

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **12.03.2001**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **10.03.2000**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/358**
(33) Země priority: **SK**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.04.2003**
(Věstník č. 4/2003)
(86) PCT číslo: **PCT/EP01/02722**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/066601**

(21) Číslo dokumentu:

2002 - 3029

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. C1. ⁷:

C 08 B 37/08
C 08 B 37/16
A 61 K 31/715
A 61 K 31/728

(71) Přihlašovatel:

FIDIA FARMACEUTICI S.P.A., Abano Terme, IT;
SLOVAK ACADEMY OF SCIENCES INSTITUTE
OF EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY, Bratislava,
SK;

(72) Původce:

Soltes Ladislav, Bratislava, SK;
Steiner Bohumil, Malacky, SK;
Machova Eva, Bratislava, SK;
Kogan Grigorij, Bratislava, SK;
Bystricky Slavomir, Bratislava, SK;
Mendichi Raniero, Tribiano, IT;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Klatrát a farmaceutický prostředek

(57) Anotace:

Klatrát, tvořený derivátem kyseliny hyaluronové (a),
derivátem kyseliny hyaluronové (b1), odlišným od (a) a
schopným vytvářet klatrát s (a), a /nebo složkou (b2),
neobsahující částici kyseliny hyaluronové, ale schopnou
vytvářet s (a) klatrát a farmaceutické použití takového
klatrátu.

Clathrát a farmaceutický prostředek

Oblast techniky

Vynález se týká clathrátových komplexů mezi deriváty kyseliny hyaluronové, získaných pomocí fyzikálně chemického zesílení derivátů hyaluronové kyseliny o vysoké molekulové hmotnosti či jejich solí.

Dosavadní stav techniky

Arthritida je jednou z nejrozšířenějších chorob v lidské populaci. Mezi přibližně stovkou různých typů arthritidy patří osteoarthritis (OA) k těm, jejichž snaha o zvládnutí vyžaduje nejvíce finančních investic a představuje tedy největší ekonomické břemeno (L. S. Simon, Osteoarthritis 25, 345, 1999).

Při osteoarthritis (OA) se synoviální tekutina stává hojnější a méně viskozní, zatímco koncentrace synoviálního hyaluronanu (HA) a jeho molekulová hmotnost se snižují. (J. G. Peyron, J. Rheum. 20, dodatek 39, 10, 1993). Tyto změny jsou považovány za spoluzodpovědné za následnou urychlenou degradaci chrupavky. Nitrokloubní (injekční) podávání HA o vysoké molekulové hmotnosti pacientům (tato léčba se obvykle nazývá "viskodoplnění", "viscosupplementation") je popsáno jako účinný postup při léčbě traumatizovaných arthritických kloubů (T. Kikuchi se spoluautory, Osteoarthritis and Cartilage 4, 99, 1996).

Průměrná molekulová hmotnost synoviálního HA se u zdravých lidí pohybuje v rozmezí od $1,6 \times 10^6$ do $1,9 \times 10^6$, zatímco jeho koncentrace se rovná 2 až 3 mg/ml (E. Balazs se spoluautory, Arthritis Rheum. 10, 357, 1967). Hodnoty molekulových hmotností obchodně dostupných HA přípravků, získaných z různých (přírodních) zdrojů, jako například z

bakterií *Streptococcus zooepidemicus* nebo *Streptococcus equii*, z kohoutích hřebenů a podobně, se pohybují v rozmezí od stovek tisíc do přibližně 1 až 2 milionů (Obr. 1).

HA o vysoké molekulové hmotnosti váže vzhledem ke své hmotnosti až tisícinásobek vody a vytváří pseudoplastické, elastoviskozní roztoky, které se chovají jako měkké gely, projevující tak zvanou na stříhu závislou viskozitu a frekvenčně závislou pružnost (N. E. Larsen a E. A. Balazs, *Adv. Drug Delivery Rev.* 7, 279, 1991). Při malé veličině stříhového napětí vykazují roztoky HA o vysoké molekulové hmotnosti vysokou viskozitu a nízkou pružnost, zatímco při rostoucích hodnotách stříhového napětí se tyto roztoky stávají pružnějšími (L. S. Simon, *Osteoarthritis* 25, 345, 1999). Takové nikoli Newtonovské chování synoviální tekutiny je nezbytné pro mazání kloubů během (rychlého) pohybu. Povrch chrupavky je pokrytý tenkým filmem synoviální tekutiny (SF), která uhlazuje (jemné) nerovnosti kloubní struktury. Nedostatečnost této vrstvy vede ke zvýšení koeficientu tření mezi pohyblivými částmi kloubu, což vyvolává silnou bolest (M. Nishimura se spoluautory, *Biochim. Biophys. Acta* 1380, 1, 1998).

Ultračisté (připravené pro injekční aplikaci) přípravky elastoviskozních roztoků sodné soli hyaluronanu (HEALON®, Pharmacia, Uppsala, Švédsko) našly širší použití zvláště v oftalmologii (viskochirurgie) (A. Nimrod se spoluautory, *J. Ocular Pharmacol.* 8, 161, 1992) a rovněž v revmatologii (viskodoplnění) (J. G. Peyron, *J. Rheumatology* 20, doplněk 39, 10, 1993; T. Kokuchi se spoluautory, *Osteoarthritis and Cartilage* 4, 99, 1996).

Nedávno byl v USA a v některých jiných zemích schválen pro nitrokloubní podávání pacientům s OA jiný přípravek. Tento nový výrobek, obsahující HA o vysoké molekulové hmotnosti, pocházející z kohoutích hřebenů a nazývaný HYLAN® (Biomatrix Inc., Ridgefield, NJ,

USA), zahrnuje přidavně zesítěný HA (L. S. Simon, Osteoarthritis 25, 345, 1999). Logickým výkladem (tohoto zlepšení) je skutečnost, že časové období, během něhož vykazuje nitrokloubně vložený hyaluronan svou aktivitu, je poměrně krátké. Biologický poločas HA po nitrokloubní aplikaci do kolenního kloubu králíka byl přibližně 13 hodin (T. J. Brown se spoluautory, Exp. Physiol. 76, 125, 1991). (Obrat endogenního hyaluronanu v kloubech představuje 12 až 48 hodin; J. Drobnik, Adv. Drug Delivery Rev. 7, 295, 1991). Vodou rozpustné přípravky HYLAN® s ultravysokou molekulovou hmotností (průměrně kolem 6×10^6), které byly připraveny chemickým zesítěním HA za pomoci formaldehydu, vykazují významně delší období biologického poločasu (L. S. Simon, Osteoarthritis 25, 345, 1999). Přípravky HYLAN®, připravené tímto způsobem, tj. za použití chemického zesítění, představují nejúčinnější (biologické) materiály pro viskodoplnění. V jiných (vodou nerozpustných) přípravcích HYLAN® (gely, membrány, mikročástice) je HA zesítěn prostřednictvím zavedených vinylsulfonových skupin za vzniku "nekonečné" poly(makro)molekulární sítě (N. E. Larsen a E. A. Balazs, Adv. Drug Delivery Rev. 7, 279, 1991).

Ovšem při sumarizaci veškerých údajů z literatury, týkajících se preklinických a klinických zkoušek, zahrnujících injekce roztoků HYLAN® (N. E. Larsen a E. A. Balazs, Adv. Drug Delivery Rev. 7, 279, 1991; S. Al-Assaf se spoluautory, Radiat. Phys. Chem. 46, 207, 1995; M. Wobig se spoluautory, Clin. Ther. 20, 410, 1998; L. S. Simon, Osteoarthritis 25, 345, 1999), je možné dojít k závěru, že spolu s jejich významnými užitečnými vlastnostmi, jako jsou biologická slučitelnost, biologická odbouratelnost, (úplná) resorpce, nulová imunogenita, velmi malá a zřídka projevovaná pyrogenita, je jejich zřejmou nevýhodou velmi vysoká viskozita. Vzhledem ke skutečnosti, že nitrokloubně (injekčně) podávané hyaluronany o ultravysoké molekulové hmotnosti (HYLAN®) jsou enormně viskozními pseudoplastickými gely, je jejich prostupnost

do úzkých štěrbin a/nebo zářezů v poškozené kloubní struktuře zjevně z velké části snížena.

Existuje proto potřeba dostupné hyaluronové kyseliny, mající vysokou molekulovou hmotnost a poskytující výše zmíněné užitečné vlastnosti, současně však nevykazující nadbytečnou viskozitu.

Podstata vynálezu

Autoři vynálezu neočekávaně zjistili, že je možné výše uvedené nevýhody překonat za použití nového postupu fyzikálně chemického zesílení vhodných derivátů hyaluronové kyseliny o vysoké molekulové hmotnosti nebo jejích solí.

Předkládaný vynález se tedy týká clathrátu, vytvořeného:

- derivátem kyseliny hyaluronové (a),
- derivátem kyseliny hyaluronové (b1), odlišným od (a) a schopným vytvářet clathrát s (a), a/nebo
- složkou (b2), neobsahující částici kyseliny hyaluronové, ale schopnou vytvářet s (a) clathrát.

Požadované zvýšení molekulové hmotnosti HA, nebo vytvoření (třírozměrné) polymerní sítě formováním clathrátových komplexů se bude s výhodou provádět *in situ* v místě/poloze požadovaného působení. Tak je možné získat vhodný tekutý přípravek pro viskodoplnění (například pro léčbu OA), a/nebo měkký/pružný a dokonce pevný/neohebný gel (vhodný např. pro "remodelaci" chybějící (části) tkáně. Postup pro přípravu výše zmíněných clathrátových komplexů se týká tak zvaných (samo)spojujících se supramolekulárních sloučenin (self-associating supramolecular compounds). Účinnější viskodopňovací léčby je možné dosáhnout za použití původního přístupu, zahrnujícího:

- i) dvě následné nitrokloubní injekce spojujících se sloučenin (a), (b1) a/nebo (b2). Jako výsledek zvýšené prostupnosti a propustnosti injikovaných tekutin o nízké viskozitě je během jejich spojování vytvářen požadovaný produkt viskodoplnění přímo v cílovém místě; nebo
- ii) nitrokloubní podání výše uvedených spojujících se sloučenin spolu s vhodnou sloučeninou o nízké molekulové hmotnosti, jmenovitě s aktivní přísadou, jejíž prvotní rolí je znemožňovat proces spojování, kompetovat s ním. (Během injekce takového "koktejlu" molekuly činidla (léku) (o nízké molekulové hmotnosti) nejprve úplně znemožňují proces spojování, ovšem během eliminace (exkrece) léku z kloubního prostředí nastane požadované *in situ* samospojení polymerních složek).

Předkládaný vynález se tedy týká 2 odlišných typů farmaceutických prostředků, s výhodou ve formě injikovatelných roztoků, obsahujících jako aktivní složku sloučeninu (a), (b1) a/nebo (b2) a lék obsahující uvedený clathrát, volitelně s obsahem další aktivní přísady.

Tento lék je výhodně dán spojením uvedených farmaceutických prostředků a obsahuje clathrát, který je vytvářen *in situ*, na místě působení, přičemž uvedený lék volitelně obsahuje jinou aktivní přísadu.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 představuje chemickou strukturu hyaluronové kyseliny a β -cyklodextrinu.

Obr. 2 zobrazuje chemickou strukturu sloučeniny (a) a schématické prostorové znázornění (A) amantadinu; chemickou strukturu sloučeniny (b) a schématické prostorové znázornění (B) β -cyklodextrinu

a schématické prostorové znázornění (A---B) jejich clathrátového komplexu.

Obr. 3 představuje schématické prostorové znázornění clathrátových komplexů, tvořených derivátem kyseliny hyaluronové s β -cyklodextrinem a derivátem kyseliny hyaluronové s amantadinem.

Upřednostňovanými clathráty podle předkládaného vynálezu jsou ty, zvolené ze skupiny, sestávající z:

- clathrátu (A), přičemž složkou (a) je derivát hyaluronové kyseliny s cyklodextrinem a složkou (b1) je hyaluronová kyselina s amantadinem;
- clathrátu (B), přičemž složkou (a) je hyaluronová kyselina s cyklodextrinem a složkou (b2) je vodou rozpustný přírodní, polosyntetický anebo syntetický polymer,
- clathrátu (C), přičemž složkou (a) je hyaluronová kyselina s amantadinem a složkou (b2) je polymerizovaný cyklodextrin.

Přírodními polymery, které je možné použít jako složku (b2) v clathrátu (B), jsou například kolagen, společné sraženiny kolagenu a glykosaminglykanů, celulóza, polysacharidy jako chitin, chitosan, pektin nebo kyselina pektinová, agaróza, xanthan, gellan, estery kyseliny alginové a její sole, polymannan nebo polyglykany, škrob a přírodní gummy.

Polosyntetické polymery, které lze použít jako složku (b2) v clathrátu (B), mohou být zvoleny například ze skupiny, sestávající z kolagenu zesíťovaného činidly, jako jsou aldehydy nebo jejich prekursorů, z dikarboxylových kyselin nebo jejich halogenidů, diaminů, derivátů celulózy, hyaluronové kyseliny, chitinu, chitosanu, gellanu, xanthanu,

pektinu nebo kyseliny pektinové, polyglykanů, polymannanu, agaru, agarózy, přírodní gummy a glykosaminglykanů.

Konečně příklady syntetických polymerů, které lze použít jako složku (b2) v clathrátu (B), jsou například ty, zvolené ze skupiny, sestávající z poloxamerů.

Clathrát je inkluzní komplex, tvořený molekulou, jmenovitě hostující molekulou, uzavřenou v kleci, vytvořené jinou molekulou, a to hostitelskou molekulou.

Konkrétněji teorie vytváření clathrátu zahrnuje komplexaci hostující a hostitelské molekuly, popsanou následující rovnicí:



Pokud se stechiometrie vzájemně reagujících molekul [hostitelské]:[hostující], kde hranaté závorky označují molární koncentraci, rovná poměru 1:1, může být v případě termodynamické rovnováhy komplexační konstanta "K" definována následovně:

$$K = \frac{[\text{hostitel—host}]}{[\text{hostitelská m.}] \times [\text{hostující m.}]}$$

Tato rovnice vyjadřuje, že v případě ekvimolární směsi ($[\text{hostitelská m.}] = [\text{hostující m.}] = 1 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$) závisí (molární) koncentrace vytvořeného komplexu [hostitel—host] pouze na velikosti parametru K.

Hodnota $\log K$ komplexace clathrátu (A) mezi β -cyklodextrinem (β -CD), kde β -CD představuje hostitelskou molekulu, a hostující molekulou amantadinu, nebo hostující molekulou ve formě hydrochloridu 1-aminoadamantanu (AMANT), tedy lékem, patřícím mezi léky proti

Parkinsonově chorobě [C. J. Gean a F. H. Meyers, POCKET DRUG GUIDE- druhé vydání, Williams & Wilkoms, Baltimore, MD, USA, (19 při 25 °C, pH 7,2)], se rovná $3,92 \pm 0,02$ nebo $5,04$ ([M. V. Rekharsky a Y. Inoue, Chem. Rev. 98, 1875, 1998). Proces komplexace amantadinové molekuly s molekulou β -CD je znázorněn na Obr. 2.

Adamantylová skupina (téměř kulovitého tvaru) je jednou z nejlepších hostujících struktur, která pevně sedí v hostitelské dutině molekuly β -CD (W. C. Cromwell se spoluautory, J. Phys. Chem. 89, 326, 1985; C. Amiel a B. Sébille, J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem. 25, 61, 1996). Hodnota rovnovážné komplexační konstanty K různých adamantanových derivátů s nesubstituovanými a se substituovanými β -cyklodextriny se pohybuje v rozmezí od 10^4 do 10^5 mol \times l⁻¹. Jedna z nejvyšších hodnot log K , a to $7,8 \pm 0,1$ při 25 °C, se získá komplexací indolu s α -CD (M. V. Rekharsky a Y. Inoue, Chem. Rev. 98, 1875, 1998).

Obr. 3 schématicky znázorňuje proces asociace (spojování) takových dvou derivátů hyaluronanu o vysoké molekulové hmotnosti. Jejich makromolekulární řetězce nesou buď substituenty hostujícího typu (AMANT), nebo hostitelského typu (β -CD), které jsou schopné se do sebe velmi pevně zaklínit (jako háček do oka). V případě mnohočetného zaklínění hostitelské a hostující části hyaluronanových derivátů, jak k tomu dochází v případě clathrátových komplexů podle předkládaného vynálezu, bude vytvořen stálý makromolekulární agregát.

V clathrátu podle předkládaného vynálezu se molární poměr derivátu hyaluronové kyseliny s cyklodextrinem a hyaluronové kyseliny s amantadinem s výhodou pohybuje od 10:90 do 90:10 a lépe od 80:20 do 50:50, zatímco molekulová hmotnost tohoto komplexu je pro měkké gely s výhodou v rozmezí od 500 do 25 000 a lépe od 2 000 do 20 000. U

tvrdých gelů ovšem tato hodnota přesahuje horní hranici a není stanovitelná.

Molekulová hmotnost výchozí hyaluronové kyseliny, použité pro přípravu clathrátu podle tohoto vynálezu, je s výhodou v rozmezí od 100 do 2 000.

Deriváty hyaluronové kyseliny s cyklodextriny jsou s výhodou ty, které se získají přímou esterifikací karboxylové skupiny hyaluronové kyseliny s cyklodextrinem, přičemž k substituci dochází na primárních hydroxylových skupinách ($-\text{CH}_2-\text{OH}$) α -D-glukopyranosylových jednotek cyklodextrinu postupem, který je popsán v publikaci "Cyclodextrin derivative of hyaluronan" L. Šoltésem a spoluautory (Carbohydrate Polymers 39, 17-24, 1999).

Podle jiného upřednostňovaného ztělesnění jsou cyklodextrinovými estery hyaluronové kyseliny ty, které se získají reakcí cyklodextrinů a hyaluronových kyselin za přítomnosti mezeríkové skupiny (spaceru).

Podle zvláště upřednostňovaného řešení je mezeríkovou skupinou (spacerem) dihydrazid kyseliny adipové. V takovém případě postup přípravy derivátů hyaluronové kyseliny s cyklodextrinem podle předkládaného vynálezu zahrnuje kroky, v nichž:

- a) se vytvoří počáteční hydrazidová skupina ($-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}$) mezi dihydrazidem kyseliny adipové $/\text{NH}_2-\text{NHCO}(\text{CH}_2)_4\text{CONH}-\text{NH}_2/$ a karboxylovými skupinami předem aktivované hyaluronové kyseliny;
- a
- b) úspěšnou reakcí druhé hydrazidové funkční skupiny ($\text{NH}_2-\text{NHCO}-$) dihydrazidového adipátového derivátu hyaluronové kyseliny s předem aktivovanými primárními hydroxyly cyklodextrinu se vytvoří

konečný produkt, který se může znázornit jako
HA-CO-NH-NH-(CH₂)₄CONH-NH-COO-CYKLODEXTRIN.

V tomto postupu se krok (a) s výhodou provádí v přítomnosti vodného pufracího roztoku při pH 5,5, a sestává z přidání 2(N-morfolino)ethansulfonátu sodného a dihydrazidu kyseliny adipové k hyaluronové kyselině, aktivované 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimidem. Derivát hyaluronové kyseliny s dihydrazidem kyseliny adipové se z reakční směsi s výhodou získává dialýzou a lyofilizací (sublimačním sušením). Krok (b) se s výhodou provádí přidáním adipátového dihydrazidového derivátu kyseliny hyaluronové k vodnému roztoku cyklodextrinu, předem aktivovanému tetrafluorboritanem 1-kyano-4-dimethyl-aminopyridinia v acetonitrilu za přítomnosti triethylaminu a reakce se zastavuje přidávkem ethanolaminu. Produkt se pak získává dialytickou ultrafiltrací a nakonec lyofilizací.

Cyklodextriny pro přípravu derivátů hyaluronové kyseliny, použitých v clathrátu (A) a (B), jsou s výhodou zvoleny ze skupiny, sestávající z: α -cyklodextrinu, β -cyklodextrinu, γ -cyklodextrinu, propyl- β -cyklodextrinu, sulfobutyl- β -cyklodextrinu a amino- nebo hydrazino- β -cyklodextrinu.

Tyto deriváty kyseliny hyaluronové mají s výhodou stupeň substituce karboxylových funkčních skupin (tedy procenta karboxylových skupin hyaluronové kyseliny, reagujících s cyklodextrinem, vypočítaná vzhledem k celkovému počtu funkčních skupin karboxylové kyseliny, přítomných v uvedené molekule) v rozmezí od 0,5 a 50 a ještě lépe od 2 do 20 %.

Způsob výroby derivátů kyseliny hyaluronové s amantadinem, používaných pro přípravu clathrátů (A) a (C) podle předkládaného

vynálezu, zahrnuje zejména vytvoření amidové vazby mezi předem aktivovanou hyaluronovou kyselinou a amantadinem ve vodném roztoku v přítomnosti pufru.

Podle upřednostňovaného ztělesnění je amantadinovým aktivátorem 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid a pufrům je 2(N-morfolino)-ethansulfonát sodný.

Deriváty hyaluronové kyseliny s amantadinem mají s výhodou stupeň substituce (jmenovitě procentní množství karboxylových skupin hyaluronové kyseliny, které reagovaly s amantadinem, vypočítané z celkového množství karboxylových funkčních skupin, přítomných v uvedené molekule) se v rozmezí od 0,5 do 25 a lépe od 2 do 10 %.

Předkládaný vynález se dále týká farmaceutických prostředků, obsahujících jako aktivní přísadu derivát hyaluronové kyseliny s cyklodextrinem, nebo alternativně derivát hyaluronové kyseliny s amantadinem v kombinaci s vhodnými přídavnými látkami a/nebo ředidly.

Farmaceutické prostředky podle předkládaného vynálezu mohou být vhodné pro orální, parenterální a místní léčbu a mohou být použity zejména ve všech oblastech, v nichž je potřebné obnovení viskoelastičnosti; důležitá je také snadnost injekce. Zahrnují prostředky pro obecnou chirurgii (jako materiály pro výplně umělých protéz), pro maxilofaciální chirurgii (například materiály pro injekce k vyplnění vrásek, materiály používané při náhradě měkkých tkání a pro růst tkání), arthroskopickou chirurgii (například jako lubrikační materiály), nebo pro viskodoplnění kloubů, a to i kloubů o menší velikosti jako jsou klouby článků prstů, kotníků a oblasti spánků a dolní čelisti (temporomandibulární).

Nadto může být derivát hyaluronové kyseliny s cyklodextrinem použit k podpoře výroby farmaceutických forem, zahrnujících přenos nebo řízené uvolnění léků a/nebo biologicky aktivních sloučenin, používaných při léčbě poruch v oboru dermatologie, očního lékařství, gynekologie, onkologie, cévního lékařství, neurologie, orthopedie a revmatologie. Takovými aktivními sloučeninami mohou být protiinfekční činidla, protimikrobiální činidla, protizánětlivá činidla, cytostatika, cytotoxické sloučeniny, protivirové sloučeniny a anestetická činidla a růstové faktory. Derivát může být ve spojení s radioaktivními sloučeninami i neradioaktivními sloučeninami použit v kontrastních systémech, jako značka při diagnostice *in vivo*, k identifikaci a léčbě rakovinných nebo poškozených tkání.

Prostředky, kombinující biologické materiály na bázi hyaluronové kyseliny podle předkládaného vynálezu s léky a/nebo biologicky aktivními sloučeninami, jsou vhodné pro nový léčebný přístup, při němž po uvolnění farmakologicky aktivní přísady následuje samospojení složek polymeru *in situ*. Farmakologická aktivita uvolňované sloučeniny je tedy spojena s lubrikačním účinkem a s účinkem chránícím tkáň, které poskytuje materiál zesíťovaný *in situ*. Takový přístup je vhodný v oborech jako je dermatologie, ortopedie a revmatologie (například pro léčbu osteoartritidy a revmatoidní artritidy) a oční lékařství (například při léčbě oční infekce a zánětu).

Jak bylo dříve stanoveno, výše uvedené farmaceutické prostředky jsou v rozsahu předkládaného vynálezu s výhodou ve formě injikovatelných roztoků, a s výhodou se používají v přidružení, spojení, tak, aby došlo k vytvoření léčiva s obsahem clathrátu podle předkládaného vynálezu, který je formován *in situ*.

Léčivo podle předkládaného vynálezu může kromě clathrátu obsahovat také aktivní přísadu, která je s výhodou zvolena ze skupiny,

sestavající z nesteroidních nebo steroidních protizánětlivých léků, antibiotik a protirakovinných léků. Tyto léky o nízké molekulové hmotnosti mohou na nejprve sloužit jako kompetující látky (blokuující látky) spojení dvou derivátů hyaluronové kyseliny a postupně jsou vyplavovány, což umožňuje tvorbu clathrátu.

Zvláště se upřednostňuje lék podle předkládaného vynálezu, který obsahuje piroxicam.

Lék podle předkládaného vynálezu může obsahovat kromě dříve uvedených aktivních přísad, nebo místo nich, biologicky aktivní sloučeninu, zvolenou ze skupiny, sestávající z růstových faktorů, cytokinů a/nebo buněčného materiálu, zvoleného ze skupiny, sestávající z osteocytů, chondrocytů, kmenových buněk a mesenchymálních buněk.

V léku podle předkládaného vynálezu jsou aktivní přísady s výhodou navázány na cyklodextrin.

Nejnadějnější oblastí použití clathrátových (na bázi hyaluronové kyseliny) biologických materiálů a léků je léčba pacientů, stejně jako zlepšení jejich zdravotního stavu při diagnózách jako je zánět kloubů - arthritida, jako jsou oční záněty (konjunktivitis), zhoubné nádory, kožní poranění a podobně.

Níže uvedené příklady ozřejmují výrobu derivátů hyaluronové kyseliny s cyklodextrinem a s amantadinem, stejně jako tvorbu clathrátu, ale neomezují rozsah vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

V následujících příkladech 1 a 2 byla použita hyaluronová kyselina o vysoké molekulové hmotnosti, zatímco v příkladech 3 až 7 byla použita její sodná sůl.

Molekulární parametry, týkající se hodnoty molekulové hmotnosti použité hyaluronové kyseliny, byly následovné: číselně střední molekulová hmotnost (M_n) = 350,7 (326,5); hmotnostně střední molekulová hmotnost (M_w) = 647,1 (659,4 a 666,0) a z-střední molekulová hmotnost (M_z) = 1 050,4 (1 066,1). Parametry $\langle Rg_z^2 \rangle^{1/2}$, a to kvadratický střední poloměr setrvačnosti a A_2 , jmenovitě druhý viriální koeficient, stanovený ve vodném roztoku chloridu sodného (0,15 mol/l), se rovnaly 97,4 (97,2) nm, respektive $1,94 \times 10^3$ mol.ml/g².

Příklad 1

Příprava HA- β -CD derivátu za použití mezerníkové skupiny

Hyaluronová kyselina (106 mg) se rozpustí v vodném roztoku pufru 2-(N-morfolino)-ethansulfonátu sodného (MES; 0,05 mol/l; 57 ml; pH = 5,5). Následně se do roztoku přidají mezerníková skupina, tj. hydrazid kyseliny adipové (ADH; 600 mg) a aktivátor (karboxylových skupin hyaluronové kyseliny), tj. 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDC; 127 mg). Po přidání celého množství EDC se reakční směs podrobí dialýze a meziproduct HA-ADH se získá lyofilizací.

K vodnému roztoku β -CD (100 mg/30 ml) se přidá aktivátor hydroxylových skupin, tetrafluorboritan 1-kyano-4-dimethylamino-pyridinia (CDAP; 20 mg) v roztoku acetonitrilu (2 ml) s přídávkem triethylaminu (0,2 mol; pH 7,8). Po uplynutí 2 minut se přidá vodný roztok HA-ADH (90 mg/10 ml). Reakce se zastaví po uplynutí 2 hodin přídávkem ethanoaminu (2 ml). Reakční směs se dialyzuje a produkt se následně čistí opakovanou ultrafiltrací a konečně lyofilizací (tento postup je vhodný pro zavedení jakékoliv homo-bifunkční mezerníkové skupiny, obsahující (dvě) koncové aminové nebo hydrazinové skupiny).

Příklad 2

Postup je stejný jako v Příkladu 1, ovšem místo β -cyklodextrinu jsou použity α -CD, γ -CD nebo kterýkoliv ze substituovaných cyklodextrinů, jako hydroxyethyl- β -CD, hydroxypropyl- β -CD, (částečně substituovaný) sulfobutyl- β -CD a podobně.

Příklad 3

Příprava HA- β -CD derivátu za použití vazby prostřednictvím aminové nebo hydrazinové skupiny

Při tomto použití se aminový nebo hydrazinový derivát β -CD připravuje výměnou například tosylové skupiny. Reakce hyaluronové kyseliny s aminovým nebo hydrazinovým derivátem β -CD probíhá za stejných podmínek, jaké byly popsány v Příkladu 1, tj. za použití aktivace karboxylových skupin hyaluronové kyseliny prostřednictvím EDC.

Příklad 4

Postup je stejný jako v Příkladu 3, ovšem místo β -CD se používá α -CD nebo γ -CD a podobně.

Příklad 5

Příprava derivátů HA-AMANT

Hyaluronová kyselina (130 mg) se rozpustí v pufru MES (0,05 mol/l; 20 ml; pH 5,5). K roztoku se za stálého míchání přidá amantadin, tj. hydrochlorid 1-amino-adamantanu (AMANT; 270 mg), rozpuštěný v 35

ml stejného pufru MES a následně se přidá EDC, aktivátor karboxylových skupin hyaluronové kyseliny (150 mg). Reakční směs se míchá při teplotě místnosti po dobu přibližně 20 hodin. Hodnota pH se udržuje v rozmezí 6,0 až 6,5 za použití zředěné HCl (0,01 mol/l). Po skončení reakce se roztok zfiltruje (za použití filtračního papíru "Whatman č. 3"), filtrát se dále čistí opakovanou (pětinásobnou) ultrafiltrací (za použití membrány "Amicon PM-10"). Výsledný produkt (HA-AMANT) se získá (s výtěžkem 105 mg) lyofilizací. Molekulární parametry připraveného derivátu HA-AMANT jsou uvedeny v Tabulce 1.

Příklad 6

Asociace/komplexace typu host-hostitel dvou derivátů hyaluronové kyseliny (o vysoké molekulové hmotnosti)

HA-AMANT (syntetizovaný tak, jak bylo popsáno v Příkladu 5) a HA- β -CD (a syntetizovaný tak, jak bylo popsáno v "Cyclodextrin derivative of hyaluronan", L. Soltéz se spoluautory, Carbohydrate Polymers 39, 17-24, 1999) byly rozpuštěny ve vodném roztoku chloridu sodného (0,15 mol/l) a smíseny takovým způsobem, že jejich molární poměr [HA-AMANT]/[HA- β -CD] činil 80 : 20 nebo 50 : 50. Hodnota hmotnostně střední molekulové hmotnosti (M_w), získaná pro ekvimolární směs těchto dvou biologických polymerů za použití MALLS, byla 556,0, což bylo významně vyšší než hodnoty M_w jednotlivých složek, stejně jako prostý aritmetický součet jejich hodnot (Tabulka 1). Podobně hodnota $\langle Rg_z^2 \rangle^{1/2} = 80,6$ nm, stanovená pro ekvimolární směs, byla podstatně vyšší než tato hodnota získaná u oddělených čistých makrobiomolekul, která činidla 23,8 (25,2) nm pro HA-AMANT a 40,2 nm pro HA- β -CD.

Příklad 7

Postup byl shodný s postupem, popsaným v Příkladu 6, ale v tomto zvláštním případě se roztok vzorku, připraveného podle popisu v Příkladu 6, smísí s roztokem vzorku, připraveného postupem popsaným v Příkladech 1 až 5.

Příklad 8

Asociace/komplexace typu host-hostitel derivátu HA- α -CD s polyethylenglykolovým dendrimerem.

HA- α -CD (syntetizovaný tak, jak bylo popsáno v Příkladu 1), o molekulové hmotnosti 150 000, se rozpustí se vodném roztoku chloridu sodného (0,15 mol/l) a smísí se s jiným roztokem chloridu sodného (0,15 mol/l) a polyethylenglykolového (PEG) dendrimeru (vyráběného formou Shearwater, USA) o molekulové hmotnosti 20 000. Hmotnostě střední molekulová hmotnost ekvimolární směsi těchto dvou biopolymerů činí 820 000.

Příklad 9

Asociace/komplexace typu host-hostitel polymerizovaného β -CD s HA-AMANT.

Polymerizovaný β -CD (vyráběný firmou CYCLOLAB, Maďarsko), o molekulové hmotnosti 135 000, se rozpustí ve vodném roztoku chloridu sodného (0,15 mol/l) a smísí se s jiným roztokem chloridu sodného (0,15 mol/l) a HA-AMANT (připraveným tak, jak bylo popsáno v Příkladu 5) o molekulové hmotnosti 91 200. Hmotnostně střední molekulová hmotnost ekvimolární směsi těchto dvou biopolymerů činí 427 000.

Tabulka 1

Molekulární parametry syntetizovaných (bio)polymerů měřených jednotlivě a po jejich spojení/smísení.

	HA-β-CD	HA-AMANT		[HA-AMANT]/ [HA-β-CD] 80:20	[HA-AMANT]/ [HA-β-CD] 50:50
Parametr	SEC-MALLS	SEC-MALLS	MALLS	MALLS	MALLS
M_z	302,9	156,1			
M_w	185,3	86,8	91,2	293,0	556,0
M_n	106,2	51,0			
$\langle Rg_z^2 \rangle^{1/2}$ (nm)	40,2	23,8	25,2	69,6	80,6

Z kvantitativního hlediska hodnoty $\langle Rg_z^2 \rangle^{1/2}$, stejně jako hodnoty M_w , stanovené pro asociáty po smíchání obou biopolymerů, významně překročily tytéž hodnoty, určené pro odděleně měřené makromolekulární složky. Vzhledem k tomu, že v případě jednoduchého sečtení ($[1] + [1]$), by hodnoty, získané pro parametry, měly velikost: $\langle Rg_z^2 \rangle^{1/2} = 64,0$ (65,4) nm a $M_w = 272,1$ (276,5), je potom sklon k vytváření větších agregátů po komplexaci obou typů makromolekulárních derivátů hyaluronové kyseliny významný.

Zastupuje:

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Clathrát, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je utvářen spojením
- derivátu kyseliny hyaluronové (a),
 - derivátu kyseliny hyaluronové, odlišným od (a) a schopným vytvářet clathrát, a/nebo
 - složkou neobsahující částici kyseliny hyaluronové, ale schopnou vytvářet s (a) clathrát.

2. Clathrát podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je zvolený ze skupiny, sestávající z:

- clathrátu (A), přičemž složkou (a) je derivát hyaluronové kyseliny s cyklodextrinem a složkou (b1) je hyaluronová kyselina s amantadinem;
- clathrátu (B), přičemž složkou (a) je hyaluronová kyselina s cyklodextrinem a složkou (b2) je vodou rozpustný přírodní, polosyntetický anebo syntetický polymer,
- clathrátu (C), přičemž složkou (a) je hyaluronová kyselina s amantadinem a složkou (b2) je polymerizovaný cyklodextrin.

3. Clathrát podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený derivát hyaluronové kyseliny s cyklodextrinem je zvolen ze skupiny, sestávající z derivátu hyaluronové kyseliny s cyklodextrinem, získaného přímou esterifikací karboxylových skupin hyaluronové kyseliny s cyklodextrinem a derivátu hyaluronové kyseliny s cyklodextrinem, získaného pomocí mezeríkové skupiny.

4. Clathrát podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedenou mezeríkovou skupinou je dihydrazid kyseliny adipové.

5. Clathrát podle kteréhokoliv z nároků 2 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že cyklodextrin je zvolen ze skupiny, sestávající z:

α -cyklodextrinu, β -cyklodextrinu, γ -cyklodextrinu, propyl- β -cyklodextrinu, sulfobutyl- β -cyklodextrinu, amino- β -cyklodextrinu nebo hydrazin- β -cyklodextrinu.

6. Clathrát podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněné deriváty hyaluronové kyseliny mají stupeň substituce karboxylových funkčních skupin v rozmezí od 0,5 do 50 %.

7. Clathrát podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený stupeň substituce je v rozmezí od 2 do 50 %.

8. Clathrát podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že derivát hyaluronové kyseliny s amantadinem má stupeň substituce v rozmezí od 0,5 do 25 %.

9. Clathrát podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený derivát hyaluronové kyseliny má stupeň substituce v rozmezí od 2 do 10 %.

10. Clathrát podle kteréhokoliv z nároků 1 až 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako výchozí reagující sloučenina je používána hyaluronová kyselina, mající molekulovou hmotnost v rozmezí od 100 do 2 000.

11. Clathrát podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je clathrátem (A).

12. Clathrát podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, že má molekulovou hmotnost v rozmezí od 500 do 25 000 a molární poměr derivátu hyaluronové kyseliny s cyklodextrinem vůči derivátu hyaluronové kyseliny s amantadinem v rozmezí od 10 : 90 do 90 : 10.

13. Clathrátový komplex podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, že má molekulovou hmotnost v rozmezí od 2 000 do 20 000 a molární poměr v rozmezí od 80 : 20 do 50 : 50.

14. Clathrát podle nároku 2, zvolený z clathrátu (B), v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedené přírodní polymery, jež mají být použity jako složka (b2), jsou zvoleny ze skupiny, sestávající z kolagenu, společných sraženin kolagenu a glykosaminoglykanů, celulózy, polysacharidů, agarózy, xanthanu, gellanu, solí nebo esterů kyseliny alginové, polymannanu, polyglykanů, škrobu a přírodních gum.

15. Clathrát podle nároku 14, v y z n a č u j í c í s e t í m, že polosyntetické polymery, jež mají být použity jako složka (b2) v clathrátu (B), jsou zvoleny ze skupiny, sestávající z kolagenu zesíťovaného síťovacími činidly, derivátů celulózy, hyaluronové kyseliny, chitinu, chitosanu, gellanu, xanthanu, pektinu nebo pektinové kyseliny, polyglykanů, polymannanu, agaru, agarózy, přírodní gummy a glykosaminoglykanů.

16. Clathrát podle nároku 14, v y z n a č u j í c í s e t í m, že syntetické polymery jsou zvoleny ze skupiny sestávající z poloxamerů.

17. Clathrát podle nároku 16, v y z n a č u j í c í s e t í m, že poloxamerem je polyethylenglykol o molekulové hmotnosti 2 000.

18. Clathrát podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je zvolen z clathrátu (C) a polymerizovaným cyklodextrinem je polymerizovaný β -cyklodextrin, mající molekulovou hmotnost 91 200.

19. Lék, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako aktivní přísadu obsahuje clathrátový komplex podle kteréhokoliv z nároků 1 až 18.

20. Lék podle nároku 19, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje aktivní přísadu o nízké molekulové hmotnosti.

21. Lék podle nároku 20, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená aktivní přísada je zvolena ze skupiny, sestávající z nesteroidních nebo steroidních protizánětlivých léků, antibiotik a protinádorových léků.

22. Lék podle kteréhokoliv z nároků 20 a 21, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedenou aktivní přísadou je piroxicam.

23. Lék podle kteréhokoliv z nároků 20 až 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že kromě uvedené aktivní přísady, nebo místo ní, obsahuje biologicky aktivní sloučeninu a/nebo buněčný materiál.

24. Lék podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená biologicky aktivní sloučenina je zvolena ze skupiny, sestávající z růstových faktorů, cytokinů.

25. Lék podle nároku 24, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený buněčný materiál je zvolen ze skupiny, sestávající z osteocytů, chondrocytů, kmenových buněk a mesenchymálních buněk.

26. Derivát hyaluronové kyseliny s cyklodextrinem, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je získán prostřednictvím mezerníkové skupiny.

27. Derivát hyaluronové kyseliny podle nároku 26 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedenou mezerníkovou skupinou je hydrazid kyseliny adipové.

28. Způsob výroby derivátu hyaluronové kyseliny podle nároku 27, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje kroky, v nichž :

- a) se vytváří počáteční hydrazidová skupina (-CO-NH-NH) mezi dihydrazidem kyseliny adipové /NH₂-NHCO(CH₂)₄CONH-NH₂/ a karboxylovými skupinami předem aktivované hyaluronové kyseliny;
- a
- b) druhá hydrazidová funkční skupina (NH₂-NHCO-) dihydrazidového adipátového derivátu hyaluronové kyseliny z kroku (a) se ponechá reagovat s předem aktivovaným cyklodextrinem.

29. Způsob výroby podle nároku 28, v y z n a č u j í c í s e t í m, že krok (a) se provádí v přítomnosti vodného roztoku pufru tvořeného 2(N-morfolino)ethansulfonátem sodným při pH 5,5 a k hyaluronové kyselině aktivované 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidem se přidá dihydrazid kyseliny adipové.

30. Způsob výroby podle kteréhokoliv z nároků 28 nebo 29, v y z n a č u j í c í s e t í m, že krok (b) se provádí přidáním derivátu hyaluronové kyseliny s dihydrazidem kyseliny adipové, získaným z kroku (a), k vodnému roztoku cyklodextrinu, předem aktivovaného tetrafluorboritanem 1-kyano-4-dimethylaminopyridinia v acetonitrilu v přítomnosti triethylaminu a reakce se zastaví přidávkem ethanolaminu.

31. Derivát hyaluronové kyseliny s amantadinem.

32. Způsob výroby derivátu hyaluronové kyseliny podle nároku 31, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje krok, v němž se vytváří amidová vazba mezi předem aktivovanou hyaluronovou kyselinou a amantadinem ve vodném roztoku v přítomnosti pufru.

33. Způsob výroby podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako amantadinový aktivátor se používá 1-ethyl-3(3-

dimethylaminopropyl)karbodiimid a jako pufr se používá 2(N-morfolino)ethansulfonát sodný.

34. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje jako aktivní přísadu derivát hyaluronové kyseliny podle kteréhokoliv z nároků 26 a 27 v kombinaci s vhodnými přídatnými látkami a/nebo ředidly.

35. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje jako aktivní přísadu derivát hyaluronové kyseliny podle nároku 31 v kombinaci v vhodnými pomocnými látkami a/nebo ředidly.

36. Farmaceutický prostředek podle nároku 34 nebo 35, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je vhodný pro orální, parenterální a místní podávání.

37. Místně nebo parenterálně podávaný farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že v kombinaci s vhodnými přídatnými látkami a/nebo ředidly obsahuje jako aktivní přísadu derivát hyaluronové kyseliny s cyklodextrinem, získaný přímou esterifikací hyaluronové kyseliny s cyklodextrinem.

38. Farmaceutický prostředek podle nároku 36 a 37, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je ve formě injikovatelného nebo nitrokloubního roztoku.

39. Lék podle kteréhokoliv z nároků 19 až 25, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je získán spojením dvou farmaceutických prostředků ve formě injikovatelných roztoků, obsahujících jako aktivní přísadu derivát hyaluronové kyseliny s cyklodextrinem, respektive derivát hyaluronové kyseliny s amantadinem, čímž je *in situ* získán clathrát (B) podle nároku 2.

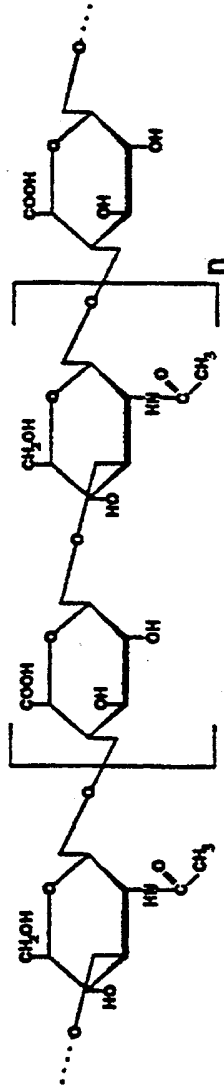
40. Lék podle nároku 39, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje aktivní přísadu, biologicky aktivní sloučeninu a/nebo buněčný materiál, vázané na cyklodextrin.

41. Farmaceutický prostředek s řízeným uvolňováním, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje jako nosné činidlo derivát hyaluronové kyseliny s cyklodextrinem.

42. Farmaceutický prostředek s řízeným uvolňováním podle nároku 41, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje aktivní přísadu nebo biologicky aktivní sloučeninu pro léčbu poruch v oboru dermatologie, očního lékařství, gynekologie, onkologie, cévního lékařství, neurologie, orthopedie a revmatologie.

43. Kontrastní média obsahující radiaktivní sloučeninu, v y z n a č u j í c í s e t í m, tato radioaktivní sloučenina je sdružena s derivátem hyaluronové kyseliny s cyklodextrinem.

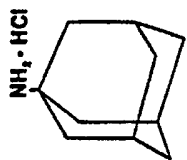
Zastupuje:



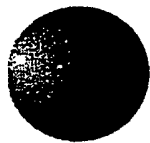
Obr. 1

2/3

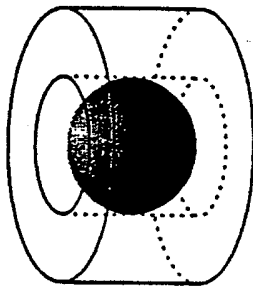
24.01.03 2002-3029



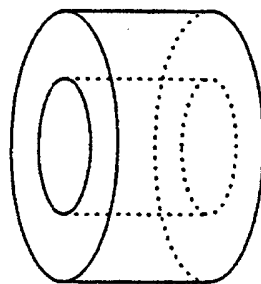
a



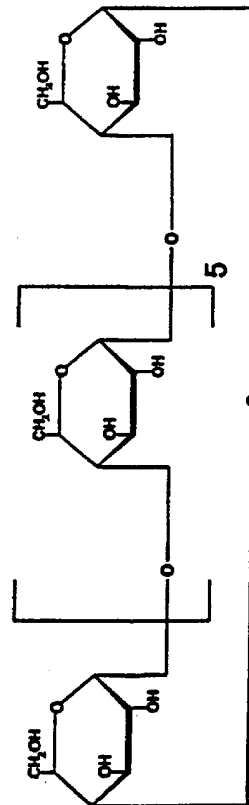
A



A---B



B



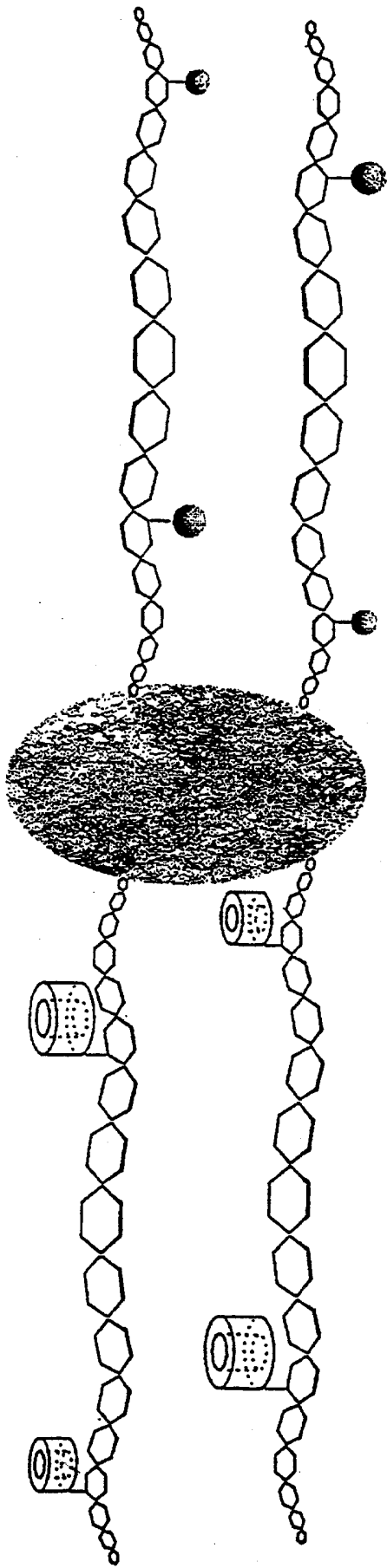
b

Obr. 2

3/3

24.01.03

102-50



Obr. 3