

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **031390**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2018.12.28

(21) Номер заявки
201491991

(22) Дата подачи заявки
2013.05.30

(51) Int. Cl. *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

(54) СИСТЕМА ДЛИТЕЛЬНОГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ГИДРОФОБНЫХ БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ АМИДА ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ

(31) PD2012A000173

(32) 2012.05.31

(33) IT

(43) 2015.03.31

(86) PCT/IB2013/054477

(87) WO 2013/179258 2013.12.05

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ФИДИА ФАРМАЧЕУТИЧИ С.П.А.
(IT)

(56) WO-A1-2006092233

BORZACCHIELLO A. ET AL.: "Effect of hyaluronic acid amide derivative on equine synovial fluid viscoelasticity", JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH, WILEY, NEW YORK, NY, US, vol. 92A, no. 3, 1 March 2010 (2010-03-01), pages 1162-1170, XP002619476, ISSN: 0021-9304, DOI: 10.1002/JBM.A.32455 [retrieved on 2009-03-25], the whole document
EP-A1-1095064

(72) Изобретатель:
**Кампизи Моника, Гуаризе Кристиан,
Реньер Давиде (IT)**

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

(57) Настоящее изобретение относится к системе длительного высвобождения биологически активных белков, содержащей: а) белок гидрофобной природы и b) амид гиалуроновой кислоты (НА), где НА, используемая для получения амида, имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне значений от 500 до 730 кДа, где указанный белок гидрофобной природы имеет индекс GRAVY не менее -0,5 и амид НА выбран из: гексадециламида НА: амид НА, полученный с использованием гексадециламина, с молярным процентом амидирования от 7 до 14%; октиламида НА: амид НА, полученный с использованием октиламина, с молярным процентом амидирования от 10 до 15%; додециламида НА: амид НА, полученный с использованием додециламина, с молярным процентом амидирования от 10 до 15%; трет-бутиламида НА: амид НА, полученный с использованием трет-бутиламина, с молярным процентом амидирования от 7 до 12%; бензиламида НА: амид НА, полученный с использованием бензиламина, с молярным процентом амидирования от 7 до 15%; и где соотношение амид гиалуроновой кислоты (НА)/белок составляет не менее 10:1. Изобретение обеспечивает длительное, замедленное по времени высвобождение, которое приводит к повышению эффективности лекарственного средства и облегчает соблюдение пациентом режима лечения.

031390 B1

031390 B1

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим специфические амиды гиалуроновой кислоты в сочетании с белками в основном гидрофобной природы, которые обладают терапевтической и/или биологической активностью, для приготовления систем длительного, замедленного высвобождения белков.

Уровень техники

Первое лекарственное средство, полученное методами генной инженерии из живой (бактериальной) системы, был инсулин, разрешенный к применению Администрацией США по контролю за использованием пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA) в 1982 г. Гормон роста человека, ранее выделенный из трупов, был также быстро получен с использованием методов рекомбинантной технологии. В 1986 г. Администрация США по контролю за использованием пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA) разрешила использование рекомбинантной человеческой вакцины против гепатита В. Промышленное получение лекарственных средств с использованием живых систем в качестве биореакторов стало распространяться, начиная с указанных выше препаратов, и в настоящее время стало предпочтительным способом для синтеза различных лекарственных средств, особенно ввиду относительно низкой стоимости такого способа получения.

Большое число белков человека, применяемых с целью их терапевтического (и не терапевтического использования), получаемые методами биоинженерии, включают эритропоэтин (для лечения анемии), интерлейкин 2 (для лечения карциномы почек), IL-1Ra (антагонист IL-1 рецептора), глюкагон, интерферон, фермент ДНКазу человека, кальцитонин и многие другие.

Указанные лекарственные средства имеют в основном белковую или полипептидную природу и обычно вводятся парентерально, поскольку их прием через рот вызывает быстрое разложение активного ингредиента. Однако парентеральное введение может вызывать проблемы с соблюдением пациентом режима лечения, поскольку для достижения терапевтической эффективности необходимы повторные введения. Указанные белки в основном характеризуются очень коротким периодом полувыведения из организма; например, в случае гормона роста человека hGH (полученного по генноинженерной технологии) требуются ежедневные инъекции. В этой связи, в целях поиска способов снижения частоты введения и повышения комфортности лечения для пациента было проведено множество экспериментов, направленных на разработку систем высвобождения белка/лекарственных средств с увеличенным периодом полувыведения из организма.

Указанные системы высвобождения должны гарантировать, что активность лекарственного средства будет поддерживаться, и, соответственно, должны гарантировать, что трехмерная структура белка/лекарственного средства останется интактной; однако стрессовые ситуации, которые могут возникать в ходе их изготовления, такие как присутствие органического растворителя и/или вариации в значениях температуры и pH, могут вызвать дезамидирование или окисление белков в цепи, что ведет к их денатурации и потере терапевтической активности.

Например, известно, что использование микросфер с PLGA (полилактидной/гликолиевой кислотой) в качестве системы высвобождения, применяемой для малых пептидов, дает прекрасные результаты (Hutchinson F.G., Biochem. Soc. Trans., 1985, 13:520-523); однако их применение с целью получения депонированного препарата с высвобождением гормона роста человека (hGH) оказалось невозможным, поскольку в этом случае денатурация белка создает проблемы, связанные с воспалением.

Длительные поиски систем высвобождения белка/лекарственного средства, которые были бы нетоксичными, но обладали неизменной эффективностью в отношении доставки активного ингредиента, привели к использованию природных полимеров при создании препаратов, которые (за счет их объединения с активным ингредиентом) вносят соответствующую модификацию в кинетику лекарственного средства, с которым их объединяют.

Гиалуроновая кислота (HA) представляет собой гетерополисахарид, состоящий из чередующихся остатков D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина. Это природный линейноцепочечный полимер с молекулярной массой от 50000 до 13×10^6 Да, которая определяется как источник, из которого она была выделена, так и методом ее получения.

Она встречается в природных условиях в перичеллюлярной жидкости, в межклеточном веществе соединительной ткани позвоночных (где она представляет один из основных компонентов), а также в синовиальной жидкости суставов, жидкости стекловидного тела и в пупочном канатике.

В этой связи, HA выполняет важную биологическую роль в жизнедеятельности живых систем за счет создания механической поддержки для клеток в различных тканях, таких как кожа, сухожилия, мышцы и хрящи.

Гиалуроновая кислота, благодаря этим присущим ей свойствам, защищает ткани от действия свободных радикалов, сдерживает воспалительные процессы и стимулирует ангиогенез и демонстрирует особую эффективность в качестве модулятора всех основных стадий в процессах заживления ран (EP 1196179).

Известно использование указанного полисахарида в качестве носителя для разного рода лекарственных средств в варианте их простого сочетания или в виде соли гиалуроновой кислоты, поскольку присущие ей свойства, такие как биосовместимость, способность к биоразложению, отсутствие иммуно-

генности, соответствующая вязкость и гидратируемость, делают ее особенно подходящей в качестве системы высвобождения для лекарственных средств и молекул, как на местном, так и на системном уровне (EP 197718, EP 445255). Указанный полисахарид исследовали также с точки зрения его применимости в качестве системы доставки для конкретных белков, таких как IL-1Ra (US 6096728), эритропоэтин (Hahn S.K. et al., *Int J Pharm.*, 2006, 28, 322:44-51), инсулин (Nomura M. et al., *J Pharm Pharmacol.*, 1994, 46:768-770), гормон роста (Kim S.J. et al., *Journal of Controlled Release*, 2005, 104:323-335), интерферон и фолликулостимулирующий гормон (US 8025900).

Во всех этих случаях сочетание лекарственного средства с полисахаридом приводило к достижению "замедленного" высвобождения доставляемого белка, но не настолько замедленного, чтобы можно было снизить количество инъекций лекарственного средства.

НА представляет собой полностью натуральный полисахарид, который быстро разлагается ферментами, присутствующими в организме (гиалуронидаза), относительно быстро высвобождая лекарственное средство, с которым она была объединена. По этим причинам карбоксильные и гидроксильные группы в НА были химически модифицированы для получения шитых производных (US 4582865; US 4713448; US 5676964; US 495774; US 5827937) или дериватизированы с использованием других природных или синтетических полимеров или молекул с иными размерами и физико-химическими характеристиками (US 4851521); однако способы получения указанных производных зачастую затрагивают целостность доставляемого фармакологического агента.

Описание изобретения

Настоящее изобретение относится к новым системам высвобождения, содержащим специфические амиды гиалуроновой кислоты в сочетании с терапевтически и/или биологически активными белками, в основном гидрофобной природы, для целей пролонгированного, замедленного высвобождения в течение длительного периода времени, которые повышают эффективность лекарственного средства и облегчают соблюдение пациентом режима лечения.

Ниже приведено несколько примеров терапевтически и/или биологически активных белков, в основном гидрофобной природы, согласно настоящему изобретению:

Инсулин представляет собой белковый гормон с анаболическими свойствами, продуцируемый бета-клетками в островках Лангерганса в поджелудочной железе; он состоит из двух цепей, соединенных двумя сульфидными мостиками. Хорошо известная функция этого гормона заключается в регуляции уровня глюкозы в крови. В этой связи, данный белок применяется для лечения диабета типа 1 или типа 2, когда имеется очень слабая продукция инсулина или она вообще отсутствует. Указанный гормон вводится путем подкожной инъекции (поскольку, если его инъектировать непосредственно в кровоток, всасывание лекарственного средства происходит слишком быстро, что может привести к гипогликемии). Терапевтический подход основан на результатах тестов, проводимых в течение дня самим пациентом, с последующим введением инсулина в виде определенных, отмеренных доз (3 или более).

Гормон роста (GH) представляет собой пептидный гормон передней доли гипофиза, состоящий из 191 аминокислоты и имеющий массу 22005 Да. Основной функцией этого гормона является стимуляция развития тела человека (и многих других позвоночных организмов) за счет усиления роста и митотического деления клеток практически во всех тканях организма (в частности, он стимулирует рост костей, хрящей и соединительной ткани).

В детском возрасте гипосекреция GH вызывает развитие гипофизарной карликовости, тогда как гиперсекреция вызывает гипофизарный гигантизм. Если гиперсекреция начинается после завершения периода роста, что в основном связано с опухолевым процессом, развивается акромегалия, при которой происходит значительное расширение костей лица, рук и ног.

В этой связи, он применяется пациентами, которые либо находятся еще в фазе роста, либо взрослыми, у которых имеются опухоли гипофиза.

GH применяется также для лечения расстройств, которые не связаны с дефицитом GH, таких как синдром Тернера, хроническая болезнь почек, ISS (идиопатическая низкорослость) и рассеянный склероз, а также для усиления потери веса у пациентов с ожирением, при фибромиалгии, при болезни Крона и язвенном колите.

В последнее время были получены прекрасные результаты при оценке внутрисуставного введения hGH в процессе лечения остеоартрита (ОА), где была продемонстрирована эффективность данного гормона по восстановлению повреждения хрящевой ткани, вызванного ОА (EP1153607; Kim S.B. et al., *J Korean Med Sci.*, 2010, 25:776-80).

Кальцитонин (СТ) представляет собой гормон, содержащий в своем составе полипептид из 32 аминокислот, который продуцируется в организме человека парафолликулярными клетками (которые известны также как С-клетки) щитовидной железы. Основной функцией кальцитонина является снижение концентрации кальция в крови за счет противодействия эффектам гормона паращитовидной железы паратгормона. Этот механизм регуляции был обнаружен у рыб, рептилий, птиц и млекопитающих. Гормон кальцитонин также действует на уровне почек, стимулируя элиминацию кальция через каналцы. Кальцитонин из лосося (sCT) обычно используют для лечения остеопороза, гиперкальциемии, метастазов костей и болезни Педжета.

И снова, полученные недавно экспериментальные данные продемонстрировали эффективность кальцитонина при лечении остеоартрита: его введение защищает поверхности суставов от эрозии, вызываемой ОА (Manicourt D.H. et al., *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2005, 5(3):285-293).

IL-1Ra представляет собой антагонист рецептора цитокина IL-1, мощного индуктора местных и системных воспалительных процессов. IL-1 в основном продуцируется В- и Т-лимфоцитами и макрофагами после бактериальной стимуляции или стимуляции другими цитокинами; он также секретируется альвеолярными макрофагами, эндотелиальными, эпителиальными и гладкомышечными клетками, фибробластами, остеокластами, синовиоцитами и клетками разных других типов. IL-1 вовлекается в развитие особенно серьезных расстройств, таких как псориаз и септический шок, а также в патогенез некоторых типов опухолей. В сочетании с другими цитокинами, IL-1 входит в число основных медиаторов воспалительных процессов и, таким образом, вовлекается в развитие множества расстройств и заболеваний, таких как остеопороз, ревматоидный артрит (РА), псориатический артрит и остеоартрит (ОА): примечательно, в этой связи, что большие количества IL-1 были обнаружены в синовиальной жидкости пациентов с ревматоидным артритом и/или остеоартритом.

Экспрессия IL-1 представляет собой важнейший фактор в патогенезе ОА, поскольку IL-1 стимулирует синтез, секрецию и активацию металлопротеаз (ММР), ферментов протеазного действия, продуцируемых хондроцитами, которые отвечают за деградацию хрящевого матрикса.

Все экспериментальные данные, относящиеся к процессу развития ОА, согласуются с представлениями о том, что IL-1 и TNF α составляют основную катаболическую систему, вовлекаемую в деструкцию ткани суставов; так, было показано, что блокирование продукции и/или активации IL-1 предотвращает или ослабляет деструкцию суставного матрикса (Caron J.P. et al., *Arthritis Rheum*, 1996, 39:1535-1544).

В настоящее время используются новые лекарственные средства, содержащие антагонист рецептора IL-1Ra, для целей противодействия эффектам этого цитокина, поскольку было показано, что блокирование этого рецептора представляет собой эффективный способ лечения заболеваний и расстройств, в патогенез которых вовлекается IL-1 (Burger D. et al., *Cytokine Reference*, Oppenheim J.J. and Feldmann M., Eds. New York, London, Academic Press, 2000, p. 31-336; Jiang Y. et al., *Arthritis Rheum*, 2000, 43 (5):1001-9).

IL-1Ra представляет собой белок, который действует как ингибитор указанного интерлейкина; однако лекарственные средства, содержащие IL-1Ra (такие как Кинерет® (Kineret®, основанный на анакире, рекомбинантной, негликозилированной форме человеческого белка IL-1Ra), имеют очень короткий период полувыведения из организма, который зачастую усложняет трактовку клинического результата. В этой связи, важно создать новую фармацевтическую композицию, содержащую IL-1Ra, подходящую для доставки лекарственного средства в пролонгированном, замедленном режиме, которая бы обеспечивала более длительный период полувыведения из организма и гарантировала получение консолидированных клинических результатов.

Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) представляет собой гликопротеин, содержащий в своем составе 174-180 аминокислот, который стимулирует продукцию в костном мозге гранулоцитов и стволовых клеток, которые затем высвобождаются в кровоток. Этот ростовой фактор проявляет активность в качестве нейротропина и, в этой связи, в настоящее время исследуется с целью оценки возможностей его применения при лечении церебральной ишемии и амиотрофического бокового склероза. Обычно он используется при лечении онкологических больных, для ослабления нейтропении, ассоциированной с проведением химиотерапии; и, наконец, результаты последних экспериментальных исследований показали, что внутривенное введение G-CSF способствует регенерации поврежденных клеток сердца.

Фактор роста тромбоцитов (PDGF) представляет собой биологически активный белок, включающий димер, состоящий из двух полипептидов, соединенных дисульфидным мостиком, обозначаемых как А и В. Он синтезируется, главным образом, в мегакариоцитах, и у людей представляет основной митогенный агент в сыворотке крови для клеток мезенхимального происхождения. Он используется для ускорения заживления ран/язвенных поражений, поскольку действует как медиатор образования соединительной ткани стромы, и, в этой связи, в настоящее время используется также как средство, способствующее образованию новой костной ткани.

Трансформирующий фактор роста- β (TGF β) представляет собой пептид, который играет важнейшую роль в регуляции иммунной системы и в регенерации тканей, дифференцировке клеток и эмбриогенезе. Он используется в основном как ранозаживляющий агент, поскольку способен усиливать заживление ран/язвенных поражений кожи, а также способствует срастанию костных переломов; по этим причинам он также применяется при лечении остеопороза и ОА. И, наконец, результаты проведенных экспериментов показывают, что TGF β также обладает кардиопротекторными свойствами, важными для сердца после ишемического повреждения.

Эпидермальный фактор роста (EGF) представляет собой фактор роста, который играет важную роль в регуляции роста, пролиферации и дифференцировке клеток. Человеческий EGF представляет собой

белок массой 6045 Да, состоящий из 53 аминокислотных остатков и трех внутримолекулярных дисульфидных мостиков. Он обнаружен в тромбоцитах, макрофагах, моче, слюне, молоке и плазме.

Это белок, применяемый в качестве гастропротекторного средства, поскольку стимулирует пролиферацию клеток слизистой желудочно-кишечного тракта; он используется для усиления регенерации тканей кожи, в связи с тем, что способен стимулировать образование новой грануляционной ткани при лечении ран/язвенных поражений кожи, вен и других типов ран/язвенных поражений. И, наконец, местное применение EGF дает прекрасные результаты по регенерации поврежденной роговицы, например, после хирургического вмешательства на роговице или в случае дегенеративных расстройств, таких как кератит.

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF-B) представляет собой белковый фактор роста, вовлекаемый в процессы васкулогенеза (а именно его пово образование системы кровообращения на эмбриональной стадии), нейрогенеза и ангиогенеза. Он также представляет собой нейротрофический агент, который защищает нейроны от NMDA-опосредованного ишемического повреждения.

Эритропоэтин (EPO) представляет собой гликопротеиновый гормон, продуцируемый в организме человека почками, и, в меньших количествах, печенью и головным мозгом, основной функцией которого является регуляция эритропоэза (продукция эритроцитов костным мозгом).

EPO был также получен в лабораторных условиях и использовался в качестве лекарственного средства при лечении анемии у пациентов с заболеванием почек или нарушениями в системе кроветворения, а также для ускорения восстановления после проведения химиотерапии у больных раком. По данным проведенных недавно исследований, EPO также выполняет определенную нейротрофическую функцию, действуя как противовоспалительный агент.

Эритропоэтин представляет собой молекулу гликопротеина массой примерно 30000 Да. И, наконец, начиная с 1989 г., EPO стал доступен в виде лекарственного препарата для больных с анемией, подвергающихся диализу. Позже его применение распространили на пациентов с хронической почечной недостаточностью, проходящих консервативное лечение, поскольку этот препарат помогает улучшить качество жизни у этих больных. Получение фармацевтического средства на основе эритропоэтина основано на методе рекомбинантных ДНК.

Фактор роста нервных клеток (NGF) представляет собой белок, секретируемый в гипоталамус из щитовидной железы и гипофиза; он также продуцируется гладкомышечными клетками и фибробластами. Активной формой является NGFβ массой 26 кДа, гомодимер с двумя дисульфидными мостиками, которые соединяют две белковых цепи из 118 аминокислот. Он отвечает за дифференцировку и функциональную активность нейронов в периферической нервной системе и холинэргических нейронов в ЦНС. В этой связи, он применяется при лечении нейродегенеративных расстройств и заболеваний, таких как деменция; кроме того, было показано, что NGF полезен при лечении глаукомы.

Трансферрин представляет собой основной белок-переносчик железа в кровотоке. Трансферрин, синтезируемый в печени и моноцитарно-макрофагальной системе, связывает достаточно стабильно, хотя и обратимо, железо, поглощенное в кишечнике, а также железо, образуемое при разрушении эритроцитов, и переносит его в сайты последующего использования (в частности, в костный мозг) и в сайты его отложения (в частности, в печень).

С точки зрения структуры, это гликопротеин, сформированный на основе полипептидной цепи из 679 аминокислот с молекулярной массой примерно 80 кДа, который содержит два сайта связывания ионов трехвалентного железа (Fe^{3+}), однако здесь отсутствует аффинность для ионов двухвалентного железа (Fe^{2+}); период его полувыведения составляет примерно 8 дней.

Трансферрин в основном синтезируется в печени и стандартные значения его содержания в крови укладываются в диапазон 200-360 мг/дл. Уровни трансферрина в крови возрастают при использовании контрацептивных средств, во время беременности, а также при недостаточности железа. И наоборот, эти уровни падают в случае нефротического синдрома, болезни печени, нарушения питания, хронических воспалительных заболеваний, опухолей, и при лечении с использованием железа или кортизона. Физиологическое снижение может наблюдаться в неонатальном периоде и в пожилом возрасте.

ТИМР представляют собой белки, которые ингибируют металлопротеазы, т.е. ферменты, вовлекаемые в разложение хрящевого матрикса; семейство белков ТИМР включает следующие формы: ТИМР-2, ТИМР-3 и ТИМР-4, продуцируемые хондроцитами, фибробластами, синовиоцитами, остеобластами, нейронами, макрофагами, гладкомышечными клетками, гепатоцитами и т.п.

В этой связи, они выполняют защитную функцию в отношении действия хондроцитов и эрозии хряща, вызываемой ОА.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к новым фармацевтическим композициям, содержащим специфические амиды гиалуроновой кислоты в сочетании (т.е. не связанные химически) с белками, в основном гидрофобной природы, которые обладают терапевтической и/или биологической активностью, для получения систем длительного, замедленного высвобождения белка.

Системы по настоящему изобретению вызывают

Пролонгированное высвобождение указанного белка в течение увеличенного по длительности пе-

риода времени (в сравнении с тем же белком, вводимым "в исходном виде"). Такой режим непрерывного высвобождения усиливает терапевтическое окно лекарственного средства, поскольку оно не высвобождается в больших количествах в период времени непосредственно после введения (что обычно имеет место в том случае, когда лекарственные средства вводятся "в исходном виде"). Введение в виде системы высвобождения в сочетании с определенными амидами НА модулирует высвобождаемое количество (по временным параметрам) и период высвобождения лекарственного средства (при этом достигается постепенное повышение количества высвобождаемого со временем белка, так что конечный период высвобождения превышает таковой, который имеет место в случае введения "в исходном виде"); таким образом, можно сделать вывод о том, что профиль кинетики высвобождения белка существенно модифицируется, при сохранении профиля его терапевтической эффективности.

Новая система высвобождения является нетоксичной, поскольку характеризуется такими свойствами, как биосовместимость и биodeградируемость, и определяет замедленное высвобождение переносимого белка/лекарственного средства, что гарантирует поддержание терапевтической активности; при этом сохраняется целостность трехмерной структуры активного ингредиента, который не подвергается каким-либо денатурирующим изменениям.

Система высвобождения по настоящему изобретению не создает каких-либо химических модификаций в переносимом белке, поскольку она получена за счет сочетания определенных амидов НА и переносимых белков, которые объединены в виде смеси. Соответственно, здесь не устанавливаются ковалентные химические связи между носителем и лекарственным средством, что гарантирует поддержание структурной целостности белка/лекарственного средства.

Указанные новые характеристики полученного продукта повышают комфортность терапии для пациентов, способствуя соблюдению нужного режима лечения, поскольку данное лекарственное средство может вводиться согласно показателям новой фармакокинетики, и, соответственно, здесь могут использоваться другие дозы: так, будут применяться более длинные интервалы между инъекциями и внесены соответствующие изменения в количество вводимого лекарственного средства, что приведет к повышению эффективности лечения и к снижению побочных реакций.

Фармакологически и/или биологически активные белки, рассматриваемые в контексте настоящего изобретения, должны обладать преимущественно гидрофобными характеристиками, оценка которых проводится по индексу GRAVY (Grand Average of Hydropathy); указанный индекс GRAVY представляет собой величину, характеризующую пептид или белок, которая рассчитывается как сумма показателей гидрофобности всех аминокислот, входящих в данный белок, которую делят на число остатков в белковой последовательности. Каждая аминокислота характеризуется определенным индексом гидрофобности, значения которого варьируют от 4,5 для изолейцина (аминокислоты с остатком, образованным ароматическим углеводородным радикалом, который придает молекуле явные неполярные свойства и соответственно гидрофобный характер) до -4,5 в случае аргинина, аминокислоты с положительно заряженным остатком (Kyte J. et al., J. Mol. Biol., 1982, 157:105-132). Данная шкала показывает, что чем выше индекс гидрофобности, тем выше гидрофобность анализируемой аминокислоты (фиг. 1). Для целей облегчения оценки индекса GRAVY у анализируемого белка обычно используют программу ProtParam (Gasteiger E. et al., Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, JM Walker ed., The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press, 2005, 571-607), которая дает информацию обо всех физико-химических характеристиках исследуемых белков путем анализа их последовательностей; когда вводится та или иная аминокислотная последовательность, программа рассчитывает показатель GRAVY для белка, степень гидрофобности которого нужно определить.

Согласно настоящему изобретению фраза "белки преимущественно гидрофобной природы" обозначает такие белки, которые характеризуются индексом GRAVY в диапазоне значений от не менее -0,5 до положительных значений: и здесь вновь следует отметить, что чем выше индекс GRAVY, тем выше гидрофобность анализируемого белка.

Ниже приведено несколько примеров белков преимущественно гидрофобной природы, которые входят в область настоящего изобретения:

Инсулин: индекс GRAVY=0,2

Гормон роста человека, hGH: индекс GRAVY=-0,3

Кальцитонин, sCT (CT из лосося): индекс GRAVY=-0,5

IL-1, антагонист рецептора IL-1Ra: индекс GRAVY=-0,4

Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, G-CSF: индекс GRAVY=0,2

Фактор роста тромбоцитов, PDGF: индекс GRAVY=-0,5, предпочтителен PDGF-BB с индексом GRAVY=-0,1

Трансформирующий фактор роста TGF-β: индекс GRAVY=-0,3

Эпидермальный фактор роста, EGF: индекс GRAVY=-0,5

Фактор роста эндотелия сосудов B, VEGF-B: индекс GRAVY=-0,2

Эритропоэтин (человеческий) или EPO: индекс GRAVY=-0,03

Фактор роста нервных клеток или NGFβ: индекс GRAVY=-0,3

Трансферрин (человеческий): индекс GRAVY=-0,2

Тканевой ингибитор металлопротеиназы-2 (человеческий), TIMP-2: индекс GRAVY=-0,2

Тканевой ингибитор металлопротеиназы-3 (человеческий), TIMP-3: индекс GRAVY=-0,3

Тканевой ингибитор металлопротеиназы-4 (человеческий), TIMP-4: индекс GRAVY=-0,18.

Автор настоящего изобретения показал, что амиды гиалуроновой кислоты по настоящему изобретению, приведенные ниже, создают систему высвобождения, которая характеризуется длительным, замедленным высвобождением белков гидрофобной природы, которые в ней содержатся, тогда как белки преимущественно гидрофильной природы, если их объединять с теми же самыми амидами, не создают систему высвобождения, подходящую для их длительного, замедленного по времени высвобождения.

Амиды НА, подходящие для создания указанной системы высвобождения по настоящему изобретению, приведены ниже.

Гексадециламид НА: амид НА на основе гексадециламина, характеризующийся молярным процентом амидирования (определяемым по методу ^1H -ЯМР) в диапазоне значений от 7 до 14%, предпочтительно от 8 до 9%;

Октиламид НА: амид НА на основе октиламина, характеризующийся молярным процентом амидирования (определяемым по методу ^1H -ЯМР) в диапазоне значений от 10 до 15%, предпочтительно от 10 до 11%;

Додециламид НА: амид НА на основе додециламина, характеризующийся молярным процентом амидирования (определяемым по методу ^1H -ЯМР) в диапазоне значений от 10 до 15%, предпочтительно от 10 до 11%;

трет-Бутиламид НА: амид НА на основе трет-бутиламина, характеризующийся молярным процентом амидирования (определяемым по методу ^1H -ЯМР) в диапазоне значений от 7 до 12%, предпочтительно от 7 до 8%;

Бензиламид НА: амид НА на основе бензиламина, характеризующийся молярным процентом амидирования (определяемым по методу ^1H -ЯМР) в диапазоне значений от 7 до 15%, предпочтительно от 8 до 9%.

Гиалуроновая кислота (НА), используемая в настоящем изобретении для формирования указанных амидов, может быть получена из любого источника, например, путем экстракции из морского петушка (EP 138572) или путем ферментации (например, с использованием *Streptococcus equi*, как это известно специалистам в данной области), или с использованием соответствующего технологического процесса (например, из *Bacillus*, WO 2012/032154), со средней молекулярной массой (определяемой по методу оценки предельного показателя вязкости: Terbojevich et al., Carbohydrate Research, 1986, 149:363-377) в диапазоне значений от 400 до 3×10^6 Да, предпочтительно от 50 до 730 кДа, от 750 до 1230 кДа или от 1500 до 2500 кДа и еще более предпочтительно от 150 до 250 кДа и/или от 500 до 730 кДа.

Предпочтителен гексадециламид НА со средним значением молекулярной массы от 150 до 250 кДа или от 500 до 730 кДа.

Перечисленные выше амиды НА по настоящему изобретению могут быть получены по процедуре, описанной в EP 1095064, где также приводятся различные варианты их применения, включая создания систем высвобождения для фармакологически активных веществ, но при этом не проводится разграничение между химическими видами используемых лекарственных средств и типом выбранного амида, и кроме того, там не описывается полученный при этом эффект. Однако в настоящем изобретении показано, что определенные амиды НА, такие как гексадециламид, октиламид, додециламид, трет-бутиламид и бензиламид, характеризующиеся определенным уровнем амидирования и значением М.М. в определенном диапазоне значений, в сочетании с белками преимущественно гидрофобной природы (и имеющие, в этой связи, индекс GRAVY выше -0,5), которые являются терапевтически и/или биологически активными, могут применяться для создания новой системы длительного, замедленного высвобождения указанных белков.

Предпочтительны следующие, приведенные ниже белки:

Инсулин

hGH

sCT

IL-1Ra

G-CSF

PDGF, предпочтительно PDGF-BB

TGF- β

EGF

VEGF-B

EPO

NGF β

Трансферрин

TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4.

Указанные белки могут быть получены с использованием технологии рекомбинатных ДНК или путем экстракции из ткани.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к новым системам высвобождения, содержащим:

- 1) гексадециламид, октиламид, додециламид, трет-бутиламид или бензиламид НА, в сочетании с
- 2) инсулином, hGH, sCT, IL-1Ra, G-CSF, PDGF, предпочтительно PDGF-BB, TGF- β , EGF, VEGF-B, EPO, NGF β , трансферрином, TIMP-2, TIMP-3 и TIMP-4, а также, возможно, в сочетании со стабилизаторами (при необходимости) и эксципиентами.

В частности, настоящее изобретение относится к системе, содержащей:

1) гексадециламид НА, предпочтительно гексадециламид НА с молекулярной массой в диапазоне значений от 150 до 250 кДа или от 500 до 730 кДа.

2) hGH или sCT, возможно, в сочетании со стабилизаторами и эксципиентами.

Новые системы применимы в режиме длительного, замедленного высвобождения активных агентов, которые они содержат, поскольку они изменяют терапевтическое окно объединенного с ними белка/лекарственного средства: в этой связи, можно использовать другие схемы дозирования, что будет облегчать соблюдение пациентом режима лечения.

Белки, содержащиеся в рассматриваемой системе высвобождения, будут определять вариант применения такой системы. Так, например, система высвобождения, содержащая гексадециламид гиалуроновой кислоты в сочетании с hGH или sCT, предпочтительно будет использоваться в варианте внутрисуставного введения при лечении ОА, ревматоидного артрита, псориатического артрита и остеопороза.

Автор настоящего изобретения показал, что рассматриваемая новая система высвобождения определяет непрерывный характер высвобождения hGH в синовиальной жидкости подлежащего лечению сустава, что повышает его терапевтический эффект, при том, что данный активный агент не проходит в плазму (что снижало бы концентрацию в суставе), предупреждая, таким образом, появление системных побочных реакций, вызываемых лекарственным средством.

Настоящее изобретение также относится к системе длительного высвобождения биологически активных белков, содержащей:

а) белок гидрофобной природы и

б) амид гиалуроновой кислоты (НА), где НА, используемая для получения амида, имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне значений от 500 до 730 кДа,

где указанный белок гидрофобной природы имеет индекс GRAVY не менее -0,5 и амид НА выбран из

гексадециламида НА: амид НА, полученный с использованием гексадециламина, с молярным процентом амидирования от 7 до 14%;

октиламида НА: амид НА, полученный с использованием октиламина, с молярным процентом амидирования от 10 до 15%;

додециламида НА: амид НА, полученный с использованием додециламина, с молярным процентом амидирования от 10 до 15%;

трет-бутиламида НА: амид НА, полученный с использованием трет-бутиламина, с молярным процентом амидирования от 7 до 12%;

бензиламида НА: амид НА, полученный с использованием бензиламина, с молярным процентом амидирования от 7 до 15%;

и где соотношение амид гиалуроновой кислоты (НА)/белок составляет не менее 10:1.

Предпочтительно указанные биологически активные белки гидрофобной природы представляют собой инсулин, hGH, sCT, IL-1Ra, G-CSF или PDGF.

В другом варианте осуществления изобретения, указанные биологически активные белки гидрофобной природы представляют собой PDGF-BB, TGF- β , EGF, VEGF-B, EPO, NGF β , трансферрин, TIMP-2, TIMP-3 или TIMP-4.

В системе длительного высвобождения белков согласно изобретению, указанный амид НА может представлять собой гексадециламид.

В предпочтительных вариантах осуществления, указанный биологически активный белок представляет собой hGH, sCT или инсулин.

В других вариантах осуществления, указанный биологически активный белок представляет собой PDGF, ингибитор металлопротеазы TIMP-2, TIMP-3 или TIMP-4.

Далее, указанный амид НА в системе длительного высвобождения белков по изобретению может быть выбран из следующих:

гексадециламида НА: амид НА, полученный с использованием гексадециламина, с молярным процентом амидирования от 8 до 9%;

октиламида НА: амид НА, полученный с использованием октиламина, с молярным процентом амидирования от 10 до 11%;

додециламида НА: амид НА, полученный с использованием додециламина, с молярным процентом

амидирования от 10 до 11%;

трет-бутиламида НА: амид НА, полученный с использованием трет-бутиламина, с молярным процентом амидирования от 7 до 8%;

бензиламида НА: амид НА, полученный с использованием бензиламина, с молярным процентом амидирования от 8 до 9%.

Согласно изобретению указанные биологически активные белки гидрофобной природы могут представлять собой PDGF-BB, TGF- β , EGF или VEGF-B.

Система длительного высвобождения белков по изобретению дополнительно может содержать стабилизаторы и эксципиенты.

Изобретение также относится к применению амида гиалуроновой кислоты (НА) для создания вышеуказанной системы, где указанный белок гидрофобной природы имеет индекс GRAVY не менее -0,5 и где указанный амид НА выбран из:

а) гексадециламида НА: амид НА, полученный с использованием гексадециламина, с молярным процентом амидирования от 7 до 14%;

б) октиламида НА: амид НА, полученный с использованием октиламина, с молярным процентом амидирования от 10 до 15%;

с) додециламида НА: амид НА, полученный с использованием додециламина, с молярным процентом амидирования от 10 до 15%;

д) трет-бутиламида НА: амид НА, полученный с использованием трет-бутиламина, с молярным процентом амидирования от 7 до 12%;

е) бензиламида НА: амид НА, полученный с использованием бензиламина, с молярным процентом амидирования от 7 до 15%;

где НА, используемая для получения амидов, имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне значений от 500 до 730 кДа

и где соотношение амид гиалуроновой кислоты (НА)/белок составляет не менее 10:1.

В соответствии с данным применением, указанные биологически активные белки гидрофобной природы могут включать инсулин, hGH, sCT, IL-1Ra, G-CSF и PDGF.

В другом варианте осуществления изобретения, указанные биологически активные белки представляют собой PDGF-BB, TGF- β , EGF, VEGF-B, EPO, NGF β , трансферрин, TIMP-2, TIMP-3 и TIMP-4.

Указанный амид НА может представлять собой гексадециламид.

Биологически активный белок согласно изобретению также может представлять собой hGH или sCT.

Кроме того, изобретение относится к применению данной системы для внутрисуставного лечения остеоартрита, ревматоидного артрита или псориатического артрита, и/или остеопороза.

Далее, изобретение включает применение данной системы для лечения повреждения суставов, вызванного остеоартритом, лечения тендинита, восстановления поражения сердечной мышцы, восстановления костных переломов/полостей или лечения язвенных поражений/ран/повреждений кожи посредством инъекций, внутрисуставного или местного введения, или перорального введения.

Согласно вышеприведенному применению, биологически активный белок может представлять собой ингибитор металлопротеазы TIMP-2, TIMP-3 или TIMP-4, для инъекционного или внутрисуставного лечения повреждения хрящевой ткани сустава, вызванного остеоартритом, и/или для восстановления остеохондральных эрозий.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, амид НА выбран из

гексадециламида НА: амид НА, полученный с использованием гексадециламина, с молярным процентом амидирования от 8 до 9%;

октиламида НА: амид НА, полученный с использованием октиламина, с молярным процентом амидирования от 10 до 11%;

додециламида НА: амид НА, полученный с использованием додециламина, с молярным процентом амидирования от 10 до 11%;

трет-бутиламида НА: амид НА, полученный с использованием трет-бутиламина, с молярным процентом амидирования от 7 до 8%;

бензиламида НА: амид НА, полученный с использованием бензиламина, с молярным процентом амидирования от 8 до 9%.

Новая система высвобождения будет предпочтительно использоваться для лечения повреждений суставов, хрящей, вызванных ОА, и для восстановления остеохондральных эрозий.

Примеры получения новых систем высвобождения и эксперименты, проведенные автором для подтверждения эффективности указанных систем по настоящему изобретению описаны ниже.

Пример 1. Синтез гексадециламидного производного НА со средней молекулярной массой (М.М.) в диапазоне значений от 500 до 730 кДа, H_{yadd4} , с молярным процентом амидирования от 8 до 9%

5,00 г натриевой соли гиалуроновой кислоты, полученной путем ферментации, с М.М. в диапазоне значений от 500 до 730 кДа, растворяют в 250 мл воды, и полученный раствор пропускают через стек-

лянную колонку, заполненную 100 мл смолы Дауэкс (Dowex), в виде тетрабутиламмония. Раствор НА в виде соли ТВА элюируют, собирают и лиофилизируют.

2 г полученного таким образом продукта растворяют в 200 мл диметилсульфоксида (ДМСО) и добавляют 64 мкл метансульфоновой кислоты; добавляют также 53 мг 1,1'-карбонилдимидазола и полученную смесь оставляют при слабом перемешивании на 1 ч при комнатной температуре. Затем добавляют 998 мг гексадециламина и проводят реакцию амидирования при температуре 42°C в течение 24 ч.

Реакцию останавливают добавлением 5 мл насыщенного водного раствора NaCl и через 30 мин добавляют 1,5 объема абсолютного этанола для выделения полученного производного. Осадок промывают с использованием смеси этанол/Н₂О (80:20) и в итоге абсолютным этанолом, после чего сушат в условиях высокого вакуума при температуре 40°C.

Получают 1,3 г данного производного и определяют степень его амидирования с помощью ¹H-ЯМР.

Пример 2. Синтез октиламидного производного НА со средней молекулярной массой в диапазоне значений от 500 до 730 кДа, Nyadd2, с молярным процентом амидирования от 10 до 11%

5,00 г натриевой соли гиалуроновой кислоты, полученной путем ферментации, с М.М. в диапазоне значений от 500 до 730 кДа, растворяют в 250 мл воды и полученный раствор пропускают через стеклянную колонку, заполненную 100 мл смолы Дауэкс (Dowex), в виде тетрабутиламмония. Раствор НА в виде соли ТВА элюируют, собирают и лиофилизируют.

2 г полученного таким образом продукта растворяют в 200 мл диметилсульфоксида (ДМСО) и добавляют 64 мкл метансульфоновой кислоты; добавляют также 61,4 мг 1,1'-карбонилдимидазола и полученную смесь оставляют при слабом перемешивании на 1 ч при комнатной температуре. Затем добавляют 330 мг октиламина и проводят реакцию амидирования при температуре 42°C в течение 24 ч.

Реакцию останавливают добавлением 5 мл насыщенного водного раствора NaCl и через 30 мин добавляют 1,5 объема абсолютного этанола для выделения полученного производного. Осадок промывают с использованием смеси этанол/Н₂О (80:20) и в итоге абсолютным этанолом, после чего сушат в условиях высокого вакуума при температуре 40°C.

Получают 1,2 г данного производного и определяют степень его амидирования с помощью ¹H-ЯМР.

Пример 3. Синтез додециламидного производного НА со средней молекулярной массой в диапазоне значений от 500 до 730 кДа, Nyadd3, с молярным процентом амидирования от 10 до 11%

5,00 г натриевой соли гиалуроновой кислоты, полученной путем ферментации, с М.М. в диапазоне значений от 500 до 730 кДа, растворяют в 250 мл воды и полученный раствор пропускают через стеклянную колонку, заполненную 100 мл смолы Дауэкс (Dowex), в виде тетрабутиламмония. Раствор НА в виде соли ТВА элюируют, собирают и лиофилизируют.

2 г полученного таким образом продукта растворяют в 200 мл диметилсульфоксида (ДМСО) и добавляют 64 мкл метансульфоновой кислоты; добавляют также 54,2 мг 1,1'-карбонилдимидазола и полученную смесь оставляют при слабом перемешивании на 1 ч при комнатной температуре. Затем добавляют 448 мг додециламина и проводят реакцию амидирования при температуре 42°C в течение 24 ч.

Реакцию останавливают добавлением 5 мл насыщенного водного раствора NaCl и через 30 мин добавляют 1,5 объема абсолютного этанола для выделения полученного производного.

Осадок промывают с использованием смеси этанол/Н₂О (80:20) и в итоге абсолютным этанолом, после чего сушат в условиях высокого вакуума при температуре 40°C.

Получают 1,25 г данного производного и определяют степень его амидирования с помощью ¹H-ЯМР.

Пример 4. Синтез трет-бутиламидного производного НА со средней молекулярной массой в диапазоне значений от 500 до 730 кДа, Nyadd6, с молярным процентом амидирования от 7 до 8%

5,00 г натриевой соли гиалуроновой кислоты, полученной путем ферментации, с М.М. в диапазоне значений от 500 до 730 кДа, растворяют в 250 мл воды и полученный раствор пропускают через стеклянную колонку, заполненную 100 мл смолы Дауэкс (Dowex), в виде тетрабутиламмония. Раствор НА в виде соли ТВА элюируют, собирают и лиофилизируют.

2 г полученного таким образом продукта растворяют в 200 мл диметилсульфоксида (ДМСО) и добавляют 64 мкл метансульфоновой кислоты; добавляют также 53 мг 1,1'-карбонилдимидазола и полученную смесь оставляют при слабом перемешивании на 1 ч при комнатной температуре. Затем добавляют 178 мг трет-бутиламина и проводят реакцию амидирования при температуре 42°C в течение 24 ч.

Реакцию останавливают добавлением 5 мл насыщенного водного раствора NaCl и через 30 мин добавляют 1,5 объема абсолютного этанола для выделения полученного производного. Осадок промывают с использованием смеси этанол/Н₂О (80:20) и в итоге абсолютным этанолом, после чего сушат в условиях высокого вакуума при температуре 40°C.

Получают 1,25 г данного производного и определяют степень его амидирования с помощью ¹H-ЯМР.

Пример 5. Синтез бензиламидного производного НА со средней молекулярной массой в диапазоне значений от 500 до 730 кДа, Nyadd1, с молярным процентом амидирования от 8 до 9%

5,00 г натриевой соли гиалуроновой кислоты, полученной путем ферментации, с М.М. в диапазоне значений от 500 до 730 кДа, растворяют в 250 мл воды, и полученный раствор пропускают через стек-

лянную колонку, заполненную 100 мл смолы Дауэкс (Dowex), в виде тетрабутиламмония. Раствор НА в виде соли ТВА элюируют, собирают и лиофилизируют.

2 г полученного таким образом продукта растворяют в 200 мл диметилсульфоксида (ДМСО) и добавляют 64 мкл метансульфоновой кислоты; добавляют также 54,0 мг 1,1'-карбонилдидимидазола и полученную смесь оставляют при слабом перемешивании на 1 ч при комнатной температуре. Затем добавляют 260 мг бензиламина и проводят реакцию амидирования при температуре 42°C в течение 24 ч.

Реакцию останавливают добавлением 5 мл насыщенного водного раствора NaCl и через 30 мин добавляют 1,5 объема абсолютного этанола для выделения полученного производного. Осадок промывают с использованием смеси этанол/Н₂O (80:20) и в итоге абсолютным этанолом, после чего сушат в условиях высокого вакуума при температуре 40°C.

Получают 1,25 г данного производного и определяют степень его амидирования с помощью ¹H-ЯМР.

Пример 6. Получение композиций, содержащих НА и hGH в соотношении 10:1 и 20:1 (мас./мас.)

8 мг натриевой соли гиалуроновой кислоты, полученной путем ферментации, с М.М. в диапазоне значений от 150 до 250 кДа (низкомолекулярный продукт, LMW) и от 500 до 730 кДа (продукт со средним значением молекулярной массы, MMW) растворяют в 1 мл фосфатного буфера с pH 7,4. После полного растворения добавляют 0,8 мг hGH с достижением массового соотношения полисахарид/белок 10:1, и 0,4 мг hGH с достижением массового соотношения полисахарид/белок 20:1. Оба ингредиента перемешивают с получением однородной композиции. Содержание фактора роста рассчитывают при разбавлении смеси буфером в пропорции 1:10 и последующем измерении УФ-поглощения при длине волны 280 нм и затем, с использованием калибровочной кривой, определяют концентрацию GH.

Пример 7. Получение композиции, содержащей систему высвобождения, созданную с использованием гексадециламида НА и hGH, взятых в соотношении 10:1 (мас./мас.)

8 мг гексадециламидного производного НА, Nyadd4, полученного по процедуре примера 1, растворяют в 1 мл фосфатного буфера с pH 6,9. После полного растворения добавляют 0,8 мг hGH, предварительно растворенного в водном растворе, и все перемешивают, так чтобы композиция стала однородной и белок включился в гель. Уровень нагрузки геля рассчитывают при разбавлении буфером в пропорции 1:10, с последующим измерением УФ-поглощения при длине волны 280 нм и затем, с использованием калибровочной кривой, определяют концентрацию GH.

Пример 8. Получение композиции, содержащей систему высвобождения, созданную с использованием трет-бутиламида НА и hGH, взятых в соотношении 10:1 (мас./мас.)

8 мг Nyadd6, полученного по процедуре примера 4, растворяют в 1 мл фосфатного буфера с pH 6,9 (8 мг/мл). После полного растворения, добавляют 0,8 мг hGH, предварительно растворенного в водном растворе, и все перемешивают, так чтобы композиция стала однородной и белок включился в гель. Уровень нагрузки геля рассчитывают при разбавлении буфером в пропорции 1:10, с последующим измерением УФ-поглощения при длине волны 280 нм и затем, с использованием калибровочной кривой, определяют концентрацию GH.

Пример 9. Получение композиции, содержащей систему высвобождения, созданную с использованием октиламида НА и hGH, взятых в соотношении 10:1 (мас./мас.)

8 мг Nyadd2, полученного по процедуре примера 2, растворяют в 1 мл фосфатного буфера с pH 6,9 (8 мг/мл). После полного растворения, добавляют 0,8 мг hGH, предварительно растворенного в водном растворе, и все перемешивают, так чтобы композиция стала однородной и белок включился в гель. Уровень нагрузки геля рассчитывают при разбавлении буфером в пропорции 1:10, с последующим измерением УФ-поглощения при длине волны 280 нм и затем, с использованием калибровочной кривой, определяют концентрацию GH.

Пример 10. Получение композиции, содержащей систему высвобождения, созданную с использованием додециламида НА и hGH, взятых в соотношении 10:1 (мас./мас.)

8 мг Nyadd3, полученного по процедуре примера 3, растворяют в 1 мл фосфатного буфера с pH 6,9 (8 мг/мл). После полного растворения добавляют 0,8 мг hGH, предварительно растворенного в водном растворе, и все перемешивают, так чтобы композиция стала однородной и белок включился в гель. Уровень нагрузки геля рассчитывают при разбавлении буфером в пропорции 1:10, с последующим измерением УФ-поглощения при длине волны 280 нм и затем, с использованием калибровочной кривой, определяют концентрацию GH.

Пример 11. Получение композиции, содержащей систему высвобождения, созданную с использованием бензиламида НА и hGH, взятых в соотношении 10:1 (мас./мас.)

8 мг Nyadd1, полученного по процедуре примера 5, растворяют в 1 мл фосфатного буфера с pH 6,9 (8 мг/мл). После полного растворения добавляют 0,8 мг hGH, предварительно растворенного в водном растворе, и все перемешивают, так чтобы композиция стала однородной и белок включился в гель. Уровень нагрузки геля рассчитывают при разбавлении буфером в пропорции 1:10, с последующим измерением УФ-поглощения при длине волны 280 нм и затем, с использованием калибровочной кривой, определяют концентрацию GH.

Пример 12. Получение композиции, содержащей систему высвобождения, созданную с использова-

нием гексадециламида НА и сСТ, взятых в соотношении 10:1 (мас./мас.)

8 мг Nuadd4, полученного по процедуре примера 1, растворяют в 1 мл фосфатного буфера с рН 6,9. После полного растворения добавляют 0,8 мг кальцитонина из лосося (сСТ), предварительно растворенного в фосфатном буфере, и все перемешивают, так чтобы композиция стала однородной и белок включился в гель. Уровень нагрузки геля рассчитывают при разбавлении буфером в пропорции 1:10, с последующим измерением УФ-поглощения при длине волны 280 нм и затем, с использованием калибровочной кривой, определяют концентрацию кальцитонина.

Пример 13. Получение композиции, содержащей систему высвобождения, созданную с использованием гексадециламида НА и IL-1Ra, взятых в соотношении 10:1 (мас./мас.)

8 мг Nuadd4, полученного по процедуре примера 1, растворяют в 1 мл фосфатного буфера с рН 6,9. После полного растворения добавляют 0,8 мг IL-1Ra, предварительно растворенного в водном растворе, и все перемешивают, так чтобы композиция стала однородной и белок включился в гель. Уровень нагрузки геля рассчитывают при разбавлении буфером в пропорции 1:10, с последующим измерением УФ-поглощения при длине волны 280 нм и затем, с использованием калибровочной кривой, определяют концентрацию IL-1Ra.

Пример 14. Получение композиции, содержащей систему высвобождения, созданную с использованием гексадециламида НА и РНКазы, взятых в соотношении 10:1 (мас./мас.)

8 мг Nuadd4, полученного по процедуре примера 1, растворяют в 1 мл фосфатного буфера с рН 6,9. После полного растворения добавляют 0,8 мг РНКазы, предварительно растворенной в фосфатном буфере, и все перемешивают, так чтобы белок включился в гель. Уровень нагрузки геля рассчитывают при разбавлении буфером в пропорции 1:10, с последующим измерением УФ-поглощения при длине волны 280 нм и затем, с использованием калибровочной кривой, определяют концентрацию РНКазы.

Пример 15. Получение композиции, содержащей систему высвобождения, созданную с использованием гексадециламида НА и инсулина, взятых в соотношении 10:1 (мас./мас.)

8 мг Nuadd4, полученного по процедуре примера 1, растворяют в 1 мл фосфатного буфера с рН 6,9. После полного растворения, добавляют 0,8 мг инсулина, предварительно растворенного в фосфатном буфере, и все перемешивают, так чтобы белок включился в гель. Уровень нагрузки геля рассчитывают при разбавлении буфером в пропорции 1:10, с последующим измерением УФ-поглощения при длине волны 280 нм и затем, с использованием калибровочной кривой, определяют концентрацию инсулина.

Пример 16. Исследование уровня высвобождения hGH из композиции, полученной с включением НА или амидов НА

Композиции, полученные по процедурам примеров 6-11, вносят в диализные трубки, с отсекаемым значением М.М. 100 кДа, и погружают в фосфатный буфер при рН 7, при осторожном перемешивании, для отслеживания их высвобождения из соответствующего отсека. Для целей сравнительного анализа смешивают 0,8 мг hGH с 1 мл фосфатного буфера (PBS), и полученную композицию вносят в диализную трубку.

Условия достаточного растворения поддерживаются в течение всех экспериментов. В заданные временные точки отбирают аликвоты по 50 мкл из донорского отсека и разбавляют в пропорции 1:10 для определения содержания белка и его изменений с течением времени. Параллельно проводят определение УФ-поглощения при длине волны 280 нм и оценку результатов ОФ-ВЭЖХ при длине волны 220 нм для определения количества оставшегося белка и наличия его деградации, если она имеет место. Проводят также анализ по методу анализа рассеяния для оценки агрегации введенного в состав композиции белка. И, наконец, отбирают образцы из рецепторного отсека для проверки, соответствует ли высвобожденный уровень количеству, которое исчезает из донорского отсека, а также проводят масс-спектрометрический анализ (Esi-ToF) для подтверждения того, что высвобожденный GH не подвергается какой-либо структурной деградации. Далее, строят кривые, описывающие уровень деградации, которые показывают процент белка, высвобожденного с течением времени. Фиг. 2, 3, 4 и 5.

Результаты

На фиг. 2 показан профиль высвобождения hGH, определяемый системой, созданной с использованием Nuadd4 и hGH, в сравнении с контролем, в котором тот же белок находится в PBS.

На фиг. 3 показан профиль высвобождения белка, hGH, введенного в состав композиции в сочетании с LMW-НА и MMW-НА: в обоих случаях тестировали препараты с двумя разными весовыми отношениями НА к hGH (10:1 и 20:1), этот эксперимент автор провел с целью продемонстрировать, что сочетание белков гидрофобной природы, даже с большими количествами НА с разными значениями М.М., не приводит к какому-либо изменению профиля высвобождения белка в сравнении с профилем высвобождения, получаемым при его введении в PBS, т.е. в водном растворителе.

На фиг. 4 показаны профили высвобождения hGH из систем высвобождения, созданных с использованием амидов по настоящему изобретению и hGH, в сравнении с контрольным вариантом, где hGH был введен в композицию с PBS.

На фиг. 5 проиллюстрировано время высвобождения 50% hGH из систем высвобождения, созданных с использованием амидов по настоящему изобретению, также в сравнении с контролем, как было указано выше.

Если сравнивать фиг. 3 с фиг. 2 и 4, можно заметить, что системы высвобождения, полученные с использованием амидов НА (описанных выше) в сочетании с белками преимущественно гидрофобной природы (в данном случае, в сочетании с hGH), создают вполне очевидное пролонгированное по времени, замедленное высвобождение белка, в сравнении с контролем, где анализируемые белки были изготовлены с использованием PBS, а также в сравнении с белками, которые введены в состав композиций в сочетании с НА разного М.М. и с разными показателями массового соотношения. Из этого следует, что не концентрация и/или не М.М. полисахарида определяет модификацию профиля высвобождения исследуемого гидрофобного белка, а химическая природа полимера. Все это еще более явно следует из фиг. 5, где показано сравнение времени высвобождения 50% hGH: на фигуре продемонстрировано, что новые системы высвобождения по настоящему изобретению увеличивают период высвобождения до трех раз, в сравнении с контрольным вариантом (hGH в PBS).

Пример 17. Исследование высвобождения sCT, IL1-Ra и инсулина в сравнении с профилем высвобождения гидрофильного белка РНКазы А

Каждую из исследуемых композиций получали по процедурам, описанным в примерах 12-15, и затем вводили в диализную трубку, с отсекаемым значением М.М. 100 кДа, и погружали в фосфатный буфер при pH 7, при осторожном перемешивании. Для целей сравнительного анализа смешивали 0,8 мг кальцитонина, IL-1Ra или инсулина с 1 мл фосфатного буфера, и полученные композиции вводили в диализную трубку для мониторинга их высвобождения из донорного отсека с течением времени.

Условия достаточного растворения поддерживались в течение всех экспериментов. В заданные временные точки отбирали аликвоты по 10 мкл из донорского отсека и разбавляли в пропорции 1:10 для определения содержания белка и его изменений с течением времени. Параллельно проводили определение УФ-поглощения при длине волны 280 нм для определения количества оставшегося белка. Проводили также анализ по методу рассеяния анализа рассеяния для оценки агрегации введенного в состав композиции белка. И, наконец, отбирали образцы из рецепторного отсека для проверки, соответствует ли высвобожденный уровень количеству, которое исчезает из донорского отсека. Далее, строят кривые, описывающие уровень деградации, которые показывают процент белка, высвобожденного с течением времени, в сравнении с его значением в контроле.

Белок РНКазы А характеризуется индексом GRAVY, равным -0,67, и, следовательно, не может рассматриваться как преимущественно гидрофобный белок, а, скорее, как гидрофильный белок. Приведенное ниже описание дано с целью сравнения получаемого в данном случае профиля высвобождения с профилем высвобождения, характерным для системы высвобождения Nuadd, в которой используется сочетание с использованием белков преимущественно гидрофобной природы, с тем чтобы проиллюстрировать имеющиеся различия.

Результаты

На фиг. 6-8 показаны профили высвобождения 3 анализируемых белков гидрофобной природы: во всех трех случаях система, сформированная с использованием гексадециламида НА в сочетании с указанными белками, демонстрирует пролонгированное, замедленное высвобождение в течение более длительного периода времени, чем в контрольном варианте.

Тогда как на фиг. 9 показано сочетание того же гексадециламида, взятого в том же отношении (10:1, мас./мас.), в сочетании с РНКазой, которая имеет преимущественно гидрофильную природу и характеризуется индексом GRAVY=-0,67, где наблюдается профиль высвобождения, идентичный тому профилю, который получают при использовании в композиции сочетания такого же белка с PBS.

Пример 18: Исследование высвобождения hGH в синовиальную жидкость человека (LS), полученную от пациентов с остеоартритом

Гормон hGH вначале ковалентно связывают с флуоресцентным зондом (Cy5.5), так чтобы его можно было определенно распознать в присутствии других синовиальных белков. С этой целью, 1,5 мг hGH растворяют в 2 мл боратного буфера при pH 8, к которому затем добавляют 2 мг Cy5.5, предварительно растворенного в 60 мкл ДМСО. Проводят реакцию мечения в защищенных от света условиях, при не сильном перемешивании в течение 18 ч. Затем проводят очистку путем диализа против фосфатного буфера в течение 4 дней и против MilliQ воды в течение 1 дня. Далее меченый белок анализируют с использованием гель-фильтрации для подтверждения его чистоты.

Композицию на основе Nuadd4 и hGH-Cy5.5, изготавливают по процедуре примера 7, с поддержанием массового соотношения 10:1. Оба указанных ингредиента хорошо перемешивают, с тем чтобы получить однородную композицию и белок включился в гель. Полученный таким образом гель вводят в диализную трубку с отсекаемым значением М.М. 100 кДа, погружают в среду, содержащую фосфатный буфер и синовиальную жидкость, взятую от пациентов с остеоартритом (1:1, об./об.), и продолжают осторожное перемешивание.

В заданные временные точки определяют количество белка, высвободившегося с течением времени в рецепторный отсек. Анализы проводят по процедуре ОФ-ВЭЖХ с использованием флуоресцентного детектора, не только с тем чтобы определить содержание hGH, но также для проверки, подвергается ли белок деградации. Далее строят кривые, иллюстрирующие профиль высвобождения, на которых показан процент белка, высвободившегося из композиции за период 48 ч.

Результаты

На фиг. 10 показан полученный результат: высвобождение hGH в LS из системы, созданной на основе Hyadd4 в сочетании с исследуемым белком, показывает, что длительный, замедленный профиль высвобождения, ранее проиллюстрированный на фиг. 2, поддерживается в неизменном состоянии. В этой связи, можно полагать, что белок/лекарственное средство, включенное в систему Hyadd, защищено и не подвергается деградации в среде, в которую он высвобождается, где указанная среда обогащена ферментами, белками, причем некоторые из них неопределенной природы, а также провоспалительными молекулами, какой является синовиальная жидкость от пациентов с ОА.

Пример 19: Исследование фармакокинетики системы, созданной на основе Hyadd4 и hGH, после ее внутрисуставного введения крысам

8 мг Hyadd4, полученного по процедуре, описанной в примере 1, растворяют в 1 мл фосфатного буфера с рН 6,9 и стерилизуют в условиях влажного тепла при температуре 121°C. Далее 0,8 мг hGH, предварительно растворенного в водном растворе и простерилизованного фильтрацией через регенерированные целлюлозные фильтры с размером пор 0,2 мкм, добавляют в асептических условиях и все хорошо перемешивают, так чтобы композиция стала однородной и белок включился в гель.

Для проведения исследования *in vivo*, количество композиции, эквивалентное 100 мкг белка/на животное, инъецируют в коленный сустав крысы. В заданные временные точки (0,15, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24 и 48 ч) отбирают образцы плазмы и проводят анализ по процедуре ELISA для определения концентрации hGH, который проходит в плазму после его внутрисуставного введения. Данный эксперимент проводят в трехкратном повторе.

Для целей сравнения, одну группу животных подвергают лечению эквивалентным количеством свободного hGH (100 мкг), также при проведении внутрисуставного введения. Параметры фармакокинетики определяют при построении графика зависимости концентрации hGH в нг/мл, обнаруженной в плазме, от времени, т.е. как графика указанной концентрации в виде функции времени, до 48 ч.

Результаты

Как показано на фиг. 11, инъецированный белок обнаруживается в плазме сразу же после его внутрисуставного введения.

Однако в связи с пролонгированным характером высвобождения белка, созданного системой Hyadd, он остается *in situ*, а именно: в полости сустава, и не проходит в кровоток, так что весь эффект белка ограничивается местом его инъекции.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Система длительного высвобождения биологически активных белков, содержащая:
 - а) белок гидрофобной природы и
 - б) амид гиалуроновой кислоты (НА), где НА, используемая для получения амида, имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне значений от 500 до 730 кДа, где указанный белок гидрофобной природы имеет индекс GRAVY не менее -0,5 и амид НА выбран из
 - гексадециламида НА: амид НА, полученный с использованием гексадециламина, с молярным процентом амидирования от 7 до 14%;
 - октиламида НА: амид НА, полученный с использованием октиламина, с молярным процентом амидирования от 10 до 15%;
 - додециламида НА: амид НА, полученный с использованием додециламина, с молярным процентом амидирования от 10 до 15%;
 - трет-бутиламида НА: амид НА, полученный с использованием трет-бутиламина, с молярным процентом амидирования от 7 до 12%;
 - бензиламида НА: амид НА, полученный с использованием бензиламина, с молярным процентом амидирования от 7 до 15%;
 и где соотношение амид гиалуроновой кислоты (НА)/белок составляет не менее 10:1.
2. Система длительного высвобождения белков по п.1, где указанные биологически активные белки гидрофобной природы представляют собой инсулин, hGH, sCT, IL-1Ra, G-CSF, PDGF.
3. Система длительного высвобождения белков по п.1, где указанные биологически активные белки гидрофобной природы представляют собой PDGF-BB, TGF- β , EGF, VEGF-B, EPO, NGF β , трансферрин, TIMP-2, TIMP-3 и TIMP-4.
4. Система длительного высвобождения белков по любому из пп.1-3, где указанный амид НА представляет собой гексадециламид.
5. Система длительного высвобождения белков по п.4, где указанный биологически активный белок представляет собой hGH или sCT.
6. Система длительного высвобождения белков по п.2, где указанный биологически активный белок представляет собой инсулин.
7. Система длительного высвобождения белков по п.4, где указанный биологически активный белок

представляет собой PDGF.

8. Система длительного высвобождения белков по п.4, где указанный биологически активный белок представляет собой ингибитор металлопротеазы TIMP-2, TIMP-3 или TIMP-4.

9. Система длительного высвобождения белков по любому из пп.1-8, где указанный амид НА выбран из

гексадециламида НА: амид НА, полученный с использованием гексадециламина, с молярным процентом амидирования от 8 до 9%;

октиламида НА: амид НА, полученный с использованием октиламина, с молярным процентом амидирования от 10 до 11%;

додециламида НА: амид НА, полученный с использованием додециламина, с молярным процентом амидирования от 10 до 11%;

трет-бутиламида НА: амид НА, полученный с использованием трет-бутиламина, с молярным процентом амидирования от 7 до 8%;

бензиламида НА: амид НА, полученный с использованием бензиламина, с молярным процентом амидирования от 8 до 9%.

10. Система длительного высвобождения белков по п.4, где указанные биологически активные белки гидрофобной природы представляют собой PDGF-BB, TGF- β , EGF или VEGF-B.

11. Система длительного высвобождения белков по любому из пп.5-8 и 10, которая дополнительно содержит стабилизаторы и эксципенты.

12. Применение амида гиалуроновой кислоты (НА) для создания системы по любому из пп.1-11, где указанный белок гидрофобной природы имеет индекс GRAVY не менее -0,5 и где указанный амид НА выбран из:

а) гексадециламида НА: амид НА, полученный с использованием гексадециламина, с молярным процентом амидирования от 7 до 14%;

б) октиламида НА: амид НА, полученный с использованием октиламина, с молярным процентом амидирования от 10 до 15%;

в) додециламида НА: амид НА, полученный с использованием додециламина, с молярным процентом амидирования от 10 до 15%;

г) трет-бутиламида НА: амид НА, полученный с использованием трет-бутиламина, с молярным процентом амидирования от 7 до 12%;

д) бензиламида НА: амид НА, полученный с использованием бензиламина, с молярным процентом амидирования от 7 до 15%;

где НА, используемая для получения амидов, имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне значений от 500 до 730 кДа и где соотношение амид гиалуроновой кислоты (НА)/белок составляет не менее 10:1.

13. Применение по п.12, где указанные биологически активные белки гидрофобной природы включают инсулин, hGH, sCT, IL-1Ra, G-CSF, PDGF.

14. Применение по п.12, где указанные биологически активные белки представляют собой PDGF-BB, TGF- β , EGF, VEGF-B, EPO, NGF β , трансферрин, TIMP-2, TIMP-3 и TIMP-4.

15. Применение по любому из пп.12-14, где указанный амид НА представляет собой гексадециламид.

16. Применение по п.15, где указанный биологически активный белок представляет собой hGH или sCT.

17. Применение системы по любому из пп.1-11 для внутрисуставного лечения остеоартрита, ревматоидного артрита или псориатического артрита и/или остеопороза.

18. Применение системы по любому из пп.1-11 для лечения повреждения суставов, вызванного остеоартритом, лечения тендинита, восстановления поражения сердечной мышцы, восстановления костных переломов/полостей или лечения язвенных поражений/ран/повреждений кожи посредством инъекций, внутрисуставного или местного введения или перорального введения.

19. Применение системы по п.4, где указанный биологически активный белок представляет собой ингибитор металлопротеазы TIMP-2, TIMP-3 или TIMP-4 для инъекционного или внутрисуставного лечения повреждения хрящевой ткани сустава, вызванного остеоартритом, и/или для восстановления остеохондральных эрозий.

20. Применение по пп.12-19, где амид НА выбран из

гексадециламида НА: амид НА, полученный с использованием гексадециламина, с молярным процентом амидирования от 8 до 9%;

октиламида НА: амид НА, полученный с использованием октиламина, с молярным процентом амидирования от 10 до 11%;

додециламида НА: амид НА, полученный с использованием додециламина, с молярным процентом амидирования от 10 до 11%;

трет-бутиламида НА: амид НА, полученный с использованием трет-бутиламина, с молярным про-

центом амидирования от 7 до 8%;

бензиламида НА: амид НА, полученный с использованием бензиламина, с молярным процентом амидирования от 8 до 9%.

Шкала значений гидрофобности для аминокислот

Ile: 4.500

Val: 4.200

Leu: 3.800

Phe: 2.800

Cys: 2.500

Met: 1.900

Ala: 1.800

Gly: -0.400

Asn: -3.500

Thr: -0.700

Trp: -0.900

Ser: -0.800

Tyr: -1.300

Pro: -1.600

His: -3.200

Glu: -3.500

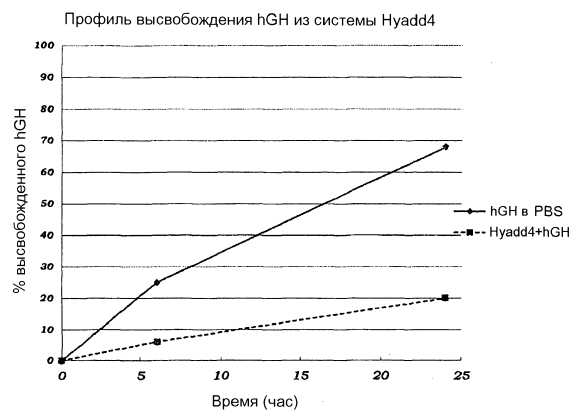
Asp: -3.500

Gln: -3.500

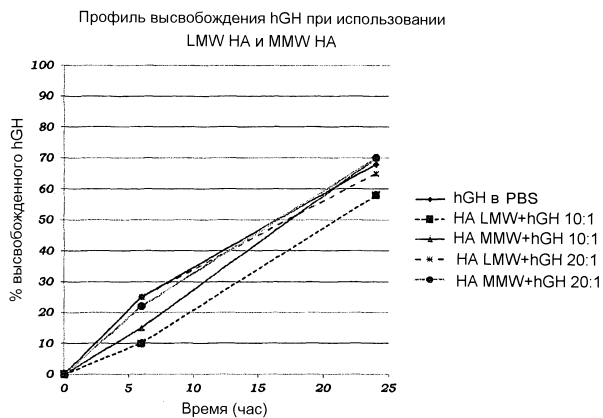
Lys: -3.900

Arg: -4.500

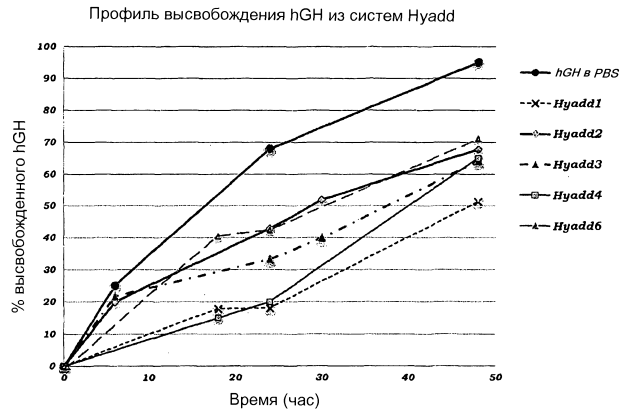
Фиг. 1



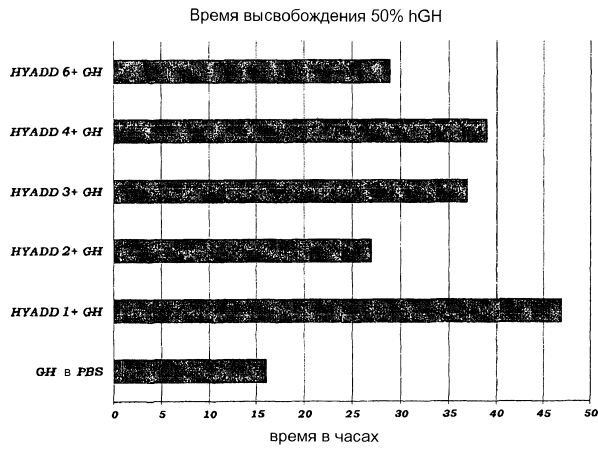
Фиг. 2



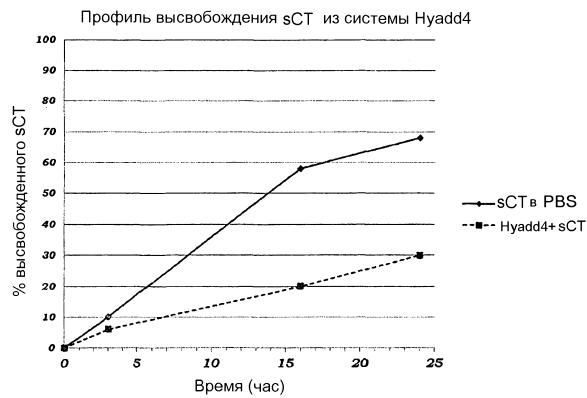
Фиг. 3



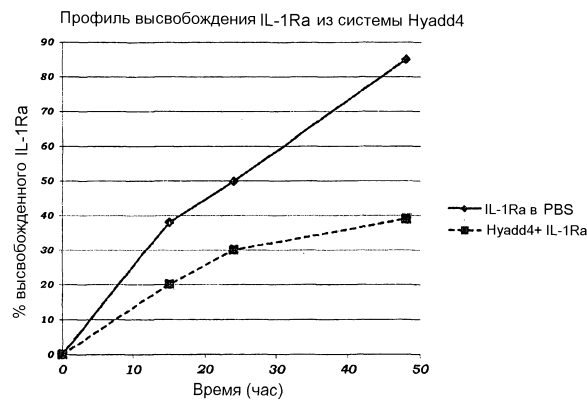
Фиг. 4



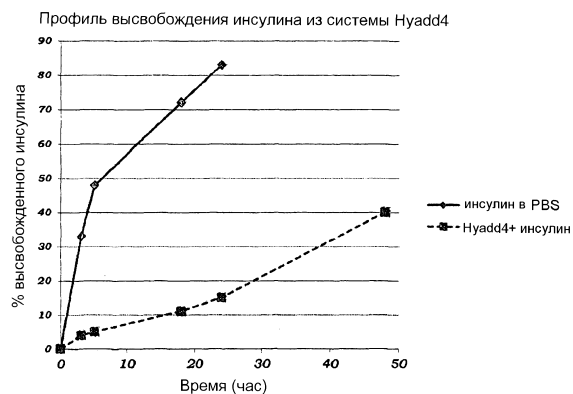
Фиг. 5



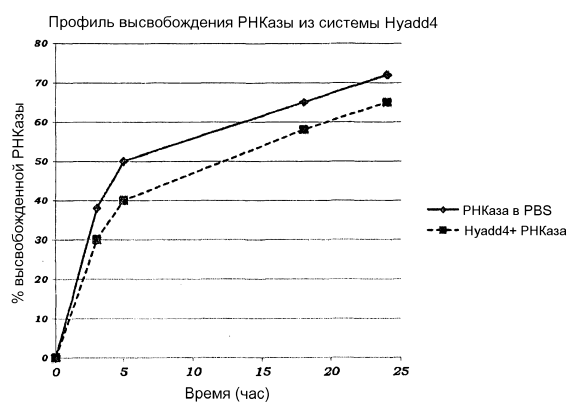
Фиг. 6



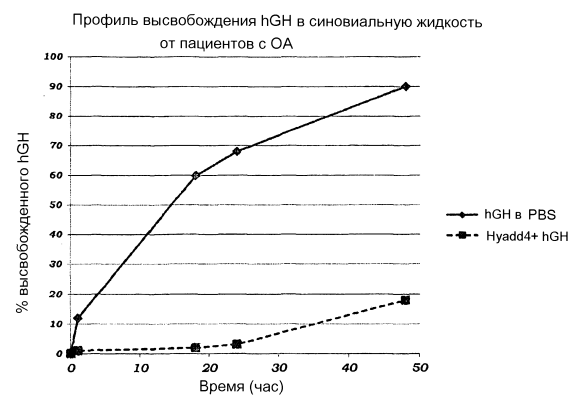
Фиг. 7



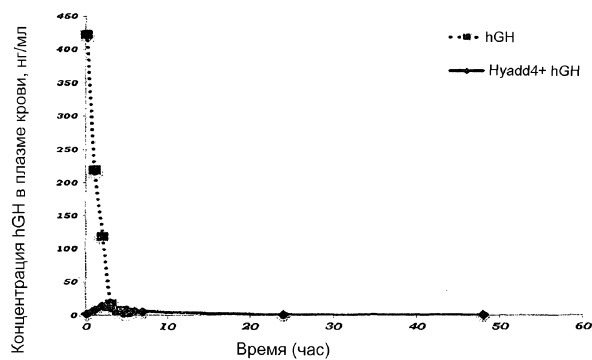
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11