



(51) МПК
A61M 15/00 (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
A61K 31/616 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010133870/14, 14.01.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 14.01.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
 14.01.2008 DE 102008004386.9

(43) Дата публикации заявки: 20.04.2012 Бюл. № 11

(45) Опубликовано: 27.07.2014 Бюл. № 21

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: GB 2306109 A 30.04.1997. RU 2131750 C1 20.06.1999. MY 134521 A 31.12.2007. WO 2006074114 A2 13.07.2006. US 6051566 A 18.04.2000. EA 889 B1 26.06.2000. DE 102005053358 A1 10.05.2007. WO 2004060360 A1 22.07.2004. BE 1010692 A6 01.12.1998. "Ацетилсалицилат лизина (Lysine acetylsalicylat)" - инструкция, применение и формула // на сайте "www.rlsnet.ru", (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 16.08.2010

(86) Заявка РСТ:
 DE 2009/000033 (14.01.2009)

(87) Публикация заявки РСТ:
 WO 2009/089822 (23.07.2009)

Адрес для переписки:

105082, Москва, Спартаковский пер., д. 2, стр. 1, секция 1, этаж 3, "ЕВРОМАРКПАТ"

(72) Автор(ы):

Штефан ЛЮДВИГ (DE),
 Герхард ШОЙХ (DE),
 Оливер ПЛАНЦ (DE)

(73) Патентообладатель(и):

ФЕНТАЛЕОН ГМБХ (DE)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ СОЛИ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине, а именно к фармакологии и вирусологии, и может быть использована для профилактики и лечения вирусных инфекций, вызываемых РНКвыми вирусами с отрицательной цепью, предпочтительно вирусами гриппа, прежде всего вирусами типа H5 или H7. Для этого предложена

композиция, содержащая соль о-ацетилсалициловой кислоты с аминокислотой, выбранной из группы, включающей лизин, аргинин, орнитин, диаминомасляную кислоту и смесь указанных аминокислот. Предложен также способ применения аэрозольной композиции, включающей соль о-ацетилсалициловой кислоты

с природной или неприродной основной аминокислотой, пропеллент и необязательно вспомогательное вещество и/или носитель. Способ предполагает аэрогенное введение физиологически активного количества данной аэрозольной композиции человеку, подверженному риску вирусной инфекции или

уже поражённому ею, путём ингаляции через нос или рот. Изобретения обеспечивают возможность эффективной профилактики и лечения предложенных вирусных инфекций при хорошей переносимости вводимой препаративной формы и отсутствии риска возникновения приступов астмы. 2 н. и 10 з.п. ф-лы, 12 ил., 7 пр.

(56) (продолжение):

год последней корректировки 2007 [он-лайн] [Найдено 2012.12.17] найдено из Интернет: http://www.rlsnet.ru/tn_index_id_2530.htm . CAPELLA L et al. "Efficacy and tolerability of nimesulide and lysine-acetylsalicylate in the treatment of paediatric acute upper respiratory tract inflammation". Drugs. 1993;46 Suppl 1:222-5, реферат, найдено 20.12.2012 из PubMed PMID: 7506178. OGATA N et al. "Intranasal lysine-aspirin administration decreases polyp volume in patients with aspirin-intolerant asthma". J Laryngol Otol. 2007 Dec;121(12):1156-60. Epub 2007 Aug 15, реферат, найдено 20.12.2012 из PubMed PMID: 17697437

RU 2524304 C2

RU 2524304 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61M 15/00 (2006.01)*A61K 31/198* (2006.01)*A61K 31/616* (2006.01)*A61P 31/12* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2010133870/14, 14.01.2009**(24) Effective date for property rights:
14.01.2009

Priority:

(30) Convention priority:
14.01.2008 DE 102008004386.9(43) Application published: **20.04.2012** Bull. № 11(45) Date of publication: **27.07.2014** Bull. № 21(85) Commencement of national phase: **16.08.2010**(86) PCT application:
DE 2009/000033 (14.01.2009)(87) PCT publication:
WO 2009/089822 (23.07.2009)

Mail address:

**105082, Moskva, Spartakovskij per., d. 2, str. 1,
sektcija 1, ehtazh 3, "EVROMARKPAT"**

(72) Inventor(s):

**Shtefan LJuDVIG (DE),
Gerkhard ShoJKh (DE),
Oliver PLANTs (DE)**

(73) Proprietor(s):

FENTALEON GMBKh (DE)(54) **APPLICATION OF ACETYLSALICYLIC ACID SALT FOR TREATMENT OF VIRAL INFECTIONS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: group of inventions relates to medicine, namely to pharmacology and virology, and can be used for the prevention and treatment of viral infections, caused by RNA viruses with a negative chain, preferably flu viruses, first of all, viruses of H5 or H7 types. For this purpose a composition, containing a salt of o-acetylsalicylic acid with amino acid, selected from the group, including lysine, arginine, ornithine, diaminobutyric acid and a mixture of the said amino acids, is claimed. Also claimed is a method of applying an aerosol composition, which includes a salt of o-acetylsalicylic acid with natural or non-natural basic

amino acid, a propellant and an optionally auxiliary substance and/or a carrier. The method involves aerogenic introduction of a physiologically active amount of the said aerosol composition to a person who is at risk of a viral infection or already infected by it, by inhalation through the nose or mouth.

EFFECT: inventions provide a possibility of efficient prevention and treatment of the said viral infections with good tolerability of the introduced preparation form and an absence of risk of asthma attack development.

12 cl, 12 dwg, 7 ex

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к новому применению композиции, содержащей соль о-салициловой кислоты (орто-оксибензойной кислоты) с основной аминокислотой, для приготовления фармацевтической композиции.

5 Существующий уровень техники и предпосылки создания изобретения

Грипп по-прежнему относится к наиболее опасным заразным заболеваниям человека, которые могут принимать характер пандемии. Имеется лишь очень ограниченное количество лекарственных средств против вызывающих заболевание патогенов, а именно против вирусов гриппа А, мишенью которых является непосредственно только вирус. В данном случае существует проблема, заключающаяся в том, что сравнительно быстро может развиваться устойчивость. Кроме того, существует опасность того, что эпидемически распространяющийся среди домашней птицы птичий грипп, вызываемый заражением вирусом гриппа А типа H5, может передаваться также и человеку. Таким образом, высокой опасности подвергаются, прежде всего, люди, контактирующие с 10 зараженной домашней птицей. В этой связи следует особо отметить, что все возрастает количество сообщений о нечувствительности вирусов подтипа H5N1 к немногим разрешенным к применению лекарственным средствам, таким как озельтамивир. Таким образом, существует большая потребность в новых и эффективных противогриппозных лекарственных средствах, предназначенных как для профилактики, так и для лечения 15 вирусных инфекций, причем указанные лекарственные средства по возможности не должны вызывать развитие устойчивости к ним.

В документе WO 2004/060360 A1 описано, что ацетилсалициловая кислота может ингибировать фактор транскрипции NF-kB в клетках-хозяевах и в результате такого ингибирования пути передачи сигнала NF-kB, необходимые вирусные компоненты 20 остаются в ядре клетки и не могут более интегрироваться в вирусные частицы. В указанном документе описано также аэрогенное введение ацетилсалициловой кислоты с целью профилактики или лечения вирусных инфекций.

Например, в документе DE 10202019 A1 описаны соли ацетилсалициловой кислоты с основными аминокислотами, где полученные с их использованием композиции 30 предназначены только для орального введения. Кроме того, в указанном документе описано применение таких солей для лечения заболеваний ревматического типа, артритов, невралгий, миалгий, мигреней, ишемических заболеваний сердца, «удара», стенокардии, инфаркта миокарда, при операциях, связанных с шунтированием, при осуществлении чрескожной катетерной коронаопластики (РТСА), имплантациях стентов, 35 для стимуляции иммунной системы страдающих ВИЧ пациентов, для профилактики опухолей, для замедления ухудшения когнитивной способности при синдроме деменции, для ингибирования образования желчных конкрементов и/или для лечения диабетических заболеваний. Кроме того, указанные соли, известные под торговым названием Aspisol®, уже применяют в качестве лекарственных средств для лечения астмы, сенной лихорадки, 40 опуханий слизистой оболочки носа или хронических инфекций дыхательных путей, при этом введение осуществляют не только оральным путем, но также и путем инъекции. Следует отметить, что все указанные заболевания не являются заболеваниями, непосредственно ассоциированными с вирусными инфекциями, которые вызываются вирусами гриппа.

45 В принципе, применение чистой ацетилсалициловой кислоты в качестве противовирусного агента, вводимого в виде аэрозоля в дыхательные пути или легкие, очень хорошо проверено на подопытных животных. Однако у человека введение путем ингаляции чистой ацетилсалициловой кислоты может вызывать сильное раздражение

дыхательных путей. Кроме того, было установлено, что в отдельных случаях введение путем ингаляции ацетилсалициловой кислоты может вызывать приступы астмы у некоторых чувствительных пациентов. В любом случае аэрогенное введение ацетилсалициловой кислоты в качестве противогриппозного лекарственного средства должно быть противопоказано страдающим астмой пациентам или индивидуумам, имеющим риск возникновения астмы.

Техническая задача изобретения

Таким образом, в основу настоящего изобретения была положена задача разработать содержащую ацетилсалициловую кислоту препаративную форму, предназначенную для лечения вирусных инфекций, которая обладает очень хорошей переносимостью и, прежде всего, надежно обеспечивает отсутствие риска возникновения приступов астмы.

Краткое изложение сущности изобретения и предпочтительных вариантов осуществления изобретения

Для решения указанной технической задачи в изобретении предложено применение композиции, содержащей в физиологически эффективной дозе соли о-ацетилсалициловой кислоты с встречающейся в естественных условиях или не встречающейся в естественных условиях аминокислотой, для приготовления фармацевтической композиции, предназначенной для профилактики или лечения вирусных инфекций у человека или животных, прежде всего у млекопитающих и птиц. В контексте изобретения понятие «вирусные инфекции» относится, прежде всего, к инфекциям, вызываемым встречающимися в естественных условиях вирусами дикого типа, но не к инфекциям, вызываемым генетически модифицированными вирусами.

Среди птиц в качестве объектов для профилактики или лечения рассматривают, прежде всего, домашних птиц, таких как куры, гуси, утки, пулярки, индейки, индюки, перепела или голуби, а также певчие птицы.

При применении такой соли, прежде всего при аэрогенном введении, не происходит раздражение ткани, такой как слизистая оболочка дыхательных путей, благодаря тому, что действующее вещество во вводимой препаративной форме не является кислым. Это позволяет, прежде всего, надежно избегать возникновения приступов астмы у страдающих астмой пациентов или индивидуумов, имеющих риск возникновения астмы, и при этом благодаря отсутствию рисков, обусловленных побочными действиями, практически не имеется препятствий для ее широкого применения, как в качестве терапевтического средства, так и в качестве профилактического средства, тем более что указанную препаративную форму уже применяли даже в качестве средства против астмы. Кроме того, при создании изобретения неожиданно было установлено, что дериватизация ацетилсалициловой кислоты практически не ослабляет ингибирующее воздействие на вирусную репликацию; неожиданно было установлено, что оно даже слегка возрастает.

Предпочтительно, когда основную аминокислоту выбирают из группы, включающей лизин, аргинин, орнитин, диаминомасляную кислоту и смеси указанных кислот, при этом предпочтительно применяют моноацетилсалицилат. Аминокислота представляет собой альфа-аминокарбоновую кислоту, при этом она на альфа-атоме может быть связана с водородом или любым остатком в виде боковой цепи. Основная аминокислота содержит в боковой цепи основную группу или несколько основных групп, прежде всего аминогруппу. Основная аминокислота может представлять собой, прежде всего D-лизин, L-лизин или смесь D-лизина и L-лизина.

Композиция может содержать дополнительно также соль о-ацетилсалициловой кислоты с встречающейся в естественных условиях или не встречающейся в естественных

условиях аминокислотой, имеющей неосновную боковую цепь, прежде всего с глицином. Массовое соотношение лизина и глицина в композиции может составлять от 100:1 до 1:1, прежде всего от 100:1 до 10:1. Предпочтительной является смесь солей аминокислот лизина и глицина. Наиболее предпочтительной является соль или смесь солей, такая как содержащаяся в композиции, поступающей в продажу под торговым названием Aspisol®, например, в водном растворе.

Для цели настоящего изобретения можно применять также фармацевтические композиции, содержащие пролекарства, которые после приема или введения метаболизируются естественным путем в организме с образованием действующих веществ, предлагаемых в изобретении.

Согласно изобретению применяемую композицию можно использовать для профилактики или лечения многочисленных вирусных инфекций. Композиция наиболее пригодна для профилактики или лечения инфекций, вызываемых РНКовыми вирусами с отрицательной цепью, такими как вирусы гриппа, предпочтительно вирусы гриппа А, прежде всего вирусы H5- или H7-типа.

Было установлено также, что применяемая согласно изобретению субстанция подавляет индуцируемую вирусом сверхэкспрессию цитокинов («цитокиновый шторм»), регуляция которых зависит от NF-κB. Следовательно, с помощью предлагаемой в изобретении субстанции можно снижать в целом патогенность многих вирусов, патогенный потенциал которых коррелирует среди прочего с избыточным уровнем экспрессии цитокинов. Поэтому применяемую согласно изобретению композицию можно использовать также для лечения и профилактики вирусных инфекций, вызываемых коронавирусом (SARS), респираторно-синцитиальным вирусом (RSV), филовирусами, такими как вирус Марбург или вирус Эбола, аренавирусами, такими как вирус Ласса, вирусами аргентинской, боливийской или венесуэльской геморрагической лихорадки, хантавирусами, флавивирусами, такими как вирус Денге или вирус желтой лихорадки, вирусом геморрагической лихорадки Крым-Конго, вирусом лихорадки долины Рифт, вирусами парагриппа (типов 1, 2 и 3), риновирусами, человеческими вирусами метапневмонии (hMPV) и вирусом Эпштейна-Барра.

Галенов препарат предлагаемой в изобретении фармацевтической композиции можно готовить общепринятым в данной области методом и в форме, пригодной, в принципе для любого пути введения, например, орального, путем инъекции или аэрогенного введения путем ингаляции. Пригодными твердыми или жидкими формами галеновых препаратов являются, например, гранулы, порошки, драже, таблетки, (микрo-) капсулы, суппозитории, сиропы, соки, суспензии, эмульсии, капли или растворы, предназначенные для инъекции (i.v., i.p., i.m., s.c.) или распыляемые дисперсии (аэрозоли), трансдермальные системы, а также препараты с пролонгированным высвобождением действующего вещества, для приготовления которых можно применять общепринятые вспомогательные вещества, такие как носители, разрыхлители, связующие вещества, вещества для нанесения покрытия, вещества, способствующие набуханию, обеспечивающие скольжение или замасливатели, вещества, улучшающие вкус, подслащивающие вещества и вещества, повышающие растворимость. В качестве вспомогательных веществ следует отметить карбонат магния, диоксид титана, лактозу, маннит и другие сахараиды, тальк, молочный белок, желатин, крахмал, целлюлозу и ее производные, масла животного и растительного происхождения, такие как жир печени трески, подсолнечное, арахисовое или кунжутное масло, полиэтиленгликоли и растворители, такие как стерильная вода и одно- или многовалентные спирты, например, глицерин, или смеси таких растворителей. Фармацевтическую композицию, применяемую

согласно изобретению, можно получать путем смешения по меньшей мере одной применяемой согласно изобретению соли, взятой в определенной дозе, с фармацевтически приемлемым и физиологически переносимым носителем и необязательно с другими действующими веществами, дополнительными или вспомогательными веществами, взятыми в определенной и заранее заданной дозе, и приготовления препаративной формы, предназначенной для требуемого пути введения. Примеры пригодных препаративных форм для орального введения описаны, например, в документе DE 10202019 A1 и приведенных в нем ссылок.

Предпочтительными, однако, является галенов препарат, предназначенный для аэрогенного назального введения в виде жидкой водной композиции (раствора) или в виде порошка, если это возможно, в виде суспензии в пропелленте, например в пропелленте, который может быть оживлен при комнатной температуре, таком как хлорфторуглерод (ХФУ), гидрофторалканы, такие как 1,1,1,2-тетрафторэтан или 1,1,1,2,3,3,3-гептафторпропан, пропан, бутан, изобутан или другие общепринятые в области медицинских аэрозольных препаративных форм пропелленты. В дополнение к упомянутым пропеллентам или вместо них можно применять также воздух, кислород, азот, диоксид углерода или закись азота. При этом композиция может содержать общепринятые в данной области дополнительные и вспомогательные вещества для медицинских аэрозольных препаративных форм, такие например, как физиологически переносимые поверхностно-активные вещества и/или общепринятые в данной области облегчающие суспендирование средства.

Кроме того, водная композиции предпочтительно представляет собой водный раствор солей или смеси солей с концентрацией от 0,01 мМ до 3,0 М, предпочтительно от 0,5 до 3,0 М, или от 0,01 до 100 мМ, прежде всего от 0,1 до 10 мМ.

Предпочтительно, когда размер частиц аэрозоля, образованного из раствора, из соли в виде твердого вещества или находящегося в суспензии, характеризуется величиной ММАД (массовый медианный аэродинамический диаметр), составляющей менее 10 мкм, предпочтительно менее 5 мкм. Для измерения характеризующей распределение аэродинамических размеров частиц величины FPD (доза респирабельных частиц) или FPF (фракция респирабельных частиц) можно применять импакторы, такие например, как 5-ступенчатый многостадийный жидкостной импинджер (MSLI) или 8-ступенчатый каскадный импактор Андерсена (ACI), которые описаны в главе 601 Фармакопеи США (USP) или в монографии Inhalanda Европейской Фармакопеи (Ph. Eur.). На основе аэродинамического распределения частиц с использованием «графика логарифм размера частиц - вероятность» можно рассчитывать величину ММАД для аэрозольной композиции. При предпочтительных величинах ММАД обеспечивается респирабельность частиц аэрозоля, так что они могут проникать в нижнюю область легкого, в результате чего в течение периода введения обычной продолжительности во всем объеме легкого достигается достаточная концентрация. Для того чтобы избежать удаления малых частиц при выдохе, можно обеспечивать нижнюю границу величины ММАД на уровне 0,1 мкм, предпочтительно 0,5 мкм.

Для достижения требуемых величин ММАД можно дробить или измельчать применяемую согласно изобретению соль общепринятым в данной области методом, например с помощью стержневой, шаровой или воздушоструйной мельницы.

Введение предлагаемого в изобретении аэрозоля можно осуществлять с помощью любых общепринятых в области медицинской техники ингаляционных устройств, снабженных аэрозольными генераторами, такими как пульверизаторы или аэрозольные распылители. Примерами могут служить порошково-аэрозольные пульверизаторы или

DPI (ингаляторы для сухого порошка), форсуночные, ультразвуковые распылители или распылители с вибрирующей мембраной. Можно применять также аэрозольные генераторы, работа которых основана на электродинамическом принципе или на основе конденсации аэрозоля из жидкой препаративной формы. Примеры приемлемых ингаляционных устройств описаны в документах EP 1741460 A, EP 1700614 A, EP 1258264 A и EP 1163921 A.

Концентрацию соли в композиции выбирают в соответствии со скоростью выброса аэрозольного генератора таким образом, чтобы в течение промежутка времени, составляющего менее 5 мин, предпочтительно 2 мин, наиболее предпочтительно 1 мин, можно было превратить в аэрозоль и ввести пациенту по меньшей мере 10 мг, предпочтительно по меньшей мере 50 мг, наиболее предпочтительно по меньшей мере 100 мг соли.

Кроме того, для обеспечения оптимального отложения в легких целесообразно контролировать и регулировать вдыхаемый поток или вдыхаемый объем. Поскольку при слишком быстром вдыхаемом потоке аэрозольные частицы наталкиваются уже на заднюю стенку глотки или осаждаются в голосовой щели. При слишком медленном дыхании аэрозольные частицы достигают только верхней части дыхательных путей и не проникают в нижние отделы легких. Следовательно, применяемая ингаляционная система должна обеспечивать для пациента возможность глубокой медленной ингаляции. Для детей ингаляционный объем должен составлять по меньшей мере 200 мл, предпочтительно по меньшей мере 500 мл. Для взрослых ингаляционный объем должен составлять по меньшей мере 300 мл, предпочтительно по меньшей мере 500 мл. Целесообразно ингаляцию аэрозоля в таком объеме осуществляют в течение периода времени, составляющего по меньшей мере 1 с, более предпочтительно в течение по меньшей мере 3 с, предпочтительно в течение по меньшей мере 5 с. Предпочтительно ингаляционный поток регулируют таким образом, чтобы он составлял менее 1000 мл/с, прежде всего менее 500 мл/с, прежде всего менее 300 мл/с, а вдыхаемый объем составлял по меньшей мере 20%, прежде всего по меньшей мере 30%, предпочтительно по меньшей мере 50% и вплоть до 95% по отношению к емкости вдоха пациента. Последнее гарантирует, с одной стороны, медленную, а с другой стороны, также и глубокую ингаляцию для пациентов.

Для цели изобретения можно применять ингаляционные системы, в которых вышеуказанные параметры измеряются с помощью датчиков и которые посредством электрических, акустических и/или оптических сигналов выдают информацию о правильном или неправильном режиме ингаляции. Дополнительные сведения об ингаляционных устройствах, работающих таким образом, можно почерпнуть в вышеуказанных документах. В случае использования простых ингаляционных систем можно предусматривать также, чтобы к фармацевтической композиции прилагалась письменная информация для пациента, содержащая указанные рекомендации.

Таким образом, изобретение относится также к аэрозольное препаративной форме, содержащей соль о-ацетилсалициловой кислоты с встречающейся в естественных условиях или не встречающейся в естественных условиях аминокислотой, пропеллент, а также необязательно вспомогательные вещества и/или носители. Соль может присутствовать в количестве, составляющем от 0,001 до 50 мас.%, от 0,001 до 10 мас.%, прежде всего от 0,1 до 10 мас.%, или от 10 до 50 мас.%, прежде всего от 30 до 50 мас.%, в пересчете на общую массу препаративной формы. Если соль находится в форме частиц, то она может характеризоваться величиной ММАД, составляющей менее 10 мкм, прежде всего менее 5 мкм.

При создании изобретения неожиданно было установлено, что при использовании указанных выше высоких концентраций оказалось возможным создавать образующиеся из таких растворов аэрозольные частицы, которые характеризуются указанным выше малым размером частиц.

5 Кроме того, изобретение относится также к применению предлагаемой в изобретении аэрозольной препаративной формы для профилактики или лечения вирусных инфекций у человека или животных, в котором человеку или животному, имеющему риск заболеть или имеющему заболевание, обусловленное вирусной инфекцией, вводят аэрогенно в физиологически эффективном количестве аэрозольную препаративную
10 форму путем ингаляции через нос или рот.

И, наконец, изобретения относится к ингаляционному устройству, включающему резервуар и присоединенный к резервуару аэрозольный генератор, где резервуар содержит аэрозольную препаративную форму, предлагаемую в изобретении. Как правило, к выходу аэрозольного генератора присоединен мундштук. Кроме того, может
15 быть предусмотрено наличие воздушного насоса, посредством которого под контролем управляющего устройства осуществляют управление ингаляционным потоком и/или ингаляционным объемом. Могут быть предусмотрены управляющие и/или регулирующие средства для управления и/или регулирования ингаляционного потока и вдыхаемого объема, при этом управляющие и/или регулирующие средства
20 предпочтительно настраивают на указанные выше значения.

Приведенные выше пояснения касательно предлагаемой в изобретении фармацевтической композиции применимы аналогичным образом также и к предлагаемой в изобретении аэрозольной препаративной форме, ее применению, а также к ингаляционному устройству.

25 Изобретение более подробно пояснено с помощью представленных ниже примеров.

Пример 1: Исследование явления устойчивости

Поскольку прежде всего требовалось рассмотреть проблемы устойчивости, связанные с применением ацетилсалициловой кислоты в качестве обладающего противовирусным действием ингибитора клеточных факторов, то было проведено исследование тенденции
30 возникновения устойчивых вариантов по сравнению с их возникновением при применении таких действующих непосредственно на вирус лекарственных средств, как амантадин и озельтамивир. Клетки легочного эпителия линии A549 заражали высокопатогенным изолятом вируса птичьего гриппа A A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) (FPV, вирус чумы домашней птицы) с MOI=0,01 (множественность заражения) и
35 инкубировали в течение 24 ч в присутствии ацетилсалициловой кислоты (5 мМ), амантадина (5 мкМ) и озельтамивира (2 мкМ) или без них. Отдельную партию клеток легочного эпителия линии A549 заражали A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) с MOI=0,001 и инкубировали в течение 24 ч в присутствии лизин-глицин-ацетилсалицилата (5 мМ) и озельтамивира (2 мкМ) и без них. Затем для обеих партий собирали клеточный
40 супернатант каждого образца и для него определяли вирусный титр с помощью анализа бляшкообразования на клетках линии MDCK. После этого супернатанты стандартизовали и использовали еще раз для того, чтобы в одинаковых условиях заражать соответствующими одинаковыми количествами вирусов второй обработанный или необработанный клеточный пассаж. Эту процедуру повторяли до получения в
45 общей сложности пятого или восьмого пассажа.

На фиг.1А представлено сравнение графиков вирусных титров в клетках, обработанных ацетилсалициловой кислотой, или амантадином, или озельтамивиром с вирусными титрами в супернатантах необработанных клеток. Было установлено, что

уже в третьем пассаже вирусные титры в клетках, обработанных амантадином, снова существенно возрастали вследствие образования устойчивых вариантов. Неожиданно было установлено, что аналогичное увеличение на сопоставимую величину имело место в выбранных для данного опыта экспериментальных условиях также и в случае
5 обработки озельтамивиром. Было установлено, что ацетилсалициловая кислота даже и в пятом пассаже обладала все такой же неизменной противовирусной активностью, что и в первом пассаже, что является выраженным отличием от приведенных выше результатов.

На фиг.11Б представлено сравнение графиков вирусных титров в клетках,
10 обработанных лизин-глицин-ацетилсалицилатом или озельтамивиром, с титрами в супернатантах необработанных клеток. Установлено, что и в случае применения лизин-глицин-ацетилсалицилата был получен результат, аналогичный продемонстрированному на фиг.1А, в данном случае даже после восьми пассажей все еще нельзя обнаружить
15 возникновения вирусной устойчивости после обработки лизин-глицин-ацетилсалицилатом. Полученные результаты полностью подтверждают предположение о том, что как ацетилсалициловая кислота, так и лизин-глицин-ацетилсалицилат, не имеют тенденции вызывать образование устойчивых вариантов клеточной культуре.

Пример 2: Исследование противовирусной активности препаративной формы, содержащей лизин-глицин-ацетилсалицилат, в отношении высокопатогенных вирусов
20 гриппа А

Исследуемая композиция представляла собой Lys-Gly-ацетилсалицилат (в дальнейшем обозначен также как LG-ацетилсалицилат), который по молекулярному составу соответствует продукту Aspisol®, выпускаемому фирмой Bayer AG.

Проводили исследование противовирусной активности этой препаративной формы
25 в отношении вирусов гриппа. Клетки легочного эпителия линии A549 заражали вирусом A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) (MOI=0,01) и инкубировали в течение 8, 24 и 36 ч в присутствии ацетилсалициловой кислоты (5 мМ) или LG-ацетилсалицилата (5 мМ), или без них. Затем собирали клеточный супернатант каждого образца и определяли вирусный титр с помощью анализа бляшкообразования на клетках линии MDCK. На фиг.2
30 представлен график зависимости вирусных титров от времени. Результат свидетельствует о том, что LG-ацетилсалицилат ингибирует размножение вирусов высокопатогенного изолята птичьего вируса H7N7 с такой же эффективностью, что и ацетилсалициловая кислота.

Как продемонстрировано на фиг.3, это же имеет место также и в случае заражения
35 высокопатогенными изолятами подтипа H5N1. Клетки легочного эпителия линии A549 заражали человеческим изолятом H5N1 вируса линии A/Thailand/KAN-1/2004 (MOI=0,001) и инкубировали в присутствии ацетилсалициловой кислоты или LG-ацетилсалицилата в указанных концентрациях. Клеточный супернатант исследовали с целью определения вирусных титров с помощью анализа бляшкообразования на клетках
40 линии MDCK. На фиг.3А представлены данные для момента времени 20 ч, на фиг.3Б представлены данные о кинетике возрастания вирусных титров. В обоих случаях видно, что имело место эффективное ингибирование, достигающее нескольких десятков раз, вирусных титров штамма H5N1.

На основе выявленного *in vitro* высокого противовирусного потенциала можно
45 сделать предположение о том, что препаративную форму, содержащую LG-ацетилсалицилат, можно применять для введения путем ингаляции в качестве противогриппозного действующего вещества.

Пример 3: Воздействие LG-ацетилсалицилата на высокопатогенные вирусы птичьего

гриппа в системе клеточной культуры

Клетки линии MDCKII культивировали в среде MEM (MEM; фирма Gibco (Invitrogen), Германия, 21430-079, лот 32034), дополненной 10% инактивированной тепловой обработкой фетальной телячьей сыворотки (FCS, фирма PAA Laboratories/A04305-0346), пенициллином (фирма Grunenthal/616G03) и стрептомицином (фирма Sanavita/03056440111). Для осуществления заражения клетки высевали в 24-луночные планшеты (8×10^4 клеток/лунку; фирма Greiner, Германия, №662160, лот 05210151) и инкубировали в течение ночи при 37°C. Перед осуществлением заражения клетки отмывали с помощью ЗФР, соответствующий вирус (FPV, SNI, MBI) разводили в ЗФР/БА (ЗФР, дополненный 0,6% БА (фирма MP Biomedicals), 1 мМ MgCl₂, 0,9 мМ CaCl₂, пенициллином (фирма Grunenthal/616G03) и стрептомицином, и с помощью пипетки вносили на газон клеток с MOI, составляющей 0,001. После инкубации в течение 30 мин при 37°C вирусный инокулят удаляли, к клеткам добавляли либо 1 мл среды MEM, либо среды MEM, содержащей 5 мМ LG-ацетилсалицилата. Через 8, 24, 32 и 48 ч после осуществления заражения отбирали соответствующий супернатант. Выявляли присутствие инфекционных вирусных частиц с помощью анализа бляшкообразования.

Для проведения анализа бляшкообразования клетки линии MDCKII высевали в 96-луночные планшеты таким образом, чтобы газон клеток достигал конфлюэнтности на следующий день. Клетки отмывали с помощью ЗФР и заражали в течение 60 мин при 37°C разведениями супернатантов, которые вносили в ЗФР/БА. После инкубации на клетки наслаивали среду, смешанную с авицелом (Avicel RC-581 (FMC/B624C)). Для этого смешивали 2,5%-ный раствор авицела с равным количеством 2x среды MEM. После инкубации в течение 20 ч удаляли среду, смешанную с авицелом, клетки фиксировали в течение 30 мин при 4°C с помощью 4%-ного раствора Roti®-Histofix (фирма Roth/32789170) в ЗФР и после этого отмывали с помощью ЗФР. Необходимые для осуществления окрашивания стадии обработки выполняли при комнатной температуре. Путем инкубации с 0,3% Тритон-Х-100 (фирма Serva/30043) в ЗФР увеличивали проницаемость клеток. Инфицированные вирусом клетки окрашивали иммуногистохимическим методом. Для этого клетки инкубировали в течение 1 ч с моноклональным антителом (фирма Serotec/250107), специфическим в отношении нуклеопротеина вируса гриппа А. Обнаружение инфицированных клеток проводили путем осуществления еще одной инкубации (30 мин) со связанным с пероксидазой антимышиным антителом (фирма DIANOVA/75790) и добавления пероксидазного субстрата True Blue™ (KPL/070490). Разведения антитела осуществляли в ЗФР, дополненном 10% FCS и 0,1% Твин-20 (фирма Serva/16211). После осуществления инкубации с первичным и вторичным антителом клетки трижды отмывали в течение 5 мин с помощью ЗФР/0,1% Твин-20. Для прекращения реакции планшеты отмывали водопроводной водой и сушили. Высушенные планшеты подвергали сканированию и оценивали с использованием программного обеспечения Corel DRAW 9.0. Для определения вирусного титра в супернатантах подсчитывали скопления инфицированных клеток (очаги) в каждой лунке 96-луночного планшета. Количество подсчитанных очагов умножали на соответствующий коэффициент разведения. На основе полученных величин определяли среднее значение для каждого образца. Вирусный титр представляли в виде десятичного логарифма (\log_{10}) среднего значения.

Результаты представлены на фиг.4. Обнаружено, что в результате обработки LG-ацетилсалицилатом репликация вируса H7N1 (FPV), а также вируса H5N1 (MBI) в системе клеточной культуры снижалась более чем на 99%.

Пример 4: Исследование молекулярных механизмов действия, лежащих в основе

противовирусной активности LG-ацетилсалицилата

Кроме того, изучали, сопоставимы ли молекулярные профили действия LG-ацетилсалицилата и чистой субстанции, представляющей собой ацетилсалициловую кислоту. LG-ацетилсалицилат должен действовать в качестве ингибитора NF- κ B и соответственно не оказывать никаких побочных воздействий на другие индуцируемые вирусом сигнальные пути. Важную группу сигнальных медиаторов, которые также активируются в результате заражения вирусом гриппа, образуют так называемые активируемые митогеном протеинкиназы (МАРК). К ним относятся киназы JNK, p38 и ERK. Для чистой субстанции, представляющей собой ацетилсалициловую кислоту, уже было установлено, что ацетилсалициловая кислота не оказывает ингибирующего действия на индуцируемую вирусом активацию указанных киназ. На фиг.5 продемонстрировано, что это же имеет место и в случае LG-ацетилсалицилата: добавление ацетилсалициловой кислоты в концентрации 5 мМ (полоса 7) или 7 мМ (полоса 9) не приводит к блокированию индуцируемой вирусом активации JNK, p38 и ERK (фиг.5, полоса 5), которую можно выявлять методом вестерн-блоттинга с помощью фосфор-специфических антител к активной форме указанных киназ. Противовирусное действие ацетилсалициловой кислоты обусловлено ингибированием экспрессии проапоптозных факторов, что, в конце концов, приводит к снижению активации каспазы в клетке. На фиг.6 это продемонстрировано с помощью вестерн-блоттинга также и для LG-ацетилсалицилата, на этом чертеже проиллюстрирована активация каспазы, выявленная по расщеплению каспазного субстрата поли-АДФ-рибозо-полимеразы (PARP). Четко видимая после 30 ч зона, соответствующая расщепленной PARP (полоса 6), существенно уменьшалась для образца, обработанного LG-ацетилсалицилатом (полоса 7).

NF- κ B-зависимая стадия вирусной репликации представляет собой зависящий от каспазы экспорт в цитоплазму вирусных рибонуклеопротеиновых комплексов (RNP), которые затем могут встраиваться в клеточную мембрану новых вирусных частиц. Ацетилсалициловая кислота специфически блокирует эту стадию, не оказывая воздействия на накопление вирусных белков на более ранней стадии цикла размножения. В случае LG-ацетилсалицилата имеет место идентичный механизм действия: на фиг.7 с помощью вестерн-блоттинга продемонстрировано, что LG-ацетилсалицилат не оказывает ингибирующего действия на накопление вирусных белков M1, NP, NS1 и PB1. Однако обнаружено, как это было описано ранее для чистой субстанции, представляющей собой ацетилсалициловую кислоту, эффективное удерживание вирусных RNP-комплексов, что четко видно из представленных на фиг.8 результатов иммунофлуоресцентного анализа.

На основании вышеизложенного можно сделать вывод о том, что LG-ацетилсалицилат обладает таким же противовирусным потенциалом, что и ацетилсалициловая кислота, и оказывает ингибирующее воздействие на размножение вирусов посредством идентичных молекулярных механизмов.

Пример 5: Снижение уровня экспрессии мРНК IP10 и интерферона-гамма после обработки LG-ацетилсалицилатом

Известно, что избыточное производство цитокинов, так называемый «цитокиновый шторм», является важным фактором патогенности при инфекциях, вызываемых вирусами гриппа подтипа H5N1. Поскольку регуляция большинства из этих цитокинов зависит от NF- κ B, то было поведено исследование того, может ли LG-ASA ингибировать экспрессию индуцируемых вирусами цитокинов и в результате этого оказывать косвенное влияние на патогенность указанных вирусов. Результаты проведенной ранее авторами

изобретения работы продемонстрировали, что IP10 и IFN-гамма подвергаются повышающей регуляции вирусами H5N1 (МВ1) в легких мышей. Экспрессия этого хемокина или цитокина индуцируется фактором транскрипции NF-κB. На основе полученных ранее данных можно продемонстрировать, что аспирин действует в качестве ингибитора NF-κB.

Цель данного эксперимента заключалась в том, чтобы установить, действует ли LG-ацетилсалицилат в качестве ингибитора NF-κB в легких мышей после заражения H5N1. Для этого проводили исследование того, оказывает ли обработка мышей LG-ацетилсалицилатом до и в процессе заражения МВ1 воздействие на скорость экспрессии обоих хемокинов или цитокинов. В эксперименте каждую из пяти мышей линии Balb/c обрабатывали путем i.v.-введения (100 мкл) и i.p.-введения (200 мкл) 50 мМ LG-ацетилсалицилата за один час до осуществления заражения (инфицирующая доза: 1×10^3 БОЕ/50 мкл). Последующие обработки осуществляли через 17, 24 и 42 ч после осуществления заражения. Через 48 ч после заражения (р.и.) легкие изымали и выделяли РНК. Уровень экспрессии IP10 и IFN-гамма в мышечных легких обработанных LG-ацетилсалицилатом мышей определяли с помощью количественной ОТ-ПЦР и сравнивали с уровнем экспрессии в контрольных животных. Данные представлены на фиг.9.

Уровни экспрессии IP10 и IFN-гамма в организме необработанных мышей принимали за 100% для того, чтобы иметь возможность проведения более четкого сравнения. После четырехкратной обработки LG-ацетилсалицилатом, как с помощью внутривенного, так и внутрибрюшинного пути введения, было выявлено снижение уровня экспрессии мРНК обоих хемокинов или цитокинов. При введении внутривенным путем было выявлено более выраженное снижение, составлявшее 62% для IP10 и 68% для IFN-гамма, чем в случае внутрибрюшинного введения (26% для IP10 и 50% для IFN-гамма).

Результаты свидетельствуют о том, что индуцируемая вирусом H5N1 экспрессия NF-κB-зависимых генов в легких обработанных LG-ацетилсалицилатом инфицированных мышей существенно снижалась. Этот факт является важным, поскольку избыточное производство цитокинов («цитокиновый шторм»), наблюдаемый после заражения вирусом подтипа H5N1, регуляция которых в основном зависит от NF-κB, существенным образом влияет на патогенность этих вирусов. Таким образом, LG-ASA может оказывать не только непосредственное влияние на репликацию вирусов, но также оказывать и косвенное положительное влияние путем снижения избыточного производства цитокинов.

Пример 6: Исследования переносимости

В следующем эксперименте проводили исследование переносимости LG-ацетилсалицилата после аэрозольной обработки мышей. Для того чтобы оптимальным образом наблюдать воздействие обработки, эксперимент проводили с использованием системы наблюдения за мышью. Это позволяло измерять температуру в режиме реального времени. Каждые 5 минут измеряли температуру и строили график (фиг.10А-Е). Кроме того, животных взвешивали каждый день. По окончании периода обработки мышей умерщвляли и определяли массу органов, а именно печени и селезенки. Уже при первых симптомах токсичности в отношении печени происходит увеличение печени. В отличие от этого увеличение селезенки является признаком наличия воспалительного процесса.

Для исследования переносимости в общей сложности 12 самкам мышей линии Balb/c за 3 дня до начала обработки имплантировали передатчик системы наблюдения за

мышью. Успех операции по имплантации оценивали на протяжении 3 дней. После этого 6 мышей трижды в день обрабатывали с помощью распылителя Pari, вводя каждый раз по 2 мл 50 мМ раствора LG-ацетилсалицилата. Контролями служили 6 мышей, которых обрабатывали 2 мл ЗФР. Растворы распыляли при давлении 1,5 бар, так что обработка
5 занимала примерно 10 мин. Обработки проводили ежедневно в течение 5 дней в 9:00; 12:00 и 15:00 ч.

Исследовали влияние LG-ацетилсалицилата на изменение веса. Всех мышей взвешивали ежедневно, начиная со дня обработки, и эту процедуру осуществляли перед первой обработкой (9:00 ч). Вес, измеренный в первый день обработки, принимали за
10 100%, и вес тела, измеренный в последующие дни, выражали в процентах по отношению к нему. Сравнение результатов, полученных для обеих групп обработки, представлено в виде графика на фиг.11. Из него следует, что между группой, обработанной LG-ацетилсалицилатом, и группой, обработанной ЗФР, не имелось значимых различий касательно изменений веса тела.

Кроме того, проводили исследование влияния LG-ацетилсалицилата на температуру тела. Как уже отмечалось, система наблюдения за мышью позволяла получать данные о температуре тела мыши в режиме реального времени. Поскольку мыши обладают высоким метаболизмом, то уже минимальные изменения состояния здоровья вызывают изменение температуры тела. На фиг.10 представлен график температуры тела, начиная
20 со дня -1 (за один день до обработки) (фиг.10А) до окончания периода обработки (день +4) (фиг.10Е). Не было выявлено различий между температурой тела у мышей, которых обрабатывали LG-ацетилсалицилатом, и температурой тела у контрольных животных.

И, наконец, проводили исследование влияния LG-ацетилсалицилата на массу печени и селезенки. Всех животных умерщвляли через 15 мин после последней обработки и
25 осуществляли аутопсию. После полного кровоизвлечения через полую вену проводили обследование внутренних органов. Легкие сначала обследовали через диафрагму в расправленном (наспавшемся) состоянии. Печень и селезенку взвешивали. Результаты представлены на фиг.13. Поскольку вес тела мышей в период обработки не претерпевал существенных изменений, то можно было не осуществлять стандартизацию массы
30 органов. Ни для селезенки (фиг.12А), ни для печени (фиг.12Б) не было обнаружено значимых различий между массой органов животных, которых обрабатывали LG-ацетилсалицилатом, и контрольных животных. Таким образом, после ингаляционной обработки мышей не было обнаружено признаков токсичности, которые часто сопровождаются опуханием органов. Кроме того, не было выявлено системных
35 воспалительных реакций, которые сопровождаются увеличением размеров селезенки.

В целом, результаты описанных исследований свидетельствуют о том, что введение путем ингаляции 2 мг LG-ацетилсалицилата в концентрации 50 мМ в течение 5 дней хорошо переносилось мышами.

Пример 7: Опыты на пациентах

В клиническом опыте 4 пациентам с бронхиальными инфекциями вводили раствор, содержащий LG-ASA (50:50) в концентрации вплоть до 2М, который распыляли с
40 получением частиц размером менее 5 мкм. Общие количества LG-ASA составляли вплоть до 350 мг. Ингаляционный поток регулировали до уровня, находящегося ниже 500 мл/с, в большинстве случаев ниже 300 мл/с. Вдыхаемый объем составлял по меньшей мере 30%, в большинстве случаев по меньшей мере 50% от емкости вдоха пациентов.

У трех пациентов было выявлено выраженное улучшение симптомов уже на следующий день после начала введения. У всех остальных пациентов улучшение симптомов наступало на 3-й день после начала введения. При этом субъективно

оцениваемая переносимость растворов, имеющих указанные высокие концентрации, была очень хорошей. Ни один из пациентов не сообщил о вкусовом раздражении. Не было выявлено также и позывов к кашлю.

Формула изобретения

5

1. Композиция для профилактики или лечения инфекций, вызываемых РНКвыми вирусами с отрицательной цепью, предпочтительно вирусами гриппа, прежде всего вирусами типа Н5 или Н7, содержащая соль о-ацетилсалициловой кислоты с аминокислотой, выбранной из группы, включающей лизин, аргинин, орнитин,

10

диаминомасляную кислоту и смесь указанных аминокислот,
2. Композиция по п.1, дополнительно содержащая соль о-ацетилсалициловой кислоты с глицином.

3. Композиция по п.2, в котором основная аминокислота представляет собой D-лизин, L-лизин или смесь D-лизина и L-лизина.

15

4. Композиция по любому пп.1-3, для профилактики или лечения инфекций, вызываемых вирусами гриппа А или риновирусами.

5. Композиция по любому пп.1-4, в галеновом препарате в виде жидкой водной композиции прежде всего для аэрогенного введения.

20

6. Композиция по п.5, в которой водная композиция представляет собой водный раствор соли с концентрацией, составляющей от 0,1 до 5М, прежде всего от 0,1 до 3М, предпочтительно от 1 до 3М.

7. Композиция по п.5, в которой водная композиция представляет собой водный раствор соли с концентрацией, составляющей от 0,01 до 100 мМ, прежде всего от 0,1 до 10 мМ.

25

8. Композиция по любому из пп.1-7, в котором композицию помещают в фармацевтически совместимый резервуар, снабженный пульверизатором или распылителем.

9. Композиция по п.8, в котором резервуар подготавливают для настройки ингаляционного потока на уровень, находящийся ниже 1000 мл/с, предпочтительно ниже 500 мл/с, прежде всего ниже 300 мл/с, а также вдыхаемого объема на уровень, составляющий по меньшей мере 10%, прежде всего по меньшей мере 30%, предпочтительно по меньшей мере 50% и вплоть до 95% по отношению к емкости вдоха пациента.

30

10. Способ применения аэрозольной композиции, включающей соль о-ацетилсалициловой кислоты с природной или неприродной основной аминокислотой, пропеллент и необязательно вспомогательное вещество и/или носитель для профилактики или лечения инфекций человека или животных, вызываемых РНКвыми вирусами с отрицательной цепью, предпочтительно вирусами гриппа, прежде всего вирусами типа Н5 или Н7 вирусами, при котором человеку, который подвержен риску вирусной инфекции или уже поражен указанной инфекцией, или такому животному, аэрогенно вводится путем ингаляции через нос или рот физиологически эффективное количество аэрозольной композиции.

40

11. Способ по п.10, где аэрозольная композиция содержит соль в количестве, составляющем от 0,001 до 50 мас.%, от 0,001 до 10 мас.%, прежде всего от 0,1 до 10 мас.%, или прежде всего от 10 до 50 мас.% в пересчете на общую массу препаративной формы.

45

12. Способ по п.10 или п.11, где аэрозольная композиция содержит соль в форме частиц или раствора, где величина ММАД составляет менее 10 мкм, прежде всего менее

5 МКМ.

5

10

15

20

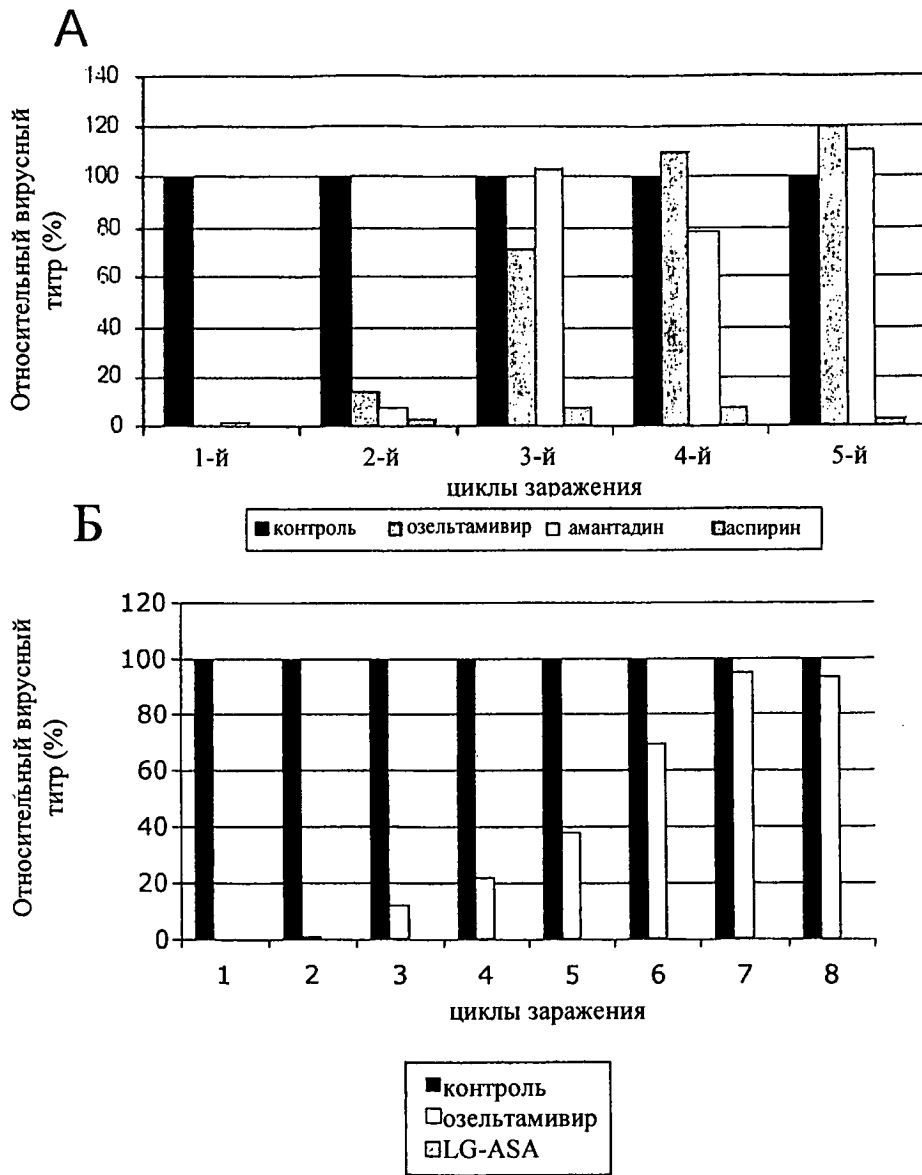
25

30

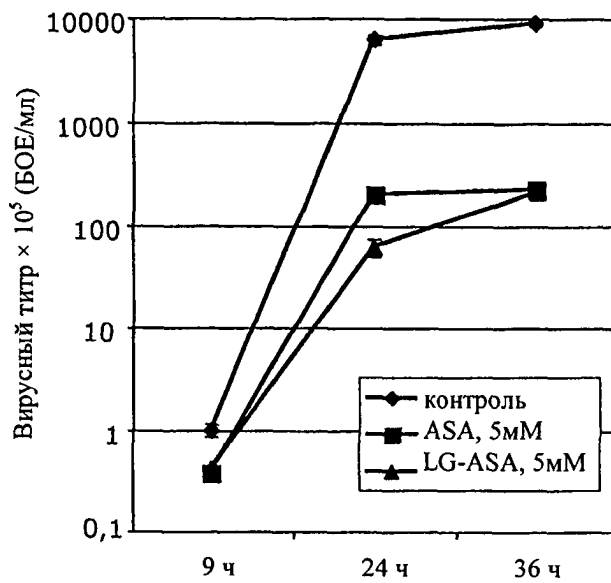
35

40

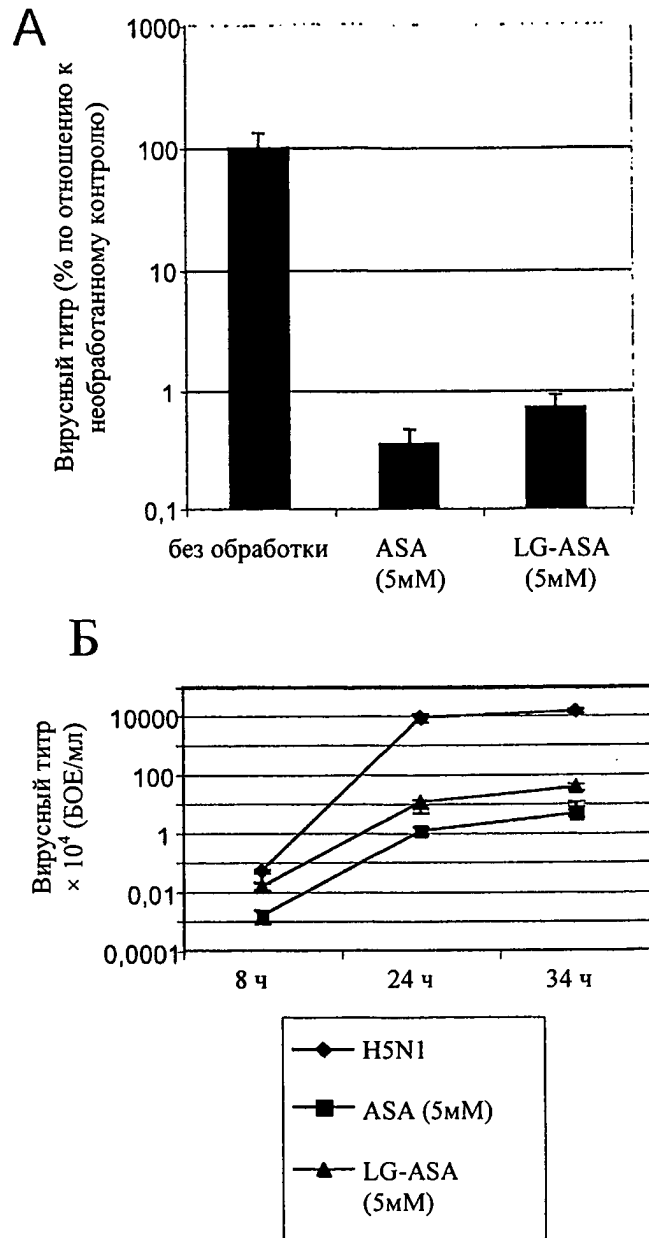
45



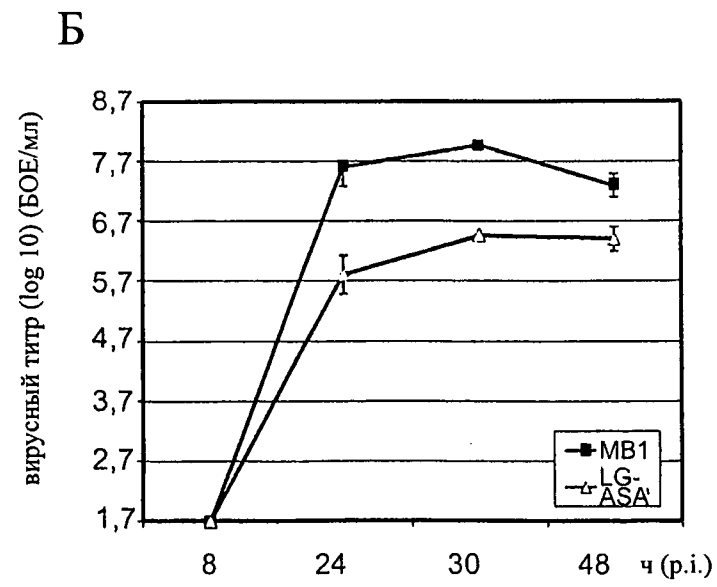
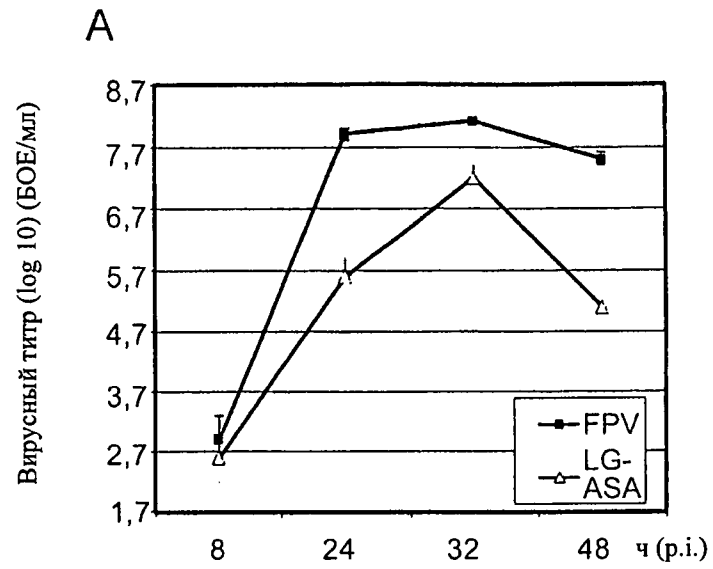
Фиг. 1



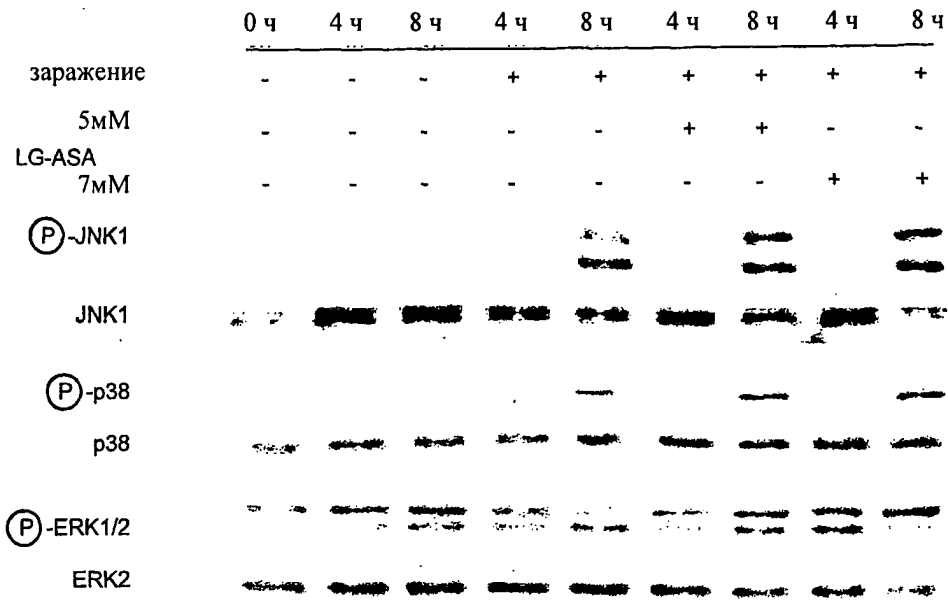
Фиг. 2



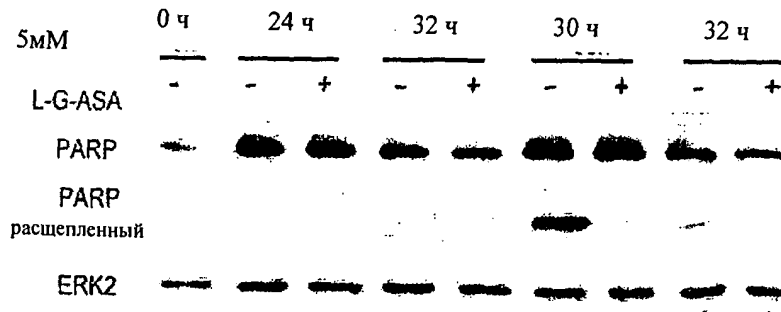
Фиг. 3



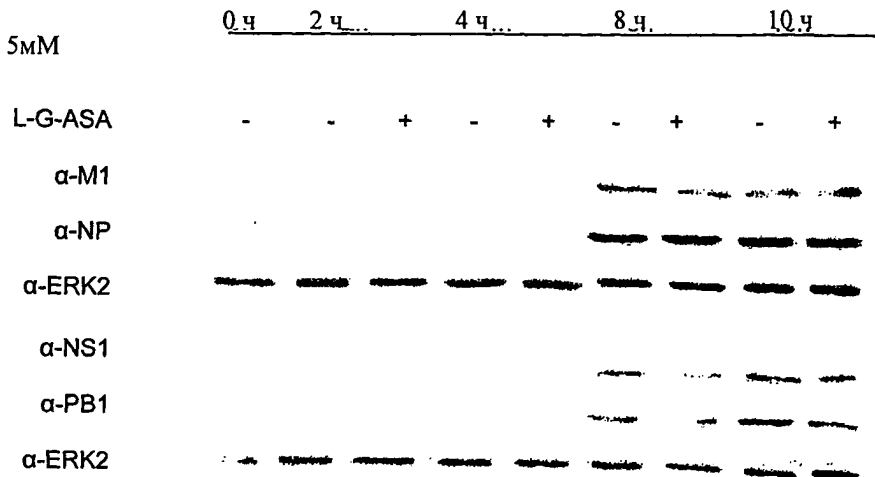
Фиг. 4



Фиг. 5



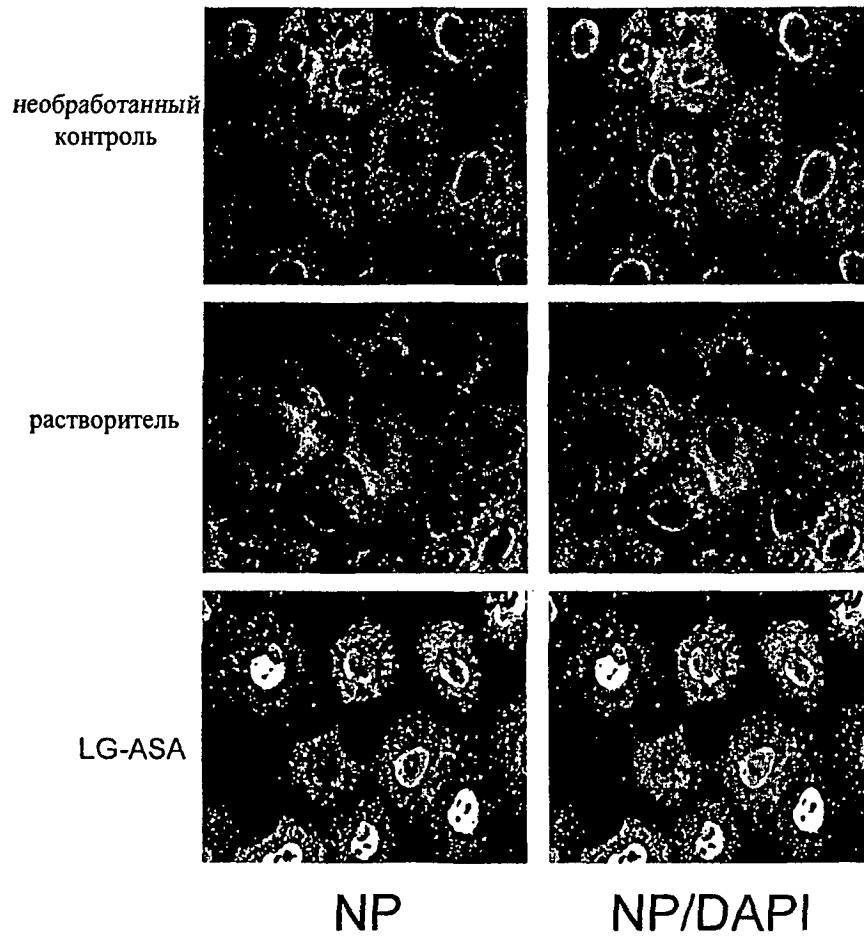
Фиг. 6



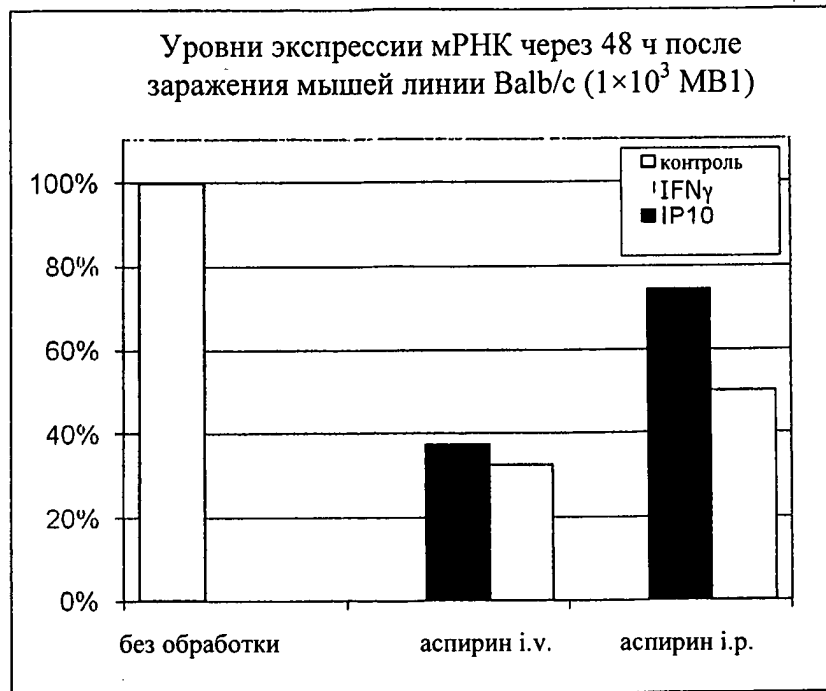
Фиг. 7

A/Thailand/KAN-1/2004 (H5N1)

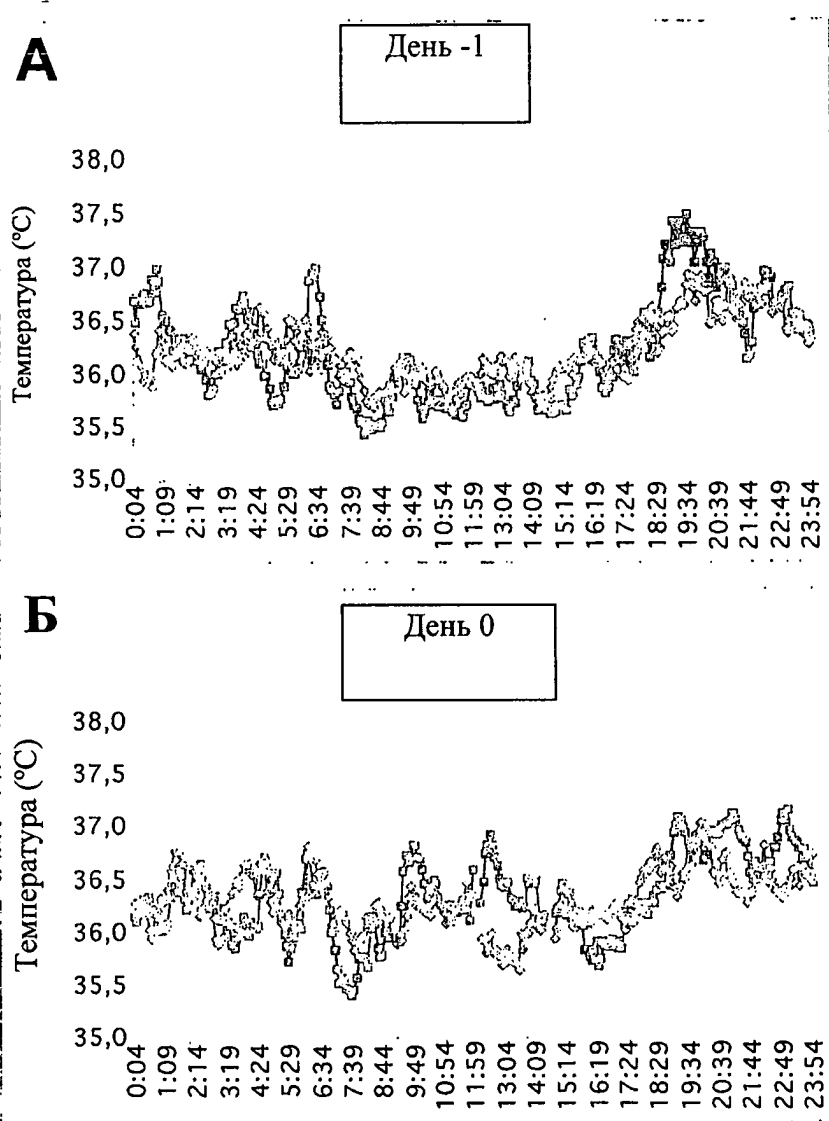
(8 ч p.i.)



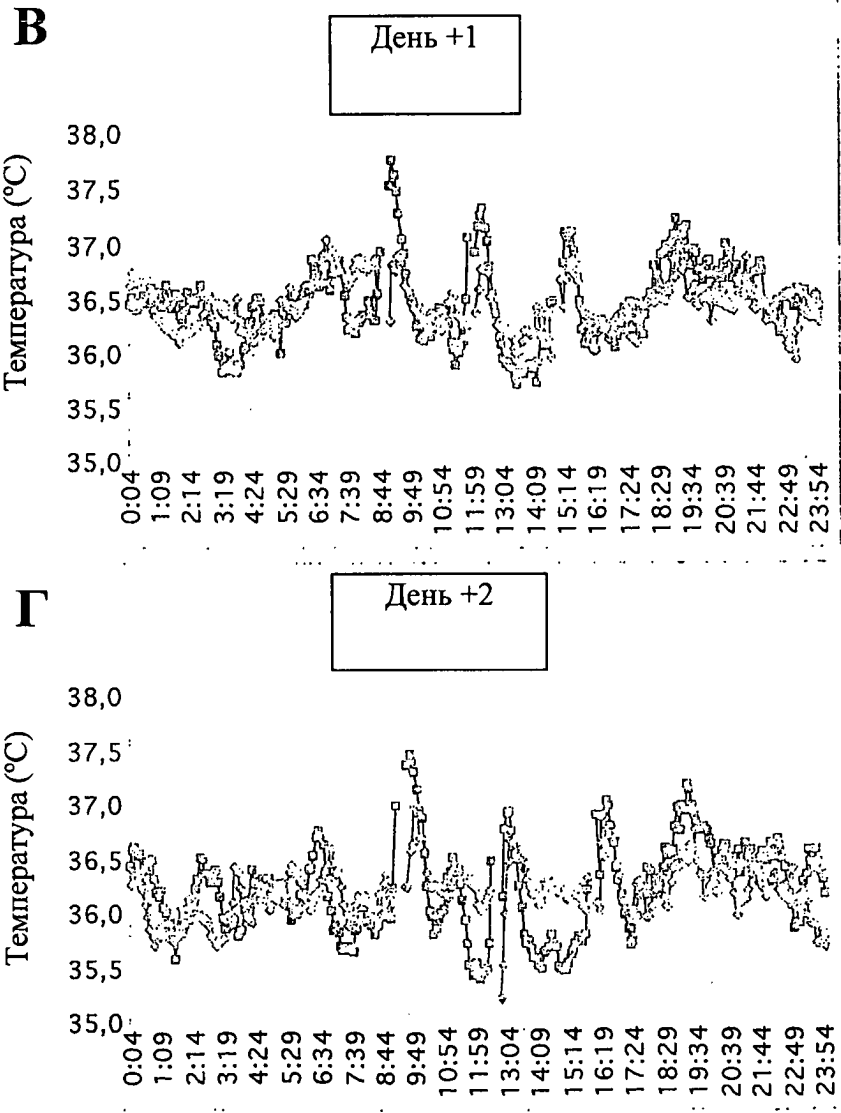
Фиг. 8



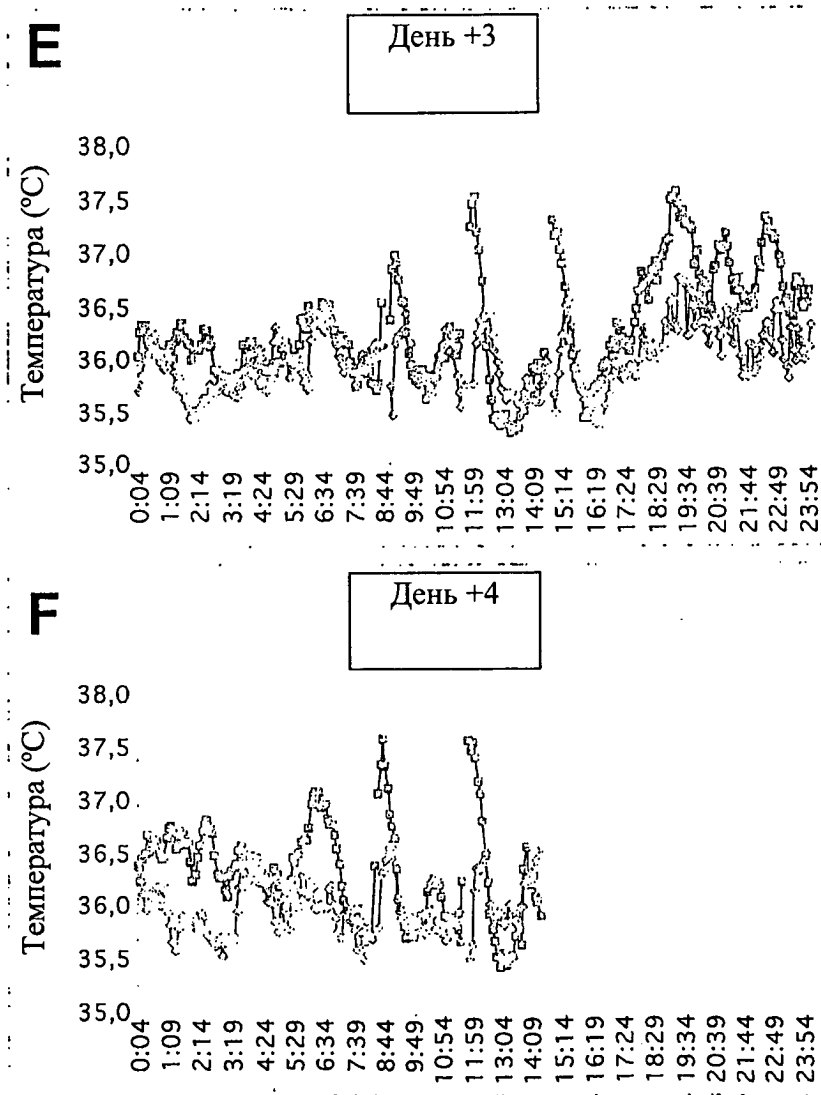
Фиг. 9



Фиг. 10

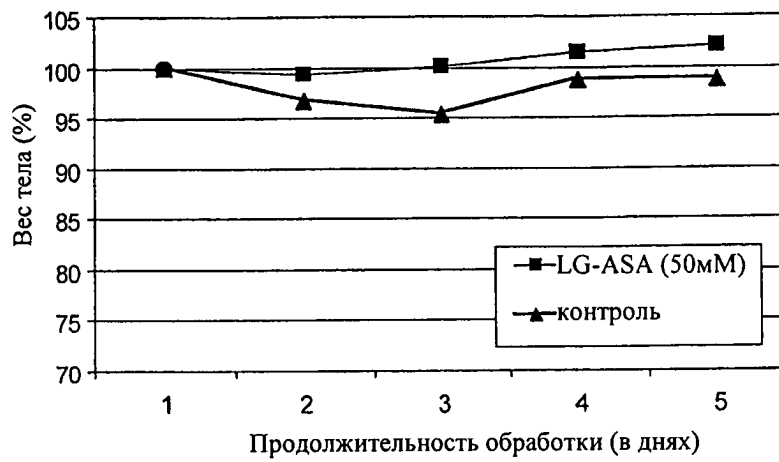


Фиг. 10 (продолжение)

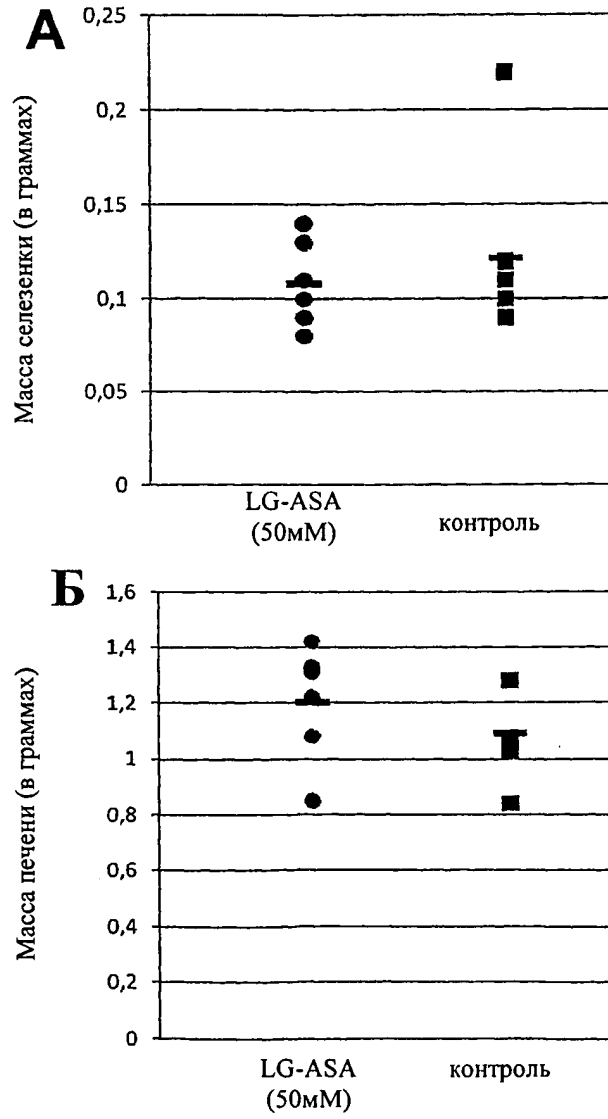


Фиг. 10 (продолжение)

LG-ASA (50мМ; ингаляция через трубку)



Фиг. 11



Фиг. 12