



УКРАЇНА

(19) UA (11) 44761 (13) C2

(51) 6 A61K9/16, A61K38/19

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД(54) ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ ІЗ КОНТРОЛЬОВАНИМ ВИДІЛЕННЯМ РОЗЧИННОГО TNF- α РЕЦЕПТОРА ТА СПОСОБИ ЛІКУВАННЯ

1

2

(21) 97094438

(22) 01 03 1996

(24) 15 03 2002

(86) PCT/US96/03121, 01 03 1996

(31) 112834

(32) 01 03 1995

(33) IL

(46) 15 03 2002, Бюл. № 3, 2002 р

(72) Уолек Девід, IL, Кост Йозеф, IL, Еліаз Ром, IL

(73) ЙЕДА РІСБОРЧ ЕНД ДЕВЕЛОПМЕНТ КО
ЛТД, IL, БЕН-ГУРІОН УНІВЕРСИТЕТ ОФ ДЗЕ НЕ-
ДЖЕВ, IL

(56) US 4,883,666, 28 11 1989,

US 4,929,442, 29 05 1990,

R Eloaz et al, "Long- Term Protection Against the
Effects of Tumour Necrosis by Controlled Delivery of
the Soluble p55 TNE Receptor", Cytokine, Jun 1996,
vol 8, No 6, pp 482-487(57) 1 Фармацевтична композиція із контрольова-
ним виділенням розчинного TNF- α рецептора,
який має здатність зв'язуватись з TNF- α і впли-
вати на функцію вказаного TNF- α , яка
відрізняється тим, що вона містить біосумісний
полімерний матеріал з розчинним рецептором
TNF- α , який введено в нього2 Фармацевтична композиція за п 1, яка **відріз-
няється** тим, що вказаний полімерний матеріал
являє собою біосумісний полімер, вибраний з гру-
пи, що складається з етилен-вінілацетатних спів-
полімерів (EVAc), силіконових каучуків, полісахар-
идів, поліамідів, поліакрилатів, поліетиленів,
поліуретанів, поліізобутилену та поліфосфазенів3 Фармацевтична композиція за п 1, яка **відріз-
няється** тим, що вказаний полімерний матеріал
являє собою біосумісний полімер, вибраний з гру-
пи, що складається з поліефірів, поліангідридів,
поліортоєфірів, полікапролактону, псевдополіамі-
нокислот, поліпептидів, желатину, полі молочної
кислоти, полігліколевої кислоти та співполімерів
полі(молочно-гліколевої) кислоти, (PLGA)4 Фармацевтична композиція за п 2, яка **відріз-
няється** тим, що полімер являє собою поліетилен-
вінілацетат5 Фармацевтична композиція за п 3, яка **відріз-****няється** тим, що полімер являє собою по-
лі(молочно-гліколеву) кислоту6 Фармацевтична композиція за п 1, яка **відріз-
няється** тим, що розчинний TNF- α рецептор
являє собою розчинний p55 TNF- α рецептор
(p55 sTNF-R)7 Фармацевтична композиція за п 1, яка **відріз-
няється** тим, що розчинний TNF- α рецептор
являє собою розчинний p75 TNF- α рецептор
(p75 sTNF-R)8 Фармацевтична композиція за п 1, яка **відріз-
няється** тим, що вона призначена для лікування
розладів, при яких необхідна нейтралізація шкід-
ливих ефектів TNF- α , при цьому вказаний реце-
птор є введеним у вказаний полімерний матеріал
таким чином, щоб забезпечити контрольоване ви-
ділення такої кількості розчинного TNF- α реце-
птора, яка є ефективною для нейтралізації шкідли-
вих ефектів TNF- α .9 Фармацевтична композиція за п 8, яка
відрізняється тим, що вона призначена для
лікування септичного шоку10 Фармацевтична композиція за п 8, яка
відрізняється тим, що вона призначена для
лікування кахексії, асоційованої з раком11 Фармацевтична композиція за п 8, яка
відрізняється тим, що вона призначена для
лікування аутоімунних хвороб12 Фармацевтична композиція за п 8, яка
відрізняється тим, що вона призначена для
лікування ревматоїдного артриту13 Фармацевтична композиція за п 12, яка
відрізняється тим, що вона додатково містить
протизапальний агент14 Фармацевтична композиція за п 11, яка
відрізняється тим, що вона призначена для
лікування розсіяного склерозу15 Фармацевтична композиція за п 14, яка **відрі-
зняється** тим, що вона додатково містить агент
для лікування розсіяного склерозу, вибраний з
групи, що складається з бета-інтерферону та спів-
полімеру 116 Фармацевтична композиція за п 11, яка
відрізняється тим, що вона призначена для
лікування системного червоного вовчака

(13) C2

(11) 44761

(19) UA

- 17 Фармацевтична композиція за п 8, яка **відрізняється** тим, що вона призначена для лікування реакції "трансплантат проти хазяїна"
- 18 Фармацевтична композиція за п 8, яка **відрізняється** тим, що вона призначена для лікування розладів, пов'язаних з алергічною реакцією шкіри уповільненого типу
- 19 Фармацевтична композиція за п 4, яка **відрізняється** тим, що вона виконана у формі імплантату
- 20 Фармацевтична композиція за п 5, яка **відрізняється** тим, що вона виконана у формі імплантату
- 21 Фармацевтична композиція за п 5, яка **відрізняється** тим, що вона призначена для введення у формі ін'єкції
- 22 Фармацевтична композиція за будь-яким з пп 19-21, яка **відрізняється** тим, що вона призначена для локальної ін'єкції у синовіальну рідину для лікування запалення суглобів при ревматоїдному артриті
- 23 Фармацевтична композиція за будь-яким з пп 19-21, яка **відрізняється** тим, що вона призначена для ін'єкції у цереброспінальну рідину для лікування розсіяного склерозу
- 24 Фармацевтична композиція за п 18, яка **відрізняється** тим, що вона призначена для місцевого застосування
- 25 Фармацевтична композиція за п 1, яка **відрізняється** тим, що вона додатково містить TNF- α
- 26 Фармацевтична композиція за п 1, яка **відрізняється** тим, що вона призначена для збільшення тривалості корисних ефектів TNF- α , причому, вказаний рецептор є введеним у вказаний полімерний матеріал таким чином, щоб викликати контрольоване виділення кількості розчинного TNF- α рецептора, яка є ефективною для підсилення корисних ефектів TNF- α
- 27 Фармацевтична композиція за п 26, яка **відрізняється** тим, що вона призначена для лікування пухлин
- 28 Фармацевтична композиція за п 26, яка **відрізняється** тим, що вона призначена для лікування вірусних, бактеріальних та інфекцій, викликаних багатоклітинними паразитами
- 29 Фармацевтична композиція за п 26, яка **відрізняється** тим, що вона призначена для застосування у загоюванні ран
- 30 Спосіб лікування захворювань, у якому потріб-

- но нейтралізувати шкідливі ефекти TNF- α , який включає введення фармацевтичної композиції із контрольованим виділенням активної речовини, що нейтралізує вказані ефекти, який **відрізняється** тим, що вводять фармацевтичну композицію за п 1, призначену для виділення ефективної кількості вказаної розчинної форми TNF- α рецептора таким чином, щоб протягом періоду часу виділялась його ефективна кількість
- 31 Спосіб за п 30, який **відрізняється** тим, що вказані захворювання вибирають з групи, яка складається з септичного шоку, кахексії, асоційованої з раком, аутоімунного захворювання, реакції "трансплантат проти хазяїна" та алергічної реакції шкіри уповільненого типу
- 32 Спосіб за п 30, який **відрізняється** тим, що вказане введення включає імплантацію вказаної фармацевтичної композиції із контрольованим виділенням активної речовини
- 33 Спосіб за п 30, який **відрізняється** тим, що він призначений для лікування вірусних, бактеріальних та інфекцій, викликаних багатоклітинними паразитами
- 34 Спосіб лікування пухлин, який включає введення фармацевтичної композиції із контрольованим виділенням активної речовини, який **відрізняється** тим, що вводять фармацевтичну композицію для стабілізації корисних ефектів TNF- α , яка містить біосумісну полімерну матрицю з введеним в неї комплексом розчинного TNF- α рецептора та TNF- α таким чином, щоб протягом періоду часу виділялась його ефективна кількість
- 35 Спосіб лікування захворювань, який потребує корисних ефектів TNF- α , що включає введення фармацевтичної композиції із контрольованим виділенням активної речовини, який **відрізняється** тим, що вводять фармацевтичну композицію для стабілізації корисних ефектів TNF- α , яка містить біосумісну полімерну матрицю з введеним в неї комплексом розчинного TNF- α рецептора та TNF- α таким чином, щоб протягом періоду часу виділялась його ефективна кількість
- 36 Спосіб за п 35, який **відрізняється** тим, що він призначений для загоювання ран
- 37 Спосіб за п 35, який **відрізняється** тим, що він призначений для лікування пухлин, причому вказану композицію вводять у місце розташування пухлини

Цей винахід стосується фармацевтичних композицій із контрольованим виділенням розчинних рецепторів із полімерної матриці

Системи контрольованого виділення постачають ліки з заданою інтенсивністю протягом відповідного часу, який може тривати від кількох днів до декількох років. Ці системи мають значні переваги у порівнянні зі звичайною терапією. Наприклад, після введення стандартної дози ліків через травний тракт або шляхом ін'єкції концентрація ліків у

крові збільшується, досягає піку, а потім знижується. Кожні ліки мають власний діапазон терапевтичного ефекту, вище якого воно стає токсичним, а нижче - неефективним, тому зміни рівнів концентрації ліків у крові можуть викликати появу періодів його неефективності та токсичності. У порівнянні з цим, контрольоване виділення ліків підтримує їх концентрацію у потрібній терапевтичній зоні при одноразовому застосуванні. Інші потенційні пере-

ваги систем контролюваного виділення ліків вмищують до себе

(i) локалізоване постачання ліків до визначеної частини тіла, чим досягається зниження рівня ліків в організмі, тобто в інших органах,

(ii) збереження складових, які швидко руйнуються в середовищі організму (це особливо важливо для біологічно чутливих молекул, таких як протеїни),

(iii) зниження потреби у подальшому нагляді за хворим,

(iv) підвищення комфорту, та

(v) поліпшення стану

Оптимального контролю над виділенням ліків можна досягти шляхом введення ліків до полімерного матеріалу. З полімерного матеріалу ліки звичайно виділяються шляхом дифузії, хімічною реакцією або активацією розчинником.

Найбільш поширеним механізмом виділення є дифузія, при якій ліки пересуваються з початкового положення у полімері до зовнішньої його поверхні, а потім в організм. Дифузія може відбуватися крізь полімерну плівку, що покриває ліки, або з матриці полімерної системи, через що ліки розподіляються більш рівномірно. Ліки можуть також бути виділені хімічною реакцією, наприклад, розпадом полімеру, або розщепленням ліків з полімерної основи.

Також можливі комбінації зазначених механізмів. Швидкість виділення може контролюватися властивостями полімерного матеріалу (наприклад, ступенем кристалізації, або структурою пор дифузії контрольованих систем, гідролітичною нестійкістю зв'язків, або гідрофобією мономерів хімічно контрольованих систем) та будовою самої системи (наприклад, товщиною і формою). Перевагою наявності систем з різними механізмами виділення є те, що за їх допомогою кожної з них можна досягти різних цілей.

На протязі багатьох років системи контролюваного виділення були здатні тільки до помірного виділення ліків з низькою молекулярною масою (< 600). Великі молекули, такі як протеїни, не розглядалися як ймовірні кандидати, тому що поліпептиди вважалися занадто великими для помірного дифузії крізь більшість полімерних матеріалів, навіть після набрякання полімеру. Відкриття того, що матриці твердих гідрофобних полімерів, які мають макрофібрильну структуру, дозволяють молекулам майже будь-якого розміру виділятися протягом більш 100 днів, надало можливість контролюваного постачання в організм усіляких протеїнів, полісахаридів та полінуклєотидів (Див. Langer, 1990).

Протеїни та поліпептиди, що вводилися до цього часу в полімерні матеріали з метою контролюваного виділення, є у більшості ефекторними молекулами, такими як інсулін, а це суперечить композиціям із контрольованим виділенням молекул, які зв'язують та нейтралізують ефекторні молекули, що містяться у людському організмі. Пухлинний некроз-фактор- α (TNF α) - це сильно діючий цитокін, що породжує широкий спектр біологічних реакцій. TNF α цитотоксичний по відношенню до багатьох пухлинних клітин і може використовуватись при лікуванні раку. TNF α посилює ріст фібро-

бласт, діє як речовина, що зумовлює реконструювання тканини, і може бути, таким чином, придатним для лікування ран. Також він викликає гемороїдальні некрози пересаджуваних пухлин у мишей, посилює фагоцитозну функцію та цитотоксичність поліморфноядерних нейтрофілів і модулює виразність багатьох протеїнів, включаючи ліпопротеїнову ліпазу класу 1 антигенів головного постоперувального комплексу, і цитокінів, таких як інтерлеукін-1 і інтерлеукін-6. TNF α показав свою ефективність проти вірусів, бактерій і багатоклітинних, зокрема внутрішньоклітинних, паразитів. TNF α є необхідним для нормальної імунної реакції, але велика його кількість викликає значні патогенні наслідки. TNF α здобув назву "кахектин", тому що він є пануючим фактором, відповідаючим за спустошливий синдром (кахексія), зв'язаний з неопластичною хворобою і паразитомією. TNF α є також головним постачальником токсинів при грамнегативному сепсисі, тому що антитіла проти TNF α можуть захистити інфікованих тварин.

TNF α виказав свою причетність до захворювань, прикладом яких є синдром респіраторного виснаження дорослих, легеневий фіброз, малярія, інфекційний гепатит, туберкульоз, запалення кишечника, септичний шок, СНІД, позитивна реакція на щеплення, аутоімунні хвороби, такі як ревматоїдний артрит, поширений склероз і юнацький діабет, та хвороби, пов'язані з тривалим розладом надчутливості шкіри. Свідчення того, що деякі ефекти TNF α можуть бути шкідливими для організму, привадили увагу до механізмів, які регулюють функцію TNF α . Внутрішньоклітинні сигнали для реакції на TNF α забезпечуються рецепторами поверхні клітини (далі TNF-R) двох різних молекулярних видів, до яких TNF α приєднується міцним зв'язком.

Рецептори поверхні клітини TNF-R виявляються майже у всіх клітинах організму. Різні впливи TNF α цитотоксичність, сприяння росту та інші, обумовлюються рецепторами TNF після приєднання до них TNF α . Дві форми цих рецепторів, які відрізняються молекулярним розміром, 55 і 75 кДальтон, вже описані і будуть далі називатися p55 та p75 TNF-R відповідно. Проте необхідно пам'ятати, що в публікації, у яких також робиться посилання на ці рецептори, але позначені як p60 та p80 TNF-R відповідно. Обидва рецептори TNF α знаходяться не тільки на клітинах, але й в розчинній формі, складаючись з розділених позакліткових областей цілих клітинних рецепторів. Утворюються вони протеолітичним розщепленням рецепторних форм поверхні клітини. Ці TNF α рецептори розчинної форми (sTNF-R) можуть підтримувати здатність зв'язувати TNF α , конкуруючи з TNF α рецепторами поверхні клітини, і, таким чином, блокувати TNF α активність. Таким чином, sTNF-Rs діють як фізіологічні послаблювачі активності TNF α , захищаючи від його потенційно шкідливих впливів. Але, як також згадувалося, sTNF-Rs впливають також на TNF α функцію, стабілізуючи її активність, шорше, запобігаючи розпаду його біоактивної тривимірної структури на інертні мономерні (Aderka et al., 1992). Таким чином, sTNF-Rs можуть впливати на активність TNF α двома способами або вони конкурують з TNF α рецепторами поверхні

клітини і блокують шкідливі реакції TNF α , або вони діють як буферне середовище і стабілізують TNF α активність

Два рецептори sTNF-Rs, далі p55 sTNF-R та p75 sTNF-R, раніш позначалися як TNF зв'язуючі протеїни I та II, або TBPI та TBPII відповідно (див., наприклад, EP 398327, EP 412486, та EP 433900). У цій заявці ми будемо використовувати обидва позначення: p55 sTNF-R, або TBPI та p75 sTNF-R, або TBPII, у кожному позначенні протеїни ті ж самі.

sTNF-Rs істотно присутні у сироватці у концентраціях, які значно збільшуються в обох, запальних та незапальних, етапах хвороби. Реакція цих протеїнів, однак, може бути різною, залежно від їх концентрації на місці дії TNF α , співвідношення їх концентрації до місцевої концентрації TNF α , та швидкості, з якою sTNF-Rs та TNF α виходять із зони дії TNF α по відношенню до швидкості ослаблення активності TNF α . Залежно від цих параметрів, sTNF-Rs можуть у різних ситуаціях впливати на функцію TNF α цілком по-іншому, або пригнічуючи реакції TNF α , або виконуючи роль несучого середовища для TNF α , або навіть підсилюючи реакції TNF α , збільшуючи тривалість її функції (Aderka et al., 1992).

На ефективність sTNF-Rs в якості ліків проти TNF α можуть впливати різні фактори: структурна близькість, при якій sTNF-Rs зв'язують TNF α , в порівнянні зі структурною близькістю рецепторів поверхні клітини, можливість доступу розчинних рецепторів у зону дії TNF α , і швидкість очистки розчинних рецепторів і сполук, які вони утворюють з TNF α з місця формації TNF α .

Ймовірно, що звичайні форми sTNF-Rs діють найбільш фізіологічно доречним способом. Проте, їх достатньо швидке усунення з крові є головною перешкодою їх застосування. Було вжито декілька спроб покращити ці молекули, прикладами яких є так звані химерні "імунозв'язки", де sTNF-Rs зв'язані з частиною Fc імуноглобулінової молекули (розроблено Huffman La Roche and Immunex), і Полі Етиленгліколеві (ПЕГ) sTNF-Rs, в яких sTNF-Rs мають поперечні зв'язки за допомогою ПЕГ молекул (розроблено Synergen). Обидва підходи дають в результаті формування двовалентних sTNF-R молекул, у яких більш тривалий час усунення, і які можуть більш ефективно приєднуватися до тривалентної молекули TNF α . Проте вони, схоже, більш імуногенні, ніж звичайні розчинні рецептори, і усунення їх сполук з TNF α з циркуляції може відбуватися недостатньо ефективно.

Багато шкідливих ефектів TNF α виникають при хронічних утвореннях цього цитокіну в певному окремому місці організму. Найбільш передбаченим обмеженням використання розчинних форм TNF рецепторів для захисту проти таких патологічних умов є складність, пов'язана з підтримкою терапевтично-ефективних концентрацій розчинних рецепторів у необхідних місцях в перебігу більш тривалого часу.

Предметом цього винаходу є розробка нових підходів до терапевтичного застосування розчинних форм рецепторів для впливу на функції їх лігандів, тобто для захисту від шкідливих ефектів їх лігандів, зокрема систем, дозволяючих місцеве виділення розчинного рецептора в організмі при по-

стійній швидкості та впродовж тривалого часу. Ці підходи базуються на введенні розчинного рецептора у біосумісні полімерні матеріали, які імплантуються або вводяться у задані відділи організму. Полімерні матриці, які містять в собі розчинний рецептор, дозволяють місцеве контрольоване виділення розчинного рецептора в його звичайній формі.

Будь-який розчинний рецептор, що має можливість приєднуватися і впливати на функції його лігандів, або нейтралізуючи їх шкідливі ефекти і/або стабілізуючи або підсилюючи їх активність, охоплюється цим винаходом.

Прикладами таких розчинних рецепторів є розчинні рецептори гормонів і цитокінів, а найкраще, розчинний рецептор - це розчинний TNF α рецептор.

Таким чином, ще одним предметом цього винаходу є забезпечення нового підходу до терапевтичних застосувань розчинних TNF α рецепторів для впливу на TNF α ефекти, тобто для захисту від TNF ефектів, включаючи системи контрольованого виділення.

Цей винахід, таким чином, забезпечує фармацевтичну композицію з контрольованим виділенням розчинного рецептора, де зазначений розчинний рецептор запроваджений у біосумісну полімерну матрицю.

Приклади біосумісних полімерних матеріалів, які можуть бути використані у композиціях винаходу включають до себе, але не обмежують цим, біосумісні недеградуєчі полімери, обрані з групи, яка включає етилен-вінілові ацетатні сополімери (EVAc), силіконові каучуки, полісахариди, такі як целюлоза, поліаміди, поліакрилати, поліетилени, поліуретани, поліізобутилені і поліфосфазени, та біодеградуєчі полімери, обрані з групи, яка включає поліефіри, поліангідриди, поліорфоефіри, полікапролактон, псевдополіамінокислоти, поліпептиди, желатин, полімолочну кислоту, полігліколеву кислоту і полімери полімолочно-гліколевої кислоти (PLGA).

За одним з переважних рішень, розчинний TNF α рецептор (sTNF-R) вводиться у прийнятний полімерний матеріал, такий як поліетилен-вінілова ацетатна матриця, або у мікросфери полі (молочно-гліколевої кислоти).

Фармацевтичні композиції, відповідно з цим винаходом, можуть мати в собі p55 sTNF-R або p75 sTNF-R. У найкращому рішенні, композиція містить p55 sTNF-R (TBPI).

В одному рішенні фармацевтичні композиції винаходу призначені для використання при лікуванні хвороб, що вимагають захисту від шкідливих ефектів лігандів, тобто, TNF α . Полімерні матриці з sTNF-Rs розташовуються у потрібних частинах організму, тим самим дозволяючи утримувати sTNF-R у організмі постійно на протязі тривалого часу.

У другому рішенні фармацевтичні композиції винаходу призначені для використання разом з лігандами, тобто, TNF α , для стабілізації та/або посилювання активності TNF α , для використання у будь-якій ситуації, де потрібна корисна дія TNF α . В одному аспекті цього рішення композиція включає до себе сполучення TNF α /sTNF-R, яке при

застосуванні у місці розташування пухлини може виконувати ефективну місцеву протипухлинну функцію і давати незначні соматичні небажані ефекти з боку TNF α . В інших аспектах цього рішення композиція, що включає до себе сполучення TNF α /sTNF-R, корисна проти вірусних, бактеріальних і паразитичних, зокрема, внутрішньоклітинних багатоклітинно-паразитичних інфекцій, і для лікування ран.

В іншому рішенні винахід охоплює лікування пацієнта для його захисту від шкідливих ефектів лігандів, тобто, TNF α , при якому вказаному пацієнту призначається фармацевтична композиція у відповідності з винаходом, що має ефективну кількість відповідного розчинного рецептору, тобто, sTNF-R, у формі контрольованого виділення.

В наступному рішенні винахід стосується лікування раку, охоплюючи застосування, при необхідності, в районі пухлини пацієнта фармацевтичної композиції винаходу, яка включає сполучення TNF α /sTNF-R у формі контрольованого виділення.

Фіг. 1 показує вплив розміру частинки на сукупне виділення TBPI. Частинки TBPI + BSA порошків трьох розмірних класів були введені в етипен-вінілові ацетатні сополімерні (EVAc) матриці з заповненням на 30% (i) < 75мкм (затушовані ромби), (ii) 75 - 250мкм (чисті квадрати) і (iii) 250 - 425мкм (затушовані круги). На фіг. 2 показан вплив ефекту заповнення на сукупне виділення TBPI. Були зроблені матриці EVAc з заповненням TBPI + BSA, з використанням частинок розміром 75 - 250мкм (i) 10% заповнення (затушовані ромби), (ii) 30% заповнення (чисті квадрати), і (iii) 50% заповнення (затушовані круги).

Фіг. 3 показує сукупне відсоткове виділення розчинного TNF α рецептора I (TBPI) окремо, або введеного разом з альбуміном бичачої сироватки (BSA) з мікросфер (i) полімолочно-гліколевої кислоти (PLGA) 75 - 25 (чисті та затушовані круги, відповідно), (ii) PLGA 50 - 50 (чисті та затушовані квадрати, відповідно), (iii) полі-1-молочної кислоти (PLLA) (чисті та затушовані трикутники, відповідно).

Фігури 4a-c показують *in vivo* результати оголених мишей Балба, інюкульованих TNF-виробляючими клітинами яєчника китайського хом'яка (CHO) (CHO/TNF) і підданим лікуванню TBPI, або мишиними анти-TNF моноклонними антитілами TNF-1 (Ab), де Фіг. 4a - це графічне зображення усередненої ваги групи (гр) оголених мишей Балба при лікуванні (i) TBPI в EVAc матриці, введеної підшкірно (затушовані круги), (ii) TBPI у PLGA 75 - 25, імплантовані (чисті круги), (iii) анти-(TNF) антитіла, введені ін'єкцією один раз, через п'ять днів після інюляції клітинами CHO/TNF (Ab один раз) (затушовані квадрати), (iv) анти-TNF антитіла, введені ін'єкцією два рази, через п'ять днів після інюляції мишей клітинами CHO/TNF та через тиждень (Ab двічі) (чисті квадрати), і (v) контрольної групи, без будь-якого лікування (затушовані трикутники).

Фіг. 4b подає результати *in vitro* рівнів концентрації біоактивних TNF α у мишиній сироватці. Сироватка була відібрана у мишей, що мають TNF α -виробляючі клітини яєчника китайського хом'яка (CHO), через вказані періоди часу після імпланта-

ції TBPI у EVAc (затушовані круги), або TBPI у PLGA 75 - 25 (чисті круги), або введення ін'єкції анти-TNF α антитіла одноразово (затушовані квадрати), або двічі (чисті квадрати), як на фіг. 4a, а також у мишей без лікування (затушовані трикутники). Біоактивність TNF α у сироватці була визначена шляхом його вміщення у розчин у співвідношенні 1 : 100 к культивованій MHA2 клітині (похідна від клітин Гепа, через 24 години після їх висіву у клітини розміром 3×10^4 на 9 мікрорел) протягом 10 годин у присутності циклогексимида (25мкм/мл), з послідовним підсумовуванням схожості клітин методом нейтрального червоного поглинання (Wallach et al, 1984), і

Фіг. 4c подає криві виживання мишей при лікуванні (i) TBPI у EVAc, імплантовані (чисті квадрати), (ii) TBPI у PLGA 75 - 25, імплантовані (затушовані круги), (iii) анти-TNF антитіла, одноразово (чисті трикутники), (iv) анти-TNF антитіла, двічі (затушовані трикутники), та (v) контрольні, без лікування (чисті круги).

Фіг. 5 показує вплив імплантованих у різні частини тіла миши EVAc матриць, що мають TBPI, на концентрацію виділення TBPI шия (затушовані круги), спина (чисті круги) та живіт (затушовані квадрати).

Фіг. 6 - це графічне зображення опуклостей кісткових суглобів (мм), показуючих розвинення артриту на різних ступенях у потомства трансгенних Tg 197 артритних мишей, яких лікували імплантуванням EVAc, який має TBPI (чорні колонки), тільки EVAc (сірі колонки), або без лікування (контрольні) (білі колонки).

Фіг. 7 - це графічне зображення опуклостей кісткових суглобів (мм), показуючих розвинення артриту на різних ступенях у потомства трансгенних Tg 197 артритних мишей, лікуваних анти-TNF α антитілами один раз кожен тиждень на протязі експерименту (65 днів) (чорний копій колонок) і один раз на тиждень на протязі двох тижнів (сірий копій), або без лікування (контрольна) (білий копій колонок).

Фіг. 8 - це графічне зображення усередненої ваги групи (гр) трансгенних Tg 211 мишей, які мають людські TNF α mRNA у Т клітинах, яких лікували імплантаціями EVAc, що містять TBPI (затушовані круги), тільки EVAc (чисті круги), або без лікування (контрольна) (затушовані квадрати).

Фіг. 9 - це графічне зображення усередненої ваги групи (гр) трансгенних Tg 211 мишей, яких лікували анти-TNF α антитілами один раз кожен тиждень на протязі експерименту (50 днів) (затушовані трикутники), і один раз на тиждень на протязі двох тижнів (чисті трикутники), або без лікування (контрольна) (затушовані квадрати). Фіг. 10 подає криві виживання трансгенних Tg 211 мишей, яких лікували імплантуванням EVAc з TBPI (затушовані круги) і тільки EVAc (чисті круги), або без лікування (контрольна) (затушовані квадрати).

Фіг. 11 подає криві виживання трансгенних Tg 211 мишей при лікуванні анти-TNF α антитілами раз на тиждень на протязі 65 днів (затушовані круги), і раз на тиждень на протязі двох тижнів (чисті круги), або без лікування (контрольна) (затушовані квадрати).

Цей винахід дозволяє контрольоване виділен-

ня будь-якого розчинного рецептору, який може зв'язуватись та впливати на активність його ліганд, як нейтралізуючи ліганд, який має шкідливі ефекти, так і стабілізуючи / посилюючи його діяльність. Прикладами таких розчинних рецепторів є розчинні рецептори цитокінів, тобто, TNF α , IFN- γ , IL-2, IL-6 і подібні.

У переважному рішенні, композиції винаходу мають sTNF-Rs, які можуть бути одержані з натуральних джерел, таких як людська сеча (Engelmann et al, 1989, Engelmann et al, 1990, Olson et al, 1989, Seckinger et al, 1989), або рекомбінантними способами (EP 433900, Nophar et al, 1990, Schall et al, 1990, Loetscher et al, 1990) з подальшим очищенням, як описано, наприклад, у EP 308378 і EP 398327. Використані тут терміни "sTNF-Rs", "p55 sTNF-R", "p75 sTNF-Rs", відносяться до всіх sTNFs з натуральних джерел, або здобутих рекомбінантними DNA способами, включаючи, але не обмежуючись ними, TNF зв'язуючі протеїни I і II, описані у EP 308378 і EP 398327.

Полімери, які можуть бути використані при застосуванні цього винаходу, включають, але не обмежуються ними, біосумісні недеградовані полімери, вибрані з етилен-вінілових ацетатних сополімерів, силіконових каучуків, полісахаридів, таких як целюлоза, а також поліаміди, поліакрилати, поліетилен, поліізобутилен, поліуретани й поліфосфазени, та біодеградовані полімери, вибрані з поліефірів, поліорфоефірів, полікапролактону, поліпептидів, псевдополі(амінокислот), желатину, поліангідридів, полі-L-молочної кислоти, полі-D-молочної кислоти, полі-D,L-молочної кислоти, полігліколевої кислоти, і сополімери, обрані з полі-L-молочної кислоти-гліколевої кислоти, полі-D-молочної кислоти-гліколевої кислоти, полі-D,L-молочної кислоти-гліколевої кислоти, полі-L-молочної кислоти-D-молочної кислоти, та полі-L-молочної кислоти-D,L-молочної кислоти.

Полімери, найкраще використовані у цьому винаході, були етилен-вінілові ацетатні сополімери (EVAc), сополімери полімолочно-гліколевої кислоти (PLGA) та полі-L-молочної кислоти (PLLA).

Фармацевтична композиція, що включає sTNF-R, вводиться у EVAc матрицю, яка може бути виготовлена з промислових EVAc, після очистки, коли необхідно, наприклад, розчинним литтям, як описано у Rhine et al, 1980. Ці матриці утворюють дифузно-контрольовані системи, що забезпечують рівномірний розподіл протеїнів, репродуктивну динаміку з пролонгованим виділенням біологічно активного sTNF-R на протязі тижнів або, навіть, місяців. По причині того, що EVAc біосумісний, але не деградований полімер, EVAc матриці придатні для використання там, де є потрібним або бажаним пролонговане виділення ліків.

По причині того, що головним принципом є виділення з недеградованих полімерних матеріалів, таких як EVAc, методом дифузії крізь канали у матриці, дифузія посилюється більш високою навантаженою протеїнів. Таким чином, у переважному рішенні, активний протеїн є з'єднаним з нейтральним протеїном, який не впливає на біологічне спрацьовування активного протеїну, щоб збільшити загальну протеїнову навантажку. Прикладами таких нейтральних протеїнів є бичачий сироватковий альбумін (хоча він і не є найкращим для використання людиною), людський альбумін, міоглобін, гемоглобін та інші.

Фармацевтична композиція, відповідно з винаходом, яка має в собі sTNF-R, може бути введена у біодеградований полімер, обраний з групи, яка включає полі-L-молочну кислоту, полігліколеву кислоту, та сополімери, комерційно наявні гомополімери, або сополімери молочної кислоти і/або гліколевої кислоти, з'єднані у формі мікросфер, які придатні як для імплантації, так і для ін'єкцій. Мікросфери можуть бути виготовлені, наприклад, удосконаленням методом випаровування розчину з використанням подвійної емульсії, як описано у Cohen et al, 1991. З тої причини, що полімери біодеградовані, імплантований об'єкт може бути легко введений ін'єкцією, уникаючи використання хірургічних процедур і необхідності виведення обладнання після вичерпання ліків. Динаміка виділення активного компонента є контрольованою та прогнозованою. Система дозволяє тривале виділення активного компонента на протязі тижнів або, навіть, місяців.

Фармацевтична композиція винаходу, що включає sTNF-R, може бути використана для подавлення шкідливих ефектів TNF α при гострих захворюваннях, таких як септичний шок, позитивна реакція на щеплення (GVHD), малярія, інфекційний гепатит, туберкульоз, або при хронічних захворюваннях, таких як кахексія, що супроводить рак, хронічний GVHD, або при аутоімунних захворюваннях, тобто, ревматоїдному артриті, підлітковому діабеті, соматичному туберкульозі шкіри еритематозі та поширеному склерозі, або при тривалих розладах надчутливості шкіри. Фармацевтична композиція винаходу може бути застосована будь-яким способом, придатним для контрольованої доставки sTNF-R - або імплантуванням, або місцевими ін'єкціями, наприклад, внутрішньосуглобною ін'єкцією у синовіальну рідину порожнини суглоба при лікуванні ревматоїдного артриту, або внутрішньооболонковою ін'єкцією у цереброспинальну рідину при лікуванні поширеного склерозу, або способом топічних формулювань, тобто, лосьйонів, при лікуванні шкіряних захворювань. Композиції для лікування ревматоїдного артриту можуть включати інші протизапальні компоненти, а композиції для лікування поширеного склерозу можуть включати інші компоненти проти поширеного склерозу, тобто, бета-інтерферон і Сополімер-1 (COP-1).

Композиція винаходу, що має в собі sTNF-R, буде складена таким чином, щоб доставити в організм таку кількість sTNF-R, яка є достатньою для блокування дії TNF α . Для застосування при лікуванні аутоімунних хвороб композиція буде складена таким чином, щоб доставити таку кількість sTNF-R, що відповідає курсу лікування і тяжкості аутоімунної хвороби, для поліпшення стану пацієнта та зниження або ремісії хвороби. Ефективність дози буде залежати від способу її введення, хвороби, яку лікують, і стану пацієнта. Визначення рівня p55 sTNF-R або p75 sTNF-R у сироватці або у іншій придатній для вивчення рідині пацієнта відомими методами (для ELISA, див. Aderka et al, 1991) може допомогти визначенню необхідної до-

зи лікування. Композиція винаходу, що має в собі sTNF-R, буде складена таким чином, щоб доставити в організм таку кількість sTNF-R, яка є достатньою для блокування дії TNF α . Для застосування при лікуванні аутоімунних хвороб композиція буде складена таким чином, щоб доставити таку кількість sTNF-R, що відповідає курсу лікування і тяжкості аутоімунної хвороби, для поліпшення стану пацієнта та зниження або ремісії хвороби. Ефективність дози буде залежати від способу її введення, хвороби, яку лікують, і стану пацієнта. Визначення рівня p55 sTNF-R або p75 sTNF-R у сироватці або у іншій придатній для вивчення рідині пацієнта відомими методами (для ELISA, див. Aderka et al, 1991) може допомогти визначенню необхідної до-

зи для цього пацієнта, пам'ятаючи, що екзогенне застосування sTNF-R може доповнити ендогенне існуючий sTNF-R при нейтралізації шкідливої активності TNF α

Коли потрібна стабілізація активності TNF α , композиція включає в себе сполучення TNF α і sTNF-R, наприклад, сполучення 1:1, для застосування на місці локалізації пухлини

Винахід буде зараз проілюстровано наступними прикладами, які не обмежують цей винахід, і фігурами, які додаються

ПРИКЛАДИ

Матеріали та методи

Матеріали Використовувались PLGA 50:50, властива в'язкість (i.v.) 0,51дл/гр, та PLGA 75:25, i.v. 0,48дл/гр, PLLA (полі-1-молочна кислота), i.v. 0,64дл/гр (обидва із PURAC Biochem BV, Holland) Були використані по одержанні етилен-вініловий ацетатний сополімер (EVAc) (40% вінілового ацетату) (Dupont), бичачий сироватковий альбумін (BSA) (Sigma Chemical Co., USA), полівінілспирт (PVA) з середньою молекулярною вагою 77000 - 79000, 88% гідролізований (Aldrich Chemical Co.) і TBPI (p55 sTNF-R) (InterPharm Laboratories Ltd., Israel) Анти-TNF α антитіло, позначене TNF-1, - це миши́не моноклональне антитіло, отримане проти людського рекомбінанту TNF α в одній з сучасних лабораторій винахідника (D Wallach)

Методи In vitro профілі виділення були отримані розміщенням матриць для доставки ліків у фосфатно-буферний фізіологічний розчин (PBS, pH 7.4), який міститься у пляшці і збовтується у ванні для цього. Періодично відбиралися і аналізувалися зразки TBPI Ферментно-Зв'язаним Імунно-Сорбентним Аналізом (ELISA, Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), як описано у Aderka et al., 1991

In vivo ефективність полімерних систем досліджувалася на трьох моделях

(i) мишах з імплантованими TNF α -виروبляючими клітинами пухлини (CHGyTNF), як описано у XDLiff et al., 1987, розвинено тяжку форму кахексії, яка веде до смерті,

(ii) трансгенних Tg 197 мишах, у яких прогнозовано розвивався артрит, як описано у Kefferetal., 1991,

(iii) трансгенних Tg 211 мишах, які мають людський TNF α mRNA в Тклинах, з помітно розвиненими гістологічними змінами і летальним виснажливим синдромом, як описано у Probert et al., 1993

ПРИКЛАД 1 Контрольовані виділення p55 sTNF-R з EVAc матриць

Етилен-вініловий ацетатний сополімер (40% вініловий ацетат по вазі) був розчинений у метиленхлориді, щоб отримати 10% розчин (w/v) TBPI розчин був доданий у порошок бичачого сироваткового альбуміну (BSA), розчиненого у дистильованій воді подвійної очистки. Суміш була виморожена до перетворення у порошок (24 години при 5 мікронах Нд та -70°C, Freeze Dryer, Lab Conco) TBPI + BSA порошок був просіяний для отримання частинок < 75, 75 - 250 та 250 - 425мкм Зважена кількість порошку одного класу була додана до 15мл полімерного розчину у скляну пляшку, отримана суміш була швидко влита в центр рівної тefлонової дискової форми (1см у діаметрі і 0,5см

товщиною), яка була попередньо охолоджена на сухому льоді протягом 5 хвилин. Під час попереднього охолодження форма була закрита скляною кришкою для запобігання надмірного заморожування. Після того, як суміш була вилита, форма залишалася на сухому льоді протягом 10 хвилин, і суміш заморожувалась (Форма на цій стадії закривалася знову на протязі останніх 7 хвилин). Легко звільнивши заморожену пластину холодним шпателем, її перемістили на дротовий екран і витримали протягом 2 днів при температурі -20°C. Потім диск висувували протягом ще двох днів при кімнатній температурі у випарювачі під слабким вакуумом (600 мторр). Сушка спричинила усихання дисків до розмірів 0,5см у діаметрі і 0,1 - 0,2см товщиною

Полімерні системи доставки були занурені у середовище PBS. EVAc матриці були виготовлені у вигляді дисків з діаметром 0,5см і товщиною 1 - 2мм, які містять 22,35мкг TBPI у кожному диску для експериментів in vivo. Для експериментів in vitro диски містили 4,47, 13,41 та 22,35мкг TBPI (10%, 30% і 50% завантаження). Визначення TBPI проводилося за допомогою ELISA для TBPI як функції часу (Aderka et al., 1991). Фіг. 1 і 2 показують вплив розміру частинок ліків і завантаження на динаміку виділення з EVAc матриць. Розмір частинок істотно впливав на швидкість виділення ліків. Збільшення розміру частинок збільшувало швидкість виділення (Фіг. 1). Збільшення завантаження ліків рівномірно збільшувало швидкість виділення ліків (Фіг. 2). Тобто не тільки збільшується загальний об'єм виділених ліків, але також збільшилась швидкість виділення.

Розмір частинок ліків і заповнення помітно вплинули на динаміку виділення макромолекул з полімерних систем доставки. По причині того, що макромолекули занадто великі, щоб дифундувати крізь полімерну плівку, пролонговане виділення можна забезпечити дифузією крізь канали у матриці. Для введення макромолекул шляхом лиття можна використовувати такі канали, крізь які розчинені ліки можуть дифундувати. Збільшення швидкості виділення, спричинене збільшенням розміру частинок, може бути результатом утворення великих порних каналів у полімерній матриці. Таким чином, збільшення заповненості має надати більш прості провідні шляхи (найменша покрученість) і більш велику пористість для дифузії, що в обох випадках полегшить рух води або PBSy, та перенесення протеїнів з матриці.

ПРИКЛАД 2 Контрольоване виділення p55 sTNF-R (TBPI) з мікросфер PLGA і PLLA

Мікросфери полі(молочно-гліколевої кислоти) (PLGA), або полі-1-молочної кислоти (PLLA) були виготовлені модифікованим методом випарювання розчину з використанням подвійної емульсії, як описано у Cohen et al., 1991. Або, коротко, розчин TBPI або порошок TBPI і BSA (отриманий, як описано у Прикладі 1, вище), що був розчинений у дистильованій воді подвійної очистки, були влиті у PLGA, або PLLA, розчинені у метиленовому хлориді. Суміш була досліджена ультразвуком (модель VC-250, Sonic & Materials, Inc.) протягом 30 секунд для утворення першої внутрішньої емульсії (W1/O). Емульсія була влита при енергійному змі-

шуванні магнітним брусом у 2мл водного 1% полівинілспирту (PVA), насиченого метиленовим хлоридом для утворення другої емульсії (W1/0) W2). Одержана подвійна емульсія була влита у 200мл 0,1% PVA і безперервно змішувалась протягом 3 годин при кімнатній температурі, доки більша частина метиленового хлориду не випаровувалася, залишаючи тверді мікросфери. Мікросфери були зібрані центрифугуванням (1000гр за 10 хвилин), відібрані за розміром з використанням сит з чарунками 100мкм і перетворені сухим заморожуванням (16 годин, Freeze Dryer, Lab Conco) у порошок. Якщо не було визначено інакше, то дослідження проводились з PLGA у співвідношенні 75 : 25 і 50 : 50 (L/G) і PLLA.

Полімерні системи доставки були занурені у PBS 0,04гр PLGA або PLLA мікросфер, маючих 18,2мкг TBPI, були використані у кожному експерименті, і виділення TBPI були оцінені за допомогою ELISA, як функція часу.

Фіг. 3 показує сукупне відсоткове виділення TBPI з різних PLGA сополімерів (50 : 50 або 75 : 25), або PLLA мікросфер. Можна бачити, що навіть після 2200 годин виділилось тільки 10% TBPI, введених у мікросфери. На цьому графіку також показано, що сукупний відсоток виділення TBPI з полімерів, куди додавався TBPI разом з BSA (TBP + BSA) (затушовані круги, квадрати та трикутники), як було описано вище, ніж зі зразків, де TBPI додавався без BSA (чисті круги, квадрати та трикутники).

ПРИКЛАД 3 TBPI, виділений з полімерних матриць, зберігає біологічну активність *in vivo* у мишей, інюльованих CHO/TNFα клітинами.

Щоб прослідкувати хронічні ефекти TNFα, для експерименту була відібрана добре відома модель тварини з кахексійним синдромом, тобто, оголеним мишам Балба були імплантовані TNFα-виробляючі клітини пухлини (CHO/TNFα), як описано у Oliff et al., 1987.

Оголені миші Балба були інюльовані підшкірно клітинами CHO/TNFα (Korn et al., 1988), щоб досягти стану кахексії. Інюляція проводилася з використанням свіже-трипсинованих суспензій клітин у концентрації 1×10^7 клітин/мл (1мл/миша). Ін'єкції були зроблені голками 23-го розміру на пластикових циліндрах об'ємом 3см³. Ін'єкції з клітинами робилися підшкірно у район спини, шиї або живота. Зразки сироватки відбиралися кілька раз на тиждень кровопусканням із хвоста. Ді полімерних систем, імплантованих через п'ять днів після інюляції клітинами CHO/TNFα, оцінювалися по рівню TBPI та TNFα у крові, по зменшенню ваги і смертності.

Полімерні матриці, відповідно до вказаними вище прикладами 1 і 2, імплантувалися або ін'єктувалися оголеним мишам Балба через 5 днів після підшкірної інюляції TNFα-виробляючих CHO клітин для досягнення стану кахексії, і їх дія оцінювалася по концентрації TBPI і TNFα у крові (ELISA). Параметрами для оцінки були (1) біологічна активність TBPI як функція часу, (2) порівняння лікування за допомогою TBPI з лікуванням мишиними антитілами проти людського TNFα (зрощений у лабораторіях винахідника і позначений TNF-1), введених ін'єкцією один раз (п'ять днів

після інюляції клітинами CHO/TNFα, позначеного Ab-один), або двічі з інтервалом у тиждень одна від одної (п'ять днів після інюляції клітинами CHO/TNFα і через тиждень, позначених Ab-двічі), (3) розвиток кахексії в умовах мишиної групи середньої ваги і мишиної смертності, і (4) місце імплантації (підшкірно у шию, спину або живіт).

TNFα може викликати кахексію і прогресуючу втрату ваги у тварин, що мають пухлини. *In vivo* ефективність матриць розглядалася на мишах з імплантованими TNFα-виробляючими клітинами пухлини. Миші з ін'єкціями 1×10^7 CHO/TNFα клітин, які виробляли головні TNFα у великій кількості, отримали тяжку форму кахексії і втрату ваги, які ведуть до смерті. Миші, яким додатково були імплантовані матриці полімерів з TBPI, збільшували свою вагу без смертності, що свідчить про те, що TBPI, виділений із матриць, забезпечив довготривалий захист проти TNFα.

Для оцінки досягнення біологічної активності TBPI у мишей з пухлинами, збиралися зразки сироватки на різних відрізках часу. Біоактивність TNFα оцінювалася у них визначенням їх цитотоксичності до клітин MHA2 (похідні клітини Гела, які чутливі до TNFα). Як показано у Фіг. 4b, інюляція матриць з TBPI призвела до тривалого та значного зниження біоактивності TNFα у сироватці, демонструючи, що виділений із матриць TBPI значно пригнічує зв'язання TNFα з рецепторами TNFα поверхні клітини у MHA2 клітинах.

Для порівняння мишам робилися ін'єкції антитілами до TNFα один раз (п'ять днів після інюляції мишей клітинами CHO/TNFα, позначених Ab-раз), або двічі (п'ять днів після, інюляції клітинами CHO/TNFα і через тиждень, позначених Ab-двічі). Як показано у Фіг. 4a, антитіла впливали на вагу мишей тільки на протязі кількох днів після ін'єкції (у мишей зберігалася їх вага), а потім у них розвивалася прогресуюча втрата ваги, в той час як введений у полімери TBPI був присутній у організмі тривалий час.

Коротка тривалість дії введених ін'єкціями анти-TNFα антитіл (TNF-1) також спостерігається у зразках TNFα біоактивності у сироватці мишей з введеними антитілами, як показано на Фіг. 4b.

Фіг. 4c показує, що миші, оброблені полімерними системами, забезпечуючими контрольоване місцеве виділення TBPI, жили більш чим на 50 днів довше, порівняно з мишами з введеними антитілами TNF-1, які не вижили, і у яких розвилася кахексія при припиненні ін'єкцій антитіл.

Ці результати показують, що лікування, засноване на полімерній контрольованій доставці TBPI, перешкоджає розвитку виснажливого синдрому і може бути більш привабливим у порівнянні з ін'єкціями антитіл у TNFα, тому що воно усуває необхідність робити ін'єкції щотижневе і забезпечує більш тривалий захист проти TNFα. Більш того, як натуральні молекули, розчинні TNFα рецептори більш придатні для тривалого прийому. Анти-TNFα антитіла рано чи пізно збільшують антитіла проти них, що буде перешкоджають їх дії, і, таким чином, вони не придатні для тривалого використання. Це вірно також для людських, або наближених до людей антитіл, які збільшують анти-ідіотипичні антитіла, які блокують їх дію. Не має значної різ-

ниці у динаміці TBPI виділення із EVAc матриць, імплантованих у мишину шию, спину або живіт (функція імплантації матриць) (Фіг 5) Динаміка виділення TBPI постійна на протязі усього часу виділення

ПРИКЛАД 4 TBPI виділення з полімерних матриць зберігають свою біологічну активність *in vivo* у транс генних Tg 197 мишей

Для EVAc матриць, виготовлених згідно з Прикладом 1, (імплантованих підшкірно невеликою операцією через 14 днів після народження), у трансгенних Tg 197 мишей оцінювалася по рівням опухлостей кісткових суглобів Захворювання було помітним приблизно у 4 - 6 тижневого віці з опухлостями кісткових суглобів Додаткове набрякання кісткових суглобів та погіршення рухомості ніг прогресувало до повної втрати рухомості задніх ніг приблизно у віці 9 - 10 тижнів Більш того, прогресуюча втрата ваги була загальною рисою у цих мишей Лікування цих артритичних мишей TVAc матрицями, що містять TBPI, повністю відвернуло набрякання кісткових суглобів (Фіг 6) Більш того, оброблені тварини розвивалися нормально, у них не спостерігалось ніяких ознак артриту або втрати ваги навіть після 10-тижневого віку Для порівняння, мишам робились ін'єкції антитілу TNF-1 кожний тиждень, починаючи з 14 дня після народження, на протязі усього курсу лікування (65 днів), або один раз на тиждень протягом 2 тижнів Як показано на Фіг 7, антитіла впливали на набрякання тільки в тому випадку, коли вводилися кожний тиждень на протязі усього експерименту (чорний копір колонок) Миші з ін'єкціями кожний тиждень розвивалися нормально, у них не спостерігалось ніяких ознак артриту або втрати ваги навіть після 10-тижневого віку, коли погіршення рухомості являється загальною макроскопічною рисою у цих мишей Проте, у мишей, яким вводилися ін'єкції один раз на тиждень на протязі двох тижнів, розвивалося набрякання кісткових суглобів і погіршення рухомості ніг, прогресуючого до повної втрати рухомості задніх ніг, приблизно, у 9 - 10 тижневого віці з прогресуючою втратою ваги Ці результати показують, що лікування, засноване на полімерній контрольованій доставці TBPI, повністю перешкоджає розвитку артриту у мишей і може бути кращим за ін'єкцію антитілу hTNF α , тому що воно надає більш тривалий захист від TNF α і усуває необхідність робити ін'єкції кожний тиждень

ПРИКЛАД 5 TBPI, виділені з полімерних матриць, зберігають свою біологічну активність *in vivo* у транс генних Tg 211 мишей

У трансгенних Tg 211 мишей з людським TNF mRNA в Т клітинах розвилися помітні гістологічні зміни і синдром летального виснаження Для полімерних систем з TBPI, імплантованих через 14 днів після народження, оцінювалася по зниженню ваги і смертності Окремі тварини зважувалися декілька разів кожний тиждень EVAc матриці імплантувалися підшкірно невеликою операцією

Як показано на Фіг 8 та 10, у мишей без лікування (контрольна група затушовані квадрати) розвилася тяжка форма прогресуючої втрати ваги, ведуча до смерті, в той час, як миші з імплантованими EVAc матрицями, що мають TBPI (затушовані круги), збільшили свою вагу і жили протягом

усього експерименту

Для порівняння мишам робились ін'єкції антитілу TNF-1 через 14 днів після народження один раз кожного тижня протягом усього експерименту, або раз на тиждень протягом 2 тижнів Як показано на Фіг 9, застосування анти-TNF α антитілу повністю запобігало розвитку синдрому виснаження, якщо проводилося кожний тиждень від народження Проте, коли антитіла застосовувалися один раз на тиждень протягом 2 тижнів, вони були неефективні, і у мишей розвивався синдром виснаження, ведучий до смерті, як показано на Фіг 11

Ці результати показують, що лікування, засноване на полімерній контрольованій доставці TBPI, повністю запобігає розвитку синдрому виснаження у мишей, і може бути кращим, ніж ін'єкції антитілу hTNF α

Результати *in vivo* показують, що виділений TBPI зберігає свою біологічну активність, як показує зміна усередненої ваги групи (Фіг 4a) і високий відсоток живих MHA2 клітин, чутливих до TNF α (Фіг 4b)

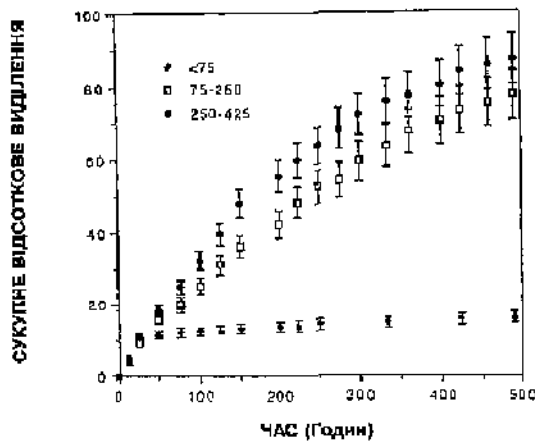
Усі процитовані тут посилання, включаючи журнальні статті або витяги, опубліковані або ті, що відповідають американським або іноземним заявкам на патент, видані у США, або це іноземні патенти, або будь-які інші посилання, повністю об'єднані цим посиланням, включаючи усі дані, таблиці, фігури та текст, наведений у цитованих посиланнях Додатково, повний зміст посилань, цитованих у рамках даних посилань, також повністю включений у дане посилання

Посилання на зміст відомого методу, зміст звичайного методу, на відомі методи, або на звичайні методи, ніяким чином не є припущенням, що будь-який аспект, опис або рішення цього винаходу розкриті, вивчені або пропонувані у відповідній сфері Вищезазначений опис характерних рішень так повно розкриває загальний характер винаходу, що можна, застосовуючи знання у цій сфері (включаючи зміст посилань, цитованих тут), легко модифікувати та/або адаптувати для всіляких застосувань характерні рішення, без надмірного експериментування, не відходячи від загальної концепції даного винаходу Таким чином, такі адаптації та модифікації призначені бути у значенні і рамках еквівалентів розкритих рішень, заснованих на приведених тут керівництвах Потрібно мати на увазі, що фразеологія або термінологія вживається тут з метою описання, а не обмеження, таким чином, щоб термінологія або фразеологія цієї специфікації інтерпретувалася умілим фахівцем у світі головних ідей та керівництва, даних тут, у сполученні зі знаннями одного із звичайних методів у цій сфері

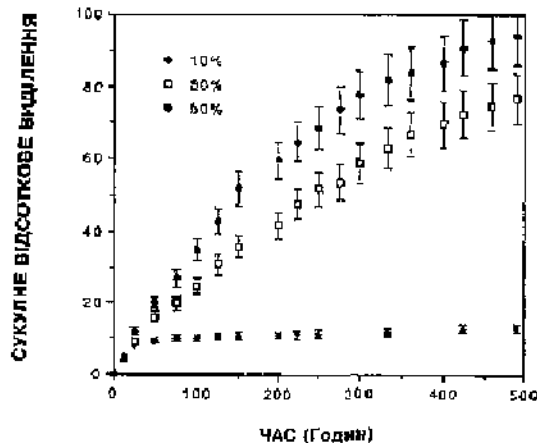
Посилання

- 1 Aderka D et al, Cancer Res, 51 5602 - 5607 (1991)
- 2 Aderka D et al, J Exp Med, 175 323 - 329 (1992)
- 3 Cohen S et al, Pharm Res 8 713 - 720 (1991)
- 4 Engelmann H et al, J Biol Chem, 264 11974 - 80 (1989)
- 5 Engelmann H et al, J Biol Chem, 265 1531 - 36 (1990)

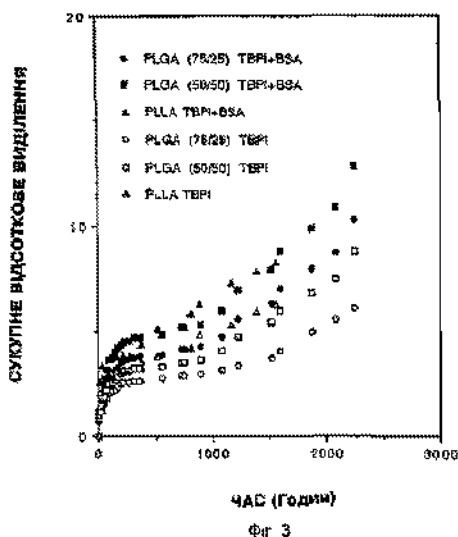
- 6 Korn J H et al, Lymphokine Res, 7 349 - 358 (1988)
 7 Langer R, Science, 249 1527 - 1533 (1990)
 8 Loetscher H et al, Cell, 61 351 - 359 (1990)
 9 Nophar Y et al, EMBO J, 9 3269 - 78 (1990)
 10 Oliff A et al, Cell, 50 555 - 563 (1987)
 11 Olson I et al, Eur J Haematol, 42 270 - 75 (1989)



Фіг. 1

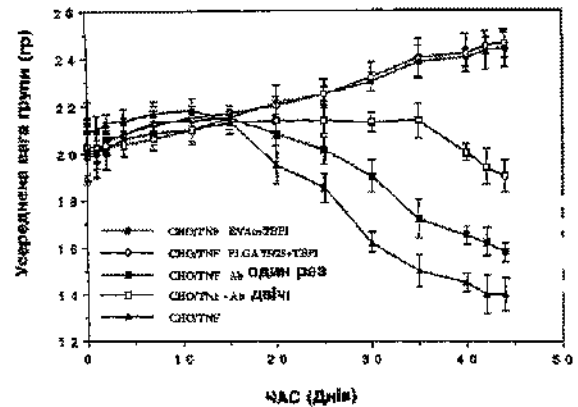


Фіг. 2

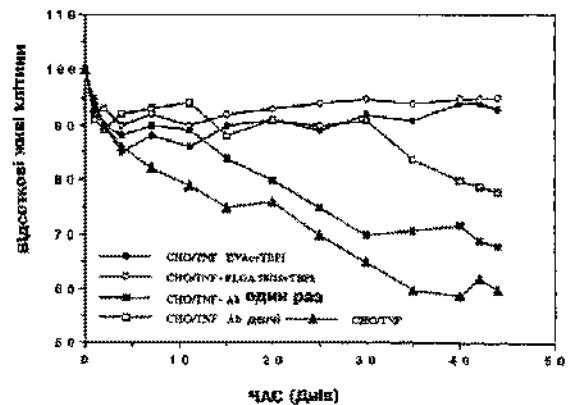


Фіг. 3

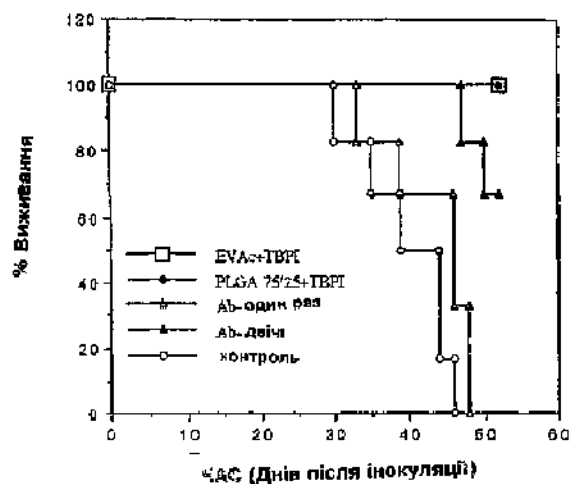
- 12 Probert L et al, J Immunol, 151 1894 - 1906 (1993)
 13 Rhine W D et al, J Pharm Sci, 69 265 - 270 (1980)
 14 Schall T J et al, Cell, 61 361 - 370 (1990)
 15 Seckinger P et al, J Biol Chem 264 11966 - 973 (1989)
 16 Wallach D et al, J Immunol 132 2464 - 69 (1984)



Фіг. 4а



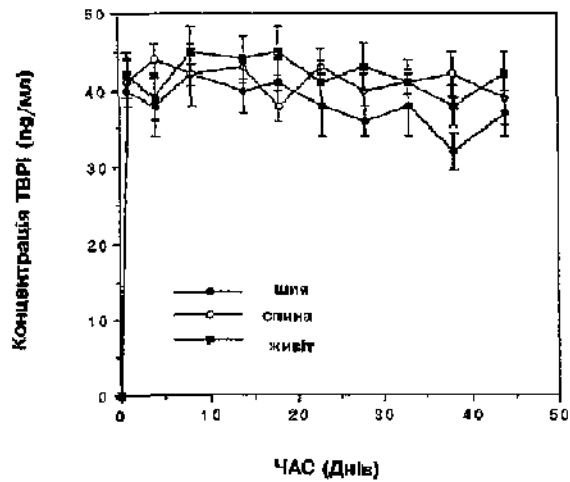
Фіг. 4б



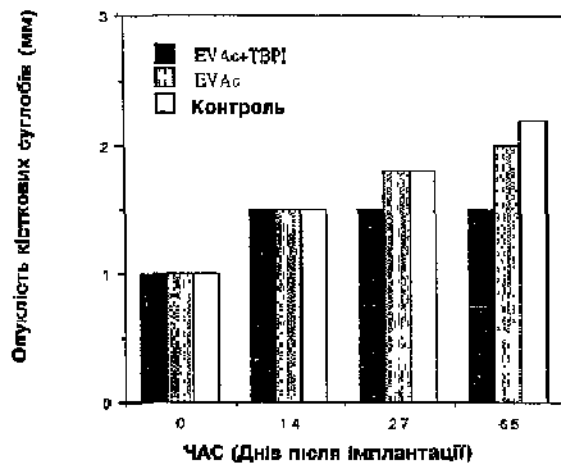
Фіг. 4с

21

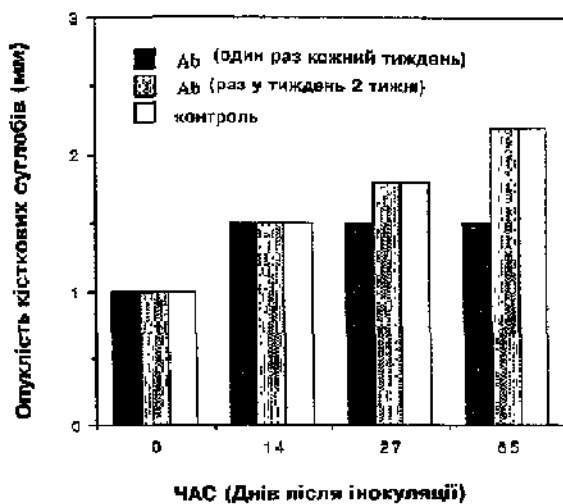
44761



Фіг. 5



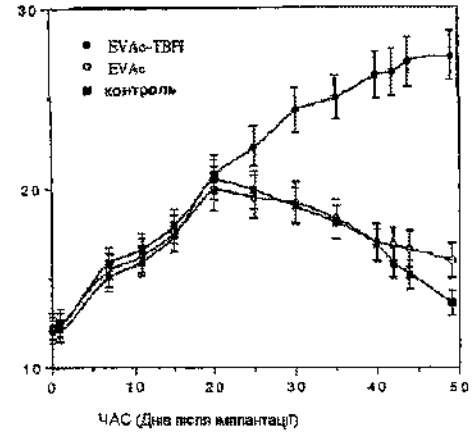
Фіг. 6



Фіг. 7

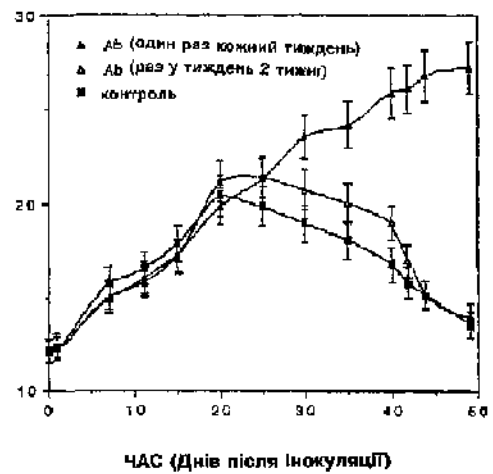
22

Усереднена вага групи (гр)



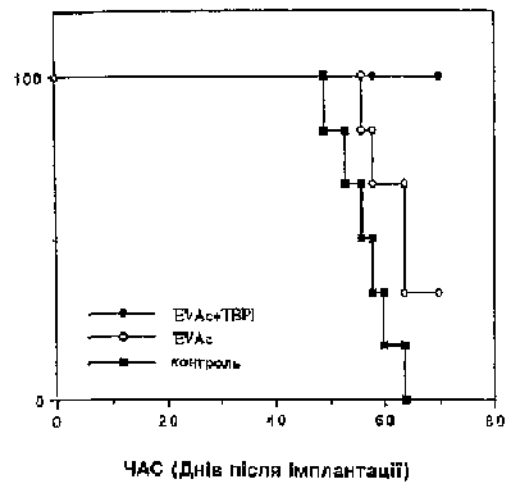
Фіг. 8

Усереднена вага групи (гр)

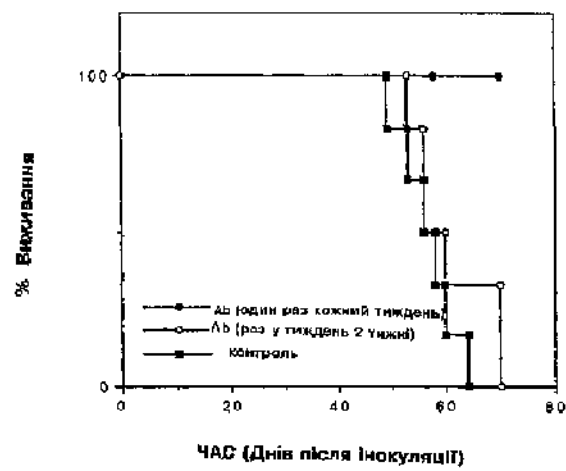


Фіг. 9

% Висихання



Фіг. 10



Фіг. 11