



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **114941** (13) **C2**
(51) МПК (2017.01)

A61K 31/737 (2006.01)

A61K 36/48 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

C12N 9/50 (2006.01)

A61K 31/198 (2006.01)

A61K 38/06 (2006.01)

A61P 29/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2015 07424**
(22) Дата подання заявки: **23.01.2014**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **28.08.2017**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **MI2013A000117**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **25.01.2013**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **IT**
(41) Публікація відомостей про заявку: **25.11.2015, Бюл.№ 22**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **28.08.2017, Бюл.№ 16**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/EP2014/051308, 23.01.2014**

(72) Винахідник(и):
**Міралья Нікколо (IT),
Россіні Мауро (IT),
Бьянкі Давіде (IT),
Трентін Антонелла (IT)**
(73) Власник(и):
**ГНОСІС С.П.А.,
Piazza del Carmine, 4, I-20121 Milano, Italy (IT)**
(74) Представник:
Крилова Надія Іванівна, реєстр. №30
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
US 2004/241256 A1, 02.12.2004
US 2009/110674 A1, 30.04.2009
RU 2381021 C2, 10.02.2010
WO 98/52583 A1, 26.11.1998
EP 1304338 A1, 23.04.2003
Kamiya Seitaro et all. In vivo Evaluation Method of the Effect of Nattokinase on Carrageenan-Induced Tail Thrombosis in a Rat Model / Seitaro Kamiya, Masayori Hagimori, Masayoshi Ogasawara, Masayuki Arakawa // Acta Haematologica (Basel), doi:10.1159/000321518. – 13.11.2010. – P.218-224

(54) КОМПОЗИЦІЇ, ЯКІ МІСТЯТЬ ХОНДРОЇТИНСУЛЬФАТ, ПРОТЕОЛІТИЧНІ ФЕРМЕНТИ ТА СУЛЬФІДРИЛЬНІ СПОЛУКИ ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ БІОДОСТУПНОСТІ ХОНДРОЇТИНСУЛЬФАТУ

(57) Реферат:

Винахід стосується композицій, які містять хондроїтинсульфат (CS), натокиназу та сульфгидрильну сполуку у співвідношенні 1,0/0,05-0,8/0,001-0,05 відповідно. Композиції призначені для лікування та профілактики остеоартриту та пов'язаних з ним гострих та хронічних запальних процесів, або для застосування як поживних композицій для підтримання здорового стану опорно-рухової системи людини та тварини.

UA 114941 C2

Винахід стосується композицій, що містять хондроїтинсульфат (CS), ферментів або ферментативних сумішей, що виявляють протеолітичною активністю окремо або в присутності сульфгідрильних сполук, та їх застосування у лікуванні та профілактиці остеоартриту та пов'язаних з ним гострих та хронічних запальних процесів, або як поживні композиції для підтримання здорового стану опорно-рухової системи людини та тварин.

Ці комбінації підвищують кишкове поглинання CS при пероральному введенні.

Їх дія розповсюджується на широкий діапазон молекулярних мас CS, включаючи зразки, які складаються з олігосахаридів, що відрізняються дуже низькими молекулярними масами (1-10 кДа), та, стосовно яких відомо, що їх біодоступність є більшою, ніж біодоступність зразків з більш високою молекулярною масою.

На основі великої кількості клінічних даних, Європейська Антиревматична Ліга (EULAR) рекомендує застосування CS як симптоматичний лікарський засіб повільної дії проти остеоартриту (SYSADOA) для лікування остеоартриту колін, стегон та рук. CS також застосовують, як поживний засіб, окремо або у поєднанні з іншими інгредієнтами поживний у композиціях, які виявляють протизапальну активність, як на місцевому, так і на системному рівнях.

Хондроїтинсульфат (CS) є полісахаридом, що належить до класу глікозаміногліканів (GAG), які є присутніми у хребетних та безхребетних тварин, та складаються з дисахаридних послідовностей, утворених залишком глюкуронової кислоти (GlcA), який перемешується залишком N-ацетил-D-галактозаміну (GalNAc) та разом ці залишки пов'язано бета- 1-3 зв'язками та сульфатовано у різних положеннях. В свою чергу ці дисахариди є зв'язаними разом бета- 1-4 зв'язками. Головним чином CS містить моносульфатовані дисахаридні одиниці у 4 або у 6 положенні GalNAc (які відповідно називають дисахаридом A та C). CS A та C присутні в різних відсоткових частках в залежності від походження полісахариду. Несульфатований дисахарид та дисульфатовані дисахариди, що несуть дві сульфатні групи, зв'язані з атомом оксигену у різних положеннях, також присутні у CS у меншій кількості, яка є змінною, залежить залежності від певних тваринних джерел (як-то у положенні 2 GlcA та у положенні 6 GalNAc (дисахарид D), у положенні 2 GlcA та у положенні 4 GalNAc або у положеннях 4 та 6 GalNAc (дисахарид E)) (Volpi N.J. Pharm. Pharmacol. 61, 1271, 2009. Volpi N.J. Pharm. Sci. 96, 3168, 2007. Volpi N. Curr. Pharm. Des. 12, 639, 2006).

Хондроїтинсульфати різного тваринного походження також відрізняються різною молекулярною вагою.

CS наземних тварин мають, наприклад, схожі між собою значення молекулярної маси, але вони відрізняються від CS різних видів риб, які мають більш високу молекулярну масу. Середня молекулярна маса CS наземних тварин знаходиться у межах 14-26 кДа, тоді як CS морських тварин, отримані з кальмару, хрящових та костистих риб, мають середню молекулярну масу, яка перевищує 50 кДа.

Окрім CS тваринного походження, деякі продукти CS описують, як такі, що мають полісахаридну основу бактеріального походження, яку потім синтетично змінюють з метою отримати полімерні аналоги природних CS. Ці біотехнологічні CS, які мають бактеріально-синтетичне походження долають певні недоліки, пов'язані з тваринним походженням виділених CS, як-то можливу наявність вірусів та / або пріонів або інших потенційно алергічних макромолекул у складі залишкових домішок, високий вміст тваринних білків у кінцевому продукті, несумісність тваринних продуктів релігійними та харчовими обмеженнями та обмежені джерела, доступні для задоволення зростаючого світового попиту.

Приклади CS бактеріально-синтетичного походження описано, наприклад, в EP 1304338, в якій капсульний полісахарид штаму O5:K4:H4 E. coli після виділення та гідролізу оригінального полімеру піддають хімічному сульфатуванню. Інші приклади бактеріально-синтетичних CS описані у WO 2012/152872, WO 2012/159655 та WO 2013/174847, в яких бактеріальний капсульний полісахарид також піддають хімічному сульфатуванню для отримання CS, подібного тому, який має тваринне походження.

Нарешті, у деяких прикладах низькомолекулярні CS було отримано шляхом деполімеризації полісахаридів, отриманих шляхом екстракції, (Cho SY et al. Biol. Pharm. Bull. 27, 47, 2004, Das A. et al. Osteoart. Cartil. 8, 343, 2000) та полісахаридів бактеріального походження (WO 2013/174847, WO 2012/152872). Малі молекулярні розміри CS цих типів сприяють кращому пероральному застосуванню з одночасним збереженням більшості відомих активних властивостей природних CS.

При пероральному введенні CS всмоктується кишковою слизовою оболонкою у тонкому кишечнику та дистальному тракті. Частково ця сполука всмоктується у вигляді високомолекулярного полісахариду у тонкому кишечнику та її більша частина поглинається у

вигляді олігосахаридів у сліпій та товстій кишках. (Lauder R.; Compl. Ther. Med.17, 56-62, 2009). Ці олігосахариди утворюються внаслідок часткової деполімеризації первісного полісахариду гідролітичними ферментами, які є продуктами кишкової флори у нижньому відділі системи травлення.

Хоча механізм, залучений до кишкового поглинання полісахаридів, які є складовими частинами CS до кінця є не зовсім зрозумілим, однак для більшості макромолекул вважається, що поглинання через параклітинний простір кишкового епітелію є кількісно значним та олігосахаридні фрагменти CS також поглинаються таким шляхом. На цьому рівні присутні щільні контакти, які утворюють бар'єр, що обмежує поглинання великих молекул, до перенесення яких не залучено посередництво певних молекулярних носіїв через слизову оболонку кишечника.

Поглинання високомолекулярного CS оцінюють у кількості приблизно 1-5 %. Як було попередньо зазначено, більшість поглинутих хондроїтинсульфатів складається з олігосахаридів, які виникають внаслідок ферментативного розщеплення цих сполук хондроїтиназою, яку виробляє кишкова мікробна флора. Однак, приймаючи до уваги поглинання олігосахаридів слід зазначити, що загальне поглинання CS кишковою слизовою оболонкою становить не більш, ніж 20-23 % поглиненого полісахариду (Lauder R.; Compl. Ther. Med. 17, 56-62, 2009-Barthe L. et al. Arzneimittelforsch./Drug Res. 2004; 54: 286-92).

В цілому поглинання CS після перорального введення залишається проблемою та будь-який спосіб, здатний підвищити кишкове поглинання цього глікозаміноглікану є дуже актуальним.

Бромелайн є цистеїновою протеазною сумішшю, яку отримують з плодів та стебел ананасу (*Ananas comosus*), рослини родини Bromeliaceae. Головним джерелом бромелайну є стебло цієї рослини, в якому концентрація цієї сполуки є найвищою. Взагалі можна розрізнити чотири окремі фракції цієї суміші або, згідно за більш елегантною аналітичною характеристикою, проведеної з допомогою мас-спектрометрії, у цій суміші можна розрізнити вісім протеолітичних компонентів, кожен з яких має порівнянну протеолітичну активність. Цю суміш у природній формі звичайно й застосовують з цією метою. Бромелайн класифікують, як ендopeптидазу, що належить до підродина пептидаз C1A (номенклатура MEROPS). На додачу до суміші протеаз цей екстракт також містить пероксидазу, кислу фосфотазу та глікозидазу. Молекулярна маса інгредієнтів коливається у межах 8 – 28,5 кДа. Концентрацію бромелайну частіше виражають не у одиницях ваги, а у протеолітичних одиницях (у одиницях GDU або у міжнародних одиницях, IU).

З точки зору власних протеолітичних характеристик, бромелайн має активність, подібну до активності панкреатичної протеази, отже він сприяє травленню. Його застосовують для лікування диспепсії у поєднанні з панкреатичними екстрактами. Також він розщеплює довголанцюгові жири. Крім того, бромелайн також має інші фармакологічні активні властивості, найбільш важливою з яких є потужна протизапальна активність, яка робить його ефективним для застосування у лікуванні запальних станів м'яких тканин, пов'язаних з травмами або післяопераційних реакцій та місцевих запалень. Показано, що активність бромелайну полягає у підвищенні біосинтезу протизапальних простагландинів (як-то простагландину E2) та навпаки, у пригніченні біосинтезу прозапальних простагландинів.

Іншими типами фармакологічних активних властивостей бромелайну є його антитромботична та про-фібринолітична дія, гіпотензивна активність та здатність викликати регресію атеросклеротичних бляшок. Також описані його синергетичні властивості при застосуванні у протипухлинному та антибіотичному лікуванні.

Бромелайн відрізняється доброю пероральною біодоступністю, яку оцінюють, як приблизно 40 %, що є рідкою ознакою для білків. Більш того, більшість непоглиненого бромелайну залишається неушкодженою та здатна проявляти свою ферментативну активність у просвіті кишечника, оскільки вона не сильно піддається впливу шлункового соку або присутніх в слині цистатинів. З точки зору своїх характеристиками бромелайн нагадує папаїн та фікаїн, схожі екстракти, отримані, відповідно, з папаї (*Carica papaya*) та інжиру *Ficus carica*).

Натокіназа є ферментом, який перший раз отримано з natto, традиційної японської їжі на основі варених соєвих бобів, ферментованих певним різновидом *Bacillus subtilis*, *B. subtilis natto*.

Натокіназа є сериною протеазою розміром приблизно 32 кДа, яка має потужну фібринолітичну активність. Її гомологія з субтилізином перевищує 72 %. Фібринолітичні активні властивості натокінази полягають у безпосередній фібринолітичній дії разом зі здатністю викликати підвищення продуктування урокінази та плазміну. Натокіназа відрізняється відносно високою стійкістю до температури та низьких значень pH; ці характерні особливості надають цьому білку добру стійкість до впливу шлункового середовища, дозволяючи його застосовувати

шляхом перорального введення.

Відносна стійкість натокинази до шлункового середовища та її протеолітичні активні властивості роблять її ферментом, який у зображеному тут застосуванні може бути аналогічним до бромелайну.

5 US 5679344 присвячено поживним композиціям, які містять глюкозамін та протеолітичні ферменти, що мають протизапальні властивості та які призначені для застосування у лікуванні розладів суглобів. Ці композиції містять принаймні одну протеазу та принаймні одну кислотостійку протеазу.

10 US 5888514 присвячено композиціям, які містять хрящ, протеолітичні ферменти, глюкозамінсульфат та хондроїтинсульфат разом з вітамінами та рослинними екстрактами та призначені для лікування запалення кісток та суглобів.

Було показано, що поєднання CS з бромелайном та одночасна наявність підсилювача активності бромелайну, як-то цистеїну, метіоніну, глутатіону або інших сульфгідрильних сполук підвищує його поглинання у тонкому кишечнику.

15 Також було показано, що натокиназа має навіть ще більш неочікувану дію на біодоступність CS, яка зростає більш, ніж на 250 %.

Метою заявленого винаходу є композиція, що містить хондроїтинсульфат та одну або кілька протеаз та вибірково, за умови, коли протеаза є іншою, ніж натокиназа, містить сульфгідрильну сполуку.

20 Вираз "сульфгідрильна сполука" тут має відношення до природної або синтетичної амінокислоти або малого пептиду або до іншої сполуки, яка містить принаймні одну сульфгідрильну групу. Ця сульфгідрильна сполука є переважно вибраною з метіоніну, цистеїну, гомоцистеїну, S-аденозилметіоніну, ацетилцистеїну, відновленого або окисленого глутатіону та S-ацетил-глутатіону.

25 У композиціях за винаходом, співвідношення хондроїтинсульфату / протеази / сульфгідрильної сполуки дорівнює 1,0/0,05-0,8/0,001-0,05.

Хондроїтинсульфат переважно має молекулярну масу, що знаходиться у межах 1-95 кДа, більш переважно 4-50 кДа.

30 Хондроїтинсульфат переважно є екстрактом тваринного походження. CS можна отримати шляхом хімічної сульфатації капсульного полісахариду K4 з E. coli після усунення фруктозних залишків шляхом гідролізу, як описано у EP 1304338, WO 2012/152872, WO 2012/159655, або шляхом хімічної сульфатації та наступної кислотної або радикальної деполімеризації капсульного полісахариду K4 з E. coli після усунення фруктозних залишків шляхом гідролізу, як описано у WO 2013/174847 та WO 2012/152872. Альтернативним чином, CS також можна отримати шляхом хімічної сульфатації капсульного полісахариду з генетично модифікованого штаму E. coli (наприклад, DSM23644), під час якої цей полісахарид спочатку позбавляють фруктозних залишків (WO 2012/159655). Молекулярні розміри отриманого таким чином CS також можуть бути потім зменшені шляхом кислотної або радикальної деполімеризації, як зазначено у WO 2013/174847.

40 Протеаза переважно є вибраною з бромелайну, папаїну, фікаїну та натокинази, та переважно такою протеазою є натокиназа. У переважному втіленні винаходу передбачені композиції, які містять хондроїтинсульфат та натокиназу у відсутність сульфгідрильної сполуки. Винаходом також передбачено застосування натокинази для покращення кишкової проникності хондроїтинсульфату.

45 Композиції за винаходом також можуть містити один або більше активних інгредієнтів, яких застосовують для запобігання або лікування гострих та хронічних запальних станів та/або один або більше поживних сполук, які застосовують для підтримання доброго стану опорно-рухової системи людини та тварин.

50 Активні інгредієнти можуть бути вибрані, наприклад, з групи, яка охоплює гідрохлорид глюкозаміну, сульфат глюкозаміну, N-ацетилглюкозамін, гіалуронову кислоту, амінокислоти, колаген, гідролізований колаген, поліненасичені жирні кислоти, кератин, метилсульфонілметан, фолат, відновлений фолат, вітаміни, вітаміни групи B, C-аденозилметіонін (CAM), аскорбінову кислоту та аскорбат марганцю.

55 Ці композиції також можуть містити одну або більше фармацевтично або поживно прийнятних домішок.

Всі з цих інгредієнтів звичайно поєднують з хондроїтинсульфатом, наприклад, до цих композицій також може бути додано глюкозамін та метилсульфонілметан (MCM).

60 Фармацевтично або поживно прийнятні домішки охоплюють, наприклад, мікрокристалічну целюлозу, стеаринову кислоту, стеарат магнію, колоїдний діоксид кремнію, етилцелюлозу, метилцелюлозу, гідроксипропілметилцелюлозу, водні солі шелаку, альгінат натрію, крохмаль,

модифіковані крохмалі, сополімери метакрилової кислоти, мальтодекстрини та поліолі.

Композиції за винаходом переважно вводять перорально, наприклад, у вигляді капсул, м'яких желатинових капсул, таблеток, гранул, напоїв у рідкій формі або порошкоподібних напоїв, які мають бути відновлені. Добова доза CS може варіюватися між 400 мг та 3600 мг при поживному застосуванні та звичайна добова доза при застосуванні в якості ліків дорівнює 1200 мг.

Опис фігури.

На фігурі зображено проникність бичачого хондроїтинсульфату розміром 20 кДа (ромби), низькомолекулярного (LMW) хондроїтинсульфату розміром 9 кДа (квадрати) та високомолекулярного (HMW) хондроїтинсульфату розміром 40 кДа (трикутники) крізь кишкову слизову оболонку щурів.

Експериментальна частина.

Проникність CS перевіряли з допомогою моделі *in vitro*, в якій кишкову слизову оболонку щурів вилучали з тварин одразу після евтаназії та розташовували у камері Уссинга, зануреній у прийнятному буфері на межі двох відділень, з поверхнею слизової оболонки, спочатку підданої дії просвіту кишечника, що стикається з одним, так званим донорним відділенням, та з її базальною частиною, що стикається з іншим, акцепторним відділенням.

CS розмістили у донорному відділенні у присутності або у відсутності інших інгредієнтів комбінації та наявність полісахаридів визначали у акцепторному відділенні після періоду інкубації, протягом якого відбувалося проникнення CS у акцепторне відділення через мембрану, яка складалася з кишкової слизової оболонки щурів.

Далі буде більш детально описано застосований експериментальний спосіб оцінки кишкової проникності CS з різними комбінаціями цієї сполуки. Щурів Льюїса вагою 150-170 г. піддали евтаназії шляхом інгаляції CO₂, після чого тонкий кишечник тварин негайно вилучили, промили та розташували у камері Уссинга, заповненій середовищем, яке містило 125 мМ хлорид натрію (NaCl), 1,3 мМ сульфат магнію (MgSO₄), 5 мМ хлорид калію (KCl), 20 мМ глюкозу та 25 мМ карбонат натрію (NaHCO₃). рН розчину довели до 7,4 з допомогою HEPES. Дослідження проникнення проводили при температурі 37 °C у атмосфері 95 % O₂ та 5 % CO₂. Перевірку проникнення здійснювали не більш, ніж через 15 хв. після вилучення кишкової слизової оболонки.

Застосовані у цих дослідженнях зразки CS відрізнялися за природою та молекулярними розмірами. Зразки бичачого та біотехнологічного (бактеріально-синтетичного) хондроїтинсульфату піддали перевірці на кишкове проникнення у різних комбінаціях. Також застосовані зразки CS відрізнялися різною молекулярною масою, яка коливалася у межах 1-95 кДа або переважним знаходилася у межах 4-50 кДа.

Хондроїтинсульфат додавали до донорного відділення з 3 % концентрацією (маси / об'єму). Для дослідження проникнення у присутності бромелайну, до розчину CS додали бромелайн з 1,5 % концентрацією. Альтернативним чином, разом з бромелайном додавали також сульфгідрильну сполуку з 0,075 % концентрацією, вибрану з метіоніну, цистеїну, гомоцистеїну, S-аденозилметіоніну, ацетилцистеїну S-ацетил-глутатіону та від відновленого або окисленого глутатіону. Для дослідження проникнення у присутності натокинази цей фермент додали до розчину, як і бромелайн, з 1,5 % концентрацією.

Загальний період інкубування сягав три години, та кожні 30 хв. протягом цього часу зразки (100 мкл) розташовували у акцепторному відділенні, та вилучений об'єм замінювали свіжим середовищем. Після розщеплення полісахариду хондроїтиназою ABC (специфічна активність 0,5 од./мл) вибрані зразки піддали ВЕРХ-аналізу на присутність дисахаридних складових з застосуванням описаного вище способу.

Застосований спосіб ВЕРХ-аналізу полягав у застосуванні потужної аніонообмінної колонки (SAX), елюенту на основі підкисленої води з рН 4 та лінійного градієнту з 1,2 М NaCl з 0 % до 100 % за 25 хв., після першого ізократичного елюювання протягом 5 хв. виключно у підкисленій воді. Застосована швидкість потоку дорівнювала 1,0 мл/хв та рівень дисахаридів визначали з допомогою УФ-детектора з довжиною хвилі 232 нм.

Кількість CS у акцепторном відділенні обчислювали з відкаліброваною по 8 точкам кривою стандартного хондроїтинсульфату, яка відповідала 0,78 % - 100 % від початкової концентрації CS (C). Стандартні зразки хондроїтинсульфату попередньо інкубували з хондроїтиназою ABC, розчиненої у такому ж саме середовищі, яке застосовували для експериментів. На основі знайденого у акцепторному відділенні хондроїтинсульфату, коефіцієнт удаваної проникності (P_{app}) обчислювали з допомогою формули $P_{app} \text{ (cm/sec)} = Q/A \cdot C \cdot t$, в якій Q є загальною кількістю прониклого CS (мкг), A є площиною дифузії камери Уссинга (см²), C є початковою концентрацією CS у донорному відділенні (мкг/см³) та t є часом інкубування (30-180 хв.).

Коефіцієнт приросту R обчислювали, виходячи зі значення P_{app} , як $(P_{app} \text{ CS} + \text{протеаза}) / (P_{app} \text{ CS без протеази})$. P_{app} обчислювали після отримання кожного зразка, а саме на 30, 60, 90, 120, 150 та 180 хв. досліджень. Потім для отримання коефіцієнту середньої проникності кожного зразка у експерименті було обчислено середню величину різних значень P_{app} , отриманих у ці

5 точки часу. Дані щодо проникнення CS наведено у вигляді окремо вимірених середніх значень піків концентрації дисахаридів $\Delta di-0S$, $\Delta di-6S$ та $\Delta di-4S$.

Статистичну величину цих даних піддали аналізу з допомогою параметричного t -критерію Стьюдента, з $p < 0,05$ в якості мінімального значення.

Чинність цієї експериментальної моделі також підтверджується тим фактом, що три зразки 10 CS різної молекулярної маси, як-то 9, 20 та 40 кДа демонструють наявність проникності до кишкової мембрани, яка є функцією молекулярної маси, як це відбувається в природних умовах. Про це свідчить графік, на якому зображено сукупне перенесення CS у всі інтервали часу, розглянуті протягом 180-хвилинного періоду експерименту (див. Фіг.).

15 Далі для перевірки проникності були застосовані зразки CS нетваринного походження з низькою (9 кДа) або високою (40 кДа) молекулярною масою, та таку перевірку здійснювали у присутності або у відсутності протеаз та, у випадку бромелайну, з або без додавання підсилюючої сполуки.

Дані досліджень проникнення зразків CS протягом часу було отримано у відсутність інших ад'ювантів або у присутності бромелайну, бромелайну та метіоніну або натокінази.

20 Хоча відомо про здатність бромелайну сприяти параклітинному проникненню багатьох макромолекул, вона є також пов'язаною зі здатністю цієї речовини до послаблення щільних контактів (Grabovac et al., Int. J. Pharm. 326, 153-159, 2006). Застосування у цих дослідженнях самого тільки бромелайну без втручання інших факторів не призвело до підвищення поглинання низькомолекулярного CS, що може бути видно з наведеного у Таблиці 1 порівняння 25 отриманих середніх значень P_{app} . Однак для комбінації низькомолекулярного CS, бромелайну та метіоніну було виявлено помітне підвищення такого поглинання. Неочікуване підвищення проникності кишкової слизової оболонки також спостерігали у випадку застосування комбінації низькомолекулярного CS та натокінази (Таблиця 1).

30 Співвідношення приростів R мали значення, які перевищували 1 для комбінації CS/бромелайну/метіоніну та значно перевищували 1 для комбінації CS/натокінази, тоді як у випадку комбінації CS/бромелайну показник R був меншим, ніж 1 (Таблиця 2). Отже, метіонін демонструє неочікувано сприятливу дію на підсилення бромелайном кишкової проникності CS, та було виявлено (що було ще більш неочікувано), що натокіназа без втручання інших факторів є здатною до збільшення кишкової проникності низькомолекулярного CS приблизно в два рази. 35 Цікаво відзначити, що з допомогою описаних тут комбінацій може бути додатково підвищена біодоступність низькомолекулярного CS, який завжди є більш біодоступним, ніж відповідний великий полісахарид.

Таблиця 1

	$P_{app} \text{ (cm сек}^{-1}\text{)} \times 10^{-7}$
Низькомолекулярний хондроїтинсульфат	2,13±0,61
Низькомолекулярний хондроїтинсульфат + бромелайн + метіонін	2,65±1,36
Низькомолекулярний хондроїтинсульфат + бромелайн	1,41±0,76
Низькомолекулярний хондроїтинсульфат + натокіназа	3,56±0,04

40 Середні значення P_{app} , визначені для проникнення низькомолекулярного (LMW) хондроїтинсульфату, застосованого без домішок або у поєднанні з бромелайном; бромелайном та метіоніном або з натокіназою.

Таблиця 2

	Співвідношення приросту (R)
Низькомолекулярний хондроїтинсульфат + бромелайн + метіонін/низькомолекулярний хондроїтинсульфат	1,25±0,18
Низькомолекулярний хондроїтинсульфат + бромелайн/низькомолекулярний хондроїтинсульфат	0,66±0,35
Низькомолекулярний хондроїтинсульфат + натокіназа/низькомолекулярний хондроїтинсульфат	1,67±0,20

Співвідношення приростів комбінацій порівняно до окремо застосованого низькомолекулярного (LMW) хондроїтинсульфату.

Прийнятний для порівняння ефект спостерігали відносно поглинання високомолекулярного хондроїтинсульфату (40 кДа), а також хондроїтинсульфату нетваринного походження (Таблиці 3 та 4). У цьому разі підсилююча дія застосованої комбінації була ще більш очевидною та перевищувала поглинання окремо застосованого CS майже в три рази, що вказує на наявність такої підсилюючої дії у випадку застосування полісахаридів з великими розмірами, для яких поглинання є більш критичним.

Таблиця 3

	P_{app} (см сек ⁻¹) x 10 ⁻⁷
Високомолекулярний хондроїтинсульфат	0,53±0,25
Високомолекулярний хондроїтинсульфат + бромелайн + метіонін	1,27±0,80
Високомолекулярний хондроїтинсульфат + натокиназа	1,57±1,10

Середні значення P_{app} , визначені для проникнення високомолекулярного (HMW) хондроїтинсульфату, застосованого без домішок або у поєднанні з бромелайном; бромелайном та метіоніном або з натокиназой.

Таблиця 4

	Співвідношення приросту (R)
Високомолекулярний хондроїтинсульфат + бромелайн + метіонін / високомолекулярний хондроїтинсульфат	2,42±0,36
Високомолекулярний хондроїтинсульфат + натокиназа/ високомолекулярний хондроїтинсульфат	2,86±1,64

Співвідношення приростів комбінацій порівняно до окремо застосованого високомолекулярного (HMW) хондроїтинсульфату.

Дослідження проникності зразка CS тваринного походження (молекулярна маса - 15-20 кДа) у відсутності або у присутності "коктейлю" бромелайну та метіоніну підтверджують здатність комбінації підвищувати проникність CS, отриманого з будь-якого джерела (Таблиця 5).

Таблиця 5

	P_{app} (см сек ⁻¹) x 10 ⁻⁷
Еталонний хондроїтинсульфат	1,34±1,24
Еталонний хондроїтинсульфат + бромелайн + метіонін	1,45±0,45

Середні значення P_{app} визначено для проникнення бичачого хондроїтинсульфату, застосованого без домішок або у поєднанні з бромелайном + метіонін.

Нижче наведені приклади композицій за винаходом.

Приклад 1,

Композицію отримали шляхом змішування:

1200 мг бичачого хондроїтинсульфату,

600 мг бромелайну,

30 мг L-метіоніну.

Приклад 2.

Композицію отримали шляхом змішування:

1200 мг бичачого хондроїтинсульфату,

600 мг натокинази.

Приклад 3.

Композицію отримали шляхом змішування:

1200 мг біотехнологічного хондроїтинсульфату з молекулярною масою 9 кДа,

600 мг бромелайну,

30 мг L-метіоніну.

Приклад 4.

Композицію отримали шляхом змішування:

1200 мг біотехнологічного хондроїтинсульфату з молекулярною масою 9 кДа,
600 мг натокинази.

Приклад 5.

5 Композицію отримали шляхом змішування:

1200 мг біотехнологічного хондроїтинсульфату з молекулярною масою 40 кДа,
600 мг бромелайну,
30 мг L-метіоніну.

Приклад 6.

10 Композицію отримали шляхом змішування:

1200 мг біотехнологічного хондроїтинсульфату з молекулярною масою 40 кДа,
600 мг натокинази.

Приклад 7.

Композицію отримали шляхом змішування:

15 1200 мг біотехнологічного хондроїтинсульфату з молекулярною масою 9 кДа,
600 мг натокинази,
30 мг L-метіоніну.

Приклад 8.

Композицію отримали шляхом змішування:

20 1200 мг біотехнологічного хондроїтинсульфату з молекулярною масою 40 кДа,
600 мг натокинази,
30 мг L-метіоніну.

Приклад 9.

Композицію отримали шляхом змішування:

25 1200 мг бичачого хондроїтинсульфату,
600 мг натокинази,
30 мг L-метіоніну.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

30

1. Композиція, що містить хондроїтинсульфат, натокиназу та, як варіант, сульфгідролізовану сполуку, причому співвідношення хондроїтинсульфату/протеази/сульфгідролізованої сполуки дорівнює 1,0/0,05-0,8/0,001-0,05 за вагою.

2. Композиція за п. 1 за відсутності сульфгідролізованої сполуки.

35 3. Композиція за п. 1 за присутності сульфгідролізованої сполуки.

4. Композиція за будь-яким з пп. 1-3, в якій хондроїтинсульфат має молекулярну масу 1-95 кДа.

5. Композиція за будь-яким з пп. 1-4, в якій хондроїтинсульфат отримують екстракцією з тваринного джерела.

40 6. Композиція за будь-яким з пп. 1 та 4, в якій хондроїтинсульфат отримують хімічним сульфатуванням капсульного полісахариду K4 E. coli усунення гідролізом залишків фруктози.

7. Композиція за будь-яким з пп. 1 та 4, в якій хондроїтинсульфат отримують хімічним сульфатуванням та наступною кислотною або радикальною деполімеризацією капсульного полісахариду K4 E. coli після гідролітичного усунення залишків фруктози.

45 8. Композиція за будь-яким з пп. 1 та 4, в якій хондроїтинсульфат отримують хімічним сульфатуванням капсульного полісахариду генетично модифікованого штаму E. coli, в якому цей полісахарид у початковому стані є вільним від залишків фруктози.

9. Композиція за будь-яким з пп. 1 та 4, в якій хондроїтинсульфат отримують хімічним сульфатуванням та наступною кислотною або радикальною деполімеризацією капсульного полісахариду генетично модифікованого штаму E. coli, в якому цей полісахарид у початковому стані є вільним від залишків фруктози.

50 10. Композиція за будь-яким з пп. 1-9, в якій сульфгідролізовану сполуку вибрано з метіоніну, цистеїну, гомоцистеїну, S-аденозилметіоніну, ацетилцистеїну, відновленого або окисненого глутатіону та S-ацетилглутатіону.

55 11. Композиція за будь-яким з пп. 1-10, яка додатково містить один або більше активних елементів, які застосовують у запобіганні або лікуванні гострого або хронічного запалення та/або одну або більше поживних речовин, яку застосовують для підтримання доброго стану опорно-рухової системи людини та тварин.

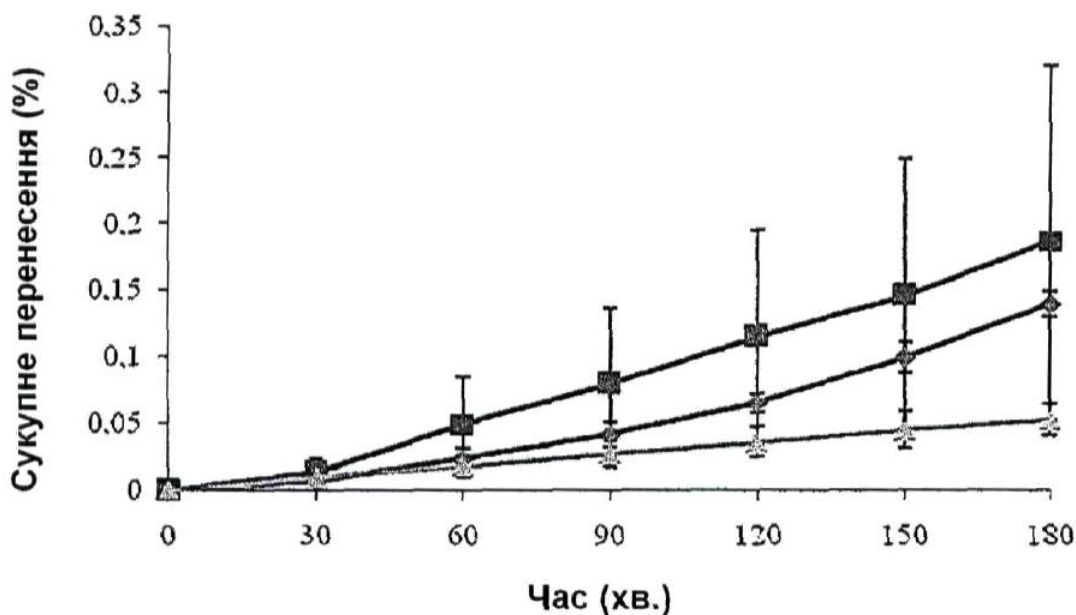
60 12. Композиція за п. 11, в якій один або більше активних елементів вибрано з групи, яка складається з гідрохлориду глюкозаміну, сульфату глюкозаміну, N-ацетилглюкозаміну, гіалуронової кислоти, амінокислот, колагену, гідролізованого колагену, поліненасичених жирних

кислот, кератину, метилсульфонілметану, фолату, відновленого фолату, вітамінів, вітамінів групи В, S-аденозилметіоніну (SAM), аскорбінової кислоти та аскорбату марганцю.

13. Композиція за будь-яким з пп. 1-12, яка додатково містить одну або більше фармацевтично та поживно прийнятних домішок, вибраних з групи, яка охоплює мікрокристалічну целюлозу, стеаринову кислоту, стеарат магнію, колоїдний діоксид кремнію, етилцелюлозу, метилцелюлозу, гідроксипропілметилцелюлозу, водні солі шелаку, альгінат натрію, крохмаль, модифіковані крохмалі, співполімери метакрилової кислоти, мальтодекстрини та поліюлі.

14. Композиція за будь-яким з пп. 1-13 для застосування у профілактиці або лікуванні гострих та хронічних запалень.

15. Композиція за будь-яким з попередніх пунктів у вигляді твердих препаратів для перорального застосування, у вигляді капсул, м'яких желейних капсул, таблеток, гранул, рідких напоїв або відновлених порошкових напоїв.



Фігура

Комп'ютерна верстка М. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601