



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 48980

(13) C2

(51) 6 C07H1/00, C07H13/02, A61K31/725,
A61K31/73МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ГЕЛЕПОДІБНОЇ КОМПОЗИЦІЇ ПОПЕРЕЧНО ЗШИТОГО БІОЛОГІЧНО СУМІСНОГО ПОЛІСАХАРИДУ, КОМПОЗИЦІЯ НА ЙОГО ОСНОВІ**

1

(21) 98020826
(22) 28 05 1996
(24) 16 09 2002
(86) PCT/SE96/00684, 28 05 1996
(31) 08/503,323
(32) 17 07 1995
(33) US
(46) 16 09 2002, Бюл. № 9, 2002 р
(72) Огеруп Бенгт, SE
(73) К МЕД АБ, SE
(56) EP, A1, 0203049, 26 11 1986 US, A, 5128326, 07 07 1992 US, A, 4863907, 05 09 1989
(57) 1 Спосіб одержання гелеподібної композиції поперечно зшитого біологічно сумісного полісахариду, який відрізняється тим, що включає такі стадії
- приготування водного розчину полісахариду, що поперечно зшивається,
- ініціювання реакції поперечного зшивання вказаного полісахариду в присутності поліфункціонального агента, що забезпечує зшивання полісахариду,
- забезпечення стеричних перешкод реакції поперечного зшивання до її завершення перед стадією гелеутворення з одержанням активованого полісахариду і продовження реакції поперечного зшивання активованого полісахариду шляхом усунення стеричних перешкод для вказаного активованого полісахариду, для завершення його поперечного зшивання аж до в'язкопружного гелю
2 Спосіб згідно з п. 1, який відрізняється тим, що полісахаридом є глюкозаміноглюкан
3 Спосіб згідно з п. 2, який відрізняється тим, що глюкозаміноглюканом є палуронова кислота
4 Спосіб згідно з будь-яким із пп. 1-3, який відрізняється тим, що агент для поперечного зшивання вибирають із групи, яка складається із епоксидів, поліазиридильних сполук та гліцидилових естерів
5 Спосіб згідно з п. 4, який відрізняється тим, що вказаним гліцидиловим естером є дигліцидиловий естер 1,4-бутандіолу
6 Спосіб згідно з будь-яким із пп. 1-5, який відрізняється тим, що забезпечення стеричних перешкод реакції поперечного зшивання включає розведення водного розчину полісахариду, що поперечно зшивається, із зниженням його концентрації у вказаному розчині

2

7 Спосіб згідно з будь-яким із пп. 1-6, який відрізняється тим, що усунення стеричних перешкод для проведення реакції поперечного зшивання включає упарювання водного розчину полісахариду, що поперечно зшивається, з підвищенням його концентрації у вказаному розчині
8 Спосіб згідно з будь-яким із пп. 1-6, який відрізняється тим, що усунення стеричних перешкод для проведення реакції поперечного зшивання включає діаліз водного розчину полісахариду, що поперечно зшивається
9 Спосіб згідно з будь-яким із пп. 1-8, який відрізняється тим, що ініціювання реакції поперечного зшивання у присутності поліфункціонального агента проводять при лужному рН, переважно при рН вище 9, для полегшення реакції поперечного зшивання з утворенням етерів
10 Спосіб згідно з будь-яким із пп. 1-8, який відрізняється тим, що ініціювання реакції поперечного зшивання у присутності поліфункціонального агента проводять при кислотному рН, переважно при рН 2-6, для полегшення реакції поперечного зшивання з утворенням естерів
11 Спосіб згідно з будь-яким із пп. 1-10, який відрізняється тим, що стеричні перешкоди реакції поперечного зшивання створюють ще до того, як витратиться агент, що забезпечує поперечне зшивання
12 Спосіб згідно з будь-яким із пп. 1-11, який відрізняється тим, що в гелеподібну композицію полісахариду, що поперечно зшивається, додатково вводять біологічно активну речовину шляхом її розчинення або диспергування в активованому полісахариді перед усуненням стеричних перешкод для продовження реакції зшивання вказаного полісахариду, причому, введення біологічно активної речовини переважно проводять при фізіологічних умовах
13 Спосіб згідно з п. 12, який відрізняється тим, що перед усуненням стеричних перешкод для продовження реакції зшивання вказаного полісахариду в гелеподібну композицію полісахариду, що поперечно зшивається, додатково вводять клітини, причому, введення клітин переважно проводять при фізіологічних умовах
14 Спосіб згідно з будь-яким із пп. 12 - 13, який відрізняється тим, що вказану біологічно активну

(13) C2
(11) 48980
(19) UA

речовину вибирають із групи, яка складається з гормонів, цитокінів, вакцин та речовин для нарощування тканин

15 Спосіб згідно з п. 14, який відрізняється тим, що вказана речовина для нарощування тканин є полімером, обраним із групи, яка складається з колагену, крохмалю, декстраномеру, полілактиду та його співполімерів, полі-β-гідроксибутирату та його співполімерів

16 Спосіб згідно з п. 14, який відрізняється тим, що вказаний гормон вибирають з групи, яка включає еритропоєтин та кальцитонін

17 Спосіб згідно з будь-яким із пп. 12-16, який відрізняється тим, що вказана біологічно активна речовина містить функціональні групи, які здатні реагувати з полісахаридом і яка розподілена в гелі і хімічно зв'язана з ним

18 Спосіб згідно з п. 17, який відрізняється тим, що вказана біологічно активна речовина містить функціональні групи, які реагують з агентом, що забезпечує поперечне зшивання вказаного полісахариду в процесі одержання гелеподібної композиції поперечно зшитого біологічно сумісного полісахариду

19 Гелеподібна композиція частково поперечно зшитого біологічно сумісного активованого

полісахариду, одержаного згідно зі способом за будь-яким із пп. 1-18, який переривають на стадії продовження реакції поперечного зшивання активованого полісахариду за рахунок усунення стеричних перешкод реакції поперечного зшивання

20 Гелеподібна композиція поперечно зшитого біологічно сумісного полісахариду, одержаного згідно зі способом за будь-яким із пп. 1-18

21 Композиція згідно з п. 20, яка відрізняється тим, що одержана згідно зі способом за будь-яким із пп. 2-11

22 Композиція згідно з будь-яким із пп. 20-21, яка відрізняється тим, що містить біологічно активну речовину і одержана згідно зі способом за будь-яким із пп. 12-18

23 Композиція згідно з будь-яким із пп. 20-22, яка відрізняється тим, що використовується як лікувальний або профілактичний засіб

24 Композиція згідно з будь-яким із пп. 20-22, яка відрізняється тим, що використовується як депо для лікувального або профілактичного засобу

25 Композиція згідно з будь-яким із пп. 23-24, яка відрізняється тим, що використовується для одержання лікувального або профілактичного засобу для нарощування тканин ссавця, зокрема людини

Галузь винаходу

Даний винахід стосується гелеподібної композиції поперечнозшитого біологічно сумісного полісахариду, а більш конкретно, нового способу поперечного зшивання таких композицій, у результаті якого одержують нову структуру гелю. Нова структура надає поліпшені властивості відомим раніше гелевим композиціям, а також дає можливість нових використань вказаних композицій, як самих по собі, так і таких, що вміщують активні інгредієнти.

Передумови винаходу

Гелі, які зв'язують воду, широко використовуються в біології та медицині. Їх зазвичай одержують шляхом поперечного зшивання полімерів у безкінечні сітки. Коли використовують біологічно сумісні полімери, зазвичай необхідно використовувати низький ступінь поперечного зшивання для підтримки вказаної біологічної сумісності. Проте часто потрібен більш густий гель, щоб одержати відповідну дію використовуваних активних інгредієнтів, і в такому випадку біологічна сумісність часто втрачається.

Другою цінною властивістю гелів, які зв'язують воду, або гідрогелів є те, що в них можуть міститися пептиди та біологічні речовини більшого розміру для утворення композиції з уповільненим вивільненням. Проте при забезпеченні достатнього часу утримування активного інгредієнта виникають практичні проблеми, оскільки зазвичай активний інгредієнт вивільнюється з тією ж швидкістю, із якою він розчиняється або включається у згадану композицію. Більш того, якщо такий гель ущільнюють при спробі утримати активний інгредієнт протягом більш довгого часу, він швидко розбухає

у тваринній тканині, де існує вільний доступ води.

Гіалуронова кислота є однією з біологічно сумісних полімерів, яка широко використовується у медицині. Оскільки вона присутня в ідентичних композиціях у кожному живому організмі, вона дає мінімальні побічні реакції і робить можливим більш широкий діапазон медичних застосувань. В наслідок цього, вона є об'єктом багатьох спроб модифікації. Так, її поперечнозшивають з агентами, такими як альдегди, епоксиди, поліазиридилени сполуки і дивінілсульфон (Laurent et al. *Acta Chem Scan* 18 (1964) № 1, p. 274, Європейський патент 0161887B1, Європейський патент 0285116A2, та патент США 4716154).

У заявці WO87/07898 описується взаємодія полісахариду з поліфункціональним епоксидом, вилучення надлишку вказаного епоксиду і, нарешті, операцію сушіння для поперечного зшивання вказаного полісахариду в плівку, порошкоподібний матеріал або подібний сухий продукт. Проте не існує пропозицій розбавляти активований полісахарид і потім повторно концентрувати його до бажаної густоти або консистенції, яка потім є по суті постійною.

У патенті США 5128326 описується ряд модифікованих гіалуронових кислот для використання в якості депо лікарських засобів. Описані способи доставки препаратів на основі гелю, що ґрунтуються на дифузії активного інгредієнта усередину гелю, а потім вивільнення його з тією ж постійною швидкістю дифузії. На противагу цьому даний винахід включає розчинення активного інгредієнта з наступним ущільненням або концентруванням гелевої композиції доти, поки не буде мати місце ніяка дифузія, або дуже повільна дифузія вказано-

го активного інгредієнта

У патенті США 5399351 описуються гелеві суміші і розчини полімерів, при цьому вказані розчини використовують для поліпшення реологічних властивостей гелю. Проте також і в цьому випадку, описуються гелі здатні до зворотного відтворення, як можна зрозуміти, наприклад, із колонки 6, рядки 53 - 58

Стислий опис винаходу

Згідно з даним винаходом з'ясувалося, що гелеподібні композиції полісахариду, які мають нову структуру, і тому - нові визначні властивості можуть бути отримані шляхом використання нової методики їхнього поперечного зшивання. Вказана нова методика поперечного зшивання робить можливим легке керування структурою і властивостями одержуваної гелеподібної композиції полісахариду, що, у свою чергу, забезпечує конструювання кінцевої композиції з бажаними властивостями

Більш конкретно, однією з цілей даного винаходу є створення способу одержання поперечнозшитого полісахаридного гелю, біологічна сумісність якого може зберігатися, незважаючи на високий ступінь поперечного зшивання або полімеризації

Другою ціллю даного винаходу є створення гелеподібної композиції полісахариду з в'язкоеластичними властивостями замість гелю, який є поперечнозв'язаним з поперечнозшитим полісахаридом, до достатнього ступеня

Ще однією ціллю даного винаходу є створення гелеподібної композиції полісахариду, яка є більш або менш незворотно ущільненою або концентрованою, тобто, яка по суті не набухає, або набухає тільки до обмеженого ступеня, коли знаходиться у контакті з водою

Ще однією ціллю даного винаходу є створення гелеподібної композиції полісахариду, що включає біологічно активну речовину, для використання в якості композиції з уповільненим вивільненням або композицій депо

Іншою ціллю даного винаходу є створення гелевих композицій полісахариду, які включають велику кількість біологічно активних речовин для використання в якості лікарських або профілактичних композицій для різних цілей

Ще однією ціллю даного винаходу є застосування композицій, які згадуються тут, для одержання лікарських або профілактичних композицій, а також для введення осавцям, зокрема - людям

Ще однією ціллю даного винаходу є створення гелеподібної композиції частково поперечнозшитого активованого полісахариду, одержуваної в якості проміжної речовини у вказаному вище способі за даним винаходом, вказана проміжна сполука може, зрештою, бути поперечнозшитою *in situ* у будь-якому бажаному місці

Ці та інші цілі даного винаходу стануть зрозумілими за допомогою більш докладного опису, приведеного нижче

Докладний опис винаходу

Згідно з одним із аспектів даного винаходу розроблений спосіб одержання гелеподібної композиції поперечнозшитого біологічно сумісного полісахариду, де вказаний спосіб включає

приготування водного розчину полісахариду, що поперечно зшивається,

ініціювання реакції поперечного зшивання вказаного полісахариду в присутності поліфункціонального агента, що забезпечує зшивання полісахариду,

забезпечення стеричних перешкод реакції поперечного зшивання до її завершення перед стадією гелеутворення з одержанням активованого полісахариду і продовження реакції поперечного зшивання активованого полісахариду шляхом усунення стеричних перешкод для вказаного активованого полісахариду, для завершення його поперечного зшивання аж до в'язкопружного гелю

Іншими словами, новий спосіб даного винаходу включає поперечне зшивання розчинного у воді поперечнозшитого полісахариду, принаймні, у дві стадії, де реакція поперечного зшивання переривається перед тим, як ініціюється гелеутворення, вказане переривання здійснюють шляхом стеричного утруднення вказаної реакції поперечного зшивання. Реакція поперечного зшивання потім продовжується на другій стадії за допомогою повторного усунення стеричних перешкод

Таким чином, по-перше, було з'ясувалося, що шляхом вказаних стеричних перешкод утворюється активований полісахарид, поперечне зшивання або полімеризація якого можуть бути продовжені шляхом повторного усунення стеричних перешкод. Крім того, було також з'ясувалося, що гелеподібна композиція полісахариду, отримана при цьому, не утворює компакту, щільну структуру, яка була б отримана при проведенні відповідної реакції поперечного зшивання в одну стадію до цілком поперечнозшитого гелю, але скоріше - в'язкогустий гель. Крім того, як вказано вище, нова структура гелю, що одержується за даним винаходом, являє собою по суті необоротну структуру гелю, яка не набрякає до якогось помітного ступеня при контакті з водою або будь-яким іншим водним середовищем. Звичайно це означає, що вказане повторне набрякання є меншим ніж 10% від об'єму, відносно до об'єму гелю після одержання за вказаним способом

Хоча даний винахід не пов'язаний із будь-якою теорією, може бути, що нова структура, одержана за даним винаходом, є скоріше сполученням поперечного зшивання між існуючими полімерними ланцюгами і подовження існуючих ланцюгів, ніж дуже густою сіткою, яка дає дуже жорстку структуру. Те, що може змусити припустити такий механізм, є тим фактом, що за даним винаходом можна одержати в'язкогустий продукт

Термін "стерична перешкода реакції поперечного зшивання", як він тут використовується, повинен інтерпретуватися у широкому змісті, тобто це не повинно бути повне утруднення, але у багатьох випадках згадується скоріше часткове утруднення реакції. Тобто, важливим є те, що швидкість поперечного зшивання істотно зменшується, щоб зробити можливим, якщо залучаються нові центри реакції на кінцевій реакції поперечного зшивання

Подібно цьому, термін "усунення стеричних перешкод" також повинен інтерпретуватися широко, що звичайно означає, що вказані стеричні перешкоди не повинні обов'язково бути точно тими ж

сторичними перешкодами, які використовують при ініціюванні реакції поперечного зшивання. Таким чином, що зазвичай є важливим, так це те, що вказане усунення сторичних перешкод призводить до збільшення швидкості реакції порівняно із системою з сторичними перешкодами.

Стеричні перешкоди реакції поперечного зшивання можуть забезпечені різними шляхами, але кращим виконанням даного винаходу для даного винаходу є розведення водного середовища, у якому проводять реакцію поперечного зшивання, для досягнення більш низької концентрації полісахариду у вказаному середовищі.

Для повторного введення сторичних перешкод також можуть бути використані різні шляхи, але кращим виконанням у цьому відношенні є випадок, який включає випарювання водного середовища, у якому здійснюють реакцію поперечного зшивання, для досягнення більш високої концентрації полісахариду у вказаному середовищі, інше краще виконання у цьому відношенні представлено випадком, який включає діаліз водного середовища, у якому провадять реакцію поперечного зшивання.

За кращим виконанням даного винаходу стерична перешкода реакції поперечного зшивання провадиться перед тим, як буде спожитий агент для поперечного зшивання. Це, у свою чергу, звичайно також означає, що повторне усунення стеричних перешкод ініціюється в присутності вказаного не спожитого агента для поперечного зшивання.

Стерична перешкода реакції поперечного зшивання може звичайно починатися або провадитися у межах 50 - 90% від загального часу гелеутворення, що використовується в способі за даним винаходом, при цьому також повинні братися до уваги відповідна еластичність або консистенція для передбачуваної до використання композиції.

Даний винахід повинен бути придатним до будь-якого біологічно сумісного полісахариду, який є поперечнозшитим і розчинним у водному середовищі. Таким чином, термін "водорозчинний" повинен інтерпретуватися у широкому змісті, необов'язково є необхідною чиста вода. Тобто водний розчин означає будь-який розчин, де вода є головним компонентом. Кращою підгрупою полісахаридів у зв'язку з даним винаходом є глюкозаміноглюкани, із яких палуронова кислота є особливо цікавим випадком.

Агент для поперечного зшивання, який може бути використаний у зв'язку з даним винаходом, є будь-яким раніше відомим агентом для поперечного зшивання, придатним для використання в зв'язку з полісахаридами, при цьому, приймаючи до уваги те, щоб були виконані необхідні умови біологічної сумісності. Краще, проте, агент для поперечного зшивання вибирають із групи, яка містить альдегіди, епоксиди, поліазиридильні сполуки, гліциділові ефіри та дивінілсульфони. З них гліциділові естери представляють особливо кращу групу, із них 1,4-бутандіолдигліциділовий естер може бути згаданий як кращий приклад. У цьому зв'язку потрібно також зауважити, що "поліфункціональний" включає дифункціональний.

Початкову реакцію поперечного зшивання у присутності поліфункціонального агента для попе-

речного зшивання можна проводити при різних значеннях рН, в залежності від того, чи повинні утворюватися естери або етери. Переважно це означає, що вказана реакція поперечного зшивання проводиться при лужних рН, зокрема, при рН вище, ніж 9, наприклад, у межах рН 9 - 12, якщо полегшується утворення етеру. Якщо полегшується утворення естерів, вказана реакція поперечного зшивання переважно проводиться при кислотних рН, зокрема, при рН 2 - 6.

Один із цікавих аспектів даного винаходу представлений випадком, де отримана гелеподібна композиція поперечнозшитого полісахариду використовується сама по собі, оскільки даний винахід робить можливим одержання в'язкогустої композиції. Така в'язкогуста композиція є, наприклад, придатною для використання в хірургії ока, в якості заміни синавіальної рідини, у вигляді крапель для очей, тощо, і, як згадувалося вище, даний винахід робить можливим зміню в'язкогустих властивостей для таких застосувань. Таким чином, при застосуванні сторичної технології за даним винаходом є можливим одержання подовження ланцюгів, розгалуження ланцюгів, поперечного зшивання тощо, більш керованим шляхом, ніж за допомогою раніше використаних технологій із більш-менш неупорядкованого розташованими центрами зшивання.

Крім того, завдяки тому факту, що гелі отримані за даним винаходом не зберігають свій початковий об'єм в присутності водного середовища, нові продукти не викликають ніякого втручання або негативних об'ємних ефектів при цих або інших медичних застосуваннях.

За даним винаходом є також можливим включення в композиції полісахаридного гелю будь-якої біологічно активної речовини, для якої є бажаним або прийнятним носій із полісахаридного гелю. У цьому зв'язку технологія розведення - концентрування, яка використовується у способі за даним винаходом, робить можливим включення вказаної біологічно активної речовини перед усуненням впливу на полісахарид стеричних перешкод. Тобто, хоча стеричні перешкоди зазвичай означають операцію концентрування, така операція означає, що біологічно активна речовина буде присутньою у фазі, яка є більш компактною, ніж тоді, коли вказану речовину включають у вказаний носій, іншими словами, біологічно активна речовина може утримуватися набагато довше у порівнянні з раніше відомими реакціями поперечного зшивання гелю. Тим самим може бути отриманий кращий тимчасовий профіль уповільненого вивільнення для активної речовини.

У зв'язку з включенням біологічно активної речовини у композицію бажано забезпечити фізіологічне значення рН та сольові умови для одержання препарату, готового для медичного застосування. Таке доведення до фізіологічних умов є кращим також у тому, що стосується умов реакції, якщо виявляється, що друга стадія процесу добре проводиться за таких умов.

У будь-якому відношенні даний винахід не повинний обмежуватися біологічно активною речовиною, у порівнянні з використанням вказаної речовини у раніше відомих випадках, іншими

словами, стан, що підлягає лікуванню, повинен бути вирішальним для конкретної речовини, яку необхідно вибрати

Проте цікаві речовини в зв'язку з даним винаходом можуть бути вибрані з групи, яка включає гормони, цитокіни, вакцини, клітини та речовини для нарощування тканин. Таким чином, унікальне сполучення властивостей нової гелеподібної композиції за даним винаходом дає їй виняткові переваги у поєднанні з цими речовинами, тобто, насамперед, завдяки видатним властивостям депо або уповільненого вивільнення і властивостям не набрякання.

Так, однієї з цікавих груп біологічно активних сполук є речовини для нарощування тканин, оскільки полісахаридний гель має ряд переваг носія для них. Додаткові деталі щодо цих продуктів можна знайти у заявці WO 94/21299. Більш конкретно, кращою речовиною для нарощування тканин є полімер, вибраний з колагену, крохмалю, декстраномеру, полілактиду та його співполімерів, та полі-β-гидроксibuтирату та його співполімерів.

Серед гормонів кращими є еритропоєтин та кальцитонін.

Спосіб за даним винаходом також робить можливим включення біологічно активної речовини за допомогою хімічної реакції зі структурою полісахаридного гелю або з його агентом для поперечного зшивання, за умови, що вказана активна речовина містить функціональні групи, які можуть реагувати з ними. Тим самим можуть бути отримані унікальні властивості або сполучення властивостей, оскільки в такому випадку, наприклад, швидкість вивільнення активного інгредієнта буде визначатися скоріше деградацією або розкладанням полімерної сітки, ніж розчиненням або швидкістю міграції згадуємої речовини із сітки гелю.

Модифікація останньої технології за даним винаходом означає, що функціональні групи активної речовини можуть попередньо взаємодіяти з агентом для поперечного зшивання для полісахариду. Переважно використовують той же самий агент для поперечного зшивання, як той який використовують при поперечному зшиванні полісахариду.

Оскільки спосіб за даним винаходом вказує нову композицію або структуру полісахаридного гелю, інший аспект даного винаходу представлений отриманою новою гелеподібною композицією полісахариду. У цьому відношенні область дії винаходу вказує не тільки гелеподібну композицію полісахариду, яким-небудь чином отриману за допомогою вказаного способу, але також будь-яку гелеподібну композицію полісахариду, яку можна одержати за допомогою подібної технології.

Викладений іншим чином даний винахід також включає композицію поперечнозшитого біологічно сумісного полісахаридного гелю, який може бути отриманий у дві стадії шляхом поперечного зшивання поперечнозшиваємого полісахариду з його поліфункціональним агентом для поперечного зшивання, при цьому перша стадія поперечного зшивання завершується перед тим, як здійснюється гелеутворення, за допомогою сторичних перешкод реакції поперечного зшивання, а друга стадія поперечного зшивання ініціюється шляхом повто-

рного усунення стеричних перешкод для вказаної реакції поперечного зшивання для П продовження аж до в'язкогустого гелю.

Всі ці деталі, які рекомендуються як кращі або цікавлячи деталі в сполученні зі способом даного винаходу, можуть бути застосовані також до вказаної композиції полісахаридного гелю як такі, і не потребують повторень.

Ще один аспект даного винаходу представлений випадком, де проміжний продукт одержують шляхом переносу кінцевої стадії реакції поперечного зшивання із усуненими стеричними перешкодами на більш пізню стадію або місце, наприклад, на кінцеве використання композиції. Таким чином, виявлено, що проміжний продукт, одержуваний після стеричного утруднення реакції поперечного зшивання, має таку стабільність, що реакція поперечного зшивання може бути проведена на більш пізній стадії.

Даний винахід також стосується вказаної вище композиції для використання в якості лікарської або профілактичної композиції.

Іншим аспектом даного винаходу є використання вказаної композиції для одержання лікарської або профілактичної композиції для будь-якої із вказаних вище медичних або терапевтичних цілей, нарощування тканини або лікування гормонами ссавців, зокрема людей, що є кращими застосуваннями.

Нарешті, даний винахід стосується способу медичного або профілактичного лікування ссавців, зокрема, людей, який включає введення композиції, вказаної вище, ссавцю якому потрібне таке лікування.

ПРИКЛАДИ

Нижче даний винахід буде проілюстровано за допомогою наведених далі необмежуваних прикладів.

Приклад 1

Активация прикладу

а В лужних умовах

10г палуронової кислоти (полісахарид), яка отримана шляхом ферментації *Streptococcus*, розчиняють у 100мл 1% NaOH, pH > 9. Додають агент для поперечного зшивання 1,4-бутандіолдигліцидифір до концентрації 0,2%. Розчин інкубують при 40°C протягом 4 годин.

б В кислотних умовах

Експеримент проводять як у п 1а, але при кислотному pH біля 2 - 6, шляхом додавання 1% оцтової кислоти до розчину замість NaOH згідно з п 1а.

Приклад 2

Одержання в'язкогустого гелю

Інкубати відповідно до п п 1а і 1б розбавляють до об'єму, який складає два кінцеві бажаних об'єми, або біля 0,5 - 1%, і нейтралізують, потім гель випарюють на роторному випарнику до одержання в'язкогустого гелю.

Приклад 3

Одержання гелю, який містить декстраномерні частинки

Інкубати відповідно до п п 1а та 1б розбавляють до міцності в 1% і розчин перемішують з 20г сухих декстраномерних частинок (Sephadex®25, Pharmacia), при цьому частинки включаються

шляхом поперечного зшивання полімеру папуринової кислоти через кілька хвилин внаслідок концентрування папуринової кислоти, яке досягається шляхом адсорбції води кульками декстраномеру

Отримані в'язкогусті гелі є стабільними, стійкими при автоклавній обробці і доступними для введення шляхом ін'єкції за допомогою тонких голів для підшкірних ін'єкцій

Приклад 4

Одержання гелю для використання в якості лікарського депо, яке містить еритропоєтин (EPO)

Інкубат, отриманий у прикладі 1а, розбавляють до міцності в 1%, і встановлюють рН шляхом додавання цитратного буфера відповідно до інструкцій виробника (Ortho Biotech Inc., Raritan USA) для поліпшення стабільності у водянному розчині 5×10^6 м.о. EPO додають при перемішуванні. При упарюванні розчину до 1/4 об'єму полімер поперечно зшивається з композицією депо, і одержують 20000 м.о. EPO/мл

Приклад 5

Одержання гелю для використання в якості препарату депо, який містить кальцитонін

Кальцитонін із лососа, 100 м.о. /мл (Miacalcin^(R) Sandoz), змішують із 2% розчином полімеру, отриманого відповідно до прикладу 1б, і розчин концентрують до 5% (250 м.о. /мл) шляхом упарювання на ротаторному випарнику. Коня із хронічною кульгавістю правої передньої ноги лікують ін'єкцією 2 мл підшкірно в тиждень протягом двох тижнів. Протягом шести тижнів після лікування вказаний кінь вільний від болю. Рівень кальцію в сироватці крові знижується тільки на 12%

Приклад 6

Одержання гелю, який містить гепарин, що повільно вивільняється

У розведеному активованому полімері відповідно до прикладу 4 розчиняють гепарин у кількості 5% від полімеру. Отриману суміш врівноважують протягом 1 години, при цьому її упарюють до 1/4 об'єму. Вивільнення, яке інгібує коагуляцію, із неї відзначають протягом 16 днів інкубації у фізіологічному сольовому розчині

Приклад 7

Одержання гелю з ковалентне зв'язаним гепарином у стерично керованому положенні

Активованій полімер відповідно до прикладу 1 осаджують у метанолі при енергійному перемішуванні. Отриманий дрібнодисперсний осад сушать протягом ночі. Гепарин активують відповідно до прикладу 1. Після вказаної інкубації (4 години при 40°C) осад полімеру змішують із розчином активованого гепарину. Суміш інкубують протягом ночі і на протязі наступного дня, розчин гелю нейтралізують, осаджують і промивають від залишків реагентів. Отриманий гель спроможний зв'язувати чинник росту, між іншим, головний чинник росту фібробластів (bFGF), але не виявляє ніякого інгібування коагуляції суцільної крові

Приклад 8

Одержання гелю, який містить позитивно заряджені групи хітозану

Інкубацію суміші 7,5 г полімеру папуринової кислоти та 2,5 г хітозану (See Cure[®] Protan) одержують відповідно до прикладу 1. Після розчинення і

нейтралізації одержують співполімеризований в'язкоеластичний розчин. Вказаний розчин має властивості прискорення загоєння ран, після того, як його наносять на рану, яка повільно гоїться

Приклад 9

Одержання гелю, який стерично зшивають

7,5 г папуринової кислоти активують відповідно до прикладу 1а. Тим же способом активують 2,5 г декстрану. Хіалуринову кислоту осаджують у метанолі, осад потім змішують із 500 мл розведеного активованого 0,5% розчину декстрану. Після перемішування і встановлення рН і концентрації солі одержують в'язкогустий розчин. 5 мл вказаного розчину впливають усередину ахіллесова сухожипля, яке виявляє повторюване запалення у формі свищів та "поскрипування". Через чотири тижні вказані проблеми з ахіллесовим сухожиллям пропадають

Приклад 10

Одержання гелю для використання в якості лікарського депо, яке містить GM-CSF

Продукт одержують відповідно до прикладу 5, але замість кальцитоніну додають чинник, який стимулює ріст колоній макрофагів гранулоцитів, GM-CSF (Leucotax[®]), 1 мг/г полімеру

Приклад 11

Одержання гелю, який містить вбиті віруси грипу типу А2

Препарат одержують як у прикладі 4, але замість EPO додають 40960 HAU вбитого вірусу грипу коня на 100 мл розведеного активного 1% розчину полімеру. Після зменшення об'єму 4х препарат містить 1600 HAU на мл. Шляхом вакцинації більш ніж 100 коней у зв'язку з епідемією грипу, препарат, як виявлено, є високоефективним для захисту від інфекції, цей захист підтримується протягом тривалого часу (більш ніж 6 місяців)

Приклад 12

Одержання свіжого гелю, який містить суспензію живих клітин

5 мл культури фібробластів змішують із 100 мл нейтралізованого розчину відповідно до прикладу 1а. Суміш оксигенують і висушують до половини об'єму. Одержують в'язкогустий розчин, який містить живі клітини

Приклад 13

Одержання мікронних частинок густого гелю, який містить малі пептиди

До активованого нейтралізованого гелю відповідно до прикладу 1а додають 5 мг пептиду, який має 12 амінокислот. Гель упарюють при перемішуванні до 10% і суспендують у мінеральному маслі. Після додавання метанолу сухі частинки гелю відфільтровують і промивають до чиста від залишків масла

Приклад 14

Одержання гелю, який містить частинки густого гелю мікронних розмірів із малими пептидами відповідно до прикладу 13

До 1% розчину нейтралізованого полімеру, активованого відповідно до прикладу 1а, додають мікросфери з прикладу 13. Потім гель упарюють до половини його об'єму. Одержують однорідний, придатний для ін'єкцій і стабільний гель, що містить дрібнодисперсні мікросфери

Приклад 15

Одержання гелю, який містить сферичні частинки поліметилметакрилату (ПММА), які мають розмір у 40 - 120 нм

До 5г полімеру, розведеного до 1%, і нейтралізованого та активованого відповідно до прикладу 1а, додають 100мг сфер із поліметилметакрилату ПММА. Упарювання полімерного гелю до 3% дає стабільний в'язкогустий гель, придатний для ін'єкції

Приклад 16

Одержання гелю, який містить фрагменти ПММА в 500нм до яких доданий гідрофобний антиген

Антиген гемаглютиніну, отриманий із вірусів А2 відповідно до прикладу 11, адсорбується за допомогою гідрофобної взаємодії на 500нм частинках ПММА. Вказані частинки додають до 1% розчину відповідно до прикладу 15, і здійснюють зменшення об'єму до половини. Одержують стабільний гомогенний в'язкогустий гель, який є придатним для використання в якості вакцини, яка має високу підтримуючу дію

Приклад 17

Порівняння по ступені повторного набрякання при вільному доступі води гелей, отриманих звичайним шляхом, і гелей, отриманих за даним винаходом

Гелі з гіалуроновою кислотою, отримані відповідно до Laurent et al 1963 і відповідно до прикладів 1 і 2 вище, сушать до половини їхнього об'єму після набрякання. Потім їх повторно вводять у їхні вихідні розчини. Відомі раніше гелі набрякають до їхнього первісного об'єму, при цьому композиції гелей відповідно до даних прикладів 1 і 2 набрякають тільки незначно (10%)

Приклад 18

Порівняння біологічної активності ЕРО, співполімеризованого з гіалуроновою кислотою до гелю, і гелю відповідно до прикладу 1, у який ЕРО включають шляхом концентрування вказаного гелю

Четверо пацієнтів, яких лікують Епрех® (CILAG) від їхньої анемії, викликаного хронічною уремією, лікують протягом двох місяців по одній дозі на місяць згідно з таким режимом

Пацієнт №	1	2	3	4
Доза,	60000	70000	70000	50000

мо				
Місяць 1	Депозит, пряме гелеутворення	Депозит, пряме гелеутворення	Контроль	Контроль
Місяць 2	Контроль	Контроль	Концентрований	Концентрований

Депозит, пряме гелеутворення. Епоксидне поперечне зшивання при сприятливих умовах відповідно до прикладу 11 у присутності ЕРО

Контроль. ЕРО розчиняють у 4% гіалуронової кислоти з МВ біля 6×10^6 із півнячих гребнів, отриманих згідно з патентом США 4141973 (Healon® Pharmacia)

Концентрований. ЕРО вводять в активований гель, де гелеутворення відбувається при концентруванні

Дозу вибирають як загальну дозу на місяць, яку звичайно потребує пацієнт для підтримки рівня гемоглобіну. Рівень ЕРО в сироватці крові аналізують через регулярні інтервали часу за допомогою імунохімічного методу

Результати

Звичайним способом вираження ефекту функціонування препаратів, які знаходяться в депозиті, є обчислення площі під кривою (одиниці ЕРО [дні]). Це дослідження також дає біологічну доступність у формі рівня гемоглобіну в крові, як 0 = постійний, + = збільшений і - = знижений

Таблиця

Пацієнт № / Місяць	1/1	1/2	2/1	2/2	3/1	3/2	4/1	4/2
Площа під кривою	41	424	57	534	224	952	567	656
Контроль гемоглобіну	-	+	-	+	0	+	+	+

Висновки

Введення ЕРО в депозит зі скороченим об'ємом дає найбільше можливе вивільнення під час аналізу. Спроби зробити реакцію гелеутворення при ЕРО руйнують гормони, так, що може реєструватися дуже низьке вивільнення