

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044423**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.08.25

(21) Номер заявки
202192534

(22) Дата подачи заявки
2020.01.28

(51) Int. Cl. **C08B 37/08** (2006.01)
A61K 31/728 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
C08L 5/08 (2006.01)
A61K 9/107 (2006.01)

(54) **СИСТЕМЫ СТАБИЛИЗАЦИИ И КОНТРОЛИРУЕМОГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ДЛЯ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, НЕСТАБИЛЬНЫХ ПРИ СТЕРИЛИЗАЦИИ**

(31) **102019000003887**

(32) **2019.03.18**

(33) **IT**

(43) **2021.11.29**

(86) **PCT/IB2020/050636**

(87) **WO 2020/188365 2020.09.24**

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

(72) Изобретатель:
Гуаризе Кристиан, Пиццокаро Карло
(IT)

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

(56) **CN-A-105820270**
WO-A1-2018092013

(57) Раскрыты алкениламиды сульфатированной гиалуроновой кислоты и их применение для стабилизации и высвобождения лекарственных средств в форме мицеллярных суспензий, которые могут быть введены местным путем и/или местно-регионально, особенно внутрисуставно.

B1

044423

044423

B1

Настоящее изобретение относится к алкениламидам сульфатированной гиалуроновой кислоты и их применению для стабилизации и высвобождения лекарственных средств в форме мицеллярных суспензий, которые могут быть введены местным и/или местно-региональным образом, особенно внутрисуставно.

Уровень техники

Местное или местно-региональное введение изучают все чаще для преодоления проблем, связанных с системной токсичностью или фармакокинетикой лекарственных средств; возможность сделать лекарство доступным на его сайте действия будет понижать водимые дозы, что еще больше уменьшит вероятность побочных эффектов. Это преимущество особенно важно при лечении хронических нарушений, требующих постоянного введения, или нарушений, которые являются этиологически и биохимически сложными. Одним из наиболее значимых примеров указанных нарушений является остеоартроз (ОА), который возникает из-за сложной системы механических и биохимических взаимодействий, конечным результатом которых является разрушение суставной ткани. Хотя первоначальный механизм повреждения в значительной степени неизвестен, известны изменения, наносящие ущерб хрящу и в последствие субхондральной кости, такие как снижение содержания агрекана и протеогликана в суставном хряще, увеличение количества коллагена типа I (субхондрального) по сравнению с типом II (присутствует в гиалиновом хряще), дисбаланс метаболической и катаболической активности хондроцитов и массивный дисбаланс внутрисуставной ферментативной активности с избыточной экспрессией (среди прочего) металлопротеиназ, цитокинов и воспалительных ферментов. Все это приводит к растрескиванию внутрисуставного хряща, вначале поверхностному и затем поражающему всю толщину хряща, пока в наиболее серьезных случаях не приводит к эрозии субхондральной кости и появлению хорошо известных клинических симптомов. Согласно последним открытиям, основной акцент для определения стратегий эффективного лечения следует искать в гуморальных взаимодействиях между хрящом и субхондральной костью.

Таким образом, очевидно, что новые рубежи в лечении остеоартроза должны основываться на многофакторном подходе, учитывающем сложность заболевания.

Описаны многочисленные лекарственные средства, некоторые из которых также используют для лечения других нарушений, которые проявляют активность *in vitro* на различных моделях ОА и, следовательно, потенциально полезны для клинических целей. Однако их разработка в системных препаратах для использования человеком часто сильно ограничивается проблемами токсичности и фармакокинетики.

Стратегия, связанная с этими аспектами, заключается в местном или местно-региональном, в частности внутрисуставном, введении, которое устраняет проблемы системной фармакокинетики и токсичности. Для внутрисуставного введения требуются рецептуры в водном растворителе, которые могут распределяться в синовиальной жидкости и интегрироваться в нее, не вызывая местных воспалительных явлений, которые часто возникают в случае неводных растворителей. Значение pH рецептуры должно быть таким же или очень схожим с физиологическим значением pH, чтобы гарантировать отсутствие дисбаланса в суставе, уже измененном текущим нарушением. Рецептура должна обеспечивать локализованное, продолжительное, постепенное высвобождение активного ингредиента, которое ограничено сайтом введения. И, наконец, переносимый активный ингредиент должен быть стабилен в условиях стерилизации стандартными способами.

Эти требования также применимы к местно-региональным вариантам применения за пределами суставного отдела.

Однако многие из лекарственных средств, представляющих наибольший интерес в описанной выше области, как правило, довольно чувствительны к изменениям pH, нестабильны при тепловой стерилизации и имеют преимущественно гидрофобную природу. Будучи гидрофильными, они склонны быстро выпадать в осадок в водном растворе, и, следовательно, после введения не обеспечивают достаточного времени пребывания для проявления фармакологического эффекта.

Примеры лекарственных средств, подходящих для местно-регионального введения включают рапамицин (сиролимус), статины, кальцитонин, эверолимус, паклитаксел и стероидные соединения.

Рапамицин представляет собой макролидный антибиотик, полностью нерастворимый в водных растворителях, который широко используют для предупреждения отторжения после трансплантации органов и в качестве покрытия для стентов, используемых для предотвращения рестеноза. Он также исследован на его влияния на суставы (Arthritis Res Ther, 2014, 16, 482) ввиду его способности активировать аутофагию в хондроцитах человека и его ингибирующего действия на mTOR, предотвращая таким образом развитие ОА. mTOR (мишень рапамицина в клетках млекопитающих) представляет собой протеинкиназу, отвечающую за фосфорилирование серина и треонина, которая регулирует рост, пролиферацию, подвижность и выживаемость клеток; она также активно участвует в процессе перерождения хряща, которое имеет место у пациентов, страдающих от остеоартроза. Таким образом, ингибирование mTOR рапамицином в настоящее время может предоставлять заслуживающую внимание стратегию противодействия остеоартрозу суставов.

Симвастатин и статины в целом, помимо их хорошо известных холестерин-снижающих эффектов, в течение некоторого времени исследовались на предмет их противовоспалительных эффектов (ингибирование ММП (MMP)) и их способности регулировать баланс остеобластов/остеокластов. Статины обычно нерастворимы в воде, нестабильны при кислом и щелочном pH и не могут быть стерилизованы нагреванием.

Триамцинолон и кортизоны в целом широко используют для внутрисуставного лечения ОА, но они нерастворимы в воде.

Кальцитонин используют из-за его воздействия на анаболизм хряща; он не полностью нерастворим в водном носителе, но имеет тенденцию очень быстро выпадать в осадок, что препятствует адекватному профилю высвобождения. Он также нестабилен при тепловой стерилизации.

Другими лекарствами, еще находящимися в стадии разработки, являются RN-1747, 4 α -форбол-12,13-дидеканоат (4 α PDD) и арахидоновая кислота, которые действуют на определенные ионные каналы, такие как TRPV4. Этот канал представляет собой канал, экспрессирующий в широком спектре тканей, участвующих в генерации опосредуемых кальцием сигналов, способствуя таким важным функциям, как поддержание клеточного объема и гомеостаза. Также было показано, что TRPV4 играет решающую роль в развитии и поддержании костно-мышечной и хрящевой ткани; нарушение функции TRPV4 тесно связано с проявлением воспалительных и остеоартритических проблем сустава (McNaughty, Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2015, 388, 437-450). Таким образом, способность также регулировать правильную активацию TRPV4 представляет собой важную мишень для лечения остеоартритических нарушений. Лекарственные средства, описанные выше, являются агонистами каналов TRPV4, способными регулировать их активацию и, следовательно, потенциально применимы для целей, описанных выше, но тот факт, что они плохо растворимы или даже нерастворимы в воде (как в случае RN-1747), исключает их клиническое применение.

Следовательно, существует очевидная потребность в системах, которые позволяют стабилизировать описанные молекулы как на стадии приготовления рецептуры, так и на стадии стерилизации, и одновременно обеспечивать контролируемое высвобождение на месте введения.

В документе US 2016/0279108 описана конъюгация рапамицина с низкомолекулярной гиалуроновой кислотой с помощью линкера, содержащего ароматические группы, с получением водорастворимого производного, способного проникать в лимфатическую систему и накапливаться в лимфатических узлах. В документе WO 2017044135 описаны рецептуры, содержащие рапамицин, капсулированный в фосфолипидные липосомы, которые, хотя и несут лекарственное средство, являются относительно большими (до 2 мкм) и могут создавать проблемы приготовления рецептур из-за их чувствительности к pH, ионной силе, градиенту носителя и др. Также описаны системы капсулирования для лекарственных средств, плохо растворимых в полимерных частицах (полимолочная кислота, полигликолевая кислота и др.). И, наконец, известные системы контролируемого высвобождения включают гидрогели на основе сильно гидратируемых полимеров (низкомолекулярная гиалуроновая кислота, коллаген, альгиновая кислота, альгинаты и др.), которые удерживают лекарство в сетке гидрогеля или высвобождает его постепенно по мере разрушения гидрогелевой структуры (WO 2013179258).

Сульфатированная гиалуроновая кислота (HAS), описанная в документах EP 0702699 и WO 2017/085622, легко проникает через кожные барьеры, тем самым облегчая проход фармакологически активных веществ. Совсем недавно обнаружено, что HAS обладает противовоспалительными свойствами, опосредуемыми модуляцией активности множества цитокинов, как про- и противовоспалительных. Следовательно, HAS может быть использована при лечении нарушений, опосредуемых изменением уровней цитокинов (ревматоидный артрит, астма, системные и кожные аутоиммунные заболевания, вирусные инфекции, атопический дерматит, экзема, витилиго и лимфомы, как сообщается в документах WO 2010130468 и WO 2010130466).

Описание изобретения

В настоящее время найдена система стабилизации и контролируемого высвобождения лекарственных средств, которые нестабильны при стерилизации стандартными способами и/или трудны для рецептурирования, которая включает смешение медикамента с алкениламидом сульфатированной гиалуроновой кислоты (HAS) и последующую обработку ультразвуком. Сульфатные группы делают гиалуроновую кислоту водорастворимой без образования гидрогеля и делают ее стерилизуемой фильтрованием, при этом амидирование C₄-C₂₀-алкениламиноом придает HAS частично гидрофобную природу, требуемую для ее смешения с соединениями, которые нерастворимы в воде.

Обработка ультразвуком приводит к образованию мицеллярных структур, гомогенно суспендированных в водном носителе (HAS); указанные суспензии можно стерилизовать путем фильтрования или нагревания с использованием известных методов, таких как автоклавирование.

Полученные суспензии также можно лиофилизировать, хранить при комнатной температуре и восстанавливать во время использования стерильным водным носителем без потери титра активного

ингредиента, и после введения на желаемый сайт прежде всего способны высвобождать активный ингредиент контролируемым образом.

Амиды сульфатированной гиалуроновой кислоты с C_4 - C_{20} -алкениламинами являются новыми и составляют первый объект изобретения.

Второй объект изобретения составляют водные мицеллярные суспензии амида сульфатированной гиалуроновой кислоты с C_4 - C_{20} -алкениламинами и гидрофобного или гидрофильного лекарственного средства.

Третьим объектом изобретения является способ приготовления мицеллярных суспензий, который включает:

взаимодействие C_4 - C_{20} -алкениламина с бензалкониевой или тетрабутиламмониевой солью сульфатированной гиалуроновой кислоты в апротонном неполярном растворителе в присутствии конденсирующих агентов;

смешение амида сульфатированной гиалуроновой кислоты, полученной на предыдущей стадии, с водной суспензией или раствором лекарства;

обработка смеси ультразвуком и стерилизующее фильтрование.

Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим указанные мицеллярные суспензии и необязательные наполнители, и к их применению для местного, местнорегионального, внутрисуставного или внутрикостного инъекционного введения, в частности для внутрисуставной инъекции, для лечения остеоартроза.

Подробное описание изобретения

Исходная гиалуроновая кислота, используемая в изобретении и предназначенная для сульфатированная и последующего амидирования, может быть получена и очищена известными методами, например, путем экстракции из петушиных гребней (EP 138572), ферментацией из *Streptococcus* (WO 2018/020458; WO 2019/016699), или биосинтезом из *Bacillus* (WO 2012/032154). Предпочтительная НА получена и очищена из *Streptococcus* со средневесовой молекулярной массой (MW) в интервале от 100000 до 250000 Да, в частности от 180000 до 230000 Да, далее называемую "MW 200 кДа", или НА со средневесовой MW в интервале от 500000 до 730000 Да. НА с MW 200 кДа особенно предпочтительна. "Средняя молекулярная масса" (MW) в данном случае средневесовую MW, рассчитанную методом "характеристической вязкости" (Terbojevich et al., Carbohydr. Res., 1986, 363-377).

Фракции НА, описанные выше, сульфатируют по известным методикам, особенно способами, описанными в документах EP 702699 и WO 2017/085622.

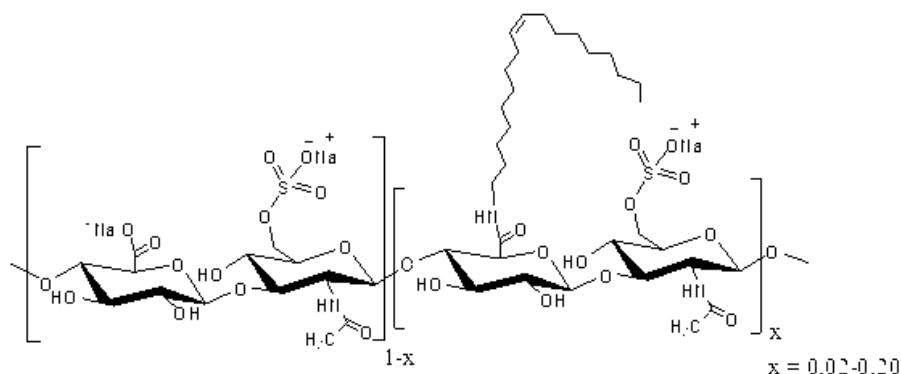
Число сульфатных групп на дисахаридное звено (степень сульфатирования) в амидах в соответствии с изобретением находится в интервале от 0,5 до 3,5. Обычно может быть использована степень сульфатирования, лежащая в интервале от 0,5 до 1,5 (HAS-1), 1,5 и 2,5 (HAS-2) или 2,5 и 3,5 (HAS-3). Предпочтительно используют HAS со степенью сульфатирования в интервале от 0,5 до 1,5 (HAS-1).

В соответствии с изобретением карбоксильные группы HAS вводят в реакцию с C_4 - C_{20} -алкениламинами с образованием амидной связи. Обычно функциональные группы, не вовлеченные в дериватизацию, превращают в соль с помощью щелочного или щелочноземельного иона, предпочтительно Na^+ . Амидирование проводят по известным методикам, предпочтительно, как описано в документе EP 1095064, с соответствующими адаптациями.

Степень дериватизации в мольных процентах (%) (амидирование) HAS, выраженная в виде отношения моли алкениламина/моли димера HAS, находится в интервале от 5 до 30%, предпочтительно от 10 до 25% и более предпочтительно от 10 до 17%.

Алкениламин предпочтительно содержит одну или две ненасыщенности, более предпочтительно одну ненасыщенность. Примерами предпочтительных аминов являются олеиламин, (2E)-гекс-2-ен-1-амин и пент-2-ен-1-амин. Олеиламин особенно предпочтителен.

Формула схематичного строения структурных подзвеньев олеиламида сульфатированной гиалуроновой кислоты в соответствии с изобретением показана ниже:



Амиды в соответствии с изобретением устойчивы к тепловой обработке и, следовательно, могут быть стерилизованы в автоклаве, поскольку амидная связь является термоустойчивой. Они также могут быть стерилизованы фильтрованием при 0,2 мкм, могут быть смешаны как с гидрофобными, так и гидрофильными лекарствами, суспендированы или солюбилизированы в водном растворителе с образованием водной суспензии мицеллярных частиц, которые переносят лекарство и регулируют его высвобождение. Водную мицеллярную суспензию можно лиофилизировать, хранить при комнатной температуре и восстанавливать водным растворителем без потери титра активного ингредиента.

Размер мицелл находится в интервале от 5 до 200 нм, предпочтительно от 10 до 50 нм.

Концентрация амида в мицеллярных суспензиях находится в интервале от 4 до 20 мг/мл.

Предпочтительная концентрация олеиламида равна 13 мг/мл.

Примерами лекарственных средств, которые могут быть использованы в соответствии с изобретением, являются рапамидин, триамцинолон, статины (в частности, симвастатин), кальцитонин, RN-1747, 4 α -форбол-12,13-дидеканоат (4 α PDD), эверолимус, паклитаксел и арахидоновая кислота. Рапамидин особенно предпочтителен.

Концентрация лекарства, которое может быть загружено в мицеллярные суспензии в соответствии с изобретением, зависит от гидрофобности самого лекарства и желаемой степени амидирования HAS, и, следовательно, может быть изменена за счет сбалансирования указанных характеристик.

Мицеллярные суспензии в соответствии с изобретением, таким образом, состоят из амидов сульфатированной гиалуроновой кислоты (HAS) со степенью сульфатирования в интервале от 0,5 до 1,5 (HAS-1), от 1,5 до 2,5 (HAS-2) или от 2,5 до 3,5 (HAS-3), полученных из HA со средневесовой MW в интервале от 180000 до 230000 Да или со средневесовой MW в интервале от 500000 до 730000 Да; амидирование проводят C₄-C₂₀-алкениламинами, предпочтительно олеиламином, (2E)-гекс-2-ен-1-амином и пент-2-ен-1-амином; степень молярной дериватизации (амидирования) HAS, выраженная в виде отношения моли алкениламина/моли димера HAS, находится в интервале от 5 до 30%; концентрация амида в мицеллярных суспензиях находится в интервале от 4 до 20 мг/мл.

Предпочтительно мицеллярные суспензии в соответствии с изобретением состоят из амидов сульфатированной гиалуроновой кислоты (HAS) со степенью сульфатирования в интервале от 0,5 до 1,5 (HAS-1), полученных из HA со средневесовой MW в интервале от 180000 до 230000 Да; амидирование проводят олеиламином; степень молярной дериватизации (амидирования) HAS, выраженная в виде отношения моли алкениламина/моли димера HAS, находится в интервале от 10 до 17%; концентрация амида в мицеллярных суспензиях предпочтительно равна 13 мг/мл. Мицеллярные суспензии в соответствии с изобретением получают путем диспергирования гидрофобного лекарства в буферном растворе, содержащем амид, затем путем обработки ультразвуком в ультразвуковой ванне и затем фильтрованием через 0,2 мкм фильтр, что делает продукт стерильным. Буфер предпочтительно представляет собой фосфатный буфер PBS (фосфатно-солевой буферный раствор) при pH 7, 2-N-морфолинометансульфовую кислоту при pH в интервале от 5 до 8, 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтилсульфовую кислоту при pH в интервале от 5 до 8, и более предпочтительно представляет собой PBS при pH 7. Если используемое лекарство растворимо в воде, его растворяют, а не диспергируют, в буферном растворе.

Таким образом, схематично получение системы стабилизации и контролируемого высвобождения в соответствии с изобретением включает:

синтез желаемого сорта HAS в форме натриевой соли из HA-Na или из HA-TBA (тетрабутиламмониевая соль);

приготовление бензалкониевой соли (BA) или TBA-соли HAS из HAS-Na;

частичную дериватизацию карбоксильных групп HAS-BA или HAS-TBA C₄-C₂₀-алкениламином;

приготовление рецептуры HAS-алкениламид/лекарство в форме мицеллярной суспензии.

Мицеллярные суспензии могут быть введены "как они есть" после стерилизации или могут быть добавлены наполнители, такие как мальтоза, маннит или глюкоза, в концентрации, лежащей в интервале от 1 до 9 мас.%, предпочтительно мальтоза в концентрации 4,5% от массы рецептуры.

Приведенные ниже примеры иллюстрируют изобретение более подробно.

Пример 1. Синтез HAS1.

1.1. Синтез HAS1-Na из натриевой соли НА.

Диспергируют 4,0 г ($9,96 \times 10^{-3}$ моль; 1 экв.) НА-Na (НА MW 200 кДа) в 220 мл ДМСО и добавляют 3,6 мл метансульфоновой кислоты (5 экв.), после чего смесь оставляют при перемешивании на 24 ч при комнатной температуре (КТ). По окончании растворения добавляют 12,8 г (8 экв.) комплекса пиридин-(триоксид серы) (Pyr-SO₃). После выдерживания в течение ночи при КТ продукт осаждают этанолом (EtOH); полученный осадок фильтруют через тигель Гуча, промывают дважды EtOH и снова растворяют в 150 мл деионизированной воды; добавляют 8 мл насыщенного раствора NaCl и 115 мл ДМСО и доводят pH до 3,4±0,1 с помощью 3М раствора NaOH. Продукт осаждают 440 мл EtOH; полученный осадок фильтруют через тигель Гуча, промывают смесью EtOH/H₂O (80:20) и EtOH и окончательно сушат в вакууме при 37°C.

Получают 7,78 г HAS1-Na в виде желтовато-белого порошка. (Выход 97,6%).

1.2. Синтез HAS1-Na из ТВА-соли НА.

Растворяют 2,0 г ($3,22 \times 10^{-3}$ моль; 1 экв.) НА-ТВА (НА MW 200 кДа) в 200 мл ДМСО. По окончании растворения добавляют 1,28 г (2,5 экв.) комплекса пиридин-(триоксид серы) (Pyr-SO₃). После выдерживания в течение ночи при КТ продукт осаждают этанолом (EtOH); полученный осадок фильтруют через тигель Гуча, промывают дважды EtOH и снова растворяют в 150 мл деионизированной воды; добавляют 8 мл насыщенного раствора NaCl и 115 мл ДМСО и доводят pH до 3,4±0,1 с помощью 3М раствора NaOH. Продукт осаждают 430 мл EtOH; полученный осадок фильтруют через тигель Гуча, промывают смесью EtOH/H₂O (80:20) и EtOH и окончательно сушат в вакууме при 37°C.

Получают 1,52 г HAS1-Na в виде желтовато-белого порошка. (Выход 93,8%).

Пример 2. Синтез конъюгата HAS1-олеиламид [10%] из HAS1-ВА (бензалконий).

Растворяют 2,5 г ($5,0 \times 10^{-3}$ моль, 1 экв.) HAS1-Na в 100 мл деионизированной воды; отдельно растворяют 3,0 г хлорида бензалкония (ВА⁺Cl⁻) в 100 мл деионизированной воды. По окончании солубилизации добавляют раствор ВА⁺Cl⁻ к раствору HAS1, в результате получают осадок, который фильтруют через тигель Гуча, промывают в H₂O, в этаноле и затем в ацетоне и сушат в роторном испарителе при высоком вакууме. Выделенный осадок HAS1-ВА солубилизируют в 160 мл ДМСО; затем добавляют 0,114 г (0,14 экв.) CDI (карбодиимид) и 0,10 мл метансульфоновой кислоты (0,3 экв.). После перемешивания в течение 30 мин при 40°C добавляют 1,32 мл (0,8 экв.) олеиламина и реакцию проводят в течение ночи при медленном перемешивании при 40°C. На следующий день добавляют 16 мл насыщенного раствора NaCl и продукт осаждают этанолом. Полученный осадок фильтруют через тигель Гуча и промывают 2 объемами смеси этанол/H₂O (85:15), затем этанолом и, наконец, ацетоном. Полученный продукт растворяют в 50 мл в деионизированной H₂O и подвергают диализу (диализная мембрана Spectra/Por® с отсечкой 12000-14000 Да) в течение 3 дней в буфере PBS (pH 7) и 1 день в H₂O. И, наконец, диализированный продукт замораживают и лиофилизируют. Получают 1,9 г желтовато-белого порошка. (Выход 72,2%).

Описание. Степень дериватизации рассчитывают с помощью анализа ¹H-ЯМР: 20 мг HAS1-олеиламид растворяют в 1 мл D₂O и анализируют с помощью спектрометра Bruker Advance (300 МГц). Для определения степени дериватизации используют следующие сигналы: δ 0,6-0,9 (т, 3H, HAS1-CONH-(CH₂)₈-CH=CH-(CH₂)₇-CH₃), δ 1,9-1,7 (с, 3H, HAS1-NHCO-CH₃) (моли олеиламида относительно молей повторяющегося звена HAS1).

Пример 3. Синтез конъюгата HAS1-олеиламид [10%] из HAS1-ТВА.

а) Приблизительно 10 г сульфоновой смолы Amberlyst промывают 5 раз водой сорта MilliQ в колонке с рубашкой (смола занимает приблизительно половину объема колонки). Добавляют 20 мл 55%-ного раствора ТВА-ОН, встряхивают и оставляют в контакте со смолой на 2 ч при КТ. Смолу промывают приблизительно 0,5 л MilliQ H₂O, пока pH элюата не упадет ниже 10,5 (pH 10,48).

Загружают 2,5 г ($5,0 \times 10^{-3}$ моль, 1 экв.) соли HAS1-Na, растворенной в 30 мл H₂O, процеживают при скорости 5 мл/мин и промывают дополнительно 60 мл. Элюат собирают, замораживают и лиофилизируют; получают 3,9 г соли HAS1-ТВА в форме светло-желтого лиофилизата.

б) Выделенное производное HAS1-ТВА солубилизируют в 160 мл ДМСО; затем добавляют 0,114 г (0,14 экв.) CDI (карбодиимид) и 0,10 мл метансульфоновой кислоты (0,3 экв.). После перемешивания в течение 30 мин при 40°C добавляют 1,32 мл (0,8 экв.) олеиламина и реакцию проводят в течение ночи при медленном перемешивании при 40°C. На следующий день добавляют 16 мл насыщенного раствора NaCl и продукт осаждают этанолом. Полученный осадок фильтруют через тигель Гуча и промывают 2 объемами смеси этанол/H₂O (85:15), затем этанолом и, наконец, ацетоном.

Получают 2,5 г желтовато-белого порошка. (Выход 94,1%).

После описания с использованием анализа ^1H -ЯМР, как описано в примере 2, определяют степень дериватизации $10,6 \pm 0,8\%$ моль/моль (молей олеиламида относительно молей повторяющегося звена HAS1).

Пример 4. Синтез HAS1-олеиламид [17%] из HAS1-TBA.

После получения производного HAS1-TBA, как описано в примере 3, пункт а), синтез проводят следующим образом.

Солубилизируют 2,5 г ($5,0 \times 10^{-3}$ моль, 1 экв.) выделенного производного HAS1-TBA в 160 мл ДМСО; затем добавляют 0,163 г (0,2 экв.) CDI (карбодиимид) и 0,10 мл метансульфоновой кислоты (0,3 экв.). После перемешивания в течение 30 мин при 40°C добавляют 1,32 мл (0,8 экв.) олеиламина и реакцию проводят в течение ночи при медленном перемешивании при 40°C . На следующий день добавляют 16 мл насыщенного раствора NaCl и продукт осаждают этанолом. Полученный осадок фильтруют через тигель Гуча и промывают 2 объемами смеси этанол/ H_2O (85:15), затем этанолом и, наконец, ацетоном. Получают 2,6 г рыхлого белого продукта. (Выход 96,1%).

После описания с использованием анализа ^1H -ЯМР, как описано в примере 2, определяют степень дериватизации $17,3 \pm 1,2\%$ моль/моль (молей олеиламида относительно молей повторяющегося звена HAS1).

Пример 5. Синтез HAS1-олеиламид [25%] из HAS1-TBA.

После получения производного HAS1-TBA, как описано в примере 3, пункт а), синтез проводят следующим образом.

Солубилизируют 2,5 г ($5,0 \times 10^{-3}$ моль, 1 экв.) выделенного производного HAS1-TBA в 160 мл ДМСО; затем добавляют 0,285 г (0,35 экв.) CDI (карбодиимид) и 0,15 мл метансульфоновой кислоты (0,45 экв.). После перемешивания в течение 30 мин при 40°C добавляют 1,32 мл (0,8 экв.) олеиламина и реакцию проводят в течение ночи при медленном перемешивании при 40°C . На следующий день добавляют 16 мл насыщенного раствора NaCl и продукт осаждают этанолом. Полученный осадок фильтруют через тигель Гуча и промывают 2 объемами смеси этанол/ H_2O (85:15), затем этанолом и, наконец, ацетоном. Получают 2,6 г рыхлого белого продукта. (Выход 94,5%).

После описания с помощью анализа ^1H -ЯМР, как описано в примере 2, определяют степень дериватизации $24,5 \pm 1,5\%$ моль/моль (молей олеиламида относительно молей повторяющегося звена HAS1).

Пример 6. Синтез HAS2-олеиламид [10%] из HAS2-TBA.

Получают HAS2 по методике, описанной в примере 1.1, только меняют количество используемого комплекса пиридин-(триоксид серы) ($\text{Pyr} \cdot \text{SO}_3$) (16 г).

После получения производного HAS2-TBA, как описано в примере 3, пункт а), синтез проводят следующим образом.

Солубилизируют 2 г ($3,3 \times 10^{-3}$ моль, 1 экв.) соли HAS2-TBA в 160 мл ДМСО; затем добавляют 0,074 г (0,14 экв.) CDI (карбодиимид) и 0,06 мл метансульфоновой кислоты (0,3 экв.). После перемешивания в течение 30 мин при 40°C добавляют 1,08 мл (0,8 экв.) олеиламина и реакцию проводят в течение ночи при медленном перемешивании при 40°C . На следующий день добавляют 16 мл насыщенного раствора NaCl и продукт осаждают этанолом. Полученный осадок фильтруют через тигель Гуча и промывают 2 объемами смеси этанол/ H_2O (85:15), затем этанолом и, наконец, ацетоном.

Получают 2,0 г рыхлого светло-желтого-белого продукта. (Выход 94,5%).

После описания с использованием анализа ^1H -ЯМР, как описано в примере 2, определяют степень дериватизации $9,8 \pm 0,6\%$ моль/моль (молей олеиламида относительно молей повторяющегося звена HAS2).

Пример 7. Синтез HAS3-олеиламид [11%] из HAS3-TBA.

Получают HAS3 по методике, описанной в примере 1.1, только меняют количество используемого комплекса пиридин-(триоксид серы) ($\text{Pyr} \cdot \text{SO}_3$) (20,8 г).

После получения производного HAS3-TBA, как описано в примере 3, пункт а), синтез проводят следующим образом.

Солубилизируют 2 г ($2,8 \times 10^{-3}$ моль, 1 экв.) соли HAS3-TBA в 160 мл ДМСО; затем добавляют 0,063 г (0,14 экв.) CDI (карбодиимид) и 0,05 мл метансульфоновой кислоты (0,3 экв.). После перемешивания в течение 30 мин при 40°C добавляют 0,73 мл (0,8 экв.) олеиламина и реакцию проводят в течение ночи при медленном перемешивании при 40°C . На следующий день добавляют 16 мл насыщенного раствора NaCl и продукт осаждают этанолом. Полученный осадок фильтруют через тигель Гуча и промывают 2 объемами смеси этанол/ H_2O (85:15), затем этанолом и, наконец, ацетоном.

Получают 1,7 г рыхлого светло-желто-белого продукта. (Выход 93,9%).

После описания с использованием анализа ^1H -ЯМР, как описано в примере 2, определяют степень дериватизации $11,1 \pm 0,6\%$ моль/моль (молей олеиламида относительно молей повторяющегося звена HAS3).

Пример 8. Приготовление рецептуры HAS1-олеиламид (13 мг/мл)/рапамицин.

Взвешивают 65 мг конъюгата HAS1-олеиламид, полученного в примере 3 (дериватизация 10% моль), в пробирке на 50 мл и добавляют 20 мг рапамицина (1CHEM LP) и 5,0 мл PBS (pH 7). Суспензию

оставляют при перемешивании на 2 ч при комнатной температуре и обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин (ультразвуковой аппарат Sonifer 250), затем фильтруют при 0,2 мкм с фильтром Sartorius из ацетата целлюлозы.

Анализ содержания рапамицина в рецептуре.

Система ВЭЖХ-МС (HPLC-MS) Agilent 1260: колонка Kinetex C8; расход: 0,35 мл/мин; УФ детектор при 216 нм; подвижная фаза (ПФ (MP)): ацетат аммония (2 г/л) (А); ацетонитрил (В); градиент: 40% подвижной фазы (В) в течение 3 мин, затем градиент от 40 до 97% (В) за 4 мин.

Система калибрована путем впрыскивания стандарта рапамицина при 0,14 мг/мл (рапамицин растворяют до 1,4 мг/мл в ацетонитриле (ACN) и разбавляют 1:10 с помощью ПФ (40% (В)/60% (А)). Время удерживания составляет 7,6 мин.

Рецептуру HAS1-олеиламид/рапамицин разбавляют 1:3 в ПФ (40% (В)/60% (А) и вводят напрямую в ВЭЖХ. Время удерживания рапамицина 7,6 мин. Количественный анализ проводят с учетом площади стандарта рапамицина. МС анализ подтверждает структуру рапамицина и отсутствие продуктов разложения (теоретический МС 914,2; измеренный 914,3+Na⁺). Содержание рапамицина, определенное в рецептуре, составляет 0,16 мг/мл.

Пример 9. Приготовление рецептуры HAS1-олеиламид (9 мг/мл)/рапамицин.

Взвешивают 65 мг HAS1-олеиламида, полученного как в примере 3 (дериватизация 10% моль), в пробирке объемом 50 мл и добавляют 20 мг рапамицина (1CHEM LP) и 5,0 мл PBS (рН 7). Суспензию оставляют при перемешивании на 2 ч при комнатной температуре и обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин (ультразвуковой аппарат Sonifer 250), затем фильтруют при 0,2 мкм с фильтром Sartorius из ацетата целлюлозы.

Содержание рапамицина в рецептуре, проанализированное как в примере 8, равно 0,15 мг/мл.

Пример 10. Приготовление рецептуры HAS1-олеиламид (13 мг/мл)/рапамицин.

Взвешивают 65 мг HAS1-олеиламида, полученного как в примере 4 (дериватизация 17% мол.), в пробирке объемом 50 мл и добавляют 20 мг рапамицина (1CHEM LP) и 5,0 мл PBS (рН 7). Суспензию оставляют при перемешивании на 2 ч при комнатной температуре и обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин (ультразвуковой аппарат Sonifer 250), затем фильтруют при 0,2 мкм с фильтром Sartorius из ацетата целлюлозы.

Содержание рапамицина в рецептуре, проанализированное как в примере 8, равно 0,21 мг/мл.

Пример 11 (сравнительный). Приготовление рецептуры рапамицина в PBS.

Взвешивают 20 мг рапамицина в пробирке объемом 50 мл и добавляют 5,0 мл PBS (рН 7); суспензию оставляют при перемешивании на 2 ч при комнатной температуре и обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин (ультразвуковой аппарат Sonifer 250), затем фильтруют при 0,2 мкм с фильтром Sartorius из ацетата целлюлозы. Содержание рапамицина в рецептуре, проанализированное как в примере 8, составляет 0,00 мг/мл.

Пример 12. Приготовление рецептуры HAS1-олеиламид (13 мг/мл)/RN-1747.

Взвешивают 65 мг HAS1-олеиламида, полученного как в примере 3 (дериватизация 10% мол.), в пробирке объемом 50 мл и добавляют 21,5 мг RN-1747 (Key Organics), 4,0 мл PBS (рН 7) и 0,5 мл 1М HCl; суспензию оставляют при перемешивании на 2 ч при комнатной температуре и обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин (ультразвуковой аппарат Sonifer 250), доводят до рН 7 с помощью 0,5 мл 1М раствора NaOH, а затем фильтруют при 0,2 мкм с фильтром Sartorius из ацетата целлюлозы.

Анализ содержания RN-1747 в рецептуре.

Система ВЭЖХ-МС Agilent 1260 (ВЭЖХ-МС): колонка Kinetex C8; расход: 0,35 мл/мин; УФ детектор при 216 нм; подвижная фаза (ПФ (MP)): ацетат аммония (2 г/л) (А); ацетонитрил (В); градиент: 20% подвижной фазы (В) в течение 3 мин, затем градиент от 20 до 97% (В) за 4 мин.

Система калибрована путем впрыскивания стандарта RN-1747 при 0,15 мг/мл (RN-1747 растворяют до 1,5 мг/мл в ACN и разбавляют 1:10 с помощью ПФ ((20% (В)/80% (А))). Время удерживания: 8,4 мин.

Рецептуру HAS1-олеиламид/RN-1747 разбавляют 1:3 в ПФ (20% (В)/80% (А) и вводят напрямую в ВЭЖХ. Время удерживания RN-1747 составляет 8,4 мин. Количественный анализ проводят с учетом площади стандарта RN-1747. МС анализ подтверждает структуру RN-1747 и отсутствие продуктов разложения (теоретический МС 395,9; измеренный 395,5+Na⁺). Содержание RN-1747, найденное в рецептуре, составляет 0,44 мг/мл.

Пример 13. Приготовление рецептуры HAS1-олеиламид (13 мг/мл)/симвастатин.

Взвешивают 65 мг HAS1-олеиламида, полученного как в примере 3 (дериватизация 10% мол.), в пробирке объемом 50 мл и добавляют 20,5 мг симвастатина (Fluogochem) и 5,0 мл PBS (рН 7); суспензию оставляют при перемешивании на 2 ч при комнатной температуре и обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин (ультразвуковой аппарат Sonifer 250), доводят до рН 7 с помощью 0,5 мл 1М раствора NaOH и затем фильтруют при 0,2 мкм с фильтром Sartorius из ацетата целлюлозы.

Анализ содержания симвастатина в рецептуре.

Система ВЭЖХ-МС Agilent 1260: колонка Kinetex C8; расход: 0,35 мл/мин; УФ детектор при 216 нм; подвижная фаза: ацетат аммония (2 г/л) (А); ацетонитрил (В); градиент: 40% подвижной фазы (В) в течение 3 мин, затем градиент от 40 до 97% (В) за 4 мин.

Система калибрована путем впрыскивания стандарта симвастатина при 0,3 мг/мл (симвастатин растворяют до 3,0 мг/мл в ACN и разбавляют 1:10 с помощью ПФ ((40% (B)/60% (A))). Время удерживания: 7,1 мин.

Рецептуру HAS1-олеиламид/симвастатин разбавляют 1:3 в ПФ (40% (B)/60% (A) и вводят напрямую в ВЭЖХ. Время удерживания симвастатина равно 7,1 мин. Количественный анализ проводят с учетом площади стандарта симвастатина. МС анализ подтверждает структуру симвастатина и отсутствие продуктов разложения (теоретический МС 418,3; измеренный 418,6+Na⁺). Содержание симвастатина, найденное в рецептуре, составляет 0,20 мг/мл.

Пример 14. Приготовление рецептуры HAS1-олеиламид (13 мг/мл)/ацетонид триамцинолона.

Взвешивают 65 мг HAS1-олеиламида, полученного как в примере 3 (дериватизация 10% мол.), в пробирке объемом 50 мл и добавляют 20,5 мг ацетонида триамцинолона (Spectrum) и 5,0 мл PBS (pH 7); суспензию оставляют при перемешивании на 2 ч при комнатной температуре и обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин (ультразвуковой аппарат Sonifer 250), доводят до pH 7 с помощью 0,5 мл 1M раствора NaOH и затем фильтруют при 0,2 мкм с фильтром Sartorius из ацетата целлюлозы.

Анализ содержания ацетонида триамцинолона в рецептуре.

Система ВЭЖХ-МС Agilent 1260: колонка Kinetex C8; расход: 0,35 мл/мин; УФ детектор при 216 нм; подвижная фаза (ПФ (MP)): ацетат аммония (2 г/л) (A); ацетонитрил (B); градиент: 20% подвижной фазы (B) в течение 3 мин, затем градиент от 20 до 97% (B) за 4 мин.

Система калибрована путем впрыскивания стандарта ацетонида триамцинолона при 0,3 мг/мл (триамцинолон растворяют до 3,0 мг/мл в ACN и разбавляют 1:10 с помощью ПФ ((20% (B)/80% (A))). Время удерживания: 8,6 мин.

Рецептуру HAS1-олеиламид/триамцинолон разбавляют 1:3 в ПФ (20% (B)/80% (A) и вводят напрямую в ВЭЖХ. Время удерживания триамцинолона равно 8,6 мин. Количественный анализ проводят с учетом площади стандарта триамцинолона. МС анализ подтверждает структуру гексаацетонида триамцинолона и отсутствие продуктов разложения (теоретический МС 532,6; измеренный 532,3+Na⁺).

Содержание гексаацетонида триамцинолона, найденное в рецептуре, составляет 0,02 мг/мл.

Пример 15. Приготовление рецептуры HAS1-олеиламид (13 мг/мл)/кальцитонин лососевых рыб.

Взвешивают 65 мг HAS1-олеиламида, полученного как в примере 3 (дериватизация 10% мол.), в пробирке объемом 10 мл; добавляют 16,0 мг кальцитонина лососевых рыб (Bachem) и 5,0 мл 0,2M раствора CH₃COONH₄ (pH 5,2), раствор оставляют при перемешивании на 2 ч при комнатной температуре и обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин (ультразвуковой аппарат Sonifer 250), затем фильтруют при 0,2 мкм через фильтр Sartorius из ацетата целлюлозы.

Анализ содержания кальцитонина в рецептуре.

Система ВЭЖХ-МС Agilent 1260: колонка Kinetex C8; расход: 0,35 мл/мин; УФ детектор при 254 нм; подвижная фаза (ПФ (MP)): ацетат аммония (2 г/л) (A); ацетонитрил (B); градиент: 15% подвижной фазы (B) в течение 3 мин, затем градиент от 15 до 97% (B) за 4 мин.

Система калибрована путем впрыскивания стандарта кальцитонина лососевых рыб при 0,8 мг/мл (кальцитонин растворяют до 8,0 мг/мл в ACN и разбавляют 1:10 с помощью ПФ ((15% (B)/85% (A))). Время удерживания: 7,4 мин.

Рецептуру HAS1-олеиламид/кальцитонин лососевых рыб разбавляют 1:3 в ПФ (15% (B)/85% (A) и вводят напрямую в ВЭЖХ. Время удерживания кальцитонина равно 7,4 мин. Количественный анализ проводят с учетом площади стандарта кальцитонина лососевых рыб. МС анализ подтверждает структуру кальцитонина лососевых рыб и отсутствие продуктов разложения (теоретический МС 3431,9; измеренный: (1144,4=3430,2+3H⁺)/3).

Содержание кальцитонина лососевых рыб, найденное в рецептуре, составляет 3,2 мг/мл.

Когда рецептуры, описанные в примерах 9-17, должны быть лиофилизированы, рекомендуется добавлять наполнитель, выбранный из мальтозы, маннита и глюкозы, предпочтительно мальтозу, в количестве 4,5% мас./мас. Добавление следует проводить после обработки ультразвуком и перед фильтрованием через 0,2 мкм фильтр.

Пример 16. Приготовление рецептуры HAS1-олеиламид (13 мг/мл)/паклитаксел.

Взвешивают 65 мг HAS1-олеиламида, полученного как в примере 4 (дериватизация 17% мол.), в пробирке объемом 50 мл и добавляют 20 мг паклитаксела и 5,0 мл PBS (pH 7). Суспензию оставляют при перемешивании приблизительно на 2 ч при комнатной температуре и обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин (ультразвуковой аппарат Sonifer 250), затем фильтруют при 0,2 мкм с фильтром Sartorius из ацетата целлюлозы.

Анализ содержания паклитаксела в рецептуре.

Система ВЭЖХ-МС Agilent 1260: колонка Kinetex C18; расход: 1,0 мл/мин; УФ детектор при 220 нм; подвижная фаза (ПФ (MP)): ацетат аммония (2 г/л) (A); ацетонитрил (B); градиент: 1% подвижной фазы (B) в течение 3 мин, затем градиент от 5 до 95% (B) за 10 мин.

Система калибрована путем впрыскивания стандарта паклитаксела (растворенного в ацетонитриле) при 0,46 мг/мл.

Рецептуру HAS1-олеиламид/паклитаксел разбавляют 1:3 в ацетонитриле и вводят напрямую в ВЭЖХ. Время удерживания паклитаксела равно 11,3 мин. Количественный анализ проводят с учетом площади стандарта паклитаксела. МС анализ подтверждает структуру паклитаксела и отсутствие продуктов разложения (теоретический МС; измеренный 853,9+Na⁺). Содержание паклитаксела, найденное в рецептуре, составляет 0,23 мг/мл.

Пример 17. Тест на образование мицелл.

Образование мицелл, способных нести гидрофобные активные ингредиенты, продемонстрировано с помощью электронной просвечивающей микроскопии (ПЭМ (ТЕМ)).

Помещают 25 мкл рецептуры примера 8, разбавленной до 0,2 мг/мл, на сетку 400 меш; после окрашивания 1%-ным уранилацетатом образец изучают в просвечивающем электронном микроскопе ТеспаiG²(FEI), работающем при 100 кВ. Изображения получают с помощью цифровой камеры Veleta (Olympus Soft Imaging System). Обнаружено образование совместимых с мицеллярной системой везикул, имеющих средний диаметр в интервале от 10 до 50 нм (фиг. 1).

Пример 18. Оценка стабильности стерилизованных рецептур при хранении и лиофилизации.

Проведены экспериментальные тесты, чтобы оценить влияние лиофилизации рецептур по изобретению на содержание активного ингредиента. В частности, испытывают рецептуру примера 8 с добавлением 0,23 г мальтозы (4,5 мас./мас.%) перед фильтрованием через 0,2 мкм фильтр.

Полученный профильтрованный раствор делят в стерильных условиях между флаконами на 1 мл (9×1 мл) (по 0,5 мл на флакон). Флаконы помещают в лиофилизатор (Epsilon 2-6DLS plus); зонд лиофилизатора помещают на один из них (начальная температура замораживания: при 40°C; замораживание образца: -17°C; температура лиофилизации: -29°C). Вакуум на стадии лиофилизации устанавливают на 0,08 бар; лиофилизированные образцы имеют внешний вид несплющенного светло-желто-белого осадка.

Один образец растворяют в 0,58 мл H₂O сразу же после лиофилизации и анализируют титр рапамицина уже описанным методом ВЭЖХ-МС. Другие образцы хранят при 40°C в течение 6 месяцев и титрование рапамицина проводят через 3 и 6 месяцев.

Установленный титр рапамицина составляет 95% как сразу после лиофилизации, так и через 3 или 6 месяцев хранения при 40°C, показывая эффективность системы стабилизации и контролируемого высвобождения, описанной в изобретении.

Пример 19. Испытания *in vitro* ингибирования протеазы синовиальной жидкости, индуцированного производным HAS1-олеиламид/рапамицин.

Рецептуру HAS1-олеиламид/рапамицин, полученную как в примере 10, то есть, содержащую 13 мг/мл HAS1-олеиламид и 0,21 мг/мл рапамицина, испытывают *in vitro* с целью оценки ее ингибирующего действия на протеазы синовиальной жидкости, более конкретно на:

10 различных металлопротеиназ человека (ММП (ММР));

эластазу;

агрекканазу 1 (ADAMTS4);

используя глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу в качестве контроля (как известно специалисту, GAPDH представляет собой конститутивный фермент, физиологически экспрессируемый в каждой клетке, ингибирование которого предупреждает клеточную активность, приводящую к гибели клетки; оценка его ингибирования испытываемыми образцами определяет специфичность действия и токсичность образцов) и путем оценки начальной скорости гидролиза различных протеаз (RFU/s) в присутствии разных концентраций рецептуры. Значение IC₅₀, то есть, концентрацию ингибитора, способную ингибировать 50% ферментативной активности стандартизованных ММП, рассчитывают путем интерполяции активности ММП относительно концентрации рецептуры, и значения представлены на фиг. 2.

Материалы и методы.

Для ММП: используют флуориметрический набор определения профиля ингибитора ММП ("Fluorimetric MMP Inhibitor Profiling Kit" (BML-AK016)); испытывают рецептуру, описанную в примере 10, при концентрации HAS1-олеиламид 0,8, 0,4 и 0,1 мг/мл, соответствующей 0,013, 0,006 и 0,0016 мг/мл рапамицина, соответственно, и с использованием такой же концентрации субстрата (4,0 мкМ);

Для эластазы: используют флуориметрический набор для эластазы ("Fluorimetric Sensolyte Rh110 Elastase kit" (AS-72178)); испытывают рецептуру, упомянутую в примере 10, при концентрации HAS1-олеиламид 0,7 мг/мл, 0,35 мг/мл и 0,1 мг/мл, соответствующей 0,0112, 0,0056 и 0,0016 мг/мл рапамицина, соответственно, и с использованием такой же концентрации субстрата (25 мкМ).

Для ADAMTS4: используют набор для оценки активности агрекканазы ("Aggrecanase Activity Assay Kit" (KA-1497)); испытывают рецептуру, упомянутую в примере 10, при концентрации HAS1-олеиламид 0,6 мг/мл, 0,3 мг/мл и 0,1 мг/мл, соответствующей 0,0096, 0,0048 и 0,0016 мг/мл рапамицина, соответственно, и с использованием такой же концентрации субстрата (1 мкМ).

Для GAPDH: используют калориметрический набор для оценки активности GAPDH ("Colorimetric GAPDH Activity Assay Kit") (K680-100)); испытывают рецептуру, описанную в примере 10, при

концентрации HAS1-олеиламид 0,6, 0,3 и 0,1 мг/мл, соответствующей 0,0096, 0,0048 и 0,0016 мг/мл рапамицина, соответственно, и с использованием такой же концентрации субстрата (1 мкМ).

Результаты представлены на фиг. 2.

Очевидно, что рецептура HAS1-олеиламид/рапамицин селективно ингибирует ММП, показывая превосходную активность на всех металлопротеиназах, за исключением MMP2 и MMP9; и, напротив, она не влияет на другие протестированные протеазы синовиальной жидкости или на контрольный фермент (GAPDH).

Это означает, что рецептура HAS1-олеиламид/рапамицин действует специфически и селективно на ММП, и особенно на ММП, которые избыточно экспрессированы в синовиальной жидкости пациентов с ОА и ответственны за деградацию коллагена.

Пример 20. Испытания *ex vivo* на высвобождение коллагена из хрящевых эксплантатов, индуцированное производным HAS1-олеиламид/рапамицин.

Эффективность рецептуры HAS1-олеиламид/рапамицин при высвобождении коллагена оценивают в модели *ex vivo* воспаления хряща, описанной в литературе (Arns, S. et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2012, 20: 2131-2140). Испытываемая рецептура HAS1-олеиламид/рапамицин представляет собой рецептуру, полученную в примере 10, в разных концентрациях.

Хрящ собирают из пателлофemorальной борозды и мышелка бедренной кости, взятых из бедренной кости взрослого животного крупного рогатого скота, и биопсию хряща ($\varnothing=3$ мм) берут с помощью стального пробойника. Биопсии культивируют в 48-луночном многолуночном планшете (BD Falcon, номер по каталогу 353078, Италия) при 37°C с 5% CO₂ в течение 24 ч в среде DMEM/F-12 (1:1) (Life Technologies, номер по каталогу 11320074, Италия), содержащей 2% фетальной бычьей сыворотки (Life Technologies, номер по каталогу 10270106, Италия). После инкубации биопсии промывают PBS и делят на следующие группы:

- 1) контрольная группа, где клетки не обработаны и не стимулированы;
- 2) одна группа, обработанная провоспалительными цитокинами OSM (онкостатин M) и IL-1 β (по 10 нг/мл каждого);
- 3) одна группа, подвергнутая воздействию OSM и IL-1 β и обработанная HAS1-олеиламид (1,3 мг/мл)/рапамицин (0,021 мг/мл);
- 4) одна группа, подвергнутая воздействию OSM и IL-1 β и обработанная HAS1-олеиламид (0,3 мг/мл)/рапамицин (0,005 мг/мл);
- 5) одна группа, подвергнутая воздействию OSM и IL-1 β и обработанная HAS1-олеиламид (0,1 мг/мл)/рапамицин (0,002 мг/мл).

Через 0, 7, 14 и 21 день культуральную среду биопсии аспирируют и заменяют свежей средой, содержащей воспалительные цитокины и тестируемую рецептуру HAS1-олеиламид/рапамицин. После 21-дневной инкубации среду для биопсии собирают и определяют растворимый коллаген с помощью набора для оценки коллагена "Sircol collagen assay kit" (Biocolor, номер по каталогу S1000, UK) в соответствии с инструкциями производителя. Как видно на фиг. 3, биопсии группы, обработанной IL-1/OSM высвобождают, как и ожидалось, существенно более высокое количество растворимого коллагена в культуральную среду, чем контроль, указывая на очень сильное воспалительное повреждение. Рецептура HAS1-олеиламид/рапамицин значительно снижает высвобождение коллагена, индуцированное воспалительным стимулом, на практике снижая его до контрольных уровней даже в наиболее низкой испытанной концентрации и практически устраняя его при концентрации 1,3/0,021 мг/мл. Этот эффект подтверждает способность рецептуры ингибировать высвобождение коллагена и указывает на выраженный противовоспалительный эффект рецептуры HAS1-олеиламид/рапамицин.

Пример 21. Влияние на экспрессию ММП-13, индуцированное производным HAS1-олеиламид/рапамицин.

Определяют концентрацию ММП-13 в надосадочных жидкостях из тестов на эффективность высвобождения коллагена (предыдущий пример), чтобы количественно оценить присутствие в образцах основного фермента, ответственного за разрушение хряща. Для этой цели используют метод анализа ELISA (Mybiosource, номер по каталогу MBS2880297, США) в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты, представленные на фиг. 4, показывают, что обработка образцов воспалительными цитокинами OSM и IL-1 β значительно повышает концентрацию ММП-13 в надосадочной жидкости, как и ожидалось. Напротив, надосадочные жидкости образцов, обработанных рецептурой HAS1-олеиламид/рапамицин в концентрациях 0,3 и 0,1 мг/мл, соответствующих 0,0048 и 0,0016 мг/мл рапамицина, соответственно, имеют значительно более низкие уровни ММП-13, чем контрольные образцы, даже при самой низкой проверенной концентрации. Это однозначно подтверждает эффективность испытанной рецептуры при снижении экспрессии воспалительных факторов, лежащих в основе деградации суставного хряща.

Пример 22. Испытание *in vitro* ингибирования mTOR, индуцированного производным HAS1-олеиламид/рапамицин.

Эффективность рецептуры HAS1-олеиламид/рапамицин, которая получена как в примере 10, при ингибировании mTOR, определяют *in vitro* с использованием набора для анализа ELISA (K-Elisa mTOR Activity Kit, номер по каталогу CBA055; Merck), используя не содержащий рапамицин буферный раствор (TRIS) в качестве контроля и две разные дозы рапамицина "как есть", растворенные в ДМСО. Дозы показаны на диаграмме на фиг. 5 и для простоты в случае производного относятся к концентрации рапамицина. Активность mTOR в отсутствие рапамицина стандартизована к 100%. Как и ожидалось, наблюдается зависимый от концентрации ответ на рапамицин. Рецептура HAS1-олеиламид/рапамицин оказывается активной при ингибировании mTOR при намного более низких концентрациях, чем один рапамицин. В частности, ингибирование, полученное с помощью концентрации рапамицина 125 мкМ, достигается с помощью рецептуры HAS1-олеиламид/рапамицин, содержащей 34,7 мкМ рапамицина, то есть, с гораздо более низким содержанием активного ингредиента. Возможность введения существенно более низких количеств лекарства с тем же самым эффектом будет означать минимизацию или даже устранение значительных побочных эффектов, которые могут быть вызваны рапамицином.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Амид сульфатированной гиалуроновой кислоты (HAS) с C₄-C₂₀-алкениламинами, причем указанный амид имеет степень дериватизации в молярных процентах, выраженную в виде отношения моли алкениламина/моли димера HAS, в интервале от 2 до 20%.

2. Амид по п.1, в котором степень дериватизации в молярных процентах, выраженная в виде отношения моли алкениламина/моли димера HAS, в интервале от 5 до 15%.

3. Амид по п.1, в котором степень дериватизации в молярных процентах, выраженная в виде отношения моли алкениламина/моли димера HAS равную 10%.

4. Амид по п.1, в котором сульфатированная гиалуроновая кислота имеет число сульфатных групп на дисахаридное звено в интервале от 0,5 до 3,5.

5. Амид по п.4, в котором сульфатированная гиалуроновая кислота имеет число сульфатных групп на дисахаридное звено в интервале от 0,5 до 1,5.

6. Амид по п.4, в котором сульфатированная гиалуроновая кислота имеет число сульфатных групп на дисахаридное звено в интервале от 1,5 до 2,5.

7. Амид по п.4, в котором сульфатированная гиалуроновая кислота имеет число сульфатных групп на дисахаридное звено в интервале от 2,5 до 3,5.

8. Амид по любому из пп.1-7, в котором алкениламин выбирают из олеиламина, (2E)-гекс-2-ен-1-амина и пент-2-ен-1-амина.

9. Амид по п.8, в котором алкениламин представляет собой олеиламин.

10. Амид по любому из пп.1-9, в котором молекулярная масса исходной гиалуроновой кислоты, используемой для сульфатирования, находится в интервале от 100000 до 250000 Да.

11. Амид по любому из пп.1-9, в котором молекулярная масса исходной гиалуроновой кислоты, используемой для сульфатирования, находится в интервале от 500000 до 730000 Да.

12. Водная мицеллярная суспензия амида по пп.1-11 и гидрофобного или гидрофильного лекарства.

13. Мицеллярная суспензия по п.12, в которой размер мицелл находится в интервале от 5 до 200 нм, предпочтительно от 10 до 50 нм.

14. Мицеллярная суспензия по п.12 или 13, в которой амид представляет собой олеиламид по п.9.

15. Мицеллярная суспензия по пп.12, 13 или 14, в которой концентрация амида находится в интервале от 4 до 20 мг/мл.

16. Мицеллярная суспензия по п.14, в которой концентрация олеиламида составляет 13 мг/мл.

17. Мицеллярная суспензия по пп.12-16, в которой лекарство выбирают из рапамицина, триамцинолона, статинов (в частности, симвастатина), кальцитонина, RN-1747, 4 α -форбол-12,13-дидеканоата (4 α PDD), эверолимуса, паклитаксела и арахидоновой кислоты.

18. Мицеллярная суспензия по п.17, в которой лекарством является рапамицин.

19. Мицеллярная суспензия по пп.12-18 в буферном растворе, выбираемом из фосфатного буфера PBS при pH 7, 2-N-морфолино-метансульфоновой кислоты при pH в интервале от 5 до 8 и 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтилсульфоновой кислоты при pH в интервале от 5 до 8.

20. Мицеллярная суспензия по п.19, в которой буферным раствором является PBS при pH 7.

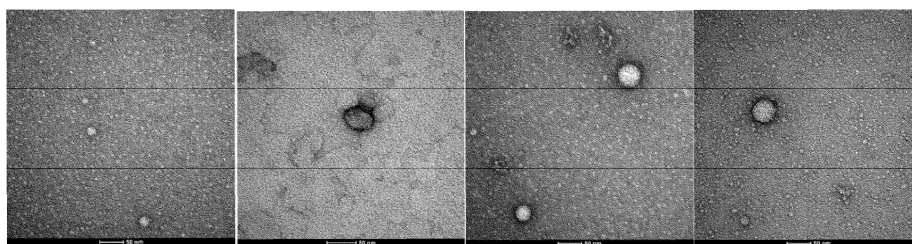
21. Способ получения мицеллярной суспензии по пп.1-20, который включает:

взаимодействие C₄-C₂₀-алкениламина с бензалкониевой или тетрабутиламмониевой солью сульфатированной гиалуроновой кислоты в апротонном неполярном растворителе в присутствии конденсирующих агентов;

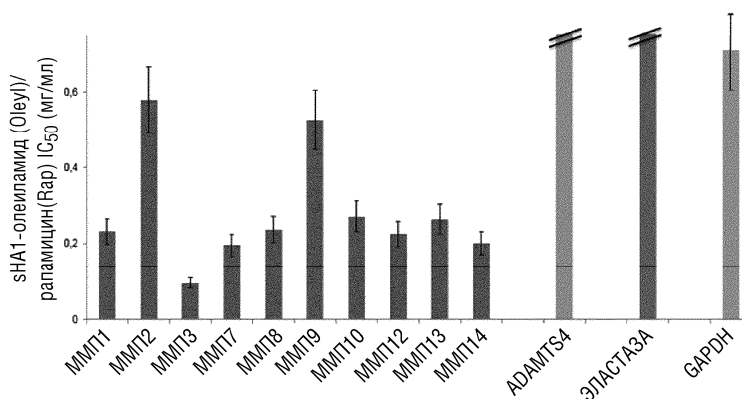
смешение амида сульфатированной гиалуроновой кислоты, полученной на предыдущей стадии, с водным раствором или суспензией лекарства;

обработку смеси ультразвуком и стерилизующее фильтрование.

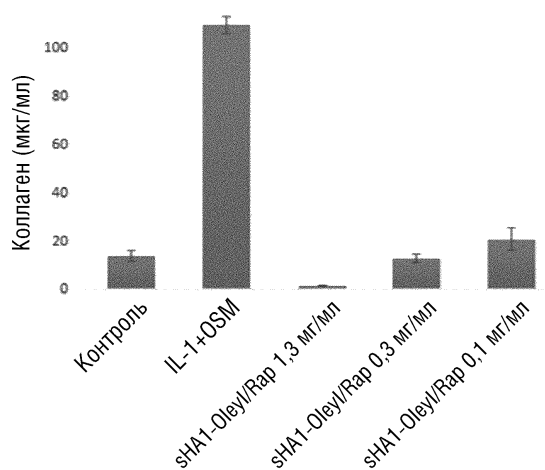
22. Фармацевтическая композиция, содержащая мицеллярную суспензию по пп.12-20 и наполнители.
23. Композиция по п.22, в которой наполнители выбирают из мальтозы, маннита и глюкозы в концентрациях в интервале от 1 до 9 мас.%.
 24. Композиция по п.23, в которой наполнителем является мальтоза в концентрации 4,5 мас.%.
 25. Применение композиции по пп.22-24 для местного, местно-регионального, внутрисуставного или внутрикостного, внутрисуставного, введения путем инъекции.
 26. Применение композиции по пп.22-25 при лечении остеоартроза.
 27. Применение амида сульфатированной гиалуроновой кислоты по любому из пп.1-11 в качестве агента для стабилизации и контролируемого высвобождения лекарственных средств.



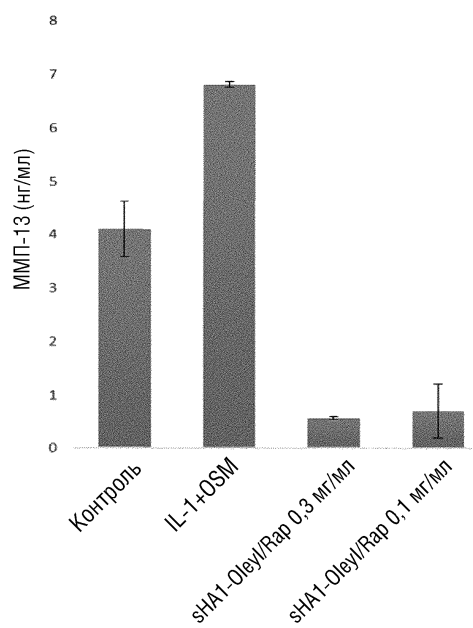
Фиг. 1



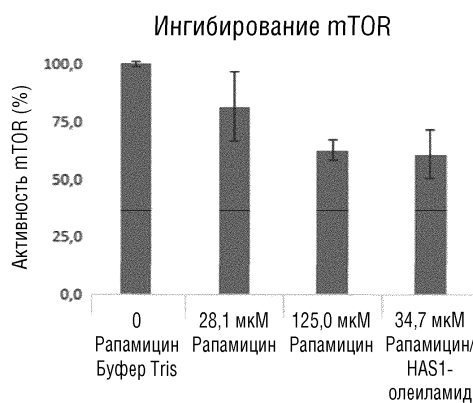
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

