

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям с поддерживаемым высвобождением, содержащим подвергающиеся биологической деградации гранулы из альгинатного геля и/или задерживаемых гелей, и соответствующим способам.

Предпосылки создания изобретения

С развитием технологий генной и клеточной инженерии возможность получения рекомбинантных белков обусловила их использование в качестве медицинских препаратов в терапевтических целях. Для лечения многих заболеваний и болезненных состояний с помощью фармацевтически активных белков в целях обеспечения наиболее эффективного терапевтического результата необходимо, чтобы в организме поддерживались определенные уровни таких белков. Однако в случае большинства содержащих белки фармацевтических композиций короткое время полужизни белков требует частого введения таких композиций. Повторяющиеся инъекции осуществляют с неодинаковыми интервалами, что приводит к различиям в уровнях медицинского препарата и существенной физической нагрузке пациентов, а также требует значительных денежных средств. Поскольку при многих состояниях наблюдается лучшая ответность на контролируемые уровни фармацевтического препарата, существует необходимость контролируемого высвобождения медикаментов для обеспечения более длительного периода их действия. Использование таких лекарственных средств с поддерживаемым высвобождением будет генерировать не только улучшенные профилактические, терапевтические или диагностические эффекты, но также и снижать частоту инъекций и расходы на лечение.

Существующие подходы для создания поддерживаемых уровней лекарственных препаратов в организме животных и человека между вводимыми дозами подразумевают использование подвергающихся биологической деградации полимеров в качестве матрикса для контроля высвобождения препарата. Например, в патенте Великобритании 1 388 580 раскрывается применение гидрогелей для поддерживаемого высвобождения инсулина. В патенте США 4 789 550 описано использование покрытых полилизином альгинатных микрокапсул для доставки белков с помощью инкапсулированных живых клеток. Кроме того, известно использование анионных или катионных полимерных композиций, покрытых ионными полимерами противоположного заряда, для инкапсулирования клеток, способных продуцировать биологически активные соединения (патент США 4 744 933). Подобно указанному, описано использование многочисленных оболочек из анионных или катионных сшивающихся полимеров для обеспечения контролируемого высвобождения (патенты США 4 690 682 и 4 789 516). Другие ме-

тодики основаны на использовании как альгинатов самих по себе, так и альгинатов, покрытых другими подвергающимися биологической деградации полимерами, для генерации контролируемого высвобождения полипептидных композиций или их катионных преципитатов (заявки РСТ WO 96/00081, W095/29664 и WO 96/03116).

Указанные подходы, однако, не были достаточно успешными с точки зрения обеспечения контролируемого высвобождения при доставке белковых композиций. Хорошо известно, что применение различных подвергающихся биологической деградации полимеров, например, сополимера гликолида и полилактида, *in vivo* приводит к интенсивной начальной вспышке высвобождения медикамента (Johnson, O. et al., *Nature Med.*, 2 (7): 795 (1996)). Более того, известно также, что белки, используемые в существующих препаратах с контролируемым высвобождением, подвергаются денатурации и утрачивают биологическую активность при контакте с инкапсулирующими агентами. В таких препаратах применяют органические растворители, которые оказывают губительное воздействие на белки. И, наконец, как обсуждается ниже, применение альгинатов самих по себе не приводит к ожидаемому контролируемому высвобождению белков, необходимому для обеспечения должной эффективности лечения.

В целом, альгинаты представляют собой хорошо известные анионные полисахариды природного происхождения, включающие 1,4-связанную-*b*-D-маннуроновою кислоту и *a*-L-глюкуроновою кислоту (Smidsrod, O. et al., *J. Microencapsulation*, 13 (5): 601-614 (1996)). Содержание указанных кислот в альгинатах обычно варьирует в интервале, составляющем до 70% маннуроновою кислоты и 30% глюкуроновою кислоты и 30% маннуроновою кислоты и 70% глюкуроновою кислоты (Smidsrod, см. выше). Альгиновая кислота нерастворима в воде, в то время как ее соли, образованные одновалентными катионами, такими, как натрий, калий и аммоний, растворимы в воде (McDowell, R.H. "Properties of Alginates" (London, Alginate Industries Ltd, 4th edition 1977)). Известно, что поливалентные катионы реагируют с альгинатами со спонтанным образованием гелей.

Альгинаты имеют широкий спектр применений, например, в качестве пищевых добавок, адгезивных средств, фармацевтических компонентов и препаратов для заживления ран. Альгинаты также рекомендованы для осуществления методик разделения белков. Например, в работе Gray, C.J. et al., [*Biotechnology and Bioengineering*, 31: 607-612 (1988)] показана возможность инкапсулирования инсулина в альгинатные гели, содержащие цинк/кальций, для отделения инсулина от других сывороточных белков.

В литературе имеются многочисленные ссылки на использование альгинатных матриц-

сов для создания систем доставки лекарственных препаратов. Например, в патенте США 4 695 463 описаны жевательные резинки на основе альгинатов и системы доставки фармацевтических средств. Альгинатные гели использовались для обеспечения контролируемого высвобождения различных белков, например, рецептора фактора некроза опухолей. При этом указанный белок заключали в катионные альгинатные гранулы, покрытые поликатионами [см. Wee, S.F., *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 21: 730-731 (1994)].

Известно также инкапсулирование трансформирующего ростового фактора в альгинатные гели [Puolakkainen, P.A. et al., *Gastroenterology*, 107:1319-1326 (1994)]; ангиогенных факторов в альгинатные гранулы, содержащие кальций [Downs, E.C. et al., *J. of Cellular Physiology*, 152:422-429 (1992)]; альбумина в хитозан-альгинатные микрокапсулы [Polk, A. et al., *J. Pharmaceutical Sciences*, 83(2): 178-185 (1994)]; гранулы из хитозана - альгината кальция, покрытые полимерами [Okhamafe, F.O. et al., *J. Microencapsul*, 13(5): 497-508 (1996)]; гемоглобина в гранулы из хитозан-альгината кальция [Huguët, M.L. et al., *J. Applied Polymer Science*, 51: 1427-1432 (1994), Huguët, M.L. et al., *Process Biochemistry*, 31: 745-751 (1996)] и интерлейкина-2 в хитозан-альгинатные микросферы [Liu, L.S. et al., *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 22: 542-543 (1995)].

Системы, использующие альгинатные гелевые гранулы или альгинатные гелевые гранулы с кальцием для заключения в них белков, не обладают эффектом поддерживаемого высвобождения, что обусловлено быстрым выходом белков из альгинатных гранул [Liu, L. et al., *J. Control. Rel.*, 43: 65-74 (1997)]. Для того, чтобы избежать такого быстрого высвобождения белков, в многочисленных из описанных выше системах пытались использовать поликатионное полимерное покрытие (например, полилизинное, хитозановое) с целью задержки выхода белков из альгинатных бус [см., например, Wheatley, M.A. et al., *J. Applied Polymer Science*, 43: 2123-2135 (1991); Wee, S.F. et al., см. выше; Liu, L.S. et al., см. выше; Wee, S.F. et al., *Controlled Release Society*, 22: 566-567 (1995) и Lim, et al., см. выше).

Поликатионы, например, полилизин, представляют собой заряженные положительно полиэлектролиты, которые реагируют с отрицательно заряженными альгинатными молекулами с образованием полиэлектролитных комплексов, действующих как диффузионные барьеры на поверхности гранул. Проблемы, которые возникают при использовании поликатионов, заключаются в следующем:

(1) такие композиции могут быть цитотоксичными за счет поликатионов [Huguët, M.L. et al., см. выше; Zimmerman, Ulrich, *Electrophoresis*, 13: 269 (1992); Bergmann, P. et al., *Clinical*

Science, 67: 35 (1984)]; (2) поликатионы подвергаются окислению; (3) гранулы с поликатионным покрытием не распадаются в организме пациента и накапливаются в нем; (4) такие составы получают в результате трудоемких процедур получения покрытий гранул, включающих многочисленные нанесения поликатионного полилизина [Padol, et al., *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 2: 216 (1986)], и (5) ионные взаимодействия между белком и поликатионами могут привести к утрате активности белка или ухудшить его стабильность.

В патенте США 5 336 668 и приведенных в нем ссылочных документах (Francesco et al.) раскрываются полные и частичные эфиры альгиновой кислоты, полученные различными способами, и обладающие определенными фармацевтическими свойствами. Описывается также, каким образом эфиры альгиновой кислоты могут быть использованы в качестве подвергающихся биологической деградации пластиковых материалов для целей медицины, в частности, хирургии, добавок для различных полимерных соединений или же для приготовления широкого круга медикаментов. Возможное применение этерифицированных альгинатов в композициях с поддерживаемым высвобождением не обсуждается в указанных источниках информации; в них также не раскрыты и альгинатные гидрогели.

Nightlinger et al., *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 22:738-739 (1995) описывает микросферы из этерифицированной гиалуроновой кислоты (НА), обладающие свойством контролируемого высвобождения. Приведенные здесь ссылочные источники информации в основном касаются различных скоростей деградации производных НА и описывают, каким образом эфир разрушается, высвобождая спирт и НА. Какие-либо сведения, касающиеся того, каким образом и способен ли вообще НА-остов сам по себе распадаться с образованием полимерных единиц меньшего молекулярного веса, отсутствуют.

Чтобы системы доставки с поддерживаемым высвобождением, основанные на полисахаридах, можно было использовать на практике, полисахариды должны быть способны к биологической деградации с образованием нетоксичных продуктов. Обнаружено, что некоторые альгинатные гелевые системы будучи эффективными с точки зрения поддерживаемого высвобождения лекарственных препаратов, вызывают образование «опухоли» (или узелка) в области инъекции, что приводит к медленному рассасыванию геля. При использовании терапевтических схем, подразумевающих введение низких доз лекарственных препаратов и частые инъекции, указанное не является серьезной проблемой. Однако при использовании терапевтических схем, подразумевающих введение высоких доз лекарственных препаратов и более час-

тые инъекции, медленное рассасывание геля необходимо предотвращать. Таким образом, необходимо разработать средства для ускорения рассасывания альгинатного геля из места инъекции.

Таким образом, существует настоящая необходимость в разработке фармацевтических композиций, обеспечивающих более гибкое и эффективное поддерживаемое высвобождение лекарственных препаратов, используемых для клинического применения. Многочисленные рекомбинантные или природные белки при постоянном длительном высвобождении могут обнаруживать более действенные клинические результаты.

Настоящее изобретение позволяет решить указанные задачи. Фармацевтические композиции, содержащие подвергающиеся биологической деградации частицы альгинатных гелей или гелей, полученных в соответствии с настоящим изобретением, способны обеспечить повышенную биологическую доступность препаратов, необходимую степень защиты белков, пониженную способность к деградации и медленное высвобождение белков при их увеличенной стабильности и активности. Кроме того, заявленные фармацевтические композиции обеспечивают простые, быстрые и недорогие системы контролируемого высвобождения рекомбинантных белков, что приводит к эффективным профилактическим, терапевтическим и диагностическим результатам.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение основано на исследованиях возможности использования немодифицированных альгинатных гидрогелей (альгинаты - это класс анионных полисахаридов) для поддерживаемого высвобождения белков. Такие содержащие белок немодифицированные альгинатные гидрогели образуются в том случае, когда соответствующими материалами заполняют шприц и оставляют его на некоторое время до формирования в шприце геля. Обнаружено, что такие гели могут быть введены путем инъекций. После однократной инъекции такого препарата экспериментальным грызунам наблюдалось поддерживаемое высвобождение белка в течение многих дней, однако образовывался видимый узелок (или опухоль) в месте инъекции препарата, который сохранялся длительное время без существенного уменьшения в размерах. Такой узелок состоял из содержащего воду альгинатного гидрогеля, и его размер зависел от объема первоначально инъецированного геля. Гелевые гранулы также задерживаются в месте инъекции.

Настоящее изобретение, таким образом, относится к новому классу подвергающихся биологической деградации биосовместимых полисахаридных гидрогелей, например, гидрогелей из альгинатных эфиров, используемых для поддерживаемого высвобождения терапевтиче-

ских белков. Неожиданно было обнаружено, что гидрогели альгинатных эфиров помимо способности к желированию, поддерживаемому высвобождению и возможности введения путем инъекций, что свойственно и немодифицированным альгинатам, не формируют узелков (опухолей) в участке инъекции. Таким образом, эфиры альгинатных гидрогелей подвергаются биологической деградации и рассасыванию и медленно проникают в окружающие ткани при минимальной реакции в участке инъекции.

Полученные в соответствии с настоящим изобретением композиции содержат альгинатные эфиры или их производные, ионно-сшитые в гидрогелевом (содержащем воду) матриксе, включающем терапевтический агент, например белок.

Настоящее изобретение также относится к способу получения композиций, подвергающихся биологической деградации и обеспечивающих поддерживаемое высвобождение.

Настоящее изобретение также относится к применению этерифицированных альгинатных материалов в жидких смесях для отложенного во времени желирования в организме.

Настоящее изобретение также относится к композициям, в которых гидрогели этерифицированных альгинатов находятся в форме гранул или микросфер для поддерживаемого высвобождения активных агентов, предпочтительно терапевтических белков. В одном варианте осуществления настоящего изобретения гидрогели этерифицированных альгинатов входят в состав композиций для применения в участках мишенях организма пациента. Такие композиции могут эффективно использоваться для предотвращения или ингибирования адгезии тканей в результате хирургического или травматического повреждения, в качестве дополнительного материала тканей, особенно для «наполнения» мягких и твердых тканей, для заполнения пограничного пространства рядом с подвергающимся резорбции материалом, в качестве подложки для роста тканей и мазей для лечения ран.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения гидрогели этерифицированных альгинатов используются для получения устройств, содержащих активный агент, предназначенных для имплантации в организм пациента, причем такой активный агент может быть связан или не связан с полимерным матриксом.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения заявленные композиции гидрогелей этерифицированных альгинатов обеспечивают способ улучшения биодоступности активного агента в составе композиции.

Наконец, композиции на основе гидрогелей этерифицированных альгинатов, полученные в соответствии с настоящим изобретением, используются для осуществления способа под-

держания во времени по существу постоянного объема крови у пациента.

Подробное описание изобретения

Композиции.

Гидрофильные полимеры, включая альгинаты и их производные, могут быть получены из различных коммерческих, природных или синтетических источников, хорошо известных из уровня техники. Используемый здесь термин «гидрофильный полимер» относится к растворимым в воде полимерам или полимерам, имеющим способность к абсорбции воды. Гидрофильные полимеры хорошо известны специалистам в данной области исследований. К таким полимерам относятся (без ограничений указанными) полианионные полимеры, в том числе анионные полисахариды, например альгинат, карбоксиметиламиноза, соли полиакриловой кислоты, соли полиметакриловой кислоты, сополимеры этилена и ангидрида малеиновой кислоты (полуэфир), карбоксиметилцеллюлоза, декстрансульфат, гепарин, карбоксиметилдекстран, карбоксицеллюлоза, 2,3-дикарбоксицеллюлоза, трикарбоксицеллюлоза, карбоксигуммиарабик, карбоксикаррагинан, пектин, карбоксипектин, карбоксигуммитрагакант, карбоксигуммиксантан, полисульфат пентозана, карбоксикрахмал, карбоксиметилхитин/хитозан, курдлан, гексасульфат инозитола, сульфат β -циклодекстрина, гиалуриновая кислота, хондроитин-6-сульфат, дерматансульфат, гепаринсульфат, карбоксиметилкрахмал, каррагинан, полигалактуронат, карбоксигуммигуар, полифосфат, полиальдегидокарбоновая кислота, поли-1-гидрокси-1-сульфонат-пропен-2, сополимер стирола с малеиновой кислотой, агароза, мезогликан, сульфопропилинированные поливиниловые спирты, сульфат целлюлозы, протаминсульфат, фосфогуммигуар, полиглутаминовая кислота, полиаспартиловая кислота, полиаминокислоты и производные или комбинации указанных соединений. Специалисту очевидно, что в объем данного изобретения входят и другие гидрофильные полимеры.

Сходным образом, связанные поливалентные ионы металлов могут быть получены из различных коммерческих, природных или синтетических источников, хорошо известных из уровня техники. В частности, ионы металлов включают (без ограничений указанными) ионы алюминия, бария, кальция, железа, магния, марганца, стронция и цинка. Предпочтительно, ионы металлов представляют собой ионы кальция и цинка, а также их соли, например, ацетат цинка, ацетат кальция или хлориды. Могут быть использованы и растворимые в воде небольшие молекулы, например, сульфат аммония, ацетон, этанол и глицерин.

В соответствии с настоящим изобретением в качестве этерифицирующих соединений карбоксильных групп альгиновой кислоты используются спирты алифатического ряда, например,

с максимальным числом атомов углерода, составляющим 34, которые могут быть насыщенными или ненасыщенными, а также могут быть замещены другими свободными или функционально модифицированными группами, такими как amino-, гидроксо-, альдегидо-, кето-, меркапто-, карбоксигруппы, или группами, происходящими из указанных, например гидрокарбил- или дигидрокарбиламино [далее термин «гидрокарбил» используется для обозначения не только моновалентных радикалов углеводородов, таких как C_nH_{2n+} , но и для бивалентных или тривалентных радикалов углеводородов, таких, как алкилены (C_nH_2) или алкилилены (C_nH_{2n})] группами, а также группами простых и сложных эфиров, ацетальными или кетальными группами, группами простых или сложных тиоэфиров и этерифицированными карбоксильными группами или карбамидными группами или карбамидными группами, замещенными одной или двумя гидроксигруппами, нитрильными группами или галогенами.

В указанных выше группах, содержащих гидрокарбильные радикалы, последние предпочтительно представляют собой низшие алифатические радикалы. Предпочтение отдается спиртам, замещенным одной или несколькими указанными функциональными группами.

В соответствии с настоящим изобретением спирты указанных выше групп предпочтительно представляют собой соединения, содержащие максимально 12 и более предпочтительно 6 атомов углерода, причем в указанных группах, к которым относятся аминогруппы, группы простых и сложных эфиров и тиоэфиров, ацетальные и кетальные группы, гидрокарбильные радикалы соответствуют алькильным группам с максимальным числом атомов углерода 4, а в этерифицированных карбокси- или замещенных карбамидных группах гидрокарбильные радикалы представлены алкилами с тем же самым числом атомов углерода и в amino- или карбамидных группах гидрокарбильные радикалы могут быть алкиленамино- или алкиленкарбамидными группами с максимальным числом атомов углерода 8. Среди спиртов, в первую очередь, следует указать насыщенные и незамещенные спирты, такие как метиловый, этиловый, пропиловый, изопропиловый, n-бутиловый, изобутиловый, трет.бутиловый, амиловый, пентиловый, гексиловый, октиловый, нониловый и додециловый, а также все спирты с линейной цепью, например n-октиловый или n-додециловый. Среди указанных замещенных спиртов следует перечислить двухатомные спирты, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или бутиленгликоль; трехатомные спирты, такие как глицерин; альдегидоспирты, например тартроновый спирт; карбоксиспирты, например молочные кислоты, например альфа-оксипропионовую кислоту, гликолевую кислоту, яблочную кислоту, тартаровые кислоты, лимонную кислоту;

аминоспирты, такие как аминоэтанол, аминопропанол, н-аминобутанол, а также их диметилили диэтилпроизводные по аминокислотной функции, холин, пирролидинилэтанол, пиперидинилэтанол, пиперазинилэтанол и соответствующие производные н-пропилового или н-бутилового спиртов, моноэтиленгликоль или его алкильные производные, например этилпроизводные по меркаптофункции.

Среди высших насыщенных алифатических спиртов, которые заслуживают специального упоминания, можно назвать цетиловый спирт или миристиловый спирт, однако особенно важными для целей настоящего изобретения являются высшие ненасыщенные спирты с одной или двумя двойными связями, в особенности, такие спирты, которые входят в состав многих эфирных масел и имеют сродство к терпенам, например цитронеллол, гераниол, нерол, неролидол, линалоол, фарнезол и фитол.

Среди низших ненасыщенных спиртов особое внимание уделяется пропаргиловому спирту.

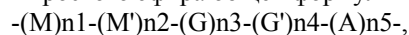
Среди указанных выше алифатических спиртов прежде всего следует отметить спирты, имеющие только один бензольный остаток, и в которых алифатическая цепь имеет максимально 4 атома углерода и, кроме того, бензольный остаток может быть замещен 1-3 метильными или гидроксигруппами или атомами галогена, в особенности, хлора, брома или иода, а алифатическая цепь может быть замещена одной или более функциональными группами, выбранными из группы, содержащей свободные аминокислотные группы или моно- или диметиловые группы, или пирролидиновыми или пиперидиновыми группами. Из указанных спиртов бензиловый спирт или фенетиловый спирт являются особенно предпочтительными. Спирты циклоалифатического или алифатического ряда могут быть получены из моно- или полициклических углеводородов и могут иметь максимально 34 атома углерода. Среди спиртов, полученных из циклических моноанулярных углеводородов, специального внимания заслуживают спирты с максимальным числом атомов углерода 12 с циклами, содержащими предпочтительно 5-7 атомов углерода, возможно замещенные, например, одной или тремя низшими алкильными группами, скажем, метиловой, этиловой, пропиловой или изопропиловой. Специфическими спиртами указанной группы являются циклогексанол, циклогександиол, 1,2,3-циклогексантриол и 1,3,5-циклогексантриол (флороглюцитол), инозитол, спирты, полученные из п-ментана, например, ментоловый спирт карвоментол, 1-терпинеоловые спирты альфа и гамма терпинеолы, известные как «терпинеолы», а также 1,4- и 1,8-терпины. Спиртами, полученными из углеводородов с конденсированными циклами, например, являются спирты туйана, пинана, кам-

пбана, в частности, туйанол, сабинолпинолгидрат, D- и L-борнеол и D- и L-изоборнеол.

Кроме того, следует указать и спирты, полученные в результате реакции этерификации эпоксисодержащих соединений альгинатами (см., например, патенты США 2 463 824 и 2 426 125).

Полные или неполные сложные эфиры, содержащие полианионы, в соответствии с настоящим изобретением, в целом, относятся к кислым полисахаридам, в которых гликозидный кислород находится в бета-положении по отношению к карбонильному атому углерода сложного эфира. Не будучи связанной с каким-либо специфическим механизмом, такая перегруппировка структур обеспечивает разрушение полимерной цепи за счет механизма бета-элиминации, что происходит в физиологических условиях.

Сложные эфиры альгиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением состоят из остатков маннуриновой кислоты (m-COOH или m-COO анион) и остатков глюкуроновой кислоты (g-COOH или g-COO анион), соединенных вместе гликозидными кислородными связями простого эфира общей формулы I



где M представляет собой остаток маннуриновой кислоты, m-COOH или m-COO анион;

M' представляет собой остаток сложного эфира маннуриновой кислоты, m-COOR1;

G представляет собой остаток глюкуроновой кислоты, g-COOH или g-COO анион;

G' представляет собой остаток сложного эфира глюкуроновой кислоты, g-COOR2;

A представляет собой единицы не g- и не m-цепей, например, сахара, продукты окисления сахаров или алифатические, ароматические, ариалифатические, циклоалифатические радикалы, которые могут быть замещены и прерваны гетероатомами, связанными внутри или на концах цепей;

n1, n2, n3, n4 и n5 представляют собой целые числа, отражающие примерное среднее число включенных единиц;

R1 и R2 представляют собой независимо выбранные алифатические, ароматические, ариалифатические, алкилароматические, циклоалифатические радикалы, которые могут быть замещены и прерваны гетероатомами; а также их производные (например, гидроксигруппы могут быть ацетилованными и вступившими в реакцию с изоцианатами) и фармацевтически приемлемые соли.

В сложных эфирах в соответствии с настоящим изобретением желательно, чтобы R1=R2=алифатическому или алкилароматическому радикалу и величина $100(n2+n4)/(n1+n2+n3+n4)$ составляла 1-99 моль%, предпочтительно 5-50 моль%, еще более предпочтительно 6-30 моль%, еще более предпочтительно 6-15 моль% и наиболее предпочтительно 7-12

моль%, а величина $100n5/(n2+n4)/(n1+n2+n3+n4+n5)$ составляла предпочтительно менее 10 моль%.

В неполных сложных эфирах в соответствии с настоящим изобретением незтерифицированные карбоксигруппы могут быть свободными или образовывать соль. Основания для формирования соли выбирают в соответствии с конечным использованием продукта. Неорганические соли могут быть образованы щелочными металлами, например, калием и, в особенности, натрием и аммонием, или щелочно-земельными металлами, например, кальцием, магнием или алюминием.

Особый интерес представляют соли, образованные органическими основаниями, в частности, азотсодержащими основаниями и, следовательно, алифатическими, арилатическими, циклоалифатическими или гетероциклическими аминами. Указанные аммонийные соли могут быть получены на основе терапевтически приемлемых аминов и нетоксичных, но терапевтически неактивных аминов, или же аминов с терапевтическим действием.

Предпочтительными аминами первого типа являются алифатические амины, например моно-, ди- и триалкиламины с алкильными группами, содержащими максимальное число атомов углерода 8, или арилалкиламины с тем же самым числом атомов углерода в алифатической части и где арил означает бензольную группу, возможно замещенную 1-3 метильными группами или атомами галогена или гидроксигруппами. Биологически неактивные основания для формирования солей могут быть также циклическими, например моноциклическими алкиленаминами с циклами, содержащими 4-6 атомов углерода, возможно прерванными гетероатомами, выбранными из группы, включающей азот и серу, например, пиперазином или морфолином, или могут быть замещенными, скажем, амино- или гидроксифункциями, такими как аминокэтанол, этилендиамин, эфедрин или холин.

Степень и тип этерификации можно регулировать известными методами синтеза. Предпочтительно получать альгинаты путем обработки четвертичных аммониевых солей альгиновой кислоты обычными алкилирующими агентами в среде апротонного органического растворителя, такого как диметилсульфоксид. Образовавшиеся эфиры предпочтительно представляют собой эфиры одноатомных спиртов, такие как низшие алкиловые, например, этиловые или аралкиловые, например, бензиловые или их смеси. Можно также получать эфиры путем обеспечения взаимодействия альгиновой кислоты с оксираном или эпоксисодержащими соединениями, такими как этилен- или пропиленоксид.

Можно также получать четвертичные аммониевые соли неполных эфиров, например,

соли тетраалкиламмония с вышеуказанным числом атомов углерода, предпочтительно соли этого типа, в которых четвертая алкильная группа содержит 1-4 атомов углерода, например, такой группой является метильная.

Степень этерификации (выраженная в моль %) альгината связана с желательной скоростью рассасывания геля в тканях пациента. Эта скорость рассасывания геля обычно связана с требуемой скоростью высвобождения активного вещества из геля, которая составляет более 5 лет или менее, обычно от 2 дней до 270 дней, чаще от 2 дней до 180 дней, предпочтительно от 2 дней до 90 дней. Степень этерификации (DE) составляет от 1 до 99 моль%, предпочтительно от 5 до 50 моль%, более предпочтительно от 6 до 30 моль%, еще предпочтительнее от 6 до 15 моль%, наиболее предпочтительно от 7 до 12 моль%.

Используемый в данном описании термин «буфер» или «буферный раствор» подразумевает применение неорганических или органических кислот или их смесей для приготовления буферного раствора, как известно из уровня техники. Неорганические кислоты в контексте данного изобретения включают галоидводородные кислоты (например, соляную), фосфорную, азотную, серную. Другие неорганические кислоты хорошо известны специалистам в данной области и входят в объем настоящего изобретения. Органические кислоты в контексте данного изобретения включают алифатические карбоновые кислоты и ароматические кислоты, такие как муравьиную, угольную, уксусную, пропионовую, масляную, валерьяновую, капроновую, акриловую, малоновую, янтарную, глутаминовую, адипиновую, малеиновую, фумаровую, глициновую или фенолсульфоновую. Другие органические кислоты хорошо известны специалистам в данной области.

Как подразумевается в настоящем описании, биологически активными веществами могут быть рекомбинантные или природные белки человека и животных, пригодные для профилактического, терапевтического или диагностического использования, а также соединения небелковой природы, такие как небольшие молекулы. Кроме того, биологически активные вещества могут быть природными, синтетическими или полусинтетическими соединениями или производными указанных соединений. Биологически активные вещества, согласно настоящему изобретению, должны быть способны к осаждению. Пригодным является широкий спектр биологически активных веществ. Такие вещества включают (без ограничений указанными) гормоны, цитокины, гематопозитические факторы, ростовые факторы, факторы, противодействующие ожирению, трофические факторы, противовоспалительные факторы и ферменты (см. также в патенте США № 4 695 463 дополнительные примеры природных биологически

активных веществ). Специалист в данной области легко может адаптировать требуемое биологически активное вещество к композициям по данному изобретению.

Такие белки включают (без ограничений) интерфероны (см. патенты США 5 372 808, 5 541 293, 4 897 471 и 4 695 623), интерлейкины (см. патент США 5 075 222, включенный в настоящее описание вместе с рисунками в качестве ссылки), эритропоэтины (см. патенты США 4 703 008, 5 441 868, 5 618 698, 5 547 933 и 5 621 080), гранулоцитарные колониестимулирующие факторы (см. патенты США 4 810 643, 4 999 291, 5 581 476, 5 582 823 и заявку PCT WO 94/17185), фактор стволовой клетки (см. заявки PCT WO 91/05795, WO 92/17505 и WO 95/17206) и белок 0B (см. заявки PCT WO 96/40912, WO 96/05309, WO 97/00128, WO 97/01010 и WO 97/06816). Кроме того, биологически активные вещества могут включать (без ограничения указанными) продукты, противодействующие ожирению, инсулин, гастрин, пролактин, адренокортикотропный гормон (АКТГ), тиреоид-стимулирующий гормон (ТШГ), лютеинизирующий гормон (ЛН), фолликулостимулирующий гормон (FSH), хорионический гонадотропин человека (HCG), мотилин, интерфероны (альфа, бета, гамма), интерлейкины (от ИЛ-1 до ИЛ-12), белок, связывающий фактор некроза опухолей (TNF- β), нейротрофический фактор, происходящий из головного мозга (BDNF), нейротрофический фактор глиальной клеточной линии (GDNF), нейротрофический фактор 3 (NT3), фактор роста фибробластов (FGF), нейротрофический ростовой фактор (NGF), факторы роста кости, такие как остеопротегерин (OPG), инсулиноподобные ростовые факторы (IGFs), макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), ростовой фактор, происходящий из мегакариотоцитов (MGDF), тромбopoэтин, ростовой фактор, происходящий из тромбоцитов (PGDF), колониестимулирующие ростовые факторы (CSFs), морфогенетический белок кости (BMP), супероксиддисмутаза (SOD), тканевой активатор плазминогена (TPA), урокиназа, стрептокиназа и калликреин. Используемый в данном описании термин «белки» относится к пептидам, полипептидам, консенсусным молекулам, аналогам, производным или комбинации указанных веществ.

Производные биологически активных веществ могут включать продукты присоединения одного или нескольких химических фрагментов к фрагменту белка. Было показано, что химическая модификация биологически активных веществ обеспечивает в некоторых случаях дополнительные преимущества, такие, как повышение стабильности и увеличение времени циркуляции терапевтического белка и снижение иммуногенности. Специалист в данной области

может выбрать нужную химическую модификацию на основе желательной дозировки, времени циркуляции, устойчивости к протеолизу, терапевтического применения и других соображений.

Используемый в данном описании термин «биологическая деградация» («биodeградация») означает распад молекулярной цепи конкретного полимера на ряд фрагментов меньшего размера, то есть распад на фрагменты с меньшим молекулярным весом. Термин «биоразрушающийся гель» относится к рассасыванию геля вблизи места его применения, где рассасывание сопряжено с распадом молекулярной цепи образующих полимеров, приводящим к образованию фрагментов полимерной цепи меньшего размера.

Комплексы.

Белки, их аналоги или производные могут быть введены в виде комплексов со связующим компонентом. Такой компонент может обеспечивать пролонгирование времени циркуляции белка, аналога или производного или увеличение активности биологически активного вещества. Он может быть белком (понятие «пептид» используется в качестве синонима), его производным, аналогом или их комбинацией. Например, связывающим белком для белка 0B является рецептор белка 0B или его участок, например, растворимый фрагмент. Другие связывающие белки могут быть выявлены при анализе белка 0B или другого выбранного белка в сыворотке или же эмпирически скринированы на связывающую способность. Такое связывание обычно не должно влиять на способность белка 0B или его аналога или производного связываться с эндогенным рецептором белка 0B и/или вызывать сигнальную трансдукцию. Помимо белка 0B, в соответствии с данным изобретением могут быть получены комплексы и других терапевтически значимых белков со связывающим компонентом. Специалист в данной области знаний может выбрать подходящие связывающие белки для использования в соответствии с настоящим изобретением.

Подобным образом, преципитирующие агенты, используемые для осаждения биологически активного вещества, могут быть получены из различных коммерческих, природных или синтетических источников, хорошо известных из уровня техники. Преципитирующие агенты (без ограничения указанными), включают ионы поливалентных металлов, их соли, такие как ацетаты, цитраты, хлориды, карбонаты, оксалаты, тартраты или гидроокиси указанных соединений, кислоты или водорастворимые полимеры. В частности, ионы металлов (без ограничения указанными) могут включать ионы алюминия, бария, кальция, железа, марганца, магния, стронция и цинка. Предпочтительными ионами металла являются ионы цинка или его соли, такие, как ацетатная или хлоридная соль. Можно

использовать и водорастворимые молекулы небольшого размера, такие как сульфат аммония, ацетон, этанол и глицерин.

Что касается водорастворимых полимеров, они включают (без ограничения указанными) полиэтиленгликоль, сополимеры этиленгликоля с пропиленгликолем, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимеры этилена с малеиновым ангидридом, полиаминокислоты, поли(N-винилпирролидон), гомополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля, сополимеры окиси этилена и окиси полипропилена, полиоксиэтилированные полиолы, сукцинат поливинилового спирта, глицерин, этиленоксиды, пропиленоксиды, полоксамеры, алкоксилированные сополимеры, водорастворимые полианионы, а также производные и комбинации указанных соединений. Водорастворимый полимер может быть любого молекулярного веса и может быть разветвленным или неразветвленным. Например, предпочтительным является полиэтиленгликоль с молекулярным весом от примерно 700 Да до примерно 100 кДа вследствие того, что он удобен в обращении и обеспечивает эффективное осаждение.

Могут быть использованы осаждающие агенты другого типа и других размеров, их выбор зависит от нужной терапевтической схемы (например, необходимой продолжительности поддерживаемого высвобождения, влияния, если оно имеет место, на биологическую активность, легкости в обращении, степени или отсутствия антигенности и других известных воздействий желаемого осаждающего агента на терапевтически активный белок или аналог). Специалист в данной области может легко определить, какие другие преципитирующие агенты входят в объем настоящего изобретения.

Кроме того, композиции, полученные согласно данному изобретению, могут также включать дополнительные добавки, необходимые для стабилизации биологически активных веществ и/или гидрофильного полимера. Такие добавки могут входить в состав буфера и представлять собой консерванты, не ограничиваясь последними.

Фармацевтические композиции.

Фармацевтические композиции с поддерживаемым высвобождением согласно данному изобретению могут быть введены оральным путем (например, в виде капсул, таких как твердые капсулы и мягкие капсулы, твердых препаратов, таких как гранулы, таблетки, пилюли, пастилки, лепешки, крахмальные капсулы, шарики, порошки и лиофилизированные формы, а также жидких препаратов, таких как суспензии) и не оральным путем (например, в виде внутримышечных, подкожных, чрезкожных, висцеральных, внутривенных, внутрибрюшинных, внутриартериальных, внутриболоочечных,

внутрикапсульных, внутриглазных, инъекционных, легочных, назальных, ректальных и маточно-трансмуккозных препаратов).

В целом, данное изобретение охватывает фармацевтические композиции с поддерживаемым высвобождением, включающие эффективное количество белка или его производных в сочетании с фармацевтически приемлемыми разбавителями, консервантами, солюбилизаторами, эмульгаторами, адъювантами и/или носителями, необходимыми для введения (см. заявку WO 97/01331). Оптимальная фармацевтическая рецептура для нужного биологически активного вещества определяется специалистом в данной области в зависимости от способа введения и требуемой дозировки. Примеры фармацевтических композиций описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences [Mack Publishing Co., 18th Ed., Easton, PA, pgs. 1435-1712 (1990)].

Вследствие тиксотропной природы геля с поддерживаемым высвобождением для подкожного введения можно использовать шприцы. Композиция может образовывать гель в шприце и далее вводиться пациенту. Такое гелеобразование можно осуществлять замедленным способом. Время регулируется изменением количества гелеобразующего агента и донора в смеси, если это необходимо. Такой препарат будет использоваться для последующего повторного гелеобразования в организме пациента после инъекции. Термин «тиксотропный», используемый в данном описании, относится к вязкости гелеобразной смеси, которая уменьшается под давлением, например, создаваемым поршнем шприца, в этой точке смесь способна течь, например, через иглу шприца и затем вновь образовывать гель в месте инъекции.

Концепция замедленного гелеобразования также может использоваться при заполнении шприца, когда гелевая композиция с поддерживаемым высвобождением помещается в шприц и образует гель в заданный момент времени в шприце, например, в интервале, составляющем от нескольких минут до многих часов, после заполнения шприца. Это позволяет избежать необходимости заполнения шприца составом, который уже находится в виде геля. Такие предварительно заполненные шприцы могут храниться до последующей инъекции пациентам.

Компоненты, необходимые для введения препарата, включают разбавители с различными буферными системами (например, Трис-НСI, ацетат), рН и ионной силой; добавки, такие как поверхностно-активные вещества и солюбилизующие агенты (например, Tween 80, HCO-60, полисорбат 80), антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту, глутамин, метабисульфит натрия), дополнительные полисахариды (например, карбоксиметилцеллюлозу, альгинат натрия, гиалуронат натрия, протаминсульфат, полиэтиленгликоль), консерванты (например, Thimersol, бензиловый спирт, метилпарабен,

пропилпарабен) и наполнители (например, лактозу, маннитол). Состав может вводиться в частицы полимерных соединений, такие, как полимеры или сополимеры полимолочной/полиглицолевой кислоты и т.д. или же в сочетании с липосомами. Для введения препарата можно использовать и гиалуроновую кислоту, что способно обеспечить еще более продолжительное время циркуляции. Кроме того, композиции с замедленным высвобождением согласно данному изобретению можно диспергировать в масле (например, сезамном, кукурузном, растительном) или смеси масла с фосфолипидом (например, лецитином) или в триглицеридах жирных кислот со средней длиной цепи (например, Migliol 812) для образования масляной суспензии. Композиции согласно данному изобретению можно диспергировать и в присутствии диспергирующих агентов, таких как водорастворимые полисахариды (например, маннитол, лактоза, глюкоза, крахмалы), гиалуроновая кислота, глицин, фибрин, коллаген и неорганические соли (например, хлорид натрия).

Кроме того, при использовании композиций с замедленным высвобождением согласно данному изобретению предусмотрено применение механических устройств, предназначенных для легочного введения терапевтических препаратов, включая (без ограничений указанными) распылители, ингаляторы с отмеренной дозой и ингаляторы для порошков, которые известны специалистам в данной области знаний.

Компоненты композиции могут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость выведения *in vitro* белков и их производных. Специалисты в данной области легко могут подобрать соответствующие компоненты и/или механические устройства для введения препарата в зависимости от терапевтической схемы, способа введения, нужной дозы, времени циркуляции, устойчивости к протеолизу, стабильности белков и других факторов.

Методы применения.

Терапевтический.

Терапевтическое применение зависит от типа биологически активного вещества. Специалист может легко адаптировать необходимый биологически активный агент для целей данного изобретения при терапевтическом применении. Терапевтическое применение таких агентов более подробно описано в следующих публикациях, которые вместе с рисунками включены в данное описание в качестве ссылок. Такое применение предусматривает использование (без ограничений указанными) белков типа интерферонов (см. патенты США 5 372 808, 5 541 293, 4 897 471 и 4 695 623), интерлейкинов (см. патент США 5 075 222), эритропоэтинов (см. патенты США 4 703 008, 5 441 868, 5 618 698, 5 547 933 и 5 621 080), гранулоцитарных колониестимулирующих факторов (см. па-

тенты США 4 999 291, 5 581 476, 5 582823, 4 810 643 и заявку WO 94/17185), факторов стволовых клеток (заявки WO 91/05795, WO 92/17505 и WO 95/17206) и белка 0B (см. заявки WO 96/40912, WO 96/05309, WO 97/00128, WO 97/01010 и WO 97/06816).

Кроме того, настоящее изобретение относится к применению биологически активных веществ, включающих (без ограничений указанными) продукты, препятствующие ожирению, инсулин, гастрин, пролактин, адренокортикотропный гормон (АСТН), тироидстимулирующий гормон (ТSH), лютеинизирующий гормон (LH), фолликулостимулирующий гормон (FSH), хорионический гонадотропин человека (HCG), мотилин, интерфероны (альфа, бета, гамма), интерлейкины (от ИЛ-1 до ИЛ-12), белок, связывающий фактор некроза опухолей (TNF- β), нейротрофический фактор, происходящий из головного мозга (BDNF), нейротрофический фактор глиальной клеточной линии (GDNF), нейротрофический фактор 3 (NT3), фактор роста фибробластов (FGF), нейротрофический ростовой фактор (NGF), факторы роста кости, такие как остеопротегерин (OPG), инсулиноподобные ростовые факторы (IGFs), макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), ростовой фактор, происходящий из мегакариноцитов (MGDF), тромбopoэтин, ростовой фактор, происходящий из тромбоцитов (PGDF), колониестимулирующие ростовые факторы (CSFs), морфогенетический белок кости (BMP), супероксиддисмутазу (SOD), тканевой активатор плазминогена (TPA), урокиназу, стрептокиназу и калликреин. Используемый здесь термин «белки» относится к пептидам, полипептидам, консенсусным молекулам, а также производным, аналогам или комбинациям указанных соединений. Кроме того, заявленные композиции можно использовать для производства одного или нескольких медикаментов для лечения или облегчения состояний, для которых показана терапия с помощью указанных биологически активных агентов.

Например, оксигенация крови и снижение резорбции костной ткани или остеопороза могут быть достигнуты при отсутствии потери веса.

Комбинированная терапия.

Заявленные композиции и методы можно использовать в сочетании с другими терапевтическими методами, такими как чередующаяся диета и физические упражнения. Можно использовать другие лекарственные средства, например, пригодные для лечения диабета (например, инсулин и, возможно, амилин), препараты, понижающие уровень холестерина и снижающие кровяное давление (такие, которые, например, снижают уровень липидов в крови или другие сердечно-сосудистые лекарства), препараты, повышающие активность (например,

амфетамины), диуретики (для выведения жидкости) и вещества, подавляющие аппетит. Введение указанных средств может осуществляться одновременно или последовательно. Кроме того, заявленные в соответствии с изобретением способы могут применяться в сочетании с хирургическими процедурами, такими как косметическая хирургия, предназначенная для изменения внешности (например, липосакция или лазерная хирургия, направленные на уменьшение массы тела, или методы имплантации для увеличения массы тела). Польза, которую приносит сердечная хирургия, например, шунтирование или другие методы, предназначенные для облегчения тяжелого состояния, вызванного закупоркой кровеносных сосудов жировыми отложениями, например, артериальными бляшками, может быть повышена при использовании композиций и способов согласно данному изобретению. Способы удаления камней в желчном пузыре, такие как ультразвуковой или лазерный методы, также могут быть использованы до, во время или после курса терапии в соответствии с данным изобретением. Кроме того, заявленные способы могут быть применены в сочетании с хирургическими или терапевтическими методами лечения переломов, повреждений мышц или с другими терапевтическими методами, эффективность которых повышается при увеличении нежировой массы тела.

Дозировка.

Специалист в данной области легко может подобрать эффективные дозы для введения препаратов, наблюдая за желательным терапевтическим действием. Доза препарата с поддерживаемым высвобождением представляет собой количество, необходимое для достижения эффективной концентрации биологически активного вещества *in vivo* для данного периода времени. Дозировка и предпочтительная частота введения препарата с поддерживаемым высвобождением меняются в зависимости от типа биологически активного вещества, необходимой продолжительности высвобождения, типа заболевания и желательной частоты введения, вида животного и других факторов. Предпочтительный состав препаратов обеспечивает дозы, составляющие от примерно 0,1 мкг/кг/день до примерно 100 мг/кг/день, что необходимо для достижения нужного терапевтического эффекта.

Эффективные дозы могут быть определены с использованием диагностических средств во времени. Например, заявленное изобретение предусматривает дозирование белка ОВ. Вначале можно использовать диагностический подход для определения содержания белка ОВ в крови (или плазме крови или сыворотке) и выявления эндогенных уровней белка ОВ. Такой диагностический метод может представлять собой метод анализа с антителами, например, антительный «сэндвич-метод». Количество эндогенного белка ОВ определяется вначале, он составляет

базовую линию. Терапевтические дозы рассчитываются по мере того, как определяются количества эндогенного и экзогенного белка (то есть белка, его аналога или производного, обнаруженного в организме, который образовался как сам по себе, так и был введен в организм) в течение курса терапии. Например, первоначально может требоваться сравнительно высокая доза, пока не проявится терапевтический эффект, а затем можно применять меньшие дозы для поддержания такого эффекта.

Материалы и методы.

Материалы.

Альгинат в виде альгината натрия может быть получен из хорошо известных источников. Белок ОВ и GCSF производит Amgen Inc. Другие химические вещества получают из хорошо известных источников.

Препараты альгинатного гидрогеля в виде частиц/гранул.

Препарат альгинатного гидрогеля в виде частиц или гранул с белками или без них подробно описан в одновременно рассматриваемой заявке США 08/842,756.

Препараты в виде геля с замедленным высвобождением. Препараты альгинатных гидрогелей с замедленным высвобождением с белками или без белков подробно описаны в одновременно рассматриваемых заявках США 08/857,913 и 08/912,902.

Для более полной иллюстрации данного изобретения ниже приведены примеры, не ограничивающие объема изобретения. С учетом этих примеров специалист в данной области легко может внести необходимые изменения, не выходящие за рамки настоящего изобретения, в целях обеспечения крупномасштабного производства.

Пример 1.

Нижеследующий пример касается получения альгинатных эфиров, используемых в соответствии с данным изобретением.

Синтез А. Тетрабутиламмоний (ТВА) альгинат.

Кислая сульфированная смола (Bio-Rad, AG MP-50) превращается в тетрабутиламмониевую (ТВА) соль при обработке гидроокисью тетрабутиламмония (Aldrich) периодическим методом при комнатной температуре. К раствору 10 г натриевой соли альгиновой кислоты в 800 мл дистиллированной воды добавляют 60 мл сульфированной смолы (Bio-Rad, AG MP-50) в виде тетрабутиламмониевой соли. Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 0,5 ч. Смолу удаляют путем фильтрации, промывают дистиллированной водой. ТВА-альгинат выделяют из фильтрата методом замораживания-высушивания (выход 16,8 г), его получение подтверждают с помощью ¹H ЯМР.

Синтез Б. Неполный этиловый эфир альгиновой кислоты, степень этерификации (DE) равна 30 моль%.

ТВА альгинат (6 г, 14,4 ммоль ТВА звеньев) растворяют в 500 мл диметилсульфоксида (DMSO) при комнатной температуре. Затем добавляют йодэтан (Aldrich, 673 мг, 4,3 ммоль). Смесь перемешивают при 30°C в течение 15 ч, затем охлаждают до комнатной температуры. К этому раствору медленно добавляют раствор 2 г NaCl в 20 мл воды для полного превращения ТВА в натриевую соль. После перемешивания в течение 15-30 мин раствор медленно выливают в 1500 мл этилацетата. Осадок собирают при фильтрации и 3 раза промывают смесью ацетон/вода (8:1, по объему) и 3 раза ацетоном, затем сушат в вакууме. Полученное соединение вновь растворяют в дистиллированной воде (около 100 мл) и доводят значение pH примерно 6,5 с помощью 0,2% бикарбоната натрия при 0°C. Затем раствор подвергают диализу (MW 8000) в течение суток при противотоке дистиллированной воды при 4°C и далее замораживанию-высушиванию. Выход неполного эфира равен 2,8 г, а степень этерификации составляет 30 +/- 1% (¹H ЯМР, внутренний стандарт - малеимид).

Синтез В. Полный и неполный этиловый эфир альгиновой кислоты, DE=100%, 50%, 20%, 10% и 5%.

Получение указанных соединений аналогично описанному на стадии «Синтез Б», за исключением того, что количество йодэтана подбирают для достижения желательной степени этерификации.

Синтез Г. Неполные пропиловый, гексиловый, октиловый, и додециловый эфиры альгиновой кислоты.

Получение указанных соединений аналогично описанному на стадиях «Синтез Б» и «Синтез В», за исключением того, что йодэтан заменяют 1-йодпропаном, 1-йодгексаном, 1-йодоктаном и 1-йоддодеканом соответственно.

Синтез Д. Неполный бензиловый эфир альгиновой кислоты, DE=30%.

ТВА альгинат (2,5 г, 5,99 ммоль ТВА звеньев) растворяют примерно в 200 мл DMSO при комнатной температуре. Добавляют бензилобромид (Aldrich, 307 мг, 1,8 ммоль) и ТВА йодид (Aldrich, 3 мг). Смесь перемешивают при 30°C в течение 15 ч и затем охлаждают до комнатной температуры. К полученному раствору медленно добавляют раствор 0,6 г NaCl в 10 мл воды для полного превращения ТВА в натриевую соль. После перемешивания в течение 15-30 мин медленно выливают полученный раствор в 500 мл этилацетата. Осадок собирают после фильтрации и промывают 3 раза смесью ацетон/вода (8:1, по объему) и 3 раза ацетоном, затем высушивают под вакуумом. Полученный осадок вновь растворяют в дистиллированной воде (около 60 мл) и доводят значение pH при-

мерно до 6,5 с помощью 0,2% бикарбоната натрия при 0°C. Затем раствор подвергают диализу (MW 8000) в течение суток при противотоке дистиллированной воды при 4°C. Выход неполного эфира равен 1,3 г, а степень этерификации составляет 30 +/-1% ¹H ЯМР, внутренний стандарт - малеимид).

Синтез Е. Неполный и полный бензиловый эфир альгиновой кислоты с различной DE.

Получение указанных соединений аналогично описанному на стадии «Синтез Д», за исключением того, что количество бензилобромид и ТВА йодида регулируют с целью достижения желательной степени этерификации.

Пример 2.

Нижеследующий пример иллюстрирует получение геля этилового эфира альгиновой кислоты (DE=15 моль% и 10 моль%), содержащего белковое лекарственное средство (Лептин), и поддерживаемое высвобождение из геля указанного средства *in vitro*.

Лептин (100 мг/мл; 10 mM Трис-HCl, pH 8,8; pH доводят примерно до 8,0-8,8 с помощью 1 M NaOH) и 6% этилового эфира альгиновой кислоты (15 моль%, 10 mM Трис-HCl, pH 8,6) охлаждают на ледяной бане. Лептин (0,5 мл) добавляют к 6% этиловому эфиру альгиновой кислоты (0,18 мл) и перемешивают смесь на ледяной бане в течение 10-15 мин; конечный pH равен 8,6-8,8. К этой смеси добавляют суспензию 1 M CaCO₃ (16 мкл) и полученную суспензию тщательно перемешивают. К суспензии по каплям при перемешивании добавляют раствор 0,1 M ZnCl₂ (100 мкл); затем добавляют воду до получения объема, составляющего 1 мл. Смесь тщательно перемешивают и выдерживают 10-20 мин на ледяной бане. Затем к смеси добавляют при тщательном перемешивании раствор 1,68 M d-глюконолактона (Aldrich, 56 мкл). Полученную смесь (50 мг/мл лептина, 1% этиловый эфир альгиновой кислоты, 0,1 мл) помещают на внутреннюю поверхность пробирки Эппендорфа и оставляют на ночь при 4°C для гелеобразования. После хранения в течение ночи осуществляют высвобождение белка в 10 mM гистидиновом буфере, pH 7,4, *in vitro*. Гель со степенью этерификации 15 моль% обеспечивает минимально быстрое высвобождение лептина и прекращение поддерживаемого его высвобождения, причем 60% белка высвобождается в течение 6 дней. Гель со степенью этерификации 10 моль% обеспечивает минимально быстрое высвобождение лептина и довольно постоянное его высвобождение, причем 55% белка высвобождается в течение 6 дней.

Пример 3.

Нижеследующий пример иллюстрирует получение геля гексилового эфира альгиновой кислоты (DE=15 и 10 моль%), содержащего белковое лекарственное средство (лептин), и поддерживаемое высвобождение из геля указанного средства *in vitro*.

Способ в соответствии с данным примером, осуществляют аналогично описанному в примере 2, за исключением того, что вместо этилальгината используют гексилальгинат.

Гели гексилового эфира альгиновой кислоты со степенью этерификации 15 и 10 моль% обеспечивают минимально быстрое высвобождение лептина и поддерживаемое его высвобождение, причем 50% белка высвобождается в течение 6 дней.

Пример 4.

Нижеследующий пример иллюстрирует получение геля этилового эфира альгиновой кислоты (DE=15 моль%), содержащего белковое лекарственное средство (Zn-лептин), и поддерживаемое высвобождение из геля указанного средства *in vitro*.

К раствору 4% (вес/объем) этилальгината (15 моль%, 0,75 мл) добавляют 1 М Трис-НСI, pH 8,0 (7,5 мкл), 0,5 мкл PIPES, pH 6,8 (33 мкл) и 0,1 М ZnCl₂ (8,5 мкл). Смесь тщательно перемешивают. К этой смеси добавляют суспензию Zn-лептина (100 мг/мл, 675 мкл) и тщательно перемешивают. Затем к смеси добавляют при тщательном перемешивании суспензию 1 М CaCO₃ (24 мкл) и раствор 1,68 М d-глюконолактона (Aldrich, 70 мкл). Полученную смесь (0,1 мл) помещают на внутреннюю поверхность пробирки Эппендорфа и оставляют на ночь при 4°C для гелеобразования. После хранения в течение ночи осуществляют высвобождение белка в 10 мМ гистидиновом буфере, pH 7,4, *in vitro*. Гель со степенью этерификации 15 моль% обеспечивает небольшую степень минимально быстрого высвобождения и поддерживаемое высвобождение, причем 65% белка высвобождается в течение 4 дней.

Пример 5.

Нижеследующий пример иллюстрирует получение геля этилового эфира альгиновой кислоты (DE=30 моль%), содержащего белковое лекарственное средство (GCSF), и поддерживаемое высвобождение из геля указанного средства *in vitro*.

К раствору 2,39% этилальгината (30 моль%, 0,50 мл) добавляют 0,1 М ацетатный буфер, pH 4,5 (100 мкл), GCSF (104 мкл, 48,2 мг/мл, HCl, pH 3) и дистиллированную воду (246 мл). Смесь тщательно перемешивают. Затем к смеси добавляют при тщательном перемешивании суспензию 1 М CaPO₄ (10 мкл) и раствор 1,68 М d-глюконолактона (Aldrich, 40 мкл). Полученную смесь (0,2 мл) помещают на внутреннюю поверхность пробирки Эппендорфа и оставляют на ночь при 4°C для гелеобразования. После хранения в течение ночи осуществляют высвобождение белка в 10 мМ Трис-буфере, pH 7,5, *in vitro*. Полученный гель со степенью этерификации 30 моль% обеспечивает менее чем 5% минимально быстрое высвобождение и поддерживаемое высвобождение, при-

чем 20% белка высвобождается в течение 1 дня и 40% белка высвобождается за 2 дня.

Пример 6.

Нижеследующий пример иллюстрирует получение геля бензилового эфира альгиновой кислоты (DE=30 моль%), содержащего белковое лекарственное средство (GCSF), и поддерживаемое высвобождение из геля указанного средства *in vitro*.

Способ в соответствии с данным примером осуществляют аналогично описанному в примере 5, за исключением того, что вместо этилальгината используют бензилальгинат. Гель бензилового эфира альгиновой кислоты образуется при хранении в течение ночи. Полученный гель со степенью этерификации 30 моль% обеспечивает менее чем 5% минимально быстрое высвобождение и поддерживаемое высвобождение, причем 40% белка высвобождается в течение 1 дня и 80% белка высвобождается за 2 дня.

Пример 7.

Нижеследующий пример иллюстрирует получение гранул этилового эфира альгиновой кислоты.

Гранулы геля получают при добавлении по каплям 2% растворов эфиров альгиновой кислоты в 100 мМ растворы хлорида кальция (дистиллированная вода или 1 М Трис-НСI, pH 7,0). Сформировавшиеся гранулы промывают дистиллированной водой или буфером. Гранулы приготавливают из гелей со степенью этерификации 30 или 50 моль%.

Пример 8.

Нижеследующий пример иллюстрирует получение гранул эфира альгиновой кислоты, содержащих лептин.

Гранулы геля получают при добавлении по каплям раствора лептина [25 мг/мл в 2% этилальгинате (Трис-НСI, pH 8,7)] в 100 мМ раствор хлорида кальция и 25 мМ раствор хлорида цинка. Гранулы приготавливают из гелей со степенью этерификации 30 моль%. Гранулы обеспечивают поддерживаемое высвобождение *in vitro* лептина.

Пример 9.

Нижеследующий пример иллюстрирует уменьшение молекулярного веса (или расщепление эфиров альгиновой кислоты) в среде буферных растворов при нейтральных физиологических pH.

Эфиры альгиновой кислоты (1% раствор) растворяют или в фосфатном буфере (0,1 фосфат натрия, pH 6,8) или 0,1 М Трис-буфере (pH 7,0) и выдерживают при 37°C. Снижение молекулярного веса определяется измерением уменьшения вязкости раствора (Brookfield, 25°C) в выбранные интервалы времени. Установлено, что немодифицированный альгинат натрия является сравнительно стабильным, его вязкость снижается только на 5% за 8 дней (фосфатный буфер); однако, в случае этилового и бензилового эфиров альгиновой кислоты

(DE=30 моль%) вязкость уменьшается на 35% за 8 дней в том же самом буфере. Степень расщепления эфиров альгиновой кислоты зависит также от степени этерификации, например, в случае этилового эфира с меньшей степенью этерификации (DE=15 моль%) вязкость уменьшается на 25% за 8 дней. Таким образом, снижение молекулярного веса связано со степенью этерификации.

Пример 10.

Нижеследующий пример иллюстрирует расщепление (или постепенное рассасывание) гидрогелей эфиров альгиновой кислоты, не содержащих белка и содержащих белок, *in vivo*.

Гели эфиров альгиновой кислоты получают, как описано в примере 3, однако полученную смесь помещают в шприц и оставляют на ночь при 4°C для гелеобразования. Затем 100 мкл геля вводят подкожно мышам в заднюю часть шеи (Charles River, самки, 12 нед., BDF1, 20 г, 5 животных в группе) и периодически осматривают место инъекции у различных мышей в группе хирургическим методом.

В случае этилового и бензилового эфиров альгиновой кислоты с DE=30 моль% результаты одноразовой инъекции свидетельствуют о том, что гидрогель альгинатов рассасывается через 2 нед. В случае этилового эфира альгиновой кислоты с DE=15% гель не рассасывается к 30 и 61 дню, однако его объем уменьшается. В случае этилового эфира альгиновой кислоты с DE=5% гель не рассасывается к 30 и 61 дню, однако, его объем незначительно уменьшается. При использовании незамещенного альгината натрия к 61 дню гель практически не рассасывается и его объем не уменьшается.

Скорость рассасывания альгинатных гелей не зависит от наличия белка.

Пример 11.

Нижеследующий пример иллюстрирует уменьшение молекулярного веса и фармакокинетику альгинатных гидрогелей, содержащих лептин, у крыс.

Гели этилового эфира альгиновой кислоты получают, как описано в примере 4, однако полученную смесь помещают в шприц и оставляют в течение ночи при 4°C для образования геля. Крысам вводят болюсные дозы 0 мг/кг (контроль) и 100 мг/кг и затем в течение 7 дней постоянно контролируют уровень препаратов в крови снижение веса.

Результаты экспериментов следующие: в случае этилового эфира альгиновой кислоты с DE=5% наблюдается его устойчивый уровень в крови в течение 3 дней, составляющий около 2000 нг/мл, затем он снижается до 2~3 нг/мл в течение последующих 3-4 дней; в случае этилового эфира альгиновой кислоты с DE=15% наблюдается его устойчивый уровень в крови в течение 2 дней, составляющий около 2000 нг/мл, затем он снижается до 2~3 нг/мл в течение последующих 5 дней; в случае этилового

эфира альгиновой кислоты с DE=30% наблюдается его уровень в крови в течение 1 дня, составляющий около 2000 нг/мл, затем он снижается до 2~3 нг/мл в течение последующих 4 дней; пиковый уровень в крови суспензии Zn-лептина наблюдается через 12 ч, затем он снижается до 1-2 нг/мл через 6 дней. У всех животных наблюдается потеря веса, свидетельствующая об активности Zn-лептина. Результаты исследований также показывают, что включение Zn-лептина в гели этилового эфира альгиновой кислоты (DE=5% и DE=15%) приводит к почти двукратному увеличению (фактор 1,8-1,9) площади под кривой (AUC) для Zn-лептина, что предполагает двукратное увеличение биодоступности, а использование геля этилальгината (DE=30 моль%) обеспечивает такую же биодоступность Zn-лептина по результатам AUC.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция геля с поддерживаемым замедленным высвобождением, включающая

а) биodeградируемый анионный полисахарид;

б) биологически активное вещество и

в) по меньшей мере, один связанный ион поливалентного металла, причем указанный деградируемый анионный полисахарид представляет собой альгинатный эфир, который перекрестно связан с указанным ионом поливалентного металла с образованием биodeградируемого биологически совместимого гидрогеля альгинатного эфира с замедленным высвобождением, пригодного для введения путем инъекции.

2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что связанный ион поливалентного металла представляет собой смесь связанного и несвязанного ионов поливалентного металла.

3. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что дополнительно содержит наполнители для стабилизации биологически активного вещества или анионного полисахарида.

4. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что связанный ион поливалентного металла находится в виде соли, выбранной из группы, состоящей из ацетатов, фосфатов, лактатов, тарتراتов, цитратов, хлоридов, карбонатов или соответствующих гидроокисей.

5. Композиция по п.4, отличающаяся тем, что ион металла выбран из группы, состоящей из марганца, стронция, железа, магния, кальция, бария, меди, алюминия или цинка.

6. Композиция по п.5, отличающаяся тем, что ион металла представляет собой ион кальция.

7. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что биологически активное вещество представляет собой белок, а композиция характеризуется повышенной биодоступностью.

8. Композиция по п.7, отличающаяся тем, что количество белка составляет, по меньшей мере, 0,001 мг/мл.

9. Композиция по п.7, отличающаяся тем, что белок выбран из группы, состоящей из гематопоэтических факторов, колониестимулирующих факторов, факторов, противодействующих ожирению, ростовых факторов, трофических факторов и противовоспалительных факторов.

10. Композиция по п.7, отличающаяся тем, что белок выбран из группы, состоящей из лептина, G-CSF, CSF, BDNF, GDNF, NT3, GM-CSF, IL-1ra, IL2, TNF- β , MGDF, OPG, интерферонов, эритропоэтина, KGF, инсулина или аналогов или производных указанных соединений.

11. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что биологически активное вещество представляет собой комплекс биологически активного вещества.

12. Композиция по п.11, отличающаяся тем, что комплекс биологически активного вещества представляет собой осажденный белок.

13. Композиция по п.12, отличающаяся тем, что осажденный белок представляет собой преципитат Zn-лептина.

14. Способ получения композиции геля с поддерживаемым замедленным высвобождением, включающий

смешивание биологически активного вещества и гидрофильного биodeградируемого анионного полисахарида с получением первой смеси и

смешивание первой смеси, по меньшей мере, с одним связанным ионом поливалентного металла с получением второй смеси, причем указанный деградируемый анионный полисахарид представляет собой альгинатный эфир, который перекрестно связан с указанным ионом поливалентного металла с образованием биodeградируемого биологически совместимого гидрогеля альгинатного эфира с замедленным высвобождением, пригодного для введения путем инъекции.

15. Способ по п.14, отличающийся тем, что связанный ион поливалентного металла находится в виде соли, выбранной из группы, со-

стоящей из ацетатов, фосфатов, лактатов, тарتراتов, цитратов, хлоридов, карбонатов или соответствующих гидроокисей.

16. Способ по п.14, отличающийся тем, что ион металла выбран из группы, состоящей из марганца, стронция, железа, магния, кальция, бария, меди, алюминия или цинка.

17. Способ по п.16, отличающийся тем, что ион металла представляет собой ион кальция.

18. Способ по п.14, отличающийся тем, что биологически активное вещество представляет собой белок.

19. Способ по п.18, отличающийся тем, что белок выбран из группы, состоящей из гематопоэтических факторов, колониестимулирующих факторов, факторов, противодействующих ожирению, ростовых факторов, трофических факторов и противовоспалительных факторов.

20. Способ по п.18, отличающийся тем, что белок выбран из группы, состоящей из лептина, G-CSF, CSF, BDNF, GDNF, NT3, GM-CSF, IL-1ra, IL2, TNF- β , MGDF, OPG, интерферонов, эритропоэтина, KGF, инсулина или аналогов или производных указанных соединений.

21. Способ по п.14, отличающийся тем, что биологически активное вещество представляет собой комплекс биологически активного вещества.

22. Способ по п.21, отличающийся тем, что комплекс биологически активного вещества представляет собой осажденный белок.

23. Способ по п.22, отличающийся тем, что осажденный белок представляет собой преципитат Zn-лептина.

24. Способ по п.22, отличающийся тем, что он дополнительно включает стадию выделения композиции с поддерживаемым высвобождением.

25. Фармацевтическая композиция, содержащая композицию геля с поддерживаемым замедленным высвобождением по любому из пп.1-14 в фармацевтически приемлемом носителе, разбавителе или адьюванте.

26. Фармацевтический состав по п.25, отличающийся тем, что он находится в шприце.

