

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202491243 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.08.19

(22) Дата подачи заявки  
2022.12.12

(51) Int. Cl. *A61K 9/00* (2006.01)  
*A61K 9/16* (2006.01)  
*A61K 31/65* (2006.01)  
*A61P 31/04* (2006.01)

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, ВКЛЮЧАЮЩАЯ ТИГЕЦИКЛИН

(31) 102021000031133

(32) 2021.12.13

(33) IT

(86) PCT/EP2022/085366

(87) WO 2023/110739 2023.06.22

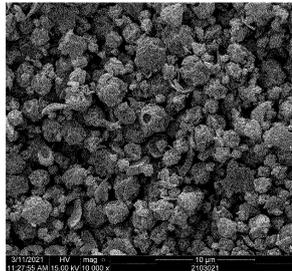
(71) Заявитель:  
ЗАМБОН С.П.А. (IT)

(72) Изобретатель:

Маджи Лоретта, Венециани  
Кристина, Бутти Хейке, Цанеллотти  
Лаура, Тангерлини Джованни,  
Капонетти Джованни (IT)

(74) Представитель:  
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции в форме сухого порошка для ингаляционного введения, включающей глицилциклин, в частности тигециклин, в количестве менее 50% по массе относительно общей массы композиции, лактозу в количестве, равном или превышающем количество указанного тигециклина, и необязательно лейцин.



A1

202491243

202491243

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-581215EA/025

### ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, ВКЛЮЧАЮЩАЯ ТИГЕЦИКЛИН

#### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции в форме сухого порошка для ингаляционного введения, обладающей высокой вдыхаемостью и стабильностью.

В частности, настоящее изобретение относится к порошку для ингаляций, предназначенному для лечения легочных инфекций, вызванных микобактериями, в частности нетуберкулезными микобактериями, содержащему лекарственные средства, принадлежащие к классу глицилциклинов, в частности тигециклин.

#### Предпосылки создания изобретения

Микобактерии относятся к роду *Mycobacterium*, впервые выявленному в 1896 году. Род *Mycobacterium* включает около 190 видов бактерий, характеризующихся клеточной стенкой с высоким содержанием восков и миколовой кислоты, что придает устойчивость к осмотическому давлению, факторам окружающей среды и антибиотикам.

Что касается микобактериальных легочных инфекций, можно выделить два основных этиологических агента, *Mycobacterium tuberculosis* и нетуберкулезные микобактерии (NTM, *Non Tuberculous Mycobacteria*).

Микобактерия туберкулеза, этиологический агент туберкулеза (ТВ), четко отличается по среде обитания, патогенности, контагиозности и чувствительности к химиотерапевтическим средствам от всех остальных видов микобактерий и остается одной из наиболее частых причин инфекции и смертности в мире.

Иными словами, NTM-вызываемые легочные инфекции (NTM-вызванное легочное заболевание, NTM-PD), менее известны, хотя они постепенно становятся одной из основных проблем глобального здравоохранения из-за их постоянного роста во всем мире.

Классификация нетуберкулезных микобактерий состояла из двух этапов. Первым этапом стала классификация с использованием скорости роста в качестве отличительного критерия путем разделения микобактерий на две группы. Колонии, видимые невооруженным глазом через 7 дней после посева, считались принадлежащими к медленно растущим NTM (медленно растущие микобактерии, SGM), тогда как видимые колонии менее чем через 7 дней были отнесены к быстрорастущим NTM (быстрорастущие микобактерии, RGM).

Второй этап классификации нетуберкулезных микобактерий начался в 90-х годах с изучения последовательности гена, кодирующего 16S рибосомальную ДНК, что привело к значительному увеличению числа видов, сегодня насчитывающих почти 150.

NTM являются условно-патогенными микроорганизмами, которые в основном вызывают легочные заболевания, сходные с туберкулезом, преимущественно у пациентов с ослабленным иммунитетом или пациентов с ранее существовавшими заболеваниями легких, такими как кистозный фиброз (CF), бронхоэктаз или хроническое обструктивное

заболевание легких (COPD).

Хотя заболеваемость туберкулезом в последние годы начала снижаться (снижение на 2,3% с 2016 г.), глобальная распространенность легочных инфекций, вызываемых NTM, быстро возросла. Годовой показатель варьируется в разных регионах и обычно составляет от 0,2/100000 до 9,8/100000 с тревожными глобальными темпами роста. Наихудшая ситуация наблюдается среди уязвимых групп населения, и дополнительную обеспокоенность вызывает растущее осознание того, что распространенность NTM во всем мире может быть выше, чем предполагалось, из-за неправильных диагнозов.

В развивающихся странах часто ставят неправильный диагноз NTM, ошибочно принимая их за туберкулез, из-за их сходства при микроскопическом исследовании мазков мокроты. Это проблематично во многих отношениях: заболеваемость NTM сильно недооценивается, что неоправданно истощает ресурсы, выделяемые на глобальную борьбу с туберкулезом, и приводит к неправильному лечению пациентов, поскольку вызванные NTM инфекции не отвечают на классические схемы лекарственного лечения туберкулеза.

Микобактериальные легочные инфекции обычно вызываются вдыханием аэрозолей. Источником этих аэрозолей может быть окружающая среда, как это часто бывает в случае NTM, или другие инфицированные индивидуумы, как это происходит при туберкулезе. Считается, что при попадании в легкие физиопатология этих инфекций относительно схожа, хотя клиническая тяжесть, по-видимому, различается. В обоих случаях патогенный возбудитель быстро распознается и фагоцитируется альвеолярными макрофагами, где микобактерии выживают и размножаются на внутриклеточном уровне. В ответ человеческий организм мобилизует свою иммунную систему в виде циркулирующих моноцитов, нейтрофилов, Т-клеток и дендритных клеток с формированием гранулемы, одного из отличительных признаков микобактериальных легочных инфекций. Эта стратегия часто позволяет патогенам выжить в карантинной области, что приводит к кавитации тканей, диссеминации и снижению дыхательной функции. Следовательно, любая терапия микобактериальной инфекции должна быть способна проникать в эту воспалительную среду для эффективного воздействия на вторгающихся патогенных возбудителей.

Среди NTM, вызывающих легочные инфекции, комплекс *Mycobacterium abscessus* (MAVc) является одним из наиболее значимых, ассоциированных с легочными инфекциями, в частности у пациентов с кистозным фиброзом. Комплекс *Mycobacterium abscessus*, впервые выделенный в 1992 г., был разделен на 3 филогенетически очень сходных подвида: *M. abscessus sensu stricto* (*M. abscessus s.s.*), *M. massiliense* и *M. bolletii*.

MAVc считается наиболее патогенным из быстрорастущих микобактерий (RGM). В частности, MAVc ассоциируется с врожденной и приобретенной устойчивостью к большинству антимикобактериальных средств, включая макролиды.

За последние годы число случаев MAVc инфекции у людей неуклонно увеличивается, что вызывает серьезную обеспокоенность в клинической сфере. Количество появляющихся в литературе работ, посвященных клиническому выделению

МABc у пациентов с кистозным фиброзом, пациентов с хроническими респираторными заболеваниями и пациентов с бронхоэктазами, постоянно увеличивается, и они имеют все большее клиническое значение. В настоящее время считается, что МABc являются причиной около 80% RGM легочных инфекций.

Известные методы лечения микобактериальных инфекций часто бывают длительными и требуют строгого соблюдения режима, в основном из-за живучести микобактерий и развития гранулематозных структур. Современная терапия туберкулеза включает введение изониазида, рифампицина, этамбутола и пиперазинамида в течение 6-30 месяцев. Лечение легочных инфекций, вызванных NTM, в основном эмпирическое, основанное на применении трех или четырех антибиотиков в течение не менее 12 месяцев.

Как правило, назначают мультилекарственные схемы на основе макролидов (кларитромицин или азитромицин) в комбинации с парентеральными антибиотиками, такими как, например, аминогликозиды (стрептомицин, неомицин, канамицин, амикацин и тобрамицин), цефокситин, имипенем или тигециклин, для лечения продолжительностью не менее 12 месяцев, которое часто продлевается до 18-24 месяцев.

Лечение легочных инфекций, вызванных NTM, часто сопряжено со значительным экономическим и психологическим бременем для пациентов, что, как следствие, приводит к высокому уровню прерывания лечения. Основными причинами прерывания лечения являются длительный срок лечения, отсутствие наблюдаемых улучшений и серьезные побочные эффекты, связанные с пероральным и парентеральным введением.

По вышеуказанным причинам существует острая медицинская необходимость в разработке более эффективных и безопасных схем, состоящих из более биодоступных лекарственных средств для лечения легочных инфекций, вызванных NTM, что привело к разработке лечения антибиотиками путем ингаляций.

В настоящее время введение лекарственных средств ингаляционным способом достигается путем доставки при помощи ингаляционных устройств, таких как:

- небулайзеры, в которых лекарственное средство растворено или диспергировано в виде суспензии и транспортируется в легкие в виде мелких распыляемых капель;
- ингаляторы под давлением, при помощи которых лекарственное средство - все еще в форме раствора или капель суспензии - подается в легкие инертным газом, быстро расширяющимся в воздухе, из баллона под давлением;
- порошковые ингаляторы, способные осуществлять доставку содержащегося в ингаляторе лекарственного средства и его подачу в легкие в виде микронизированных сухих частиц.

В международной патентной заявке, опубликованной под номером WO2020/239696, предложено использовать глицилциклин, в частности тигециклин, при лечении микобактериальных инфекций путем ингаляции. WO2020/239696 описывает использование растворов для небулайзеров и порошков для ингаляторов, последние получены в соответствии со способом, описанным в WO2011/073002, и включают 98-99,9% глицилциклина и 0,1-2% смазывающего вещества (в частности, стеарата магния).

Известны также растворы глицилциклина, в частности тигециклина, для лечения микобактериальных инфекций парентеральным путем, как описано в WO 2006/099258, полученные путем восстановления в водном растворе порошка, включающего тигециклин, углевод, выбранный из лактозы, маннозы, сахарозы и глюкозы, и кислоты и/или буфер в количестве, обеспечивающем раствор с pH от 4 до 5. WO2014/032956 описывает пример получения порошка тигециклина-лактозы методом сублимационной сушки во флаконе раствора тигециклина и лактозы с pH от 7,2 до 7,7.

Тем не менее, глицилциклины, и в частности тигециклин, являются активными ингредиентами, которые создают технические трудности для составления композиций, так что в настоящее время, несмотря на то, что эти активные ингредиенты известны уже более сорока лет, существуют только препараты в виде раствора для внутривенных инфузий в условиях стационара, и нет препаратов, одобренных или утвержденных регулирующими органами, подходящих для введения путем ингаляции.

Методы сублимационной сушки во флаконах, используемые для изготовления порошков тигециклина для восстановления в водном растворе для парентерального введения, такие как описанные в WO2006/099258 и WO2014/032956, не позволяют получить размер и аэродинамические свойства, необходимые для ингаляционного введения в форме порошка. Порошок, полученный сублимационной сушкой, не пригоден для прямого введения путем ингаляции.

Ингаляционные композиции в виде порошка обычно получают путем измельчения/микронизации активных ингредиентов в кристаллической форме с целью получения частиц диаметром в основном менее 5,0 мкм, более предпочтительно менее 2,0 мкм. Как правило, использование эксципиентов ограничивалось решением проблем сыпучести порошков микронизированных активных ингредиентов.

Очевидно, что методика составления композиций, основанная на измельчении/микронизации, имеет ряд ограничений с точки зрения возможности переработки активных ингредиентов, включая те, которые сильно различаются по химическим и физико-химическим характеристикам, при этом конечная композиция должна обладать аэродинамическими свойствами, пригодными для ингаляционной доставки в глубокие отделы дыхательной системы.

В связи с этим эффективным подходом к получению порошков для ингаляций с хорошими аэродинамическими свойствами является инженерия частиц, достижимая с использованием такой технологии изготовления, как распылительная сушка. Согласно этому методу активный ингредиент и подходящие эксципиенты могут быть объединены для получения частиц, аэродинамические свойства которых определяются композицией и используемыми технологическими условиями.

Несмотря на возможности, предлагаемые инженерией частиц, этот метод не лишен трудностей с к, которые необходимо преодолеть. Среди наиболее важных проблем, с которыми приходится сталкиваться при разработке порошковых продуктов для ингаляций, безусловно является необходимость обеспечения достаточной химической

стабильности разрабатываемого продукта при осуществлении производственного процесса.

Стабильность продукта для ингаляции особенно важна в связи с тем, что его необходимо вводить в глубокие отделы легких, сохраняя при этом физические характеристики для количественного проникновения частиц в самые глубокие области легких. К этому следует добавить тот факт, что число эксципиентов, одобренных в настоящее время для ингаляционного введения и, следовательно, приемлемых с точки зрения токсичности для легочной ткани, крайне ограничено.

### **Сущность изобретения**

С учетом всех вышеизложенных соображений было бы выгодно создать фармацевтическую композицию для ингаляционного введения в форме сухого порошка, включающую глицилциклин, в частности тигециклин, которая была бы стабильной и легко вводимой при помощи обычных ингаляторов сухого порошка, сохраняя при этом простоту осуществления.

В данной области техники проблема обеспечения ингаляционной композиции, включающей глициклин, в частности тигециклин, которая является стабильной и может вводиться при помощи обычных ингаляторов сухого порошка, сохраняя при этом характеристики высокой доставляемости и вдыхаемости, и которую можно получать в промышленном масштабе экономически выгодным способом, остается фактически нерешенной или неудовлетворительно решенной.

Таким образом, заявитель обратился к решению технической задачи обеспечения ингаляционной композиции, включающей глицилциклин, в частности тигециклин, для лечения легочных инфекций, вызванных нетуберкулезными микобактериями, уделяя особое внимание инфекциям, вызванным микобактериями, относящимися к виду *Mycobacterium Abscessus Complex*.

В частности, заявитель решил проблему получения высокой стабильности тигециклина, как в процессе производства, так и в готовом продукте в форме сухого порошка.

В то же время заявитель решил проблему обеспечения высокой вдыхаемости для достижения, в больших терапевтических количествах, более глубоких областей легких, определенных как наиболее дистальная бронхиальная и альвеолярная область, с целью достижения альвеолярных макрофагов и возможности проникновения в них через механизм прямого и быстрого проникновения через клеточную стенку.

Заявитель заметил, что использование лактозы в растворе, содержащем тигециклин, поддерживаемом при pH 7 путем добавления кислотного соединения, в частности органической или неорганической кислоты, предпочтительно летучей при рабочих температурах процесса сушки, позволило получить стабильный раствор в процессе производства порошка путем сушки и в то же время получить сухой порошок, стабильный с течением времени и обладающий оптимальными характеристиками вдыхаемости.

В частности, заявитель заметил, что эти результаты были получены, когда количество лактозы было равно или больше, чем количество тигециклина.

Заявитель также заметил, что добавление лейцина в раствор, используемый в процессе сушки, дополнительно улучшает характеристики вдыхаемости и текучести получаемого сухого порошка, а также его устойчивость к влажности окружающей среды.

Таким образом, в первом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции в форме сухого порошка для ингаляционного введения, включающей глицилциклин, в частности тигециклин, в количестве менее 50% по массе относительно общей массы композиции и лактозу в количестве, равном или превышающем количество указанного глицилциклина.

Предпочтительно фармацевтическая композиция согласно первому аспекту настоящего изобретения также включает лейцин.

Заявитель заметил, что тигециклин, присутствующий в сухом порошке согласно настоящему изобретению, находился по существу в аморфной форме.

Во втором аспекте настоящее изобретение также относится к способу получения фармацевтической композиции в форме сухого порошка для ингаляционного введения, включающей глицилциклин, в частности тигециклин, при этом указанный способ включает следующие стадии:

(а) получение раствора в водном растворителе, включающего глицилциклин, в частности тигециклин, лактозу и необязательно лейцин;

(b) сушка раствора, полученного на стадии (а), с получением сухого порошка с  $X_{90}$  менее 10 мкм, и

(с) сбор указанного сухого порошка,

отличающемся тем, что указанный раствор дополнительно включает органическую или неорганическую кислоту в количестве, необходимом для доведения значения рН указанного раствора до 6,5-7,5, предпочтительно до около 7,0.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции в форме сухого порошка для ингаляционного введения для применения в лечении инфекций, вызванных микобактериями, в частности, нетуберкулезными микобактериями, где указанная композиция включает глицилциклин, в частности тигециклин, в количестве менее 50% по массе относительно общей массы композиции и лактозу в количестве, равном или превышающем количество указанного глицилциклина.

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения инфекций, вызванных микобактериями, в частности нетуберкулезными микобактериями, у нуждающегося в этом субъекта, который включает введение путем ингаляции эффективного количества фармацевтической композиции в форме сухого порошка, которая включает глицилциклин, в частности тигециклин, в количестве менее 50% по массе относительно общей массы композиции и лактозу в количестве, равном или превышающем количество указанного глицилциклина.

#### **Краткое описание чертежей**

Далее описание будет описано со ссылкой на прилагаемые чертежи, представленные исключительно в качестве примера и, следовательно, не являющиеся ограничивающими, где:

- Фиг. 1 показывает образование продуктов разложения, приобретающих все более интенсивный цвет после 24 часов хранения раствора тигециклина при 5°C, при 25°C и при 40°C, соответственно;

- Фиг. 2 показывает дифрактограмму, полученную с порошком, полученным распылительной сушкой, включающим тигециклин и лактозу в соотношении 1:1 (кривая А), и с порошком, включающим тигециклин, лактозу и лейцин в соотношении 1:1:1 (кривая В):

- Фиг. 3 показывает электронно-микроскопическое изображение образца композиции 1 (3А) и композиции 2 (3В), описанных в примере 1.

### **Подробное описание изобретения**

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции в форме сухого порошка для ингаляционного введения, включающей глицилциклин, в частности тигециклин, в количестве менее 50% по массе относительно общей массы композиции и лактозу в количестве, равном или превышающем количество указанного глицилциклина.

Согласно настоящему изобретению под выражением “порошок для ингаляционного введения” подразумевается порошок, подходящий для пульмонального введения. Порошок для ингаляционного введения может быть диспергирован и его можно вдыхать с помощью подходящего ингалятора, так что частицы, из которых он состоит, могут проникать в легкие вплоть до альвеол для осуществления фармакологических свойств активного ингредиента, из которого он состоит. Частицы с аэродинамическим диаметром менее 5,0 мкм считаются обычно пригодными для вдыхания.

Согласно настоящему изобретению под выражением “сухой порошок” подразумевается порошок, содержание влаги в котором составляет менее 10%, предпочтительно менее 5%, более предпочтительно менее 3%.

Предпочтительно глицилциклин, используемый в фармацевтической композиции по настоящему изобретению, представляет собой тигециклин. Другими глицилциклинами, полезными в фармацевтической композиции по настоящему изобретению, являются эравакилин и другие экспериментальные глицилциклины, известные под аббревиатурами DMG-DMDOT, DMG-MINO, и DMG-DOXY.

Количество тигециклина, присутствующего в фармацевтической композиции в форме сухого порошка по настоящему изобретению, предпочтительно составляет от 15% до 45%, более предпочтительно от 20% до 40%, еще более предпочтительно от 25% до 35% по массе относительно общей массы композиции.

Количество лактозы, присутствующей в фармацевтической композиции по настоящему изобретению, предпочтительно составляет от 30% до 85%, более предпочтительно от 35% до 80%, еще более предпочтительно от 40% до 75% по массе относительно общей массы композиции.

Предпочтительно массовое соотношение между количеством тигециклина и количеством лактозы, присутствующих в фармацевтической композиции по настоящему изобретению, составляет от 1:1 до 1:3, предпочтительно от 1:1 до 1:2.

Предпочтительно фармацевтическая композиция по настоящему изобретению также включает лейцин.

Согласно предпочтительному аспекту настоящего изобретения фармацевтическая композиция по настоящему изобретению включает лейцин в количестве от 5% до 30%, предпочтительно от 10% до 25% по массе относительно общей массы композиции.

Лейцин представляет собой природную аминокислоту, чьи характеристики местной переносимости после ингаляции в настоящее время широко признаны и документально подтверждены, хотя порошок для ингаляций, содержащий лейцин в качестве эксципиента, еще не был представлен на рынке.

Лейцин представляет собой гидрофобную аминокислоту, и заявитель заметил, что в процессе сушки лейцин имеет тенденцию откладываться на поверхности частиц, образуя по существу гидрофобный слой, который повышает влагостойкость и сыпучесть полученных частиц.

Предпочтительно фармацевтическая композиция по настоящему изобретению включает тигециклин в количестве от 20% до 40%, предпочтительно от 25% до 35%, лактозу в количестве от 30% до 80%, предпочтительно от 40% до 70% по массе относительно общей массы композиции, и лейцин для оставшейся части в количестве, необходимом для достижения 100% по массе.

В особенно предпочтительном аспекте фармацевтическая композиция по настоящему изобретению включает тигециклин в количестве около 30%, лактозу в количестве от 45% до 60% и лейцин в количестве от 25% до 10% по массе относительно общей массы композиции.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению имеет такое распределение частиц по размерам ( $X_{90}$ ), что по меньшей мере 90% частиц имеют эквивалентный диаметр менее 10,0 мкм, предпочтительно менее 7,0 мкм, более предпочтительно менее 5,0 мкм.

Заявитель заметил, что чем ниже значение  $X_{90}$ , тем больше площадь поверхности порошка и тем глубже отложение в легких.

В частности, фармацевтическая композиция в виде порошка согласно настоящему изобретению имеет средний аэродинамический диаметр частиц (масс-медианный аэродинамический диаметр - MMAD) менее 5 мкм, предпочтительно от 2 мкм до 4 мкм.

Предпочтительно фармацевтическая композиция в виде порошка согласно настоящему изобретению имеет вдыхаемую фракцию мелкодисперсных частиц (FPF) более 50%, предпочтительно более 60%, более предпочтительно более 70%.

Под термином “фракция мелкодисперсных частиц (FPF)” подразумевается фракция порошка, относительно общего количества доставляемого ингалятором порошка, которая имеет аэродинамический диаметр ( $d_{ae}$ ) менее 5,0 мкм. Под термином “доставленная

фракция (DF)» подразумевается фракция доставленного активного ингредиента по отношению к общему количеству загруженного ингредиента. Для оценки этих свойств порошка выполняют тест на определение характеристик при помощи импактора нового поколения (NGI), как описано в текущей редакции Европейской фармакопеи. Согласно настоящему изобретению условия для проведения этого испытания заключаются в том, что порошок подвергается аспирации через ингалятор таким образом, что создается поток  $60 \pm 2$  л/мин. Этот поток в случае ингалятора модели RS01 (Plastiapre, Osnago IT) достигается путем создания перепада давления в системе 1,4 КПа.

Согласно предпочтительному аспекту тигециклин и лактоза, присутствующие в фармацевтической композиции в виде порошка согласно настоящему изобретению, находятся по существу в аморфной форме, тогда как лейцин, если он присутствует, находится по существу в кристаллической форме.

Согласно настоящему изобретению под выражением «по существу в аморфной форме» подразумевается, что процентное содержание тигециклина или лактозы в аморфной форме составляет 51-100%, предпочтительно 70-100% и еще более предпочтительно 90-100% относительно общего количества тигециклина или лактозы в фармацевтической композиции в виде порошка.

Согласно настоящему изобретению под выражением «по существу в кристаллической форме» подразумевается, что процентное содержание лейцина в кристаллической форме составляет 51-100%, предпочтительно 70-100%, более предпочтительно 80-100% и еще более предпочтительно 90-100% относительно общего количества лейцина в фармацевтической композиции в виде порошка.

Согласно настоящему изобретению порошок также может включать эксципиенты, подходящие для ингаляционного введения.

Эти эксципиенты предпочтительно представляют собой поверхностно-активные вещества, такие как, например, неионные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбаты и блок-сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена, известные как "полоксамеры", в частности, полисорбат 80, известный как "Tween 80", сахара, такие как, например, лактоза, маннит, сахароза, трегалоза, мальтодекстрины и циклодекстрины; жирные кислоты; эфиры жирных кислот; липиды, предпочтительно фосфолипиды, такие как, например, природные и синтетические сфингофосфолипиды, а также природные и синтетические глицерофосфолипиды, включая диацилфосфолипиды, алкил-ацил-фосфолипиды и алкенил-ацил-фосфолипиды; аминокислоты; и пептиды, такие как дилейцин и трилейцин или гидрофобные белки.

Присутствие поверхностно-активного вещества полезно для обеспечения снятия электростатических зарядов, которые в некоторых случаях присутствуют в композициях без него, присутствие жирных кислот и других липидных веществ полезно для обеспечения гладкости порошка, а присутствие дополнительных сахаров может быть полезно для дальнейшего порошкового покрытия.

Предпочтительно эксципиенты, способные снижать остаточную влажность

порошка, такие как, например, эксципиенты гидрофобной природы, особенно полезны для улучшения стабильности фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции в форме сухого порошка для ингаляционного введения, включающей глицилциклин, в частности тигециклин, при этом указанный способ включает следующие стадии:

(а) получение раствора в водном растворителе, включающего глицилциклин, в частности тигециклин, лактозу и необязательно лейцин,

(b) сушка раствора, полученного на стадии (а), с получением сухого порошка с  $X_{90}$  менее 10 мкм, и

(с) сбор указанного сухого порошка,

отличающемся тем, что указанный раствор дополнительно включает органическую или неорганическую кислоту в количестве, необходимом для доведения значения рН указанного раствора до 6,5-7,5, предпочтительно до около 7,0.

Тигециклин является чрезвычайно нестабильным активным ингредиентом в водном растворе, где он подвергается явлениям разложения, главным образом, путем окисления и эимеризации, как показано на Фиг. 1, где показано образование продуктов разложения, приобретающих все более интенсивный цвет после 24 часов хранения раствора тигециклина при 5°C, при 25°C и при 40°C, соответственно.

Заявитель заметил, что водный раствор, включающий тигециклин, лактозу и, необязательно, лейцин, в который добавлена органическая или неорганическая кислота в количестве, достаточном для доведения значения рН указанного раствора до 6,5-7,5, предпочтительно до около 7,0, позволяет осуществлять процесс сушки без каких-либо явлений разложения тигециклина.

Предпочтительно органическая или неорганическая кислота представляет собой летучее соединение при рабочих температурах процесса сушки и, в частности, выбрана из группы, которая включает муравьиную кислоту, уксусную кислоту, пропионовую кислоту, масляную кислоту, хлористоводородную кислоту, бромную кислоту, азотную кислоту и фосфорную кислоту.

Муравьиная кислота является особенно предпочтительной, поскольку заявитель заметил, что при рабочих температурах процесса сушки муравьиная кислота разлагается на диоксид углерода и воду, не оставляя следов в полученном порошке.

Предпочтительно стадию (а) получения раствора осуществляют в защищенном от света месте и при температуре, равной или менее 20°C, предпочтительно менее 10°C и более предпочтительно между 0° и 5°C.

Предпочтительно, используемый растворитель состоит из воды, преимущественно деминерализованной, дистиллированной, стерильной или деионизированной, но также можно использовать и водно-спиртовые смеси с соотношением вода/спирт от 70:30 об/об до 30:70 об/об.

Предпочтительно, чтобы используемый растворитель был своевременно

дегазирован таким образом, чтобы содержание растворенного кислорода составляло менее 10%, предпочтительно менее 5%, более предпочтительно менее 3%.

Заявитель заметил, что снижение содержания кислорода в растворителе позволяет уменьшить явления окисления тигециклина, что приводит к большей его стабильности в растворе, получаемом для процесса сушки.

Предпочтительно используемые спирты выбирают из группы, включающей метанол, этанол, 1-пропанол, 2-пропанол, 2-метил-1-пропанол, 1-бутанол, 2-бутанол, 3-метил-1-бутанол, 1-пентанол, по отдельности или в смеси. Особенно предпочтительно использовать этанол.

Предпочтительно раствор получают добавлением глицилциклина, в частности тигециклина, лактозы и, необязательно, лейцина к используемому растворителю, предпочтительно воде, а затем доведением рН до желаемого значения, предпочтительно до около 7,0, путем добавления 10% водного раствора муравьиной кислоты.

Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления второго аспекта настоящего изобретения стадия (a) включает следующие стадии:

(a1) дегазация указанного водного растворителя до достижения содержания растворенного кислорода менее 10% по массе;

(a2) добавление к указанному водному растворителю указанной лактозы и, необязательно, указанного лейцина, и после полного растворения указанной лактозы и, необязательно, указанного лейцина, добавление указанного глицилциклина, в частности тигециклина;

(a3) добавление органической или неорганической кислоты в количестве, достаточном для доведения значения рН указанного раствора до около 7,0;

(a4) охлаждение указанного раствора при температуре ниже 5°C в защищенном от света контейнере.

Предпочтительно стадию (b) способа получения согласно настоящему изобретению осуществляют методом распылительной сушки с использованием распылительной сушилки.

Заявитель отметил, что распылительная сушка позволяет получить высушенный порошок с однородными и по существу аморфными частицами.

В частности, заявитель заметил, что процесс распылительной сушки позволяет получать порошки, состоящие из очень мелких частиц, пригодных для вдыхания, за счет механизма сушки правильно распыленного раствора в среде с контролируемой температурой на входе и выходе, что происходит за несколько сотых долей секунды, обеспечивая существенную стабильность порошка, полученного после осуществления этого процесса.

Скорость подачи, при которой можно работать для получения высушенного порошка с желаемыми характеристиками согласно изобретению, зависит от типа используемой распылительной сушки, т.е. использования распылительной сушилки промышленного размера или распылительной сушилки "пилотного" размера, или также

лабораторной распылительной сушилки.

В качестве преимущества заявитель заметил, что в лабораторных распылительных сушилках стадия (b) распылительной сушки дает оптимальные результаты при скорости подачи, равной или превышающей 3 г/мин, тогда как на пилотных системах оптимальные результаты достигаются при скорости подачи, равной или превышающей 10 г/мин, предпочтительно превышающей 15 г/мин, еще более предпочтительно равной или превышающей 20 г/мин.

Обычно скорость подачи, используемая в распылительных сушилках промышленного размера, составляет от 150 до 200 г/мин, но не существует ограничений, если используют распылительные сушилки большего размера.

Предпочтительно стадию (b) распылительной сушки осуществляют при температуре на входе от 80° до 200°С, преимущественно от 90° до 160°С.

Под термином "температура на входе" согласно настоящему изобретению подразумевается температура, которой соответствует раствор на выходе из сопла распылительной сушилки, на входе в сушильную камеру.

Предпочтительно, стадию (b) распылительной сушки осуществляют при температуре на выходе от 40°С до 120°С, предпочтительно от 50°С до 100°С.

Под термином "температура на выходе" согласно настоящему изобретению подразумевается температура уже высушенного продукта после того, как он вышел из сушильной камеры, перед входом в циклонный сепаратор.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции в форме сухого порошка для ингаляционного введения для применения в лечении микобактериальных инфекций, где указанная композиция включает глицилцилин, в частности тигецилин, в количестве менее 50% по массе относительно общей массы композиции, лактозу в количестве, равном или превышающем количество указанного тигецилина, и необязательно лейцин.

В частности, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению находит применение в лечении инфекций, вызванных *Mycobacterium tuberculosis* и нетуберкулезными микобактериями (NTM), предпочтительно выбранными из группы, состоящей из медленно растущих NTM (SGM) и быстро растущих NTM (RGM).

В частности, медленно растущие нетуберкулезные микобактерии (SGM) выбраны из группы, состоящей из *Mycobacterium avium complex* (MAC), *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium marinum* и *Mycobacterium kansasii*.

Предпочтительно быстрорастущие нетуберкулезные микобактерии (RGM) выбраны из группы, состоящей из *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium abscessus sensu stricto*, *Mycobacterium massiliense*, *Mycobacterium bolletii*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium chelonae* и *Mycobacterium Abscessus Complex*.

Настоящее изобретение далее будет проиллюстрировано некоторым количеством примеров получения, которые представлены исключительно в иллюстративных целях и

без какого-либо ограничения настоящего изобретения.

### **ПРИМЕР 1**

#### **Получение раствора, подлежащего сушке**

Для получения фармацевтической композиции в форме сухого порошка по настоящему изобретению использовали водный раствор, включающий тигециклин и эксципиенты, указанные в следующих таблицах, чтобы иметь концентрацию твердого вещества от 5 до 5,5% по массе, значение pH довели примерно до 7,0 с использованием 10% водного раствора муравьиной кислоты.

Способ получения водного раствора тигециклина включает различные стадии и меры, направленные на поддержание химической стабильности в течение всей стадии сушки.

Воду, используемую в качестве растворителя, подвергали процессу дегазации, чтобы удалить растворенный кислород, используя поток азота (при скорости 12 л/мин в течение 25 минут в случае 100 мл раствора), до получения содержания кислорода менее 10%, измеренного с помощью зонда (измеритель содержания кислорода Hanna HI98198).

Эксципиенты растворяли в дегазированной воде и после полного растворения добавляли активный ингредиент (тигециклин) в количестве, указанном в каждом примере, равном концентрации твердого вещества от 5% до 5,5% по массе.

После растворения активного ингредиента pH раствора довели до 7,00 путем добавления муравьиной кислоты.

Полученный таким образом раствор хранили охлажденным при температуре, равной или ниже 5°C, в затемненном контейнере, чтобы защитить его от света, к которому чувствителен активный ингредиент.

#### **Получение порошковой композиции**

Полученный таким образом раствор обрабатывали при помощи аппарата Spray Druer ProСерТ, устанавливая следующие параметры процесса:

- сопло диаметром 0,6 мм для выхода раствора
- газ для распыления: воздух
- давление распыления: 3 бар
- сушильный газ: воздух
- скорость потока сушильного газа: 0,35 м<sup>3</sup>/мин
- температура на входе: 90°C
- температура на выходе: 45-47°C
- скорость подачи: 3 г/мин
- система сбора порошка: циклонный сепаратор

По окончании процесса сушки, сразу после изготовления, порошковую композицию упаковывали в атмосфере азота в стеклянные контейнеры, которые, в свою очередь, хранили в термоизолированных алюминиевых пакетах.

В следующих таблицах показан ряд сравнительных примеров и примеров изобретения, выполненных в соответствии с вышеуказанными техническими

требованиями.

В таблице 1 представлены результаты аналитического определения и гранулометрического анализа частиц, полученных с композицией, указанной в первой графе таблицы 1.

Таблица 1

Композиция %	WC %	X <sub>90</sub> мкм	Титр TGC %	Примеси %	FPF %
TGC 100%	4,8	3,3	94,7	2,8	91,4
TGC:LEU 50:50	3,3	3,5	95,4	2,3	88,4
TGC:LAT 50:50	5,4	4,8	100,6	0,9	73,6
TGC:ALB 50:50	5,8	4,2	96,9	2,2	80,1
TGC:LAT:LEU 33:33:33	4,0	4,0	99,4	1,2	75,8
TGC:ALB:LEU 33:33:33	4,3	5,0	98,7	1,8	69,5
TGC:LAT:ALB 33:33:33	5,3	7,0	100,9	1,0	58,6

TGC: Тигециклин; EU: Лейцин; LAT: Лактоза; ALB: Альбумин; WC: Содержание воды; X<sub>90</sub>: Диаметр, ниже которого находится 90% частиц; FPF: Фракция мелкодисперсных частиц менее 5 мкм

Результаты, приведенные в таблице 1, относящиеся к аналитическому определению тигециклина и примесей, присутствующих в полученном порошке, показали, что присутствие лактозы необходимо для стабильности тигециклина, тогда как присутствие только лейцина или альбумина недостаточно для стабилизации тигециклина, следствием чего является образование примесей.

В то же время приведенные в таблице 1 результаты, касающиеся содержания воды, показали, что присутствие лейцина позволяет получить более сухой порошок с меньшим содержанием воды, менее 5% и даже равным или менее 4%.

Напротив, результаты, приведенные в таблице 1, показали, что присутствие альбумина, даже в комбинации с лактозой, не позволило получить желаемое содержание воды и значение X<sub>90</sub>, давая самые низкие значения FPF%.

Наконец, результаты анализа размера частиц вместе с их аэродинамичностью (X<sub>90</sub> и FPF%) показали, что все комбинации, за исключением тройной комбинации TGC:LAT:ALB, дали хорошие результаты.

В таблице 2 представлены результаты аналитического определения и гранулометрического анализа тех же частиц после хранения при комнатной температуре (25°C и относительной влажности 60%) в течение 9 месяцев и при 4°C в течение 15 месяцев.

Таблица 2

Композиция	9 месяцев, комнатная температура				15 месяцев, 4°C			
	WC %	X <sub>90</sub> мкм	TGC %	Примеси %	WC %	X <sub>90</sub> мкм	TGC %	Примеси %

TGC 100%	6,4	3,2	81,9	18,1	5,1	3,1	-	-
TGC:LEU 1:1	4,3	3,8	84,4	15,6	3,9	3,5	-	-
TGC:LAT 1:1	7,0	4,6	95,9	4,1	5,7	4,6	98,3	1,7
TGC:ALB 1:1	7,0	4,1	-	-	6,4	4,0	-	-
TGC:LAT:LEU 1:1:1	5,3	4,1	95,9	4,1	4,3	4,0	98,2	1,8
TGC:ALB:LEU 1:1:1	5,4	5,3	-	-	4,7	5,0	-	-
TGC:LAT:ALB 1:1:1	6,8	6,6	-	-	6,0	6,3	-	-

TGC: Тигециклин; LEU: Лейцин; LAT: Лактоза; ALB: Альбумин

Результаты, представленные в Таблице 2, подтвердили долговременную стабильность композиций, включающих лактозу, после хранения при 4°C или при комнатной температуре.

В таблице 3 представлены результаты аналитического определения частиц, полученных с композицией, указанной в первой графе таблицы 1, после хранения насыпью или в капсулах в течение 1 или 3 месяцев в различных условиях температуры и относительной влажности.

Таблица 3

Композиция	Частицы насыпью		Стандартные капсулы		Безводные капсулы	
	40°C 75% RH 1 месяц	30°C 65% RH 1 месяц	25°C 60% RH		25°C 60% RH	
			1 месяц	3 месяца	1 месяц	3 месяца
TGC:LAT 1:2	КО	ОК	ОК	КО	ОК	ОК
TGC:LAT 1:1.5	КО	ОК	ОК	КО	ОК	ОК
TGC:LAT 1:1	КО	ОК	ОК	КО	ОК	ОК
TGC:LAT 2:1	КО	КО	КО	-	КО	-
TGC:LAT 3:1	КО	КО	КО	-	КО	-
TGC:LAT 4:1	КО	КО	КО	-	КО	-

TGC: Тигециклин; LEU: Лейцин; LAT: Лактоза; RH: Относительная влажность; КО: Испытание с отрицательными результатами, образование примесей более 5%; ОК: Успешное испытание, стабильный продукт

Результаты, представленные в таблице 3, подчеркивают необходимость наличия количества лактозы, равного или превышающего количество тигециклина, с массовым соотношением между количеством тигециклина и количеством лактозы в диапазоне от 1:1 до 1:2.

В Таблице 4 представлены результаты аналитического определения частиц, полученных с композицией, указанной в первой графе таблицы 1, после хранения насыпью или в высушенных капсулах после того, как они были заполнены в атмосфере азота, в течение 1 месяца в различных условиях температуры и относительной влажности.

Таблица 4

		40°C 75% RH		30°C 65% RH	
Композиция %	TGC:LAT	Частицы насыпью	Капсула	Частицы насыпью	Капсула
TGC:LAT:LEU 50:40:10	1:0.8	КО	ОК	ОК	ОК
TGC:LAT:LEU 40:40:20	1:1	КО	ОК	ОК	ОК
TGC:LAT:LEU 30:45:25	1:1.5	КО	ОК	ОК	ОК
TGC:LAT:LEU 30:60:10	1:2	КО	ОК	ОК	ОК
TGC:LAT:LEU 25:50:25	1:2	КО	ОК	ОК	ОК

TGC: Тигециклин; LEU: Лейцин; LAT: Лактоза; RH: Относительная влажность; КО: Испытание с отрицательными результатами, образование примесей более 5%; ОК: Успешное испытание, стабильный продукт

Результаты, представленные в таблице 4, подтвердили полезность лейцина для улучшения долгосрочной стабильности порошка, который при этом успешно прошел испытание при 30°C и 65% относительной влажности, а также самое экстремальное испытание при 40°C и 75% относительной влажности в высушенных капсулах после заполнения в атмосфере азота.

Также в этом случае наилучшие результаты были получены при соотношении тигециклин:лактоза от 1:1 до 1:2, и из результатов анализа размера частиц ( $X_{90}$  и FPF%) было видно, что оптимальное количество тигециклина составляет не более 30% по массе.

В следующей таблице 5 приведены результаты аналитического определения и анализа размера частиц двух трехкомпонентных композиций, включающих 30% по массе тигециклина и оптимальные количества лактозы и лейцина в соответствии с настоящим изобретением.

Композиция 1 включала TGC:LAT:LEU в процентном соотношении 30:45:25 с соотношением тигециклин:лактоза 1:1,5, тогда как композиция 2 включала TGC:LAT:LEU в процентном соотношении 30:60:10 с соотношением тигециклин:лактоза 1:2.

Таблица 5

	Композиция 1	Композиция 2
TGC:LAT:LEU %	30:45:25	30:60:10
TGC:LAT	1:1,5	1:2
BULK WC %	4,4	4,7
CPS WC %	2,6	2,0
TGC %	101,7	99,7

Примеси %		1,1	0,9
PSD	X <sub>50</sub>	2,5	2,2
	X <sub>90</sub>	5,0	4,3
	VMD	2,7	2,4
PA	FPF	62,1	73,7
	MMAD	3,7	2,6
	GSD	1,77	1,83

TGC: Тигециклин; LEU: Лейцин; LAT: Лактоза; BULK WC %: Содержание воды в сыпучем материале; CPS WC %: Содержание воды в капсулах; PSD: Распределение частиц по размерам; VMD: Среднеобъемный диаметр; PA: Аэродинамические параметры; FPF: Фракция мелкодисперсных частиц; MMAD: Масс-медианный аэродинамический диаметр; GSD: Геометрическое стандартное отклонение

Данные, представленные в таблице 5, подтвердили оптимальные результаты, полученные с обеими композициями 1 и 2, как с точки зрения вдыхаемости, с оптимальными значениями PSD и PA, так и с точки зрения стабильности, с оптимальными значениями тигециклина и минимальными количествами примесей.

Фиг. 3 показывает изображение, полученное при помощи электронного микроскопа, образца композиции 1 (3А) и композиции 2 (3В).

## **ПРИМЕР 2**

### **Описание используемых аналитических методов**

Значения, указанные в предыдущих таблицах, были определены следующими методами.

#### Определение характеристик порошковой композиции

##### 1. Анализ размера частиц

Полученные порошковые композиции были охарактеризованы с точки зрения размера сухих частиц с использованием лазерного дифракционного аппарата Sympatec HELOS/BR, способного анализировать размеры частиц, оснащенного системой диспергирования RODOS/L для анализа порошков, связанной с системой ASPIROS/L для автоматической загрузки образца.

Прибор был откалиброван с использованием эталонного материала и подготовлен в соответствии с инструкциями, приведенными в руководстве для пользователя прибора.

Процедура анализа:

Отбирали образец продукта в подходящий держатель образцов (сосуд) через Aspiros и анализировали.

В качестве диспергирующего газа использовали сжатый воздух, предварительно освобожденный от частиц.

Способ, при помощи которого выполняли анализ распределения частиц по размерам, был следующим:

Инструмент для анализа: Лазерный светодифракционный анализатор частиц Sympatec HELOS/BR.

- Линза: R1 (0,1-35 мкм)
- Система диспергирования образцов: RODOS/L
- Система подачи образцов: ASPIROS/L
- Давление диспергирования: 3 бар, с автоматической регулировкой сброса давления
- Время интеграции сигнала: 10,0 сек.
- Длительность эталонного измерения: 10,0 сек
- Измерения действительны в диапазоне концентраций канала 20 от 1,5% до 50%
- Версия программного обеспечения: PAQSOS 3.1.1
- Способ расчета: FREE

Все анализы выполняли в условиях комнатной температуры и влажности.

При анализе размера частиц определяются значения диаметра, ниже которых опускается, соответственно, 50% популяции ( $X_{50}$ ), 90% популяции ( $X_{90}$ ) и среднеобъемный диаметр (VMD) популяции частиц в образце порошковой композиции.

## 2. Определение активного ингредиента и других компонентов в порошковой композиции

Для определения содержания активного ингредиента и других компонентов в порошковой композиции использовали аналитический метод ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии).

Используемый аналитический метод характеризуется следующими параметрами:

Растворитель: 80/20 фосфатный буфер pH 8/ацетонитрил

Подвижная фаза: ацетонитрил/фосфатный буфер pH 6,4

Градиентное элюирование

Время (мин)	% Ацетонитрила	% буфера pH 6,4
0	11,8	88,2
2	11,8	88,2
42	24,4	75,6
57	50	50
60	50	50
+ 10 минут после окончания		

Скорость потока: 1 мл/мин

Объем вводимой пробы: 25 мкл

Аналитическая колонка: Agilent Pursuit XRs C18, 150 мм × 4,6 мм, 3 мкм

Температура колонки: 30°C

Температура автодозатора: 5°C

Длина волны: 248 нм

Время удерживания: 20 мин

Для анализов использовали HPLC Agilent модели 1200 с диодно-матричным детектором, модель G1315C.

Образцы для анализа содержания активного ингредиента получали путем растворения в растворителе такого количества порошкообразной композиции, чтобы

получить концентрацию от 500 мкг/мл до 600 мкг/мл для тигециклина, как для эталонного раствора.

Образцы для анализа содержания активного ингредиента использовали для анализа примесей.

Эталонный раствор вводили три раза подряд перед образцом для определения прецизионности системы, выраженной в процентах относительного стандартного отклонения (RSD%), которое должно быть ниже 2%.

Содержание активного ингредиента определяли отношением площади пика к площади пика тигециклина в эталонном растворе при известной концентрации. Разложение продукта рассчитывали как отношение суммы площадей аналитических пиков, соответствующих продуктам разложения, с поправкой на каждый фактор отклика, к общей площади (активный ингредиент+примеси) в образце. Все аналитические пики, площадь которых превышает 0,1% от общей площади, учитывали в сумме продуктов разложения.

### 3. Испытание на пригодность для вдыхания при помощи NGI (импактора нового поколения)

Импактор нового поколения (NGI) представляет собой импактор для порошков, описанный в фармакопее (EP; USP), используемый для измерения аэродинамического диаметра частиц порошка, диспергированных в воздухе в виде аэрозоля.

Ингаляционная композиция, доставляемая подходящим ингалятором и поступающая в устройство посредством всасывания, оседает на различных ступенях импактора, расположенных последовательно, в зависимости от ее аэродинамических характеристик, которые зависят от размеров частиц, плотности и формы. Каждой ступени NGI соответствует диапазон аэродинамических размеров частиц осажденного внутри нее порошка, определенный УФ-методом количественного анализа данного активного ингредиента.

Благодаря количественному определению активного ингредиента на каждой ступени получают аэродинамическое распределение частиц порошка по размерам, и можно рассчитать средний аэродинамический диаметр и вдыхаемую фракцию, определяемую Европейской фармакопеей как фракцию с аэродинамическим диаметром менее 5,0 мкм.

Для испытания на вдыхаемость порошки композиций из примеров распределяли в капсулы НРМС размера 3 и подавали через порошковый ингалятор RS01 - модель 7 одноразовая доза, код. 239700001AB (Aerolizer - Plastiapе S.p.A.).

Устройство было собрано в соответствии с инструкциями для пользователя и указаниями Европейской фармакопеи.

С аналитической точки зрения, для проведения испытания достаточно доставки одной капсулы с порошком для каждого испытания на пригодность для вдыхания. Испытания выполняли при скорости потока 60 л/мин в течение 4 секунд при перепаде давления в системе 1,4 КПа.

Этой скорости потока для каждой ступени NGI соответствуют следующие отсечки аэродинамического диаметра.

- ступень 1: > 8,06 мкм
- ступень 2: от 8,06 мкм до 4,46 мкм
- ступень 3: от 4,46 мкм до 2,82 мкм
- ступень 4: от 2,82 мкм до 1,66 мкм
- ступень 5: от 1,66 мкм до 0,94 мкм
- ступень 6: от 0,94 мкм до 0,55 мкм
- ступень 7: от 0,55 мкм до 0,34 мкм
- ступень 8 (MOC): < 0,34 мкм

Вдыхаемая фракция (фракция мелкодисперсных частиц) представляет собой количество лекарственного средства, рассчитанное по отношению к доставленной дозе, характеризующееся частицами со средним аэродинамическим диаметром менее 5,0 мкм и рассчитываемое при помощи соответствующего утвержденного программного обеспечения (CITDAS Copley).

Аэродинамические параметры ингаляционной композиции, подвергаемой анализу NGI, выражаются в следующих терминах:

- Доставленная фракция (DF): т.е. процент дозы активного ингредиента, доставленный за пределы мундштука ингалятора, по отношению к загруженной дозе.
- Доза мелкодисперсных частиц (FPD): теоретически вдыхаемая доза активного вещества, характеризующаяся аэродинамическим диаметром менее 5,0 мкм.
- Фракция мелкодисперсных частиц (FPF): теоретически вдыхаемая фракция (аэродинамический диаметр менее 5,0 мкм) активного вещества, выраженная в процентах от доставленного количества.
- Масс-медианный аэродинамический диаметр (MMAD): средний аэродинамический диаметр доставляемых частиц.
- Геометрическое стандартное отклонение (GSD): Геометрическое стандартное отклонение относительно среднего аэродинамического диаметра.

Количественное определение активного ингредиента на каждой ступени выполняли методом УФ-спектрофотометрии с использованием аналитического метода, описанного ниже:

Растворитель: 80/20 фосфатный буфер pH 8/ацетонитрил

Кюветы для анализа: пластиковые, одноразовые, с оптическим путем 10 мм

Длина волны: 411 нм

Для анализов использовали многоячеечный спектрофотометр Agilent модели Cary 3500.

Образцы для анализов содержания активного ингредиента, выводимого на основании испытания NGI, были получены с использованием таких объемов растворителя, чтобы получить диапазон концентраций тигециклина от 0,4 мкг/мл до 60 мкг/мл, при этом эталонный раствор имел концентрацию тигециклина около 25 мкг/мл.

Содержание активного ингредиента определяется отношением абсорбции к абсорбции пика тигециклина в эталонном растворе при известной концентрации.

### **ПРИМЕР 3**

#### **Характеристика порошка: определение твердого состояния методом рентгеновской дифрактометрии**

Измерения методом рентгеновской дифрактометрии

Измерения методом рентгеновской дифрактометрии выполняли для определения твердого состояния порошка.

Кристаллы рассеивают рентгеновские лучи способом, характерным для их структуры. По этой причине метод рентгеновской дифрактометрии позволяет определить кристаллическое или аморфное твердое состояние компонентов образца.

В качестве прибора использовали D2-Phaser от Bruker AXS с датчиком LYNXEYE, программным обеспечением для измерения DIFFRAC.MEASUREMENT CENTER.V7.

Образцы порошков распределяли равномерным слоем на силиконовых держателях образцов диаметром 20 мм и толщиной 0,5 мм.

В выбранном методе анализа использовали следующую конфигурацию прибора:

- Источник: медный
- Щель расходимости: 0,2 мм
- щель Соллера: 4°
- Нож: 1 мм

Параметры сканирования были следующими:

- Диапазон углов: 3-50° 2Тэта
- Длина шага между измерениями: 0,02°
- Время измерения при каждом угле: 1 сек.
- Апертура детектора: 4 мм
- Вращение образца: 15 об/мин

Фиг. 2 показывает дифрактограмму, полученную с порошком, включающим тигециклин и лактозу в соотношении 1:1 (кривая А), и с порошком, включающим тигециклин, лактозу и лейцин в соотношении 1:1:1 (кривая В).

Как легко заметить, кривая А не показывает каких-либо пиков кристаллической природы, подразумевая, что порошок находится по существу в аморфной форме. Кривая В показывает два пика, относящиеся к лейцину, что указывает на его выравнивание с тенденцией к кристаллизации.

### **ПРИМЕР 4**

#### **Оценка антимикобактериальной активности**

Испытание осуществляли в клеточной линии макрофагов ТНР-1 для оценки цитотоксической активности и антимикобактериальной активности против нетуберкулезных микобактерий (NTM) (*Mycobacterium abscessus*) композиции 2 примера 1, включающей смесь тигециклин/лактоза/L-лейцин (30/60/10 масс/масс/масс), по сравнению с чистым активным ингредиентом тигециклином.

Полная среда DMEM, используемая для композиции макрофагов

Модифицированная Дульбекко среда Игла (Cellgro 15-017-cv) с добавлением:

Инактивированной нагреванием фетальной телячьей сыворотки (Atlas Biologicals, Fort Collins, CO, F-0500-A) (10%)

LCM (10%)

Среды, кондиционированной L929: клетки L-929 (CCL-1) (ATCC) секретируют макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF) - цитокин, который дифференцирует макрофаги костного мозга/предшественники моноцитов в однородную популяцию зрелых макрофагов. Их высевают в количестве  $4,7 \times 10^5$  клеток в 55 мл DMEM+10% эмбриональной телячьей сыворотки в шарообразную емкость 75 см<sup>2</sup>. Клетки оставляют расти на 3 дня, затем супернатант собирают и фильтруют через фильтр 0,45 мкм, разделяют на аликвоты и замораживают при -20°C.

Бесклеточный фильтрат используют в среде DMEM.

L-глутамин (Sigma G-7513) (2 mM)

Буфер HEPES (Sigma H-0887) (10 mM) антибиотик/антимикотик (Sigma A-9909) (1X)

Заменимые аминокислоты MEM (Sigma M-7145) (1X)

2-меркаптоэтанол (Sigma M-6250) (50 nM)

Получение и культивирование клеточной линии макрофагов THP-1

Клетки THP-1 размножали в течение 2 недель. Затем клетки THP-1 суспендировали в полной среде DMEM (для макрофагов при концентрации  $5 \times 10^5$  клеток/мл). Клетки высевали в 24-луночные планшеты для тканевых культур по 2 мл на лунку ( $1 \times 10^6$  на лунку).

24-луночный планшет для культуры тканей позволяет тестировать в трех экземплярах диапазон из 7 концентраций лекарственных средств и необработанных контролей. Клетки инкубировали при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> в увлажненной камере.

Полные среды DMEM, не содержащие антибиотиков/антимикотиков, не менялись в течение 3-дневного испытания.

Инфицирование и обработка макрофагов THP-1

В день 0 из клеток удаляли среду и заменяли ее 0,2 мл DMEM без антибиотиков/антимикотиков, содержащей *Mycobacterium abscessus* при соотношении 10 бактерий на макрофаг.

Планшеты с тканевыми культурами помещали в закрытые пакеты Ziploc и переносили в инкубатор. Внутри инкубатора пакеты открывали. Клетки инкубировали с бактериями в течение 2 часов.

После инфицирования внеклеточные бактерии удаляли путем однократного промывания каждой лунки PBS. Затем добавляли 2 мл полной среды DMEM, не содержащей антибиотиков/антимикотиков, и различные концентрации лекарственного средства.

Для получения концентраций лекарственного средства выполняли 2-кратные

серийные разведения путем добавления 10 мл предыдущей суспензии к 10 мл полной среды плюс сыворотка в следующем флаконе, что приводило к диапазону испытаний 0,25, 1, 4 и 16х МИС.

Каждую концентрацию лекарственного средства тестировали в трех повторах. Культуральные планшеты инкубировали с антибиотиками при 37°C+5% CO<sub>2</sub> в течение 3 дней.

Через 3 дня клетки обрабатывали гентамицином в течение 2 часов для уничтожения внеклеточных бактерий, а затем 3 раза промывали средой. Посев лизатов инфицированных клеток и воздействие композицией 2 и исходным материалом тигециклином, а также оценку жизнеспособности клеток для ТНР-1 клеток выполняли через 4 часа, 1 день и 2 дня.

Результаты представлены в следующих таблицах 6 и 7.

Таблица 6

## Результаты с чистым тигециклином

Чистый мкг/мл	Тигециклин	День 1 КОЕ	День 2 КОЕ	День 3 КОЕ
0		217	1233	13333
1		287	2067	2667
2		263	203	1743
4		427	123	267
8		303	203	220
16		333	203	153
24		287	90	143

Таблица 7

## Результаты с композицией 1

Композиция мкг/мл	1	Тигециклин мкг/мл	День 1 КОЕ	День 2 КОЕ	День 3 КОЕ
0		0	217	1233	13333
1		0,3	123	203	3300
2		0,6	170	163	2600
4		1,2	177	160	2000
8		2,4	163	183	517
16		4,8	193	147	497
24		7,2	163	183	160

Испытание показало значительное проникновение тигециклина в инфицированные макрофаги как из чистого активного ингредиента, так и из композиции 1.

Сравнение эффективности композиции 1 с эффективностью чистого активного ингредиента выявило существенную эквивалентность поведения двух препаратов, принимая во внимание, что количество тигециклина в композиции 1 равно 30% от общего количества.

В случае композиции 1 используемая максимальная концентрация тигециклина составляла 7,2 мкг/мл, что значительно ниже, чем при использовании чистого тигециклина.

Тем не менее, снижение количества КОЕ (колониеобразующие единицы)

*Mycobacterium abscessus* очевидно даже при низких концентрациях тигециклина, что демонстрирует сопоставимые скорости растворения между композицией 1 и активным ингредиентом и, прежде всего, стабильность тигециклина после получения путем распылительной сушки.

Испытание на цитотоксичность, проведенное предварительно с композицией 1, не выявило токсичности. Макрофаги, подвергшиеся воздействию композиции 1, сохранили 95% жизнеспособность после воздействия.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция в форме сухого порошка для ингаляционного введения, включающая глицилциклин, в частности тигециклин, в количестве менее 50% по массе относительно общей массы указанной композиции и лактозу в количестве, равном или превышающем количество указанного глицилциклина.

2. Фармацевтическая композиция по пункту 1, где массовое соотношение количества глицилциклина к количеству лактозы составляет от 1:1 до 1:3, предпочтительно от 1:1 до 1:2.

3. Фармацевтическая композиция по пункту 1, где указанная композиция включает лейцин.

4. Фармацевтическая композиция по пункту 3, где указанная композиция включает указанный лейцин в количестве от 5% до 30%, предпочтительно от 10% до 25% по массе относительно общей массы указанной композиции.

5. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, где указанный порошок имеет  $X_{90}$  менее 10,0 мкм, предпочтительно менее 7,0 мкм, более предпочтительно менее 5,0 мкм.

6. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, где указанный порошок имеет MMAD менее 5 мкм, предпочтительно от 2 мкм до 4 мкм.

7. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, где указанный порошок имеет вдыхаемую фракцию (FPF) более 50%, предпочтительно более 60%, более предпочтительно более 70%.

8. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, где указанная композиция включает указанный глицилциклин в количестве от 15% до 45%, предпочтительно от 20% до 40%, более предпочтительно от 25% до 35% по массе относительно общей массы указанной композиции.

9. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, где указанная композиция включает указанную лактозу в количестве от 30% до 85%, предпочтительно от 35% до 80%, более предпочтительно от 40% до 75% по массе относительно общей массы указанной композиции.

10. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, где указанный глицилциклин присутствует в аморфном твердом состоянии в количестве от 90 до 100% по отношению к его общему количеству в указанной композиции.

11. Способ получения фармацевтической композиции в форме сухого порошка для ингаляционного введения, включающей глицилциклин, в частности тигециклин, при этом указанный способ включает следующие стадии:

(а) получение раствора в водном растворителе, включающего глицилциклин, в частности тигециклин, лактозу и необязательно лейцин,

(б) сушку раствора, полученного на стадии (а), с получением сухого порошка с  $X_{90}$  менее 10 мкм, и

(с) сбор указанного сухого порошка,

отличающийся тем, что указанный раствор дополнительно включает органическую или неорганическую кислоту в количестве, необходимом для доведения значения pH указанного раствора до 6,5-7,5.

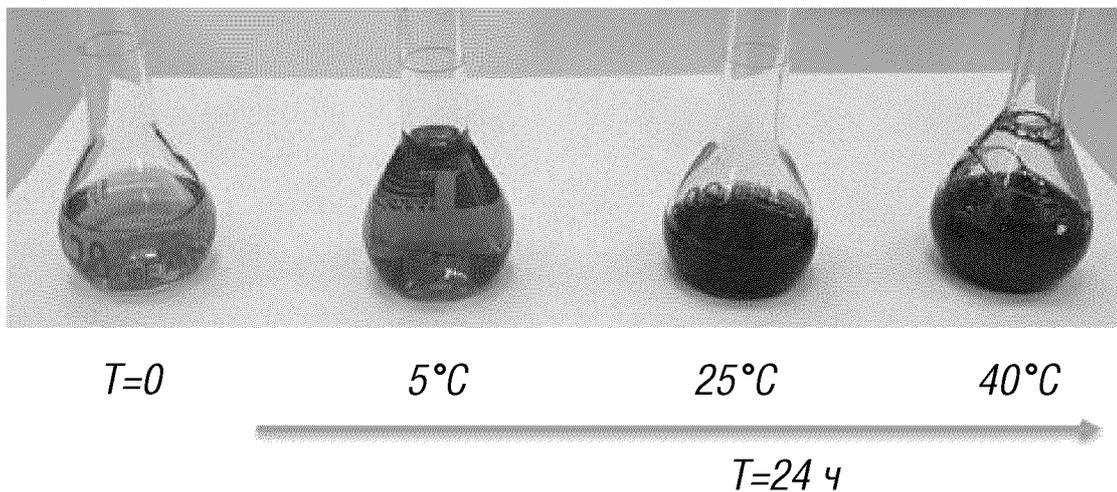
12. Способ по пункту 11, где указанную стадию (b) осуществляют при помощи распылительной сушилки.

13. Способ по любому из пунктов 11-12, где указанная органическая или неорганическая кислота выбрана из группы, состоящей из муравьиной кислоты, уксусной кислоты, пропионовой кислоты, масляной кислоты, хлористоводородной кислоты, бромистоводородной кислоты, азотной кислоты и фосфорной кислоты, предпочтительно муравьиной кислоты и фосфорной кислоты.

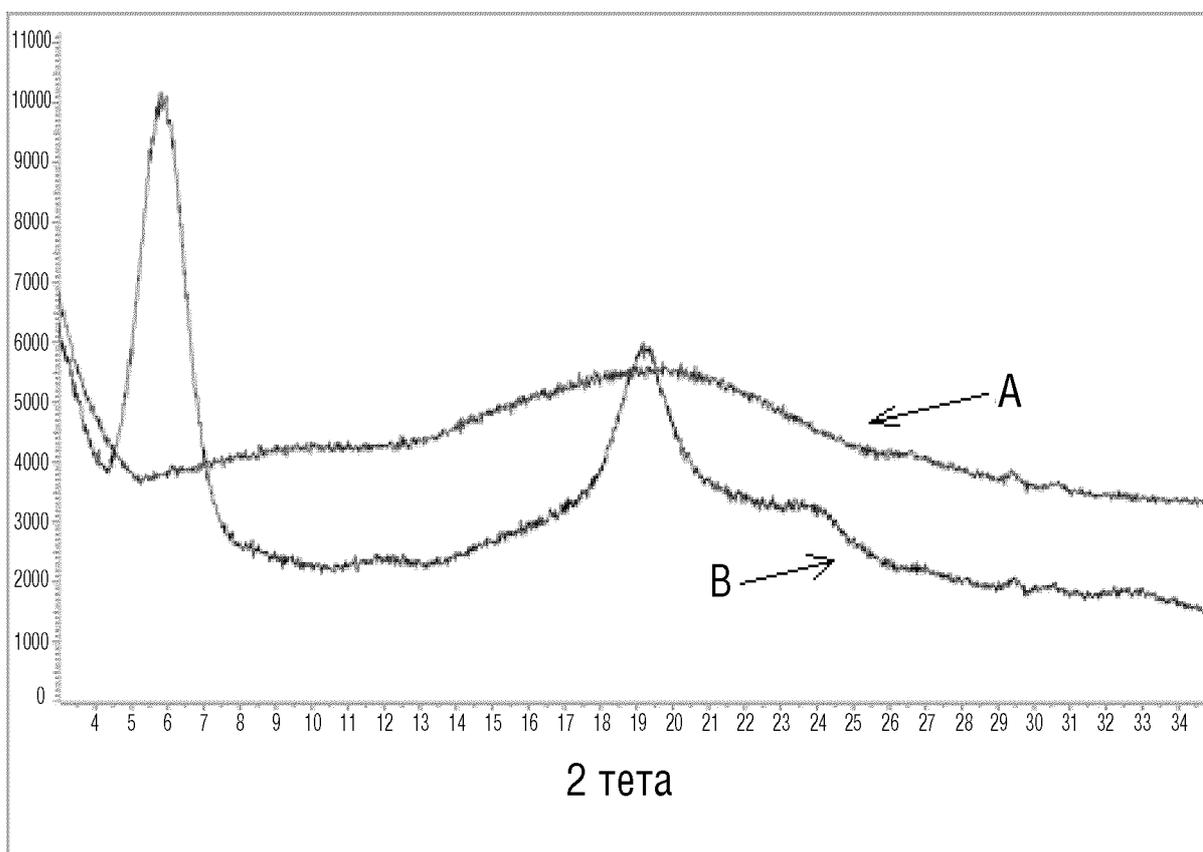
14. Фармацевтическая композиция в форме сухого порошка для ингаляционного введения для использования в лечении микобактериальных инфекций, где указанная композиция включает глицилциклин, в частности тигециклин, в количестве менее 50% по массе относительно общей массы указанной композиции, лактозу в количестве, равном или превышающем количество указанного глицилциклина, и необязательно лейцин.

15. Фармацевтическая композиция для использования по пункту 14, где указанные микобактерии представляют собой нетуберкулезные микобактерии (NTM), предпочтительно выбранные из группы, состоящей из медленно растущих NTM (SGM) и быстро растущих NTM (RGM).

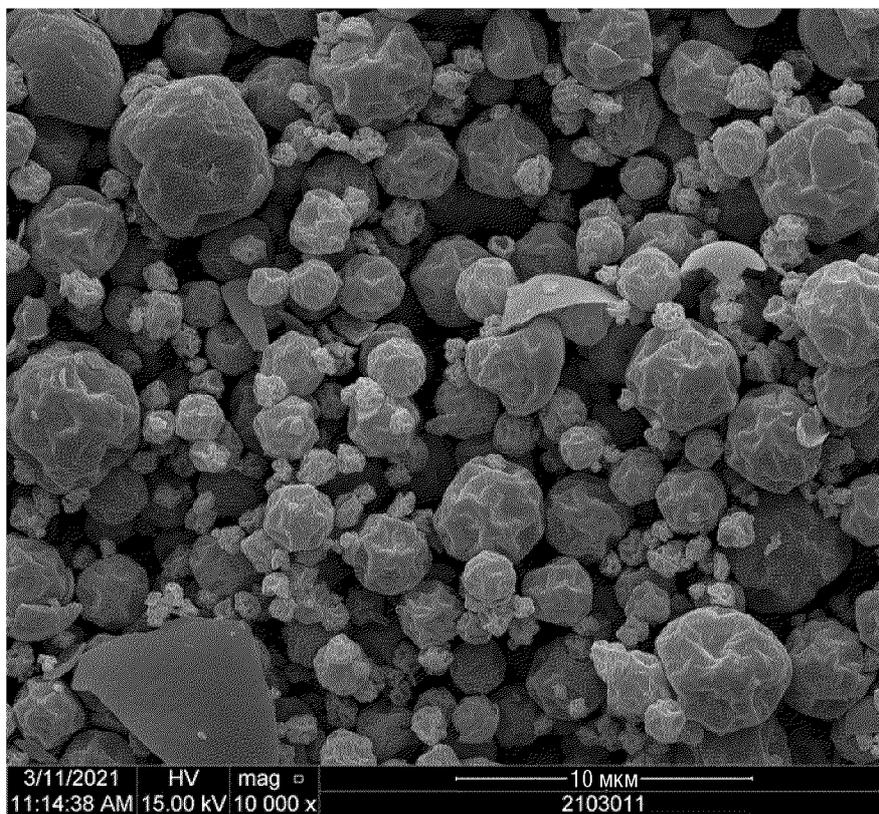
ФИГ.1



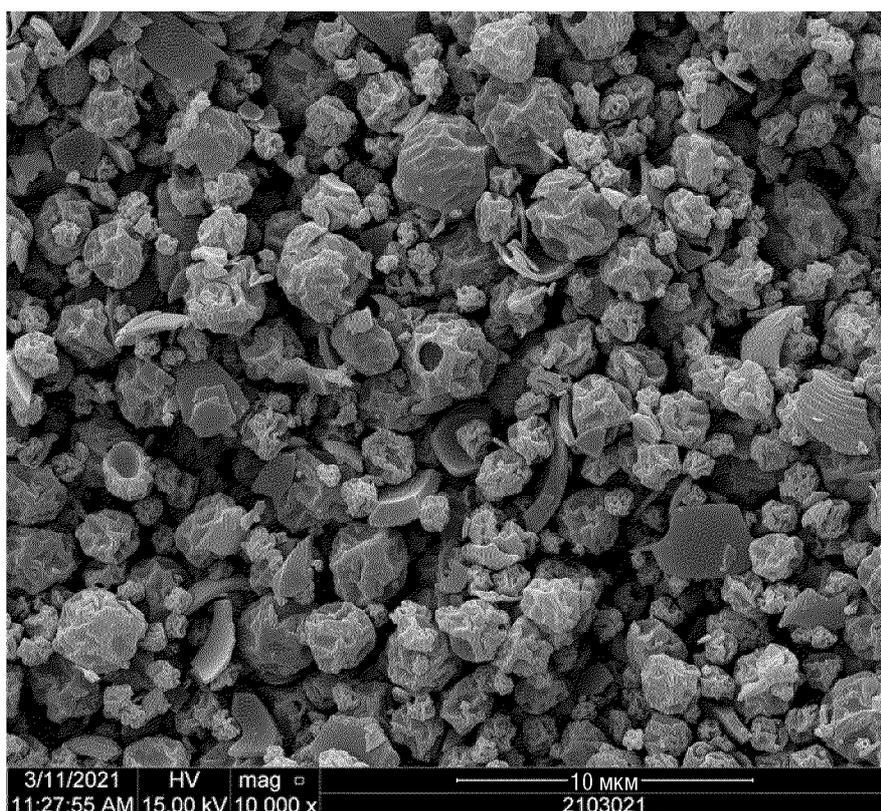
ФИГ.2



ФИГ.3



(A)



(B)