соотношение липофильного биоактивного средства к солюбилизатору может составлять приблизительно 1:1, согласно вариантам осуществления от приблизительно 1:1 до приблизительно 4:2, согласно другим вариантам осуществления от приблизительно 1:2 до приблизительно 3:2.

Например, такой солюбилизатор, как полисорбат 80 может быть способен растворить липофильное

биоактивное средство согласно вариантам осуществления CoQ10 на высоких уровнях, причем липофильное биоактивное средство полностью растворяется в солюбилизаторе в соотношении от приблизительно 1:2 до приблизительно 3:2 при нагревании до температуры от приблизительно 50°C до приблизительно 55°C, температуры, которая превосходит температуру плавления CoQ10 (которая составляет от приблизительно 47°C до приблизительно 48°C).

Как указано выше, количество солюбилизатора, добавленного к липофильному биоактивному средству, может зависеть от солюбилизатора, липофильного биоактивного средства и используемых для образования липосом фосфолипидов. Согласно некоторым вариантам осуществления солюбилизатор может присутствовать в количестве приблизительно 0,2-12% по массе или приблизительно 1,5-6,5% по массе.

Раствор липофильного биоактивного средства и солюбилизатора может затем комбинироваться с фосфолипидом (например, для образования липосом), из которых, в свою очередь, образуется дисперсия с носителем водной дисперсии. Для получения дисперсии фосфолипиды и носитель водной дисперсии могут смешивать вместе и нагревать приблизительно до 50-60°C, например 55°C, в течение приблизительно 1-24 ч или в течение приблизительно 1-8 ч, например приблизительно 1 ч.

Подходящие способы быстрого замораживания для образования аэрозольных в виде аэрозоля частиц включают те, которые в настоящем документе называются замораживанием орошением в жидкость (SFL), как описано в патенте США № 6862890, полное раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки, и сверхбыстрым замораживанием (URF), как описано в публикации патентной заявки США № 2004/0137070, полное раскрытие которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам осуществления подходящий способ SFL может включать смешивание активного средства со средством раствора и распыление смеси эффективного ингредиента со средством раствора через изолирующее сопло, расположенное на уровне или ниже уровня криогенной жидкости так, чтобы спрей создавал замороженные частицы. Согласно некоторым вариантам осуществления подходящий способ URF может включать контакт раствора, включающего в себя активное средство и по меньшей мере один замораживаемый органический растворитель, с холодной поверхностью так, чтобы заморозить раствор, и удаление органического растворителя.

Подходящие способы преципитации для образования аэрозольных частиц включают те, которые в настоящем документе называются испарительной преципитацией в водный раствор (EPAS), как описано в патенте США № 6756062, полное раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки, и контролируемой преципитацией (CP), как описано в публикации патентной заявки США № 2003/0049323, полное раскрытие которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам осуществления подходящий способ EPAS может включать растворение лекарственного средства или другого активного средства по меньшей мере в одном органическом растворителе для образования смеси лекарственного средства с органическим растворителем, распыление смеси лекарственного средства с органическим растворителем в водный раствор наряду с одновременным выпариванием органического растворителя в присутствии водного раствора для образования водной дисперсии частиц лекарственного средства. Согласно некоторым вариантам осуществления подходящий способ CP может включать рециркуляцию антирастворителя через зону смешивания, растворение лекарственного средства или другого активного средства в растворителе для образования раствора, добавление раствора в зону смешивания для образования суспензии частиц в антирастворителе и рециркуляцию по меньшей мере части суспензии частиц обратно через зону смешивания.

Подходящие эмульсионные способы для получения аэрозольных частиц включают те, которые в настоящем документе называются HIPE (эмульсии с высоким содержанием дисперсной фазы), как описано в патентах США № 5539021 и 5688842, полные раскрытия каждого из которых включены в настоящий документ посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам осуществления подходящий способ HIPE может включать непрерывное объединение в диспергирующем устройстве в присутствии эмульгирующего и стабилизирующего количества сурфактанта, жидкого потока непрерывной фазы, характеризующегося объемной скоростью потока R1, и жидкого потока дисперсной фазы, характеризующегося объемной скоростью потока R2, и смешивание объединенных потоков с достаточным количеством сдвигающего усилия с достаточно постоянным соотношением R2:R1 для образования эмульсии с высоким соотношением дисперсной фазы без инверсии фаз или поэтапного распределения дисперсной фазы в диспергирующую фазу.

Подходящие способы гомогенизации под высоким давлением для образования аэрозольных частиц включают те, в которых используется гомогенизатор и микрофлюидизатор, например, как описано в патентных заявках США № 61/313605, 61/313632, 61/385194 и 61/385107.

Вышеописанные способы могут производить частицы и аэрозольные частицы, которые являются кристаллическими или аморфными по морфологии. Преимущественно ни один из описанных способов не требует механического помолла или других аналогичных однократных операций, которые могут вызывать тепловое разложение активного средства.

Один или несколько из компонентов составов (например, гидрофобное биоактивное средство, фосфолипид и/или носитель водной дисперсии) могут быть гомогенизированы путем смешивания при высо-

ком сдвигающем усилии для образования липосомного концентрата с использованием гомогенизаторов, мешалок, смесителей и аналогичных устройств в пределах компетенции специалистов в настоящей области техники. Согласно некоторым вариантам осуществления коммерчески доступные гомогенизаторы, включая гомогенизатор Ultra-Turrax TP 18/10 или аналогичные типы статорно-роторных гомогенизаторов, изготовленных Gifford-Wood, Frain, IKA и другими производителями, а также многоступенчатые гомогенизаторы, коллоидные дробилки, сонолаторы или другие типы гомогенизаторов, могут использоваться для получения субмикронных липосомных дисперсий липофильного биоактивного средства. Описанные выше гомогенизаторы статорно-роторного типа характеризуются рабочим диапазоном от приблизительно 100 об/мин до приблизительно 15000 об/мин и могут быть укомплектованы с диапазоном приемных сит с низким сдвигающим усилием, стандартным сдвигающим усилием и высоким сдвигающим усилием.

Гомогенизация может быть проведена путем смешивания двух фаз при подходящих скоростях, составляющих, например, от приблизительно 5000 об/мин до приблизительно 15000 об/мин, согласно некоторым вариантам осуществления приблизительно 5000, 7500, 10000, 12500 или 15000 об/мин и/или значение или диапазон между ними. Скорость сдвига гомогенизатора также может быть увеличена или уменьшена независимо от скорости гомогенизирующего вала путем увеличения или снижения размера технологического сита, окружающего головку гомогенизатора.

Согласно некоторым вариантам осуществления липосомы могут быть получены с помощью как стандартного сита для эмульгирования, так и сита с высоким сдвигающим усилием, поставляемых в комплекте с гомогенизатором Silverson L4RT. Смешивание может происходить в течение подходящего периода времени, составляющего менее чем приблизительно 90 мин, согласно вариантам осуществления от приблизительно 2 мин до приблизительно 60 мин, согласно вариантам осуществления от приблизительно 5 мин до приблизительно 45 мин. Согласно одному варианту осуществления смешивание может происходить в течение почти до 5 мин. Полученные липосомы могут характеризоваться размером частиц, составляющим от приблизительно 30 нм до приблизительно 500 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 200 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 150 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 100 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 75 нм, от приблизительно 75 нм до приблизительно 100 нм, от приблизительно 100 нм до приблизительно 150 нм.

Согласно вариантам осуществления перемешиваемые компоненты могут быть нагреты до температуры от приблизительно 45°C до приблизительно 65°C, согласно вариантам осуществления от приблизительно 50°C до приблизительно 55°C, и смешаны путем гомогенизации с высоким сдвигающим усилием при скоростях и в течение периодов времени, описанных выше для образования субмикронных липосом CoQ10. Если липофильное биоактивное средство представляет собой CoQ10, то температура обработки для фазы CoQ10, водно-фосфолипидной фазы и комбинированных фаз не должна превышать приблизительно 65°C, чтобы избежать окислительного разложения CoQ10. Тем не менее обработка смеси при температуре от приблизительно 50°C до приблизительно 60°C может быть необходима для получения необходимой вязкости концентрата, составляющей от приблизительно 5000 сП до приблизительно 100000 сП, согласно вариантам осуществления от приблизительно 15000 сП до приблизительно 40000 сП при от приблизительно 35°C до приблизительно 45°C. Согласно некоторым вариантам осуществления обработка в течение длительных периодов, например в течение до приблизительно 60 мин при указанных выше скоростях в пределах этого температурного диапазона, не должна неблагоприятно влиять на целостность полученных липосом.

Размер частиц дисперсии липофильного биоактивного средства может быть снижен с использованием таких механических устройств, как, например, помол, применение ультразвуковой энергии, образование характерных для коллоидных систем капель в системе распыления или путем сдвига частиц в жидкости, текущей при высокой вязкости в ограниченном канале. Значительное количество энергии может быть необходимо для расщепления частиц большого размера. Меньшие частицы увеличивают площадь поверхности раздела фаз активного средства. Согласно некоторым вариантам осуществления сурфактанты применяют для снижения энергии поверхности раздела фаз, таким образом стабилизируя дисперсию. Размер частиц определяет общую площадь поверхности раздела фаз и, таким образом, энергию поверхности раздела фаз, которая должна быть адаптирована для достижения стабильной системы. Если размер частиц снижается, то увеличение энергии требуется для получения частицы, и поскольку общая площадь поверхности увеличивается, то сурфактант должен допускать большую энергию поверхности раздела фаз.

Согласно предпочтительному варианту осуществления размер частиц дисперсии биоактивных средств снижается путем использования микрофлюидизатора. Согласно некоторым вариантам осуществления в снижении размера частиц дисперсии для смеси CoQ10 может быть необходимо прохождение через несколько циклов в микрофлюидизаторе для получения необходимого размера частиц. Например, фосфолипидная дисперсия биоактивного средства (например, CoQ10) согласно настоящему изобретению может проходить через по меньшей мере 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 или несколько циклов в микрофлюидизаторе. Предпочтительно, чтобы фосфолипидная дисперсия биоактивного средства (например, CoQ10) прошла через достаточное число циклов в микрофлюидизаторе для получения предпоч-

ительного размера частиц, например размера частиц, подходящего для интраназальной доставки, например, через небулайзер.

Подходящие микрофлюидизаторы для применения согласно настоящему изобретению включают в себя, например, M110P, который доступен от Microfluidics, Inc. (MFI). M110P характеризуется 75-мкм каналом и камерой взаимодействия F12Y. При использовании в производстве M3 микрофлюидизатор характеризуется давлением на входе, составляющим 25000 фунт/дюйм². Другие многочисленные микрофлюидизаторы являются распространенными и известными в настоящей области техники и рассматриваются как подходящие для применения в способах согласно настоящему изобретению. Используемые в настоящем изобретении микрофлюидизаторы могут характеризоваться давлением на входе, составляющим по меньшей мере приблизительно 20000 фунт/дюйм², по меньшей мере приблизительно 25000 фунт/дюйм² и предпочтительно по меньшей мере приблизительно 30000 фунт/дюйм².

Согласно представленным в настоящем документе примерам после минимум 10 циклов через микрофлюидизатор M110P с камерой взаимодействия F12Y с 75-мкм каналом частицы со средним диаметром, составляющим менее чем 160 нм, получали с применением лецитина и частицы, составляющие приблизительно 110 нм, получали с применением DPPC. Специалисту в настоящей области техники будет понятно, что относительные количества липофильного биоактивного средства (например, CoQ10), фосфолипидов (например, лецитина, DPPC или DMPC) и носителя водной дисперсии могут регулироваться на основании таких необходимых свойств, как необходимое терапевтическое применение, аэрозольное распыление, фармакокинетика и/или фармакодинамика. Согласно приведенным в настоящем документе примерам микрофлюидизатор работал при давлении, составляющем приблизительно 30000 фунт/дюйм², хотя другие показатели давления могут быть использованы согласно другим вариантам осуществления.

Аэрозольное распыление.

Способы согласно настоящему изобретению могут включать аэрозольное распыление дисперсии липосомных частиц с образованием таким образом респираторного аэрозоля, содержащего множество капель, причем каждая капля содержит дисперсию липосомных частиц и характеризуется средним массовым аэродинамическим диаметром (MMAD), составляющим приблизительно 1-5 мкм. Тем не менее согласно некоторым вариантам осуществления частицы могут характеризоваться диаметром менее чем 1 мкм и/или более чем 5 мкм.

На фиг. 1А показана схема легочной доставки водной липосомной дисперсии гидрофобного биоактивного средства согласно настоящему изобретению. Лекарственное средство с большим размером частиц вводят в состав в виде стабилизированной фосфолипидной водной дисперсии с малым размером частиц (лекарственного средства), которую распыляют в виде аэрозоля с использованием небулайзера с вибрирующей сеткой-мембраной в виде капель, содержащих мелкие частицы лекарственного средства. С целью определения "частица" обозначает дисперсную фазу водной дисперсии и "капля" обозначает результат появления образованного аэрозоля. Согласно различным вариантам осуществления каждая капля содержит определенное количество частиц лекарственного средства. На фиг. 1В показаны три различных исследуемых производственных способа для получения водной дисперсии с малым размером лекарственного средства. Для целей фиг. 1В фосфолипидную дисперсию, содержащую 6 мас.% лецитина в воде, добавляли к расплавленному CoQ10 (1 мас.%) при 55°C. Состав затем обрабатывали следующим образом:

(1) смешивание с большим сдвигом (гомогенизатор Ultra-Turrax® TP 18/10 с лопастью ротора 8 мм, IKA-Werke, Стауфен, Германия): 100 мл состава перемешивали при 300 об/мин и смешивали с высоким сдвигающим усилием при 10-12 тысячах об/мин в течение 45 мин;

(2) микрофлюидизация (High Pressure Pneumatic Microfluidizer®, Microfluidics, Ньютон, Массачусетс, США): этот процесс работает при наличии двух реактивных потоков в противоположных направлениях; каждый проход представляет один шанс того, что частицы лекарственного средства должны столкнуться друг с другом во время этого процесса, разбиваясь и становясь меньше; состав подвергали предварительному диспергированию с использованием обработки с помощью ультразвукового зонда в течение 2 мин с последующими 30 проходами при приблизительно 13 кфунт/дюйм²; или

(3) обработка ультразвуком (Omni Sonic Ruptor-250® ультразвуковой гомогенизатор с 5/32" (3,9 мм) зондом с микронаконечником, Omni International, Кеннесо, Джорджия, США): при 125 Вт в течение 60 мин; сравнение результатов этих различных методик получения показано на фиг. 5 и обсуждается более подробно ниже.

Получение и доставка аэрозолей согласно настоящему изобретению могут быть достигнуты посредством любого подходящего средства доставки для непрерывной небулизации или водных липосомных дисперсий, включая небулайзеры. Наиболее подходящее средство доставки будет зависеть от подлежащего доставке к легкому активному средству, других компонентов состава, необходимого эффективного количества для этого активного средства и специфических для данного пациента характеристик. С учетом настоящего раскрытия подробности выбора и эксплуатации таких устройств находятся в пределах компетенции специалистов в настоящей области техники.

Согласно различным вариантам осуществления аэрозоли согласно настоящему изобретению могут

быть доставлены с помощью ультразвукового небулайзера, струйного небулайзера, ингалятора мягких аэрозолей, ультразвукового небулайзера с вибрирующей сеткой-мембраной или другого небулайзера, использующего технологию вибрирующей сетки-мембраны. Например, подходящие ультразвуковые небулайзеры включают в себя Omron NE-U17, доступный от Omron Corporation, Япония и Beurer Nebulizer IN30, доступный от Beurer GmbH, Германия. Подходящие струйные небулайзеры включают в себя, например, AquaTower, доступный от A&H Products, Inc., Оклахома. Подходящие небулайзеры мягких аэрозолей включают в себя, например, Respimat Soft Mist, доступный от Boehringer Ingelheim GmbH, Германия. Подходящие небулайзеры с вибрирующей сеткой-мембраной включают в себя, например, Pari eFlow, доступный от Pari Pharma GmbH, Германия, Respironics i-Neb, доступный от Respironics Inc., Питтсбург, Пенсильвания, Omron MicroAir, доступный от Omron Corporation, Япония, Beurer Nebulizer IN50, доступный от Beurer GmbH, Германия, и Aerogen Aeroneb, доступный от Aerogen Ltd., Ирландия. Согласно настоящему изобретению небулайзер выбирают для ингаляционной терапии по сравнению с дозирующими ингаляторами под давлением (pMDI) и порошковыми ингаляторами (DPI) на основании их способности к доставке высоких количеств лекарственных средств путем пассивного дыхания. Следовательно, не предполагается, что пациенты с нарушенной функцией легких (например, пациенты с раком легкого) будут испытывать трудности во время введения лекарственного средства.

Наряду с тем что в настоящем раскрытии более подробно обсуждались ингаляционные составы в зависимости от конкретных подлежащих лечению состояний описанные выше липофильные биоактивные средства могут также быть составлены и введены с помощью других системных и/или локальных путей. Например, аэрозоли могут быть доставлены селективно к одному или нескольким участкам дыхательных путей, рту, трахее, легким, носу, слизистым оболочкам, придаточным пазухам носа или их комбинации. Доставка может обеспечивать одну или несколько из местной, локальной или системной доставки или их комбинации. Альтернативно аэрозоли также могут использоваться для неингаляционной доставки. Композиции согласно настоящему изобретению также могут быть введены в клетку *in vitro* (например, для индукции апоптоза в злокачественной клетке в культуре *in vitro* или для проведения научных, клинических или доклинических экспериментов) путем простого добавления композиций к жидкости, в которой содержится клетка.

Способы лечения.

Композиции согласно настоящему раскрытию могут использоваться для введения липофильных биоактивных средств для лечения любого заболевания или состояния, при котором может наблюдаться положительный результат от применения липофильного биоактивного средства, включая описанные в международной публикации WO № 2005/069916, полное раскрытие которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Способ введения ингаляционной фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению может включать следующие стадии:

(i) аэрозольное распыление дисперсии липосомных частиц с образованием таким образом респираторного аэрозоля, содержащего множество капель, характеризующихся средним массовым аэродинамическим диаметром (MMAD), составляющим приблизительно 1-5 мкм; и

(ii) доставка терапевтически эффективного количества гидрофобного биоактивного средства к легкому нуждающегося в лечении субъекта.

Дополнительно дисперсия липосомных частиц характеризуется средним диаметром, составляющим приблизительно 30-500 нм, причем каждая липосомная частица содержит гидрофобное биоактивное средство и фосфолипид, диспергированные в носителе водной дисперсии. Более того, соотношение гидрофобного биоактивного средства к фосфолипиду составляет от приблизительно 5:1 до приблизительно 1:5, гидрофобное биоактивное средство составляет приблизительно 0,1-30 мас.% композиции и фосфолипид составляет приблизительно 0,1-30 мас.% композиции.

Как результат конкретного состава и способа получения композиция характеризуется преимущественными свойствами, например средней процентной передачей (АРТ), составляющей приблизительно 50-100% при непрерывном аэрозольном распылении. Альтернативно композиция может характеризоваться другими фармакокинетическими свойствами, такими как то, что при непрерывном аэрозольном распылении композиция способна достигать концентрации биоактивного средства, составляющей по меньшей мере приблизительно 600 мкг/г сырой ткани легкого или общей выпущенной дозы (TED), составляющей по меньшей мере приблизительно 2900 мкг в течение 15 с.

Другие фармакокинетические свойства могут включать осажденную массовую долю, количество доставляемого к целевому месту лекарственного средства и/или состава и время удержания в целевом месте. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение может использоваться для депозиции массовой доли, составляющей по меньшей мере приблизительно 1, 5, 10, 15 или 20%. Настоящее изобретение может также использоваться для облегчения доставки свыше 0,25 мкг/г активного средства к нижним отделам легкого. Согласно определенным вариантам осуществления доставка к легкому может составлять по меньшей мере приблизительно 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 100, 200, 300, 400 или 500 мкг/г биоактивного средства в ткани легкого. Более того, составы могут удерживаться в легких (например, "время удержания") в течение периода, составляющего по меньшей мере приблизительно 2, 4, 6,

8, 10, 12, 24 или 48 ч.

Используемые в настоящем документе термины "фармацевтически эффективное количество" и "терапевтически эффективное количество" включают в себя количество или концентрацию биоактивного средства или лекарственного средства, которая производит необходимый фармакологический или терапевтический эффект при введении субъекту-животному, включая человека. Количество активного средства или лекарственного средства, которое включает в себя фармацевтически эффективное количество или терапевтически эффективное количество, может изменяться в соответствии с такими факторами, как тип используемого лекарственного средства, активность конкретного лекарственного средства, путь введения состава, используемая для введения состава система, их комбинации и подобное.

Термины "лечение" или "проведение лечения" в настоящем документе включают любое лечение заболевания у млекопитающего, включая

(i) профилактику заболевания, говоря другими словами, обеспечение препятствия развитию клинических симптомов заболевания;

(ii) ингибирование заболевания, иными словами, прекращение развития клинических симптомов; и/или

(iii) облегчение заболевания, говоря другими словами, обеспечение регрессии клинических симптомов.

Согласно некоторым вариантам осуществления композиции согласно настоящему раскрытию могут быть использованы в лечении злокачественной опухоли. Используемый в настоящем документе термин "злокачественная опухоль" относится ко всем типам злокачественных опухолей или новообразований или злокачественных образований, встречающихся у млекопитающих, включая без ограничения лейкозы, лимфомы, меланомы, карциномы и саркомы. Используемые в настоящем документе термины "злокачественная опухоль", "новообразование" и "опухоль" используются взаимозаменяемо и в форме либо единственного, либо множественного числа, относятся к клеткам, которые подверглись злокачественной трансформации, которая сделала их патологическими для организма-хозяина.

Клетки первичной злокачественной опухоли (иными словами, клетки, полученные из сайта злокачественной трансформации) можно легко отличить от доброкачественных клеток с помощью общепринятых техник, включающих в себя гистологическое исследование. Используемое в настоящем документе определение клетки злокачественной опухоли включает в себя не только клетку первичной злокачественной опухоли, но и любую клетку, полученную из предшественника клетки злокачественной опухоли. Это определение включает в себя клетки давшей метастазы злокачественной опухоли, *in vitro* культуры и клеточные линии, полученные из клеток злокачественной опухоли.

Относительно типа злокачественной опухоли, которая обычно проявляется как солидная опухоль, "клинически выявляемая" опухоль представляет собой опухоль, выявляемую на основании опухолевой массы, например, с помощью таких процедур, как трехмерная компьютерная томография, магнитно-резонансная томография, рентгенографическое, ультразвуковое исследование и пальпация, и/или которая выявляется благодаря экспрессии одного или нескольких специфических для злокачественной опухоли антигенов в полученном от пациента образце.

Примеры злокачественных опухолей включают в себя рак мозга, молочной железы, поджелудочной железы, шейки матки, толстой кишки, головы и шеи, почки, легкого, немелкоклеточный рак легкого, меланому, мезотелиому, рак яичника, саркому, рак желудка, рак матки и медуллобластому.

Выражение "саркома" в общем относится к опухоли, которая состоит из вещества, подобного эмбриональной соединительной ткани и, как правило, состоит из расположенных близко друг к другу клеток, погруженных в фибриллярное или гомогенное вещество. Примеры сарком, которые можно лечить с помощью композиций, содержащих аэрозольные частицы согласно настоящему раскрытию, и необязательно потенцирующего средства и/или химиотерапевтического средства, включают в себя без ограничения следующее: хондросаркома, фибросаркома, лимфосаркома, меланосаркома, миксосаркома, остеосаркома, инфильтрирующая липома, липосаркома, альвеолярная саркома мягких тканей, амелобластосаркома, ботриоидная саркома, гранулоцитарная саркома, хориокарцинома, эмбриональная саркома, аденомиоцитосаркома, саркома эндометрия, стромальная саркома, саркома Юинга, фасциальная саркома, фибробластная саркома, гигантоклеточная саркома, гранулоцитарная саркома, саркома Ходжкина, идиопатическая множественная пигментированная геморрагическая саркома, иммунобластная В-клеточная саркома, лимфома, иммунобластная Т-клеточная саркома, саркома Иенсена, саркома Капоши, саркома из купферовских клеток, ангиосаркома, лейкосаркома, злокачественная мезенхиома, периостальная саркома, ретикулоцитарная саркома, саркома Рауса, цистосаркома, синовиальная саркома и телеангиэктатическая саркома.

Термин "меланома" включает в себя опухоль, возникающую из меланоцитарной системы кожи и других органов. Меланомы, которые можно лечить с помощью композиций, содержащих аэрозольные частицы согласно настоящему раскрытию, включают в себя без ограничения следующее: акральная лентигинозная меланома, амеланотическая меланома, эпителиоидный невус I, меланома Клаудмана, 891 меланома, меланома Гардинга-Пасси, ювенильная меланома, ограниченный предраковый меланоз, злокачественная меланома, узловая меланома, подногтевая меланома и поверхностная распространяющаяся ме-

ланом.

Термин "карцинома" относится к злокачественной опухоли, состоящей из эпителиальных клеток, характеризующихся тенденцией инфильтрировать в окружающие ткани и провоцировать метастазы. Карциномы, которые можно лечить с помощью композиций, содержащих аэрозольные частицы согласно раскрытию, включают в себя без ограничения следующее: ацинарная аденокарцинома, аденокарцинома, аденокистозная карцинома, железисто-кистозная карцинома, аденоматозная карцинома, карцинома коры надпочечников, альвеолярная карцинома, альвеолярно-клеточная карцинома, базальноклеточная карцинома, *carcinoma basocellulare*, базалоидная карцинома, базальная плоскоклеточная карцинома, бронхио-альвеолярная карцинома, бронхиолярная карцинома, бронхогенная карцинома, медуллярная карцинома, холангиоцеллюлярная карцинома, хорионическая карцинома, коллоидная карцинома, комедокарцинома, карцинома тела матки, крибриформная карцинома, *carcinoma en cuirasse*, рак кожи, карцинома цилиндрического типа, карцинома из цилиндрических клеток, протоковая карцинома, карцинома твердая, эмбриональная карцинома, мозговидная карцинома, плоскоклеточная карцинома, *carcinoma epitheliale adenoides*, экзофитная карцинома, *carcinoma ex ulcere*, *carcinoma fibrosum*, слизеобразующая карцинома, перстневидно-клеточная карцинома, гигантоклеточная карцинома, *carcinoma gigantocellulare*, железистый рак, гранулезоклеточная карцинома, базальноклеточный рак, гематоидная карцинома, гепатоклеточная карцинома, карцинома из клеток Гюртле, гиалиновая карцинома, гипернефроидная карцинома, детская эмбриональная карцинома, карцинома *in situ*, внутриэпидермальная карцинома, внутриэпителиальная карцинома, карцинома Кромпешера, карцинома из клеток Кульчицкого, крупноклеточная карцинома, лентиккулярная карцинома, *carcinoma lenticulare*, липоматозная карцинома, лимфоэпителиальная карцинома, *carcinoma medullare*, медуллярная карцинома, меланотическая карцинома, *carcinoma moue*, слизеобразующая карцинома, *carcinoma muciparum*, *carcinoma mucocellulare*, мукоэпидермоидная карцинома, *carcinoma mucosum*, слизистая карцинома, *carcinoma muхомatodes*, носоглоточная карцинома, овсяноклеточная карцинома, *carcinoma ossificans*, остеонидная карцинома, сосочковая карцинома, перипортальная карцинома, преинвазивная карцинома, карцинома из шиповатых клеток, слизеобразующая карцинома, почечно-клеточная карцинома почки, резервногенная карцинома, *carcinoma sarcomatodes*, карцинома слизистой оболочки носовой полости, фиброзная карцинома, *carcinoma scroti*, перстневидно-клеточная карцинома, *carcinoma simplex*, мелкоклеточная карцинома, спиралевидная карцинома, карцинома из сферических клеток, веретенноклеточная карцинома, *carcinoma spongiosum*, сквамозная карцинома, сквамозно-клеточная карцинома, нитевидная карцинома, *carcinoma telangiectaticum*, *carcinoma telangiectodes*, переходноклеточная карцинома, *carcinoma tuberosum*, туберозная карцинома, бородавчатая карцинома и подобное.

Дополнительные злокачественные опухоли, которые можно лечить с помощью композиций, содержащих аэрозольные частицы согласно настоящему раскрытию, включают в себя, например, следующее: болезнь Ходжкина, неходжкинская лимфома, множественная миелома, нейробластома, рак молочной железы, рак яичника, рак легкого, рабдомиосаркома, первичный тромбоцитоз, первичная макроглобулинемия, мелкоклеточные опухоли легкого, первичные опухоли головного мозга, рак желудка, рак толстой кишки, злокачественная инсулинома поджелудочной железы, злокачественный карциноид, рак мочевого пузыря, предраковые повреждения кожи, рак яичка, лимфомы, рак щитовидной железы, нейробластома, рак пищевода, рак мочеполового тракта, злокачественная гиперкальцемия, рак шейки матки, рак эндометрия, рак коры надпочечников и рак предстательной железы.

Несмотря на то что различные злокачественные опухоли обсуждались подробно, композиции и способы согласно настоящему изобретению применимы к другим патологиям дыхательных путей, ротовой полости, носа, придаточных пазух носа и легких, включающих в себя без ограничения следующее: астма, аллергии, хроническое обструктивное заболевание легких, хронический бронхит, острый бронхит, эмфизема, кистозный фиброз, пневмония, туберкулез, отек легких, синдром острой дыхательной недостаточности, пневмокозиоз, интерстициальное заболевание легких, отек легких, эмболия сосудов легких, легочная гипертензия, плевральный выпот, пневмоторакс, мезотелиома, амиотрофический латеральный склероз, тяжелая миастения и заболевание легких.

Примеры

Следующие примеры предусмотрены исключительно в качестве иллюстративных и не предусмотрены для ограничения объема настоящего изобретения.

Пример 1. Разработка и определение характеристик стабилизированных фосфолипидами субмикронных водных дисперсий CoQ10, адаптированных для непрерывной небулизации.

Настоящий пример относится к способам разработки подходящих составов легочной доставки гидрофобных лекарственных средств с использованием CoQ10 в качестве изучения конкретного случая. Вспомогательные вещества (например, фосфолипиды) и устройство для аэрозольного распыления (например, небулайзер с вибрирующей сеткой-мембраной Aeroneb Pro®) выбирали после начального исследования (данные не показаны). Проводили определение исходных характеристик лекарственного средства с большим размером частиц с использованием рентгенодифракционного метода (XRD), дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC), лазерной дифрактометрии (LD) и сканирующей электронной микроскопии (SEM). Смешивание с большим сдвигом, гомогенизацию под высоким давлением или об-

работку ультразвуком затем оценивали как практически осуществимые производственные способы для получения дисперсий CoQ10 с малым размером частиц. После выбора подходящего способа изучали параметры, оказывающие влияние на размер частиц лекарственного средства. С использованием LD и гравиметрического анализа оценивали небулизацию для определения производительности комбинации лекарственное средство - вспомогательные вещества - устройство. Исследуемый порошок CoQ10 являлся кристаллическим с температурой плавления, составляющей приблизительно 51°C, с размером частиц, составляющим 30 мкм. В связи с этим уменьшение размера частиц считалось необходимым для легочной доставки. Было обнаружено, что микрофлюидизация представляет собой подходящий способ получения субмикронных частиц лекарственного средства в водных дисперсиях. Число проходов и тип используемых фосфолипидов (лецитин или дипальмитоилфосфатидилхолин - DPPC) влияли на конечный размер частиц лекарственного средства в дисперсиях. Производительность небулизации стабилизированных лецитином CoQ10 дисперсий изменялась от числа проходов в микрофлюидизаторе. Более того, реология этих дисперсий, вероятно, играет роль в образовании аэрозоля из используемого небулайзера с активной вибрирующей сеткой-мембраной. В заключение водные дисперсии CoQ10 надлежащим образом производили с использованием микрофлюидизатора с характеристиками, которые являлись подходящими для легочной доставки с помощью небулайзера.

Материалы и способы.

Материалы. Кофермент Q10 поставляли от Asahi Kasei Corp. (Токио, Япония). Лецитин (гранулярный, NF) покупали у Spectrum Chemical Mfg. Corp. (Гардена, Калифорния, США). Genzyme Pharmaceuticals (Листаль, Швейцария) поставляли 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DPPC). Хлорид натрия (кристаллический, сертифицированный ACS) приобретали у Fisher Chemical (Fisher Scientific, Фейр-Лоун, Нью-Джерси, США) и деионизированную воду получали из центральной системы обратного осмоса/деминерализатора, обычно встречающейся в исследовательских лабораториях. Диспергирующее средство 1,3-пропандиол (98%) покупали у Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США). Абсолютный этанол (200 proof) USP покупали у Decon Laboratories (Кинг оф Пруссия, Пенсильвания, США).

Определение характеристик частиц больших размеров CoQ10.

Рентгенодифракционный метод (XRD). Исследование проводили с использованием рентгеновского дифрактометра Philips Model 1710 (Philips Electronic Instruments Inc., Мава, Нью-Джерси, США) с первичным монохроматизированным излучением ($\text{CuK}\alpha 1$, $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$), генерирующимся при ускоряющем напряжении 40 кВ и 30 мА. Порошок CoQ10 помещали на столик и образец сканировали для получения дифрактограмм от 5 до 50° с 0,05° интервалами углов 2 θ со временем облучения, составляющим 3 с.

Дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC). Исследование DSC проводили с использованием 2920 Modulated DSC (TA Instruments, Нью-Касл, Делавэр, США) и анализировали с использованием программного обеспечения TA Universal Analysis 2000. Порошок CoQ10 взвешивали (10,5 мг) в алюминиевой чаше (набор 02190041, Perkin-Elmer Instruments, Норволк, Коннектикут, США) и загибали края. При скорости нагревания, составляющей 10°C/мин, поведение образца при термическом воздействии анализировали от 10 до 120°C.

Лазерная дифракция (LD). Порошок CoQ10 с большим размером частиц диспергировали в 20% (об./об.) 1,3-пропандиола в деионизированной воде для анализа распределения по размерам частиц. Этот диспергированный образец затем добавляли в прибор с малой ячейкой в приборе Malvern Mastersizer S® (Malvern Instruments, Ворчестершир, Великобритания), оснащенном 300 мм линзой до достижения 5-10% затемнения. Коэффициенты преломления дисперсной фазы и диспергирующего средства составляли 1,45 и 1,33 соответственно.

Сканирующая электронная микроскопия (SEM): Анализ внешнего вида и оценку размера частиц CoQ10 с большим размером частиц проводили с использованием SEM. Алюминиевый столик с липкой углеродной лентой удерживал образец порошка. Нанесение покрытия проводили на поворотно-орбитально-наклонном предметном столике с помощью платины-иридия с использованием Cressington Sputter Coater 208 HR (Cressington Scientific Instruments, Ватфорд, Англия) в атмосфере азота. Изображения SEM получали с использованием программного обеспечения SmartSEM® графического пользовательского интерфейса в сканирующем электронном микроскопе Carl Zeiss Supra® 40VP (Carl Zeiss AG, Оберкохен, Германия), используемом при рабочем расстоянии 19 мм и при 5 кВ сверхвысокого напряжения (ЕНТ).

Разработка методологии получения.

Три различных производственных способа исследовали в настоящем примере для получения водной дисперсии CoQ10 с малым размером частиц лекарственного средства. Сходные способы могут быть адаптированы для дальнейшей оптимизации составов CoQ10 и для обеспечения составов для других гидрофобных лекарственных средств. Фосфолипидную дисперсию, содержащую 6 мас.% лецитина (в качестве иллюстративного фосфолипида) в воде, добавляли к расплавленному CoQ10 (1 мас.%) при 55°C. Концентрация фосфолипида превышала критическую мицеллярную концентрацию (например, для лецитина в зависимости от источника и способа обработки, СМС варьирует от 1,3 до 5,5 мг/мл). Состав затем обрабатывали следующим образом.

Смешивание с большим сдвигом. 100 мл Состава перемешивали при 300 об/мин и смешивали с высоким сдвигающим усилием при 10000-12000 об/мин в течение 45 мин с использованием гомогенизатора Ultra-Turrax® TP 18/10 с 8 мм лопастью ротора (IKA-Werke, Стауфен, Германия).

Гомогенизация под высоким давлением. Гомогенизацию под высоким давлением обеспечивали с использованием способа микрофлюидизации. Каждый проход представляет возможность для частиц лекарственного средства столкнуться друг с другом, таким образом разбиваясь и становясь меньше. Состав подвергали предварительному диспергированию с использованием ультразвукового зонда в течение 2 мин с последующими 30 проходами приблизительно при 30000 фунт/дюйм² с использованием M-110Y High Pressure Pneumatic Microfluidizer® (Microfluidics, Ньютон, Массачусетс, США).

Обработка ультразвуком. Состав обрабатывали ультразвуком при 125 Вт в течение 60 мин с использованием ультразвукового гомогенизатора Omni Sonic Ruptor-250® с 5/32-дюймовым (3,9 мм) зондом с микронаконечником (Omni International, Кеннесо, Джорджия, США).

Разработка состава.

После выбора способа получения составы получали с помощью гомогенизации под высоким давлением для определения эффекта выбранных параметров и типа фосфолипида на распределение по размерам частиц дисперсии лекарственного средства. Во время предварительных исследований наблюдалось, что при высокой концентрации растворенного вещества составы, содержащие 6 мас.% лецитина, не производили аэрозоль из небулайзера с вибрирующей сеткой-мембраной с микронасосом Aeroneb Pro®. Дополнительные предварительные исследования также показали, что составы, содержащие пониженную концентрацию лецитина (1 мас.% при соотношении лекарственного средства к липиду 1:1), характеризуются определенной достаточной стабильностью для оценки производительности небулизации после получения. Следовательно, снижение концентрации фосфолипида было необходимым наряду с одновременным поддержанием постоянной концентрации CoQ10 в адекватном соотношении лекарственного средства к липиду.

После гидратации фосфолипидную дисперсию, содержащую 1 мас.% фосфолипида (лецитина или DPPC) в воде, добавляли к расплавленному CoQ10 (1 мас.%) при 55°C. Состав затем подвергали предварительному диспергированию с использованием смешивания с большим сдвигом (гомогенизатор Ultra-Turrax® TP 18/10 с 8-мм лопастью ротора, IKA-Werke, Стауфен, Германия) в течение до 5 мин при 20000 об/мин. Впоследствии состав пропускали через M-110P Bench-top Microfluidizer® (Microfluidics, Ньютон, Массачусетс, США) до 100 раз при приблизительно 30000 фунт/дюйм² при поддержании температуры 50-60°C.

В исследовании эффектов, которые оказывают тип фосфолипида и число проходов на распределение по размерам частиц составов, фосфолипидные дисперсии гидратировали в течение приблизительно 1 ч без перемешивания (табл. 1, составы А и В). Составы затем пропускали через микрофлюидизатор 10, 20, 30, 40 и 50 раз при сравнении различных фосфолипидов; 20, 50, 70 и 100 раз при оценке эффекта количества проходов (табл. 9). Для исследований производительности небулизации фосфолипидные дисперсии гидратировали в течение ночи с перемешиванием и добавляли 0,9% мас./об. хлорида натрия к конечному составу (табл. 1, состав С).

Распределения по размерам частиц составов затем анализировали с использованием лазерной дифракции (LD) и/или динамического рассеяния света (DLS). Также оценивали поверхностное натяжение, дзета-потенциал и реологию. Для определения производительности небулизации оценку выхода аэрозоля проводили с использованием LD и гравиметрического анализа.

Определение характеристик составов.

Распределение по размерам частиц. Исследование распределения по размерам частиц диспергированных составов проводили с помощью LD с использованием влажного образца дисперсии при перемешивании при 1000 об/мин, совмещенном с Malvern Spraytec® (Malvern Instruments, Ворчестершир, Великобритания), оснащенном 300-мм линзой. Диспергированные составы добавляли к дистиллированной воде (диспергирующему средству) до достижения приблизительно 5% затемнения лазера. Коэффициенты преломления дисперсной фазы и диспергирующего средства устанавливали как значения 1,45 и 1,33, соответственно. Измерение изменений во времени проводили в течение 45 с с 1-секундными периодами забора образца (в общем 45 измерений). Результаты представлены как Dv(X) и разброс, где X представляет собой суммарный процентиль частиц ниже указанного размера (например, Dv(50) соответствует среднему объему частиц). Разброс представляет собой измерение распределения по размерам частиц, рассчитанный как $[Dv(90)-Dv(10)]/Dv(50)$. Более высокий разброс указывает на более полидисперсное распределение по размерам частиц.

Кроме того, получали характеристики наноразмерного гидродинамического диаметра диспергированных составов с помощью DLS с использованием Malvern Zetasizer Nano S® (Malvern Instruments, Ворчестершир, Великобритания) при 25°C и предварительно уравновешенного в течение 2 мин. Отрезок функции корреляции составлял 0,5-1,0. Дисперсию разбавляли дистиллированной водой.

Поверхностное натяжение. Исследование поверхностного натяжения проводили с использованием анализатора текстуры TA.XT.plus (Texture Technologies, Скарсдейл, Нью-Йорк, США) из максимальной

нагрузки на диск, как описано в выше. Кратко, контейнер и стеклянный дисковый зонд тщательно обезжиривали, очищали с помощью этанола и высушивали. Зонд прикрепляли к плечу анализатора текстуры и погружали до контакта нижней поверхности зонда с поверхностью жидкого состава, содержащегося в резервуаре. Температуру жидкости измеряли и регистрировали. В начале исследования зонд поднимали с поверхности жидкости с постоянной скоростью (0,05 мм/с) на 10 мм, при этом анализатор текстуры регистрировал в 5 точках в с приложенную силу как функцию или времени, или расстояния. С использованием максимальной силы (отрыва) поверхностное натяжение рассчитывали с использованием уравнения 1

$$x/k = 0,0408687 + 6,20312*(x^2/v) - 0,0240752 (x^2/v)^2 \text{ (уравнение 1)}$$

где x представляет собой радиус зонда,

v представляет собой объем, и

k представляет собой менисковый коэффициент.

Принимали, что используемые для расчета поверхностного натяжения значения плотности равны плотности воды при температуре измерения.

Дзета-потенциал. Электрофоретическое рассеяние света применяли для проведения исследования дзета-потенциала с помощью анализатора дзета-потенциала ZetaPlus (Brookhaven Instruments Corp., Холтсвилл, Нью-Йорк, США). Образцы анализировали при постоянной температуре, составляющей 25°C, и постоянном (нейтральном) рН. Образцы разбавляли дистиллированной водой до значений проводимости, составляющих 300-550 мкСм. Каждый образец подвергали 10 испытаниям каждый, с 5-секундным интервалом между измерениями.

Реология. Реологическое поведение диспергированных составов исследовали с использованием реометра AR-G2 (TA Instruments, Нью-Касл, Делавэр, США), оснащенного системой "конус-плита" (диаметр конуса 40 мм; усечение 54 мкм). Перед исследованием проводили определение нулевого зазора и картирование вращения соответственно. Все измерения выполняли с дисперсией свежего образца при постоянной температуре, составляющей 25°C, без предварительного сдвига. Избыточный образец вокруг края зонда снимали и добавляли воду в отделение для стока растворителя. Образцы измеряли на этапе равномерного потока в диапазоне скоростей сдвига (300-10 с⁻¹), снижающихся логарифмически (10 единиц на декаду). Верхнюю границу скорости сдвига определяли гидродинамическими ограничениями (высокая скорость зонда будет вызывать то, что жидкий образец будет выливаться из зоны измерения). Период исследования образца составлял 10 с, и считалось, что он находится в равновесии после 2 последовательных анализов в пределах 5% допустимой погрешности, не превышая максимальной временной точки, составляющей 2 мин. Результаты оценивали с использованием программного обеспечения Rheology Advantage Data Analysis (TA Instruments, Нью-Касл, Делавэр, США).

Производительность небулизации. На основании предыдущего опыта на производительность небулайзеров с вибрирующей сеткой-мембраной может влиять засорение сетки-мембраны, приводящее к перемемному выпуску аэрозоля (например, прерывистый аэрозоль), поскольку этот состав представляет собой дисперсную систему. Для анализа производительности небулизации этих составов мы оцениваем изменения в передаче с течением времени из измерений с помощью техники LD. Производительность небулизации дисперсий оценивали с использованием способа "открытого рабочего стола" с помощью прибора Malvern Spraytec® (Malvern Instruments, Ворчестершир, Великобритания), оснащенного 300-миллиметровой линзой. Резервуар небулайзера устанавливали с мембраной на 25 мм выше верхней границы лазерного пучка и расстоянии 25 мм между линзой и центром аэрозольного облака. Прибор всасывания воздуха устанавливали на 10 см ниже лазерного пучка. Положения устройства и прибора всасывания воздуха сохраняли неподвижными в течение всего периода измерения. Коэффициенты преломления дисперсной фазы и диспергирующего средства составляли 1,33 (вода) и 1,00 (воздух) соответственно. Состав (10 мл) добавляли к резервуару небулайзера. В начале небулизации характеристики аэрозоль непрерывно измеряли каждую секунду в течение 15 мин. Наклон кривых зависимости передачи от времени (диаграммы передачи) учитывали при сравнении различных фосфолипидных составов.

Кроме того, общий выход аэрозоля (ТАО) гравиметрически измеряли для каждого из изучаемых составов. Перед аэрозольным распылением небулайзер взвешивали после того, как каждый состав дозировали в резервуар. Оставшийся состав в резервуаре небулайзера снова взвешивали после проведения 15-минутной небулизации. Разница в массе до и после небулизации дает в результате расчетный ТАО. Массу мундштука небулайзера не учитывали во время измерений.

Важно то, что ни диаграмма передачи, ни ТАО не предоставляют информацию относительно выхода лекарственного средства из небулайзера. Информация ограничена исключительно общим массовым выходом (капли, выпущенные с течением времени). В аэрозольном распылении этих дисперсий потенциально образуются капли, не содержащие частицы лекарственного средства (пустые капли). Тем не менее наша цель в этом исследовании состоит в изучении способности такого небулайзера, как небулайзер Aeroneb Pro®, непрерывно и устойчиво распылять в виде аэрозоля водные дисперсии кофермента Q10 с течением времени. Прерывистый аэрозоль может быть определен в диаграммах передачи наряду с тем, что ТАО выясняет величину общей распыляемой в виде аэрозоля массы. Солевой раствор (12 мл 0,9% мас./об. NaCl в воде) применяли в качестве контроля.

Статистический анализ. Данные выражают как среднее \pm среднеквадратическое отклонение за исключением результатов поверхностного натяжения и дзета-потенциала, которые выражали как среднее \pm среднеквадратическая погрешность. Для исследований реологии среднеквадратические погрешности получали с помощью программного обеспечения, используемого для анализа наилучшего соответствия результатов реологическим моделям. Образцы анализировали по меньшей мере в трех повторностях и оценивали в отношении статистически значимых различий с помощью однофакторного дисперсионного анализа для значимости при $p < 0,05$ с использованием программного обеспечения NCSS/PASS Dawson edition. Апостериорные сравнения проводили для определения статистически значимых различий среди групп с использованием критерия Тьюки-Крамера. Оценку парного t-критерия проводили для анализа статистически значимых различий ($p < 0,05$) в пределах одного состава в отношении стабильности размера частиц лекарственного средства с течением времени и для анализа эффекта различных фосфолипидов, обработанных при одинаковых условиях микрофлюидизации.

Результаты и обсуждение.

Настоящий пример показывает возможность осуществления разработки подходящего состава гидрофобных лекарственных средств (например, CoQ10) для легочной доставки. В частности, пример демонстрирует, как различные физико-химические свойства дисперсий лекарственного средства могут влиять на производительность небулизации. Пример также показывает, как данные о передаче, полученные с помощью LD и гравиметрического анализа выхода небулайзера, могут быть использованы для оценки устойчивого аэрозольного распыления как функции времени.

Дифрактограмма CoQ10 с большим размером частиц показала два пика высокой интенсивности (28) приблизительно при 18,65 и 22,80, указывая на кристаллическую структуру CoQ10 (фиг. 2). Эндотермический пик приблизительно при 51°C в DSC термограмме указывает на низкую температуру плавления этого соединения (фиг. 3). Частицы лекарственного средства CoQ10 являются неподходящими для легочной доставки как частицы с большим размером частиц, с $Dv(50)$, составляющим 29,87 мкм и разбросом значений, составляющим 2,051. Величину размеров частиц также подтверждали с помощью изображений SEM (фиг. 4). Первый подход по снижению размера частиц проводили с помощью измельчения в шаровой мельнице в течение 18 ч, что было безуспешным, поскольку CoQ10 превратился в кластер массы лекарственного средства. Это визуальное наблюдение подтвердили с помощью увеличенного размера частиц ($Dv(50) = 29,87$ мкм, разброс = 2,282). Вследствие низкой температуры плавления CoQ10 как образованное во время способа тепло, так и механическое воздействие могут оба вносить вклад в этот результат. Сходные результаты обнаружили при крипомоле порошка с большим размером частиц (данные не показаны).

Следовательно, требовался альтернативный подход к разработке частиц CoQ10 для легочной доставки. Исследовали смешивание с большим сдвигом, гомогенизацию под высоким давлением и обработку ультразвуком. Показанные на фиг. 5 результаты показывают, что полученные с использованием силы сдвига составы представляли частицы лекарственного средства в дисперсии с почти бимодальным распределением, что подтверждали более высоким значением разброса и $Dv(50)$ приблизительно 1 мкм (табл. 2). Как микрофлюидизация, так и обработка ультразвуком представляли монодисперсное, унимодальное распределение со значением $Dv(50)$ в субмикронном диапазоне, т.е. каждый способ способен дать в результате состав с малым размером частиц лекарственного средства, в различной степени и с различными распределениями размеров.

После выбора способа состав А обрабатывали для определения влияния числа проходов в микрофлюидизаторе на стабильность размера частиц лекарственного средства (табл. 1). Результаты LD показали, что после получения все составы представляли распределение по размерам частиц в субмикронном диапазоне (фиг. 6). Через 7 дней составы представляли частицы большего размера по сравнению с размером сразу после получения, независимо от числа проходов. Результаты DLS показывают, что увеличение числа проходов свыше 50, как оказалось, не обеспечивают меньшие гидродинамические диаметры или более монодисперсные системы (фиг. 7). О локальном минимуме в размере частиц как функции числа проходов сообщалось ранее, и его объясняли вторичным ростом частиц в следствии слияния или Освальдовского созревания во время повторной гомогенизации. Тем не менее не обнаружили никакого статистического различия для размеров частиц лекарственного средства между 0 днем и 7 днем для любого отдельного препарата с любым различным числом проходов.

Снижение числа проходов и оценку различных фосфолипидов исследовали с использованием состава В (табл. 1). Анализ DLS показал, что размер частиц лекарственного средства снижается с увеличенным числом проходов микрофлюидизации (например, до 50 проходов) как для лецитиновых, так и DPPC дисперсий CoQ10 (фиг. 8). DPPC состав представлял меньшие по размеру частицы, чем лецитиновые дисперсии CoQ10 при одинаковых условиях микрофлюидизации (например, число отдельных проходов), с Z-средними значениями в диапазонах 50-120 и 120-170 нм соответственно. Хотя DPPC коллоидная дисперсия представляла меньшие значения PDI, чем стабилизированные лецитином составы, оба представляли высокую полидисперсность ($PDI > 0,2$). Этот результат показывает, что не более чем 50 проходов необходимо для получения составов с малыми размерами частиц; конечная коллоидная система

будет зависеть от используемого фосфолипида.

После того как показали, что можно получить дисперсию с малыми частицами лекарственного средства CoQ10, изучали способность устойчиво распылять эти составы, наряду с физико-химическими свойствами, влияющими на производительность небулизации. Прерывистый аэрозоль, который является нежелательным, может иметь место, когда небулайзеры с вибрирующей сеткой-мембраной образуют аэрозоли из суспендированных лекарственных форм. Следовательно, составы оценивали на отсутствие прерывистого аэрозоля, регистрируя аэрозольное распыление непрерывно в течение всего события небулизации.

В настоящем примере Malvern Spraytec® применяли для анализа передачи как функции времени для выбора диспергированных составов, которые непрерывно распыляются в виде аэрозоля в небулайзере Aeroneb Pro®. Альтернативный способ для оценки изменений в концентрации распыленных капель с течением времени описывают в общей главе <1601> Фармакопеи США (USP) на определение характеристик продуктов небулайзера.

Перед проведением установки Malvern Spraytec® в соответствии со способом "открытого рабочего стола" производили различные попытки для проведения исследований с использованием предоставляемого Malvern вспомогательного устройства - ингаляционной ячейки (фиг. 9). В этой системе лазерный пучок излучается из левой стороны прибора в направлении установленного на правой стороне датчика. Лазерный пучок пересекает ингаляционную ячейку, соединенную с Spraytec®. Небулайзер устанавливается впереди ингаляционной ячейки и вакуумопровод присоединяют сзади ячейки. Воздушная обмотка, обесцененная трубками в середине ячейки, помогает направлять аэрозольные капли из небулайзера к источнику вакуума. Для оценки выхода небулайзера эту установку устанавливали с ингаляционной ячейкой в горизонтальном положении (угол 90°) для измерения создания аэрозоля как можно ближе к вибрирующей сетке-мембране. Скорость потока всасываемого воздуха устанавливали на 30 л/мин и скорость воздушного потока в обмотке устанавливали на 15 л/мин (30-15 л/мин=15 л/мин) для получения конечной скорости воздушного потока, составляющей 15 л/мин. Эту скорость воздушного потока выбирали так, чтобы она совпадала с необходимой для анализа составов для небулайзеров в Next Generation Impactor (NGI) для целей сравнения.

Наблюдали экспериментальный артефакт вследствие нерезультативной воздушной обмотки в Malvern Spraytec®, что вызывало вторжение аэрозольного облака в отделение линзы датчика, вызывая непрерывное увеличение затемнения и, следовательно, снижая передачу. Во время эксплуатации ингаляционной ячейки 0,45 мкм HEPA мембранный фильтр устанавливали на уровне с источником вакуума, чтобы избежать повреждения источника вакуума и предотвратить воздействие на оператора. Тем не менее состав постепенно загрязнял поры фильтра, что создавало противодействие, которое преодолевает воздушную обмотку и направляет капли к камере линзы системы обнаружения. После того как окна ингаляционной ячейки запотевают, значения передачи не возвращаются к 100% и неточные данные представляют возникновение непрерывной работы небулайзера. Следовательно, практически осуществимое измерение с использованием этой установки является невозможным. Не желая быть связанными с какой-либо конкретной теорией, считается, что это происходит вследствие того факта, что количество аэрозоля, производимого во время каждого 15-минутного события небулизации было слишком большим по сравнению с устройствами pMDI и DPI, для которых изначально разработали ингаляционную ячейку. Следовательно, наряду с тем что такие известные вспомогательные устройства применимы в получении характеристик создания аэрозоля из этих других устройств, они не применимы для непрерывных небулайзеров согласно настоящему изобретению.

Для преодоления этого артефакта разработали способ "открытого рабочего стола". Положение резервуара небулайзера выбирали для предотвращения виньетирования (широкоугольный рассеянный свет не попадает в поле датчика) наряду с тем, что также предотвращается рециркуляция капель путем установки источника всасывания воздуха соответствующим образом для непрерывного откачивания созданных капель. Представленные на фиг. 10 диаграммы передачи показывают событие небулизации, составляющее 15 мин для состава С (табл. 1). В конце этого периода значения передачи возвращаются обратно до 100% для всех составов, указывая на то, что измерение провели правильно без запотевания линзы датчика. Три состава представляли устойчивую небулизацию в течение начальных 5 мин. После этой временной точки передача, относящаяся к составу экспериментов с 10 проходами, повышалась при различной скорости по сравнению с составами экспериментов с 30 и 50 проходами. Для оценки производительности небулизации этих составов диаграмму передачи сопоставляли с линейной регрессией для анализа наклонов кривых скорости. Путем сравнения их наклонов можно определить стабильность небулизации.

Значения наклонов и ТАО состава С (табл. 1) с различными количествами проходов в микрофлюидизаторе представлены на фиг. 11. Наблюдали более низкое значение наклона для составов, которые исследовали при 10 проходах, по сравнению с 30 и 50 проходами. Это наблюдение согласуется с относительными значениями ТАО. Эти данные показывают, что состав С (обработанный с 10 проходами в микрофлюидизаторе) представлял более устойчивую небулизацию с течением времени, чем такие же соста-

вы, полученные с помощью увеличенной обработки.

Далее изучали физико-химические свойства состава С, полученного с помощью 10, 30 и 50 проходов, для определения того, как обработка влияет на производительность небулизации. Путем анализа гидродинамического размера в дисперсиях (фиг. 12) мы наблюдали из результатов LD, что размер частиц, как оказалось, слегка увеличивался с течением времени, причем большинство частиц оставалось в нанометрическом диапазоне. При сравнении составов, проанализированных на 0 день в отношении LD и DLS, мы пришли к выводу, что LD не является подходящей техникой по тем же причинам, что описаны ранее, на основании теории Фраунггофера. Результаты DLS показывают, что все составы представляли Z-среднее, составляющее приблизительно 260 нм. Через 7 дней $Dv(50)$ все еще находился ниже диапазона измерения для техники LD, тогда как Z-среднее значительно не изменяется для 30 и 50 проходов. Из результатов распределения по размерам частиц мы можем сделать вывод, что составы с более высоким числом проходов были стабильными в течение приблизительно 1 недели. PdI составлял 0,2-0,3 после получения и показывал тот же уровень полидисперсности через 7 дней.

Результаты показывают, что больший гидродинамический диаметр формировался для этих лецитиновых дисперсий (приблизительно 260 нм), чем формировался с предыдущим проанализированным составом (состав В: 120-170 нм). Эти различия могут объясняться, по меньшей мере частично, различием в концентрациях электролитов в составах. Добавление 0,9% мас./об. хлорида натрия к составу С служит для двух целей: обеспечить нормальную физиологическую осмолярность и снизить вариабельность в образовании аэрозоля из этого небулайзера с активной вибрирующей сеткой-мембраной. Растворы с такими низкими ионными концентрациями характеризуются сниженным фактором вариабельности, увеличенным выходом аэрозоля и меньшими размерами капель. Не желая быть связанным с какой-либо конкретной теорией, считается, что низкое содержание электролитов помогает преодолеть сопротивление отрыву капель от вибрирующей сетки-мембраны вследствие улучшенной электронной проводимости, которая подавляет высокий электростатический заряд воды, что, в свою очередь, способствует образованию аэрозоля.

Тем не менее добавление хлорида натрия может также вызывать коллоидную нестабильность согласно теории Дерягина-Ландау-Фервея-Овербека (DLVO) взаимодействий электролитов на поверхностях фосфолипида. В этом случае неспецифическая адсорбция, основанная исключительно на электростатических силах (без химических взаимодействий), может быть вызвана одновалентными катионами (например, Na^+). Снижение дзета-потенциала, вызванное такими катионами, может увеличивать скорость флокуляции (например, что анализировали с помощью турбидиметрии). Наблюдалось, что добавление вышеупомянутой соли после микрофлюидизации изменяло цвет дисперсии с темно-оранжевого на ярко-желтый. Несмотря на интенсивное обсуждение относительно механизма этой коллоидной стабильности современные теории в науке о коллоидах не способны полностью объяснить это явление. Распределение по размерам частиц лекарственного средства водной дисперсии отдельно, вероятно, не контролирует производительность небулизации, поскольку эти дисперсии характеризовались сходными диаметрами (после получения), но различным поведением аэрозольного распыления.

Увеличение числа проходов микрофлюидизации увеличивает как поверхностное натяжение, так и дзета-потенциал (статистически значимым образом при сравнении с составами, обработанными с помощью 10 или 50 проходов; см. фиг. 13). Предположили, что большее число проходов содействует инкапсулированию. Тем не менее роль поверхностного натяжения в образовании аэрозоля из небулайзеров с активной вибрирующей сеткой-мембраной не полностью понятна. Настоящий пример не определяет корреляцию между дзета-потенциалом и поверхностным натяжением состава С, который коррелирует с различным числом проходов в микрофлюидизаторе и соответствующей производительностью небулизации.

Реологию дисперсий исследовали путем построения графика напряжения сдвига как функции скорости сдвига. Модель Гершеля-Балкли, уравнение 2, наилучшим образом представляла поведение этих трех составов

$$\sigma = \sigma_y + \kappa * \dot{\gamma}^n \text{ (уравнение 2)}$$

где σ представляет собой напряжение сдвига,

σ_y представляет собой предел текучести,

κ представляет собой коэффициент консистенции или вязкость,

$\dot{\gamma}$ представляет собой скорость сдвига, и

n представляет собой коэффициент текучести ($n=1$: ньютоновская жидкость, $n<1$: разжижающаяся при сдвиге, $n>1$: загустевающая при сдвиге).

Среднеквадратические погрешности представляют собой $32,74 \pm 3,58$, $31,62 \pm 2,04$, $35,92 \pm 3,57$ для дисперсий CoQ10, полученных с помощью 10, 30 и 50 проходов микрофлюидизации соответственно. Три элемента модели Гершеля-Балкли представлены на фиг. 14А, 14В. Хотя значения каждого элемента не отличаются статистически по этому показателю, сходство между результатами реологии и результатами производительности небулизации является очевидным. Составы с 30 и 50 проходами представляли сходное реологическое поведение и производительность небулизации, которые отличались от составов с 10

проходами. Интересно, что все составы представляли загустевающее при сдвиге поведение ($n > 1$). Такие характеристики, как размер, распределение по размеру, форма, заряд и взаимодействия между частицами и окружающей жидкостью, играют существенные роли в реологическом поведении этих систем. Следовательно, не удивительно, что реологическое поведение составов влияет на производительность небулизации, что представляет собой функцию взаимодействия всех физико-химических характеристик.

Настоящее изобретение представляет первое известное исследование, изучающее способность небулайзеров с вибрирующей сеткой-мембраной устойчиво распылять дисперсии, в которых реологию жидкости анализировали в отличие от проведения более простых измерений кинематической вязкости (например, вязкость дисперсионных сред *per se*, не учитывая взаимодействия между диспергированными частицами с окружающей жидкостью).

Пример 2. Прогнозирование *in vitro* профилей аэрозольного распыления на основании показателей реологического поведения водных дисперсий CoQ10.

Аэрозольное распыление диспергированных составов может создавать капли, содержащие переменную концентрацию лекарственного средства вследствие гетерогенной природы лекарственной формы. Следовательно, может представляться важным определение характеристики составов для *in vitro* депозиции лекарственного средства, что может быть проведено с помощью каскадных импакторов. С этой целью может также использоваться лазерная дифрактометрия (LD), но применимость LD, как правило, ограничена растворами в качестве лекарственной формы. Негомогенность дисперсий образует капли с гетерогенными концентрациями частиц лекарственного средства, делая LD неподходящей. Для использования в этом исследовании Фармакопея США (USP) рекомендует Next Generation Impactor (NGI).

Альвеолярный сурфактант человека содержит приблизительно 90% фосфолипидов и 10% нейтральных липидов. Среди фосфолипидов фосфатидилхолин (PC) является преобладающим (76%), при этом DPPC представляет собой основной компонент (81% PC) и каждый из димиристоилфосфатидилхолина (DMPC) и дистеароилфосфатидилхолина (DSPC) содержит 3% PC. DPPC и DSPC также присутствуют в смеси фосфолипидов, которая составляет вспомогательное вещество - соевый лецитин, но их концентрация варьирует в широких пределах в зависимости от источника лецитина и способа экстракции.

Настоящий пример относится к способам и данным для выбора составов фосфолипидов согласно настоящему изобретению. Более конкретно настоящий пример также относится к способам и данным для использования синтетических фосфолипидов для получения составов CoQ10, характеризующихся улучшенной производительностью небулизации, которые характеризуются потенциалом доставлять необходимую дозу тонкодисперсных частиц (FPD) CoQ10. В примере изучались три синтетических фосфолипида: DMPC, DPPC и DSPC, которые содержат 14, 16 и 18 атомов углерода в их насыщенных жирнокислотных цепях и характеризуются молекулярной массой, составляющей 678, 734 и 790 г/моль соответственно.

В дополнение к описанным в связи с примером 1 исследованиям дополнительно определяли характеристики составов синтетических фосфолипидов в отношении *in vitro* депозиции лекарственного средства с использованием NGI и общей выпущенной дозы (TED) с использованием как NGI, так и прибора для забора образцов для определения однородности дозы (DUSA) для порошковых ингаляторов (DPI), адаптированного для небулайзеров. Результаты анализируют в связи с исследованиями производительности небулизации для непрерывного аэрозольного распыления и для определения физико-химических свойств, управляющих механизмом образования аэрозоля дисперсных систем CoQ10 из небулайзера с микронасосом. Результаты примера 1 также дополнительно подтверждали путем демонстрации того, что реология дисперсий играет роль в гидродинамике продукции аэрозоля с использованием небулайзера с активной вибрирующей сеткой-мембраной.

Материалы и способы.

Материалы. CoQ10 поставляли от Asahi Kasei Corp. (Токио, Япония). Лецитин (гранулярный, NF) покупали у Spectrum Chemical Mfg. Corp. (Гардена, Калифорния, США). Genzyme Pharmaceuticals (Листаль, Швейцария) поставлял 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DMPC), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DPPC) и 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC). DMPC также покупали у Lipoid GmbH (Людвигсхафен, Германия). Хлорид натрия (кристаллический, сертифицированный ACS) приобретали у Fisher Chemical (Fisher Scientific, Фейр-Лоун, Нью-Джерси, США) и деионизированную воду получали из центральной системы обратного осмоса/деминерализатора. Гексан и абсолютный этанол покупали у Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США) и метанол у Fisher м (Fisher Scientific, Фейр-Лоун, Нью-Джерси, США), все из которых были квалификации для ВЭЖХ. Внешний фильтр для исследования NGI (стекловолокно, GC50, 75 мм) и фильтр для исследования DUSA (стекловолокно, AP40, 47 мм) покупали у Advantec MFS Inc. (Дублин, Калифорния, США) и у Millipore (Биллерика, Массачусетс, США) соответственно. Шприцы (1 мл) и шприцевые фильтры (hyperclean, 17 мм, 0,45 мкм, PTFE) получали от Becton Dickinson (Фрэнклин Лэйкс, Нью-Джерси, США) и Thermo Scientific (Беллфонт, Пенсильвания, США) соответственно.

Состав. Составы (100 мл) получали с использованием горячей гомогенизации под высоким давлением для определения эффекта типа фосфолипида на профиль аэрозольного распыления - производительности небулизации и *in vitro* депозиции лекарственного средства частиц для легочной доставки.

2,5 мас.% Выбирали в качестве максимальной концентрации фосфолипида. Во время предварительных исследований (см. пример 5) было обнаружено, что максимальная номинальная нагрузка лекарственного средства, которая может быть достигнута для CoQ10 с составами, не представляющими прерывистый аэрозоль в пределах 15-минутного события небулизации с использованием небулайзера Aeroneb Pro®, составляла 4 мас.% Следовательно, составы с синтетическими фосфолипидами получали с соотношением лекарственного средства к липиду, составляющем 4:2,5.

После гидратации в течение ночи с перемешиванием фосфолипидную дисперсию, содержащую 2,5 мас.% фосфолипида (DMPC, DPPC или DSPC) в воде добавляли к расплавленному CoQ10 (4 мас.%) при 55°C. Состав затем подвергали предварительному диспергированию с использованием смешивания с большим сдвигом с помощью гомогенизатора Ultra-Turrax® TP 18/10 с 8 мм лопастью ротора (IKA-Werke GmbH, Стауфен, Германия) в течение 5 мин при 20000 об/мин. Впоследствии каждый состав пропускали 50 раз через M-110P Bench-top Microfluidizer® (Microfluidics, Ньютон, Массачусетс, США) при приблизительно 30000 фунт/дюйм² при поддержании температуры от 55 до 65°C. После микрофлюидизации 0,9% мас./об. хлорида натрия добавляли к конечному составу по перечисленным в предыдущем примере причинам.

Распределения по размерам частиц составов затем анализировали с использованием лазерной дифракции (LD) и/или динамического рассеяния света (DLS). Также оценивали поверхностное натяжение, дзета-потенциал и реологию. Для оценки производительности небулизации выход аэрозоля, образованный из небулайзера Aeroneb Pro® (Aerogen, Галвей, Ireland) анализировали с использованием LD и гравиметрического анализа. In vitro депозицию лекарственного средства оценивали с использованием NGI наряду с тем, что TED анализировали и из NGI результатов, и из измерения с использованием прибора для забора образцов для определения однородности дозы (DUSA). Кроме определения характеристик и производительности небулизации, представленных в примере 1, in vitro депозицию лекарственного средства лецитиновой дисперсии CoQ10 (соотношение лекарственного средства к липиду 1:1), пропущенной 50 раз через Microfluidizer® получали и анализировали. Этот показатель оценивали в отношении составов синтетических фосфолипидов (DMPC, DPPC или DSPC дисперсии CoQ10). Подробности получения, определения характеристик и оценки производительности небулизации лецитиновой дисперсии представлены в примере 1. Исследование проводили сразу после получения за исключением стабильности размера частиц лекарственного средства в дисперсиях, в котором образцы исследовали через 7 дней после получения.

Определение характеристик.

Распределение по размерам частиц. Исследование распределения по размерам частиц диспергированных составов проводили с помощью LD с использованием дисперсий влажного образца при перемешивании при 1000 об/мин, совмещенном с Malvern Spraytec® (Malvern Instruments, Ворчестершир, Великобритания), оснащенном 300-миллиметровой линзой. Диспергированные составы добавляли к дистиллированной воде (диспергирующему средству) до достижения приблизительно 5% затемнения лазера. Коэффициенты преломления дисперсной фазы и диспергирующего средства устанавливали как значения 1,45 и 1,33 соответственно. Измерение изменений во времени проводили в течение 45 с с 1-секундными периодами забора образца (в общем 45 периодов получения данных). Результаты представлены как Dv(X) и разброс, где X представляет собой суммарный процентиль частиц ниже установленного размера (например, Dv(50) соответствует среднему объему частиц). Разброс представляет собой измерение распределения по размерам частиц, рассчитанный как $[Dv(90)-Dv(10)]/Dv(50)$. Более высокий разброс указывает на более полидисперсное распределение по размерам частиц.

Кроме того, получали характеристики наноразмерного гидродинамического диаметра диспергированных составов с помощью DLS с использованием Malvern Zetasizer Nano S® (Malvern Instruments, Ворчестершир, Великобритания) при 25°C, предварительно уравновешенного в течение 2 мин. Отрезок функции корреляции составлял 0,5-1,0. Дистиллированную воду применяли для разбавления дисперсий при необходимости.

Поверхностное натяжение. Исследование поверхностного натяжения проводили с использованием анализатора текстуры TA.XT.plus (Texture Technologies, Скарсдейл, Нью-Йорк, США). Контейнер и стеклянный дисковый зонд тщательно обезжиривали, очищали с помощью этанола и высушивали. Зонд прикрепляли к плечу анализатора текстуры и погружали до контакта нижней поверхности зонда с поверхностью жидкого состава, содержащегося в резервуаре. Температуру жидкости измеряли и регистрировали. В начале исследования зонд поднимали с поверхности жидкости с постоянной скоростью (0,05 мм/с) на 10 мм, при этом анализатор текстуры регистрировал в 5 точках в секунду приложенную силу как функцию или времени, или расстояния. С использованием максимальной силы (отрыва) поверхностное натяжение рассчитывали с использованием уравнения 3

$$X/k = 0,0408687 + 6,20312 * (X^2/V) - 0,0240752 * (X^2/V)^2 \text{ (уравнение 3)}$$

где X представляет собой радиус зонда,

V представляет собой объем, и

k представляет собой менисковый коэффициент.

Принимали, что используемые для расчета поверхностного натяжения значения плотности равны плотности воды при температуре измерения.

Дзета-потенциал. Электрофоретическое рассеяние света применяли для проведения исследования дзета-потенциала с помощью Malvern Zetasizer Nano ZS® (Malvern Instruments, Ворчестершир, Великобритания). Образцы анализировали при постоянной температуре, составляющей 25°C, и постоянном (нейтральном) pH. Образцы разбавляли дистиллированной водой, получая значения проводимости в диапазоне от 400 до 1400 мкСм/см. Каждый образец анализировали в трех повторностях и подвергали 10-100 испытаниям для каждого измерения с автоматической оптимизацией коэффициента ослабления и выбором напряжения.

Реология. Реологическое поведение диспергированных составов исследовали с использованием реометра AR-G2 (TA Instruments, Нью-Касл, Делавэр, США), оснащенного системой "конус-плита" (диаметр конуса: 40 мм; усечение: 54 мкм). Определение нулевого зазора и картирование вращения, соответственно, проводили перед исследованием. Все измерения выполняли с дисперсией свежего образца при постоянной температуре, составляющей 25°C, без предварительного сдвига. Избыточный образец вокруг края зонда снимали и добавляли воду в отделение для стока растворителя. Образцы измеряли на этапе равномерного потока в диапазоне скоростей сдвига (от 1000 до 0,01 с⁻¹), снижающихся логарифмически (5 единиц на декаду). Нижнюю и верхнюю границы скорости сдвига определяли, соответственно, с помощью чувствительности прибора к гидродинамическим ограничениям (высокая скорость зонда будет вызывать то, что жидкий образец будет выливаться из зоны измерения) для каждого состава. Период исследования образца составлял 20 с, и считалось, что он находится в равновесии после 2 последовательных анализов в пределах 5% допустимой погрешности, не превышая максимальное время измерения, составляющее 2 минуты. Результаты оценивали с использованием программного обеспечения Rheology Advantage Data Analysis (TA Instruments, Нью-Касл, Делавэр, США).

Производительность небулизации. На производительность небулайзеров с вибрирующей сеткой-мембраной с дисперсными составами может оказывать влияние засорение сетки-мембраны, приводящее к переменному выпуску аэрозоля (например, прерывистый аэрозоль). Для анализа производительности небулизации составов синтетических фосфолипидов изменения в передаче с течением времени оценивали из измерений с помощью техники LD. Производительность небулизации дисперсий оценивали с использованием способа "открытого рабочего стола" с применением Malvern Spraytec® (Malvern Instruments, Ворчестершир, Великобритания), оснащенного 300-миллиметровой линзой. Резервуар небулайзера устанавливали с вибрирующей сеткой-мембраной, расположенной на 25 мм выше верхней границы лазерного пучка на расстоянии 25 мм между линзой и центром аэрозольного облака. Прибор всасывания воздуха устанавливали на 10 см ниже лазерного пучка. Положения устройства и прибора всасывания воздуха сохраняли неподвижными в течение всего периода измерения. Коэффициенты преломления дисперсной фазы и диспергирующего средства составляли 1,33 (вода) и 1,00 (воздух) соответственно. Состав (10 мл) добавляли в резервуар небулайзера. В начале небулизации характеристики аэрозоля непрерывно измеряли каждую секунду в течение 15 мин. Наклон кривых зависимости передачи от времени (диаграммы передачи) учитывали при сравнении различных фосфолипидных составов.

Кроме того, общий выход аэрозоля (ТАО) гравиметрически измеряли для каждого из изучаемых составов. Перед аэрозольным распылением небулайзер взвешивали, после того как каждый состав дозировали в резервуар. Оставшийся состав в резервуаре небулайзера снова взвешивали после проведения 15-минутной небулизации. Разница в массе до и после небулизации дает в результате расчетный ТАО. Массу мундштука небулайзера не учитывали во время измерений.

Важно то, что ни диаграмма передачи, ни ТАО не предоставляют информацию относительно выхода лекарственного средства из небулайзера. Информация ограничена исключительно общим массовым выходом (капли, выпущенные с течением времени). В аэрозольном распылении этих дисперсий потенциально образуются капли, не содержащие частицы лекарственного средства (пустые капли). Прерывистый аэрозоль может быть определен в диаграммах передачи наряду с тем, что ТАО выясняет величину общей распыляемой в виде аэрозоля массы. Солевой раствор (12 мл 0,9% мас./об. NaCl в воде) применяли в качестве контроля.

In vitro аэродинамическая депозиция. Для оценки in vitro депозиции аэрозоля в пределах 15-минутного события небулизации первые и последние 15 с (в настоящем документе имеющие название начальная и конечная части или фазы) образования аэрозоля собирали с использованием NGI или DUSA для DPI (оба от Copley Scientific, Ноттингем, Великобритания). Эта схема помогает в определении того, пересчитывается ли наклон передачи, ранее наблюдаемый для лецитиновых составов и относящийся к ТАО (глава 4, раздел 4.3), в сходный массовый выход лекарственного средства.

Для измерения аэродинамических свойств составов NGI устанавливали со скоростью воздушного потока, составляющего 15 л/мин и лекарственное средство, собранное из впускного отверстия, семи пластин каскадного импактора, коллектора с микроотверстием (МОС) и наружного фильтра, анализировали с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Сумма масс в каждом из вышеупомянутых отделений аппаратного обеспечения NGI обеспечивает TED, измеренный из NGI. Мас-

су, осажденную на каждой пластине, также применяют для определения паттерна депозиции и расчета срединного массового аэродинамического диаметра (MMAD), как описано в Общей главе <601> USP. Этот параметр представляет собой эквивалентный размер капли, при котором половина (50%) капель является большей, а другая половина является меньшей, чем установленный критический диаметр, на основании количества лекарственного средства, осажденного на различных пластинах NGI. Геометрическое стандартное отклонение (GSD) может использоваться для указания распределения размера капель около MMAD. FPD рассчитывали из суммы массы лекарственного средства, осажденной на пластинах импактора 3-7, МОС и наружном фильтре (аэродинамический критический диаметр ниже 5,39 мкм).

Потери могут происходить во время сбора лекарственного средства в анализе NGI вследствие депозиции в мундштуке небулайзера и/или внутренних отделениях между пластинами каскадного импактора. Баланс масс может быть проведен для выяснения степени таких потерь. В ходе предварительных исследований наблюдалось, что 15-минутное образование аэрозоля из дисперсий, полученных с помощью синтетических фосфолипидов, вызывало накопление более высоких количеств состава в мундштуке небулайзера. TED оценивали из адаптированного DUSA для подтверждения того, что приемлемое восстановление масс достигалось во время анализа (фиг. 15). Во время исследования DUSA аэрозоль откладывался прямо на стекловолоконном фильтре, установленном на одном конце DUSA, который был соединен с вакуумным насосом. Мундштук небулайзера устанавливали на противоположном конце и напрямую соединяли с DUSA с использованием силиконового переходника. TED определяли из количества лекарственного средства, собранного в стекловолоконном фильтре и из внутренних стенок DUSA, которое анализировали с использованием полученных с помощью ВЭЖХ данных после прекращения небулизации.

Для дальнейшего анализа дозы FPD результаты экстраполировали из 15-секундных измерений для расчета вычисленного общего доставленного лекарственного средства (вычисленного общего FPD или FPD_{et}) в пределах 15-минутного периода согласно уравнению 4

$$FPD_{et} = \sum_{i=2}^n FPD_{i-1} + \left(\frac{FPD_n - FPD_{(n-1)}}{n-1} \right) \quad (\text{уравнение 4})$$

где i представляет собой целое число, представляющее 15-секундные интервалы (длительность по времени анализов NGI и TED),

значение j представляет собой последующее целое число, меньшее чем i , и

n представляет собой число 15-секундных фракций в пределах 15-минутного периода небулизации ($n=60$).

Дозу тонкодисперсных частиц (FPDr) также рассчитывали на основании FPD_{et}.

Анализ ВЭЖХ CoQ1. Этот способ адаптировали из ранее разработанного способа, представленного в примере 4. ВЭЖХ Waters и систему колонок (Waters Co., Милфорд, Массачусетс, США) соединяли с УФ-датчиком, использовали 1525 бинарный насос, 717 автоматический пробозаборник, датчик 2487 двойного λ поглощения, установленный на 275 нм, и Symmetry® RP-C8 колонку (3,9×150 мм, 5 мкм), соединенную с Symmetry® C8 защитной колонкой (3,9×20 мм, 5 мкм). Подвижная фаза представляла собой метанол:гексан в соотношении 97:3 (об./об.), и ее элюировали при объемной скорости потока, составляющей 1,0 мл/мин. Маточный раствор CoQ10 сначала разводили в смеси гексан:этанол в соотношении 2:1 (об./об.) и затем разбавляли подвижной фазой для получения необходимых концентраций. Диапазон линейности определяли путем впрыскивания 50 мкл образцов при контролируемой температуре, составляющей 40°C. Пики хроматограмм получали в пределах времени испытания 9 мин и области пиков использовали для оценки линейности кривой.

Все образцы собирали из исследования NGI и DUSA с помощью этанола за исключением сбора лекарственного средства из планшетов NGI (пластины 1-7 и МОС) для анализа лецитиновых дисперсий. Вследствие низкой растворимости состава в этаноле использовали смесь гексан:этанол 2:1 об./об. Образцы, собранные в стекловолоконные фильтры (наружный фильтр в NGI и фильтр из DUSA) перемешивали на вортексе в течение 30 с перед фильтрованием с помощью 0,45 мкм шприцевых фильтров. Подвижную фазу применяли для разведения образца.

Статистический анализ. Данные выражают как среднее \pm среднеквадратическое отклонение за исключением поверхностного натяжения, которое выражали как среднее \pm среднеквадратическая погрешность. Для исследований реологии среднеквадратические погрешности получали с помощью программного обеспечения, используемого для анализа наилучшего соответствия результатов реологическим моделям. Образцы анализировали по меньшей мере в трех повторностях и оценивали в отношении статистически значимых различий с помощью однофакторного дисперсионного анализа для значимости при $p < 0,05$ с использованием программного обеспечения NCSS/PASS Dawson edition. Апостериорные сравнения проводили для определения статистически значимых различий среди групп с использованием критерия Тьюки-Крамера. Оценку парного t -критерия проводили для анализа статистически значимых различий ($p < 0,05$) в пределах одного события небулизации для различных составов и для сравнения способов TED.

Результаты и обсуждение.

Синтетические фосфолипиды (DMPC, DPPC и DSPC) использовали для получения составов CoQ10 и сравнивали результаты с лецитиновым составом, проанализированным в примере 1. Поскольку доставка CoQ10 достигается посредством дисперсии, аэрозольное распыление может создавать капли, содержащие отличающиеся количества лекарственного средства. В связи с этим аэродинамические свойства состава анализировали с использованием каскадного импактора на основании количества лекарственного средства, осажденного на каждой пластине прибора NGI. Более того, TED анализировали на основании лекарственного средства, собранного в фильтре, доставленного напрямую из мундштука небулайзера. Производительность небулизации, комбинированная с аэродинамическими свойствами дисперсии, может предоставить основу для сравнения ингаляционного потенциала составов. Эти характеристики также используют для определения физико-химических свойств, способствующих эффективному выпуску лекарственного средства дисперсий лекарственного средства из небулайзера.

Гидродинамический размер в дисперсиях (фиг. 16 и табл. 3) показывает, что размер частиц лекарственного средства лецитинового состава находился преимущественно в субмикронном диапазоне. Составы синтетических фосфолипидов представляли в некоторой степени большие частицы, хотя анализ $Dv(X)$ разброса не представляет статистически значимые различия среди составов (за исключением $Dv(10)$ для DMPC и DSPC дисперсий). Дополнительный анализ распределения по размерам частиц лекарственного средства с использованием DLS показал, что лецитиновые дисперсии представляли большие по размеру наночастицы с более высокой полидисперсностью, чем составы синтетических фосфолипидов (фиг. 17). Среди синтетических фосфолипидов DSPC дисперсия представляла самые большие по размеру наночастицы лекарственного средства наряду с тем, что DMPC состав представлял наиболее монодисперсный профиль. После обработки синтетические фосфолипиды представляли несколько микрочастиц, хотя популяция частиц в нанометрической шкале была, главным образом, меньше, чем частицы лекарственного средства, которые получали из лецитиновых дисперсий CoQ10.

Дзета-потенциал лецитиновой дисперсии был существенно выше, чем таковой у дисперсий синтетических фосфолипидов (фиг. 18). Без связи с какой-либо конкретной теорией смесь различных фосфолипидов при различных концентрациях в зависимости от источника и способа экстракции для лецитина может привести к переменным значениям дзета-потенциала. Значения дзета-потенциала синтетических фосфолипидов могут определяться присутствием хлорида натрия в составах, поскольку повышения ионной силы при нейтральном pH может повышать дзета-потенциал таких отрицательно заряженных фосфолипидов, как DMPC, DPPC и DSPC.

Увеличение количества проходов микрофлюидизатора может вызывать снижение поверхностного натяжения (например, вероятно, вследствие более результативного инкапсулирования). Для композиций синтетических фосфолипидов наблюдалось увеличение поверхностного натяжения, что сопровождалось увеличением числа атомов углерода в ацильных цепях фосфолипида. Составы разрабатывали так, чтобы они содержали одинаковое количество DMPC, DPPC и DSPC, составляющее 2,5 мас.% Тем не менее молекулярная масса слегка варьировала вследствие различного числа атомов углерода в каждой соответствующей ацильной цепи. Молекулярные концентрации фосфолипидов в дисперсиях составляли 36,9, 34,1 и 31,6 мМ соответственно. Структура фосфолипидов в водных дисперсиях зависела напрямую от числа фосфолипидных молекул. Следовательно, без связи с какой-либо конкретной теорией полагают, что число фосфолипидных молекул, доступных в "растворе", чтобы вызывать снижение поверхностного натяжения при постоянной температуре, может объяснять различия в значении поверхностного натяжения. Следует отметить, что поверхностное натяжение дисперсии CoQ10, полученной с лецитином, который представляет собой смесь фосфолипидов, попадает между значениями DMPC и DSPC (фиг. 19).

Такие характеристики частиц, как размер, распределение по размеру, форма, заряд, деформируемость и взаимодействия между частицами и окружающей жидкостью, могут играть роль в реологическом поведении диспергированных систем. Для оценки реологии дисперсий напряжение сдвига изображали на графике как функцию скорости сдвига и результаты сопоставляли с наилучшей реологической моделью. Модель Гершеля-Балкли (см. уравнение 2 и соответствующее описание выше) наилучшим образом соответствует большинству составов.

Степенная модель сходна с моделью Гершеля-Балкли за исключением того, что она не представляет предел текучести значение. Среднеквадратические погрешности составляют $35,92 \pm 3,57$, $9,83 \pm 0,17$, $10,27 \pm 0,35$, $21,15 \pm 8,17$ для лецитиновых, DMPC, DPPC и DSPC дисперсий соответственно. Три элемента модели Гершеля-Балкли представлены на фиг. 20. DSPC дисперсия CoQ10 подчинялась степенной модели и, следовательно, не представляла предел текучести. Интересно, что пределы текучести составов, как было показано, статистически отличались, но тренд не был установлен. DSPC состав характеризовался существенно более высокой неньютоновской вязкостью, чем другие проанализированные образцы, возможно, вследствие его очевидного разжижающегося при сдвиге поведения ($n < 1$). Интересно, что результаты индекса текучести показали, что DPPC, DMPC и лецитиновые дисперсии соответственно представляли увеличение загустевающего при сдвиге поведения ($n > 1$).

Реологию дополнительно анализировали, делая скорость сдвига и вязкость независимыми и зависимыми переменными соответственно для сопоставления результатов с общей кривой потока водных

дисперсий (фиг. 21). Графические представления показаны на фиг. 22, где ясно продемонстрировано событие разжижения при сдвиге обогащенного DSPC состава. Соответствующие уравнения, относящиеся к этим моделям, показаны в табл. 4. Путем совмещения этих кривых с реологическими моделями было обнаружено, что составы представляли различное поведение (табл. 5). Среднеквадратические погрешности представляют собой $93,49 \pm 8,60$, $43,27 \pm 10,55$, $41,34 \pm 8,57$, $16,00 \pm 4,74$ для лецитиновых, DMPC, DPPC и DSPC дисперсий соответственно.

Лецитиновый состав CoQ10 соответствует модели Сиско, показывая, что исследуемый диапазон скорости сдвига попадает в предел диапазона от средних до высоких скоростей сдвига относительно общей кривой потока дисперсий. Это подтверждается малым характеристическим временем в табл. 5 и формой кривой при более высоких скоростях сдвига, показанных на фиг. 22. Этот результат также подтверждает загустевающее при сдвиге поведение, представленное из оценки модели Гершеля-Балкли (фиг. 20). Из изученных составов только лецитиновая дисперсия представляла тиксотропное поведение. Это указывает на зависимое от времени изменение после прерывания напряжения сдвига (например, событие разжижения при сдвиге) во время восстановления структуры из загустевающего при сдвиге поведения, представленного этой дисперсией в изучаемом диапазоне скоростей сдвига. Следовательно, составы синтетических фосфолипидов быстро восстанавливают свое исходное состояние при прекращении напряжения сдвига.

DMPC и DPPC дисперсии следовали модели Кросса, поэтому представлены показатели вязкости как при нулевой скорости, так и при бесконечной скорости. Тем не менее показатели характеристического времени составов сильно отличаются, причем самое низкое значение показано для DMPC состава. Это указывает на то, что сходный с лецитиновой дисперсией DMPC состав попадает в верхний диапазон скоростей сдвига, относящийся к общей кривой потока дисперсий (табл. 5), объясняя то, что второе ньютоновское плато ($3,66$ сП) больше, чем первая ньютоновская зона ($1,13$ сП). Следовательно, реологическое поведение DMPC дисперсий ближе к модели Сиско, чем к модели Кросса. По этой причине как лецитиновые, так и DMPC дисперсии представляли значения коэффициента скорости (или константы скорости Кросса) выше единицы, отражая отсутствие степенной области в исследуемом диапазоне скоростей сдвига. Когда вязкость в пределах конкретного диапазона распространяется соответствующим образом от первой до второй ньютоновской зоны, то $1-n$ близко к коэффициенту скорости n . Загустевающее при сдвиге поведение очевидно из формы кривой при более высоких скоростях сдвига (фиг. 22). Большее характеристическое время DPPC состава указывает на то, что кривая больше попадает в нижний диапазон скоростей сдвига и, следовательно, содействует тому, что вязкость при бесконечной скорости меньше, чем вязкость при нулевой скорости. Константа скорости Кросса близка к единице, что указывает на степень разжижающегося при сдвиге поведения в степенной области. Наблюдения формы кривой DPPC дисперсии на фиг. 22 поддерживает эти данные и относительно низкую степень загустевающего при сдвиге поведения, представленного в модели Гершеля-Балкли (фиг. 20). Эта относительно низкая степень загустевающего при сдвиге поведения по сравнению с лецитиновыми и DMPC составами может быть обусловлена различиями в реологии при более высоких скоростях сдвига.

Реологическое поведение DSPC следовало модели Уильямсона. Статистически более высокое характеристическое время вместе с формой кривой потока этой дисперсии указывают на то, что исследуемый диапазон скоростей сдвига попадает в пределы диапазона от низких до средних скоростей сдвига общей кривой потока дисперсий (фиг. 22). Значение коэффициента скорости отражает разжижающееся при сдвиге поведение в степенной области (табл. 5).

Как обсуждалось в связи с примером 1, может быть важным исследовать способность небулайзеров с вибрирующей сеткой-мембраной непрерывно и устойчиво распылять в виде аэрозоля дисперсии с сопутствующим анализом реологии жидкости в отличие от более простых измерений кинематической вязкости. Предыдущие работы были сосредоточены на вязкости дисперсионных сред *per se* независимо от взаимодействий между диспергированными частицами в окружающей жидкости. Вследствие того что высокочастотное механическое напряжение небулайзера напрямую переносится на состав, анализ параметров реологии при более высоких скоростях сдвига может лучше передать, что в действительности происходит в непосредственной близости от вибрирующей мембраны.

Некоторые значения среднеквадратической погрешности, полученные из совмещения результатов с реологическими моделями, могут рассматриваться как относительно высокие. Без связи с какой-либо конкретной теорией полагают, что эти значения могут быть обусловлены ограниченным изучаемым диапазоном скоростей сдвига при использовании схемы эксперимента настоящего примера. Хотя дальнейшие и/или дополнительные эксперименты могут быть проведены для снижения среднеквадратической погрешности, понимание реакции составов на приложенное напряжение тем не менее предоставляет ценную информацию о том, чего можно ожидать от небулизации таких дисперсий с помощью активной мембраны.

Для сравнения производительности небулизации составов Malvern Spraytec® устанавливали в соответствии со способом открытого рабочего стола, описанного в примере 1. Представленные на фиг. 23 диаграммы передачи показывают события небулизации с 15-минутной длительностью. В конце этого

промежутка времени значения передачи возвращаются к 100%, указывая на то, что измерения проводили правильно и без запотевания линзы датчика. Для оценки производительности небулизации этих составов диаграммы передачи совмещали с линейной регрессией для анализа наклонов кривых. Непрерывность указанного события небулизации может быть выведена из наклона. Наклоны и результаты ТАО представлены на фиг. 24. Аэрозольное распыление контроля (т.е. солевого раствора) было наиболее устойчивым с течением времени, что показано с помощью по сути нулевого наклона и самого высокого значения ТАО. Лецитиновый состав проявлял устойчивую небулизацию в течение начальных 5 мин (300 с) с последующим увеличением передачи. DMPC дисперсия проявляла профиль передачи с паттерном, противоположным лецитину. В начале небулизации небольшой наклон наблюдался приблизительно до 8 мин (480 с) с последующей устойчивой небулизацией. DPPC и DSPC дисперсии представляли очень пологий наклон в течение всей небулизации.

Лецитиновая дисперсия проявляла наибольший наклон и низкий ТАО (который не отличался статистически от DMPC состава). Хотя DPPC и DSPC составы представляли сходные наклоны (например, не отличающиеся статистически), ТАО от DSPC показал более высокий массовый выход, чем этот ТАО от DPPC, несмотря на то что оба состава распылялись устойчиво. Эти результаты показывают важность анализа наклона диаграмм передачи совместно с массовым выходом (или ТАО). DSPC состав представлял лучшие результаты среди водных дисперсий CoQ10, проявляя низкое значение наклона и самый высокий ТАО среди фосфолипидных дисперсий. В общем порядок увеличения производительности небулизации в изученных составах был следующим: лецитин < DMPC < DPPC < DSPC.

Эти данные могут оценивать параллельно с соответственным реологическим поведением составов при повышенных скоростях сдвига. При изучении кривых (фиг. 22) при высоких скоростях сдвига лецитиновые и DMPC дисперсии представляют характерное загустевающее при сдвиге поведение после второго ньютоновского плато, что подтверждается их низкими соответственными значениями характеристического времени. Возникновение загустевания при сдвиге после события разжижения при сдвиге может объясняться нестабильностью расположения после двухмерного расслоения жидкости. Будучи выше, критическое напряжение сдвига может вызывать случайное расположение диспергированных частиц, приводя к увеличению вязкости. Случайное расположение может ограничивать устойчивую производительность небулизации, как показано этими двумя составами. С другой стороны, высокие значения характеристического времени и разжижающееся при сдвиге поведение в степенной области, представленные DSPC и в меньшей степени DPPC дисперсиями при высоких скоростях сдвига, могут объяснять их относительно более высокую производительность небулизации. Эти результаты показывают, что характеристическое время, соответствующее разжижающемуся при сдвиге поведению при высоких скоростях сдвига, может содействовать производительности небулизации, наряду с тем что загустевание при сдвиге (низкое характеристическое время) может оказывать противоположный эффект. Следовательно, эти результаты показывают, что реологическое поведение при высоких скоростях сдвига может быть непосредственно связано с производительностью небулизации дисперсий.

Тем не менее эти данные указывают на то, что массовый выход может не коррелировать (например, непосредственно коррелировать) с выпуском лекарственного средства в случае небулизации описанных в настоящем документе дисперсий. Следовательно, для измерения аэрозольного распыления лекарственного средства и для достижения понимания аэродинамических свойств составов *in vitro* депозицию фосфолипидных составов CoQ10 анализировали с использованием NGI и адаптированного DUSA. Анализ депозиции лекарственного средства в начальных и конечных временных фазах 15-минутного периода небулизации обеспечивал оценку этих данных в связи с производительностью небулизации.

Значения TED лецитиновых, DMPC, DPPC и DSPC составов представлены на фиг. 25. Лецитиновая дисперсия CoQ10 представляла статистически значимое снижение аэрозольного распыления лекарственного средства по сравнению с начальными и конечными фазами периода небулизации после как NGI, так и DUSA анализа. Это различие в количестве лекарственного средства, выпущенного в начале и конце небулизации, подтверждает, что наклон ($25,99 \times 10^{-3} \pm 2,80 \times 10^{-3} \% / \text{с}$), наблюдаемый в результатах оценки производительности небулизации с использованием LD, не только относится к уменьшенному массовому выходу, но также к количеству распыляемого в виде аэрозоля лекарственного средства. В общем лецитиновая дисперсия также представляла значительно меньшее значение TED как на начальной, так и на конечной фазах при сравнении с составами синтетических фосфолипидов.

Не обнаружили статистического различия в пределах одного события небулизации для дисперсий, полученных с синтетическими фосфолипидами при анализе NGI. Тем не менее DMPC дисперсия проявляла меньшее значение TED в пределах одного события небулизации с использованием методики DUSA. Тем не менее результаты TED/DUSA могут быть более значимыми для настоящего анализа, поскольку содержащие лекарственное средство капли напрямую осаждаются в фильтр, тогда как результаты TED/NGI характеризуются потенциальными потерями, связанными с прибором NGI. Независимо от потенциальных потерь достигали удовлетворительного массового баланса, поскольку не определили никакого статистического различия по сравнению с определением TED двумя способами. Наклон ($16,06 \times 10^{-3} \pm 2,88 \times 10^{-3} \% / \text{с}$) из исследования производительности небулизации DMPC дисперсии согласу-

ется с различием в количестве лекарственного средства, распыляемого в виде аэрозоля в течение 15-минутного периода небулизации. DPPC и DSPC дисперсии CoQ10 распылялись приблизительно одинаково. Эти результаты показывают, что оба эти состава проявляют устойчивую небулизацию (например, что рассчитывают в относительно малых значениях наклона линейной регрессии).

Аэродинамические свойства, которые могут воздействовать на легочную доставку лекарственного средства, показаны на фиг. 26 и 27. Лецитиновый состав проявлял больший размер капель по отношению к осажденной массовой доле лекарственного средства на начальной стадии небулизации, чем на конечной стадии (фиг. 26). DMPC состав в меньшей степени проявлял паттерн, сходный с лецитиновым составом. DPPC и DSPC составы характеризовались более уравновешенным размером капель в течение всего 15-минутного события небулизации. По отношению к осажденному количеству лекарственного средства (что противоположно фракции лекарственного средства) на фиг. 27 показано, что общая депозиция лецитинового состава была низкой как на начальной, так и на конечной фазах (например, при сравнении с другими составами). Этот результат согласуется с результатами TED. Среди трех изученных синтетических фосфолипидов DMPC состав представлял самую низкую депозицию, что согласуется с результатами ТАО и TED. DPPC и DSPC составы характеризовались высокими количествами осажденного лекарственного средства и поддерживали однородные аэродинамические свойства в течение всего 15-минутного события небулизации.

Для дальнейшего сравнения аэродинамических свойств распыленных в виде аэрозоля дисперсий MMAD и GSD представлены на фиг. 28. Значения MMAD и GSD являются изначально сходными для всех четырех составов. Тем не менее по завершению события небулизации значения были различными. Это поведение показывает, что размер выпускаемых капель, содержащих наночастицы лекарственного средства, является зависимым от фосфолипида. Примечательно, что изменения в наклоне диаграммы передачи, наблюдаемые в пределах одного события небулизации для лецитиновых и DMPC дисперсий (фиг. 24), отражались не только в количестве лекарственного средства, распыляемого в виде аэрозоля (результаты TED, фиг. 25), но также в аэродинамических свойствах, показанных в их *in vitro* NGI профилях депозиции (фиг. 26 и 27). С течением небулизации распыляемые в виде аэрозоля капли становятся мельче и меньше.

Дальнейшее понимание потенциала выхода небулизации для легочной депозиции можно получить путем анализа тонкодисперсных частиц (например, аэродинамических размеров ниже 5,39 мкм). На фиг. 29А показаны значения TED NGI и TED DUSA для изучаемых составов. Данные TED NGI показывают, что только лецитиновый состав проявлял значимое различие в распыляемом в виде аэрозоля количестве лекарственного средства по сравнению с начальной и конечной фазами в пределах 15-минутной небулизации. Значения TED DUSA показывают, что лецитиновые и DMPC составы проявляли различие в распыляемом в виде аэрозоля количестве лекарственного средства по сравнению с начальной и конечной фазами в пределах 15-минутной небулизации. Результаты TED DUSA могут рассматриваться как более значимые, поскольку содержащие лекарственное средство капли напрямую осаждались в фильтр для измерения, тогда как результаты TED NGI могут характеризоваться потерями по ходу путей прохода аэрозоля в оборудовании NGI. На фиг. 29В показаны значения FPDet и FPF для изученных составов. FPF увеличивалась с течением времени для всех дисперсий, распыленных в виде аэрозоля с помощью небулайзера Aeroneb Pro® при заданных экспериментальных условиях, подтверждая то, что размеры капель снижались в процессе небулизации. FPD лецитинового состава существенно изменяется во время небулизации. Значения MMAD распыленных в виде аэрозоля DMPC дисперсий снижаются во время небулизации, в то время как FPD статистически не изменяется. DPPC состав проявлял устойчивую производительность небулизации и, следовательно, однородные значения TED в течение всей небулизации. Хотя значения MMAD не отличались статистически, результаты FPD показывают, что DPPC состав проявляет большее количество распыленного в виде аэрозоля лекарственного средства в конце небулизации. Сходное поведение наблюдали для DSPC состава, но результаты не были статистически значимыми ($P=0,08$) на основании этого примера отдельно.

На фиг. 30 показано, что геометрические размеры содержащих частицы CoQ10 капель также снижаются с течением времени особенно в лецитиновых и DMPC составах. Аэрозоли DPPC и DSPC составов проявляли относительно однородный (например, сходный с контролем - солевым раствором) размер капель во время 15-минутной небулизации. Расхождения в аэродинамических и геометрических размерах могут объясняться различными экспериментальными установками (см. обсуждение в примере 1).

В табл. 6 показаны беспрецедентно высокие дозы с потенциалом достигать легких (на основании FPD), проявляющиеся в настоящем изобретении, причем DPPC и DSPC составы представляли самые высокие значения. Эти дозы приблизительно в 10-40 раз больше, чем нанодисперсии итраконазола, ранее распыляемые в виде аэрозоля с использованием такого же типа небулайзера (устройства с вибрирующей сеткой-мембраной, данные не показаны) и вплоть до 280 раз больше, чем предыдущее аэрозольное распыление суспензии будесонида (Pulmicort Respule®, AstraZeneca, Великобритания) с использованием струйного небулайзера Sidestream® PortaNeb® (Medic-Aid Ltd., Великобритания). Возможно, равноценным по важности является то, что настоящее изобретение обеспечивает верификацию качества и количе-

ства небулизации (например, болюсный в сравнении с устойчивым аэрозолем в течение события небулизации).

В некоторых случаях могут быть необходимы уточнения для эффективной загрузки лекарственного средства. Например, испарение воды может происходить во время горячей гомогенизации под высоким давлением. Аналогично малый объем полученного состава (например, 100 мл) может приводить к потере лекарственного средства в ходе отложения на производственном оборудовании.

В конце концов было показано, что наблюдаемые изменения в производительности небулизации во время событий небулизации соответствуют различиям в аэродинамических свойствах между различными составами. Тем не менее было показано, что реологическое поведение этих составов является совместимым с небулайзером с активной вибрирующей сеткой-мембраной для непрерывной небулизации стабилизированных фосфолипидом нанодисперсий гидрофобных биоактивных средств. Концентрация различных элементов дисперсии (например, гидрофобного биоактивного средства) играет значительную роль в определении критической скорости сдвига, при которой начинается событие загустевания при сдвиге после второго ньютоновского плато. Таким образом, знание о реологии дисперсий можно использовать для определения максимальной загрузки лекарственного средства при поддержании необходимой производительности небулизации. Образование аэрозоля в небулайзере происходит при приложении напряжения (например, потока через воздушное сопло, ультразвуковой силы, вибрации сетки-мембраны) в или к жидкому составу с большим размером частиц. Следовательно, представленная в настоящем документе методика, включающая в себя комбинацию исследований реологии дисперсий и анализа производительности небулизации с использованием техник LD, относится к разработке составов для ингаляционной терапии на основе применения непрерывного небулайзера гидрофобных лекарственных средств.

Пример 3. Легочная депозиция и системное распределение ингаляционных составов CoQ10 у мышей.

В примере 3 представлена оценка *in vivo* системного распределения легочной и назальной депозиций у мышей после легочной доставки составов CoQ10, полученных с синтетическими фосфолипидами. Три синтетических фосфолипида выбирали для стабилизации этих дисперсий на основании экспериментальных результатов, представленных выше, и вследствие физиологической распространенности фосфолипидов в легких: DMPC, DPPC и DSPC. Лецитин не выбирали в результате его низкой *in vitro* депозиции. Дозирующее устройство включает в себя предназначенную только для носа ингаляционную камеру, получающую аэрозоль, созданный небулайзером с вибрирующей сеткой-мембраной Aeroneb Pro®. Результаты показывают достижение высокой и устойчивой дозы CoQ10 легких мышей, которая варьировала от 1,8 до 3,0% от теоретического воздействия.

Материалы и способы.

Материалы. CoQ10 поставляли от Asahi Kasei Corp. (Токио, Япония). Genzyme Pharmaceuticals (Листаль, Швейцария) предоставил 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DMPC), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DPPC) и 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC). DMPC также получали от Lipoid GmbH (Людвигсхафен, Германия). Хлорид натрия (кристаллический, сертифицированный ACS) приобретали у Fisher Chemical (Fisher Scientific, Фейр-Лоун, Нью-Джерси, США) и деионизированную воду получали из центральной системы обратного осмоса/деминерализатора. Трубки для фиксации мышей (изделие E2QY-PC), передние носовые вставки (изделие E2TE-N) и задние держатели (изделие E2TA-N) покупали у Battelle Toxicology Northwest (Ричлэнд, Вашингтон, США). Вентилятор (12 В, 0,10 А, модель OD4020-12NB) покупали у Knight Electronics (Даллас, Техас, США). Гексан и абсолютный этанол квалификации для ВЭЖХ покупали у Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США). Шприцы (1 мл) и иглы (калибров 21G1 и 23G1) получали от Becton Dickinson (Фрэнклин Лэйкс, Нью-Джерси, США). Гепаринизированные пробирки (1,3 мл микропробирки литий-гепарина (LH) с завинчивающейся крышкой, продукт № 41.1393.105) покупали у Sarstedt AG&Co. (Нюмбрехт, Германия). Микроцентрифужные пробирки (1,5 мл, чистые, не содержащие RNase/DNase, BL3152) получали от Bio-Link Scientific, LLC (Вимберлей, Техас, США).

Состав. Составы получали с использованием гомогенизации под высоким давлением, как описано в примере 2. В качестве обобщения после гидратации в течение ночи с перемешиванием фосфолипидную дисперсию, содержащую 2,5 мас.% фосфолипидов (DMPC, DPPC или DSPC) в воде, добавляли к расплавленному CoQ10 (4 мас.%) при 55°C. Состав подвергали предварительному диспергированию с использованием гомогенизатора Ultra-Turrax® TP 18/10 с 8-миллиметровой лопастью ротора путем смешивания с большим сдвигом (IKA-Werke, Стауфен, Германия) в течение 5 мин при 20000 об/мин. Состав затем пропускали 50 раз через M-110P "Plug-and-Play" Bench-top Microfluidizer® (Microfluidics, Ньютон, Массачусетс США) приблизительно при 30000 фунт/дюйм² с поддержанием температуры от 55 до 65°C. После микрофлюидизации 0,9% мас./об. хлорида натрия добавляли к конечному составу. Состав для контрольной группы получали аналогично с использованием DPPC при отсутствии лекарственного средства (CoQ10 не добавляли).

Легочная доставка мышам. Животных помещали в клетки в группах по 4 и содержали на диете

нормального корма для грызунов со свободным доступом к воде. Прибор с предназначенными только для носа камерами, способный предоставлять дозы шести мышам одновременно, собирали, как показано на фиг. 31. Перед дозированием CD-1® IGS ICR мышей (Charles River Laboratories International, Inc., Вилмингтон, Массачусетс, США) подвергали индивидуальной акклиматизации в течение приблизительно 10 мин в день в течение 3 дней в трубках для фиксации, ограниченных передней носовой вставкой и задним держателем. Дозирующее устройство помещали внутри вытяжного шкафа для сбора выходящего аэрозоля, содержащего лекарственное средство. Чтобы избежать влияния воздушного потока, создаваемого вытяжным шкафом, конический контейнер Эрленмейера помещали на конце системы трубок в качестве амортизатора. Скорость воздушного потока выставляли на 1 л/мин для обеспечения правильного аэрозольного распыления лекарственного средства в предназначенную только для носа камеру (внутренний объем: 230 мл; диаметр: 3,8 см; длина: 20,3 см) с использованием небулайзера с вибрирующей сеткой-мембраной Aeroneb Pro® (Aerogen, Галвей, Ирландия). После получения все составы (контроль - солевой раствор, DMPC, DPPC и DSPC) дозировали в течение 15 мин мышам массой 23-33 г каждая во время введения дозы. Каждая изучаемая группа, получающая однократную дозу, состояла из 36 животных-самцов. В каждую временную точку (0,5, 1, 3, 8, 24 и 48 ч после окончания аэрозольного события небулизации) 6 животных, рандомизировано выбранных из различных событий дозирования одного и того же состава, умерщвляли путем введения наркоза в виде диоксида углерода. В качестве части способа забора кровь забирали с помощью пункции сердца, собирали легкие и проводили смыв из носа. Образцы экстрагировали для анализа с помощью жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (LC/MS/MS).

Расчетная доза. Для оценки дозы, которой подверглись мыши во время настоящего исследования, предполагали, что предназначенная только для носа камера постепенно заполнялась аэрозолем, содержащим CoQ10. Следовательно, концентрация лекарственного средства устойчиво увеличивается, пока не достигнет плато. В устойчивом состоянии, также предполагали, что скорость лекарственного средства, входящего в камеру, равна скорости лекарственного средства, выходящего из камеры ($dC/dt=0$). Следовательно, уравнение 5 можно применять для измерения концентрации лекарственного средства внутри камеры в любое заданное время

$$C = FPDt/F * (1 - e^{-\lambda t}) \text{ (уравнение 5)}$$

где C представляет собой концентрацию лекарственного средства,

FPDt представляет собой скорость доставки дозы тонкодисперсных частиц (количество частиц с аэродинамическим критическим диаметром ниже 5,39 мкм/мин), как определяют в предыдущей главе,

F представляет собой скорость воздушного потока,

λ представляет собой скорость воздухообмена камеры, и

t представляет собой любое заданное время в пределах периода небулизации.

Скорость воздухообмена камеры, λ , можно определить на основании скорости воздушного потока и внутреннего объема камеры, V, на основании уравнения 6

$$\lambda = F/V \text{ (уравнение 6)}$$

На основании этих предположений следующее уравнение 7 описывает расчетную дозу, доставленную мышам

$$\text{Расчетная доза} = RMV \cdot \frac{FPDt}{F} \cdot \left\{ t' + \frac{V}{F} \cdot [(e^{-\lambda t'}) - 1] \right\} \text{ (уравнение 7)}$$

где RMV представляет собой видоспецифический минутный объем дыхания, и

t' представляет собой длительность события небулизации.

Расчетную дозу, рассчитанную выше, затем могут приводить к массе тела животного, W (г). RMV рассчитывают согласно уравнению 8

$$RMV = 4,19 * W^{0,66} \text{ (уравнение 8)}$$

Анализ уровней CoQ10 в ткани легкого, плазме крови и носовой полости. Для каждого эксперимента уровни CoQ10 определяли после экстракции жидкости с использованием жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS). Проверяли достоверность способов в диапазоне концентраций лекарственного средства от 0,1 до 600 мкг/мл. Общие протоколы получения образцов для анализа ткани легкого, плазмы крови и носовой полости описаны ниже.

После забора легких мышей ткань взвешивали (вес во влажном состоянии), замораживали в сухом льду и переносили в холодильник при -80°C для хранения до анализа. После того как образцы оттаивали для анализа, ткань легкого ($50 \pm 1,5$ мг) взвешивали, после чего гомогенизировали с фосфатно-солевым буфером Дюльбекко (dPBS). Гомогенат (100 мкл) и внутренний стандарт добавляли к изопропанолу (IPA) и перемешивали на вортексе. После центрифугирования супернатант (100 мкл) добавляли в другую пробирку, содержащую IPA. Образец снова перемешивали на вортексе и переносили для анализа LC-MS/MS.

После пункции сердца приблизительно 1 мл крови мышей собирали в гепаринизированные пробирки и хранили на ледяной бане до центрифугирования в течение 10 мин при 7000 г. Супернатант затем переносили в 1,5 мл микроцентрифужные пробирки и хранили замороженными при -80°C до анализа (см. описанную выше процедуру для ткани легкого).

Промывку растворителем проводили для оценки количества лекарственного средства, осажденного в носовой полости. К носовой полости мышей получали прямой доступ из задней части твердого неба путем введения иглы в носоглоточное пространство и промывая носовые ямки смесью гексан:этанол 2:1 (об./об.). Растворитель собирали в сцинтилляционный флакон из передней (фронтальной) части носа и впоследствии высушивали при комнатной температуре. Образец затем ресуспендировали и впрыскивали в LC-MS/MS для количественного определения CoQ10.

Статистический анализ. Образцы исследовали в отношении нормальности с использованием критерия Шапиро-Уилкиса ($p < 0,05$) и выбросы исключали из анализа данных. Фармакокинетические параметры определяли с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007 (Редмонд, Вашингтон) с программным расширением PKSolver. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения NCSS/PASS Dawson edition. В каждой временной точке образцы ткани легкого анализировали в отношении статистически значимых различий среди различных групп с помощью однофакторного дисперсионного анализа для значимости ($p < 0,05$). Тот же анализ проводили для образцов смыва из носа с помощью дополнительных критериев апостериорного множественного сравнения, проведенного для определения статистически значимых различий между получившими лечение и контрольными группами с использованием критерия Дуннета ($p < 0,05$). Оценку парного t-критерия проводили для анализа статистически значимых различий ($p < 0,05$) в пределах одной получившей лечение группы в отношении изменений в депозиции лекарственного средства в носовой полости с течением времени.

Результаты и обсуждение.

Небулайзер применяли для создания аэрозоля для введения доз мышам в течение 15 мин с помощью контроля DMPC, DPPC и DSPC составов. Доставленную к легким дозу оценивали на основании значений FPD_r, которые определяли во время *in vitro* определения характеристик депозиции лекарственного средства с использованием описанного в примере 2Next Generation Impactor (NGI).

На фиг. 32 показан рассчитанный профиль зависимости концентрации лекарственного средства от времени в дозирующей камере. Плато достигалось на 3,0 мин. Концентрация в устойчивом состоянии (CSS) равна FPD_r, поскольку скорость воздушного потока во время настоящего эксперимента составляла 1 л/мин (табл. 7). Скорость воздухообмена камеры составляла 4,35 мин⁻¹. Расчетные дозы, доставленные мышам аэрозольных DMPC, DPPC и DSPC дисперсий CoQ10 в течение 15 мин увеличиваются в этом соответственном порядке (фиг. 33). Приведенные к массе тела животных сходные расчетные дозы доставлялись мышам, получающим или DPPC, или DSPC составы. Эти дозы CoQ10, как обнаружили, были больше, чем в ситуации, когда мышам дозировали DMPC состав.

Концентрация лекарственного средства в плазме была ниже количественного уровня (0,1 мкг/мл) для всех исследуемых групп в каждой временной точке. Исходная концентрация CoQ10 в плазме крови мышей составляет приблизительно 0,1 мкмоль/л (86 нг/мл). В легких концентрация лекарственного средства была также ниже количественного уровня для контрольной группы в каждой исследуемой временной точке. Тем не менее на фиг. 34 показано, что CoQ10 остается в легких в относительно высоких концентрациях в течение до 48 ч. Механизм, с помощью которого CoQ10 может абсорбироваться через эпителий легких, неизвестен. Без связи с какой-либо конкретной теорией считается, что несмотря на липофильность CoQ10 пассивная диффузия представляет собой только часть более сложного процесса абсорбции, включающего в себя дополнительные явления активного и облегченного транспорта. Возможно, что относительно небольшое количество в легких для системного переноса представляет собой, по меньшей мере частично, часть вследствие этой низкой проницаемости. Кроме того, дисперсии составлены в наноразмерном диапазоне, которые, как известно (например, в отношении частиц ниже 0,2-0,5 мкм), являются малозаметными для альвеолярных макрофагов. В дополнение к размеру другие физико-химические свойства лекарственного средства могут влиять на перенос наночастиц через альвеолярно-капиллярный барьер, например материал частиц, *in vivo* растворимость и аффинность связывания с клеточными мембранами (например, посредством поверхностного заряда и структуры). Присутствие фосфолипидов в этих составах могло также вызвать большее легочное периферическое распределение наночастиц лекарственного средства.

Перенос нерастворимых наночастиц через альвеолярно-капиллярный барьер, как известно, является минимальным по сравнению с длительным клиренсом из альвеол вплоть до мукоцилиарного эскалатора и в ЖКТ, который может занимать недели. Значительное распространение лекарственного средства в направлении периферии легких вследствие присутствия фосфолипидов в составах, изучаемых в настоящем исследовании, представляет собой возможный способствующий фактор, объясняющий, почему клиренс CoQ10 из легких не обнаруживается через 48 ч и аналогично почему уровни лекарственного средства в плазме были ниже количественного предела. Более того, поскольку клиренс лекарственного средства из легких не был значительным в изучаемый период времени, константы элиминации и периоды полувыведения не могут быть определены для распыленных небулайзером составов.

Другие фармакокинетические параметры представлены в табл. 8. Профили легочной депозиции водных дисперсий CoQ10 с использованием различных фосфолипидов представляли относительно сходные результаты. C_{\max} находилась в диапазоне от 604,0 до 791,3 мкг/г сырой ткани легкого и наблюдалась

через 1 ч (t_{\max}) после введения дозы для всех получавших лечение групп. Эти значения переводятся как приблизительно 4,0-5,0 мг/кг массы тела мыши и соответствуют 1,8-3,0% теоретической дозы воздействия (фиг. 35). Результаты А UC0-48 были удивительным образом различными, причем DMPC состав CoQ10 представлял самое высокое значение независимо от того, была ли представлена наименьшая расчетная доза, воздействию которой подвергались мыши. Хотя DPPC и DSPC дисперсии CoQ10 представляли высокую расчетную дозу, их значения C_{\max} и AUC0-48 варьировали в широких пределах. Не обнаружили никаких статистически значимых различий в концентрации лекарственного средства в одной временной точке среди получивших лечение групп (фиг. 34 и 35).

Депозиция лекарственного средства в носовой полости была ниже, чем та, которую измеряли в легких (фиг. 36), не превышая среднего 1,7 мг/кг массы тела мыши среди получивших лечение групп. Только группа DPPC продемонстрировала статистически значимый тренд снижения для первых двух изучаемых временных точек. Небольшое количество CoQ10 наблюдали в контрольной группе, возможно, из эндогенного источника. В итоге все мыши были живы и проявляли признаки здоровья через 48 ч после окончания события небулизации. Это демонстрирует безопасность доставки высоких количеств экзогенного CoQ10 к легким.

В примере 2 прогнозировали беспрецедентно высокие дозы с потенциалом достигать легких на основании FPDet результатов, причем DPPC и DSPC составы представляли самые высокие значения. Эти дозы приблизительно в 10-40 раз больше, чем нанодисперсии итраконазола, ранее распыляемые в виде аэрозоля с использованием такого же типа небулайзера (устройства с вибрирующей сеткой-мембраной) и вплоть до 280 раз больше, чем предыдущее аэрозольное распыление суспензии будесонида (Pulmicort Respule®, AstraZeneca, Великобритания) с использованием струйного небулайзера Sidestream® Porta-Neb® (Medic-Aid Ltd., Великобритания). В этом примере убедились в том, что высокие дозы переводились в улучшенную депозицию лекарственного средства в легких. Значение C_{\max} CoQ10 были вплоть до в 75 и 165 раз выше, чем в предыдущих исследованиях с использованием такого же небулайзера для доставки дисперсий циклоспорина А и итраконазола соответственно (данные не показаны). Эти данные представляют значительное улучшение доставки высоких количеств гидрофобного лекарственного средства напрямую к легким. Способы *in vitro* настоящего изобретения для разработки и скрининга составов с оптимизированным потенциалом к доставке высоких количеств лекарственного средства к легким были принципиально значимыми в достижении этих результатов.

Пример 4. Определение диапазона низких концентраций гидрофобных лекарственных средств с использованием ВЭЖХ.

Доклинические и клинические исследования требуют определения небольших количеств соединений (например, таких гидрофобных лекарственных средств, как CoQ10) в различных биологических жидкостях и тканях. В настоящее время доступны многочисленные аналитические способы ВЭЖХ с ультрафиолетовыми (УФ) датчиками. Тем не менее для высокочувствительного анализа необходимы более усовершенствованные и сложные способы, например ВЭЖХ с последующими химическими реакциями, ВЭЖХ с электрохимическими датчиками (ECD) и жидкостная хроматография с тройной квадрупольной (тандемной) масс-спектрометрией (LC-MS/MS). Среди параметров для валидации способов ВЭЖХ находятся достоверность, точность, диапазон, линейность и пределы обнаружения (LOD) и количественного определения (LOQ). Соотношение сигнала к помехе (S/N) представляет собой быстрый и простой способ определить LOD и LOQ, которые являются принципиально важными при анализе низкой концентрации лекарственных средств.

Способы. Выбирали Waters ВЭЖХ и систему колонок, включая 1525 бинарный насос, 717 автоматический пробозаборник, датчик 2487 двойного λ поглощения, установленный на 275 нм, и колонку Symmetry RP-C8 5 мкм (3,9×150 мм), соединенную с Symmetry C8 защитной колонкой 5 мкм (3,9×20 мм). Подвижная фаза (MP) включает в себя метанол:гексан в соотношении 97:3 (об./об.). Маточный раствор чистого CoQ10 вначале растворяли в смеси гексан:этанол (разбавитель) в соотношении 2:1 (об./об.) и впоследствии разбавляли подвижной фазой для получения необходимой концентрации. Предел обнаружения (LOD), предел количественного определения (LOQ) и линейность (кривые в три разных дня) определяли путем впрыскивания 50 мкл образцов при контролируемой температуре 30°C. Пики хроматограмм получали в пределах времени испытания 11 мин при объемной скорости потока, составляющей 1,0 мл/мин. Площадь и высоту пиков использовали для определения линейности кривой. LOD и LOQ определяли с помощью расчетов соотношения сигнала к помехе (S/N) согласно способу из Европейской Фармакопеи с минимальными приемлемыми значениями 3 и 10 соответственно. Выбранные концентрации представляли собой 10, 25, 37,5 и 50 нг/мл (n=6).

Для получения подвижной фазы растворители фильтровали перед применением через 0,45 мкм нейлоновые мембранные фильтры и промывали в течение 10 мин газообразным гелием. Для получения маточного и рабочих стандартных растворов (500 мкг/мл), 12,5 мг CoQ10 точно взвешивали в 25 мл мерную колбу из темного стекла и растворяли в смеси гексан:этанол 2:1 (об./об.). Впоследствии этот маточный стандартный раствор разбавляли с помощью MP до 10 мкг/мл. Чтобы избежать разложения API под воздействием света, стандартные растворы хранили в контейнерах из темного стекла во время манипу-

ляции с лекарственным средством. Рабочие стандартные растворы получали путем переноса соответствующих аликвот маточного раствора в прозрачные пробирки и разбавляли до конечной концентрации с помощью МР. В конце рабочие стандартные растворы переносили в полипропиленовые конические контейнеры и помещали их во флаконы из темного стекла для ВЭЖХ для анализа.

Результаты. Время удерживания (RT) CoQ10 определяли как приблизительно 8 мин и впрыскивание холостой пробы (разбавителя), как было показано, не мешает определению пика при 275 нм. Как показали наблюдения, контроль температуры был необходим для получения симметричных пиков при пониженных концентрациях. LOD и LOQ определяли как 10 нг/мл ($n=6$; соотношение $S/N=6,0$; $SD=0,6$; $RSD=10,5\%$) и 25 нг/мл ($n=6$; соотношение $S/N=12,6$; $SD=1,3$; $RSD=10,1\%$) соответственно. Линейности кривых получали с использованием высоты или площади пиков хроматограмм в диапазоне от 25 до 2500 нг/мл с $r^2 \geq 0,9999$ ($n=3$ для каждой концентрации).

Вывод. Способ может использоваться как альтернатива более сложным и дорогостоящим способам для анализа CoQ10 в малых концентрациях. Простота получения образца и небольшое время удерживания предоставляют возможность для быстрого анализа. Возможность использования или площади, или высоты пиков хроматограмм предоставляет больше гибкости для адаптации настоящего способа к различным применениям. Дальнейшие исследования экстракции CoQ10 из биологических материалов, стабильности и выбора внутреннего стандарта необходимы для определения роли настоящего способа. Настоящее исследование представляет альтернативный и приемлемо стабильный способ для определения CoQ10 в очень низких концентрациях с использованием экономически обоснованной системы ОФ-ВЭЖХ.

Пример 5. Определение подходящей концентрации гидрофобных лекарственных средств в фосфолипидных нанодисперсиях, подходящих для непрерывного распыления.

В разрабатываемых составах гидрофобного лекарственного средства для непрерывного распыления может быть полезным установить максимальные номинальные загрузки лекарственного средства в стабилизированных фосфолипидами дисперсии, которые будут поддерживать непрерывную небулизацию с вибрирующей сеткой-мембраной. Дело в том, что, например, небулайзер с вибрирующей сеткой-мембраной может проявлять такие проблемы, как неустойчивое аэрозольное распыление вследствие засорения пор сетки-мембраны, что может быть минимизировано подходящим составом.

Способы. Составы получали на основании общих обсуждаемых в связи с примерами 1 и 2 способов. Для настоящего исследования определенные дисперсии получали с помощью 50 отдельных проходов микрофлюидизации с использованием 2,5 мас.% димиристоилфосфатидилхолина (DMPC) и 7,5, 7,0, 6,0, 5,0% или 4,0 мас.% CoQ10. Дисперсии затем распыляли в виде аэрозоля за 24 ч с использованием небулайзера Aeroneb Pro® в течение 15 мин аэрозольного события небулизации. Профиль аэрозольного распыления подвергали мониторингу посредством анализа общего выхода аэрозоля (ТАО) и с использованием лазерной дифракции с помощью Malvern Spraytec®, соединенного с ингаляционной ячейкой, как описано выше.

Результаты и обсуждение. Производительности небулизации стабилизированных DMPC составов представлены на фиг. 37. Со снижением концентрации гидрофобного лекарственного средства аэрозольное распыление становится более непрерывным. Значения ТАО для пониженных концентраций лекарственного средства составляют соответственно 1,25 г (12,4%), 1,62 г (16,1%) и 2,15 г (21,4%). Результаты ТАО согласуются с анализом производительности небулизации из лазерной дифракции с увеличением значений при снижении концентраций лекарственного средства. Значения передачи не возвращаются к 100% в конце небулизации вследствие экспериментального артефакта. Хотя получали содержащий 5 мас.% CoQ10 состав, анализ с использованием лазерной дифракции не могли провести надлежащим образом вследствие этого артефакта. На основании визуального наблюдения определяют, что эта концентрация лекарственного средства не была подходящей для непрерывного аэрозольного распыления CoQ10 дисперсии вследствие образования прерывистого аэрозоля во время небулизации. Для 4,0 мас.% CoQ10 состава это прерывание наблюдали лишь в конечной фазе небулизации, следовательно, ее выбрали в качестве подходящей номинальной концентрации лекарственного средства.

Вывод. Определили, что номинальная концентрация, составляющая 4 мас.% CoQ10, является подходящей загрузкой лекарственного средства для непрерывного аэрозольного распыления с помощью небулайзера Aeroneb Pro®, что установлено с использованием DMPC в концентрации 2,5 мас.% для стабилизации дисперсий. Номинальные концентрации могут варьировать в зависимости от конкретного используемого гидрофобного лекарственного средства, а также таких других компонентов состава, как фосфолипид.

Пример 6. Измерение воспалительного ответа на легочное введение дисперсий инкапсулированных в фосфолипид гидрофобных биоактивных средств.

Измеряли воспалительный ответ на введение гидрофобных биоактивных средств (например, как обсуждалось в связи с примерами 1-3 выше). Операцию проводили на умерщвленных мышцах для воздействия на плевральную полость и трахею на горле. Небольшой разрез производят в трахее и канюлю с иглой приблизительно 23 калибра с обмоткой из пластиковых трубок (приблизительно 0,037 дюймов

внешнего диаметра (OD) и приблизительно 0,025 дюймов внутреннего диаметра) вводят через разрез в основание трахеи и зажимают, чтобы закрыть отверстие. Аликвоту (приблизительно 0,75 мл) фосфатно-солевого буфера вливают через канюлю в легкие и удаляют, чтобы промыть бронхиальные и альвеолярные поверхности. Этот процесс повторяют в общем в течение трех промываний. Содержащие фосфатно-солевой буфер клетки помещают в центрифужные флаконы и центрифугируют приблизительно при 3000 об/мин (MiniSpin Plus, Eppendorf International, Гамбург, Германия). Супернатант удаляют, оставляя собравшиеся клетки в осадке. Супернатант из BAL (бронхоальвеолярного лаважа) анализируют с помощью ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA) для оценки IL-12 (n=2 на исследуемый образец). Введение CoQ10 не связано с повышением уровней IL-12 и не вызывает воспаления легких.

Пример 7. Сравнение производительности небулизации между водными дисперсиями CoQ10 и внутривенным составом.

Для более полного понимания эффекта включения определенных компонентов в фармацевтических состав и их количества на производительность небулизации изучали непрерывное аэрозольное распыление некоторых водных дисперсий CoQ10 и внутривенного состава. Результаты настоящего примера обобщены на фиг. 38, на которой показаны диаграммы передачи аэрозольного распыления стабилизированных DMPC и DSPC дисперсий по сравнению с внутривенным составом, который включает в себя конкретное снижающее опсонизацию средство. Дополнительные данные представлены на фиг. 39-41.

Исследуемые составы включали в себя следующее:

(i) контроль - солевой раствор (0,9 мас.% NaCl в воде);

(ii) лецитин (50 проходов, как представлено в примере 1);

(iii) CQDPPC06 - состав, содержащий DPPC (4:2,5);

(iv) CQDSPC01 - состав, содержащий DSPC (4:2,5);

(v) CQDMPC05 - состав, содержащий DMPC (4:2,5);

(vi) CQDMPC06 - состав, содержащий DMPC (3:2,5);

(vii) IV Cytotech - внутривенный состав, предоставленный Cytotech Labs для анализа производительности небулизации, содержащий CoQ10:OMPC:полоксамер 188 (4:3:1,5).

Составы (iii)-(vi) получали с помощью способа, представленного в примере 2. Состав (viii) получали согласно способу, представленному в международной публикации № WO 2011/112900.

Солевой раствор представлял наклон, близкий к нулю, и высокий ТАО, что указывает на успешную доставку раствора с использованием небулайзера. Полученные с DMPC дисперсные составы (за исключением состава IV) несмотря на различия в концентрации лекарственного средства представляли сходные результаты как для наклона, так и ТАО, тогда как лецитин (50 проходов) представлял самый высокий наклон и сравнительно низкий ТАО. Важность анализа как ТАО, так и наклона проиллюстрирована с помощью этих фигур. Хотя составы CQDPPC06 и CQDSPC01 представляли сходные наклоны, ТАО от CQDSPC01 был выше, чем CQDPPC06, показывая более высокий выход, несмотря на то что оба распылялись устойчиво с помощью небулайзера. С другой стороны, хотя состав IV представлял определенную степень небулизации, выход аэрозоля был самый низкий среди всех составов. Следовательно, для всех практических целей было невозможно непрерывно распылить с помощью небулайзера состав IV. В этом отношении он не может быть целесообразно использован для доставки терапевтической дозы биоактивного средства. Состав CQDSP01 представлял, возможно, лучшие результаты среди водных дисперсий API 31510. Порядок наблюдаемой производительности небулизации был следующим (от высокой к низкой): DSPC, DPPC, DMPC, лецитин и IV Cytotech.

На фиг. 40 показан анализ частиц лекарственного средства, диспергированных в составах, изучаемых в связи с примером 7. Лецитин, DMPC и DSPC представляли преимущественно субмикронные размеры, хотя только лецитин представлял низкий разброс. Тем не менее наночастицы лецитинового состава являются относительно большими (например, ~260 нм) и полидисперсными (PdI>0,2). Фракция частиц микронного размера является самой большой в DSPC составе. IV Состав представлял моодисперсное распределение ~60 нм частиц. DMPC и DPPC составы представляли смесь малых и больших частиц лекарственного средства.

На фиг. 41 показан другой анализ частиц лекарственного средства, диспергированных в составах, изучаемых в связи с примером 7. Поверхностный заряд частиц лекарственного средства в дисперсии был относительно низким для DMPC, DPPC и DSPC составов, что выражалось в значениях их дзета-потенциала. Лецитиновый состав характеризовался самым большим дзета-потенциалом несмотря на наименьшую концентрацию фосфолипида. Поверхностное натяжение составов увеличивается с увеличением гидрофобности синтетических фосфолипидов (увеличение числа атомов углерода в липидной цепи фосфолипидов): DMPC<DPPC<DSPC. Интересно, что поверхностное натяжение лецитина, смеси фосфолипидов, попадает в пределы значений DMPC и DSPC. Тем не менее мольные фракции синтетических фосфолипидов являются различными, поскольку составы получали по массе (DMPC характеризовался самым высоким значением и DSPC - самым низким).

Без связи с какой-либо конкретной теорией полагают, что включение полоксамера в IV состав представляло собой преобладающим фактором в ослаблении производительности небулизации IV состава.

вы. Тем не менее различия в небулизации могут также, вероятно, объясняться другими факторами, включающими в себя без ограничения включение PBS вместо солевого раствора в IV состав, ионную концентрацию и заряд состава (например, вследствие различных соединений в водной дисперсии и/или присутствия снижающего опсонизацию средства) и/или различия в способе получения.

Эквиваленты

Описание изобретения должно пониматься как раскрытие и охват всех возможных перестановок и комбинаций описанных аспектов, вариантов осуществления и примеров, если только контекст не указывает иное. Специалисту в настоящей области техники будет понятно, что настоящее изобретение может осуществляться на практике с помощью отличных от обобщенных и описанных аспектов, вариантов осуществления и примеров, которые представлены с целью иллюстрации, и что настоящее изобретение ограничено исключительно последующей формулой изобретения.

Включается, что перечисление диапазонов значений в настоящем документе представлено только, чтобы служить способом сокращения для ссылки индивидуально на каждое отдельное значение, попадающее в диапазон. Если иное не указано, каждое индивидуальное значение включено в описание изобретения, как если бы его перечислили индивидуально. Каждый из процитированных в настоящем изобретении документов (включая в себя все патенты, патентные заявки, научные публикации, нормативно-техническую документацию производителя и инструкции) включены в настоящий документ посредством ссылки в их полноте.

Специалистам в настоящей области техники будут понятны, или они будут способны выяснить с использованием не более чем рутинного экспериментирования, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в настоящем документе. Включается, что такие эквиваленты охватываются последующей формулой изобретения.

Таблицы

Таблица 1

Состав	Испытание	Фосфолипиды		Число проходов	Характеристика
		Тип(ы)	Гидратация		
A	Число проходов; стабильность	Лецитин	~ 1 час, без перемешивания	20, 50, 70 и 100	Распределение по размерам частиц
B	Число проходов; тип фосфолипидов	Лецитин и DPPC	~ 1 час, без перемешивания	10, 20, 30, 40 и 50	Распределение по размерам частиц
C*	Производительность небулизации	Лецитин	В течение ночи, с перемешиванием	10, 30, и 50	Распределение по размерам частиц, поверхностное натяжение, реология, дзета-потенциал и ТАО

*0,9% вес/объем добавленный к конечному составу после обработки в микрофлюидизаторе.

DPPC: дипальмитоилфосфатидилхолин; ТАО: общий выход аэрозоля

Таблица 2

Способ получения	Dv ₍₅₀₎ (мкм)	Значение разброса
Сила сдвига	1.03	2.076
Микрофлюидизация	0.63	0.367
Обработка ультразвуком	0.71	0.459

Таблица 3

Состав	Dv ₍₁₀₎ (мкм)	Dv ₍₅₀₎ (мкм)	Dv ₍₉₀₎ (мкм)
Лецитин	0.24 ± 0.00	0.45 ± 0.00	0.81 ± 0.00
DMPC	0.21 ± 0.01*	0.81 ± 0.14	37.84 ± 27.25
DPPC	0.22 ± 0.01	0.85 ± 0.10	36.30 ± 34.26
DSPC	0.25 ± 0.02*	0.41 ± 1.93	97.24 ± 103.06

Результаты выражают как средние значения ± среднеквадратические отклонения (n=3)

*P>0,05 согласно критерий Тьюки-Крамера.

Таблица 4

Модель	Уравнение
Кросса	$\frac{\eta - \eta_{\infty}}{\eta_0 - \eta_{\infty}} = \frac{1}{(1 + (K \cdot \dot{\gamma})^m)}$
Сиско	$\eta = \eta_{\infty} + K \cdot \dot{\gamma}^{n-1}$
Уильямсона	$\eta = \frac{\eta_0}{(1 + (K \cdot \dot{\gamma})^m)}$

η_0 и η_{∞} представляют собой асимптотические значения вязкости при очень низкой (вязкость при нулевой скорости) и очень высокой (вязкость при бесконечной скорости) скоростях сдвига; K представляет собой характеристику времени (чем ниже значение, тем правее лежит кривая); m представляет собой безразмерную константу, указывающую на реологическое поведение (вязкость как функция скорости сдвига) в области разжижения при сдвиге, где $m=0$ относится к ньютоновскому поведению и увеличенные значения, стремящиеся к единице, соответствуют увеличенному разжижающемуся при сдвиге поведению; n представляет собой степенной коэффициент и значения ниже и выше единицы представляют события разжижения при сдвиге и загустевания при сдвиге, соответственно; и $\dot{\gamma}$ представляет собой скорость сдвига.

Таблица 5

Состав	Модель	Вязкость при нулевой скорости (мПА*с) [§]	Вязкость при бесконечной скорости (мПА*с)	Характеристическое время (с)	Коэффициент скорости (n) или константа Кросса (m)	Тиксотропия (Па/с)	Приведенная тиксотропия (с ⁻¹)
Лецитин	Сиско	N/A	0.95 ± 0.01	8.60×10 ⁻⁴ ± 14.9×10 ⁻⁴	23.35 ± 1.90*	85.48 ± 0.79*	16.92×10 ⁻⁴ ± 0.31×10 ⁻⁴
DMPC	Кросса	1.13 ± 0.01	3.66 ± 3.11	9.06×10 ⁻⁴ ± 5.38×10 ⁻⁴	2.59 ± 0.52	Ноль	Ноль
DMPC	Кросса	5.31 ± 0.96	1.61 ± 0.01	0.51 ± 0.03	0.70 ± 0.05	Ноль	Ноль
DSPC	Уильямсона	621.17 ± 446.30	N/A	15.19 ± 11.12*	0.54 ± 0.10	Ноль	Ноль

Результаты выражают как средние значения ± среднеквадратические отклонения (n=3). N/A: не применимо при рассмотрении данной реологической модели (сравн. с табл. 2). § Группы статистически различаются, но апостериорный анализ был неспособен отличить различия между группами. P<0,05 при сравнении с другими составами

Таблица 6

Состав	FPD _{et} (мг)	FPD _r (мкг/мин)
Лецитин	24.84	1656
DMPC	126.30	8420
DPPC	168.36	11224
DSPC	173.79	11586

Таблица 7

Состав	FPD _r (мг/мин)	Вес мыши (г)	RMV мл/мин	Расчетная доза	
				Через 15 минут небулизации (мг)	Приведенная к весу тела (мг/кг)
DMPC	8.420	28.8 ± 1.4	38.50	4.787	166.2
DPPC	11.224	26.1 ± 1.5	36.07	5.980	229.1
DSPC	11.586	29.5 ± 2.0	39.11	6.693	226.9

Результаты выражают как средние значения ± среднеквадратические отклонения (n=36 на группу). FPD_r представляет собой скорость доставки дозы тонкодисперсных частиц (количество частиц с аэродинамическим критическим диаметром ниже 5,39 мкм в минуту) и RMV представляет собой минутный объем дыхания, рассчитанный на основании 10 мл/кг при 120 вдохов в минуту.[21]

Таблица 8

Фармакокинетический параметр	DMPC	DPPC	DSPC
C_{max} (мкг/г сырой ткани)	777.7	604.0	791.3
t_{max} (ч)	1	1	1
AUC_{0-48} (мг-ч/г)	28.228	21.144	26.830

Таблица 9

Число проходов	Лецитин (контрольное испытание) DPPC (n=3)			
	APT (%)	TAO (%)	APT (%)	TAO (%)
10	94.8	11	94.3 ± 1.8	50.0 ± 9.3
20	99.3	0	81.9 ± 1.4	69.6 ± 12.1
30	97.1	10.5	87.7 ± 1.0	70.4 ± 3.0
40	94.2	21	77.8 ± 3.2	76.4 ± 3.4
50	90	30	86.8 ± 1.1	78.0 ± 8.7

Состав	Число циклов	После получения		Через 7 дней	
		APT (%)	TAO (%)	APT (%)	TAO (%)
1	20	97.1 ± 3.4	16.4 ± 15.2	85.4 ± 3.5**	75.1 ± 9.0**
2	50	77.9 ± 12.6	85.6 ± 15.1*	89.1 ± 2.0	66.7 ± 5.3
3	70	85.8 ± 1.5*	72.0 ± 4.4*	91.5 ± 0.5**	56.4 ± 0.4**
4	100	86.8 ± 0.6*	67.8 ± 1.0*	91.7 ± 0.2**	52.7 ± 1.8**

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Ингаляционная фармацевтическая композиция, содержащая дисперсию липосомных частиц, для непрерывного аэрозольного распыления, содержащая

дисперсию липосомных частиц, имеющую средний диаметр, составляющий 30-500 нм, измеренный лазерной дифракцией или динамическим рассеянием света, причем каждая липосомная частица содержит гидрофобное биоактивное средство, фосфолипид и носитель водной дисперсии,

причем отношение гидрофобного биоактивного средства к фосфолипиду составляет от 5:1 до 1:5, гидрофобное биоактивное средство составляет 0,1-30 мас.% композиции, фосфолипид составляет 0,1-30 мас.% композиции и липосомные частицы диспергированы в носителе водной дисперсии,

причем гидрофобным биоактивным средством является коэнзим Q10,

причем фосфолипид представляет собой дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), димиристоилфосфатидилхолин (DMPS) или их комбинацию.

2. Ингаляционная фармацевтическая композиция по п.1, в которой носитель водной дисперсии представляет собой воду или водный солевой раствор.

3. Ингаляционная фармацевтическая композиция по п.1, в которой дисперсия липосомных частиц находится в форме непрерывного респираторного аэрозоля, содержащего множество водяных капель, содержащих дисперсию липосомных частиц и характеризующихся масс-медианным аэродинамическим диаметром (MMAD), составляющим 1-5 мкм.

4. Ингаляционная фармацевтическая композиция по п.1, причем композиция характеризуется средним процентом передачи (APT), составляющим 50-100% в течение по меньшей мере 15 мин непрерывного аэрозольного распыления.

5. Ингаляционная фармацевтическая композиция по п.1, в которой множество капель имеет MMAD, составляющий 1-5 мкм в течение по меньшей мере 15 мин непрерывного аэрозольного распыления.

6. Ингаляционная фармацевтическая композиция по п.1, причем композиция характеризуется APT, составляющей 50-100% после по меньшей мере семи дней хранения.

7. Ингаляционная фармацевтическая композиция по п.1, в которой композиция характеризуется APT, составляющей 50-100%.

8. Ингаляционная фармацевтическая композиция по п.1, в которой липосомные частицы имеют средний диаметр, составляющий 30-500 нм после по меньшей мере семи дней хранения.

9. Ингаляционная фармацевтическая композиция по п.1, причем композиция имеет характеристики неньютоновской жидкости.

10. Ингаляционная фармацевтическая композиция по п.1, причем композиция имеет индекс текуче-

сти (n), составляющий приблизительно 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2 или 1,3.

11. Ингаляционная фармацевтическая композиция по п.1, причем композиция имеет вязкость (η), составляющую приблизительно 0,1, 0,15, 0,2, 1, 100 или 110 сП.

12. Ингаляционная фармацевтическая композиция по п.1, причем композиция имеет дзета-потенциал, составляющий приблизительно 2,5, 1,5, -2,5, -10, -50, -55 или -60 мВ.

13. Ингаляционная фармацевтическая композиция по п.1, причем композиция имеет поверхностное натяжение, составляющее приблизительно 25, 30, 35, 40, 45 или 50 мН/м.

14. Ингаляционная фармацевтическая композиция по п.1, причем композиция имеет предел текучести (σ), составляющий приблизительно 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 мПа.

15. Ингаляционная фармацевтическая композиция по п.1, в которой дисперсия липосомных частиц имеет средний диаметр, составляющий 30-300 нм.

16. Ингаляционная фармацевтическая композиция по п.1, причем композиция имеет коэффициент полидисперсности (PDI), составляющий приблизительно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 или 0,7.

17. Ингаляционная фармацевтическая композиция по п.1, причем композиция имеет общий выход аэрозоля (ТАО), составляющий по меньшей мере 40%.

18. Ингаляционная фармацевтическая композиция по п.3, в которой MMAD составляет приблизительно 1, 2, 3, 4 или 5 мкм.

19. Ингаляционная фармацевтическая композиция по п.3, в которой множество капель имеет геометрическое стандартное отклонение (GSD), составляющее менее чем приблизительно 2,5, 2,4, 2,3, 2,2, 2,1, 2,0, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1,0, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1.

20. Ингаляционная фармацевтическая композиция по п.1, в которой гидрофобное биоактивное средство составляет 4 мас.% композиции или менее.

21. Ингаляционная фармацевтическая композиция по п.1, в которой гидрофобное биоактивное средство составляет приблизительно 1 мас.% композиции.

22. Ингаляционная фармацевтическая композиция по п.1, в которой фосфолипид составляет 3 мас.% композиции или менее.

23. Ингаляционная фармацевтическая композиция по п.1, в которой отношение гидрофобного биоактивного средства к фосфолипиду составляет приблизительно 1:1, 4:3 или 4:2,5.

24. Ингаляционная фармацевтическая композиция по п.1, дополнительно содержащая хлорид натрия в количестве менее чем 1,0 мас.% на единицу объема композиции.

25. Ингаляционная фармацевтическая композиция по п.1, дополнительно содержащая соль в фармацевтически приемлемом количестве, достаточном для обеспечения композиции изотонической для человека.

26. Ингаляционная фармацевтическая композиция по п.1, в которой дисперсия представляет собой суспензию, наносуспензию, эмульсию или микроэмульсию.

27. Ингаляционная фармацевтическая композиция по п.1, дополнительно содержащая блок-полимер полиоксипропилена и полиоксиэтилена в концентрации 0,001-5 мас.% от общего веса композиции.

28. Ингаляционная фармацевтическая композиция, содержащая дисперсию липосомных частиц, для непрерывного аэрозольного распыления, содержащая дисперсию липосомных частиц, имеющую средний диаметр, составляющий 30-300 нм, измеренный лазерной дифракцией или динамическим рассеянием света,

причем каждая липосомная частица содержит CoQ10, DPPC и носитель водной дисперсии,

причем отношение CoQ10:DPPC составляет от 5:1 до 1:5, CoQ10 составляет приблизительно 0,1-6 мас.% композиции и липосомные частицы диспергированы в носителе водной дисперсии.

29. Ингаляционная фармацевтическая композиция, содержащая дисперсию липосомных частиц, для непрерывного аэрозольного распыления, содержащая

дисперсию липосомных частиц, имеющую средний диаметр, составляющий 30-300 нм, измеренный лазерной дифракцией или динамическим рассеянием света,

причем каждая частица липосомная содержит CoQ10, DSPC и носитель водной дисперсии,

причем отношение CoQ10:DSPC составляет от 5:1 до 1:5, CoQ10 составляет 0,1-6 мас.% композиции, и липосомные частицы диспергированы в носителе водной дисперсии.

30. Ингаляционная фармацевтическая композиция, содержащая дисперсию липосомных частиц, для непрерывного аэрозольного распыления, содержащая

дисперсию липосомных частиц, имеющую средний диаметр, составляющий 30-300 нм, измеренный лазерной дифракцией или динамическим рассеянием света,

причем каждая липосомная частица содержит CoQ10, DMPC и носитель водной дисперсии,

причем отношение CoQ10:DMPC составляет от 5:1 до 1:5, CoQ10 составляет 0,1-6 мас.% композиции и липосомные частицы диспергированы в носителе водной дисперсии.

31. Способ получения ингаляционной фармацевтической композиции, включающий стадии, на которых

гидратируют фосфолипид с образованием гидратированного фосфолипида;
смешивают гидратированный фосфолипид, гидрофобное биоактивное средство и носитель водной дисперсии с образованием смеси; и

гомогенизируют смесь с образованием дисперсии липосомных частиц, содержащей фосфолипид и гидрофобное биоактивное средство, диспергированные в носителе водной дисперсии, и имеющей средний диаметр, составляющий 30-500 нм, измеренный лазерной дифракцией или динамическим рассеянием света,

причем гидрофобным биоактивным средством является коэнзим Q10,

причем фосфолипид представляет собой дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), димиристоилфосфатидилхолин (DMPS) или их комбинацию,

причем отношение гидрофобного биоактивного средства к фосфолипиду составляет от 5:1 до 1:5, гидрофобное биоактивное средство составляет 0,1-30 мас.% композиции и фосфолипид составляет 0,1-30 мас.% композиции.

32. Способ по п.31, при котором смешивание представляет собой смешивание с высоким усилием сдвига в течение не более 5 мин при 10000-20000 об/мин и при 50-65°C.

33. Способ по п.31, при котором гомогенизация представляет собой микрофлюидизацию.

34. Способ по п.31, при котором гомогенизация представляет собой гомогенизацию под высоким давлением в течение 1-50 проходов при 30000 фунт/дюйм² и при 50-65°C.

35. Способ по п.31, при котором гомогенизация представляет собой ультразвуковую гомогенизацию.

36. Способ введения ингаляционной фармацевтической композиции, включающий аэрозольное распыление дисперсии липосомных частиц с образованием респираторного аэрозоля, содержащего множество капель, характеризующихся средним масс-медианным аэродинамическим диаметром (MMAD), составляющим 1-5 мкм,

причем дисперсия липосомных частиц характеризуется средним диаметром, составляющим 30-500 нм, измеренным лазерной дифракцией или динамическим рассеянием света,

причем каждая липосомная частица содержит гидрофобное биоактивное средство и фосфолипид, диспергированные в носителе водной дисперсии,

причем гидрофобным биоактивным средством является коэнзим Q10,

причем фосфолипид представляет собой дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), димиристоилфосфатидилхолин (DMPS) или их комбинацию,

причем отношение гидрофобного биоактивного средства к фосфолипиду составляет от 5:1 до 1:5, гидрофобное биоактивное средство составляет 0,1-30 мас.% композиции и фосфолипид составляет 0,1-30 мас.% композиции,

причем при введении субъекту композиция обеспечивает непрерывное аэрозольное распыление, достаточное для доставки субъекту терапевтической дозы гидрофобного биоактивного средства.

37. Способ по п.36, причем аэрозольное распыление представляет собой небулизацию с вибрирующей сеткой-мембраной.

38. Способ по п.36, причем аэрозоль характеризуется АРТ, составляющей 50-100% в течение по меньшей мере 15 мин непрерывного аэрозольного распыления.

39. Способ по п.36, причем аэрозоль характеризуется АРТ, составляющей 50-100%.

40. Способ по п.36, причем множество капель имеет MMAD, составляющий 1-5 мкм в течение по меньшей мере 15 мин непрерывного аэрозольного распыления.

41. Способ по п.36, причем MMAD составляет приблизительно 1, 2, 3, 4 или 5 мкм.

42. Способ по п.36, причем капли имеют геометрическое стандартное отклонение (GSD), составляющее по меньшей мере 2,0.

43. Способ по п.36, причем доставка обеспечивает осажденную массовую долю, составляющую по меньшей мере 1%.

44. Способ по п.36, причем доставка обеспечивает местную доставку к легкому по существу без системной доставки.

45. Способ по п.36, причем доставка обеспечивает повышенное количество гидрофобного биоактивного средства в легком в течение по меньшей мере 48 ч после введения.

46. Способ по п.36, причем при непрерывном аэрозольном распылении композиция обеспечивает концентрацию биоактивного средства по меньшей мере 500 мкг/г сырой ткани легкого.

47. Способ по п.36, причем доставка терапевтически эффективного количества гидрофобного биоактивного средства включает отмеривание дозы биоактивного средства.

48. Способ по п.36, причем субъект имеет рак легкого.

49. Способ по п.36, причем субъект имеет одно или несколько из следующего: астма, аллергии, хроническое obstructивное заболевание легких, хронический бронхит, острый бронхит, эмфизема, кистозный фиброз, пневмония, туберкулез, отек легких, синдром острой дыхательной недостаточности, пневмоколиз, интерстициальное заболевание легких, отек легких, эмболия сосудов легких, легочная гипертензия, плевральный выпот, пневмоторакс, мезотелиома, амиотрофический латеральный склероз,

тяжелая миастения и заболевание легких.

50. Способ по п.36, в котором непрерывное аэрозольное распыление имеет длительность, составляющую приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 или 60 мин.

51. Ингаляционная фармацевтическая композиция, содержащая дисперсию липосомных частиц, для непрерывного аэрозольного распыления, полученная способом, включающим стадии

гидратирования фосфолипида с образованием гидратированного фосфолипида;

смешивания гидратированного фосфолипида, гидрофобного биоактивного средства и носителя водной дисперсии с образованием смеси; и

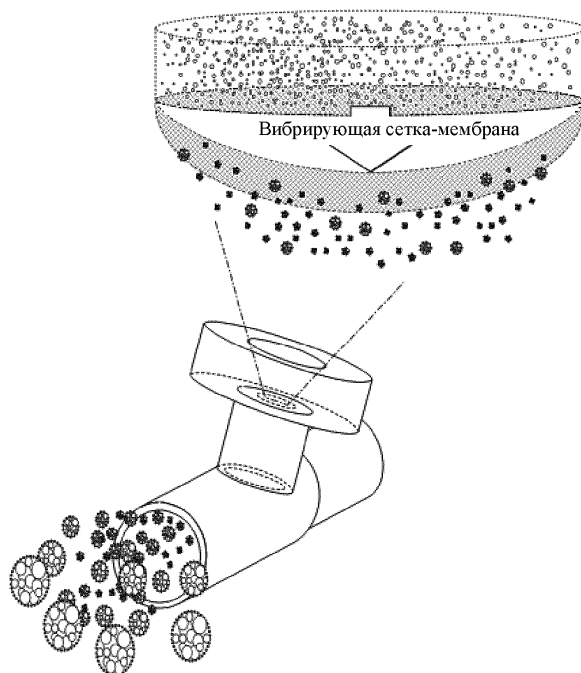
гомогенизации смеси с образованием дисперсии липосомных частиц, содержащей фосфолипид и гидрофобное биоактивное средство, диспергированные в носителе водной дисперсии, и характеризующейся средним диаметром, составляющим 30-500 нм, измеренным лазерной дифракцией или динамическим рассеянием света,

причем гидрофобным биоактивным средством является коэнзим Q10,

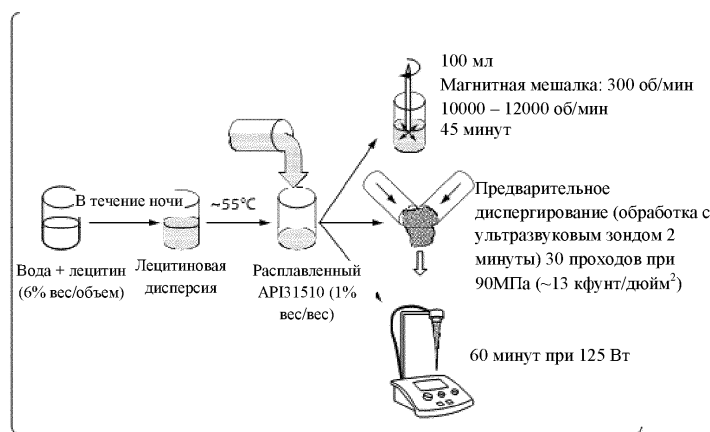
причем фосфолипид представляет собой дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), димиристоилфосфатидилхолин (DMPS) или их комбинацию,

причем отношение гидрофобного биоактивного средства к фосфолипиду составляет от 5:1 до 1:5, гидрофобное биоактивное средство составляет 0,1-30 мас.% композиции и фосфолипид составляет 0,1-30 мас.% композиции.

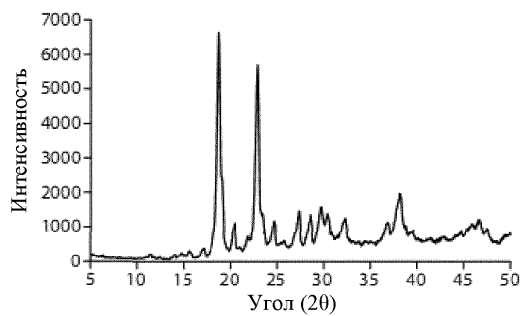
52. Ингаляционная фармацевтическая композиция по п.51, в которой TED составляет по меньшей мере 3600 мкг в течение 15 с.



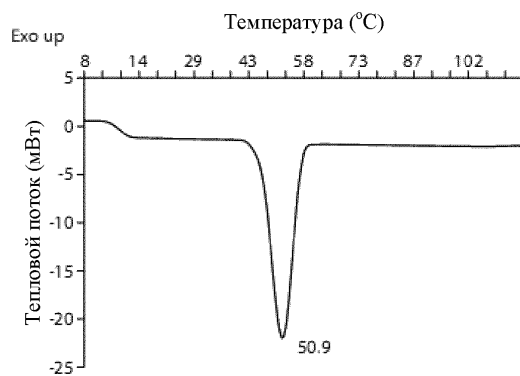
Фиг. 1А



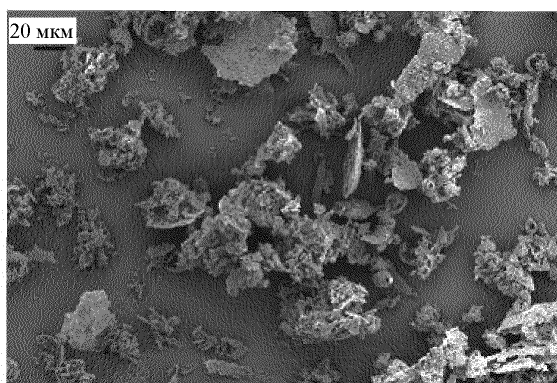
Фиг. 1В



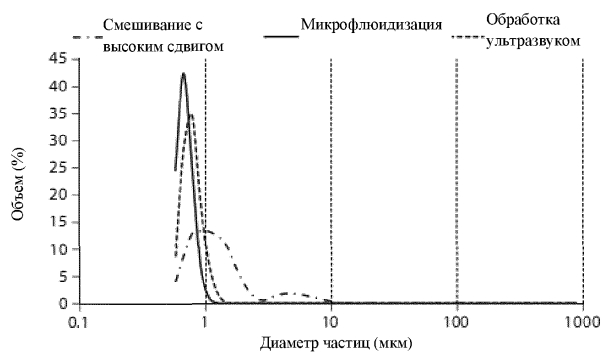
Фиг. 2



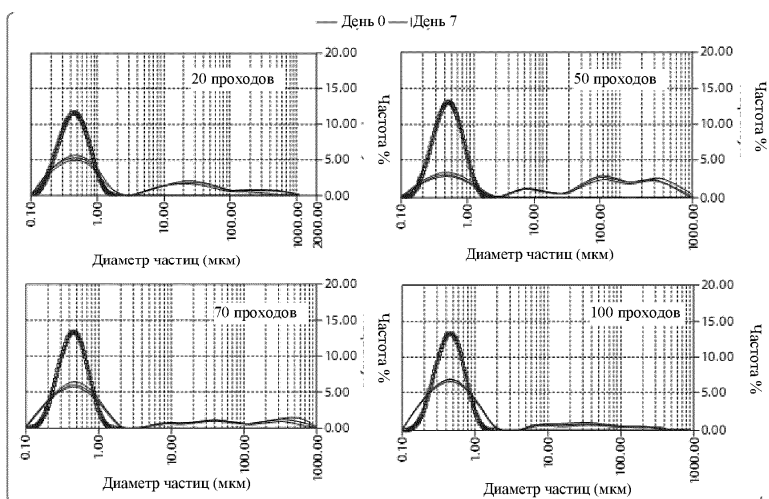
Фиг. 3



Фиг. 4



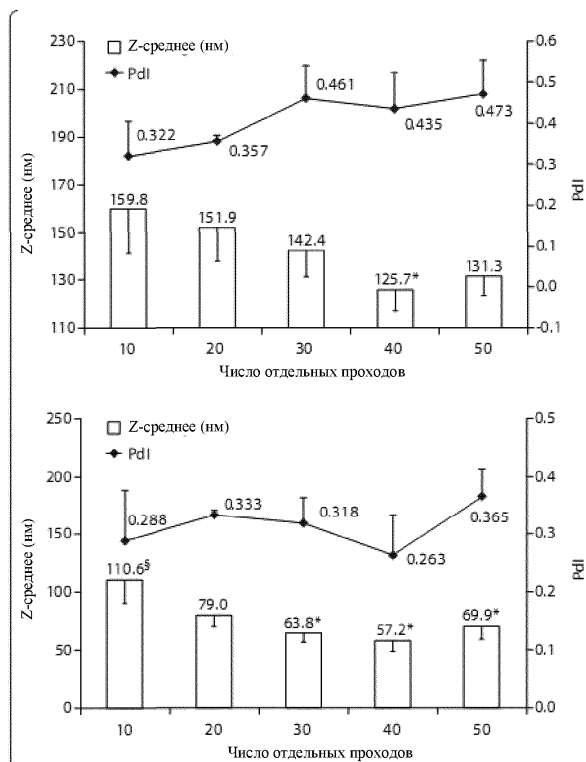
Фиг. 5



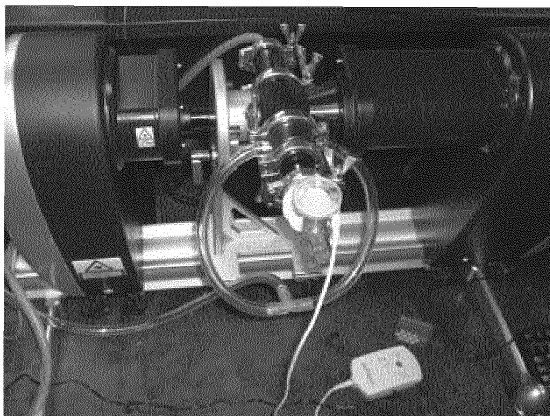
Фиг. 6



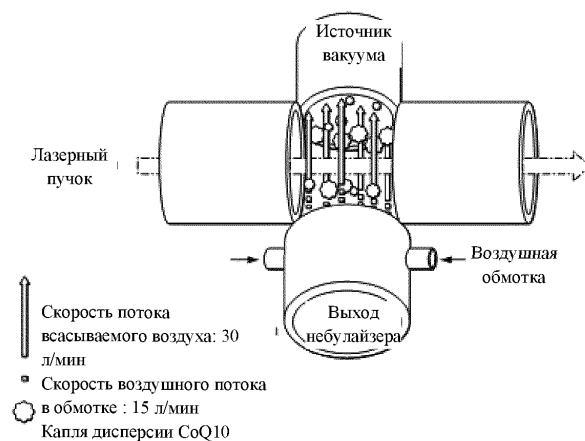
Фиг. 7



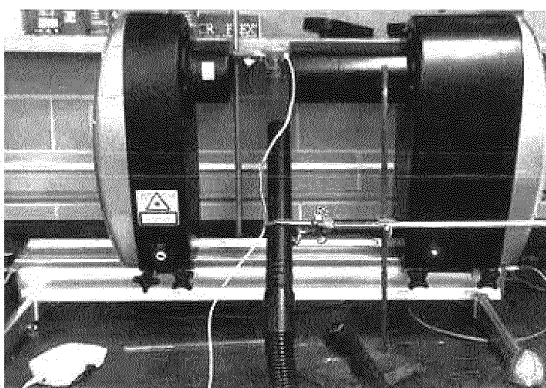
Фиг. 8



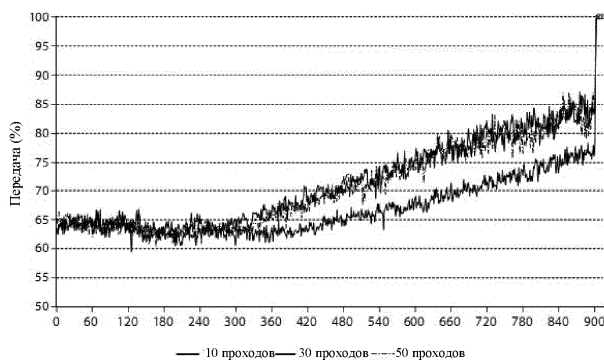
Фиг. 9А



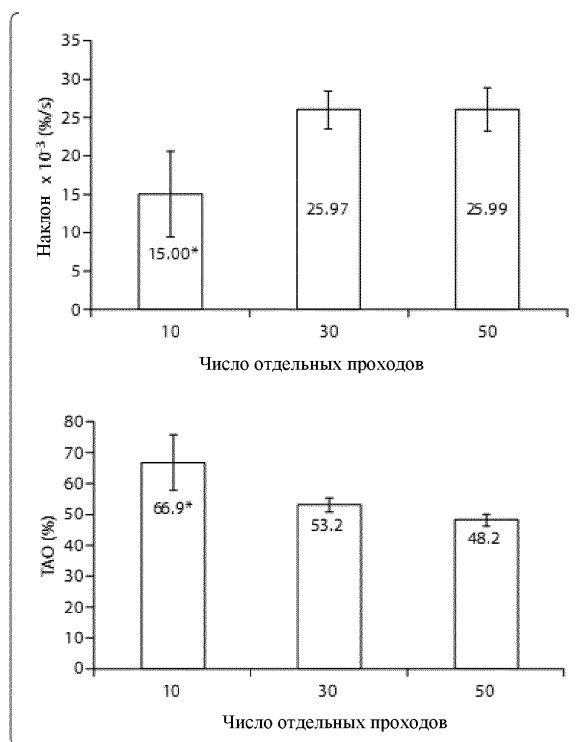
Фиг. 9В



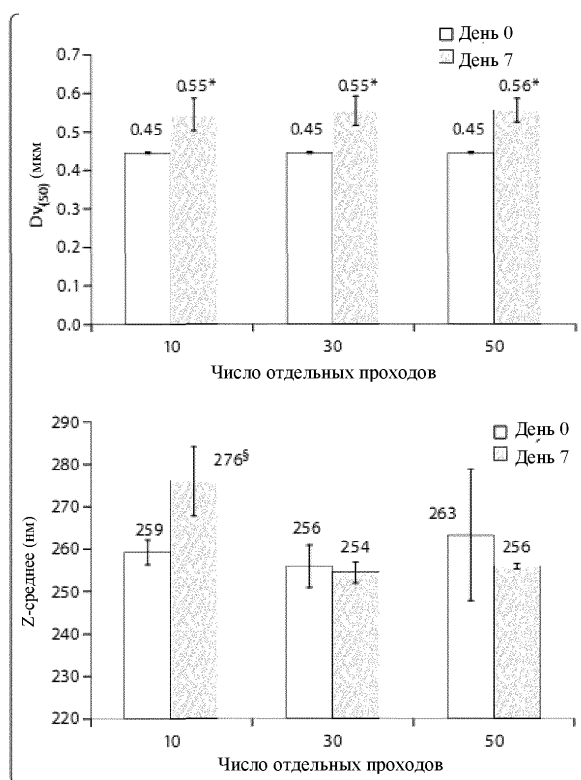
Фиг. 9С



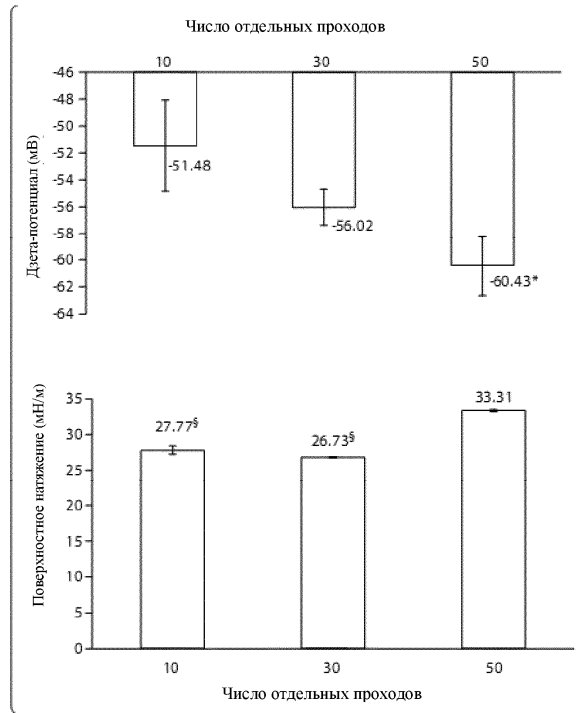
Фиг. 10



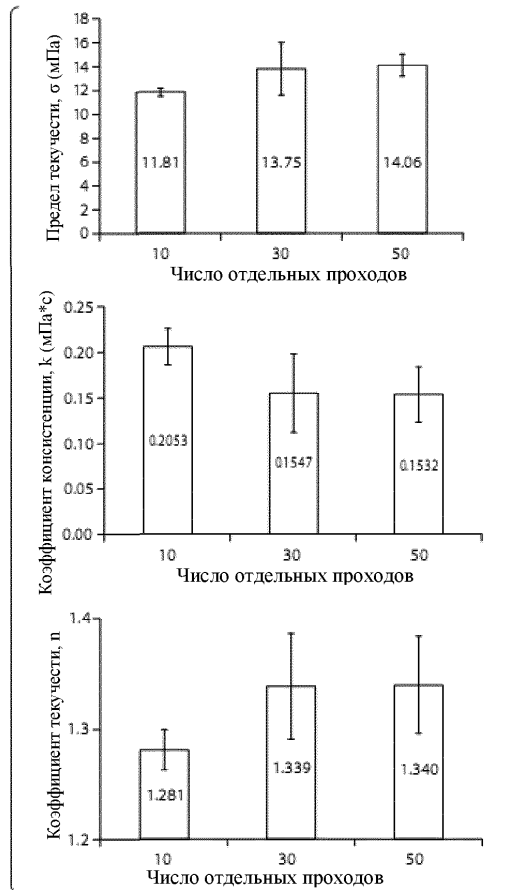
Фиг. 11



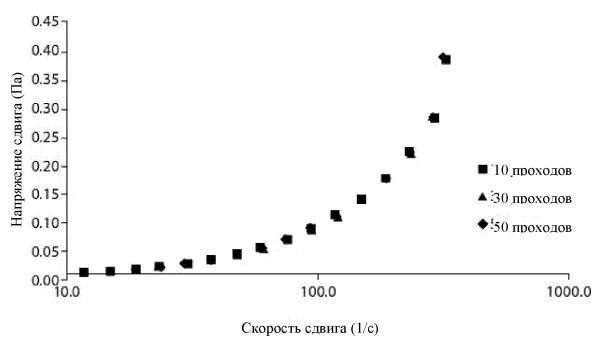
Фиг. 12



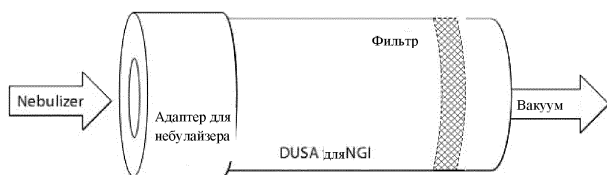
Фиг. 13



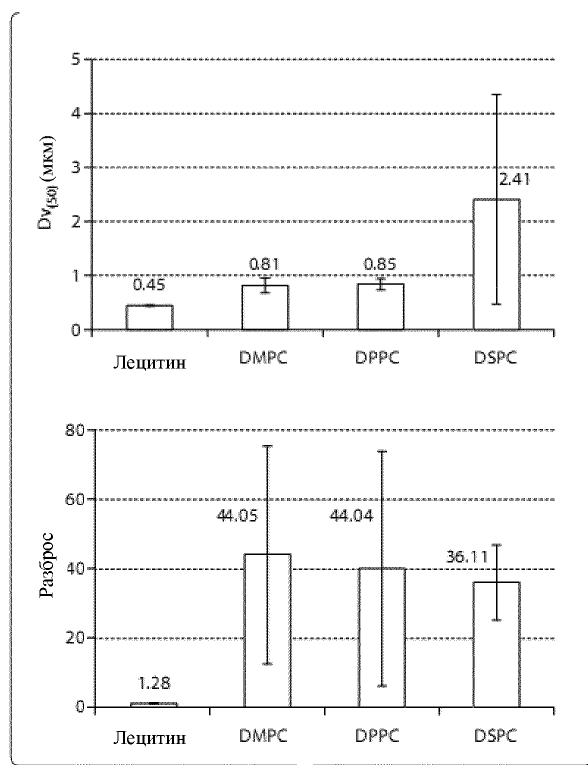
Фиг. 14А



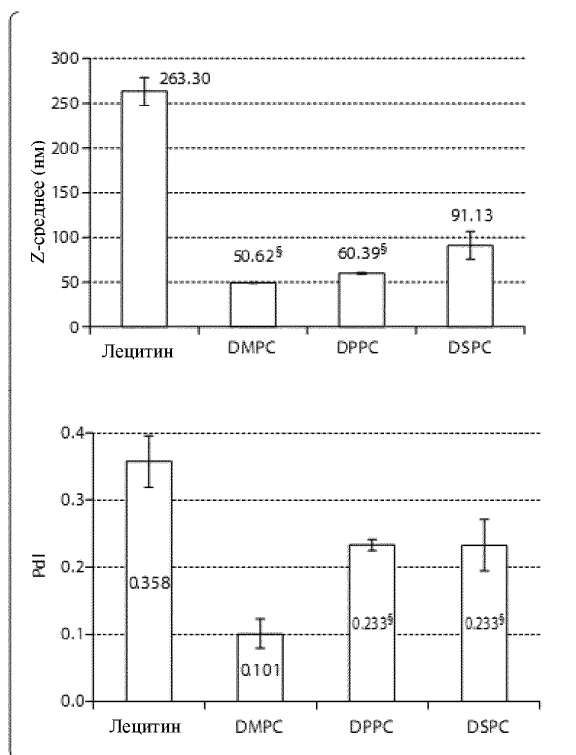
Фиг. 14В



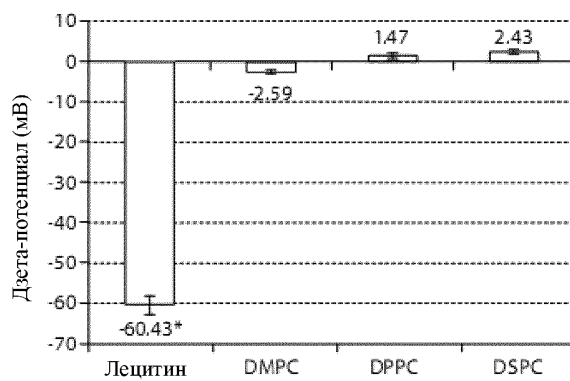
Фиг. 15



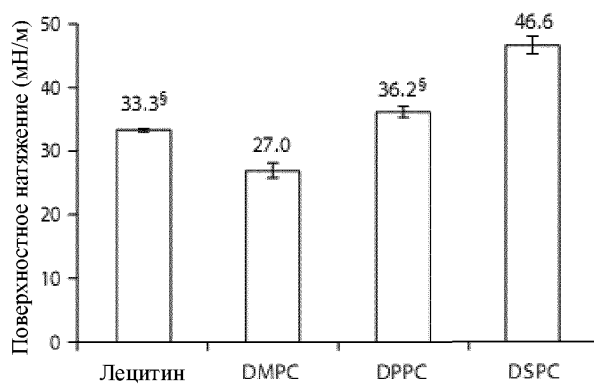
Фиг. 16



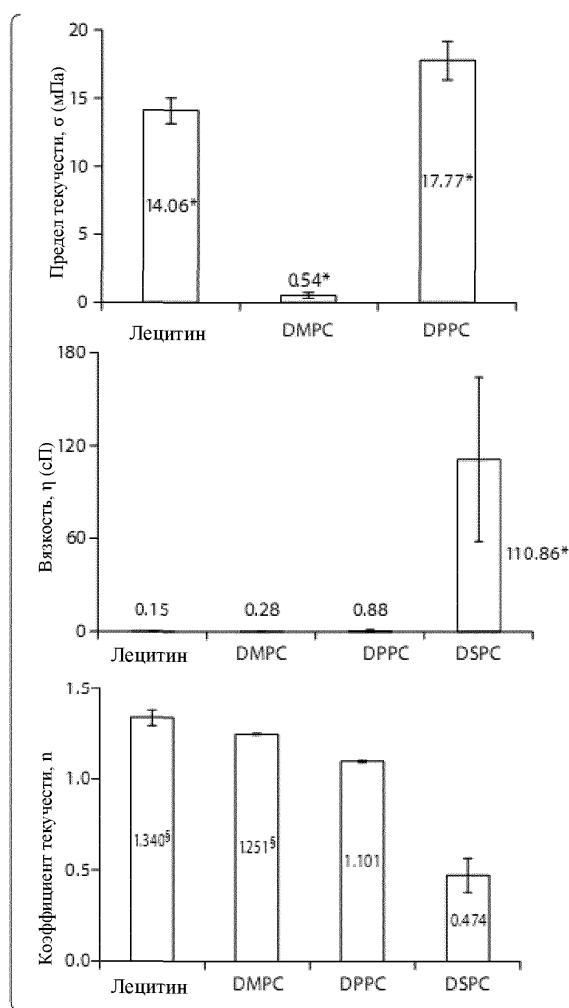
Фиг. 17



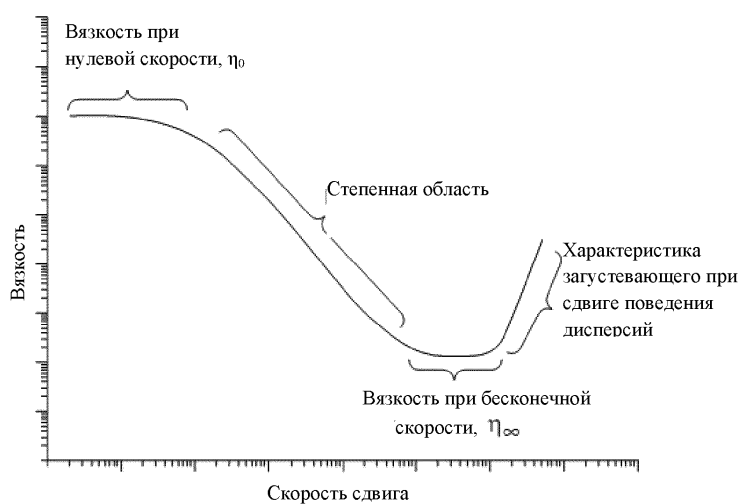
Фиг. 18



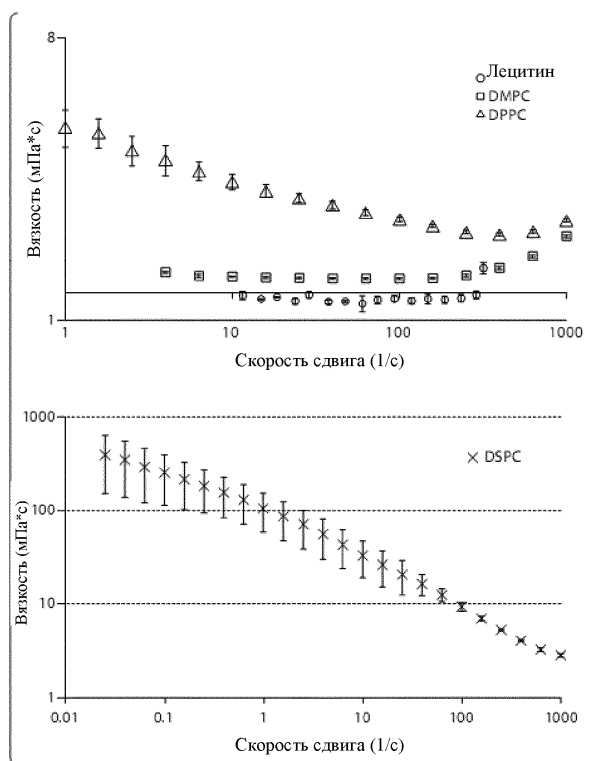
Фиг. 19



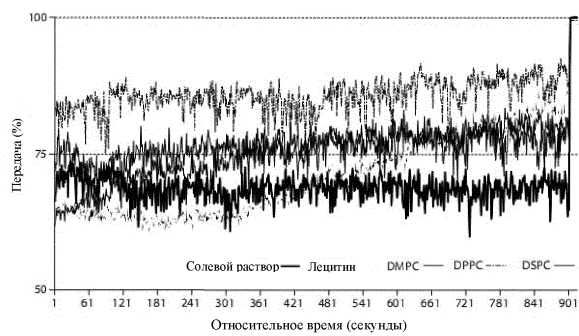
Фиг. 20



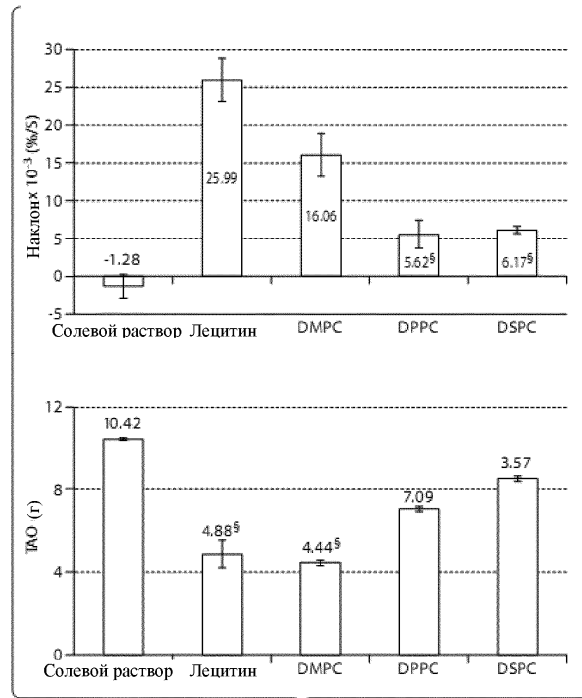
Фиг. 21



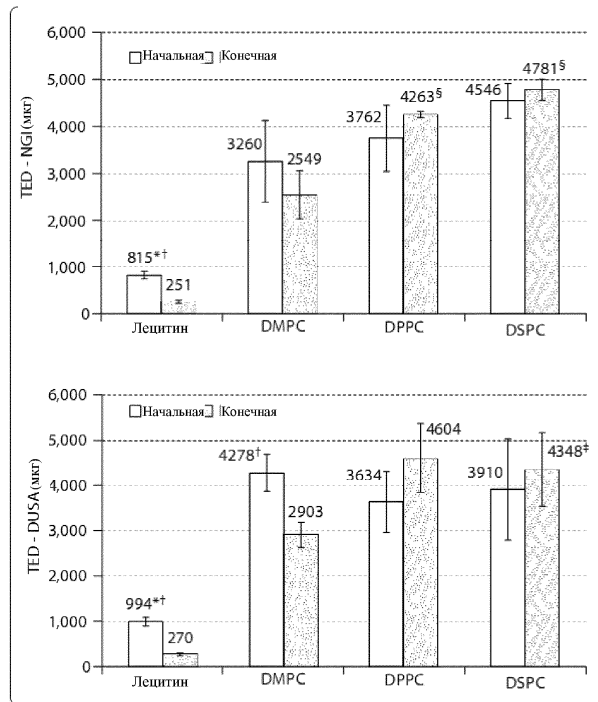
Фиг. 22



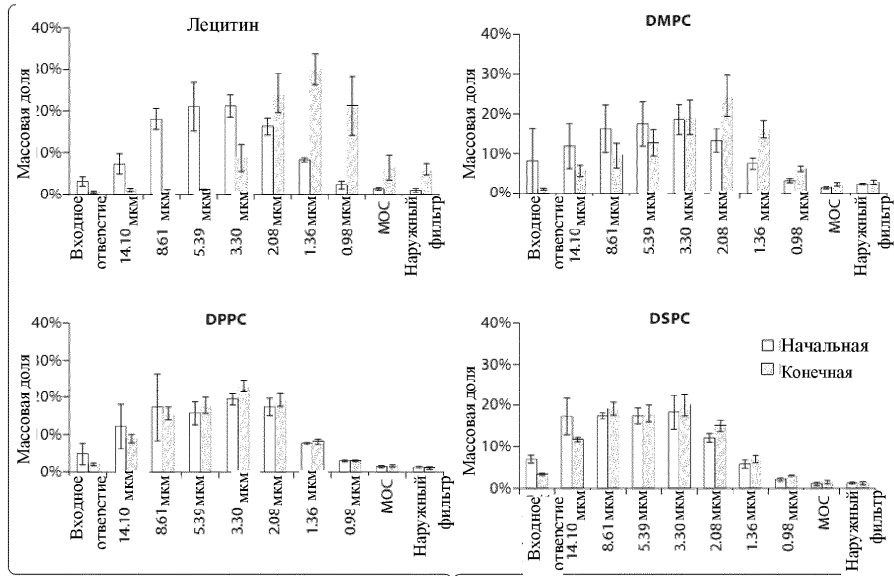
Фиг. 23



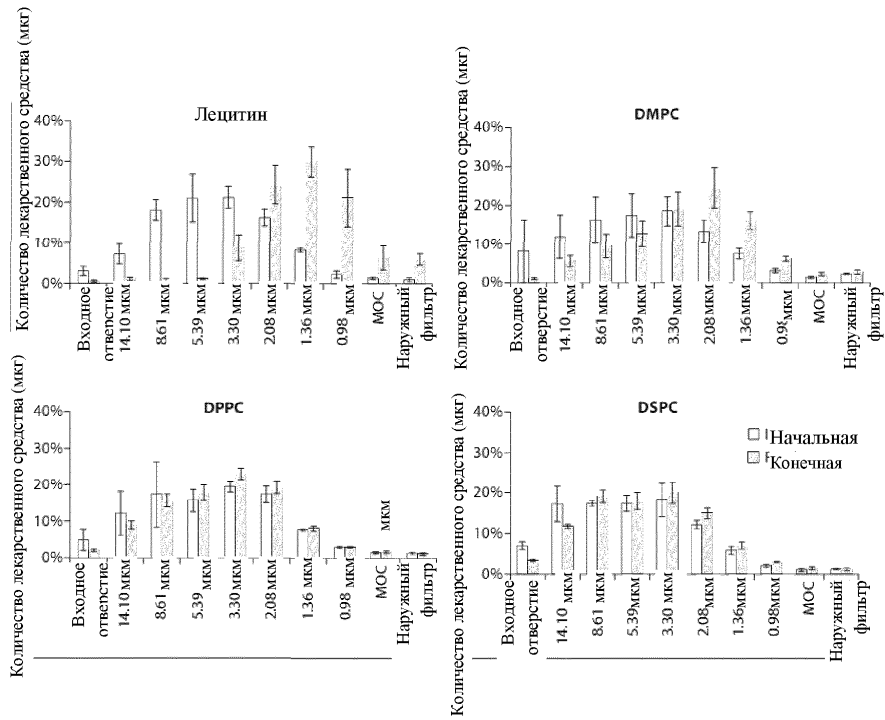
Фиг. 24



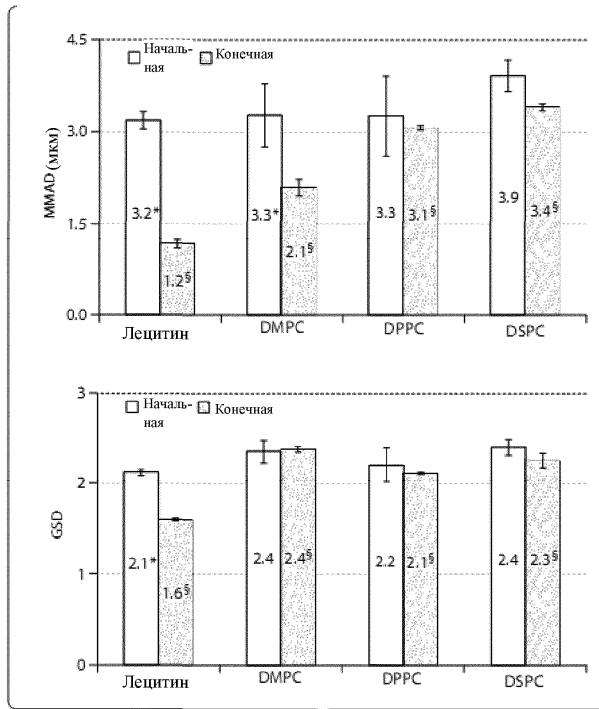
Фиг. 25



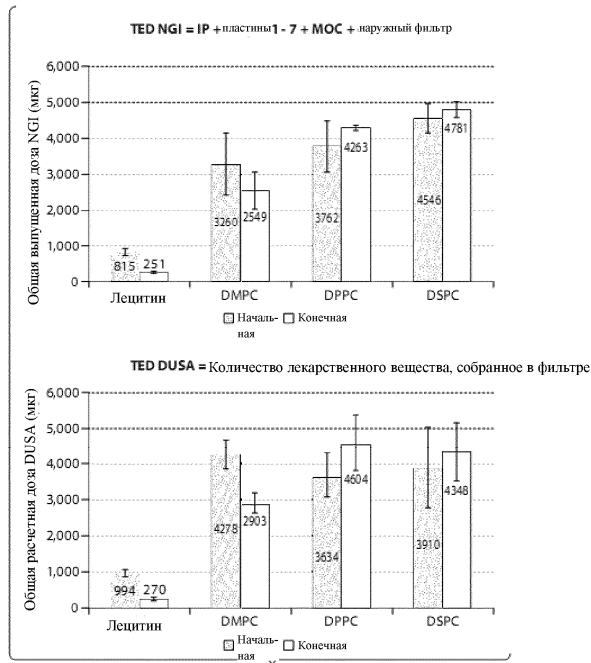
Фиг. 26



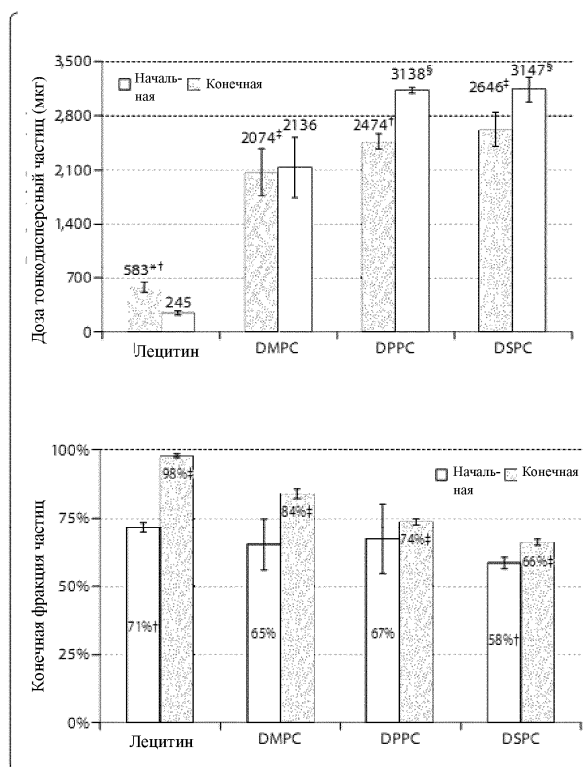
Фиг. 27



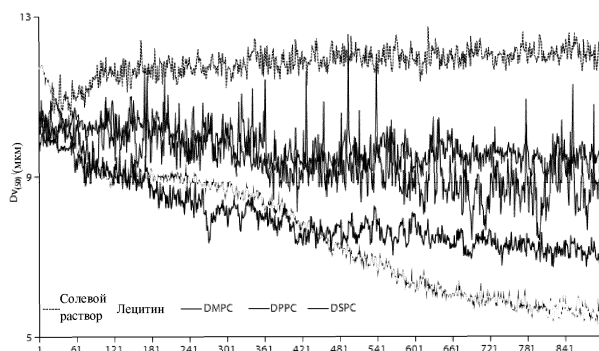
Фиг. 28



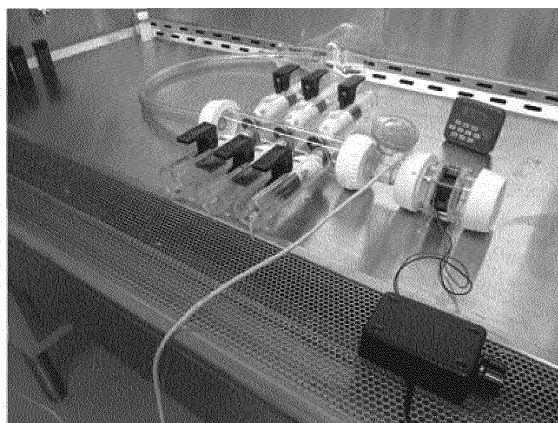
Фиг. 29А



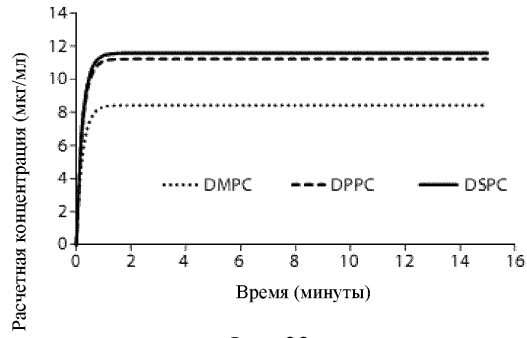
Фиг. 29В



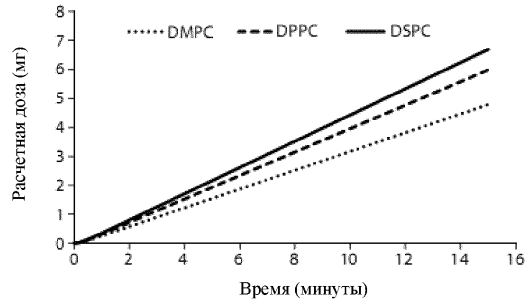
Фиг. 30



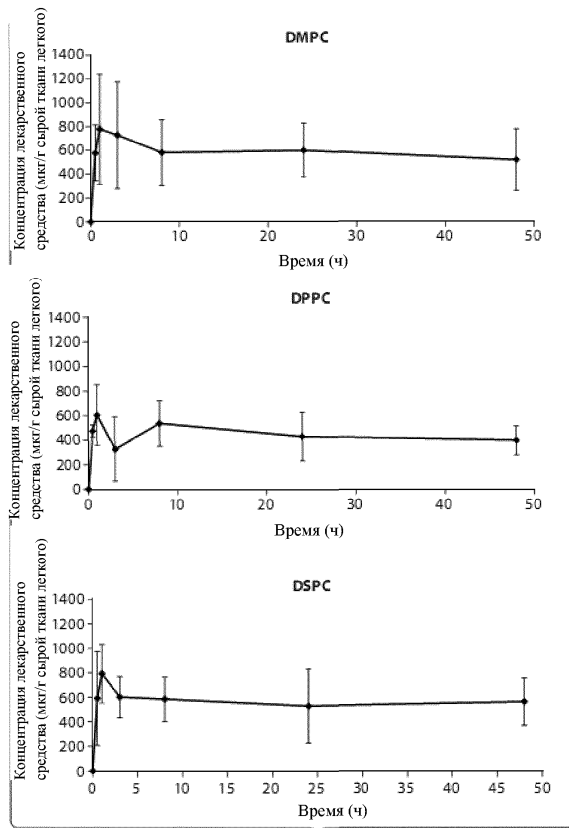
Фиг. 31



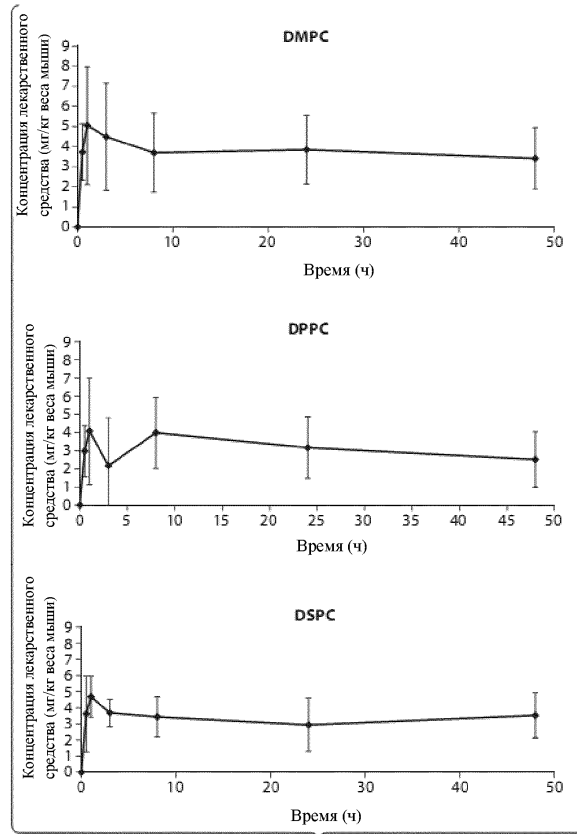
Фиг. 32



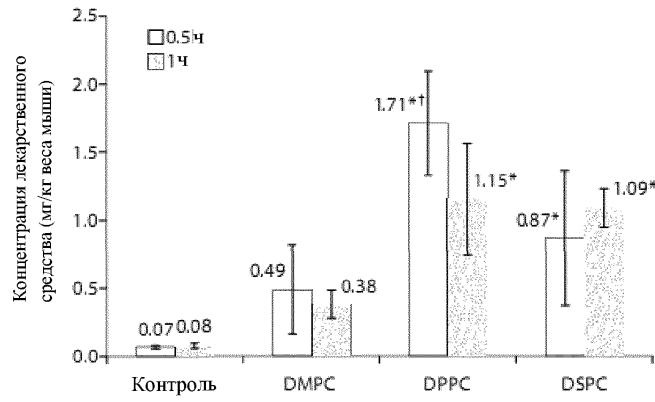
Фиг. 33



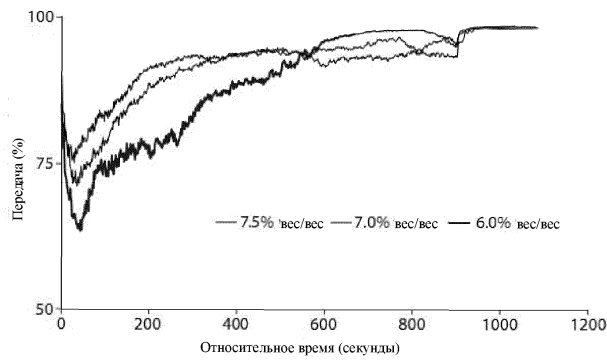
Фиг. 34



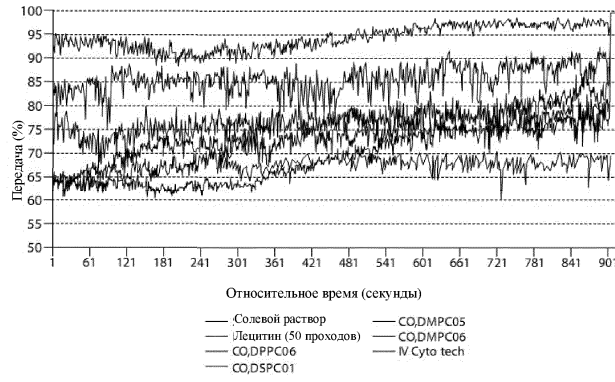
Фиг. 35



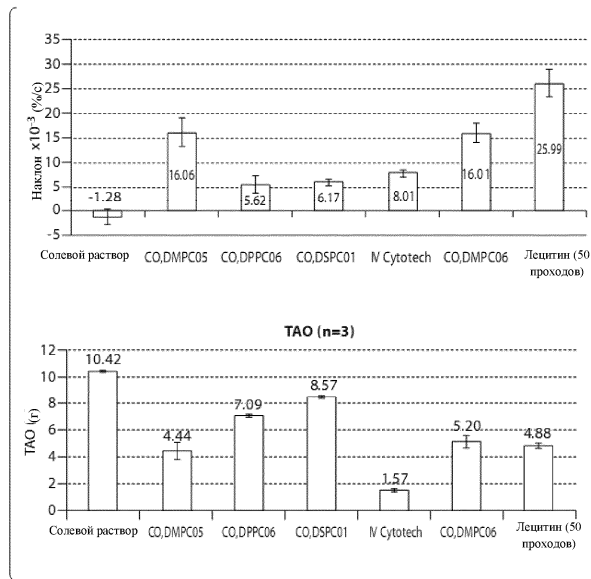
Фиг. 36



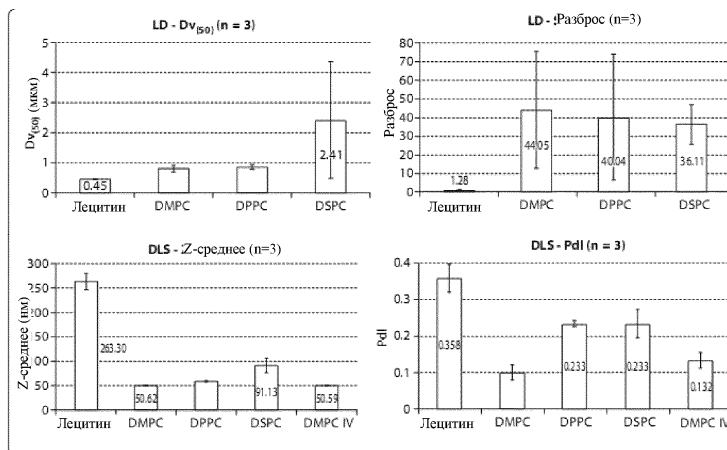
Фиг. 37



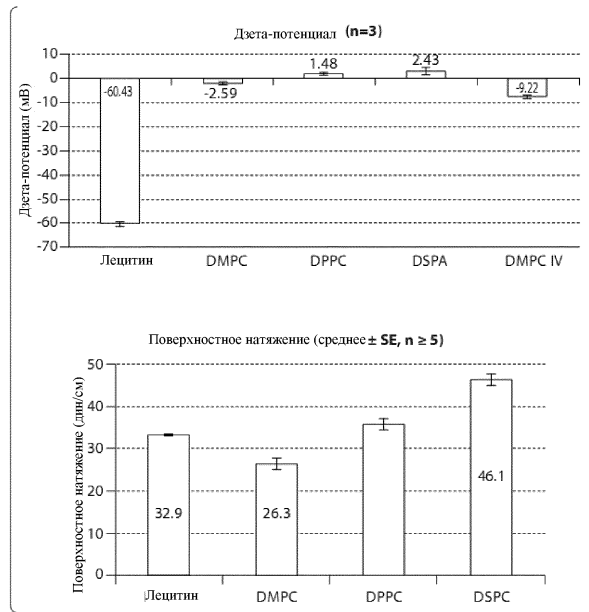
Фиг. 38



Фиг. 39



Фиг. 40



Фиг. 41

