

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **044859**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.10.06**

(51) Int. Cl. **A61K 31/00** (2006.01)

(21) Номер заявки  
**202090317**

(22) Дата подачи заявки  
**2018.09.19**

---

(54) **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ДОСТАВКИ ПЕПТИДА**

---

(31) **201711033555**

(56) US-A1-20060252686  
WO-A1-2016055550  
EP-B1-1800675

(32) **2017.09.21**

(33) **IN**

(43) **2020.06.02**

(86) **PCT/IB2018/057209**

(87) **WO 2019/058273 2019.03.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**АНЯ БИОФАРМ ИНК. (TW)**

(72) Изобретатель:  
**Гшлиссер Зигфрид (TW), Десан  
Бхушан Дхрувкумар (IN)**

(74) Представитель:  
**Зуйков С.А. (RU)**

---

(57) Изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей фармацевтически эффективное количество по меньшей мере одного пептида; и фармацевтически приемлемое количество комбинации (a) по меньшей мере одного металла в виде любой его соли или комбинации соли и его комплекса и (b) по меньшей мере одного восстановителя, при этом по меньшей мере один металл выбран из любого из следующих или комбинации: ванадия, хрома и марганца, при этом комбинация (a) по меньшей мере одного металла в виде любой соли или комбинации соли и комплекса и (b) по меньшей мере одного восстановителя обеспечивает защиту, по меньшей мере, частично по меньшей мере одному пептиду от протеолитической деградации при его приеме внутрь.

**B1**

**044859**

**044859**

**B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение в целом относится к области фармацевтики. В частности, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей пептид в комбинации с солью/комплексом металла и восстановителем для обеспечения защиты, по меньшей мере, частично пептиду от протеолитической деградации при его приеме внутрь.

### Предпосылки создания изобретения

Описание предпосылок создания изобретения включает информацию, которая может быть полезна для понимания настоящего изобретения. Оно не является признанием того, что любая информация, приведенная в настоящем документе, представляет собой известный уровень техники или имеет отношение к заявленному в настоящее время изобретению или что любая публикация, ссылка на которую приводится прямо или косвенно, представляет собой известный уровень техники.

Белки и полипептиды используются в качестве терапевтического агента(ов), диагностического агента(ов) и т.п. с давних времен, и даже сегодня их количество стремительно растет. Однако их полный потенциал еще не реализован, так как их применение ограничено только парентеральным введением.

Оральный путь - это простой, удобный и наиболее предпочтительный путь введения терапевтического агента. Однако деградация пептидов в желудочно-кишечном тракте препятствует их абсорбции в интактной форме. Таким образом, ферментативная деградация в желудочно-кишечном тракте и плохая проницаемость через эпителиальные клетки являются основными причинами их низкой оральной биодоступности.

До этого в течение некоторого периода времени предлагались различные подходы к улучшению оральной биодоступности таких белков и полипептидов, например использование большого количества усилителей абсорбции и ингибиторов протеазы, например соевый ингибитор трипсина, апротинин, ингибитор Боумена-Бирка, бацитрацин, камостат мезилат и амастатин (Ренукунтла Дж. и др., *Int. J. Pharm.*, 2013, 447, 75-93; и заявка US 20070087957 A1). Однако ни один из этих ингибиторов протеазы не преуспел в качестве добавки, применяемой при доставке полипептидных препаратов, изготавливаемой в промышленном масштабе, поскольку они токсичны и могут проявлять некоторые побочные эффекты.

Приведем несколько примеров ингибиторов протеазы, используемых для доставки пептидов.

а) Соя (ингибитор трипсина) - это один из широко распространенных аллергенов, и количество людей, страдающих от сои, неуклонно растет с 1980-х гг., что ограничивает ее использование (Мороз Л.А. и др., *N. Engl. J. Med.*, 1980, 302, 1126-8; Фокард Т. и др., *Allergy*, 1999, 54, 261-5; Рамеш С., *din Rev. Allergy Immunol.*, 2008, 34, 217-30). Она вызывает немедленные аллергические реакции, такие как кашель, чихание, насморк, крапивница, диарея, отек лица, одышка, отек языка, затруднение глотания, пониженное кровяное давление, чрезмерное потоотделение, обморок, анафилактический шок и даже смерть.

б) Боумен (ингибитор Бирка) - это производное сои с высокой оральной биодоступностью даже при отсутствии усилителя абсорбции, однако, как сообщается, оно оказывает нежелательное системное ингибирование протеазы (системное ингибирование сериновых протеаз, таких как плазмин, которое может повышать риск тромбоза) после орального приема. Кроме того, Боумен может также приводить к образованию антител против самого себя (Ван К.С. и др., *Nutr. Cancer*, 2002, 43, 167-73).

в) Апротинин известен тем, что вызывает анафилаксию на уровне 1:200 при первичном использовании (Махди А.М. и др., 2004, 93, 842-58), а также сообщается, что он связан с риском острой почечной недостаточности, инфаркта миокарда, сердечной недостаточности, инсульта и энцефалопатии у пациента, страдающего заболеванием сердца/перенесшего хирургическую операцию (Мангано Д.Т. и др., *N. Engl. J. Med.*, 2006, 354, 353-65).

Поскольку эти ингибиторы протеазы связаны с потенциальными рисками для здоровья, то повсеместно считается, что следует избегать использования этих ингибиторов протеазы. Помимо наличия этих ограничений, их ассоциируют с высокими издержками производства, гетерогенностью, нормативно-правовыми барьерами, трудностями, связанными с достижением селективного ингибирования и необходимостью применения высоких доз для эффективной активности (Ренукунтла Дж. и др., *Int. J. Pharm.*, 2013, 447), что делает их использование нежизнеспособным. Другие ингибиторы протеазы, такие как бацитрацин (антибиотическая активность), камостат мезилат (эффективный при лечении панкреатита) или амастатин (антибактериальная активность), также связаны с подобными побочными эффектами (Ренукунтла Дж. и др., *Int. J. Pharm.*, 2013, 447, 75-93; и публикация заявки US 20070087957 A1). Европейский патент EP 3006045 B1 раскрывает комбинацию микроэлементов, таких как медь или цинк с фармацевтически приемлемым восстановителем, необязательно в комбинации с усилителем абсорбции через слизистые оболочки, что приводит к удивительно высокой и выгодной оральной биодоступности различных пептидных или белковых препаратов. Однако медь и цинк ассоциированы со многими путями метаболизма у млекопитающих, и поэтому их использование в долгосрочной терапии может привести к негативным взаимодействиям.

Таким образом, существует потребность в разработке простых, безопасных, эффективных и экономически выгодных фармацевтических композиций, которые могут доставлять пептид, обеспечивая защиту, по меньшей мере, частично пептидам от протеолитической деградации при их приеме внутрь. Настоящее изобретение удовлетворяет существующие и иные потребности и устраняет недостатки тради-

ционных фармацевтических композиций и методов доставки.

### **Цели изобретения**

Одной целью настоящего изобретения является предложение фармацевтической композиции, которая может преодолеть недостатки, ассоциированные с имеющимися композициями известного уровня техники.

Другой целью настоящего изобретения является предложение фармацевтической композиции для эффективной доставки пептида.

Другой целью настоящего изобретения является предложение фармацевтической композиции для оральной доставки пептида.

Другой целью настоящего изобретения является предложение фармацевтической композиции, которая обеспечивает защиту, по меньшей мере, частично пептиду, подлежащему приему внутрь, от протеолитической деградации.

Другой целью настоящего изобретения является предложение фармацевтической композиции, которая повышает оральную биодоступность пептида.

Другой целью настоящего изобретения является предложение фармацевтической композиции, которая является безопасной.

Другой целью настоящего изобретения является предложение фармацевтической композиции, которая является экономически выгодной для производства.

Другой целью настоящего изобретения является предложение фармацевтической композиции, которую легко получить.

Другой целью настоящего изобретения является предложение фармацевтической композиции, которая обладает длительным сроком хранения.

### **Краткое изложение сущности изобретения**

Настоящее изобретение в целом относится к области фармацевтики. В частности, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей пептид в комбинации с солью/комплексом металла и восстановителем для обеспечения защиты, по меньшей мере, частично пептиду от протеолитической деградации при его приеме внутрь.

В одном аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, включающая фармацевтически эффективное количество по меньшей мере одного пептида; и фармацевтически приемлемое количество комбинации

(a) по меньшей мере одного металла в виде любой его соли или комбинации соли и его комплекса; и

(b) по меньшей мере одного восстановителя,

при этом по меньшей мере один металл выбран из любого из следующих или комбинации: ванадия, хрома и марганца, и

при этом комбинация (a) по меньшей мере одного металла в виде любой его соли или комбинации соли и комплекса и (b) по меньшей мере одного восстановителя обеспечивает защиту, по меньшей мере, частично по меньшей мере одному пептиду от протеолитической деградации при его приеме внутрь.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один металл представляет собой ванадий, при этом фармацевтическая композиция включает любую соль ванадия или комбинацию соли ванадия и комплекс ванадия в количестве от примерно 0,01 мг до примерно 15 мг на единицу дозы. В одном варианте осуществления настоящего изобретения любая из солей ванадия и комплекс ванадия выбраны отдельно из группы, включающей оксид ванадия (V), ванадат натрия, сульфат ванадия, сульфат ванадила, бигуанид ванадия, бис(мальтолато)оксавандий (IV), ацетат ванадия, пиколинат ванадила и цитрат ванадила. В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один металл представляет собой хром, при этом фармацевтическая композиция включает любую соль хрома или комбинацию соли хрома и комплекс хрома в количестве от примерно 0,02 мг до примерно 0,5 мг на единицу дозы. В одном варианте осуществления настоящего изобретения любая из солей хрома и комплекс хрома выбраны отдельно из группы, включающей пиколинат хрома, полиникотинат хрома, никотинат хрома, хлорид хрома и ацетат хрома. В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один металл представляет собой марганец, при этом фармацевтическая композиция включает любую соль марганца или комбинацию соли марганца и комплекс марганца в количестве от примерно 0,1 мг до примерно 10 мг на единицу дозы. В одном варианте осуществления настоящего изобретения любая из солей марганца и комплекс марганца выбраны отдельно из группы, включающей глюконат марганца, сульфат марганца, перманганат калия и хлорид марганца.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один пептид имеет молекулярную массу, равную или меньшую 60 кДа. В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один пептид выбран из группы, включающей инсулин, аналог инсулина, инсулин лизпро, инсулин ПЕГлиспро, инсулин аспарт, инсулин глулизин, инсулин гларгин, инсулин детемир, инсулин НПХ, инсулин деглудек, B29K(N(ε)гексадекандиоил-γ-L-GLu) A14E B25H дез-B30 инсулина человека, B29K(N(ε)октадекандиоил-γ-L-GLu-OEG-OEG) дез-B30 инсулина человека, B29K(N(ε)октадекандиоил-γ-L-GLu) A14E B25H дез-B30 инсулина человека, B29K(N(ε)эйкозандиоил-

$\gamma$ -L-GLu) A14E B25H дез-B30 инсулина человека, B29K(N( $\epsilon$ ))октадекандиоил- $\gamma$ -L-GLu-OEG-OEG) A14E B25H дез-B30 инсулина человека, B29K(N( $\epsilon$ ))эйкозандиоил- $\gamma$ -L-GLu-OEG-OEG) A14E B25H дез-B30 инсулина человека, B29K(N( $\epsilon$ ))эйкозандиоил- $\gamma$ -L-Glu-OEG-OEG) A14E B16H B25H дез-B30 инсулина человека, B29K(N( $\epsilon$ ))гексадекандиоил- $\gamma$ -L-GLu) A14E B16H B25H дез-B30 инсулина человека, B29K(N( $\epsilon$ ))эйкозандиоил- $\gamma$ -L-Glu-OEG-OEG) A14E B16H B25H дез-B30 инсулина человека, B29K(N( $\epsilon$ ))октадекандиоил) A14E B25H дез-B30 инсулина человека, GLP-1, аналог GLP-1, ацилированный аналог GLP-1, диацилированный аналог GLP-1, семаглутид, лираглутид, эксенатид, ликсисенатид, двойной агонист рецептора GLP-1 и рецептора глюкагона, амилин, аналог амилина, прамлинтид, аналог соматостатина, октреотид, ланреотид, пасиреотид, гозерелин, бузерелин, лептин, аналог лептина, метрелептин, пептид YY, аналог пептида YY, глатирамер, лейпролид, терипаратид, абалопаратид, тетракозактид, кортикорелин, этелкалцетид, элкатонин, десмопрессин, гормон роста человека, аналог гормона роста человека, гликопептидный антибиотик, гликозилированный циклический или полициклический нерибосомальный пептидный антибиотик, ванкомицин, тейкопланин, телаванцин, блеомицин, рамопланин, декаплагин, бортезомиб, козинтропин, хорионический гонадотропин, менотропин, серморелин, гормон, стимулирующий высвобождение лютеинизирующего гормона, соматропин, кальцитонин, кальцитонин лосося, пентагастрин, окситоцин, несеритид, анакинра, энфувиртид, пегвисомант, дорназа альфа, лепирудин, анидулафунгин, эптифибатид, интерферон альфакон-1, интерферон альфа-2а, интерферон альфа-2b, интерферон бета-1а, интерферон бета-1b, интерферон гамма-1b, пэгинтерферон альфа-2а, пэгинтерферон альфа-2b, пэгинтерферон бета-1а, фибринолизин, вазопрессин, алдеслейкин, эпоэтин-альфа, дарбэпоэтин-альфа, эпоэтин-бета, эпоэтин-дельта, эпоэтин-омега, эпоэтин-зета, филграстим, интерлейкин-11, циклоспорин, глюкагон, урокиназа, биомидин, гормон, высвобождающий тиреотропин, лейцин-энкефалин, метионин-энкефалин, вещество P, адреноректоротропный гормон, паратиреоидный гормон и их фармацевтически приемлемые соли.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один пептид и по меньшей мере один металл в виде любой его соли или комбинации соли и его комплекс присутствуют в физически разделенном виде в фармацевтической композиции. В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один пептид и по меньшей мере один металл в виде любой его соли или комбинации соли и его комплекс присутствуют в физически разделенной форме в отдельных компартментах. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция присутствует в виде любого из следующих: капсула-в-капсуле и таблетка-в-капсуле.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один восстановитель выбран из любого из следующих или комбинации аскорбиновой кислоты, восстановленного глутатиона, цистеина, мочевой кислоты, восстановительного сахара, глицеральдегида,  $\alpha$ -токоферола, витамина А,  $\alpha$ -липовой кислоты, дигидро- $\alpha$ -липовой кислоты, глюкозы, галактозы, лактозы, мальтозы, тиолсодержащего соединения, тиомера и их фармацевтически приемлемых солей. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция включает по меньшей мере один восстановитель в количестве от примерно 1 мг до примерно 1000 мг на единицу дозы.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция дополнительно включает по меньшей мере один усилитель абсорбции или проницаемости, при этом по меньшей мере один усилитель абсорбции или проницаемости присутствует в количестве от примерно 10 мг до примерно 1000 мг на единицу дозы. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция составлена в виде любой твердой оральной лекарственной формы и жидкой оральной лекарственной формы при условии, что когда указанная фармацевтическая композиция составлена в виде жидкой оральной лекарственной формы, фармацевтическая композиция включает воду в количестве менее примерно 5% объемного содержания.

Различные цели, признаки, аспекты и преимущества объекта изобретения станут более очевидными из следующего подробного описания предпочтительных вариантов осуществления вместе с сопроводительными чертежами, на которых одинаковые цифры представляют одинаковые компоненты.

#### **Краткое описание чертежей**

На чертеже проиллюстрирован график, изображающий профиль зависимости концентрации от времени инсулина гларгина (мЕд/л) из различных составов, в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.

#### **Подробное описание вариантов осуществления изобретения**

Далее приведено подробное описание вариантов осуществления настоящего изобретения, изображенных на сопроводительных чертежах. Варианты осуществления настоящего изобретения представлены достаточно подробно, что позволяет в полной мере раскрыть настоящее изобретение. Однако предлагаемый объем информации не предназначен для ограничения возможных изменений вариантов осуществления настоящего изобретения; напротив, он предназначен для охвата всех модификаций, эквивалентов и альтернатив, согласующихся с существом и объемом настоящего изобретения, как это определено прилагаемой формулой изобретения.

Каждый из прилагаемых пунктов формулы изобретения определяет отдельное изобретение, которое

в целях правонарушения признается включающим эквиваленты различных элементов или ограничения, указанные в формуле изобретения. В зависимости от контекста все приведенные ниже ссылки на настоящее "изобретение" могут в некоторых случаях относиться только к определенным конкретным вариантам осуществления настоящего изобретения. В других случаях будет признано, что ссылки на настоящее "изобретение" будут относиться к объекту, изложенному в по меньшей мере одном, но не обязательно во всех пунктах формулы изобретения.

Используемое в описании в настоящем документе и в самой формуле изобретения смысловое содержание в единственном числе включает ссылку на смысловое содержание во множественном числе, если иное явно не следует из контекста.

Все способы, описанные в настоящем документе, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если иное не указано в настоящем документе или иное явно не противоречит контексту. Использование любых и всех примеров или вводных слов перед примером (например, "такой как"), приведенных в настоящем документе в отношении определенных вариантов осуществления настоящего изобретения, предназначено лишь для лучшего освещения настоящего изобретения и не ограничивает объем настоящего изобретения, заявленный иным образом. Ни одна формулировка, используемая в настоящем описании изобретения, не должна истолковываться как указывающая на любой не заявленный элемент, являющийся существенным для практического применения настоящего изобретения. Различные термины, используемые в настоящем документе, показаны ниже. В той мере, в которой термин, используемый в пункте формулы изобретения, не определен ниже, ему должно быть дано самое широкое определение, которое лица в данной области техники дали этому термину, как это отражено в печатных публикациях и выданных патентах на момент подачи настоящей заявки.

Настоящее изобретение в целом относится к области фармацевтики. В частности, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей пептид в комбинации с солью/комплексом металла и восстановителем для обеспечения защиты, по меньшей мере, частично пептиду от протеолитической деградации при его приеме внутрь. Сериновые протеазы повсеместно встречаются в эукариотах и расщепляют пептидные связи, в которых основной каталитической триадой является серин, гистидин и аспарагиновая кислота. Сериновые протеазы, указанные в настоящем изобретении, включают трипсин, химотрипсин, карбоксипептидазу В и аминопептидазу М, которые отвечают за физиологические функции организма, в частности за дигенерирование (протеолитическая деградация), т.е. за гидролиз пептидных связей и аминокислот. Настоящее изобретение направлено на предложение фармацевтической композиции(й), включающей пептид в комбинации с солью/комплексом металла и восстановителем для обеспечения защиты, по меньшей мере, частично пептиду от протеолитической деградации при его приеме внутрь.

Соответственно в одном аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, включающая

фармацевтически эффективное количество по меньшей мере одного пептида; и

фармацевтически приемлемое количество комбинации

(a) по меньшей мере одного металла в виде любой его соли или комбинации соли и его комплекса; и

(b) по меньшей мере одного восстановителя,

при этом по меньшей мере один металл выбран из любого из следующих или их комбинации ванадия, хрома и марганца, и

при этом комбинация (a) по меньшей мере одного металла в виде любой его соли или комбинации соли и комплекса и (b) по меньшей мере одного восстановителя обеспечивает защиту, по меньшей мере, частично по меньшей мере одному пептиду от протеолитической деградации при его приеме внутрь.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один металл представляет собой ванадий, при этом фармацевтическая композиция включает любую соль ванадия или комбинацию соли ванадия и комплекса ванадия в количестве от примерно 0,01 мг до примерно 5 мг на единицу дозы. В одном варианте осуществления настоящего изобретения любая из солей ванадия и комплекс ванадия выбраны отдельно из группы, включающей оксид ванадия (V), ванадат натрия, сульфат ванадия, сульфат ванадила, бигуанид ванадия, бис(мальтолато)оксавандий (IV), ацетат ванадия, пиколинат ванадила и цитрат ванадила. В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один металл представляет собой хром, при этом фармацевтическая композиция включает любую соль хрома или комбинацию соли хрома и комплекса хрома в количестве от примерно 0,02 мг до примерно 0,5 мг на единицу дозы. В одном варианте осуществления настоящего изобретения любая из солей хрома и комплекс хрома выбраны отдельно из группы, включающей пиколинат хрома, полиникотинат хрома, никотинат хрома, хлорид хрома и ацетат хрома. В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один металл представляет собой марганец, при этом фармацевтическая композиция включает любую соль марганца или комбинацию соли марганца и комплекса марганца в количестве от примерно 0,1 мг до примерно 10 мг на единицу дозы. В одном варианте осуществления настоящего изобретения любая из солей марганца и комплекса марганца выбраны отдельно из группы, включающей глюконат марганца, сульфат марганца, перманганат калия и хлорид марганца.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один пептид имеет

молекулярную массу, равную или меньшую 60 кДа. В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один пептид выбран из группы, включающей инсулин, аналог инсулина, инсулин лизпро, инсулин ПЕГлиспро, инсулин аспарт, инсулин глулизин, инсулин гларгин, инсулин детемир, инсулин НПХ, инсулин деглудек, В29К(N(ε)гексадекандиоил-γ-L-GLu) А14Е В25Н дез-В30 инсулина человека, В29К(N(ε)октадекандиоил-γ-L-GLu-OEG-OEG) дез-В30 инсулина человека, В29К(N(ε)октадекандиоил-γ-L-GLu) А14Е В25Н дез-В30 инсулина человека, В29К(N(ε)эйкозандиоил-γ-L-GLu) А14Е В25Н дез-В30 инсулина человека, В29К(N(ε)октадекандиоил-γ-L-GLu-OEG-OEG) А14Е В25Н дез-В30 инсулина человека, В29К(N(ε)эйкозандиоил-γ-L-GLu-OEG-OEG) А14Е В25Н дез-В30 инсулина человека, В29К(N(ε)эйкозандиоил-γ-L-Glu-OEG-OEG) А14Е В16Н В25Н дез-В30 инсулина человека, В29К(N(ε)гексадекандиоил-γ-L-GLu) А14Е В16Н В25Н дез-В30 инсулина человека, В29К(N(ε)эйкозандиоил-γ-L-Glu-OEG-OEG) А14Е В16Н В25Н дез-В30 инсулина человека, В29К(N(ε)октадекандиоил) А14Е В25Н дез-В30 инсулина человека, GLP-1, аналог GLP-1, ацилированный аналог GLP-1, диацилированный аналог GLP-1, семаглутид, лираглутид, эксенатид, ликсисенатид, двойной агонист рецептора GLP-1 и рецептора глюкагона, амилин, аналог амилина, прамлинтид, аналог соматостатина, октреотид, ланреотид, пасиреотид, гозерелин, бузерелин, лептин, аналог лептина, метрелептин, пептид YY, аналог пептида YY, глатирамер, лейпролид, терипаратид, абалопаратид, тетракозактид, кортикорелин, этелкалцетид, элкатонин, десмопрессин, гормон роста человека, аналог гормона роста человека, гликопептидный антибиотик, гликозилированный циклический или полициклический нерибосомальный пептидный антибиотик, ванкомицин, тейкопланин, телаванцин, блеомицин, рамопланин, декапанин, бортезомиб, козинтропин, хорионический гонадотропин, менотропин, серморелин, гормон, стимулирующий высвобождение лютеинизирующего гормона, соматропин, кальцитонин, кальцитонин лосося, пентагастрин, окситоцин, несеритид, анакинра, энфувиртид, пегвисомант, дорназа альфа, лепирудин, анидулафунгин, эптифибатид, интерферон альфакон-1, интерферон альфа-2а, интерферон альфа-2b, интерферон бета-1а, интерферон бета-1b, интерферон гамма-1b, пэгинтерферон альфа-2а, пэгинтерферон альфа-2b, пэгинтерферон бета-1а, фибринолизин, вазопрессин, алдеслейкин, эпоэтин-альфа, дарбэпоэтин-альфа, эпоэтин-бета, эпоэтин-дельта, эпоэтин омега, эпоэтин зета, филграстим, интерлейкин-11, циклоспорин, глюкагон, урокиназа, биомицин, гормон, высвобождающий тиреотропин, лейцин-энкефалин, метионин-энкефалин, вещество Р, адреноректоротропный гормон, паратиреоидный гормон и их фармацевтически приемлемые соли.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один пептид и по меньшей мере один металл в виде любой его соли или комбинации соли и его комплекса присутствуют в физически разделенном виде в фармацевтической композиции. В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один пептид и по меньшей мере один металл в виде любой его соли или комбинации соли и его комплекса присутствуют в физически разделенной форме в отдельных компартментах. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция присутствует в виде любого из следующих: капсула-в-капсуле и таблетка-в-капсуле.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один восстановитель выбран из любого из следующих или комбинации аскорбиновой кислоты, восстановленного глутатиона, цистеина, мочевой кислоты, восстановительного сахара, глицеральдегида, α-токоферола, витамина А, α-липоевой кислоты, дигидро-α-липоевой кислоты, глюкозы, галактозы, лактозы, мальтозы, тиолсодержащего соединения, тиомера и их фармацевтически приемлемых солей. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция включает по меньшей мере один восстановитель в количестве от примерно 1 мг до примерно 1000 мг на единицу дозы.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция дополнительно включает по меньшей мере один усилитель абсорбции или проницаемости, при этом по меньшей мере один усилитель абсорбции или проницаемости присутствует в количестве от примерно 10 мг до примерно 1000 мг на единицу дозы. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция составлена в виде любой твердой оральной лекарственной формы и жидкой оральной лекарственной формы при условии, что когда указанная фармацевтическая композиция составлена в виде жидкой оральной лекарственной формы, фармацевтическая композиция включает воду в количестве менее примерно 5% объемного содержания.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения пептид представляет собой любой пептид или белок, который подходит для использования в качестве терапевтического или диагностического агента. В одном варианте осуществления настоящего изобретения пептид представляет собой линейный пептид или циклический пептид. В одном варианте осуществления настоящего изобретения пептид представляет собой модифицированный или дериватизированный пептид, такой как ПЕГилированный пептид, или ацилированный пептид жирной кислоты, или ацилированный пептид двухосновной жирной кислоты и т.п.

Пептиды могут не содержать остатков гистидина и/или не содержать остатков цистеина. Обычно является предпочтительным, чтобы пептид был водорастворимым, особенно при нейтральном pH (т.е. при примерно pH 7) и имел по меньшей мере один сайт расщепления сериновой протеазы, т.е. пеп-

тид содержит по меньшей мере один аминокислотный остаток, подверженный или склонный к расщеплению сериновой протеазой (в частности, сериновой протеазой кишечника, такой как трипсин, химотрипсин, аминопептидаза, карбоксипептидаза, эластаза и/или дипептидил-4-пептидаза) и т.п.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения пептид выбран из любого из следующих или комбинации инсулина (в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения инсулина человека), аналога инсулина, такого как, но этим не ограничиваясь, базальный аналог инсулина длительного действия, стабилизированный протеазой базальный аналог инсулина длительного действия, инсулина лизпро, инсулина ПЕГлиспро, производного инсулина, такого как, А14Е, В25Н, В29К(N(ε)октадекандиоил-gClu-OEG-OEG), дез-В30 инсулина человека, инсулина аспарт, инсулина глутинин, инсулина гларгин, инсулина детемир, инсулина НПХ, инсулина деглудек, и аналогов/производных инсулина, описанных в заявке США № 20140056953 А1, GLP-1, аналог GLP-1 (ацилированный аналог GLP-1 или диацилированный аналог GLP-1), семаглутид, лираглутид, эксенатид, ликсисенатид, двойного агониста рецептора GLP-1 и рецептора глюкагона, амилина, аналога амилина, прамлинтида, аналога соматостатина (октреотид, ланреотид или пасиреотид), гозерелина (ацетат гозерелина), бузерелина, лептина, аналога лептина (метрелептин), пептида YY (PYY), аналога пептида PYY, глатирамера (ацетат глатирамера), лейпролида, терипаратида, абалопаратида, тетракозактида, кортикорелина, этелкалцетида, элкатонина, десмопрессина, гормона роста человека (hGH), аналога гормона роста человека, гликопептидного антибиотика (гликозилированный циклический или полициклический нерибосомальный пептид, такой как, ванкомицин, тейкопланин, телаванцин, блеомицин, рамопланин или декапанин), бортезомиба, козинтропина, хорионического гонадотропина, менотропина, серморелина, гормона, стимулирующего высвобождение лютеинизирующего гормона (РФЛГ, также называемый гонадотропин-рилизинг-гормоном), соматропина, кальцитонина (кальцитонин лосося), пентагастрина, окситоцина, несеритида, анакинры, энфувиртида, пегвисоманта, дорназы альфа, лепирудина, анидулафунгина, эпифибатида, интерферона альфакон-1, интерферона альфа-2а, интерферона альфа-2b, интерферона бета-1а, интерферона бета-1b, интерферона гамма-1b, пэгинтерферона альфа-2а (пегилированный интерферон альфа-2а), пэгинтерферона альфа-2b (пегилированный интерферон альфа-2b), пэгинтерферона бета-1а (пегилированный интерферон бета-1а), фибринолизина, вазопрессина, алдеслейкина, эпоэтина альфа, дарбэпоэтина альфа, эпоэтина бета, эпоэтина дельта, эпоэтина омега, эпоэтина зета, филграстима, интерлейкина-11, циклоспорина, глюкагона, урокиназы, виомицина, гормона, высвобождающего тиреотропин (ТРГ), лейцин-энкефалина, метионин-энкефалина, вещества Р (CAS № 33507-63-0), адренотропного гормона (АКТГ), паратиреоидного гормона (ПТГ) и их фармацевтически приемлемых солей. Однако любая другая пептидная молекула, известная или понятная специалисту в данной области техники, может быть использована для достижения своей желаемой цели, как изложено в настоящем изобретении, не выходя за рамки объема и сущности настоящего изобретения.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения для субъекта-человека пептид выбран из любого пептида или комбинации эндогенного пептида, такого как инсулин или глюкагон и т.п. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения используется изоформа соответствующего пептида человека, которая является рекомбинантно экспрессированной или химически синтезированной. Однако любая другая изоформа пептида человека, известная или понятная специалисту в данной области техники, может быть использована для достижения своей желаемой цели, как изложено в настоящем изобретении, не выходя за рамки объема и сущности настоящего изобретения. В одном варианте осуществления настоящего изобретения пептид представляет собой аналог инсулина. В одном варианте осуществления настоящего изобретения аналог инсулина выбран из любого из следующих или комбинации инсулина детемир, инсулина гларгин, инсулина деглудек и других аналогов инсулина, полученных от человека, свиньи, рыбы. Однако любой другой аналог/производное инсулина, известный или понятный специалисту в данной области техники, может быть использован для достижения своей желаемой цели, как изложено в настоящем изобретении, не выходя за рамки объема и сущности настоящего изобретения. В одном варианте осуществления настоящего изобретения можно использовать смесь по меньшей мере двух пептидов. В одном варианте осуществления настоящего изобретения используется смесь инсулина человека и агониста GLP-1 (например, лираглутид, семаглутид, эксенатид или ликсисенатид). Однако смесь любых по меньшей мере двух пептидов (включая пептиды, рассмотренные выше), известная или понятная специалисту в данной области техники, может быть использована для достижения своей желаемой цели, как изложено в настоящем изобретении, не выходя за рамки объема и сущности настоящего изобретения. В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один пептид имеет молекулярную массу, равную или меньшую 60 кДа. В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один пептид имеет молекулярную массу, равную или меньшую 40 кДа. В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один пептид имеет молекулярную массу, равную или меньшую 30 кДа. В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один пептид имеет молекулярную массу, равную или меньшую 20 кДа. В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один пептид имеет молекулярную массу, равную или меньшую 10 кДа. В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один пептид имеет молекулярную массу, находящуюся в диапазоне от примерно равной

или большей 300 Да до примерно равной или меньшей 50 кДа. Однако пептид с любым диапазоном молекулярной массы, известный или понятный специалисту в данной области техники, может быть использован для достижения своей желаемой цели, как изложено в настоящем изобретении, не выходя за рамки объема и сущности настоящего изобретения.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения молекулярную массу по меньшей мере одного пептида можно определить любым способом, таким как масс-спектрометрия (масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением (ESI-MS) или масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-MS)), гель-электрофорез (электрофорез в полиакриламидном геле с использованием додецилсульфата натрия (SDS-PAGE)), гидродинамические способы (гель-фильтрационная хроматография или седиментация в градиенте) или статическое светорассеяние (например, многоугловое светорассеяние (MALS)), известным или понятным специалисту в данной области техники, для достижения своей желаемой цели, как изложено в настоящем изобретении, не выходя за рамки объема и сущности настоящего изобретения.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один металл представляет собой ванадий, при этом фармацевтическая композиция включает любую соль ванадия или комбинацию соли ванадия и комплекс ванадия. В одном варианте осуществления настоящего изобретения любая соль ванадия или комбинация соли ванадия и комплекс ванадия выбраны отдельно из группы, включающей ванадий (IV), ванадий (V) и ванадий в виде комплекса соли ванадила (V02) и ванадий в виде аниона в соли/комплексе ванадата. В одном варианте осуществления настоящего изобретения соль ванадия и комплексы ванадия выбраны из любого из следующих или комбинации оксида ванадия (V), пентоксида ванадия, диоксида ванадия, ванадата натрия, сульфата ванадия, сульфата ванадила, метаванадата натрия, четыреххлористого ванадия, оксихлорида ванадия (V), треххлористого ванадия, ванадилхлорида, трихлорокси ванадия, ванадата аммония, оксида ванадия аммония, моносulfида ванадия, сульфид ванадия, хлорида ванадия (IV), бигуанида ванадия, бис(мальтолато)оксавандия (IV), ацетата ванадия, пиколината ванадила, цитрата ванадила и т.п. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, соль и комплекс ванадия представляют собой ванадий (V). Преимущество состоит в использовании солей и комплекса ванадия (V), благодаря их хорошей растворимости в воде и лучшей устойчивости к окислению по сравнению с солями и комплексами ванадия (IV). В одном варианте осуществления настоящего изобретения соли и комплексы ванадия представляют собой соль и/или комплекс ванадия (IV), при этом ванадий является частью аниона в виде ванадата или частью катиона в виде ванадила. Однако любые соли ванадия или комбинация солей и комплексов ванадия, известные или понятные специалисту в данной области техники, могут быть использованы для достижения своей желаемой цели, как изложено в настоящем изобретении, не выходя за рамки объема и сущности настоящего изобретения.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция включает любую соль ванадия или комбинацию соли ванадия и комплекса ванадия в количестве от примерно 0,01 мг до примерно 15,0 мг на единицу дозы.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения соль хрома и комплекс хрома выбраны в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения из соли и/или комплекса хрома (III). В одном варианте осуществления настоящего изобретения любая соль хрома или комбинация соли хрома и комплекс хрома выбраны из пиколината хрома, хлорида хрома, никотината хрома, полиникотината хрома, ацетата хрома, трехвалентного хрома, дрожжей с высоким содержанием хрома, 2-пиридинкарбоксилата хрома, трипиколината хрома, соли 2-пиридинкарбоновой кислоты хрома, трис(пиколинато)хрома и т.п. В одном варианте осуществления настоящего изобретения соль хрома и комплекс хрома выбраны в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения из пиколината хрома, полиникотината хрома, никотината хрома, хлорида хрома, ацетата хрома и т.п. Однако любые соли хрома или комбинация солей и комплексов хрома, известные или понятные специалисту в данной области техники, могут быть использованы для достижения своей желаемой цели, как изложено в настоящем изобретении, не выходя за рамки объема и сущности настоящего изобретения.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция включает любую соль хрома или комбинацию соли хрома и комплекса хрома в количестве от примерно 0,01 мг до примерно 50 мг на единицу дозы, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - от примерно 0,02 мг до примерно 0,5 мг на единицу дозы.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения любая соль марганца или комбинация соли марганца и комплекса марганца выбраны из соли и/или комплекса марганца (II), соли и/или комплекса марганца (III), марганца в виде соли и/или комплекса перманганата (V02). В одном варианте осуществления настоящего изобретения любые соли марганца или комбинация солей марганца и комплексы марганца выбраны из любого из следующих или комбинации сульфата марганца (II) ( $MnSO_4$ ), хлорида марганца (II) ( $MnCl_2$ ), ацетата марганца (III), перманганата калия, перманганата натрия, глюконата марганца и т.п. В одном варианте осуществления настоящего изобретения соль марганца и комплекс марганца выбраны в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения из соли и/или комплекса марганца (III). В одном варианте осуществления настоящего изобретения соли и/или комплексы марганца (III) выбраны из любого из следующих или комбинации глюконата марганца, суль-

фата марганца, хлорида марганца и т.п. Однако любые соли марганца или комбинация солей и комплексы марганца, известные или понятные специалисту в данной области техники, могут быть использованы для достижения своей желаемой цели, как изложено в настоящем изобретении, не выходя за рамки объема и сущности настоящего изобретения. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция включает любую соль марганца или комбинацию соли марганца и комплекс марганца в количестве от примерно 0,01 мг до примерно 50 мг на единицу дозы, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - от примерно 0,1 мг до примерно 10 мг на единицу дозы.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения любые соли и комплексы ванадия, хрома и марганца, известные или понятные специалисту в данной области техники, могут быть использованы для достижения своей желаемой цели, как изложено в настоящем изобретении, не выходя за рамки объема и сущности настоящего изобретения.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения соли и комплексы ванадия предпочтительнее солей и комплексов хрома и марганца, поскольку соли и комплексы ванадия значительно улучшают оральную биодоступность пептидов. В одном варианте осуществления настоящего изобретения соли и комплексы хрома предпочтительнее солей и комплексов марганца. В одном варианте осуществления настоящего изобретения использование солей и комплексов хрома также является преимуществом, поскольку они менее токсичны. В одном варианте осуществления настоящего изобретения использование солей и комплексов марганца является преимуществом по сравнению с солями ванадия и хрома, поскольку соли и комплексы марганца безопасны для человека даже в больших дозах.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения восстановитель выбран из любого из следующих или комбинации аскорбиновой кислоты (в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения из аскорбата, такого как аскорбат натрия), восстановленного глутатиона (GSH), цистина, мочевой кислоты, восстановленного сахара (восстановительный моносахарид, такой как глюкоза, глицеральдегид или галактоза, или восстановленный дисахарид, такой как лактоза или мальтоза), маннитола,  $\alpha$ -токоферола, витамина А,  $\alpha$ -липоевой кислоты, дигидро- $\alpha$ -липоевой кислоты (DHLA), тиолосодержащих соединений, тиомера (включает тиомеры Лаффлер Ф. и др., Future Med. Chem., 2012, 4, 2205-16) и т.п. В одном варианте осуществления настоящего изобретения могут быть использованы смеси по меньшей мере двух восстановителей, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - аскорбата и восстановленного глутатиона. Однако любой восстановитель(и) или комбинация восстановителя(ей), известный или понятный специалисту в данной области техники, может быть использован для достижения своей желаемой цели, как изложено в настоящем изобретении, не выходя за рамки объема и сущности настоящего изобретения.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция включает восстановитель в количестве от примерно 1,0 мг до примерно 1000 мг на единицу дозы, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения от примерно 50 мг до примерно 500 мг на единицу дозы.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция дополнительно включает по меньшей мере один усилитель абсорбции (или усилитель проницаемости). Следует иметь в виду, что термины "усилитель абсорбции" и "усилитель проницаемости", используемые в настоящем документе как взаимозаменяемые и синонимичные на протяжении всего описания настоящего изобретения, охватывают своим значением усилители абсорбции и усилители проницаемости, будучи известными или понятными специалисту в данной области техники. В одном варианте осуществления настоящего изобретения введение по меньшей мере одного усилителя абсорбции или проницаемости улучшает или облегчает абсорбцию через слизистые оболочки пептида в желудочно-кишечном тракте, особенно, если пептид имеет большой размер. В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один усилитель абсорбции или проницаемости выбран из любого из следующих или комбинации цвиттер-ионного усилителя абсорбции или неионного усилителя проницаемости. В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один усилитель абсорбции выбран из любого из следующих или комбинации  $C_{8-20}$ -алканойл карнитина (в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - из лауроил карнитина, миристоил карнитина или пальмитоил карнитина; например, из лауроил карнитин хлорида, миристоил карнитин хлорида или пальмитоил карнитин хлорида), салициловой кислоты (в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения из салицилата, например салицилата натрия), производного салициловой кислоты (такого как 3-метоксисалициловая кислота, 5-метоксисалициловая кислота или гомованилиновая кислота,  $C_{8-20}$ -алкановая кислота (в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения  $C_{8-20}$ -алканойл, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения капрат, каприлат, мирилат, пальмитат или стеарат, такие как капрат натрия, каприлат натрия, мирилат натрия, пальмитат натрия или стеарат натрия), лимонной кислоты (в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения из цитрата, такого как, цитрат натрия), аминокислоты, ацилированной жирной кислотой (любая из аминокислот, ацилированных жирной кислотой, раскрытых в заявке на патент US 20140056953 A1, но не ограничиваясь этим, лауроил аланинат натрия, N-додеканоил-L-аланин, лауроил аспарагинат натрия, N-додеканоил-L-аспарагин, лау-

роил аспарагиновая кислота натрия, N-додеканоил-L-аспарагиновая кислота, лауроил цистеинат натрия, N-додеканоил-L-цистеин, лауроил глутаминовая кислота натрия, N-додеканоил-L-глутаминовая кислота, лауроил глутаминат натрия, N-додеканоил-L-глутамин, лауроил глицинат натрия, N-додеканоил-L-глицин, лауроил гистидинат натрия, N-додеканоил-L-гистидин, лауроил изолейцинат натрия, N-додеканоил-L-изолейцин, лауроил лейцинат натрия, N-додеканоил-L-лейцин, лауроил метионинат натрия, N-додеканоил-L-метионин, лауроил фенилаланинат натрия, N-додеканоил-L-фенилаланин, лауроил пролинат натрия, N-додеканоил-L-пролин, лауроил серинат натрия, N-додеканоил-L-серин, лауроил треонинат натрия, N-додеканоил-L-треонин, лауроил триптофанат натрия, N-додеканоил-L-триптофан, лауроил тирозинат натрия, N-додеканоил-L-тирозин, лауроил валинат натрия, N-додеканоил-L-валин, лауроил саркозинат натрия, N-додеканоил-L-саркозин, каприновый аланинат натрия, N-деканойл-L-аланин, каприновый аспарагинат натрия, N-деканойл-L-аспарагин, каприновая аспарагиновая кислота натрия, N-деканойл-L-аспарагиновая кислота, каприновой цистеинат натрия, N-деканойл-L-цистеин, каприновая глутаминовая кислота натрия, N-деканойл-L-глутаминовая кислота, каприновый глутаминат натрия, N-деканойл-L-глутамин, каприновой глицинат натрия, N-деканойл-L-глицин, каприновый гистидинат натрия, N-деканойл-L-гистидин, каприновый изолейцинат натрия, N-деканойл-L-изолейцин, каприновый лейцинат натрия, N-деканойл-L-лейцин, каприновый метионинат натрия, N-деканойл-L-метионин, каприновый фенилаланинат натрия, N-деканойл-L-фенилаланин, каприновый пролинат натрия, N-деканойл-L-пролин, каприновый серинат натрия, N-деканойл-L-серин, каприновый треонинат натрия, N-деканойл-L-треонин, каприновой триптофанат натрия, N-деканойл-L-триптофан, каприновый тирозинат натрия, N-деканойл-L-тирозин, каприновый валинат натрия, N-деканойл-L-валин, каприновый саркозинат натрия, N-деканойл-L-саркозин, олеил саркозинат натрия, N-дециллейцин натрия, стеароил глутамат натрия (Amisoft HS-11 P), миристоил глутамат натрия (Amisoft MS-11), лауроил глутамат натрия (Amisoft LS-11), кокоил глутамат натрия (Amisoft CS-11), кокоил глицинат натрия (Amilite GCS-11), N-дециллейцин натрия, кокоил глицин натрия, кокоил глутамат натрия, лауроил аланинат натрия, N-додеканоил-L-аланин, лауроил аспарагинат натрия, N-додеканоил-L-аспарагин, лауроил аспарагиновая кислота натрия, N-додеканоил-L-аспарагиновая кислота, лауроил цистеинат натрия, N-додеканоил-L-цистеин, лауроил глутаминовая кислота натрия, N-додеканоил-L-глутаминовая кислота, лауроил глутаминат натрия, N-додеканоил-L-глутамин, лауроил глицинат натрия, N-додеканоил-L-глицин, лауроил гистидинат натрия, N-додеканоил-L-гистидин, лауроил изолейцинат натрия, N-додеканоил-L-изолейцин, лауроил лейцинат натрия, N-додеканоил-L-лейцин, лауроил метионинат натрия, N-додеканоил-L-метионин, лауроил фенилаланинат натрия, N-додеканоил-L-фенилаланин, лауроил пролинат натрия, N-додеканоил-L-пролин, лауроил серинат натрия, N-додеканоил-L-серин, лауроил треонинат натрия, N-додеканоил-L-треонин, лауроил триптофанат натрия, N-додеканоил-L-триптофан, лауроил тирозинат натрия, N-додеканоил-L-тирозин, лауроил валинат натрия, N-додеканоил-L-валин, N-додеканоил-L-саркозин, каприновый аланинат натрия, N-деканойл-L-аланин, каприновый аспарагинат натрия, N-деканойл-L-аспарагин, каприновая аспарагиновая кислота натрия, N-деканойл-L-аспарагиновая кислота, каприновой цистеинат натрия, N-деканойл-L-цистеин, каприновая глутаминовая кислота натрия, N-деканойл-L-глутаминовая кислота, каприновый глутаминат натрия, N-деканойл-L-глутамин, каприновой глицинат натрия, N-деканойл-L-глицин, каприновый гистидинат натрия, N-деканойл-L-гистидин, каприновый изолейцинат натрия, N-деканойл-L-изолейцин, каприновый лейцинат натрия, N-деканойл-L-лейцин, каприновой метионинат натрия, N-деканойл-L-метионин, каприновый фенилаланинат натрия, N-деканойл-L-фенилаланин, каприновый пролинат натрия, N-деканойл-L-пролин, каприновой серинат натрия, N-деканойл-L-серин, каприновый треонинат натрия, N-деканойл-L-треонин, каприновый триптофанат натрия, N-деканойл-L-триптофан, каприновый тирозинат натрия, N-деканойл-L-тирозин, каприновой валинат натрия, N-деканойл-L-валин, каприновый саркозинат натрия, олеил саркозинат натрия и фармацевтически приемлемые соли любого из вышеупомянутых соединений, такие как, C<sub>8-20</sub>-алканойл саркозинат (лауроил саркозинат, такой как, лауроил саркозинат натрия) или одна из 20 стандартных протеиногенных α-аминокислот, которая ацилирована C<sub>8-20</sub>-алкановой кислотой), алкилсахарида (C<sub>1-20</sub>-алкилсахарид, такой как, C<sub>8-20</sub>-алкилполисахарид, такой как, Multitrope™ 1620-LQ-(MV) или n-октил-β-D-глюкопиранозид, или n-додецил-β-D-мальтозид), циклодекстрина (α-циклодекстрин, β-циклодекстрин, γ-циклодекстрин, метил-β-циклодекстрин, гидроксипропил β-циклодекстрин или сульфобутилэфир β-циклодекстрин), N-[8-(2-гидроксibenзоил)амино]каприлата натрия (SNAC), тиомера (включает тиомеры, которые раскрыты в работе Лаффлер Ф. и др., Future Med. Chem., 2012, 4, 2205-16), соединения хелатного кальция (этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), этиленгликоль тетрауксусная кислота (EGTA), цитрат натрия или полиакриловая кислота), кремофора EL (Коллифор EL; CAS № 61791-12-6), хитозана, N,N,N-триметил хитозана, бензалкония хлорида, бестатина, цетилпиридиния хлорида, цетилтриметиламмония бромид, C<sub>2-20</sub>-алканол (например, этанол, деканол, лауриловый спирт, миристиловый спирт или пальмитиловый спирт), C<sub>8-20</sub>-алкенола (например, олеиловый спирт), C<sub>8-20</sub>-алкеновой кислоты (например, олеиновая кислота), сульфата декстрана, моноэтилового эфира диэтиленгликоля (транскутола), 1-додецилазацикло-гептан-2-он (Azone®), этилкаприлата, глицерилмонолаурата, лизофосфатидилхолина, ментола, C<sub>8-20</sub>-алкиламина, а C<sub>8-20</sub>-алкениламина (например, олеиламин),

фосфатидилхолина, полоксамера, полиэтиленгликоль монолаурата, полиоксиэтилена, полипропиленгликоль монолаурата, полисорбата (полисорбат 80), дезоксихолата (дезоксихолат натрия), гликохолата натрия, гликодезоксихолата натрия, лаурилсульфата натрия (SDS), таурохолата (например, таурохолат натрия), тауродезоксихолата (тауродезоксихолат натрия), лаурата сахарозы, сульфоксида ((C<sub>1-10</sub>-алкил)-(C<sub>1-10</sub>-алкил)-сульфоксид, такой как, децилметилсульфоксид или диметилсульфоксид), циклопентадекалактона, 8-(N-2-гидрокси-5-хлор-бензоил)-аминокаприловой кислоты (5-CNAC), додецил-2-N,N-диметиламино пропионата (DDAIP), D- $\alpha$ -токоферил полиэтиленгликоль-1000 сукцината (TPGS) и фармацевтически приемлемых солей вышеупомянутых соединений и т.п. В одном варианте осуществления настоящего изобретения можно использовать смесь любых из по меньшей мере двух усилителей абсорбции, включая вышеописанные усилители абсорбции. Однако любая комбинация усилителя(ей) абсорбции, известная или понятная специалисту в данной области техники, может быть использована для достижения своей желаемой цели, как изложено в настоящем изобретении, не выходя за рамки объема и сущности настоящего изобретения. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция необязательно включает усилитель абсорбции или проницаемости в количестве от примерно 10 мг до примерно 1000 мг на единицу дозы, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения от примерно 50 мг до примерно 500 мг на единицу дозы.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция составлена таким образом, что, если фармацевтическую композицию добавить к десяти миллилитрам 5%-ного раствора HCl, то она будет нейтрализовать кислоту и генерировать pH со значением выше примерно 6. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция составлена таким образом, что, если фармацевтическую композицию добавить к десяти миллилитрам водного раствора, то она будет генерировать pH со значением от 6 до 9.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическую композицию, включающую фармацевтически эффективное количество по меньшей мере одного пептида, имеющего молекулярную массу, равную или меньшую 50 кДа, по меньшей мере, любую соль ванадия или комбинацию соли ванадия и комплекс ванадия по меньшей мере один восстановитель и необязательно усилитель абсорбции, вводят орально для обеспечения защиты, по меньшей мере, частично по меньшей мере одному пептиду от протеолитической деградации при приеме внутрь.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическую композицию, включающую фармацевтически эффективное количество по меньшей мере одного пептида, имеющего молекулярную массу, равную или меньшую 50 кДа, по меньшей мере, любую соль хрома или комбинацию соли хрома и комплекс хрома по меньшей мере один восстановитель и необязательно усилитель абсорбции, вводят орально для обеспечения защиты, по меньшей мере, частично по меньшей мере одному пептиду от протеолитической деградации при приеме внутрь. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическую композицию, включающую фармацевтически эффективное количество по меньшей мере одного пептида, имеющего молекулярную массу, равную или меньшую 50 кДа, по меньшей мере, любую соль марганца или комбинацию соли марганца и комплекс марганца по меньшей мере один восстановитель и необязательно усилитель абсорбции, вводят орально для обеспечения защиты, по меньшей мере, частично по меньшей мере одному пептиду от протеолитической деградации при приеме внутрь.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция дополнительно включает необязательно любые фармацевтически приемлемые эксципиенты или комбинацию по меньшей мере одного фармацевтически приемлемого эксципиента, такого как, но этим не ограничиваясь, носитель, разбавитель, наполнитель, дезинтегрант, смазывающий агент, связующее вещество, краситель, пигмент, стабилизатор, консервант, антиоксидант и/или усилитель растворимости. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция необязательно дополнительно включает по меньшей мере одну фармацевтически приемлемую добавку, такую как витамин E, гистидин, микрокристаллическую целлюлозу (МСС), маннит, крахмал, сорбит и/или лактозу. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтические композиции могут быть составлены с помощью любых методов, известных или понятных специалисту в данной области техники, для достижения своей желаемой цели, как изложено в настоящем изобретении, не выходя за рамки объема и сущности настоящего изобретения.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один усилитель растворимости выбран из любого поли(этиленгликоля) или комбинации поли(этиленгликоля), включая поли(этиленгликоль), имеющий молекулярную массу в диапазоне от примерно 200 до примерно 5000 Да, этиленгликоль, пропиленгликоль, неионные поверхностно-активные вещества, тилоксапол, полисорбат 80, макрогол-15-гидроксистеарат, фосфолипиды, лецитин, димиристоилфосфатидилхолин, дипальмитоилфосфатидилхолин, дистеароилфосфатидилхолин, циклодекстрины,  $\alpha$ -циклодекстрин,  $\beta$ -циклодекстрин,  $\gamma$ -циклодекстрин, гидроксиэтил- $\beta$ -циклодекстрин, гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин, гидроксиэтил- $\gamma$ -циклодекстрин, гидроксипропил- $\gamma$ -циклодекстрин, дигидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин, сульфобутилэфир- $\beta$ -циклодекстрин, сульфобутилэфир- $\gamma$ -циклодекстрин, глюкозил- $\alpha$ -циклодекстрин, глюкозил- $\beta$ -

циклодекстрин, диглюкозил- $\beta$ -циклодекстрин, мальтозил- $\alpha$ -циклодекстрин, мальтозил- $\beta$ -циклодекстрин, мальтозил- $\gamma$ -циклодекстрин, мальтотриозил- $\beta$ -циклодекстрин, мальтотриозил- $\gamma$ -циклодекстрин, димальтозил- $\beta$ -циклодекстрин, метил- $\beta$ -циклодекстрин, карбоксиалкил тиоэфиры, гидроксипропилметилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, поливинилпирролидон, сополимеры винилацетата, винилпирролидон, лаурилсульфат натрия, диоктилсульфосукцинат натрия и т.п. Однако любая комбинация усилителя(ей) растворимости, известная или понятная специалисту в данной области техники, может быть использована для достижения своей желаемой цели, как изложено в настоящем изобретении, не выходя за рамки объема и сущности настоящего изобретения. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция составлена в виде лекарственной формы для орального введения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения перорального введения. В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один пептид по меньшей мере один металл в виде любой его соли или комбинации соли и его комплекс по меньшей мере один восстановитель и необязательный усилитель абсорбции вводят орально.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения оральная фармацевтическая лекарственная форма выбрана из любого из следующих или комбинации таблеток (покрытые или непокрытые оболочкой таблетки), капсул (мягкие желатиновые капсулы, твердые желатиновые капсулы, капсулы из НРМС или капсулы из НРМСР), капсула-в-капсуле, таблетка-в-капсуле, пастилок для рассасывания, троше, вагинальных суппозиториях, растворов, эмульсий, суспензий, сиропов, эликсиров, порошков, гранул для восстановления, диспергируемых порошков и гранул, медицинских жевательных резинок, жевательных таблеток, шипучих таблеток, лекарственных форм, состоящих из множества частиц, и т.п. Однако любая оральная фармацевтическая лекарственная форма(ы) или комбинация оральной фармацевтической лекарственной формы(форм), известная или понятная специалисту в данной области техники, может быть использована для достижения своей желаемой цели, как изложено в настоящем изобретении, не выходя за рамки объема и сущности настоящего изобретения. В одном варианте осуществления настоящего изобретения таблетки могут включать любые эксципиенты или комбинацию эксципиентов, такие как, но этим не ограничиваясь, микрокристаллическая целлюлоза, лактоза, цитрат натрия, карбонат кальция, двухосновный фосфат кальция, глицин, дезинтегранты, такие как крахмал (в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения кукурузный, картофельный или тапиоковый крахмал), гликолят крахмала натрия, кроскармеллоза натрия и некоторые комплексные силикаты, и гранулированные связующие вещества, такие как поливинилпирролидон, гидроксипропилметилцеллюлоза (НРМС), гидроксипропилцеллюлоза (НПС), сахароза, желатин, аравийская камедь, смазывающие агенты, такие как, стеарат магния, стеариновая кислота, глицерилбегенат и тальк. Однако любой эксципиент(ы) или комбинация эксципиента(ов), известный или понятный специалисту в данной области техники, может быть использован для достижения своей желаемой цели, как изложено в настоящем изобретении, не выходя за рамки объема и сущности настоящего изобретения.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения капсула может включать любые эксципиенты или комбинацию эксципиентов, таких как, но этим не ограничиваясь, лактоза, крахмал, целлюлоза или высокомолекулярные полиэтиленгликоли. Однако любой эксципиент(ы) или комбинация эксципиента(ов), известный или понятный специалисту в данной области техники, может быть использован для достижения своей желаемой цели, как изложено в настоящем изобретении, не выходя за рамки объема и сущности настоящего изобретения. В одном варианте осуществления настоящего изобретения водные суспензии и/или эликсиры могут включать любые эксципиенты или комбинацию эксципиентов, таких как, но этим не ограничиваясь, подсластители или ароматизаторы, красящие вещества или красители, эмульгирующие и/или суспендирующие агенты и разбавители, такие как вода, этанол, пропиленгликоль и глицерин. Однако любой эксципиент(ы) или комбинация эксципиента(ов), известный или понятный специалисту в данной области техники, может быть использован для достижения своей желаемой цели, как изложено в настоящем изобретении, не выходя за рамки объема и сущности настоящего изобретения.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция составлена в виде любой твердой оральной лекарственной формы и жидкой оральной лекарственной формы при условии, что когда фармацевтическая композиция составлена в виде жидкой оральной лекарственной формы, фармацевтическая композиция включает воду в количестве менее примерно 5% объемного содержания, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения менее примерно 3% объемного содержания, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения менее примерно 1% объемного содержания, в еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения менее примерно 0,5% объемного содержания и в еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения менее примерно 0,1% объемного содержания, но в еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения без воды. В одном варианте осуществления настоящего изобретения такая жидкая оральная лекарственная форма представляет собой особое преимущество, поскольку она обеспечивает улучшенную стабильность при хранении. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения такая жидкая оральная лекарственная форма

может быть получена непосредственно перед введением, и следует избегать длительного хранения.

Количество ванадия, хрома и/или марганца, используемое в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, значительно ниже рекомендуемых уровней суточного потребления этих микроэлементов и поэтому может рассматриваться как безопасное. Кроме того, ванадий, хром и/или марганец в комбинации с восстановителем оказывают ингибирующее действие на сериновые протеазы в желудочно-кишечном тракте, но не проявляют системного эффекта, что обеспечивает дальнейшее повышение безопасности, по сравнению с рассмотренными выше ингибиторами протеаз. Более того, ванадий, хром или марганец, а также восстановители, такие как аскорбат или восстановленный глутатион, могут быть предложены при значительно более низких издержках производства, чем рассмотренные выше ингибиторы протеаз, которые ранее предлагались для оральной доставки пептидных или белковых препаратов. Определять фактическую дозировку, которая будет наиболее подходящей для конкретного субъекта, будет, как правило, лечащий врач. Конкретный уровень дозы и частота дозировки для любого конкретного субъекта могут варьироваться и будут зависеть от различных факторов, включая активность конкретного применяемого пептидного или белкового препарата, метаболическую стабильность и продолжительность действия этого соединения, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол, диету, режим и время введения, интенсивность экскреции, комбинацию препарата, тяжесть определенного состояния здоровья и конкретного субъекта, проходящего терапию. В конечном итоге точная доза будет определена по усмотрению лечащего врача или ветеринара. Субъектом или пациентом, подлежащим лечению, таким как субъект, нуждающийся в лечении или профилактике, может быть животное (например, нечеловекоподобное животное), позвоночное животное, млекопитающее, представитель грызунов (например, морская свинка, хомяк, крыса, мышь), представитель мышиных (например, мышь), представитель псовых (например, собака), представитель кошачьих (например, кошка), представитель свинообразных (например, свинья), представитель лошадиных (например, лошадь), примат, представитель обезьянообразных (например, обезьяна или человекообразная обезьяна), обезьяна (например, мартышка, бабуин), человекообразная обезьяна (например, горилла, шимпанзе, орангутанг, гиббон) или человек. В контексте настоящего изобретения также предусматривается, что необходимо лечить животных, которые имеют экономическое или агрономическое значение. Неограничивающими примерами агрономически значимых животных являются овцы, крупный рогатый скот и свиньи, в то время как, например, кошки и собаки могут рассматриваться как животные, имеющие экономическое значение. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения субъект/пациент представляет собой млекопитающее; в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения субъект/пациент представляет собой человека или нечеловекоподобное млекопитающее (такое как морская свинка, хомяк, крыса, мышь, кролик, собака, кошка, лошадь, обезьяна, человекообразная обезьяна, мартышка, бабуин, горилла, шимпанзе, орангутанг, гиббон, овца, крупный рогатый скот или свинья); в наиболее предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения субъект/пациент представляет собой человека.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один пептид по меньшей мере один металл в виде любой его соли или комбинации соли и его комплекс по меньшей мере один восстановитель и необязательный усилитель абсорбции могут быть введены одновременно/параллельно или последовательно. В одном варианте осуществления настоящего изобретения при последовательном введении по меньшей мере один металл в виде любой его соли или комбинации соли и его комплекс по меньшей мере один восстановитель могут быть введены первыми с последующим введением пептида и необязательного усилителя абсорбции (например, по меньшей мере через примерно 5 мин после первого введения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения через от примерно 5 мин до примерно 3 ч после первого введения, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения через от примерно 10 мин до примерно 1 ч после первого введения), что представляет собой особое преимущество, если пептид является инсулином (инсулином человека). В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один металл в виде любой его соли или комбинации соли и его комплекс по меньшей мере один восстановитель и необязательный усилитель абсорбции могут быть введены первыми, с последующим введением пептида (например, по меньшей мере, через, примерно, 5 мин после первого введения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения через от примерно 5 мин до примерно 3 ч после первого введения, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения через от примерно 10 мин до примерно 1 ч после первого введения), что также представляет собой преимущество, если пептид является инсулином (инсулином человека). В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один металл выбран из любого из следующих или комбинации: ванадия, хрома и марганца.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения при одновременном введении по меньшей мере один металл в виде любой его соли или комбинации соли и его комплекс по меньшей мере один восстановитель могут быть введены первыми с последующим введением пептида, а необязательный усилитель абсорбции введен в ту же фармацевтическую композицию, или в по меньшей мере две различные/отдельные фармацевтические композиции, или в по меньшей мере два различных/отдельных компартмента той же фармацевтической лекарственной формы. В одном варианте осуществления на-

стоящего изобретения по меньшей мере один металл выбран из любого из следующих или комбинации: ванадия, хрома и марганца. В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один пептид и по меньшей мере один металл в виде любой его соли или комбинации соли и его комплекс присутствуют в физически разделенном виде в фармацевтической композиции. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая лекарственная форма включает по меньшей мере два отдельных компартмента, которые физически разделены друг от друга (например, через физический разделительный слой). В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая лекарственная форма включает слой физического разделения между по меньшей мере одним пептидом по меньшей мере одним металлом в виде любой его соли или комбинации соли и его комплексом. В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один пептид присутствует только в первом компартменте и по меньшей мере один металл в виде любой его соли или комбинации соли и его комплекс присутствует/присутствуют только во втором компартменте фармацевтической лекарственной формы. В одном варианте осуществления настоящего изобретения восстановитель присутствует либо в первом компартменте, либо во втором компартменте, либо как в первом, так и во втором компартменте, либо в третьем компартменте фармацевтической лекарственной формы. В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один металл выбран из любого из следующих или комбинации: ванадия, хрома и марганца.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция присутствует в виде любой из фармацевтических лекарственных форм: капсула-в-капсуле и таблетка-в-капсуле, при этом фармацевтическая композиция включает

по меньшей мере один пептид, имеющий молекулярную массу, равную или меньшую примерно 50 кДа, который присутствует в первом компартменте фармацевтической лекарственной формы;  
 по меньшей мере один металл в виде любой его соли или комбинации соли и его комплекса, который присутствует(ют) во втором компартменте фармацевтической лекарственной формы; и  
 восстановитель, который присутствует в первом компартменте и/или во втором компартменте фармацевтической лекарственной формы.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение предлагает фармацевтическую лекарственную форму (например, лекарственную форму, состоящую из множества частиц), содержащую

по меньшей мере один пептид, имеющий молекулярную массу, равную или меньшую примерно 60 кДа, который присутствует в первом компартменте фармацевтической лекарственной формы;  
 восстановитель, который присутствует во втором компартменте фармацевтической лекарственной формы; и

по меньшей мере один металл в виде любой его соли или комбинации соли и его комплекса, который присутствует(ют) в третьем компартменте фармацевтической лекарственной формы.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая лекарственная форма представляет собой капсулу-в-капсуле или лекарственную форму, состоящую из множества частиц. В одном варианте осуществления настоящего изобретения в лекарственной форме капсула-в-капсуле, большая внешняя капсула (содержание которой будет высвобождаться первым) содержит по меньшей мере один металл в виде любой его соли или комбинации соли и его комплекс, и восстановитель, а меньшая внутренняя капсула (содержание которой будет высвобождаться позже) содержит пептид. В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один металл выбран из любого из следующих или комбинации: ванадия, хрома и марганца.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения лекарственная форма выбрана из любого из следующих или комбинации: лекарственная форма с модифицированным высвобождением (такая как, лекарственная форма (капсула, лекарственная форма, состоящая из множества частиц, или таблетка), имеющая энтеросолюбильное покрытие), лекарственная форма (капсула, лекарственная форма, состоящая из множества частиц, или таблетка), покрытая Eudragit L30D55 или Eudragit FS30D, кислотоустойчивая капсула, такая как капсулы НРМСР (известные на рынке как AR Caps®) и т.п. Однако любая лекарственная форма, известная или понятная специалисту в данной области техники, может быть использована для достижения своей желаемой цели, как изложено в настоящем изобретении, не выходя за рамки объема и сущности настоящего изобретения.

#### Пример

Сериновые протеазы - трипсин, химотрипсин, карбоксипептидаза В и аминопептидаза М, ответственные за протеолитическую деградацию пептидных связей и аминокислот, были испытаны конкретно на их окислительную инактивацию комбинацией иона(ов) металла и восстановителя(ей).

Количественный анализ ферментативной активности. Количественный анализ ферментативной активности каждого фермента в присутствии его конкретного субстрата проводили на определенной длине волны с помощью УФ-спектрофотометра, и это служило отрицательным контролем. Ферментативную активность рассчитывали следующим образом:

$$\frac{\text{Единиц}}{\text{мг}} \text{ твердого вещества} = \frac{\text{Единиц/мл фермента}}{\text{мг твердого вещества/мг фермента}}$$

Количественный анализ ингибирования ферментов. Инкубацию проводили с ингибитором каждого фермента, и это служило положительным контролем.

Инкубация с ионом(и) металла и восстановителем(ями). Инкубацию ферментов с комбинацией соли(ей) металла и восстановителя(ей) в микротитрационном планшете с 96 лунками проводили в течение определенного периода времени в присутствии субстратов для изучения их окислительной инактивации. Инактивацию фермента в присутствии иона(ов) металла и восстановителя(ей) сравнивали с исходной ферментативной активностью в присутствии субстрата в качестве отрицательного контроля и в присутствии ингибитора в качестве положительного контроля.

Измерение pH. Изменение pH ферментов после инкубации с солью(ями) металла и восстановителем(ями) контролировали посредством комбинированного pH-электрода Hanna.

Зимограмма. Обработанные ферменты подвергали зимографии, которая представляет собой электрофоретический метод обнаружения гидролитических ферментов, основанный на репертуаре субстрата фермента, т.е. субстрат для фермента был встроен в разделяющий гель во время получения акриламидного геля, после чего контролировали дегенерирование субстрата ферментом.

Проведение количественного анализа посредством наборов. Для подтверждения инактивации проводили количественный анализ посредством набора для флуоресцентной детекции протеаз и набора для проведения количественного анализа активности трипсина.

Материалы.

В табл. 1А ниже приведены материалы, используемые для оценки эффективности различных солей металла и комплексов металла необязательно в комбинации с по меньшей мере одним восстановителем при осуществлении ингибирования фермента(ов) сериновая протеаза.

Таблица 1А

## Использованный материал

№ п/п	Ферменты	Субстраты	Ингибиторы	Соли металла (испытанные)	Восстановители (испытанные)	Наборы для проведения количественного анализа	Активность pH
1.	<b>Трипсин человека</b>	N $\alpha$ -бензоил-L-аргинин этиловый эфир (BAEE)	4-Амидинофенил метансульфонил фторид гидрохлорид (Сериновая протеаза (ингибитор - для Трипсина/Химотрипсина)	Хлорид меди Карбонат меди Сульфат меди Сульфат цинка Хлорид цинка Ацетат цинка Сульфат ванадия (IV) Оксид ванадия (V) Ванадат натрия Перманганат калия Глицерофосфат марганца Глюконат марганца Хлорид хрома Пиколинат хрома	Аскорбат натрия Восстановленный глутатион Мочевая кислота Маннит Бензогидроксамовая кислота Цистеин Пиперин	Набор для проведения количественного анализа для флуоресцентной детекции протеаз и Набор для проведения количественного анализа активности трипсина	Комбинированный pH-электрод Hanna
		N $\alpha$ -бензоил-L-аргинин-7-амидо-4-метилкумарин гидрохлорид	3,4-дихлоризокумарин (Ингибитор сериновой протеазы - для Трипсина/Химотрипсина				

2.	<b>Химотрипсин человека</b>	Аланин-аланин-фенилаланин-7-амидо-4-метилкумарин	4-амидинофенилметансульфонилфторид гидрохлорид (Сериновая протеаза (ингибитор - для Трипсина/Химотрипсина)			Набор для проведения количественного анализа для флуоресцентной детекции протеаз	
		N-бензоил-L-тирозин амидобензойная кислота натриевая соль	3,4-дихлоризокумарин (Ингибитор сериновой протеазы - для Трипсина/Химотрипсина				
3.	<b>Карбоксипептидаза В человека</b>	Гиппурил-Лизин	Этилендиаминтетрауксусная кислота динатриевая соль дигидрат				
		N-бензоил-L-тирозин амидобензойная кислота					
4.	<b>Аминопептидаза М свиньи</b>	L-лейцин-р-нитроанилид	4.1 L-лейцилтиол, окисленный дигидрохлорид				
		N-сукцинил-аланин-аланин-пролин-фенилаланин-7-амидо-4-метилкумарин					

В табл. 1В ниже представлены комбинации солей металла/комплексов металла с восстановителем(ями), которые оценивали на предмет осуществления ингибирования фермента(ов) сериновая протеаза.

Комбинация солей металла и комплексов с восстановителями,  
которые оценивали на предмет инактивации ферментов

№ п/п	Восстановитель (5 мкМ)	Соль металла (1 мМ/Л)
1.	Аскорбат натрия	Хлорид меди/аскорбат натрия
		Сульфат меди/аскорбат натрия
		Сульфат цинка/аскорбат натрия
		сульфат ванадия (IV)/ аскорбат натрия
		оксид ванадия (V)
		Ванадат натрия
		Перманганат калия/ аскорбат натрия
		Глюконат марганца/ аскорбат натрия
		Пиколинат хрома/ аскорбат натрия
2.	Восстановленный глутатион	Хлорид меди/восстановленный глутатион
		сульфат ванадия (IV)/восстановленный глутатион
		оксид ванадия (V)/восстановленный глутатион
		Ванадат натрия/восстановленный глутатион
		Глицерофосфат марганца/ восстановленный глутатион
		Хлорид хрома/восстановленный глутатион
3.	Мочевая кислота	Сульфат меди/мочевая кислота
		Ванадат натрия/мочевая кислота
		Глюконат марганца/мочевая кислота
		Пиколинат хрома/мочевая кислота
		Пиперин/отсутствует
4.	Маннит	сульфат ванадия (IV)/маннит
		Сульфат цинка/маннит
		сульфат ванадия (IV)/маннит
		Глицерофосфат марганца/маннит
		Пиколинат хрома/маннит
5.	Бензогидроксамовая кислота	Сульфат меди/ бензогидроксамовая кислота
		сульфат ванадия (IV)/ бензогидроксамовая кислота
		оксид ванадия (V)/бензогидроксамовая кислота
		Ванадат натрия/ бензогидроксамовая кислота
		Глицерофосфат марганца/ бензогидроксамовая кислота

Количественный анализ ферментативной активности трипсина с использованием N $\alpha$ -бензоил-L-аргинин этилового эфира (BAEE) 200 единиц/мл раствора трипсина в холодном растворе HCl и 0,25 мм раствора субстрата BAEE получали по отдельности и инкубировали. Полученные выше растворы смешивали посредством инверсии с образованием реакционной смеси и регистрировали увеличение абсорбции при A<sub>253</sub> (здесь будут использоваться минимум 4 точки сбора данных в течение 1 мин) для холостого раствора (без фермента) и испытуемого (реакционная смесь) раствора. A<sub>253</sub>/мин будет получен с использованием максимальной линейной скорости как для холостого, так и для испытуемого раствора.

Расчет содержания трипсина в 3 мл исследуемого образца:

$$\text{Единиц BAEE/мл фермента} = \frac{(\Delta A_{253}/\text{минута Испытуемый} - \Delta A_{253}/\text{минута Холостой}) \times (df) \times (3)}{0,1 \times 0,808}$$

где df=фактор разбавления;

3=общий объем образца, исследуемого на содержание трипсина (в мл);

0,1=общий объем фермента (в мл);

0,808=коэффициент экстинкции N $\alpha$ -бензоил-L-аргинина на длине волны 253 нм.

Определение инактивации трипсина в присутствии ингибиторов. Трипсин (1 мМ/л) инкубировали с конкретными (известными) ингибиторами (представлены в табл. 1А) и комбинацией солей металла/восстановителей (представлены в табл. 2 ниже) по отдельности. Инактивация ингибиторами служила положительным контролем.

Таблица 2

Комбинации солей/комплексов металла с восстановителями  
для инактивации протеолитических ферментов

№ п/п	Восстановители		Соли металла	
	Название	Концентрация	Название	Концентрация
1	Аскорбат натрия	1 мМ	Хлорид меди	5 мкМ
2	Аскорбат натрия	1 мМ	Сульфат меди	5 мкМ
3	Аскорбат натрия	1 мМ	Сульфат цинка	5 мкМ
4	Аскорбат натрия	1 мМ	Сульфат ванадия	5 мкМ
5	Аскорбат натрия	1 мМ	Оксид ванадия	5 мкМ
6	Аскорбат натрия	1 мМ	Ванадат натрия	5 мкМ
7	Аскорбат натрия	1 мМ	Перманганат калия	5 мкМ
8	Аскорбат натрия	1 мМ	Глюконат марганца	5 мкМ
9	Восстановленный	1 мМ	Пиколинат хрома	5 мкМ
10	Восстановленный	1 мМ	Хлорид меди	5 мкМ
11	Восстановленный	1 мМ	Сульфат ванадия	5 мкМ
12	Восстановленный	1 мМ	Оксид ванадия	5 мкМ
13	Восстановленный	1 мМ	Ванадат натрия	5 мкМ
14	Восстановленный	1 мМ	Хлорид хрома	5 мкМ
15	Мочевая кислота	1 мМ	Сульфат меди	5 мкМ
16	Мочевая кислота	1 мМ	Ванадат натрия	5 мкМ
17	Мочевая кислота	1 мМ	Глюконат марганца	5 мкМ
18	Мочевая кислота	1 мМ	Пиколинат хрома	5 мкМ
19	Маннит	1 мМ	Сульфат цинка	5 мкМ
20	Маннит	1 мМ	Сульфат ванадия	5 мкМ
21	Маннит	1 мМ	Пиколинат хрома	5 мкМ
22	Бензогидроксамовая	1 мМ	Сульфат меди	5 мкМ
23	Бензогидроксамовая	1 мМ	Сульфат ванадия	5 мкМ
24	Бензогидроксамовая	1 мМ	Оксид ванадия	5 мкМ
25	Бензогидроксамовая	1 мМ	Ванадат натрия	5 мкМ
26	Бензогидроксамовая	1 мМ	Хлорид хрома	5 мкМ
27	Цистеин	1 мМ	Хлорид меди	5 мкМ
28	Цистеин	1 мМ	Оксид ванадия	5 мкМ
29	Цистеин	1 мМ	Глюконат марганца	5 мкМ
30	Цистеин	1 мМ	Пиколинат хрома	5 мкМ
31	Пиперин	1 мМ	Пиперин/отсутствует	5 мкМ
32	Ингибиторы	1 мМ		

Определение окислительной инактивации (активности и рН) трипсина в присутствии комбинации ионов металла и восстановителей.

Для реакционной смеси объемом 200 мкл инкубировали примерно 10 мкл трипсина в буферном растворе с комбинацией солей металла и восстановителей (представлено в табл. 2 под порядковыми номерами 1-31) в соответствующей концентрации при 37°C в микротитрационных планшетах с 96 лунками

(в табл. 3 ниже представлена подробная информация об использовании конкретной комбинации из комбинаций, представленных под порядковыми номерами 1-31 в табл. 2) в течение 5, 15 и 30 мин с последующим добавлением соответствующего субстрата объемом 90 мкл (представлено в табл. 1А).

Ферментативную активность измеряли спектрофотометрическим методом в считывателе микропланшета и сравнивали с количественным анализом исходной активности. рН измеряли посредством комбинированного рН-электрода Hanna (реакцию с ферментом проводили в трех повторах). В табл. 4 ниже представлена ферментативная активность трипсина по истечении определенных периодов времени после обработки комбинацией соли/комплекса металла и оцениваемого восстановителя.

Таблица 3

Распределение комбинации соли/комплекса металла и оцениваемого восстановителя в микротитрационных планшетах с 96 лунками

A	Контроль	Конт роль	Конт роль	1		1	2	2	2	3	3	3
B	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7	7	7
C	8	8	8	9	9	9	10	10	10	11	11	11
D	12	12	12	13	13	13	14	14	14	15	15	15
E	16	16	16	17	17	17	18	18	18	19	19	19
F	20	20	20	21	21	21	22	22	22	23	23	23
G	24	24	24	25	25	25	26	26	26	27	27	27
H	28	28	28	29	29	29	30	30	30	31	31	31

Таблица 4

Ферментативная активность трипсина

Восстановители и соли металла	Время		
	5 мин	15 мин	30 мин
Аскорбат натрия:Хлорид меди	89,65517241	66,66666667	45,71428571
Аскорбат натрия:Сульфат меди	89,65517241	40,25	40
Аскорбат натрия:Сульфат цинка	55,17241379	54,16666667	57,14285714
Аскорбат натрия:Оксид ванадия	41,37931034	31,25	17,14285714
Аскорбат натрия:Сульфат ванадия	82,75862069	20,83333333	14,28571429
Аскорбат натрия:Ванадат натрия	27,5862069	54,16666667	31,42857143
Аскорбат натрия:Перманганат калия	165,5172414	20,83333333	76
Аскорбат натрия:Глюконат марганца	27,5862069	29,16666667	17,14285714
Восстановленный глутатнион:Пиколинат хрома	55,17241379	45,83333333	71,42857143
Восстановленный глутатнион:Хлорид меди	158,6206897	83,33333333	80,57142857
Восстановленный глутатнион:Сульфат ванадия	188,2758621	41,66666667	37,14285714
Восстановленный глутатнион:Оксид ванадия	20,68965517	95,83333333	48,57142857
Ванадат натрия/Ванадат натрия	108,0482759	58,33333333	20
Восстановленный глутатнион:Хлорид хрома	48,27586207	16,91666667	5,714285714
Мочевая кислота:Сульфат меди	179,3103448	12,5	5,714285714
Мочевая кислота: Ванадат натрия	68,96551724	29,16666667	26,74285714
Мочевая кислота:Глюконат марганца	55,17241379	37,5	37,14285714
Мочевая кислота:Пиколинат хрома	103,4482759	33,33333333	22,85714286
Маннит:Сульфат цинка	158,6206897	70,83333333	62,85714286
Маннит:Сульфат ванадия	103,4482759	95,83333333	80
Маннит:Пиколинат хрома	89,65517241	83,33333333	37,14285714

Бензогидроксамовая кислота:Сульфат меди	110,3448276	4,166666667	57,14285714
Бензогидроксамовая кислота:Сульфат ванадия	43,2137931	29,16666667	28,57142857
Бензогидроксамовая кислота:Оксид ванадия	158,6206897	87,5	45,71428571
Бензогидроксамовая кислота:Ванадат натрия	131,0344828	66,66666667	2,857142857
Бензогидроксамовая кислота:Хлорид хрома	68,96551724	66,66666667	20
Цистеин:Хлорид меди	117,2413793	50	40
Цистеин:Оксид ванадия	186,2068966	16,66666667	14,28571429
Цистеин:Глюконат марганца	55,17241379	58,33333333	11,42857143
Цистеин:Пиколинат хрома	186,2068966	25	20
Пиперин	172,4137931	66,66666667	45,71428571

Табл. 5А-5С, представленная ниже в настоящем документе, представляет измерение рН для трипсина через различные интервалы времени, т.е. через 5, 15 и 30 мин.

Таблица 5А

## Измерение рН для трипсина с интервалом 5 мин

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	3,5	3,45	3,5	2,5	2,45	1,7	2,5	2,4	2,5	2,6	2,5	2,7
<b>B</b>	2,5	2,6	2,3	2,2	2,5	2,8	2,2	2,3	2,6	2,4	2,2	2,2
<b>C</b>	2,5	2,2	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,8	2,5	2,5	2,5
<b>D</b>	2,6	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,8	2,4	2,5	2,5
<b>E</b>	2,5	2,52	2,6	2,5	2,6	2,5	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6
<b>F</b>	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6
<b>G</b>	2,4	2,4	2,5	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2	2	2,8
<b>H</b>	2,5	2,2	2,2	2	2	2	2	2	2	2,2	2,2	2,2

Таблица 5В

## Измерение рН для трипсина с интервалом 15 мин

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	3,5	3,45	3,5	2,8	1,6	2,3	2,4	2,4	2,5	2,6	2,5	2,7
<b>B</b>	2,5	2,6	2,3	2,2	2,5	2,8	2,2	2,3	2,6	2,4	2,2	2,2
<b>C</b>	2,5	2,2	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,8	2,5	2,5	2,5
<b>D</b>	2,6	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,8	2,4	2,5	2,5
<b>E</b>	2,5	2,52	2,6	2,5	2,6	2,5	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6
<b>F</b>	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6
<b>G</b>	2,4	2,4	2,5	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2	2	2,8
<b>H</b>	2,5	2,2	2,2	2	2	2	2	2	2	2,2	2,2	2,2

Таблица 5С

## Измерение рН для трипсина с интервалом 30 мин

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	3,5	3,45	3,5	2,5	1,6	2,3	2,4	2,4	2,5	2,6	2,9	2,7
<b>B</b>	2,6	2,6	2,3	2,2	2,5	2,8	2,2	2,3	2,6	2,4	2,2	2,7
<b>C</b>	2,7	2,2	2,5	2,1	2,5	2,5	2,5	2,5	2,8	2,5	2,5	2,5
<b>D</b>	2,1	2,4	2,6	2,1	2,5	2,5	2,5	2,5	2,8	2,4	2,5	2,5
<b>E</b>	2,5	2,52	2,6	2,5	2,6	2,5	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6
<b>F</b>	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6
<b>G</b>	2,4	2,4	2,5	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2	2	2,8
<b>H</b>	2,5	2,2	2,2	2	2	2	2	2	2	2,2	2,2	2,2

Количественный анализ на ферментативную активность химотрипсина с использованием аланин-аланин-фенилаланин-7-амидо-4-метилкумарина.

Получали по отдельности примерно 2 единицы химотрипсина в холодном растворе HCl, 1,18 мМ раствора субстрата, 2 М раствора хлорида кальция, 80 мМ Трис HCl буферного раствора. В 3 мл буферного раствора добавляли раствор субстрата и раствор хлорида кальция и смешивали посредством инверсии при температуре примерно 25°C с образованием холостой реакционной смеси и испытуемой реакци-

онной смеси (табл. 6). Далее раствор HCl добавляли в холодую реакцию смесь, а ферментативный раствор добавляли в испытуемую реакцию смесь, немедленно смешивали посредством инверсии и регистрировали увеличение абсорбции при  $A_{256}$  в течение 3-5 мин.  $A_{256}/\text{мин}$  будет получено как для холостой реакции, так и для испытуемых реакций с использованием максимальной линейной скорости в течение минутного интервала, используя по меньшей мере 4 значения данных.

Таблица 6

Схема получения холостого и испытуемого раствора		
Реагенты	Холостой раствор (мл)	Испытуемый раствор (мл)
Буферный раствор	1,42	1,42
Раствор субстрата	1,40	1,40
Раствор CaCl <sub>2</sub>	0,08	0,08
Смешивали посредством инверсии с последующим доведением температуры до 25° С		
Раствор HCl	0,10	--
Ферментный раствор	--	0,10

Расчет (для субстрата аланин-аланин-фенилаланин-7-амидо-4-метилкумарина):

$$\frac{\text{Единиц фермента}}{\text{мл}} = \frac{\Delta A_{256}/\text{минута Испытуемый} - \Delta A_{256}/\text{минута Холостой}}{(83,4) \times (0,10)} \times (3) \times (df)$$

где 3=объем (мл) реакционной смеси;

df=фактор разбавления;

83,4=коэффициент миллимолярной экстинкции субстрата на длине волны 256 нм;

0,10=объем (мл) испытуемого образца, используемого в количественном анализе.

Определение инактивации химотрипсина в присутствии ингибиторов. Химотрипсин (1 мМ/л) инкубировали с конкретными (известными) ингибиторами (представлены в табл. 1А выше) и комбинацией солей металла и восстановителями (представлены в табл. 2 выше) по отдельности. Инактивация ингибиторами служила положительным контролем. Определение окислительной инактивации (активности и рН) химотрипсина в присутствии комбинации ионов металла и восстановителей.

Для реакционной смеси объемом 200 мкл инкубировали примерно 10 мкл химотрипсина в буферном растворе с комбинацией солей металла и восстановителями (представлено в табл. 2 под порядковыми номерами 1-31) в соответствующей концентрации при 37°С в микротитрационных планшетах с 96 лунками (в табл. 3 выше представлена подробная информация об использовании конкретной комбинации из комбинаций, представленных под порядковыми номерами 1-31 в табл. 2) в течение 5, 15 и 30 мин с последующим добавлением соответствующего субстрата объемом 90 мкл (представлено в табл. 1А). Активность измеряли спектрофотометрическим методом в считывателе микропланшета и сравнивали с количественным анализом исходной активности. рН измеряли посредством комбинированного рН-электрода Hanna (реакцию с ферментом проводили в трех повторах). В табл. 7 ниже представлена ферментативная активность химотрипсина по истечении определенных периодов времени после обработки комбинацией соли/комплекса металла и оцениваемым восстановителем.

Таблица 7

## Ферментативная активность химотрипсина

Восстановитель и соли металла	Время		
	5 мин	15 мин	30 мин
Аскорбат натрия:Хлорид меди	36,84210526	30	25,80645161
Аскорбат натрия:Сульфат меди	168,4210526	85	106,4516129
Аскорбат натрия:Сульфат цинка	47,36842105	55	25,80645161
Аскорбат натрия:Оксид ванадия	78,94736842	70	38,70967742
Аскорбат натрия:Сульфат ванадия	89,47368421	65	51,61290323

Аскорбат натрия:Ванадат натрия	100	95	16,12903226
Аскорбат натрия:Перманганат калия	163,1578947	130	9,677419355
Аскорбат натрия:Глюконат марганца	78,94736842	70	9,677419355
Восстановленный глутатион: Пиколинат хрома	21,05263158	30	25,80645161
Восстановленный глутатион:Хлорид меди	47,36842105	45	45,16129032
Восстановленный глутатион: Сульфат ванадия	115,7894737	85	25,80645161
Восстановленный глутатион: Оксид ванадия	105,2631579	65	45,16129032
Ванадат натрия/Ванадат натрия	105,2631579	55	16,12903226
Восстановленный глутатион: Хлорид хрома	105,2631579	40	41,93548387
Мочевая кислота:Сульфат меди	68,42105263	20	25,80645161
Мочевая кислота: Ванадат натрия	63,15789474	20	9,677419355
Мочевая кислота:Глюконат марганца	89,47368421	85	67,74193548
Мочевая кислота:Пиколинат хрома	68,42105263	65	9,677419355
Маннит:Сульфат цинка	100	80	51,61290323
Маннит:Сульфат ванадия	68,42105263	35	54,83870968
Маннит:Пиколинат хрома	115,7894737	40	19,35483871
Бензогидроксамовая кислота:Сульфат меди	152,6315789	80	35,48387097
Бензогидроксамовая кислота:Сульфат ванадия	142,1052632	110	32,25806452
Бензогидроксамовая кислота:Оксид ванадия	100	80	56,77419355
Бензогидроксамовая кислота:Ванадат натрия	115,7894737	45	12,90322581
Бензогидроксамовая кислота:Хлорид хрома	89,47368421	55	58,06451613
Цистеин:Хлорид меди	89,47368421	85	70,96774194
Цистеин:Оксид ванадия	115,7894737	140	32,25806452
Цистеин:Глюконат марганца	63,15789474	65	29,03225806
Цистеин:Пиколинат хрома	84,21052632	70	22,58064516
Пиперин	84,21052632	80	35,48387097

Табл. 8А-8С, представленная ниже, представляет измерение рН для химотрипсина через различные интервалы времени, т.е. через 5, 15 и 30 мин.

Таблица 8А

## Измерение рН для химотрипсина с интервалом 5 мин

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	1,68	1,66	1,65	1,7	1,75	1,76	1,7	1,72	1,69	1,78	1,77	1,65
<b>B</b>	1,65	1,77	1,7	1,76	1,75	1,78	1,75	1,7	1,67	1,7	1,69	1,7
<b>C</b>	1,7	1,7	1,68	1,7	1,69	1,67	1,7	1,7	1,78	1,7	1,68	1,67
<b>D</b>	1,67	1,67	1,67	1,67	1,7	1,7	1,7	1,7	1,78	1,7	1,7	1,7
<b>E</b>	1,67	1,67	1,67	1,67	1,7	1,7	1,7	1,7	1,67	1,7	1,7	1,7
<b>F</b>	1,67	1,67	1,7	1,7	1,7	1,67	1,67	1,67	1,7	1,7	1,7	1,7
<b>G</b>	1,66	1,66	1,66	1,66	1,6	1,67	1,65	1,68	1,65	1,67	1,65	1,68
<b>H</b>	1,65	1,67	1,67	1,65	1,67	1,68	1,68	1,69	1,69	1,67	1,65	1,63

Таблица 8В

## Измерение рН для химотрипсина с интервалом 15 мин

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	1,68	1,66	1,65	1,68	1,65	1,68	1,7	1,77	1,65	1,75	1,65	1,65
<b>B</b>	1,65	1,69	1,7	1,7	1,68	1,78	1,75	1,7	1,67	1,7	1,69	1,7
<b>C</b>	1,7	1,7	1,68	1,7	1,69	1,67	1,7	1,7	1,78	1,7	1,68	1,67
<b>D</b>	1,67	1,67	1,67	1,67	1,7	1,7	1,7	1,68	1,69	1,7	1,7	1,7
<b>E</b>	1,67	1,67	1,67	1,67	1,7	1,7	1,7	1,7	1,67	1,7	1,7	1,7
<b>F</b>	1,67	1,67	1,7	1,7	1,7	1,67	1,67	1,67	1,7	1,7	1,7	1,7
<b>G</b>	1,66	1,66	1,66	1,66	1,6	1,67	1,65	1,68	1,69	1,67	1,65	1,68
<b>H</b>	1,65	1,67	1,67	1,65	1,67	1,68	1,68	1,69	1,69	1,67	1,65	1,63

Таблица 8С

## Измерение рН для химотрипсина с интервалом 30 мин

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	1,68	1,66	1,65	1,69	1,65	1,7	1,77	1,77	1,69	1,68	1,68	1,66
<b>B</b>	1,65	1,69	1,7	1,7	1,68	1,78	1,75	1,7	1,67	1,7	1,69	1,7
<b>C</b>	1,7	1,7	1,68	1,7	1,69	1,67	1,7	1,7	1,78	1,7	1,68	1,67
<b>D</b>	1,67	1,67	1,67	1,67	1,7	1,7	1,7	1,68	1,69	1,7	1,7	1,7
<b>E</b>	1,67	1,67	1,67	1,67	1,7	1,7	1,7	1,7	1,67	1,7	1,7	1,7
<b>F</b>	1,67	1,67	1,7	1,7	1,7	1,67	1,67	1,67	1,7	1,7	1,7	1,7
<b>G</b>	1,66	1,66	1,66	1,66	1,6	1,67	1,65	1,68	1,69	1,67	1,65	1,68
<b>H</b>	1,65	1,67	1,67	1,65	1,67	1,68	1,68	1,69	1,69	1,67	1,65	1,63

Количественный анализ ферментативной активности карбоксипептидазы В с использованием гиппурил-аргинина.

Получали по отдельности при температуре примерно 25°C 4 единицы карбоксипептидазы В в холодной деионизированной воде, 1 мм раствора гиппурил-аргинина в 25 мМ Трис буферного раствора, содержащего 100 мМ хлорида натрия (рН 7,65). Получали 3 мл реакционных смесей (испытуемая и холодная) с использованием вышеуказанных полученных растворов в соответствии с табл. 9 при 25°C. Расчеты:

$$\text{Единиц/мл фермента} = \frac{(\Delta A_{254\text{нм}}/\text{мин Испытуемый} - \Delta A_{254\text{нм}}/\text{минута Холодной})(3)(df)}{(0,36)(0,1)}$$

где 3=объем (мл) реакционной смеси;

df=фактор разбавления;

0,36=коэффициент миллимолярной экстинкции субстрата на длине волны 254 нм;

0,10=объем (мл) испытуемого образца, используемого в количественном анализе.

Таблица 9

## Схема получения испытуемого и холодного растворов

Реагенты	Испытуемый раствор (мл)	Холодный раствор (мл)
Раствор гиппурил-аргинина в Трис буферном растворе, содержащем хлорид натрия	2,90	2,90
Деионизированная вода	----	0,10
Раствор карбоксипептидазы В	0,10	----

Определение инактивации карбоксипептидазы в присутствии ингибиторов.

Инкубировали по отдельности карбоксипептидазу (1 мМ/л) с конкретными (известными) ингибитором (представлен в табл. 1А выше) и комбинацией солей металла/восстановителями (представлены в

табл. 2 выше). Инактивация ингибиторами служила положительным контролем.

Определение окислительной инактивации (активности и рН) карбоксипептидазы в присутствии комбинации ионов металла и восстановителей.

Для реакционной смеси объемом 200 мкл инкубировали примерно 10 мкл карбоксипептидазы в буферном растворе с комбинацией солей металла и восстановителями (представлено в табл. 2 под порядковыми номерами 1-31) в соответствующей концентрации при 37°C в микротитрационных планшетах с 96 лунками (в табл. 3 выше представлена подробная информация об использовании конкретной комбинации из комбинаций, представленных под порядковыми номерами 1-31 в табл. 2) в течение 5, 15 и 30 мин с последующим добавлением соответствующего субстрата объемом 90 мкл (представлено в табл. 1А). Ферментативную активность измеряли спектрофотометрическим методом в считывателе микропланшета и сравнивали с количественным анализом исходной активности. рН измеряли посредством комбинированного рН-электрода Hanna (реакцию с ферментом проводили в трех повторах). В табл. 10 ниже представлена ферментативная активность карбоксипептидазы по истечении определенных периодов времени после обработки комбинацией соли/комплекса металла и оцениваемым восстановителем.

Таблица 10

## Ферментативная активность карбоксипептидазы

Восстановитель и соли металла	Время		
	5 мин	15 мин	30 мин
Аскорбат натрия:Хлорид меди	43,01886792	21,58490566	58,11320755
Аскорбат натрия:Сульфат меди	79,24528302	87,54716981	41,50943396
Аскорбат натрия:Сульфат цинка	120,0113208	33,20754717	33,20754717
Аскорбат натрия:Оксид ванадия	34,67169811	29,05660377	0
Аскорбат натрия:Сульфат ванадия	89,13962264	66,41509434	66,41509434
Аскорбат натрия:Ванадат натрия	61,01886792	58,11320755	58,49056604
Аскорбат натрия:Перманганат калия	83,39622642	58,11320755	41,50943396
Аскорбат натрия:Глюконат марганца	49,81132075	62,26415094	66,41509434
Восстановленный глутатион: Пиколинат хрома	65,09433962	29,05660377	20,75471698
Восстановленный глутатион:Хлорид меди	100	58,11320755	75,09433962
Восстановленный глутатион:Сульфат ванадия	91,69811321	33,20754717	0
Восстановленный глутатион:Оксид ванадия	79,24528302	45,66037736	20,75471698
Ванадат натрия/Ванадат натрия	49,43396226	41,50943396	37,35849057
Восстановленный глутатион:Хлорид хрома	79,24528302	4,150943396	58,49056604
Мочевая кислота:Сульфат меди	100	62,26415094	49,81132075
Мочевая кислота: Ванадат натрия	83,77358491	53,96226415	29,05660377
Мочевая кислота:Глюконат марганца	95,8490566	45,66037736	45,66037736

Мочевая кислота:Пиколинат хрома	62,26415094	50,18867925	45,66037736
Маннит:Сульфат цинка	74,71698113	62,26415094	41,50943396
Маннит:Сульфат ванадия	56,22641509	37,35849057	37,35849057
Маннит:Пиколинат хрома	79,24528302	58,11320755	58,11320755
Бензогидроксамовая кислота:Сульфат меди	91,32075472		83,39622642
Бензогидроксамовая кислота:Сульфат ванадия	45,66037736	24,90566038	16,60377358
Бензогидроксамовая кислота:Оксид ванадия	79,24528302	79,24528302	49,81132075
Бензогидроксамовая кислота:Ванадат натрия	41,50943396	33,20754717	24,90566038
Бензогидроксамовая кислота:Хлорид хрома	54,33962264	24,90566038	12,45283019
Цистеин:Хлорид меди	87,54716981	41,50943396	16,60377358
Цистеин:Оксид ванадия	33,20754717	25,94339623	25,94339623
Цистеин:Глюконат марганца	49,81132075	74,71698113	62,26415094
Цистеин:Пиколинат хрома	70,94339623	41,50943396	6,918238994
Пиперин	104,5283019	91,69811321	62,26415094

Табл. 11А-11С представляет измерение рН для карбоксипептидазы через различные интервалы времени, т.е. через 5, 15 и 30 мин.

Таблица 11А

## Измерение рН для карбоксипептидазы с интервалом 5 мин

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	7,77	7,78	7,76	7,76	7,65	7,77	7,77	7,78	7,76	7,65	7,78	7,7
<b>B</b>	7,78	7,8	7,67	7,78	7,79	7,69	7,72	7,67	7,74	7,75	7,76	7,78
<b>C</b>	7,79	7,76	7,75	7,76	7,78	7,7	7,6	7,8	7,7	7,5	7,67	7,7
<b>D</b>	7,8	7,76	7,7	7,6	7,72	7,6	7,9	7,7	7,7	7,7	7,8	7,8
<b>E</b>	7,76	7,6	7,78	7,7	7,6	7,6	7,8	7,6	7,7	7,76	7,8	7,7
<b>F</b>	7,7	7,8	7,7	7,7	7,7	7,8	7,8	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7
<b>G</b>	7,7	7,8	7,71	7,75	7,8	7,8	7,7	7,78	7,7	7,7	7,7	7,7
<b>H</b>	7,67	7,6	7,6	7,76	7,8	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7

Таблица 11В

## Измерение рН для карбоксипептидазы с интервалом 15 мин

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	7,77	7,7	7,7	7,7	7,75	7,77	7,77	7,78	7,76	7,65	7,78	7,7
<b>B</b>	7,78	7,8	7,67	7,78	7,79	7,69	7,72	7,67	7,74	7,75	7,76	7,78
<b>C</b>	7,79	7,76	7,75	7,76	7,78	7,7	7,6	7,8	7,7	7,5	7,67	7,7
<b>D</b>	7,8	7,76	7,7	7,6	7,72	7,6	7,9	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7
<b>E</b>	7,76	7,6	7,78	7,7	7,6	7,6	7,8	7,6	7,7	7,76	7,8	7,7
<b>F</b>	7,7	7,8	7,7	7,7	7,7	7,8	7,8	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7
<b>G</b>	7,7	7,8	7,71	7,75	7,8	7,8	7,7	7,78	7,7	7,7	7,7	7,7
<b>H</b>	7,67	7,6	7,6	7,76	7,8	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7

Таблица 11С

Измерение рН для карбоксипептидазы с интервалом 30 мин												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	7,77	7,7	7,7	7,8	7,75	7,77	7,77	7,78	7,76	7,65	7,78	7,7
<b>B</b>	7,78	7,9	7,67	7,78	7,79	7,69	7,72	7,67	7,74	7,75	7,76	7,78
<b>C</b>	7,79	7,8	7,75	7,76	7,78	7,7	7,6	7,8	7,7	7,5	7,67	7,7
<b>D</b>	7,8	7,76	7,7	7,6	7,72	7,6	7,9	7,7	7,7	7,7	7,8	7,6
<b>E</b>	7,76	7,6	7,78	7,7	7,6	7,6	7,8	7,6	7,7	7,76	7,8	7,7
<b>F</b>	7,7	7,8	7,7	7,7	7,7	7,8	7,8	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7
<b>G</b>	7,7	7,8	7,71	7,75	7,8	7,8	7,7	7,78	7,7	7,7	7,7	7,7
<b>H</b>	7,67	7,6	7,6	7,76	7,8	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7

Провести количественный анализ ферментативной активности аминопептидазы М с использованием L-лейцин-р-нитроанилида.

Получали по отдельности 1 мМ раствора трицина (получен в 100 мл деионизированной воды, реагент А) и 50 мМ раствора L-лейцин-р-нитроанилида в абсолютизированном метаноле (реагент В). Получали, примерно, 10 мМ раствора L-лейцин-р-нитроанилида (лейцин-натрий, реагент С) добавлением 0,1 мл реагента В в 4,9 мл реагента А. Получали по отдельности 200 мм трицин-буферного раствора в деионизированной воде (реагент D) и 200 мм трицин-буферного раствора с 0,05% (мас./об.) BSA с рН 8,0 при 25°C (реагент E). Получали 0,04 единиц/мл аминопептидазы в реагенте E (ферментный раствор, реагент F). Реагент С, (лейцин-натрий, 2,0 мл), реагент D (200 мМ трицин-буферного раствора, 1,0 мл) и деионизированную воду (7,0 мл) накапывали пипеткой и смешивали в контейнере посредством вихревого потока с получением реакционной смеси (реагента G). Реагент G, реагент E и реагент F немедленно смешивали посредством инверсии для получения испытуемого и холостого раствора, как указано в табл. 12, и регистрировали увеличение  $\Delta A_{405\text{нм}}$  в течение примерно 5 мин. Получали  $\Delta A_{405}$  нм/мин с использованием максимальной линейной скорости как для испытуемого, так и для холостого раствора. Расчеты:

$$\text{Единиц/мл фермента} = \frac{(\Delta A_{405\text{нм/мин Испытуемый}} - \Delta A_{405\text{нм/мин Холостой}})(1)(df)}{(0,36)(0,1)}$$

где 1=общий объем (мл) количественного анализа;

df=фактор разбавления;

10,8=коэффициент миллимолярной экстинкции 1 р-нитроанилина при  $A_{405}$  нм;

0,1=объем (в миллилитре) используемого фермента.

Таблица 12

Схема получения испытуемого и холостого раствора

Реагенты	Испытуемый раствор (мл)	Холостой раствор (мл)
Реакционная смесь (Реагент G)	0,90	0,90
Реагент F (Ферментный раствор)	0,10	-----
Реагент E	-----	0,10

Определение инактивации аминопептидазы в присутствии ингибиторов.

Инкубировали по отдельности аминопептидазу (1 мМ/л) с конкретным ингибитором (представлен в табл. 1А выше) и комбинацией солей металла/восстановителями (представлены в табл. 2 выше). Инактивация ингибиторами служила положительным контролем.

Определение окислительной инактивации (активности и рН) аминопептидазы в присутствии комбинации ионов металла и восстановителей.

Для реакционной смеси объемом 200 мкл инкубировали примерно 10 мкл аминопептидазы в буферном растворе с комбинацией солей металла и восстановителями (представлено в табл. 2 под порядковыми номерами 1-31) в соответствующей концентрации при 37°C в микротитрационных планшетах с 96 лунками (в табл. 3 выше представлена подробная информация об использовании конкретной комбинации из комбинаций, представленных под порядковыми номерами 1-31 в табл. 2) в течение 5, 15 и 30 мин с последующим добавлением соответствующего субстрата объемом 90 мкл (представлено в табл. 1А). Ферментативную активность измеряли спектрофотометрическим методом в считывателе микропланшета и сравнивали с количественным анализом исходной активности. рН измеряли посредством комбинированного рН-электрода Hanna (реакцию с ферментом проводили в трех повторах). В табл. 13 ниже представлена ферментативная активность аминопептидазы по истечении определенных периодов времени после обработки комбинацией соли/комплекса металла и оцениваемым восстановителем.

Таблица 13

## Ферментативная активность аминопептидазы

Восстановитель и соли металла	Время		
	5 мин	15 мин	30 мин
Аскорбат натрия:Хлорид меди	100	98,06034483	91,31455399
Аскорбат натрия:Сульфат меди	92,57142857	81,89655172	91,07981221
Аскорбат натрия:Сульфат цинка	109,1428571	105,1724138	101,6431925
Аскорбат натрия:Оксид ванадия	113,4285714	109,9137931	80,51643192
Аскорбат натрия:Сульфат ванадия	99,42857143	99,13793103	99,06103286
Аскорбат натрия:Ванадат натрия	101,7142857	90,94827586	73,94366197
Аскорбат натрия:Перманганат калия	100	99,56896552	88,2629108
Аскорбат натрия:Глюконат марганца	104,8571429	100,4310345	100,4694836
Восстановленный глутатион:Пиколинат хрома	92,57142857	87,5	79,10798122
Восстановленный глутатион:Хлорид меди	96	94,39655172	88,96713615
Восстановленный глутатион:Сульфат ванадия	96	86,42241379	83,09859155
Восстановленный глутатион:Оксид ванадия	102	98,27586207	100,4694836
Восстановленный глутатион:Ванадат натрия	96	95,04310345	84,50704225
Восстановленный глутатион:Хлорид хрома	108,2857143	95,68965517	89,20187793
Мочевая кислота:Сульфат меди	94,51428571	93,53448276	97,18309859
Мочевая кислота: Ванадат натрия	102,8571429	101,7241379	99,29577465
Мочевая кислота:Глюконат марганца	98,57142857	95,68965517	93,42723005
Мочевая кислота:Пиколинат хрома	93,42857143	93,53448276	86,61971831
Маннит:Сульфат цинка	105,1428571	90,0862069	96,24413146
Маннит:Сульфат ванадия	106,5714286	101,7241379	99,06103286
Маннит:Пиколинат хрома	94	87,71551724	101,8779343
Бензогидроксамовая кислота:Сульфат меди	89,71428571	75,86206897	74,64788732
Бензогидроксамовая кислота:Сульфат ванадия	84	70,68965517	75,11737089
Бензогидроксамовая кислота:Оксид ванадия	87,42857143	85,12931034	77,9342723
Бензогидроксамовая кислота:Ванадат натрия	64,51428571	88,36206897	79,81220657

Бензогидроксамовая кислота:Хлорид хрома	96,85714286	67,88793103	78,16901408
Цистеин:Хлорид меди	110	113,362069	114,5539906
Цистеин:Оксид ванадия	93,71428571	88,57758621	88,2629108
Цистеин:Глюконат марганца	88	88,36206897	88,73239437
Цистеин:Пиколинат хрома	105,4285714	90,94827586	64,31924883
Пиперин	108	100,4310345	80,51643192

В табл. 14А-14С, представленной ниже в настоящем документе, представлено измерение рН для аминопептидазы через различные интервалы времени, т.е. через 5, 15 и 30 мин.

Таблица 14А

## Измерение рН для аминопептидазы с интервалом 5 мин

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	8,11	8,15	8,16	8,16	8,13	8,13	8,11	8,13	8,13	8,13	8,11	8,13
<b>B</b>	8,13	8,1	8,11	8,12	8,09	8,09	8,1	8,1	8,09	8,11	8,1	8,12
<b>C</b>	8,11	8,12	8,09	8,1	8,11	8,12	8,09	8,11	8,11	8,12	8,09	8,11
<b>D</b>	8,11	8,11	8,12	8,12	8,11	8,11	8,1	8,11	8,1	8,12	8,12	8,12
<b>E</b>	8,11	8,11	8,12	8,1	8,11	8,11	8,12	8,11	8,09	8,11	8,1	8,11
<b>F</b>	8,12	8,12	8,12	8,11	8,12	8,09	8,11	8,1	8,1	8,1	8,1	8,1
<b>G</b>	8,11	8,11	8,12	8,11	8,11	8,1	8,11	8,11	8,12	8,1	8,1	8,1
<b>H</b>	8,1	8,1	8,1	8,1	8,12	8,12	8,1	8,1	8,12	8,12	8,12	8,12

Таблица 14В

## Измерение рН для аминопептидазы с интервалом 15 мин

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	8,11	8,15	8,16	8,16	8,13	8,13	8,11	8,13	8,13	8,13	8,11	8,13
<b>B</b>	8,13	8,1	8,11	8,12	8,13	8,14	8,1	8,1	8,11	8,11	8,1	8,12
<b>C</b>	8,11	8,12	8,12	8,1	8,11	8,12	8,13	8,11	8,11	8,12	8,15	8,11
<b>D</b>	8,11	8,11	8,12	8,12	8,11	8,11	8,1	8,11	8,1	8,12	8,12	8,12
<b>E</b>	8,11	8,11	8,12	8,1	8,11	8,11	8,12	8,11	8,14	8,11	8,1	8,11
<b>F</b>	8,12	8,12	8,12	8,11	8,12	8,14	8,11	8,1	8,1	8,1	8,1	8,1
<b>G</b>	8,11	8,11	8,12	8,11	8,11	8,1	8,11	8,11	8,12	8,1	8,1	8,1
<b>H</b>	8,1	8,1	8,1	8,1	8,12	8,12	8,1	8,1	8,12	8,12	8,12	8,12

Таблица 14С

## Измерение рН для аминопептидазы с интервалом 30 мин

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	8,11	8,15	8,16	8,16	8,13	8,13	8,11	8,13	8,13	8,13	8,11	8,13
<b>B</b>	8,13	8,1	8,11	8,12	8,15	8,12	8,1	8,1	8,09	8,11	8,1	8,12
<b>C</b>	8,11	8,12	8,15	8,1	8,11	8,12	8,09	8,11	8,11	8,12	8,09	8,11
<b>D</b>	8,11	8,11	8,12	8,12	8,11	8,11	8,1	8,11	8,1	8,12	8,12	8,12
<b>E</b>	8,11	8,11	8,12	8,1	8,11	8,11	8,12	8,11	8,09	8,11	8,1	8,11
<b>F</b>	8,12	8,12	8,12	8,11	8,12	8,09	8,11	8,1	8,1	8,1	8,1	8,1
<b>G</b>	8,11	8,11	8,12	8,11	8,11	8,1	8,11	8,11	8,12	8,1	8,1	8,1
<b>H</b>	8,1	8,1	8,1	8,1	8,12	8,12	8,1	8,1	8,12	8,12	8,12	8,12

На основании проведенных экспериментов и представленных выше данных можно сделать вывод, что наибольший уровень ингибирования ферментативной активности (протеолитической деградации) наблюдался при использовании следующих комбинаций восстановителей и солей металла: аскорбат натрия-оксид ванадия; бензогидроксамовая кислота-сульфат ванадия; маннит-сульфат ванадия; мочевиная кислота-глюконат марганца; восстановленный глутатион-хлорид хрома и восстановленный глутатион-оксид ванадия.

Исследования биодоступности.

Чтобы обеспечить защиту от кислого рН внутрижелудочной среды и деградации протеолитическими ферментами, получали составы капсула-в-капсуле, при этом капсула с энтеросолюбильным покрытием может защитить пептид от внутрижелудочной среды, гранулы MIRA, присутствующие во внешней капсуле, могут инактивировать протеолитические ферменты, а усилители проницаемости могут закрепить/увеличить абсорбцию пептида через кишечную эпителиальную мембрану.

Получение составов капсула-в-капсуле.

Получение гранул, содержащих восстановитель(и) и соль(и) металла.

В табл. 15А-15F ниже представлены различные восстановитель(и) и соль(и) металла, содержащие составы гранул (называемые в дальнейшем гранулами MIRA), полученные для оценки биодоступности.

			Таблица 15А
Формула для гранул № п/п	МIRA 1 (исследования на крысах) Ингредиенты	Количество на капсулу	
1	Восстановленный глутатион	12 мг	
2	Пиколинат хрома	0,03 мг	
3	Микрокристаллическа я целлюлоза 101	12 мг	
4	Кроскармеллоза натрия	1,5 мг	
5	Маннит	4,47 мг	
6	НРМС-Е-5	В достаточном количестве	
<b>Итого</b>		<b>30 мг</b>	
			Таблица 15В
Формула для гранул № п/п	МIRA 2 (исследования на крысах) Ингредиенты	Количество на капсулу	
1	Аскорбат натрия	30 мг	
2	Оксид ванадия	0,03 мг	
3	Микрокристаллическа я целлюлоза 101	12 мг	
4	Маннит	5,47 мг	
5	Кроскармеллоза натрия	2,5 мг	
6	НРМС-Е-5	В достаточном количестве	
<b>Итого</b>		<b>50 мг</b>	
			Таблица 15С
Формула для гранул № п/п	МIRA 3 (исследования на крысах) Ингредиенты	Количество на капсулу	
1	Мочевая кислота	3 мг	
2	Ванадат натрия	0,03 мг	
3	Микрокристаллическа я целлюлоза 101	12 мг	
4	Маннит	3,97 мг	
5	Кроскармеллоза натрия	1 мг	
6	НРМС-Е-5	В достаточном количестве	
<b>Итого</b>		<b>20 мг</b>	

Формула для гранул MIRA 4 (исследования на крысах)		
№ п/п	Ингредиенты	Количество на капсулу
1	Аскорбат натрия	30 мг
2	Глюконат марганца	0,03 мг
3	Микрокристаллическая целлюлоза 101	12 мг
4	Маннит	5,47 мг
5	Кроскармеллоза натрия	1,5 мг
6	HPMC-E-5	В достаточном количестве
<b>Итого</b>		<b>50 мг</b>
Формула для гранул MIRA 5 (исследования на собаках)		
№ п/п	Ингредиенты	Количество на капсулу
1	Аскорбат натрия	100 мг
2	Сульфат ванадия	0,1 мг
3	Микрокристаллическая целлюлоза 101	50 мг
4	Кроскармеллоза натрия	10 мг
5	HPMC-E-5	В достаточном количестве
<b>Итого</b>		<b>160,1 мг</b>
Формула для гранул MIRA 2 (исследования на собаках)		
№ п/п	Ингредиенты	Количество на капсулу
1	Аскорбат натрия	100 мг
2	Оксид ванадия	0,1 мг
3	Микрокристаллическая целлюлоза 101	50 мг
4	Кроскармеллоза натрия	10 мг
5	HPMC-E-5	В достаточном количестве
<b>Итого</b>		<b>160,1 мг</b>

Получение гранул MIRA.

Гранулы MIRA получали в соответствии с описанной ниже процедурой.

А) Получение связующего раствора: 0,3% мас./об. раствора HPMC E-5 получали растворением 75,0 мг HPMC E-5 в 25,0 мЛ деионизированной (D.I.) воды.

В) Получение порошкообразной смеси: все ингредиенты добавляли по одному в подходящий сосуд и затем тщательно смешивали с помощью полиэтиленового пакета для обеспечения однородности смеси.

С) Получение гранул: для создания гранул использовали гранулирование вручную путем добавления по каплям 2,0 мЛ связующего раствора, (для гранулирования 2,5 мг порошкообразной смеси потребовалось 2 мл).

Д) Сушка гранул: полученные гранулы сушили при 40°C в течение примерно 12 ч в сухожаровом шкафу.

Е) Просеивание гранул: высушенные гранулы пропускали через сито из нержавеющей стали № 40, собирали в подходящий стеклянный контейнер и хранили при комнатной температуре.

(В течение всей процедуры грануляции были отмечены температура: 23°C и влажность: 39% относительной влажности.)

Получение гранул, содержащих пептид(ы).

В табл. 16А-16І ниже представлены различные пептиды, содержащие составы гранул (называемые в дальнейшем гранулами РА), полученные для оценки биодоступности.

Формула для гранул инсулина гларгина РА 1 (исследования на крысах)		
№ п/п	Ингредиенты	Количество на капсулу
1	Хенодеоксихолева кислота	30 мг
2	Инсулин гларгин	0,06 мг
3	Микрокристаллическа я целлюлоза 101	15 мг
4	Маннит	2,44 мг
5	Кроскармеллоза натрия	2,5 мг
6	НРМС-Е-5	В достаточном количестве
<b>Итого</b>		<b>50 мг</b>

Формула для гранул инсулина гларгина РА 2 (исследования на крысах)		
№ п/п	Ингредиенты	Количество на капсулу
1	Лабразол ALF	5 мг
2	Инсулин гларгин	0,06 мг
3	Микрокристаллическа я целлюлоза 101	35 мг
4	Маннит	7,44 мг
5	Кроскармеллоза натрия	2,5 мг
6	НРМС-Е-5	В достаточном количестве
<b>Итого</b>		<b>50 мг</b>

Формула для гранул октреотида ацетата РА 1 (исследования на крысах)		
№ п/п	Ингредиенты	Количество на капсулу
1	Хенодеоксихолева кислота	30 мг
2	Октреотида ацетат	0,3 мг
3	Микрокристаллическа я целлюлоза 101	15 мг
4	Маннит	2,2 мг
5	Кроскармеллоза натрия	2,5 мг
6	НРМС-Е-5	В достаточном количестве
<b>Итого</b>		<b>50 мг</b>

Таблица 16D

Формула для гранул терипаратида РА 1 (исследования на крысах)

№ п/п	Ингредиенты	Количество на капсулу
1	Хенодесоксихолевая кислота	30 мг
2	Терипаратид	0,12 мг
3	Микрокристаллическая целлюлоза 101	15 мг
4	Маннит	2,38 мг
5	Кроскармеллоза натрия	2,5 мг
6	НРМС-Е-5	В достаточном количестве
<b>Итого</b>		<b>50 мг</b>

Таблица 16E

Формула для гранул терипаратида РА 3 (исследования на крысах)

№ п/п	Ингредиенты	Количество на капсулу
1	Пиперин	3 мг
2	Терипаратид	0,12 мг
3	Микрокристаллическая целлюлоза 101	20 мг
4	Маннит	5,38 мг
5	Кроскармеллоза натрия	1,5 мг
6	НРМС-Е-5	В достаточном количестве
<b>Итого</b>		<b>30 мг</b>

Таблица 16F

Формула для гранул лираглутида натрия РА 2 (исследования на собаках)

№ п/п	Ингредиенты	Количество на капсулу
1	Лираглутид натрия	12 мг
2	Лабразол ALF	40 мг
3	Микрокристаллическая целлюлоза 101	100 мг
4	Кроскармеллоза натрия	10 мг
5	НРМС-Е-5	В достаточном количестве
<b>Итого</b>		<b>162 мг</b>

Формула для гранул лираглутида натрия РА 3+4 (исследования на собаках)			Таблица 16G
№ п/п	Ингредиенты	Количество на	
			капсулу
1	Лираглутид натрия	12 мг	
2	Пиперин	10 мг	
3	Солютол HS 15	25 мг	
4	Микрокристаллическая целлюлоза 101	100 мг	
5	Кроскармеллоза натрия	10 мг	
6	HPMC-E-5	В достаточном количестве	
<b>Итого</b>		<b>157 мг</b>	
Формула для гранул лейпролида ацетата РА 2 (исследования на собаках)			Таблица 16H
№ п/п	Ингредиенты	Количество на	
			капсулу
1	Лейпролида ацетат	1,25 мг	
2	Лабразол ALF	40 мг	
3	Микрокристаллическая целлюлоза 101	88,75 мг	
4	Кроскармеллоза натрия	10 мг	
5	HPMC-E-5	В достаточном количестве	
<b>Итого</b>		<b>140 мг</b>	
Формула для гранул лейпролида ацетата РА 2+3 (исследования на собаках)			Таблица 16I
№ п/п	Ингредиенты	Количество на	
			капсулу
1	Лейпролида ацетат	1,25 мг	
2	Лабразол ALF	30 мг	
3	Пиперин	10 мг	
4	Микрокристаллическая целлюлоза 101	88,75 мг	
5	Кроскармеллоза натрия	10 мг	
6	HPMC-E-5	В достаточном количестве	
<b>Итого</b>		<b>140 мг</b>	

Процедура грануляции пептидных гранул.

А) Получение связующего раствора: 0,3% мас./об. раствора HPMC E-5 получали растворением 75,0 мг HPMC E-5 в 25,0 мЛ деионизированной (D.I.) воды.

В) Получение порошкообразной смеси: все ингредиенты, кроме жидких эксципиентов, были точно взвешены и смешаны в полиэтиленовом пакете в течение 5,0 мин.

С) Добавление связующего вещества: взвешенное количество жидких эксципиентов вместе с пептидом добавляли в связующий раствор HPMC E-5 (0,03%). Полученную смесь добавляли по каплям для проведения влажной грануляции.

Д) Сушка гранул: гранулы сушили в вакуумном эксикаторе над слоем силикагеля в течение ночи.

Е) Просеивание гранул: высушенные гранулы пропускали через сито из нержавеющей стали № 40, собирали в подходящий стеклянный контейнер и хранили при комнатной температуре.

(В течение всей процедуры грануляции были отмечены температура: 22°C и влажность: 35% относительной влажности.)

Наполнение капсулы.

Гранулы MIRA и пептидные гранулы заполняли в капсулы вручную с использованием весов. В табл. 17А и 17В ниже представлен размер капсул, используемых для заполнения капсул для исследований на крысах и исследований на собаках соответственно.

Таблица 17А

№ п/п	Размер капсул, используемых для заполнения капсул для исследований на крысах	
	Гранулы	Размер
1	Инсулин гларгин + Хенодеоксихолевая кислота	3
2	Инсулин гларгин + Лабразол	3
3	Октреотида ацетат + Хенодеоксихолевая кислота	3
4	Восстановленный глутатион + Пиколинат хрома	1
5	Аскорбат натрия + Оксид ванадия	0
6	Мочевая кислота + Ванадат натрия	4
7	Терипаратид + Пиперин	3
8	Терипаратид + Хенодеоксихолевая кислота	3
9	Аскорбат натрия + Глюконат марганца	0

Таблица 17В

№ п/п	Размер капсул, используемых для заполнения капсул для исследований на собаках	
	Гранулы	Размер
1	Аскорбат натрия + Сульфат ванадия	00 (Энтеросолюбильное покрытие)
2	Аскорбат натрия + Оксид ванадия	00 (Энтеросолюбильное покрытие)
3	Лираглутид натрия + Солютол + Пиперин	3
4	Лираглутид натрия + Лабразол	3
5	Лейпролида ацетат + Лабразол	3
6	Лейпролида ацетат + Лабразол + Пиперин	3

Упаковка и хранение капсул.

Капсулы упаковывали в полиэтиленовые пакеты и переносили в HDPE контейнеры (HDPE - полиэтилен высокой плотности) с пакетиками силикагеля для контроля влажности.

Получение партий гранул плацебо.

Партию плацебо получали с использованием красителей цвета желтого заката и синего цвета, чтобы понять распадаемость и высвобождение гранул из капсул (визуально). Высушенные гранулы заполняли в капсулы размера 3 и определяли время распада на приборе для определения распадаемости (Electrolab) с помощью направляющих дисков. Было установлено, что время распада составляет  $3 \pm 1$  мин в воде и фосфатном буфере (pH 6,8) при  $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$ . Исследование высвобождаемости гранул плацебо (капсула-в-капсуле) Внешняя капсула: размер 0, гранулы желтого цвета. Внутренняя капсула: размер 4, гранулы синего цвета.

Исследование высвобождаемости проводили в приборе для определения распадаемости (Electrolab Mumbai) при  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  в 900 мл 0,1 N HCl (в течение 2 ч) и pH 6,8 фосфатного буфера.

Из визуального наблюдения можно сделать вывод, что внешние капсулы с энтеросолюбильным по-

крытием остаются интактными в 0,1 N HCl (стабильны во внутрижелудочных средах), но начинают распадаться в фосфатном буфере с рН 6,8 в течение 3 мин.

Внутренние капсулы начали распадаться через 8 мин и полностью растворились в течение 13 мин. Аналогичным образом высвобождение гранул MIRA может происходить через 3 мин после воздействия щелочного РН с последующим полным высвобождением пептида в течение 13 мин.

Оценка капсул.

Процедура проведения количественного анализа инсулина гларгина, октреотида ацетата и терипаратида для исследований на крысах - 50/30 мг гранул (удаленных из одной капсулы) точно взвешивали и растворяли в подвижной фазе. Дисперсию обрабатывали ультразвуком в течение 5 мин в ванне для обработки ультразвуком, фильтровали через шприцевой фильтр с размером пор 0,22 мкм и впрыскивали в систему ВЭЖХ. Калибровочная кривая для всех АФИ была построена с использованием многократных разбавлений в их соответствующих подвижных фазах, предложенных USP 2017. Были проведены количественные анализы, и было рассчитано процентное содержание лекарственного препарата с использованием калибровочных кривых.

Таблица 18

Результаты количественных анализов для каждого состава (исследования на крысах)

№ п/п	Код	Состав	Площадь (mAU*S)	Количество ный анализ (%)
1	РА1	Инсулин гларгин + хенодеоксихоловая кислота	1664	105,2
2	РА2	Инсулин гларгин + лабразол	1860	115,8
3	РА1	Октреотида ацетат + хенодеоксихоловая кислота	1638	24,5
4	РА1	Терипаратид + хенодеоксихоловая кислота	2203	98,02
5	РА3	Терипаратид + пиперин	2385	106,1

Исследования стабильности капсул инсулина гларгина.

Таблица 19

№ п/п	Композиция гранул инсулина гларгина Ингредиент	Количество на	
		капсулу Партия I	капсулы Партия II
1	Инсулин гларгин	0,12 мг	0,12 мг
2	Хенодеоксихоловая кислота	30 мг	--
3	Лабразол	--	30 мг
4	Микрокристаллическая целлюлоза	15 мг	20 мг
5	Кроскармеллоза натрия	2,5 мг	1,5 мг
6	Маннит	2,38 мг	5,38 мг
7	Связующее вещество (НРМСЕ-5)	В достаточном количестве	В достаточном количестве
	Общая масса	50 мг	50 мг

Наполнение капсулы. Режим: наполнение вручную; размер капсулы: 2; масса заполненных гранул: согласно представленной выше формуле.

Хранение капсул и гранул. Температура: 25±3°C; влажность: относительная влажность 35±5%; контейнер: HDPE 60 куб. см для капсул/прозрачный стеклянный флакон с резиновой крышкой для гранул.

Наблюдение. Из уравнения ( $y=30,977x-292,26$ , полученный по данным ВЭЖХ) было установлено, что содержание инсулина гларгина, присутствующего в составе, составляет 105,2 и 115,8% для партии I и партии II соответственно.

Исследования стабильности (75 дней). Обе партии хранили при комнатной температуре 25°C в течение 85 дней и повторно проводили количественные анализы.

Наблюдение. Из уравнения ( $y=30,977x-292,26$ , полученный по данным ВЭЖХ) было установлено, что содержание инсулина гларгина, присутствующего в составе, составляет 97,25 и 91,63% для партии I и партии II соответственно, как видно из табл. 20 ниже.

Таблица 20

Состав	Сравнительный анализ исследований стабильности			
	Площадь (0 дней)	Количественный анализ (0 дней)	Площадь (85 дней)	Количественный анализ (85 дней)
Инсулин гларгин + Хенодсоксихолевая кислота	1664 mAU*s	105,2 %	1515,3 mAU*s	97,25 %
Инсулин гларгин + Лабразол (Партия II)	1860 mAU*s	115,8 %	1410,9 mAU*s	91,63 %

Исследования стабильности терипаратида.

Таблица 21

№ п/п	Ингредиент	Композиция гранул терипаратида	
		Количество на капсулу Партия I	Количество на капсулы Партия II
1	Терипаратид	0,12 мг	0,12 мг
2	Хенодеоксихолева кислота	30 мг	--
3	Пиперин	--	3 мг
4	Микрокристаллическая целлюлоза	15 мг	20 мг
5	Кроскармеллоза натрия	2,5 мг	1,5 мг
6	Маннит	2,38 мг	5,38 мг
7	Связующее вещество (НРМСЕ-5)	В достаточном количестве	В достаточном количестве
	Общая масса	50 мг	30 мг

Наполнение капсулы. Режим: наполнение вручную; размер капсулы: 2; масса заполненных гранул: согласно представленной выше формуле.

Хранение капсул и гранул. Температура: 25±3°C; влажность: относительная влажность 35±5%; контейнер: HDPE 60 куб. см для капсул/прозрачный стеклянный флакон с резиновой крышкой для гранул.

Наблюдение. Из уравнения ( $y=18,924x-22,539$ , полученный по данным ВЭЖХ) было установлено, что содержание терипаратида ацетата, присутствующего в составе, составляет 98,02 и 106% для партии I и партии II соответственно.

Исследования стабильности (75 дней). Обе партии хранили при комнатной температуре 25°C в течение 75 дней и повторно проводили количественные анализы.

Наблюдение. Из уравнения ( $y=18,924x-22,539$ , полученный по данным ВЭЖХ) было установлено, что содержание терипаратида ацетата, присутствующего в составе, составляет 92,88 и 89,76% для партии I и партии II соответственно.

Таблица 22

Состав	Сравнительный анализ исследований стабильности			
	Площадь (0 дней)	Количественный анализ (0 дней)	Площадь (75 дней)	Количественный анализ (75 дней)
Терипаратид + хенодеоксихол евая кислота (Партия I)	2203 mAU*s	98,02 %	2087 mAU*s	92,88 %
Терипаратид + пиперин (Партия II)	2385 mAU*s	106,0 %	2016 mAU*s	89,76 %

Процедура проведения количественного анализа лейпролида ацетата для исследований на крысах.

Калибровочную кривую лейпролида ацетата получали с использованием ВЭЖХ; примерно 112 мг и 104 мг гранул (эквивалентно 100 мкг) точно взвешивали и разбавляли 1 мл подвижной фазы. Это дает дисперсию с теоретической концентрацией 100 мкг/мл для лейпролида ацетата. Дисперсию перемешивали на вортексе в течение 2 мин и затем фильтровали через шприцевой фильтр с размером пор 0,2 мкм. Затем 20,0 мкл этого отфильтрованного раствора впрыскивали в систему ВЭЖХ для определения содержания пептида.

Наблюдение. Из уравнения ( $y=42,67x - 76,447$ , полученный по данным исследований ВЭЖХ для пептида) было установлено, что для лейпролида ацетата % содержание пептида составляет

(А) лейпролида ацетат+гранулы лабразола ALF (РА 2): 97,45%; и

(В) лейпролида ацетат+лабразол ALF+гранулы пиперина (РА 2+3): 105,11%.

Исследование растворения капсул лейпролида.

Состав, содержащий лабразол ALF с лейпролидом (РА 2), был выбран для исследования растворения (на основании результатов количественного анализа).

Схема 1: использование диализной мембраны. Среда: фосфатный буферный раствор pH 6,80; объем: 10 мл; объем вывода: 400 мкл; скорость встряхивания: 100 об/мин; заполнение гранул: 140 мг (эквивалентно 1 капсуле); спецификация диализной мембраны: HIMEDIA LM395-30MT; размер пор: 25 нм; средняя плоская ширина: 29,31 мм; средний диаметр: 17,5 мм.

Таблица 23

Исследование высвобождаемости лейпролида с использованием диализной мембраны

Время	Площадь	% Высвобождения
5	0	Лейпролид не высвобождается через диализную мембрану
10	0	
15	0	
20	0	
25	0	

Схема 2: использование вращающейся корзинки (USP ТИП 1). Среда: фосфатный буферный раствор pH 6,80; объем: 25 мл; объем вывода: 400 мкл; скорость встряхивания: 100 об/мин; заполнение гранул: 140 мг в желатиновой капсуле.

Таблица 24

Данные о высвобождаемости in vitro для схемы 2

Время (мин)	Площадь	концентрация (мкг/мл)	концентрация (мкг/0,5 мл)	Ошибка	концентрация (мкг/25 мл)	CDR	%CDR
0	0	0	0	0	0	0	0
5	214,9	6,82791188 2	3,41395594 1	3,4139559	170,697797	174,111753	13,92894
10	400,76	11,1836653 4	5,59183266 9	5,5918327	279,591633 5	285,183466	22,81468
15	279,59	8,34396531 5	4,17198265 8	13,177771	208,599132 9	221,776904	17,74215
20	366,37	10,3777126 8	5,18885633 9	18,366628	259,442817	277,809445	22,22476
30	370,09	10,4648933 7	5,23244668 4	23,599074	261,622334 2	285,221408	22,81771
45	330	9,52535739 4	4,76267869 7	28,361753	238,133934 8	266,495688	21,31966
60	456,86	12,4984063 7	6,24920318 7	34,610956	312,460159 4	347,071116	27,76569
90	321,25	9,32029528 9	4,66014764 5	39,271104	233,007382 2	272,278486	21,78228

Схема 3: использование вращающейся корзинки (USP ТИП 1). Среда: фосфатный буферный раствор рН 6,80; объем: 30 мл; объем вывода: 400 мкл; скорость встряхивания: 500 об/мин; заполнение гранул: 140 мг в желатиновой капсуле.

Таблица 25

Данные о высвобождаемости in vitro для схемы 3

Время (мин)	Площадь	концентрация (мкг/мл)	концентрация (мкг/0,4 мл)	Ошибка	концентрация (мкг/30 мл)	CDR	%CDR
0	0	0	0	0	0	0	0
5	229,95	7,1806187 02	2,8722474 81	2,8722475	215,41856 1	218,29080 9	17,46326
10	215,206	6,8350831 97	2,7340332 79	2,7340333	205,05249 59	207,78652 9	16,62292
20	258,028	7,8386454 18	3,1354581 67	8,7417389	235,15936 25	243,90110 1	19,51209
30	218,98	6,9235294 12	2,7694117 65	11,511151	207,70588 24	219,21703 3	17,53736
45	236,02	7,3228732 13	2,9291492 85	14,4403	219,68619 64	234,12649 6	18,73012
60	337,56	9,7025310 52	3,8810124 21	18,321312	291,07593 16	309,39724 4	24,75178

Схема 4: использование вращающейся корзинки (USP ТИП 1). Среда: фосфатный буферный раствор рН 6,80; объем: 30 мл; объем вывода: 400 мкл; скорость встряхивания: 500 об/мин; заполнение гранул: 140 мг в капсуле гипромеллозы (размер 0).

Таблица 26

Данные о высвобождаемости in vitro для схемы 4

Время (мин)	Площадь	концентрация (мкг/мл)	концентрация (мкг/0,4 мл)	Ошибка	концентрация (мкг/30 мл)	CDR	%CDR
0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	1,791586595	0,716634638	0,7166346	53,74759784	54,4642325	4,357139
15	343,5	9,841738927	3,936695571	3,9366956	295,2521678	299,188863	23,93511
30	416,63	11,55558941	4,622235763	9,275566	346,6676822	355,943248	28,47546
45	527,55	14,15507382	5,662029529	14,937596	424,6522147	439,58981	35,16718
90	428,46	11,83283337	4,733133349	19,670729	354,9850012	374,65573	29,97246

Схема 5: Использование вращающейся корзинки (USP ТИП 1). Среда: фосфатный буферный раствор pH 6,80; объем: 30 мл; объем вывода: 500 мкл; скорость встряхивания: 100 об/мин; заполнение гранул: 140 мг без капсул непосредственно в корзинку.

Таблица 27

Данные о высвобождаемости in vitro для схемы 5

Время (мин)	Площадь	концентрация (мкг/мл)	концентрация (мкг/0,5 мл)	Ошибка	концентрация (мкг/30 мл)	CDR	%CDR
0	0	0	0	0	0	0	0
5	1491,97	36,7569018	18,3784509	18,378451	1102,707054	1121,08551	89,68684
10	1550,89	38,13773143	19,06886571	19,068866	1144,131943	1163,20081	93,05606
15	1280,8	31,80799156	15,90399578	53,351312	954,2397469	1007,59106	80,60728
20	1422	35,11710804	17,55855402	70,909866	1053,513241	1124,42311	89,95385

Схема 6: использование магнитной мешалки. Среда: фосфатный буферный раствор pH 6,80; объем: 30 мл; объем вывода: 500 мкл; скорость встряхивания: 200 об/мин; заполнение гранул: 140 мг в желатиновой капсуле размера 2.

Таблица 28

Данные о высвобождаемости in vitro для схемы 6

Время (мин)	Площадь	концентрация (мкг/мл)	концентрация (мкг/0,5 мл)	Ошибка	концентрация (мкг/30 мл)	CDR	%CDR
0	0	0	0	0	0	0	0
5	1761,8	43,08054839	21,5402742	21,540274	1292,416452	1313,95673	105,1165

10	1771,8	43,314905 09	21,657452 54	21,657453	1299,4471 53	1321,1046 1	105,6884
15	1750	42,804007 5	21,402003 75	64,59973	1284,1202 25	1348,7199 6	107,8976
20	1736,9	42,497000 23	21,248500 12	85,848231	1274,9100 07	1360,7582 4	108,8607

Схема 7: использование магнитной мешалки. Среда: фосфатный буферный раствор pH 6,80; объем: 30 мл; объем вывода: 500 мкл; скорость встряхивания: 200 об/мин; заполнение гранул: 140 мг в желатиновой капсуле размера 2.

Таблица 29

Данные о высвобождаемости in vitro для схемы 7

Время (мин)	Площадь	концентрация (мкг/мл)	концентрация (мкг/0,5 мл)	Ошибка	концентрация (мкг/30 мл)	CDR	%CDR
0	0	0	0	0	0	0	0
2,5	1440,6	35,5530114 8	17,7765057 4	17,776506	1066,59034 5	1084,36685	86,74935
5	1670,9	40,9502460 7	20,4751230 4	20,475123	1228,50738 2	1248,98251	99,9186
10	1603	39,3589641 4	19,6794820 7	57,931111	1180,76892 4	1238,70004	99,096
15	1638,4	40,1885868 3	20,0942934 1	78,025404	1205,65760 5	1283,68301	102,6946

На основании данных, представленных в табл. 24-29, можно отметить, что лейпролид не высвобождался из гранул через диализную мембрану (схема 1); вращающуюся корзинку (USP ТИП 1) использовали для схемы 2, и вращение корзинки не смогло сгенерировать вращательного движения, достаточного для перемещения/вращения материала в среде и, следовательно, материал вместе с желатином оседал, отрицательно влияя в конечном счете на высвобождение; схему 3 осуществляли путем повышения количества оборотов в минуту корзинки (100-500), но даже после повышения количества оборотов в минуту корзинки, было установлено, что % CDR составляет 24,75%; схему 4 осуществляли с повышенным количеством оборотов в минуту и заменой желатиновой капсулы на капсулу гипромеллозы, при этом было установлено, что % CDR составляет 29,97%; схему 5 осуществляли во вращающейся корзинке без капсулы, было установлено, что % CDR составляет 90%, а это подтверждает, что материал (желатин/гипромеллоза) может повышать вязкость и замедлять высвобождение лейпролида из гранул; схемы 6 и 7 осуществляли с использованием магнитной мешалки для генерирования подходящего вращения сред во время проведения количественного анализа, и было установлено, что % CDR составляет 108,8 и 102,6%, соответственно; все схемы экспериментов осуществлялись при 37°C, однако изменение температуры отрицательно влияет на распад капсулы, время распада при 25°C составило 12 мин, а время распада при 37°C - менее 2 мин.

Количественный анализ лираглутида натрия с использованием ВЭЖХ.

Испытание 1.

Процедура. Примерно 10,0 мг гранул, РА 2 (табл. 16F) и РА 3+4 (табл. 16G) разбавляли 10,0 мл разбавителя ВЭЖХ (10% АСН в D.I. воде). Это дает нам дисперсию с теоретической концентрацией 74 мкг/мл для лираглутида натрия. Дисперсию обрабатывали ультразвуком в течение 5,0 мин в ультразвуковой ванне, а затем фильтровали через шприцевой фильтр с размером пор 0,2 мкм. Затем 20,0 мкл этого отфильтрованного раствора впрыскивали в систему ВЭЖХ для определения содержания пептида.

Наблюдение. Из уравнения ( $y=79,283x-571,72$ , полученный в результате исследований ВЭЖХ для пептида) было установлено, что содержание для состава лираглутида натрия с гранулами лабразола ALF (РА 2) составляет 44,4 и 25,4% - для состава лираглутида натрия с пиперином и солютолом HS-15 (РА 3+4).

(а) Количественный анализ для состава лираглутида натрия с пиперином и солютолом HS-15: 67,39% перемешивали на вортексе в течение 2 мин.

(б) Количественный анализ для состава лираглутида натрия с гранулами лабразола ALF: 80,43% перемешивали на вортексе в течение 2 мин.

(с) Количественный анализ для состава лираглутида натрия с пиперином и солютолом HS-15: 95,66% перемешивали на вортексе в течение 5 мин.

(d) Количественный анализ для состава лираглутида натрия с гранулами лабразола ALF: 96,99% перемешивали на вортексе в течение 5 мин.

Исследование растворимости лираглутида.

Среда: фосфатный буферный раствор pH 6,80; объем: 30 мл; объем вывода: 500 мкл; скорость встряхивания: 200 об/мин.

Таблица 30

Данные о высвобождаемости in vitro для лираглутида PA 2 (табл. 16F)

Время (мин)	Площадь	концентрация (мкг/мл)	концентрация (мкг/1мл)	Ошибка	концентрация (мкг/100мл)	CDR	%CDR
0	0	0	0	0	0	0	0
5	5050	70,90700402	35,45350201	35,45350201	7090,700402	7126,153904	59,38461587
7,5	5085,23	71,35136158	35,67568079	35,67568079	7135,136158	7170,811839	59,75676532
10	7804,21	105,6459771	52,82298853	123,9521713	10564,59771	10688,54988	89,07124899
15	9447,27	126,3699658	63,18498291	187,1371542	12636,99658	12824,13374	106,8677811
20	9912,43	132,2370496	66,11852478	253,255679	13223,70496	13476,96063	112,3080053
30	9912,43	132,2370496	66,11852478	319,3742038	13223,70496	13543,07916	112,858993

Таблица 31

Данные о высвобождаемости in vitro для лираглутида PA 3+4 (табл. 16G)

Время (мин)	Площадь	концентрация (мкг/мл)	концентрация (мкг/1мл)	Ошибка	концентрация (мкг/100мл)	CDR	%CDR
0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0
7,5	6823,8	93,2800222	46,6400111	46,6400111	9328,00222	9374,64223 1	78,1220185 9
10	7692,74	104,240001	52,1200005	98,7600116	10424,0001	10522,7601 1	87,6896676
15	7778,6	105,322957	52,6614785	151,421490 1	10532,2957	10683,7171 9	89,0309765 9
20	7987,41	107,956686 8	53,9783434	205,399833 5	10795,6686 8	11001,0685 1	91,6755709 5
30	8131,53	109,774478 8	54,8872393 8	260,287072 9	10977,4478 8	11237,7349 5	93,6477912 5

Наблюдение. Было установлено, что % CDR составляет 112,85 и 93,64% для лираглутида PA 2 и PA 3+4 соответственно. Было установлено, что более 50% лираглутида натрия высвобождается в течение 5-7 мин.

Количественное определение уровня глюкозы и инсулина гларгина в плазме крови STZ-индуцированных крыс с сахарным диабетом.

Проводили количественное определение уровня глюкозы и инсулина гларгина в плазме крови после введения нескольких составов инсулина гларгина в среднюю часть тощей кишки STZ-индуцированным крысам линии Спрег-Доули с сахарным диабетом.

Испытуемый состав I. Инсулин гларгин (Лантус®) - внешний вид: раствор для инъекций в предварительно запрограммированном шприце-ручке; концентрация: 100МЕ/мл; условие хранения: 2-8°C; доза: 0,2 ед/кг; путь: подкожный.

Испытуемый состав II. Состав Инсулина гларгина - MIRA 1 (восстановленный глутатион/пиколинат хрома из табл. 15A)+усилитель проницаемости 1 (PA 1 из табл. 16A) (оральный раствор в ТРИС буферном растворе); доза: 1,7 ед/животное; путь: средняя часть тощей кишки.

Испытуемый состав III. Состав Инсулина гларгина - PA 2 (из табл. 16B) и MIRA 2 (аскорбат натрия/оксид ванадия из табл. 15B) (оральный раствор в ТРИС буферном растворе); доза: 1,7 ед/животное; путь: средняя часть тощей кишки.

Наблюдения. После подкожного введения и введения в среднюю часть тощей кишки инсулина гларгина летальных исходов не наблюдалось. Наблюдаемые клинические симптомы в норме. Что касается временных точек отбора образцов, то во время введения дозы, временные точки сбора крови находи-

лись на 0, 20, 40, 60, 120 и 150 мин после введения дозы. ~100 мкл Крови собирали в эппендорф, преднаполненный Na-EDTA, из пункции ретро-орбитальной пазухи. Кровь центрифугировали со скоростью 5000 об/мин, в течение 5 мин, при 4°C для получения плазмы. Глюкозу измеряли немедленно после сбора крови с помощью глюкометра.

Таблица 32

Влияние лечения различными составами на STZ-индуцированных крыс с сахарным диабетом

Группы	Количество	% ингибирования (мин)				
		20	40	60	120	150
Носитель	2	1,6	-1,6	-2,2	-1,5	-1,8
STZ + Инсулин гларгин (0,2 ЕД/кг)	3	22,9	25,5	22	39	17,2
STZ + Испытуемый состав II	3	-23,2	-15,1	-14,7	-13,2	-15,4
STZ + Испытуемый состав III	3	-3,5	-13,1	0,8	8,8	10

Таблица 33

Биодоступность инсулина гларгина

Группы	Количество	AUC ± SEM
Носитель	2	67705 ± 2965
STZ + Инсулин гларгин (0,2 ЕД/кг)	3	39408 ± 8561
STZ + Испытуемый состав II	3	80133 ± 5168
STZ + Испытуемый состав III	3	57315 ± 3474

Исследование ELISA.

Источник. Invitron Ltd, каталог № MBS495369.

Принцип. Данное исследование ELISA гларгина представляет собой двухстадийный иммуноанализ, использующий моноклональное антитело, иммобилизованное в микротитрационных лунках, и растворимое антитело, меченное пероксидазой хрена (HRP).

Образец плазмы инкубируют в микротитрационной лунке вместе и после этапа промывки добавляют раствор конъюгата антитело-HRP. После второй инкубации наступает следующий этап промывки для удаления несвязанного конъюгата антитело-HRP перед измерением. В каждую лунку добавляют субстрат для фермента и после короткой инкубации добавляют еще один реагент для прекращения реакции. Проводится количественное определение интенсивности цвета, проявляющегося в каждой лунке, в считывателе микротитрационного планшета, установленном для регистрации пропускаемого света на длине волны 450 нм (протокол набора: использовали рекомендованный изготовителем протокол, каталог № MBS495369).

Процедура. Перед использованием доведите все компоненты набора и образцы до комнатной температуры. Соберите необходимое количество полосок с покрытием в держателе планшета. Те полоски, которые не используются немедленно, могут храниться в запечатанном полиэтиленовом пакете с осушителем из силикагеля. Убедитесь, что оставшиеся места в держателе планшета заполнены полосками без покрытия для обеспечения равномерной теплопередачи во время инкубации. Накапайте пипеткой 100 мкл образцового буферного раствора в каждую лунку. Накапайте пипеткой 25 мкл стандартного или образцового раствора в соответствующие лунки. Рекомендуется, чтобы все стандартные и образцовые растворы использовались в двух экземплярах. Прикрепите приспособление для заклеивания планшета и инкубируйте в течение 2 ч при комнатной температуре (18-22°C). Удалите приспособление для заклеивания планшета и выполните 3 цикла промывки, используя охлажденный\* рабочий промывочный буферный раствор (каждый цикл - 300 мкл) посредством автоматической машины для мойки планшетов. Накапайте пипеткой 100 мкл рабочего раствора конъюгата антитела в каждую лунку. Прикрепите приспособление для заклеивания планшета и инкубируйте еще 4 ч при температуре 4°C (2-8°C). Удалите приспособление для заклеивания планшета и выполните 3 цикла промывки, используя охлажденный\* рабочий промывочный буферный раствор посредством автоматической машины для мойки планшетов. Добавьте 100 мкл субстратного раствора в каждую лунку. Инкубируйте в течение 15 мин при комнатной температуре (18-22°C) в темноте. Добавьте 100 мкл останавливающего раствора в каждую лунку. Измерьте светопропускание в считывателе микротитрационного планшета, установленном на длине волны 450 нм, и по возможности с вычитанием фона, измеренным на OD 620/650 нм. На чертеже проиллюстрирован график, изображающий профиль зависимости концентрации от времени инсулина гларгина (мЕд/л) из различных составов.

Было установлено, что испытуемый состав инсулин гларгин-MIRA 1 (восстановленный глутатион/пиколинат хрома) плюс усилитель проницаемости 1 (PA 1) проявляет относительную биодоступность, составляющую 9,25%, и было установлено, что испытуемый состав инсулин гларгин-PA 2 и MIRA 2 (ас-

корбат натрия/оксид ванадия) проявляет относительную биодоступность, составляющую 28,86%.

Количественное определение уровня лейпролида в плазме крови собак с использованием набора для ELISA.

Справочная информация по испытываемому составу: лупродекс (депо). Концентрация: каждый флакон содержит 3,75 мг лейпролида ацетата; дата изготовления: ноябрь 2017 г.; дата истечения срока: октябрь 2020 г.; условие хранения: хранить при комнатной температуре (ниже 25°C); не замораживать; количество флаконов: 1 флакон с разбавителем.

Испытуемый состав FB: MIRA 5 (табл. 15E)+PA 2 (табл. 16H) - внешний вид: твердая желатиновая капсула с белым колпачком и белым корпусом; концентрация: каждая капсула 300 мг содержит 1,25 мг лейпролида ацетата; дата изготовления: 21 апреля 2018 г.; дата истечения срока: нет данных; условие хранения: хранить при комнатной температуре (ниже 25°C); количество капсул исследуемого вещества: 70 капсул (1 бутылка).

Испытуемый состав H: MIRA 2 (табл. 15F)+PA 2+3 (табл. 16I) - внешний вид: твердая желатиновая капсула с белым колпачком и белым корпусом; концентрация: каждая капсула 300 мг содержит 1,25 мг лейпролида ацетата; дата изготовления: 19 апреля 2018 г.; дата истечения срока: нет данных; условие хранения: хранить при комнатной температуре (ниже 25°C); количество капсул исследуемого вещества: 70 капсул (1 бутылка).

Таблица 34

## План исследования

	Количество животных	Путь введения	Состав	Доза
Группа 1	2	Подкожный	Эталонный	Лейпрорелин, в качестве метки (один имплантат в начале программы)
Группа 2	2	Оральный	Состав H (MIRA 2)	Лейпрорелин 1,25 мг, один раз в день по одной капсуле в течение 30 дней
Группа 3	2	Оральный	Состав FB (MIRA 5)	Лейпрорелин 1,25 мг, один раз в день по одной капсуле в течение 30 дней

В период введения дозы собакам (*Canis familiaris*, порода бигль) не давали пищу (воду разрешали) на ночь в течение приблизительно 12 ч перед и 4 ч после введения дозы. После введения лекарственного препарата всех животных наблюдали на предмет неблагоприятных клинических симптомов в течение вплоть до 720 ч после введения доз. Массу тела собак, использованных в исследовании, регистрировали до начала введения доз.

Временные точки для отбора образцов.

Приблизительно 2 мл образца крови от каждой собаки для подкожного и орального путей введения доз собирали в следующих временных точках: 0, 1, 2, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 240, 312, 360, 480 и 720 ч (всего 15 точек) из яремной вены в меченные трубки с покрытием K2EDTA.

Данные по исследованию ELISA.

Источник: каталог № S-1174 (Des-Gly10, D-Leu6, Pro-NHEt9)-LHRH (Лейпролид).

Протокол набора: использовали рекомендованный изготовителем протокол (каталог № S1174).

Результаты: было установлено, что испытываемый состав FB проявляет относительную биодоступность, составляющую 56,53%, и было установлено, что испытываемый состав H проявляет относительную биодоступность, составляющую 16%.

Количественное определение уровня лираглутида в плазме крови собак с использованием набора для ELISA.

Испытуемый состав I: лираглутид - внешний вид: раствор для инъекций в предварительно заправ-

ленном шприце-ручке; концентрация: 6 мг/мл; дата изготовления: 02/2017 г.; дата истечения срока: 07/2019 г.; условие хранения: 2-8°C; доза: 0,6 мг/собака; путь: подкожный.

Испытуемый состав II (FA): MIRA 5 (табл. 15E)+PA 2 (табл. 16F) - доза: 12 мг (одна капсула)/собака; путь: оральный.

Испытуемый состав III (G): MIRA 5 (табл. 15E)+PA 3+4 (табл. 16G) - доза: 12 мг (одна капсула)/собака; путь: оральный.

Таблица 35

План исследования				
	Количество животных	Путь введения	Состав	Доза
Период 1	2	Подкожный	Состав I Лираглутид	0,6 мг/собака
4 – 5 дней выведения				
Период 2	2	Оральный	Состав II FA	12 мг (одна капсула)/собака
4 – 5 дней выведения				
Период 3	2	Оральный	Состав III G	12 мг (одна капсула)/собака

После подкожного и орального введения лираглутида летальных исходов не наблюдалось. Наблюдаемые клинические симптомы в норме. Массу тела собак, использованных в исследовании, регистрировали до начала введения доз. В период введения дозы, собакам (*Canis lupus familiaris*, Порода - Бигль) не давали пищу (воду разрешали) на ночь в течение приблизительно 12 ч перед и 4 ч после введения дозы. Во время введения доз, временные точки сбора крови составляли 0, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 480 мин после введения дозы. 2 мл Крови собирали из яремной вены в меченные трубки с покрытием K2EDTA. Глюкозу измеряли немедленно после сбора крови с помощью глюкометра.

Данные по исследованию ELISA.

Источник: Krishgen BioSystems, каталог № KBI5020 Ver2.0.

Протокол набора: использовали рекомендованный изготовителем протокол (каталог № KBI5020) Ver2.0.

(1) Определите лунки для разбавленного стандартного, холостого и образцового раствора. Подготовьте 5 лунок для временных точек для стандартного раствора, 1 лунку для холостого раствора. Добавьте 50 мкл каждого разбавленного стандартного (см. получение реагента), холостого и образцового раствора в соответствующие лунки соответственно. И затем немедленно добавьте 50 мкл лираглутида-биотина в каждую лунку. Аккуратно встряхните планшет (рекомендуется использовать встряхиватель для микропланшетов). Накройте приспособлением для заклеивания планшета. Инкубируйте в течение 1 ч при температуре 37°C. Лираглутид-биотин может оказаться непрозрачным. Нагрейте до комнатной температуры и аккуратно перемешивайте до тех пор, пока раствор не станет однородным.

(2) Аспирируйте раствор и промойте 350 мкл промывочного раствора 1× каждую лунку, используя бутылку с пульверизатором, многоканальную пипетку, многоканальный дозатор или автомойку, и оставьте на 1-2 мин. Полностью удалите оставшуюся жидкость из всех лунок, защелкнув планшет на абсорбционную бумагу. Повторите 3 раза. После последней промывки, удалите весь оставшийся промывочный буферный раствор посредством аспирации или декантации. Переверните планшет и промокните его абсорбционной бумагой.

(3) Добавьте 100 мкл рабочего раствора стрептавидина-HRP в каждую лунку. Инкубируйте в течение 30 мин при 37°C после накрывания его приспособлением для заклеивания планшета.

(4) Повторите процесс аспирации/промывки в общей сложности 5 раз, как описано на этапе 2.

(5) Добавьте 90 мкл субстратного раствора в каждую лунку. Накройте новым приспособлением для заклеивания планшета. Инкубируйте в течение 10-20 мин при 37°C (не более 30 мин). Беречь от света. При добавлении субстратного раствора жидкость станет синей.

(6) Добавьте 50 мкл останавливающего раствора в каждую лунку. При добавлении останавливающего раствора жидкость станет желтой. Смешайте жидкость, постукивая по краю планшета. Если изменение цвета не выглядит однородным, то аккуратно постучите по планшету, чтобы обеспечить тщательное перемешивание.

(7) Удалите все капли воды и отпечатки пальцев на нижней части планшета и убедитесь, что на по-

верхности жидкости нет пузырьков. Затем запустите считыватель микропланшета и немедленно проведите измерение на длине волны 450 нм.

Было установлено, что испытуемый состав FA (Mira 5 плюс лираглутид+лабразол) проявляет относительную биодоступность, составляющую 3,82%, и было установлено, что испытуемый состав G (Mira 5 плюс лираглутид+солотол+пиперин) проявляет относительную биодоступность, составляющую 3,57%.

Количественное определение уровня октреотида в плазме крови крыс с использованием набора для ELISA.

Испытуемый состав I: октреотид - внешний вид: раствор для инъекций; концентрация: 0,1 мг/мл; условие хранения: 2-8°C; доза: 10 ед/кг; путь: подкожный.

Испытуемый состав II: MIRA 3 (табл. 15C)+PA 1 (табл. 16C) для введения доз в дистальный отдел тонкой кишки (подвздошная кишка) крысе линии Спрег-Доули, которой было сделано обезболивание; доза: 144 мкг/животное; путь: дистальный отдел тонкой кишки (подвздошная кишка). Во время эксперимента животных кормили.

Таблица 36

План исследования

Группы	Количество	Описание дозы
Октреотид	3	подкожно
MIRA 3 + PA 1	3	MIRA3 и PA1, смешанные с трис буферным раствором (2 мл/кг)

После подкожного введения и введения в дистальный отдел тонкой кишки (подвздошная кишка) октреотида летальных исходов не наблюдалось. Наблюдаемые клинические симптомы в норме. Во время введения доз временные точки сбора крови находились на 0, 7, 15, 30, 45, 60 и 90 мин после введения дозы. ~100 мкл Крови собирали в эппендорф, преднаполненный Na-EDTA, из пункции ретро-орбитальной пазухи. Кровь центрифугировали со скоростью 5000 об/мин в течение 5 мин при 4°C для получения плазмы. Данные по исследованию ELISA

Источник: Peninsula Laboratories International, Inc, каталог № S-1341.0001.

Протокол набора: использовали рекомендованный изготовителем протокол (каталог № S-1341.0001) - в каждую лунку иммунопланшета добавьте 25 мкл антисерума (в ИФА-буферный раствор). Добавьте 25 мкл ИФА-буферного раствора в пустые лунки; Инкубируйте при комнатной температуре в течение 1 ч. Добавьте 50 мкл стандартного или образцового раствора (в разбавителе). Не промывайте планшет перед добавлением. Добавьте 50 мкл разбавителя в пустые лунки. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 2 ч. Более короткие преинкубации могут привести к снижению чувствительности. Регидрируйте Вт-индикатор (в ИФА-буферном растворе) и добавьте 25 мкл/лунка. Инкубируйте при 4°C в течение ночи. Для достижения наилучших результатов заново доведите до комнатной температуры, прежде чем продолжить. Промойте иммунопланшет 5 раз посредством 300 мкл/лунка ИФА-буферного раствора. Будьте очень осторожны, чтобы не допустить перекрестного загрязнения между лунками в первом цикле промывки/распределения. В каждом цикле промывки осушите содержимое планшета быстрым колебательным движением запястья, затем аккуратно промокните насухо верхнюю часть планшета бумажными полотенцами. Распределите 300 мкл ИФА-буферного раствора в каждую лунку и аккуратно встряхивайте в течение по меньшей мере нескольких секунд. Тщательная промывка необходима. Добавьте 100 мкл/лунку стрептавидина-HRP. Откачайте жидкость или центрифугируйте флакон с SAHRP, чтобы собрать все жидкое содержимое, находящееся на дне флакона. Разбавьте 1/200 в ИФА-буферном растворе (60 мкл/12 мл) и перемешайте на вортексе. Добавьте 100 мкл во все лунки, включая пустые. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 1 ч. Промойте иммунопланшет 5 раз (см. этап 7). Добавьте 100 мкл/лунка раствора ТМБ. Добавьте во все лунки, включая пустые. Инкубируйте при комнатной температуре (обычно 30-60 мин). Вы можете считать проявившийся синий цвет на длине волны 650 нм и использовать данные для своих расчетов. Прекратите реакции, добавив 100 мкл 2 N HCl на лунку. Считывайте абсорбцию на длине волны 450 нм в течение 10 мин. Было установлено, что испытуемый состав MIRA 3 (мочевая кислота: ванадат натрия)+PA 1 проявляет относительную биодоступность, составляющую 0,41%.

Количественное определение уровня терипаратида в плазме крови крыс с использованием набора для ELISA.

Испытуемый состав I: терипаратид. Внешний вид: раствор для инъекций; концентрация: 600 ед/2,4 мл; условие хранения: 2-8°C; доза: 10 ед/животное; путь: подкожный испытуемый состав II: MIRA 4 (табл. 15D) плюс PA 1 (табл. 16D) вводили в дистальный отдел тонкой кишки (подвздошная кишка) в дозе 240 мкг/животное крысам, которым было сделано обезболивание; доза: 240 мкг/животное; путь: дистальный отдел тонкой кишки (подвздошная кишка).

Испытуемый состав III: MIRA 1 (табл. 15A)+PA 3 (табл. 16E) вводили в дистальный отдел тонкой кишки (подвздошная кишка) в дозе 240 мкг/животное крысам линии Спрег-Доули, которым было сделано

обезболивание; доза: 240 мкг/животное; путь: дистальный отдел тонкой кишки (подвздошная кишка).

Таблица 37

## План исследования

Группы	Количество	Описание дозы
Терипаратид	3	подкожно
MIRA 4 + PA 1	3	MIRA 4 и PA 1, смешанные с трис буферным раствором (2 мл/кг)
MIRA 1 + PA 3	3	MIRA 1 и PA 3, смешанные с трис буферным раствором (2 мл/кг)

Во время эксперимента животных кормили. После подкожного введения и введения в дистальный отдел тонкой кишки (подвздошная кишка) терипаратида летальных исходов не наблюдалось. Наблюдаемые клинические симптомы - в норме. Во время введения доз временные точки сбора крови находились на 0, 7, 15, 30, 45, 60 и 90 мин после введения дозы. ~100 мкл Крови собирали в эппендорф, предполненный Na-EDTA, из пункции ретро-орбитальной пазухи. Кровь центрифугировали со скоростью 5000 об/мин, в течение 5 мин, при 4°C для получения плазмы.

Данные по исследованию ELISA.

Источник: Immutopics, каталог № 60-3900.

Протокол набора: использовали рекомендованный изготовителем протокол (каталог № 60-3900) - поместите достаточное количество полосок, покрытых стрептавидином, в держатель для прогонки стандартных растворов ПТГ, контрольных растворов и неизвестных образцовых растворов. Накапайте пипеткой 150 мкл стандартного, контрольного или образцового раствора в специально предназначенную или обозначенную лунку. Заморозьте оставшиеся стандартные и контрольные растворы как можно скорее после использования. Накапайте пипеткой 50 мкл рабочего раствора антител, состоящего из 1 части антитела HRP и 1 части биотинилированного антитела в каждую лунку. Накройте планшет одним приспособлением для заклеивания планшета, а затем накройте алюминиевой фольгой, чтобы избежать воздействия света. Инкубируйте планшет при комнатной температуре в течение 3 ч на горизонтальном вращателе, установленном на 180-220 об/мин. Снимите алюминиевую фольгу и приспособление для заклеивания планшета. Используя автоматическую микротитрационную машину для мойки планшетов, аспирируйте содержимое каждой лунки. Промойте каждую лунку пять раз, распределяя 350 мкл рабочего моющего раствора в каждую лунку, а затем полностью аспирируйте содержимое. Подходящее аспирационное устройство также может быть использовано. Накапайте пипеткой 200 мкл субстрата HRP ELISA в каждую лунку. Снова закройте планшет приспособлением для заклеивания планшета и алюминиевой фольгой. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 30 мин на горизонтальном вращателе, установленном на 180-220 об/мин; Снимите алюминиевую фольгу и приспособление для заклеивания планшета. Считывайте абсорбцию на длине волны 620 нм (см. примечание) в течение 5 мин в считывателе микротитрационного планшета против лунок со стандартным раствором 0 пг/мл в виде холостого раствора. Немедленно накапайте пипеткой 50 мкл останавливающего раствора ELISA в каждую лунку. Смешивайте на горизонтальном вращателе в течение 1 мин. Считывайте абсорбцию на длине волны 450 нм в течение 10 мин в считывателе микротитрационного планшета против холостого раствора реагента 200 мкл субстрата и 50 мкл останавливающего раствора. Если доступна коррекция на две длины волны, то установите длину волны измерения на 450 нм и эталонную длину волны для абсорбции, используемой на этапе № 9.

Было установлено, что испытуемый состав MIRA 4 (аскорбат натрия: глюконат марганца) плюс PA 1 проявляет относительную биодоступность, составляющую 0,89%. Было установлено, что испытуемый состав MIRA 1 (восстановленный глутатион/пиколинат хрома) плюс PA 3 проявляет относительную биодоступность, составляющую 0,89%.

Не смотря на то что все вышеизложенное описывает различные варианты осуществления настоящего изобретения, однако другие и дополнительные варианты осуществления настоящего изобретения могут быть разработаны без отступления от его основного объема. Объем настоящего изобретения определяется формулой изобретения, которая представлена ниже. Настоящее изобретение не ограничивается описанными вариантами осуществления, версиями или примерами, которые включены для того, чтобы дать возможность человеку обычной квалификации в данной области техники создавать и использовать настоящее изобретение в сочетании с информацией и знаниями, доступными для человека обычной квалификации в данной области техники.

#### Преимущества изобретения

Настоящее изобретение предлагает фармацевтическую композицию, которая может преодолеть недостатки, связанные с имеющимися композициями известного уровня техники.

Настоящее изобретение предлагает фармацевтическую композицию для эффективной доставки пептида.

Настоящее изобретение предлагает фармацевтическую композицию для оральной доставки пептида.

Настоящее изобретение предлагает фармацевтическую композицию, которая обеспечивает защиту, по меньшей мере, частично пептиду от протеолитической деградации при его приеме внутрь.

Настоящее изобретение предлагает фармацевтическую композицию, которая повышает биодоступность пептида.

Настоящее изобретение предлагает фармацевтическую композицию, которая является безопасной.

Настоящее изобретение предлагает фармацевтическую композицию, которая является экономически выгодной, ее легко получить и у нее длительный срок хранения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически эффективное количество по меньшей мере одного пептида, выбранного из следующей группы: инсулин, лираглутид, октреотид, терипаратид, лейпролид; и фармацевтически приемлемое количество комбинации
  - (a) по меньшей мере одного металла в виде его соли или комбинации соли и его комплекса; и
  - (b) по меньшей мере одного восстановителя, выбранного из следующей группы: аскорбат натрия, восстановленный глутатион, мочева кислота, маннит, бензогидроксамовая кислота, цистеин, пиперин - и любой их комбинации,
 отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один металл выбран из любого из следующих или их комбинации: оксид ванадия (V), ванадат натрия, сульфат ванадия, сульфат ванадила, бигуанид ванадия, бис(мальтолато)оксавандий (IV), ацетат ванадия, пиколинат ванадила, цитрат ванадила, пиколинат хрома, полиникотинат хрома, никотинат хрома, хлорид хрома, ацетат хрома, глюконат марганца, сульфат марганца, перманганат калия и хлорид марганца, при этом указанная фармацевтическая композиция дополнительно содержит по меньшей мере один усилитель абсорбции, выбранный из следующей группы: хенодеоксихолева кислота, лабразол ALF, пиперин, солютол HS 15 - и любой их комбинации.
2. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один металл выбран из любого из следующих или их комбинации: оксид ванадия (V), ванадат натрия и сульфат ванадия, при этом фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один указанный металл в количестве от 0,01 до 15 мг на единицу дозы.
3. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один металл выбран из любого из следующих или их комбинации: оксид ванадия (V), ванадат натрия и сульфат ванадия.
4. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один металл выбран из любого из следующих или их комбинации: пиколинат хрома и хлорид хрома, при этом фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один указанный металл в количестве от 0,02 до 0,5 мг на единицу дозы.
5. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один металл выбран из любого из следующих или их комбинации: пиколинат хрома и хлорид хрома.
6. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один металл выбран из любого из следующих или их комбинации: перманганат калия и глюконат марганца, при этом фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один указанный металл в количестве от 0,1 до 10 мг на единицу дозы.
7. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один металл выбран из любого из следующих или их комбинации: глюконат марганца и перманганат калия.
8. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один пептид имеет молекулярную массу, равную или меньшую 60 кДа.
9. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один пептид и указанный по меньшей мере один металл в виде его соли или комбинации соли и его комплекса присутствуют в физически разделенном виде в указанной фармацевтической композиции.
10. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один пептид и указанный по меньшей мере один металл в виде его соли или комбинации соли и его комплекса присутствуют в отдельных компартментах.
11. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанная фармацевтическая композиция присутствует в виде любого из следующих: капсула-в-капсуле и таблетка-в-капсуле.
12. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанная фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один восстановитель в количестве от 1 до 1000 мг на единицу дозы.
13. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что по меньшей мере один усилитель абсорбции присутствует в количестве от 10 до 1000 мг на единицу дозы.

14. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанная фармацевтическая композиция составлена в виде твердой оральной лекарственной формы и жидкой оральной лекарственной формы при условии, что, когда указанная фармацевтическая композиция составлена в виде жидкой оральной лекарственной формы, фармацевтическая композиция содержит воду в количестве менее 5% объемного содержания.

15. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.1-14 для обеспечения защиты, по меньшей мере, частично по меньшей мере одного пептида от протеолитической деградации.

Зависимость концентрации от времени гларгина (мЕд/л) в различных группах

