

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **033892**

(13) **B1**

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

- (45) Дата публикации и выдачи патента
2019.12.05
- (21) Номер заявки
201792487
- (22) Дата подачи заявки
2016.06.09
- (51) Int. Cl. *A61K 31/724* (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
A61K 31/715 (2006.01)
A61K 31/716 (2006.01)

(54) **КОМПОЗИЦИИ ГИДРОКСИПРОПИЛ-БЕТА-ЦИКЛОДЕКСТРИНОВ И СПОСОБЫ**

- (31) **62/173,889; 62/175,075; 62/189,114;
62/245,974; 62/249,876; 62/263,599;
62/276,728; 62/308,736; 62/314,765;
62/331,385; 62/345,721**
- (32) **2015.06.10; 2015.06.12; 2015.07.06;
2015.10.23; 2015.11.02; 2015.12.04;
2016.01.08; 2016.03.15; 2016.03.29;
2016.05.03; 2016.06.03**
- (33) **US**
- (43) **2018.06.29**
- (86) **PCT/US2016/036753**
- (87) **WO 2016/201137 2016.12.15**
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ВТЕСС, ИНК. (US)
- (72) Изобретатель:
**Махилсе Бернардус Николас, Дарлинг
Аллан (US)**
- (74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)
- (56) **US-A1-20010056080
US-A1-20110028432
US-A1-20040076591
WO-A1-2015087016
WO-A1-2014022841**

-
- (57) В описании предложены смеси молекул бета-циклодекстринов, замещенных в одном или более гидроксильных положениях гидроксипропильными группами, необязательно содержащие незамещенные молекулы бета-циклодекстрина, для применения в качестве фармацевтически активного ингредиента; способы получения таких смесей; способы оценки соответствия таких смесей требованиям для применения в фармацевтической композиции, подходящей для интратекального или интрацеребровентрикулярного введения; фармацевтические композиции, подходящие для интратекального или интрацеребровентрикулярного введения, содержащие такие смеси; и способы применения фармацевтических композиций для лечения болезни Ниманна-Пика типа С.
-

B1

033892

033892

B1

1. Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительных заявок на патент США №№ 62/345721, поданной 3 июня 2016 г.; 62/331385, поданной 3 мая 2016 г.; 62/314765, поданной 29 марта 2016 г.; 62/308736, поданной 15 марта 2016 г.; 62/276728, поданной 8 января 2016 г.; 62/263599, поданной 4 декабря 2015 г.; 62/249876, поданной 2 ноября 2015 г.; 62/245974, поданной 23 октября 2015 г.; 62/189114, поданной 6 июля 2015 г.; 62/175075, поданной 12 июня 2015 г.; и 62/173889, поданной 10 июня 2015 г., каждая из которых включена в настоящее описание посредством ссылки во всей ее полноте.

2. Положение, относящееся к исследованию или разработке, финансируемым из федерального бюджета

Данное изобретение было создано в рамках выполнения Соглашения о проведении совместных исследований и разработок с Национальными институтами здравоохранения США, Агентством Министерства здравоохранения и социального обеспечения США. Правительство Соединенных Штатов имеет определенные права на данное изобретение.

3. Уровень техники

Болезнь Ниманна-Пика типа С (БНПС) представляет собой лизосомную болезнь накопления липидов, вызываемую аутосомными рецессивными мутациями либо в гене NPC1, либо в гене NPC2. Ее симптомы обычно проявляются в перинатальном периоде и прогрессируют в течение жизни. Указанное нарушение часто включает неврологические симптомы, такие как мозжечковая атаксия, дизартрия, судороги, вертикальный паралич взора, нарушение двигательной функции, дисфагия, психотические эпизоды и прогрессирующая деменция, а также системные симптомы в других органах, таких как печень, селезенка или легкие. БНПС характеризуется как нарушение транспорта холестерина в клетке, хотя в головном мозге также происходит накопление других липидов, таких как ганглиозиды GM2 и GM3 (Vanier, 2010, *Orphanet Journal of Rare Diseases*, vol. 5: 16). В связи с различными клиническими проявлениями и течением заболевания БНПС1 обычно классифицируют как заболевание с началом в раннем детском возрасте (< 2 лет), началом в позднем детском возрасте (от 2 до <6 лет), началом в подростковом возрасте (от 6 до <15 лет) и началом в юношеском/взрослом возрасте (>15 лет).

Попытки лечения БНПС у людей были сосредоточены на субстрат-редуцирующей терапии, такой как подавление синтеза гликофинголипидов, например, с применением N-бутилдеоксиноджиримицина (миглулат, Завеска®), или на уменьшении степени накопления липидов в целом, в частности накопления холестерина и гликофинголипидов, посредством воздействия на механизмы выведения.

Было показано, что 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрины снижают избыточное накопление холестерина в клетках, имеющих мутацию в генах NPC (Abi-Mosleh, L. et al., *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 2009, vol. 106 (46), p. 19316-19321), что соответствует предшествующему сообщению о родственных циклодекстринах, способствующих выведению холестерина из цитоплазматической мембраны клеток (Rodal, S.K. et al., 1999, *Molecular Biology of Cell*, vol. 10, p. 961-974). Также было обнаружено, что гидроксипропил-бета-циклодекстрины оказывают благоприятное действие в моделях БНПС у животных. Например, сообщалось, что композиция, содержащая 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрины, восстанавливает нарушенный лизосомальный транспорт холестерина в печени и головном мозге мышей, нокаутных по гену *Npc1*, и приводит к увеличению продолжительности жизни этих мутантов по сравнению с продолжительностью жизни при отсутствии лечения (Liu, B. et al., 2009, *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, vol. 106 (7), p. 2377-2382; Davidson et al., 2009, *PLoS One* 4:e6951).

Различные композиции гидроксипропил-бета-циклодекстринов вводили пациентам с БНПС в Соединенных Штатах, Бразилии и Японии в рамках разрешения на применение из соображений гуманности, при этом сообщения о некотором улучшении различных признаков и симптомов были единичными. Однако слепые клинические исследования композиций гидроксипропил-бета-циклодекстринов для определения безопасности и эффективности не были завершены (Ottinger, E.A. et al., 2014, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 14 (3), p. 330-339). С учетом вероятности систематической ошибки наблюдателя в указанных единичных сообщениях существует потребность в контролируемых клинических исследованиях для подтверждения того, что гидроксипропил-бета-циклодекстрин обеспечивает клинический эффект.

Эффективное лечение БНПС потребует длительного интратекального или интрацеребровентрикулярного введения, начиная с младенчества, а композиции гидроксипропил-бета-циклодекстринов для парентерального применения, ранее используемые для введения пациентам-людям, содержат примеси, что делает их непригодными для длительного введения непосредственно в спинномозговую жидкость (СМЖ) младенцев и детей: пропиленгликоль, который считают ототоксичным; молекулы бета-циклодекстрина, не имеющие гидроксипропильных заместителей, которые, как известно, образуют осадки и обладают острой токсичностью (Muller and Brauns, 1985, *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 26, p. 77-88), и бактериальный эндотоксин, который обладает высокой провоспалительной активностью. Следовательно, существует потребность в фармацевтических композициях гидроксипропил-бета-циклодекстринов более высокой степени чистоты.

Кроме того, все существующие композиции гидроксипропил-бета-циклодекстринов для парентерального применения содержат сложные смеси соединений гидроксипропил-бета-циклодекстрина, имеющих различную степень замещения гидроксипропилом. Соотношения этих соединений в смеси значительно различаются у разных поставщиков и варьируют даже между партиями одного поставщика. Неизвестно, какой вклад эти различные соединения вносят в фармакологические эффекты сложной смеси. Следовательно, существует потребность в фармацевтических композициях гидроксипропил-бета-циклодекстринов, содержащих более точно определенные и тщательно контролируемые смеси таких соединений или характеризующихся характеристическими спектрами таких соединений.

Наконец, существует потребность в способах получения в промышленном масштабе в условиях, соответствующих требованиям GMP, фармацевтических композиций гидроксипропил-бета-циклодекстринов, подходящих для длительного интратекального или интрацереброваскулярного введения, содержащих низкие концентрации примесей и имеющих конкретный и структурно определенный состав.

4. Краткое описание

Авторы настоящего изобретения проанализировали исходные данные клинического исследования I фазы, в котором пациенты с болезнью НПС I типа получают лечение посредством интратекального введения 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрина ("ГПБЦД") с применением существующей композиции для парентерального применения Kleptose® HPB (Roquette). В этом нерандомизированном открытом одноцентровом исследовании, проводимом Национальным институтом здравоохранения (НИИ), Kleptose® HPB вводят когортам пациентов, ранее не получавших медикаментозного лечения, в возрастающих дозах путем люмбальной инъекции. В некоторые из своих исследований авторы настоящего изобретения также включали данные от трех пациентов, которым интратекально вводили Kleptose® HPB в качестве индивидуальных новых исследуемых лекарственных средств (INDs) в другом учреждении.

Исследования авторов настоящего изобретения подтвердили, что интратекальное введение Kleptose® HPB обеспечивает терапевтический эффект при болезни НПС I типа. Используя стандартный суммарный показатель эффективности, клиническую шкалу тяжести БНПС, у 7/15 пациентов наблюдали стабильное заболевание или улучшение течения заболевания в сравнении с 0/13 в когорте пациентов, у которых изучали естественное течение заболевания при отсутствии лечения. Используя новую комбинированную конечную точку, основанную на ретроспективном анализе результатов, авторы настоящего изобретения обнаружили, что 11/15 пациентов в исследовании демонстрировали стабильное заболевание или улучшение течения заболевания в отличие от только 4/13, демонстрировавших стабильное заболевание, в когорте с естественным течением заболевания.

Более подробный анализ, однако, показал, что в то время как интратекальное введение ГПБЦД улучшает некоторые признаки и симптомы болезни НПС I типа, оно лишь замедляет прогрессирование других и, как оказалось, парадоксальным образом ускоряет прогрессирование других симптомов. В частности, у пациентов, получавших Kleptose® HPB интратекально, по-видимому, была ускорена потеря слуха. Проведенный авторами настоящего изобретения анализ отдельных партий Kleptose® HPB показал, что этот продукт для парентерального применения содержит сложную смесь молекул бета-циклодекстринов, имеющих различную степень замещения, и неизвестно, какое из этих соединений вносит вклад в наблюдаемое улучшение, замедление прогрессирования и ускорение прогрессирования различных клинических проявлений.

Для подготовки к клиническим исследованиям, в которых ГПБЦД вводится непосредственно в спинномозговую жидкость в течение более длительных периодов времени и с более частым введением, авторы настоящего изобретения разработали способы снижения уровня пропиленгликоля, который предположительно является ототоксином; молекул бета-циклодекстрина, не имеющих гидроксипропильных заместителей, которые, как известно, образуют осадки, и бактериального эндотоксина, который обладает высокой провоспалительной активностью. Хотя разработанные способы были эффективны для снижения указанных примесей, авторы настоящего изобретения обнаружили, что абсорбционная хроматография на оксиде алюминия, используемая отдельно или в комбинации с осаждением растворителем, также изменяла характеристический спектр состава, по существу уменьшая количество молекул бета-циклодекстрина, содержащих единственный гидроксипропильный заместитель (DS-1), и уменьшая количество молекул бета-циклодекстрина, содержащих две гидроксипропильные группы (DS-2). Снижение содержания молекул с низкой степенью замещения (DS-0, как и предполагалось, и DS-1 и DS-2, непреднамеренно) увеличивало среднюю степень замещения (DS_a) смеси.

Неожиданно, несмотря на изменение характеристического спектра Kleptose® HPB, согласно оценке в экспериментах по определению профиля экспрессии генов *in vitro* не наблюдалось изменений в экспрессии генов, которые, как известно, вовлечены в метаболизм и транспорт холестерина. Это открытие позволит вводить более высокоочищенную и определенную по составу композицию ГПБЦД посредством интратекального или интрацереброваскулярного пути в СМЖ пациентов с болезнью НПС в течение более длительных периодов времени, необязательно с более частым введением, с обеспечением терапевтического эффекта и повышенной безопасности.

Соответственно в первом аспекте предложены смеси молекул бета-циклодекстринов, замещенных гидроксипропильными группами в одном или более гидроксильных положениях, необязательно содержащие незамещенные молекулы бета-циклодекстрина. Смесь содержит менее 1% незамещенного бета-циклодекстрина ("DS-0") и бета-циклодекстрина, замещенного одной гидроксипропильной группой ("DS-1"), в совокупности; по меньшей мере 85% бета-циклодекстрина, замещенного тремя гидроксипропильными группами ("DS-3"), бета-циклодекстрина, замещенного четырьмя гидроксипропильными группами ("DS-4"), бета-циклодекстрина, замещенного пятью гидроксипропильными группами ("DS-5"), и бета-циклодекстрина, замещенного шестью гидроксипропильными группами ("DS-6"), в совокупности; и менее 1% бета-циклодекстрина, замещенного девятью гидроксипропильными группами ("DS-9"), и бета-циклодекстрина, замещенного десятью гидроксипропильными группами ("DS-10"), в совокупности, как установлено по высоте пика на спектре, полученном методом масс-спектрометрии (МС) с ионизацией электрораспылением.

В некоторых вариантах реализации менее 0,1% смеси бета-циклодекстринов представляет собой DS-0 и DS-1 в совокупности. В некоторых вариантах реализации менее 0,01% смеси бета-циклодекстринов представляет собой DS-0 и DS-1 в совокупности. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере 87% смеси бета-циклодекстринов представляет собой DS-3, DS-4, DS-5 и DS-6 в совокупности. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере 90% смеси бета-циклодекстринов представляет собой DS-3, DS-4, DS-5 и DS-6 в совокупности. В некоторых вариантах реализации менее 0,1% смеси бета-циклодекстринов представляет собой DS-9 и DS-10 в совокупности. В некоторых вариантах реализации менее 0,01% смеси бета-циклодекстринов представляет собой DS-9 и DS-10 в совокупности.

В другом аспекте смесь содержит менее 1% незамещенного бета-циклодекстрина ("DS-0") и бета-циклодекстрина, замещенного одной гидроксипропильной группой ("DS-1"), в совокупности и менее 1% бета-циклодекстрина, замещенного девятью гидроксипропильными группами ("DS-9"), и бета-циклодекстрина, замещенного десятью гидроксипропильными группами ("DS-10"), в совокупности, как установлено по высоте пика на спектре, полученном методом МС с ионизацией электрораспылением, и смесь имеет среднее молярное замещение ("МЗ") в диапазоне от 0,50 до 0,80.

В некоторых вариантах реализации менее 0,1% смеси бета-циклодекстринов представляет собой DS-0 и DS-1 в совокупности. В некоторых вариантах реализации менее 0,01% смеси бета-циклодекстринов представляет собой DS-0 и DS-1 в совокупности. В некоторых вариантах реализации менее 0,1% смеси бета-циклодекстринов представляет собой DS-9 и DS-10 в совокупности. В некоторых вариантах реализации менее 0,01% смеси бета-циклодекстринов представляет собой DS-9 и DS-10 в совокупности. В различных вариантах реализации МЗ находится в диапазоне от 0,60 до 0,70. В некоторых из этих вариантов реализации МЗ находится в диапазоне от 0,64 до 0,68. В некоторых вариантах реализации МЗ составляет примерно 0,66-0,67.

В другом аспекте предложены фармацевтические композиции, содержащие смесь бета-циклодекстринов, описанную в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый разбавитель.

В некоторых вариантах реализации композиция содержит не более 0,5% пропиленгликоля, где указанное содержание измерено методом ВЭЖХ, приведенным в статье Фармакопеи США на гидроксипропилбетадекс. В некоторых вариантах реализации композиция содержит не более 0,01% пропиленгликоля, где указанное содержание измерено методом ВЭЖХ, приведенным в статье Фармакопеи США на гидроксипропилбетадекс. В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит не более ("НБ") 5 ЕЭ эндотоксинов на 1 г смеси бета-циклодекстринов. В конкретных вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит НБ 1,5 ЕЭ эндотоксинов на 1 г смеси бета-циклодекстринов. В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит не более 1 ppm пропиленоксида, где указанное содержание определено в соответствии со статьей Фармакопеи США на гидроксипропилбетадекс.

В типичных вариантах реализации фармацевтическая композиция является подходящей для интра-текального или интрацеребровентрикулярного введения. В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция имеет осмоляльность от примерно 300 до примерно 450 мОсм/кг. В некоторых вариантах реализации композиция содержит от примерно 10 до примерно 200 мг/мл смеси бета-циклодекстринов.

В другом аспекте фармацевтическая композиция содержит смесь молекул бета-циклодекстринов, замещенных в одном или более гидроксильных положениях гидроксипропильными группами, необязательно содержащую незамещенные молекулы бета-циклодекстрина, и разбавитель, который является фармацевтически приемлемым для интра-текального, интрацеребровентрикулярного или внутривенного введения. Композиция содержит не более ("НБ") 5 ЕЭ эндотоксинов на 1 г смеси бета-циклодекстринов, не более 0,5% пропиленгликоля, где указанное содержание измерено методом ВЭЖХ, приведенным в статье Фармакопеи США на гидроксипропилбетадекс, и не более 1 ppm пропиленоксида, где указанное содержание определено в соответствии со статьей Фармакопеи США на гидроксипропилбетадекс.

В некоторых вариантах реализации композиция содержит НБ 1,5 ЕЭ эндотоксинов на 1 г смеси бета-циклодекстринов. В некоторых вариантах реализации композиция содержит не более 0,01% пропиленгликоля, где указанное содержание измерено методом ВЭЖХ, приведенным в статье Фармакопеи

США на гидроксипропилбетадекс. В некоторых вариантах реализации смесь содержит менее 3% незамещенного бета-циклодекстрина ("DS-0"), бета-циклодекстрина, замещенного одной гидроксипропильной группой ("DS-1"), и бета-циклодекстрина, замещенного двумя гидроксипропильными группами ("DS-2"), в совокупности; по меньшей мере 65% бета-циклодекстрина, замещенного пятью гидроксипропильными группами ("DS-5"), бета-циклодекстрина, замещенного шестью гидроксипропильными группами ("DS-6"), и бета-циклодекстрина, замещенного семью гидроксипропильными группами ("DS-7"), в совокупности; и менее 3% бета-циклодекстрина, замещенного девятью гидроксипропильными группами ("DS-9"), и бета-циклодекстрина, замещенного десятью гидроксипропильными группами ("DS-10"), в совокупности, как установлено по высоте пиков на спектре, полученном методом МС с ионизацией электрораспылением.

В другом аспекте предложены способы лечения болезни Ниманна-Пика типа С, включающие введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции.

В типичных вариантах реализации композицию вводят интратекально или путем интрацеребровентрикулярного введения. В некоторых вариантах реализации способ включает введение пациенту от примерно 300 до примерно 2000 мг смеси бета-циклодекстринов. В некоторых вариантах реализации композицию вводят один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в месяц, один раз в два месяца или один раз в три месяца. В некоторых вариантах реализации способ включает введение пациенту от примерно 900 до примерно 1800 мг смеси бета-циклодекстринов один раз в две недели. В некоторых вариантах реализации способ включает введение пациенту примерно 900 мг смеси бета-циклодекстринов один раз в две недели.

В некоторых вариантах реализации способ включает введение количества смеси бета-циклодекстринов, достаточного для модулирования уровня в спинномозговой жидкости одного или более из: белка тау, амилоидного пептида, легкого белка нейрофиламентов (NFL), глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), стерола, окистерола, активности хитотриозидазы, кальбиндина, белка лизосомальной мембраны 1 (LAMP-1), ганглиозидов GM2 или GM3, сфингозина и сфингозин-1-фосфата (S1P).

В некоторых вариантах реализации способ включает введение количества смеси бета-циклодекстринов, достаточного для модулирования уровня в плазме одного или более из: 7-кетохолестерола, 7 β -гидроксихолестерола, 24 β -гидроксихолестерола, 25-гидроксихолестерола, 27-гидроксихолестерола и холестан-3 β ,5 α ,6 β -триола.

В некоторых вариантах реализации способ включает введение количества смеси бета-циклодекстринов, достаточного для модулирования уровня в моче одной или более из 3 β -сульфокси-7 β -N-ацетилглюкозаминил-5-холен-24-овой кислоты (SNAG- Δ^5 -CA), конъюгированной с глицином 3 β -сульфокси-7 β -N-ацетилглюкозаминил-5-холен-24-овой кислоты (SNAG- Δ^5 -CG) и конъюгированной с таурином 3 β -сульфокси-7 β -N-ацетилглюкозаминил-5-холен-24-овой кислоты (SNAG- Δ^5 -CT).

В некоторых вариантах реализации способ включает введение смеси бета-циклодекстринов в количестве, достаточном для поддержания или снижения значений одного или более используемых для оценки параметров согласно шкале тяжести БНПС, выбранных из ходьбы, мелкой моторики, когнитивной деятельности, речи, глотания, движения глаз, памяти, слуха и судорог.

В другом аспекте представлен способ получения смеси бета-циклодекстринов, включающий обработку Kleptose® НБР с помощью абсорбционной хроматографии на оксиде алюминия.

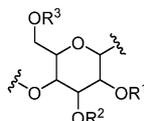
В некоторых вариантах реализации способ включает комбинацию абсорбционной хроматографии на оксиде алюминия и осаждения растворителем. В некоторых вариантах реализации осаждение растворителем проводят с использованием воды с ацетоном в качестве осаждающего агента. В других вариантах реализации осаждение растворителем проводят с использованием метанола с ацетоном в качестве осаждающего агента.

В другом аспекте смеси молекул бета-циклодекстрина, замещенных в одном или более гидроксильных положениях гидроксипропильными группами, необязательно содержащие незамещенные молекулы бета-циклодекстрина, получают путем обработки Kleptose® НБР с помощью комбинации абсорбционной хроматографии на оксиде алюминия и осаждения растворителем.

В дополнительном аспекте предложены способы определения соответствия смеси молекул бета-циклодекстрина, замещенных в одном или более гидроксильных положениях гидроксипропильными группами, необязательно содержащей незамещенные молекулы бета-циклодекстрина, требованиям для применения в фармацевтической композиции для интратекального или интрацеребровентрикулярного введения. Способ включает (а) проведение анализа смеси методом МС с ионизацией электрораспылением; (б) измерение высоты пиков и (с) расчет процентного содержания каждого типа соединения бета-циклодекстрина в общей смеси, основанный на высоте пиков. Смесь соответствует требованиям для применения - то есть обладает качеством, достаточным для применения, - в случае, если смесь содержит менее 1% DS-0 и DS-1 в совокупности; по меньшей мере 85% DS-3, DS-4, DS-5 и DS-6 в совокупности и менее 1% DS-9 и DS-10 в совокупности.

В другом аспекте в настоящем описании предложена фармацевтическая композиция, содержащая в качестве фармацевтически активного ингредиента смесь незамещенных молекул бета-циклодекстрина и молекул бета-циклодекстрина, замещенных в одном или более гидроксильных положениях гидроксипропильными группами, содержащая среднее число гидроксипропильных групп на бета-циклодекстрин ("DS_a"), составляющее от примерно 3 до примерно 7. В предпочтительных вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит не более 0,5% пропиленгликоля, не более ("НБ") 1,5 ЕЭ эндотоксина на 1 г смеси бета-циклодекстринов и не более 1% смеси не содержит гидроксипропильного заместителя ("DS-0"). В различных предпочтительных вариантах реализации смесь бета-циклодекстринов имеет среднее молярное замещение ("МЗ") в диапазоне примерно 0,58-примерно 0,68 (DS_a в диапазоне примерно 4,06-4,76). В некоторых из этих предпочтительных вариантов реализации смесь имеет МЗ, составляющее 0,58-0,68 (DS_a составляет 4,06-4,76), и в некотором варианте реализации МЗ, составляющее примерно 0,63. В различных предпочтительных вариантах реализации смесь имеет среднее молярное замещение ("МЗ") в диапазоне от примерно 0,65 до примерно 0,68 (DS_a 4,6-4,7), а в некоторых вариантах реализации среднее молярное замещение, составляющее примерно 0,67.

В некоторых вариантах реализации бета-циклодекстрины в смеси состоят из остатков глюкозы, имеющих структуру



где R¹, R² и R³ независимо для каждого случая представляют собой -H или -HP, где HP содержит одну или более гидроксипропильных групп.

В некоторых вариантах реализации среднее количество HP на бета-циклодекстрин составляет от примерно 3 до примерно 7.

В некоторых вариантах реализации по меньшей мере 15% из всего количества случаев, когда R¹ и R² присутствуют одновременно, представляют собой HP.

В некоторых вариантах реализации по меньшей мере 30% из числа R³ представляют собой HP.

В некоторых вариантах реализации по меньшей мере 70% бета-циклодекстринов в совокупности имеют среднее количество HP на бета-циклодекстрин от примерно 4 до примерно 6.

В некоторых вариантах реализации DS_a составляет от примерно 3 до примерно 4. В некоторых вариантах реализации DS_a составляет 3,3 ± 0,3. В некоторых вариантах реализации DS_a составляет 3,7 ± 0,3.

В некоторых вариантах реализации DS_a составляет от примерно 3,5 до примерно 4,5. В некоторых вариантах реализации DS_a составляет 3,8 ± 0,3. В некоторых вариантах реализации DS_a составляет 4,2 ± 0,3.

В некоторых вариантах реализации DS_a составляет от примерно 4 до примерно 5. В некоторых вариантах реализации DS_a составляет 4,3 ± 0,3. В некоторых вариантах реализации DS_a составляет 4,7 ± 0,3.

В некоторых вариантах реализации DS_a составляет от примерно 4,5 до примерно 5,5. В некоторых вариантах реализации DS_a составляет 4,8 ± 0,3. В некоторых вариантах реализации DS_a составляет 5,2 ± 0,3.

В некоторых вариантах реализации DS_a составляет от примерно 5 до примерно 6. В некоторых вариантах реализации DS_a составляет 5,3 ± 0,3. В некоторых вариантах реализации DS_a составляет 5,7 ± 0,3.

В некоторых вариантах реализации DS_a составляет от примерно 5,5 до примерно 6,5. В некоторых вариантах реализации DS_a составляет 5,8 ± 0,3. В некоторых вариантах реализации DS_a составляет 6,2 ± 0,3.

В некоторых вариантах реализации DS_a составляет от примерно 6 до примерно 7. В некоторых вариантах реализации DS_a составляет 6,3 ± 0,3. В некоторых вариантах реализации DS_a составляет 6,7 ± 0,3.

В некоторых вариантах реализации по меньшей мере 70% бета-циклодекстринов имеют DS в диапазоне DS_a ± 1. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере 90% бета-циклодекстринов имеют DS в диапазоне DS_a ± 1.

В некоторых вариантах реализации гидроксипропильные группы в гидроксильных положениях бета-циклодекстринов замещены гидроксипропильными цепями, имеющими структуру [CH₂CH(CH₃)O]_nH, где n ≥ 1 и среднее число гидроксипропильных цепей на бета-циклодекстрин составляет от примерно 3 до примерно 7. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере 70% гидроксипропильных цепей имеют n = 1. В некоторых вариантах реализации менее 30% гидроксипропильных цепей имеют n = 2. В некоторых вариантах реализации менее 10% гидроксипропильных цепей имеют n > 2. В некоторых вариантах реализации среднее число гидроксипропильных цепей на бета-циклодекстрин составляет от примерно 4 до примерно 6. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере 70% бета-циклодекстринов в совокупности имеют среднее число гидроксипропильных цепей на бета-циклодекстрин, составляющее от примерно 4 до примерно 6.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция, раскрытая в настоящем описании, содержит менее примерно 10 международных единиц (МЕ), например менее примерно 6, менее

примерно 3 или менее примерно 1,5 МЕ эндотоксинов на 1 г фармацевтически активного ингредиента. Уровень эндотоксинов определяют с помощью реакции с лизатом амебоцитов мечехвоста.

В некоторых вариантах реализации фармацевтически активный ингредиент содержит менее примерно 2 мас.%, например менее примерно 1 мас.% незамещенного бета-циклодекстрина.

В некоторых вариантах реализации фармацевтически активный ингредиент содержит менее примерно 0,5 мас.%, например менее примерно 0,2 мас.% пропиленгликоля или олигомеров пропиленгликоля.

В некоторых вариантах реализации фармацевтически активный ингредиент содержит менее примерно 1 ppm пропиленоксида.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит фармацевтически активный ингредиент, где 20% (мас./об.) раствор фармацевтически активного ингредиента в 1 мл дистиллированной воды солюбилизирует по меньшей мере 2 мг, например по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 мг неэтерифицированного холестерина при комнатной температуре согласно измерению с помощью спектрометрии в УФ-диапазоне через примерно 24 ч.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция проявляет более низкую ототоксичность, чем Trappsol® Cyclo. В некоторых вариантах реализации ототоксичность определяют *in vitro* посредством определения токсичности в отношении клетки кортиева органа (House Ear Institute-organ of Corti 1) (HEI-OC1). В некоторых вариантах реализации ототоксичность определяют *in vivo* с помощью теста акустических стволовых вызванных потенциалов (АСВП) у субъекта, такого как мышь, крыса, кошка, собака или человек.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция является подходящей для интратекального или интрацеребровентрикулярного введения.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция имеет осмоляльность от примерно 300 до примерно 450 мОсм/кг.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит от примерно 10 до примерно 200 мг/мл фармацевтически активного ингредиента.

В некоторых вариантах реализации единственный фармацевтически активный ингредиент фармацевтической композиции получают очисткой Kleptose® НВР, Kleptose® НР, Trappsol® Cyclo или Cava-sol® W7 НР Pharma. В некоторых вариантах реализации единственный фармацевтически активный ингредиент фармацевтической композиции получают очисткой Kleptose® НВР. В некоторых вариантах реализации единственный фармацевтически активный ингредиент фармацевтической композиции получают очисткой Trappsol® Cyclo. В некоторых вариантах реализации очистка включает гидрофильное или гидрофобное взаимодействие или аффинную очистку и может включать хроматографические способы, такие как очистка с помощью ВЭЖХ или гель-проникающей хроматографии.

В настоящем описании также предложен способ лечения болезни Ниманна-Пика типа С, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту, например, путем интратекального или интрацеребровентрикулярного введения, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, как описано в настоящем описании. В некоторых вариантах реализации способ включает введение пациенту от примерно 300 до примерно 3000 мг фармацевтически активного ингредиента. В некоторых вариантах реализации введение осуществляют каждую неделю, каждые две недели, каждые три недели, каждый месяц, каждые два месяца или каждые три месяца. Например, способ может включать введение субъекту от примерно 600 до примерно 1800 мг фармацевтически активного ингредиента каждые две недели.

В некоторых вариантах реализации способ включает введение количества фармацевтически активного ингредиента, достаточного для модулирования уровня в спинномозговой жидкости одного или более из: белка тау, амилоидного пептида, легкого белка нейрофиламентов (NFL), глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), стерола, оксистерола, активности хитотриозидазы, кальбиндина, белка лизосомальной мембраны 1 (LAMP-1), ганглиозидов GM2 или GM3, сфингозина и сфингозин-1-фосфата (S1P).

В некоторых вариантах реализации способ включает введение количества фармацевтически активного ингредиента, достаточного для модулирования уровня в плазме одного или более из: 7-кетохолестерола, 7β-гидроксихолестерола, 24S-гидроксихолестерола, 25-гидроксихолестерола, 27-гидроксихолестерола и холестан-3β,5α,6β-триола.

В некоторых вариантах реализации способ включает введение количества фармацевтически активного ингредиента, достаточного для модулирования уровня в моче одной или более из 3-сульфокси-7-N-ацетилглюкозаминил-5-холен-24-овой кислоты (SNAG-Δ⁵-CA), конъюгированной с глицином 3-сульфокси-7-N-ацетилглюкозаминил-5-холен-24-овой кислоты (SNAG-Δ⁵-CG) и конъюгированной с таурином 3-сульфокси-7-N-ацетилглюкозаминил-5-холен-24-овой кислоты (SNAG-Δ⁵-CT).

В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает поддержание или снижение значений одного или более используемых для оценки параметров согласно шкале тяжести БНПС, выбранных из ходьбы, мелкой моторики, когнитивной деятельности, речи, глотания, движения глаз, памяти, слуха и судорог.

5. Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показаны клинические параметры, вносящие вклад в стандартную клиническую шкалу тяжести БНПС, в соответствии с Yanjanin et al., "Linear Clinical Progression, Independent of Age of Onset, in Niemann-Pick Disease, Type C," Am. J. Med. Genet. Part B 153B: 132-140 (2010).

На фиг. 2 обобщены результаты первоначального анализа клинического исследования фазы I, описанного в примере 1.

На фиг. 3 обобщены результаты последующего анализа клинического исследования фазы I, описанного в примере 1.

На фиг. 4 обобщены результаты анализа клинического исследования фазы I с использованием изменения относительно исходных значений.

На фиг. 5 обобщены предварительные результаты клинического исследования фазы I с использованием общих оценок БНПС.

На фиг. 6 обобщены предварительные результаты клинического исследования фазы I без учета влияния на слух.

На фиг. 7 обобщены клинические параметры, вносящие вклад в новую "комбинированную" конечную точку БНПС или оценку тяжести;

На фиг. 8 обобщены предварительные результаты клинического исследования фазы I с использованием новой комбинированной конечной точки БНПС.

На фиг. 9 изображена типичная хроматограмма ВЭЖХ с использованием метода анализа производных циклодекстрина (CD-screen).

На фиг. 10 изображены сравнительные хроматограммы ВЭЖХ с использованием разных растворителей в методе анализа производных циклодекстрина. Верхняя кривая: метанол; нижняя кривая: ацетонитрил.

На фиг. 11 изображены экстрагированные ионные хроматограммы гидроксипропил-бета-циклодекстринов, имеющих различную степень замещения (DS), полученные методом масс-спектрометрии с использованием колонки для анализа производных циклодекстрина.

На фиг. 12 изображена типичная хроматограмма ВЭЖХ с использованием колонки с обращенной фазой LiChrosphere C18.

На фиг. 13 изображены сравнительные хроматограммы ВЭЖХ с использованием разных растворителей в методе хроматографии с обращенной фазой на LiChrosphere C18. Верхняя кривая: метанол; нижняя кривая: ацетонитрил.

На фиг. 14 изображены экстрагированные ионные хроматограммы гидроксипропил-бета-циклодекстринов, имеющих различную степень замещения (DS), полученные методом масс-спектрометрии с использованием колонки LiChrosphere C18.

На фиг. 15 изображены сравнительные хроматограммы ВЭЖХ с использованием разных растворителей на колонке HILIC. Верхняя кривая: градиент ацетонитрила в воде до 79%; нижняя кривая: 75% ацетонитрил.

На фиг. 16 изображены экстрагированные ионные хроматограммы гидроксипропил-бета-циклодекстринов, имеющих различную степень замещения (DS), полученные методом масс-спектрометрии с использованием колонки HILIC.

На фиг. 17 изображена типичная хроматограмма ВЭЖХ с использованием колонки с силикагелем.

На фиг. 18 изображены экстрагированные ионные хроматограммы гидроксипропил-бета-циклодекстринов, имеющих различную степень замещения (DS), полученные методом масс-спектрометрии с использованием колонки с силикагелем.

На фиг. 19 показаны наложенные кривые хроматограмм для коммерческого препарата Kleptose НРВ® (Roquette, партия E0223) (верхняя кривая) и после очистки посредством комплексообразования с D-лимоненом (нижняя кривая). На оси X представлено время удерживания в минутах.

На фиг. 20 показаны хроматограммы ВЭЖХ для образца, полученного после осаждения растворителем с использованием смеси вода/ацетон (верхняя кривая) в сравнении с коммерческим препаратом Kleptose НРВ® (Roquette, партия E0223).

На фиг. 21 показаны наложенные кривые хроматограмм для коммерческого препарата Kleptose НРВ® (Roquette, партия E0223) (верхняя кривая) и после очистки на смоле и обработки активированным углем (нижняя кривая). На оси X представлено время удерживания в минутах.

На фиг. 22 показаны наложенные кривые хроматограмм для коммерческого препарата Kleptose НРВ® (Roquette, партия E0223) (верхняя кривая) и после очистки с помощью оксида алюминия. На нижней кривой показаны данные для очищенного фильтрата после очистки с помощью оксида алюминия; на центральной кривой показаны данные для очищенного 1-го промывочного раствора после очистки с помощью оксида алюминия. На оси X представлено время удерживания в минутах.

На фиг. 23 показаны сравнительные хроматограммы ВЭЖХ для каждой из фракций от А до Н (за исключением Е), полученных при хроматографии Kleptose® НРВ на оксиде алюминия. Фракции от А до Н соответствуют образцам с 5.4.3.2.2А по 5.4.3.2.2Н соответственно (за исключением Е). На оси X пред-

ставлено время удерживания в минутах.

На фиг. 24 показан график процентного содержания примесей в каждой из фракций от А до Н, собранных при очистке Kleptose® НРВ с помощью хроматографии на оксиде алюминия. Отметки А-Н на оси X соответствуют образцам с 5.4.3.2.2А по 5.4.3.2.2Н соответственно. На оси Y показано процентное содержание примесей. ПГ% = процент пропиленгликоля (столбцы с диагональной штриховкой); общее содержание других примесей % = процент от общего количества примесей, связанных с циклодекстрином (черные столбцы); БЦД% = процент незамещенного бета-циклодекстрина (столбцы без штриховки); ГПБЦД DS-1% = процент монозамещенных бета-циклодекстринов (столбцы с обратной диагональной штриховкой).

На фиг. 25 изображен пример газовой хроматограммы Kleptose НРВ® для определения пропиленгликоля (примесь, подлежащая измерению) и этиленгликоля (внутренний стандарт). На оси X представлено время удерживания в минутах; на оси y представлен ответ.

На фиг. 26 изображены примеры газовых хроматограмм производных пропиленгликоля. На оси X представлено время удерживания в минутах; на оси y представлен ответ в милливольтгах.

На фиг. 27 изображен калибровочный график для определения концентраций пропиленгликоля в образцах для газовой хроматографии. ПГ/ЭГ = отношение пропиленгликоля к этиленгликолю, как указано.

На фиг. 28 изображен пример спектра ¹H ЯМР для Kleptose НРВ® (DS_n составляет 4,1), полученный с применением метода согласно Европейской фармакопее.

На фиг. 29 представлены данные спектров, полученных методом МС с ионизацией электрораспылением, из первой лаборатории, на фиг. 29А показан спектр Kleptose® НРВ, а на фиг. 29В показан спектр Trappsol® Cyclo™. Числа добавляли к спектрам для идентификации количества гидроксипропильных фрагментов в каждом пике.

На фиг. 30 представлены данные, полученные методом МС с ионизацией электрораспылением, из второй лаборатории, на фиг. 30А показан спектр Kleptose® НРВ, а на фиг. 30В показан спектр Trappsol® Cyclo™.

На фиг. 31 приведено сравнение данных для трех различных партий Kleptose® НРВ, полученных методом МС с ионизацией электрораспылением, выполненным двумя различными лабораториями.

На фиг. 32 представлены данные спектров для двух различных партий Trappsol® Cyclo™, полученных методом МС с ионизацией электрораспылением в двух различных лабораториях с использованием тех же условий, которые использовали для получения данных для Kleptose, показанных на фиг. 31.

На фиг. 33 показаны спектры, полученные методом МС с ионизацией электрораспылением, на которых ось Y была расширена по сравнению с фиг. 29-32, чтобы показать пики между m/z 1090 и 1230. Фиг. 33А представляет собой спектр, полученный для Trappsol® Cyclo™. Фиг. 33В представляет собой спектр, полученный для Kleptose® НРВ.

На фиг. 34 приведены данные, полученные методом МС с ионизацией электрораспылением, для дополнительного сравнения различий между Kleptose® НРВ и Trappsol® Cyclo™, на фиг. 34А показан спектр Kleptose® НРВ, а на фиг. 34В показан спектр Trappsol® Cyclo™. Числа добавляли к спектрам для идентификации количества гидроксипропильных фрагментов в каждом пике.

На фиг. 35 представлены дополнительные различия в спектрах МС между Kleptose® НРВ и Trappsol® Cyclo™ между m/z 995 и 1095, на фиг. 35А показан спектр Kleptose® НРВ, а на фиг. 35В показан спектр Trappsol® Cyclo™.

На фиг. 36 представлены данные, полученные методом МС с ионизацией электрораспылением, демонстрирующие влияние очистки с помощью адсорбции на оксиде алюминия на характеристический спектр замещения. На фиг. 36А показан спектр исходного материала Kleptose® НРВ, а на фиг. 36В представлен спектр препарата партии CYL-4063, который очищали с помощью комбинации абсорбционной хроматографии на оксиде алюминия и осаждения растворителем (вода-ацетон).

На фиг. 37 показаны изменения в экспрессии выбранных генов, связанных с гомеостазом холестерина, в клетках GM18453 и GM05659, обработанных Kleptose® НРВ в диапазоне концентраций (от 0,1 до 10 мМ).

На фиг. 38 показана кратность изменений экспрессии в клетках GM18453, гомозиготных по мутации NPC1, подмножества генов гомеостаза холестерина, экспрессия которых статистически значимо отличалась (p < 0,001) после обработки, для четырех различных композиций: STD ("стандартный" препарат Kleptose® НРВ); ХА (Kleptose® НРВ, очищенная с помощью хроматографии на оксиде алюминия); ОР (Kleptose® НРВ, очищенная путем осаждения растворителем) и АО (Kleptose® НРВ, очищенная с помощью хроматографии на оксиде алюминия и осаждения растворителем).

На фиг. 39 показаны биологические пути, подвергшиеся наибольшему влиянию, расположенные согласно статистической значимости, когда клетки GM18453 обрабатывают соответственно Kleptose® НРВ и порцией Kleptose® НРВ, очищенной способом, который включает адсорбцию на алюминии.

На фиг. 40 показаны хроматограммы различных фракций, полученных при препаративном хромато-

графическом разделении с использованием метода анализа производных циклодекстрина партии Kleptose® НРВ, снабженные примечаниями, чтобы показать степень замещения хроматографически разделенных соединений гидроксипропил-бета-циклодекстринов.

На фиг. 41 показаны спектры, полученные методом МС с ионизацией электрораспылением, для Kleptose® НРВ, фракции "L", фракции "M" и фракции "H", снабженные примечаниями, чтобы идентифицировать сигналы по степени гидроксипропилового замещения, на фиг. 41А показана Kleptose® НРВ партии E0245; на фиг. 41В показана фракция "L" (фракция 2 отдельно); на фиг. 41С показана фракция "M" (объединенные фракции 4-15); а на фиг. 41D показана фракция "H" (объединенные фракции 16-24).

На фиг. 42 показаны 10 биологических путей, подвергшихся наибольшему влиянию при обработке клеток NPC с применением 1,0 мМ фракций "L", "M" и "H", расположенных в порядке снижения статистической значимости.

На фиг. 43 показаны хроматограммы различных фракций, полученные при препаративном адсорбционно-хроматографическом разделении на алюминии пробы Kleptose® НРВ (партия E0245), снабженные примечаниями, чтобы показать пронумерованные фракции, объединенные для получения фракций "A"- "F" и "K", и снабженные примечаниями, чтобы показать степень замещения хроматографически разделенных соединений гидроксипропил-бета-циклодекстринов.

На фиг. 44 показаны хроматограммы смеси ГПБЦД после применения различных способов очистки, на фиг. 44А показаны хроматограммы очищенной смеси ГПБЦД после применения способов II-IX, а на фиг. 44В показаны хроматограммы очищенной смеси ГПБЦД после применения способов X и XI.

На фиг. 45 обобщены результаты анализа, проведенного для данных БНПС клинического исследования I фазы за 18 месяцев.

На фиг. 46 показан годовой показатель изменения данных клинического исследования I фазы за 18 месяцев.

На фиг. 47 показано среднее изменение относительно исходных значений данных клинического исследования I фазы за 18 месяцев.

На фиг. 48 показан анализ данных пациентов клинического исследования I фазы, ответивших на лечение, за 18 месяцев.

На фиг. 49 показано влияние лечения на слух.

На фиг. 50 обобщено влияние лечения на слух.

6. Подробное описание

6.1. Экспериментальные наблюдения.

Как подробно описано ниже в примере 1, авторы настоящего изобретения проанализировали исходные данные клинического исследования I фазы, проводимого Национальным институтом здравоохранения, в котором пациенты с болезнью НПС 1 типа получают лечение посредством интратекального введения 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрина ("ГПБЦД") с применением существующей композиции для парентерального применения Kleptose® НРВ (Roquette). В этом нерандомизированном открытом одноцентровом исследовании Kleptose® НРВ вводят когортам пациентов, ранее не получавших медикаментозного лечения, в возрастающих дозах путем люмбальной инъекции. В некоторые из своих исследований авторы настоящего изобретения также включали данные от трех пациентов, которым интратекально вводили Kleptose® НРВ в качестве индивидуальных новых исследуемых лекарственных средств (INDs) в другом учреждении.

Исследования авторов настоящего изобретения подтвердили, что интратекальное введение Kleptose® НРВ обеспечивает терапевтический эффект при болезни НПС 1 типа. Используя стандартный суммарный показатель эффективности, клиническую шкалу тяжести БНПС (см. Yanjanin et al., "Linear Clinical Progression, Independent of Age of Onset, in Niemann-Pick Disease, Type C," Am. J. Med. Genet. Part B 153B:132-140 (2010); см. также фиг. 1 и табл. 1 в настоящем описании), у 7/15 пациентов наблюдали стабильное заболевание или улучшение течения заболевания при отсутствии лечения (см. фиг. 5). Используя новую комбинированную конечную точку, основанную на ретроспективном анализе результатов (фиг. 7), авторы настоящего изобретения обнаружили, что 11/15 пациентов в исследовании демонстрировали стабильное заболевание или улучшение течения заболевания, в отличие от только 4/13, демонстрировавших стабильное заболевание, в когорте с естественным течением заболевания (см. фиг. 8). В некоторых из своих исследований авторы настоящего изобретения использовали клиническую оценку тяжести БНПС без учета слуха и акустических стволовых потенциалов (АСП).

Более подробный анализ, однако, показал, что в то время как интратекальное введение ГПБЦД улучшает некоторые признаки и симптомы болезни НПС 1 типа, оно лишь замедляет прогрессирование других и, как оказалось, парадоксальным образом ускоряет прогрессирование других симптомов. В частности, потеря слуха, по-видимому, была ускорена у пациентов, получавших Kleptose® НРВ интратекально (см., например, фиг. 2-4).

Как подробно изложено ниже в примере 3, авторы настоящего изобретения проанализировали отдельные партии Kleptose® НРВ с помощью различных хроматографических методов. Эти исследования

показали, что данный продукт для парентерального применения содержит сложную смесь молекул бета-циклодекстринов, имеющих различную степень замещения (см., например, фиг. 11, 14, 16, 18); неизвестно, какое из этих соединений вносит вклад в наблюдаемое улучшение, замедление прогрессирования и ускорение прогрессирования различных клинических проявлений.

Дополнительный анализ с использованием масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением, описанный в примере 5, показал, что существуют существенные различия в характеристическом спектре замещения композиции гидроксипропил-бета-циклодекстринов, применяемой в клиническом исследовании фазы I, описанном в примере 1, Kleptose® НРВ, по сравнению с характеристическим спектром замещения другой поставляемой на рынок композиции гидроксипропил-бета-циклодекстринов, Trappsol® Cyclo™. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что Kleptose® НРВ имеет низкую вариабельность в характеристическом спектре замещения от партии к партии и низкое содержание примесей, в частности пропиленгликоля. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что Trappsol® Cyclo™, напротив, проявляет высокую вариабельность в характеристическом спектре замещения от партии к партии и имеет значительно более высокое содержание пропиленгликоля, предполагаемого ототоксина.

Для подготовки к клиническим исследованиям, в которых ГПБЦД вводят непосредственно в спинномозговую жидкость в течение более длительных периодов времени и с более частым введением, авторы настоящего изобретения разработали способы снижения уровня пропиленгликоля, который является предполагаемым ототоксином; молекул бета-циклодекстрина, не имеющих гидроксипропильных заместителей, которые, как известно, образуют осадки, и бактериального эндотоксина, который обладает высокой провоспалительной активностью, как описано в примерах 6 и 7. Хотя разработанные способы были эффективны для снижения указанных примесей, авторы настоящего изобретения обнаружили, что абсорбционная хроматография на оксиде алюминия, используемая отдельно или в комбинации с осаждением растворителем, также изменяла характеристический спектр состава, по существу уменьшая количество молекул бета-циклодекстрина, содержащих единственный гидроксипропильный заместитель (DS-1), и уменьшая количество молекул бета-циклодекстрина, содержащих две гидроксипропильные группы (DS-2) (см. пример 7; табл. 20). Снижение содержания молекул с низкой степенью замещения (DS-0, как и предполагалось, и DS-1 и DS-2, непреднамеренно) увеличивало среднюю степень замещения (DS_a) смеси.

Как подробно описано ниже в примере 8 и обобщено на фиг. 35-38, эксперименты по определению профиля экспрессии генов с применением Kleptose® НРВ и пробы Kleptose® НРВ, дополнительно очищенной с использованием адсорбции на алюминии, показали, что активность смеси гидроксипропил-бета-циклодекстринов в отношении клеток, гомозиготных по мутации NPC1, представляет собой совокупность активностей, отдельно проявляемых соединениями, имеющими различную степень гидроксипропильного замещения. Несмотря на изменение в характеристическом спектре композиции по сравнению с Kleptose® НРВ, неожиданно не наблюдалось изменений в экспрессии генов, которые, как известно, вовлечены в метаболизм и транспорт холестерина. Это открытие позволит вводить новую, более высокоочищенную и определенную по составу композицию ГПБЦД посредством интракратекального или интрацереброваскулярного пути в СМЖ пациентов с болезнью НПС в течение более длительных периодов времени с обеспечением терапевтического эффекта и повышенной безопасности.

6.2. Фармацевтические композиции.

В настоящем описании предложена фармацевтическая композиция, содержащая в качестве фармацевтически активного ингредиента смесь молекул бета-циклодекстрина, замещенных в одном или более гидроксильных положениях гидроксипропильными группами, необязательно включающую незамещенные молекулы бета-циклодекстрина.

6.2.1. Фармацевтически активный ингредиент.

Фармацевтически активный ингредиент представляет собой смесь молекул бета-циклодекстринов, замещенных в одном или более гидроксильных положениях гидроксипропильными группами, необязательно включающую незамещенные молекулы бета-циклодекстрина. Термин "фармацевтически активный ингредиент" использован в настоящем описании в качестве синонима термина "активный фармацевтический ингредиент".

6.2.1.1. Средняя степень замещения.

В контексте настоящего описания "замещенный в одном или более гидроксильных положениях гидроксипропильными группами" относится к замещению водорода одной или более гидроксильных групп молекулы бета-циклодекстрина гидроксипропильной группой или олигомером гидроксипропила. Например, "замещенный в одном или более гидроксильных положениях гидроксипропильными группами" может относиться к введению одного или более заместителей $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}-$ в одну или более связей О-Н в молекуле бета-циклодекстрина, приводящему к образованию одной или более эфирных связей.

Число гидроксипропильных групп на ангидроглюкозный остаток в смеси бета-циклодекстринов представляет собой "молярное замещение", или "МЗ", и определено в соответствии со способами, приведенными в статье Фармакопеи США на гидроксипропилбетадек (USP NF 2015) ("статья Фармакопеи США на гидроксипропилбетадек"), включенной в настоящее описание посредством ссылки во всей ее

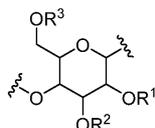
полноте. В контексте настоящего описания термин "среднее молярное замещение", или "MЗ_{ср}", использован в качестве синонима для термина "MЗ", поскольку этот термин использован в статье Фармакопеи США на гидроксипропилбетадекс, и термин "остаток глюкозы" использован в качестве синонима для термина "ангидроглюкозный остаток", поскольку этот термин использован в статье Фармакопеи США на гидроксипропилбетадекс.

В контексте настоящего описания "степень замещения", или "DS", относится к общему числу гидроксипропильных групп, являющихся непосредственными или опосредованными заместителями в молекуле бета-циклодекстрина. Например, молекула бета-циклодекстрина, содержащая остатки глюкозы, каждый из которых замещен одной гидроксипропильной группой, имеет DS = 7. В другом примере молекула бета-циклодекстрина, в которой только один из семи остатков глюкозы замещен гидроксипропильной группой, и сама эта гидроксипропильная группа замещена другой гидроксипропильной группой (например, бета-циклодекстрин с единственным HP, который содержит две гидроксипропильные группы), имеет DS = 2.

В контексте настоящего описания "среднее число гидроксипропильных групп на бета-циклодекстрин", также известное как "средняя степень замещения", "средняя DS" или "DS_а", относится к общему числу гидроксипропильных групп в совокупности бета-циклодекстринов, деленному на число молекул бета-циклодекстринов. В качестве иллюстративного примера, смесь равных частей бета-циклодекстринов, содержащих остатки глюкозы, каждый из которых замещен одной гидроксипропильной группой, и бета-циклодекстринов, содержащих остатки глюкозы, каждый из которых замещен двумя гидроксипропильными группами, имеет DS_а = 10,5 (среднее равных частей бета-циклодекстринов с DS = 7 и DS = 14). В другом иллюстративном примере смесь 33,3% бета-циклодекстринов, в которых только один из семи остатков глюкозы замещен гидроксипропильной группой (т.е. DS = 1) и 66,7% бета-циклодекстринов, содержащих остатки глюкозы, каждый из которых замещен одной гидроксипропильной группой (т.е. DS = 7), имеет DS_а = 5,0.

DS_а определяется умножением MЗ на 7. В контексте настоящего описания DS_а использована в качестве синонима для термина "степень замещения", поскольку этот термин определен в статье Фармакопеи США на гидроксипропилбетадекс.

В некоторых вариантах реализации бета-циклодекстрины в смеси состоят из остатков глюкозы, имеющих структуру



где R¹, R² и R³ независимо для каждого случая представляют собой -H или -HP, где HP содержит одну или более гидроксипропильных групп.

В некоторых вариантах реализации HP содержит одну гидроксипропильную группу. В некоторых вариантах реализации HP, по существу, состоит из одной гидроксипропильной группы. В некоторых вариантах реализации HP состоит из одной гидроксипропильной группы.

В некоторых вариантах реализации среднее количество HP на бета-циклодекстрин составляет от примерно 3 до примерно 7, например от примерно 3 до примерно 6, от примерно 3 до примерно 5, от примерно 3 до примерно 4, от примерно 4 до примерно 7, от примерно 4 до примерно 6, от примерно 4 до примерно 5, от примерно 5 до примерно 7, от примерно 5 до примерно 6 или от примерно 6 до примерно 7.

В некоторых вариантах реализации общее количество случаев, когда R³ = HP, больше, чем общее количество случаев, когда R¹ = HP или R² = HP. В некоторых вариантах реализации общее количество случаев, когда R³ = HP, больше, чем общее количество случаев, когда одновременно R¹ = HP и R² = HP.

В некоторых вариантах реализации в по меньшей мере примерно 5%, например по меньшей мере примерно 10, по меньшей мере примерно 15, по меньшей мере примерно 20, по меньшей мере примерно 25, по меньшей мере примерно 30, по меньшей мере примерно 35, по меньшей мере примерно 40 или по меньшей мере примерно 45% из всего количества случаев R¹ и R² одновременно представляют собой HP.

В некоторых вариантах реализации не более чем примерно в 95%, например не более чем примерно в 90, не более чем примерно в 85, не более чем примерно в 80, не более чем примерно в 75, не более чем примерно в 70, не более чем примерно в 65, не более чем примерно в 60, не более чем примерно в 55 или не более чем примерно в 50% из всего количества случаев R¹ и R² одновременно представляют собой HP.

В некоторых вариантах реализации процентное содержание R¹ и R², которые одновременно представляют собой HP, составляет от примерно 5 до примерно 95%; например от примерно 10 до примерно 95%, от примерно 15 до примерно 95%, от примерно 20 до примерно 95%, от примерно 25 до примерно 95%, от примерно 30 до примерно 95%, от примерно 35 до примерно 95%, от примерно 40 до примерно 95%, от примерно 45 до примерно 95%, от примерно 50 до примерно 95%, от примерно 55 до примерно 95%, от примерно 60 до примерно 95%, от примерно 65 до примерно 95%, от примерно 70 до примерно 95%, от примерно 75 до примерно 95%, от примерно 80 до примерно 95%, от примерно 85 до примерно 95%

80 до примерно 85%; например от примерно 50 до примерно 80%, от примерно 55 до примерно 80%, от примерно 60 до примерно 80%, от примерно 65 до примерно 80%, от примерно 70 до примерно 80%, от примерно 75 до примерно 80%; например от примерно 50 до примерно 75%, от примерно 55 до примерно 75%, от примерно 60 до примерно 75%, от примерно 65 до примерно 75%, от примерно 70 до примерно 75%; например от примерно 50 до примерно 70%, от примерно 55 до примерно 70%, от примерно 60 до примерно 70%, от примерно 65 до примерно 70%; например от примерно 50 до примерно 65%, от примерно 55 до примерно 65%, от примерно 60 до примерно 65%; например от примерно 50 до примерно 60%, от примерно 55 до примерно 60% или, например, от примерно 50 до примерно 55%.

В некоторых вариантах реализации фармацевтические композиции согласно настоящему описанию содержат в качестве фармацевтически активного ингредиента смесь незамещенных молекул бета-циклодекстрина и молекул бета-циклодекстрина, замещенных в одном или более гидроксильных положениях гидроксипропильными группами, где смесь имеет среднее число гидроксипропильных групп на молекулу бета-циклодекстрина (DS_a), составляющее от примерно 3 до примерно 7.

В некоторых вариантах реализации DS_a составляет от примерно 3 до примерно 5, например от примерно 3 до примерно 4. В некоторых вариантах реализации DS_a составляет $3,3 \pm 0,3$, $3,5 \pm 0,3$ или $3,7 \pm 0,3$. В других вариантах реализации DS_a составляет $3,2 \pm 0,2$, $3,3 \pm 0,2$, $3,4 \pm 0,2$, $3,5 \pm 0,2$, $3,6 \pm 0,2$, $3,7 \pm 0,2$ или $3,8 \pm 0,2$. В других вариантах реализации DS_a составляет $3,1 \pm 0,1$, $3,2 \pm 0,1$, $3,3 \pm 0,1$, $3,4 \pm 0,1$, $3,5 \pm 0,1$, $3,6 \pm 0,1$, $3,7 \pm 0,1$, $3,8 \pm 0,1$ или $3,9 \pm 0,1$.

В некоторых вариантах реализации DS_a составляет от примерно 3,5 до примерно 5,5, например от примерно 3,5 до примерно 4,5. В некоторых вариантах реализации DS_a составляет $3,8 \pm 0,3$, $4,0 \pm 0,3$ или $4,2 \pm 0,3$. В других вариантах реализации DS_a составляет $3,7 \pm 0,2$, $3,8 \pm 0,2$, $3,9 \pm 0,2$, $4,0 \pm 0,2$, $4,1 \pm 0,2$, $4,2 \pm 0,2$ или $4,3 \pm 0,2$. В других вариантах реализации DS_a составляет $3,6 \pm 0,1$, $3,7 \pm 0,1$, $3,8 \pm 0,1$, $3,9 \pm 0,1$, $4,0 \pm 0,1$, $4,1 \pm 0,1$, $4,2 \pm 0,1$, $4,3 \pm 0,1$ или $4,4 \pm 0,1$.

В некоторых вариантах реализации DS_a составляет от примерно 4 до примерно 6, например от примерно 4 до примерно 5. В некоторых вариантах реализации DS_a составляет $4,3 \pm 0,3$, $4,5 \pm 0,3$ или $4,7 \pm 0,3$. В других вариантах реализации DS_a составляет $4,2 \pm 0,2$, $4,3 \pm 0,2$, $4,4 \pm 0,2$, $4,5 \pm 0,2$, $4,6 \pm 0,2$, $4,7 \pm 0,2$ или $4,8 \pm 0,2$. В других вариантах реализации DS_a составляет $4,1 \pm 0,1$, $4,2 \pm 0,1$, $4,3 \pm 0,1$, $4,4 \pm 0,1$, $4,5 \pm 0,1$, $4,6 \pm 0,1$, $4,7 \pm 0,1$, $4,8 \pm 0,1$ или $4,9 \pm 0,1$.

В некоторых вариантах реализации DS_a составляет от примерно 4,5 до примерно 6,5, например от примерно 4,5 до примерно 5,5. В некоторых вариантах реализации DS_a составляет $4,8 \pm 0,3$, $5,0 \pm 0,3$ или $5,2 \pm 0,3$. В других вариантах реализации DS_a составляет $4,7 \pm 0,2$, $4,8 \pm 0,2$, $4,9 \pm 0,2$, $5,0 \pm 0,2$, $5,1 \pm 0,2$, $5,2 \pm 0,2$ или $5,3 \pm 0,2$. В других вариантах реализации DS_a составляет $4,6 \pm 0,1$, $4,7 \pm 0,1$, $4,8 \pm 0,1$, $4,9 \pm 0,1$, $5,0 \pm 0,1$, $5,1 \pm 0,1$, $5,2 \pm 0,1$, $5,3 \pm 0,1$ или $5,4 \pm 0,1$.

В некоторых вариантах реализации DS_a составляет от примерно 5 до примерно 7, например от примерно 5 до примерно 6. В некоторых вариантах реализации DS_a составляет $5,3 \pm 0,3$, $5,5 \pm 0,3$ или $5,7 \pm 0,3$. В других вариантах реализации DS_a составляет $5,2 \pm 0,2$, $5,3 \pm 0,2$, $5,4 \pm 0,2$, $5,5 \pm 0,2$, $5,6 \pm 0,2$, $5,7 \pm 0,2$ или $5,8 \pm 0,2$. В других вариантах реализации DS_a составляет $5,1 \pm 0,1$, $5,2 \pm 0,1$, $5,3 \pm 0,1$, $5,4 \pm 0,1$, $5,5 \pm 0,1$, $5,6 \pm 0,1$, $5,7 \pm 0,1$, $5,8 \pm 0,1$ или $5,9 \pm 0,1$.

В некоторых вариантах реализации DS_a составляет от примерно 5,5 до примерно 6,5. В некоторых вариантах реализации DS_a составляет $5,8 \pm 0,3$, $6,0 \pm 0,3$ или $6,2 \pm 0,3$. В других вариантах реализации DS_a составляет $5,7 \pm 0,2$, $5,8 \pm 0,2$, $5,9 \pm 0,2$, $6,0 \pm 0,2$, $6,1 \pm 0,2$, $6,2 \pm 0,2$ или $6,3 \pm 0,2$. В других вариантах реализации DS_a составляет $5,6 \pm 0,1$, $5,7 \pm 0,1$, $5,8 \pm 0,1$, $5,9 \pm 0,1$, $6,0 \pm 0,1$, $6,1 \pm 0,1$, $6,2 \pm 0,1$, $6,3 \pm 0,1$ или $6,4 \pm 0,1$.

В некоторых вариантах реализации DS_a составляет от примерно 6 до примерно 7. В некоторых вариантах реализации DS_a составляет $6,3 \pm 0,3$, $6,5 \pm 0,3$ или $6,7 \pm 0,3$. В других вариантах реализации DS_a составляет $6,2 \pm 0,2$, $6,3 \pm 0,2$, $6,4 \pm 0,2$, $6,5 \pm 0,2$, $6,6 \pm 0,2$, $6,7 \pm 0,2$ или $6,8 \pm 0,2$. В других вариантах реализации DS_a составляет $6,1 \pm 0,1$, $6,2 \pm 0,1$, $6,3 \pm 0,1$, $6,4 \pm 0,1$, $6,5 \pm 0,1$, $6,6 \pm 0,1$, $6,7 \pm 0,1$, $6,8 \pm 0,1$ или $6,9 \pm 0,1$.

В некоторых вариантах реализации DS_a составляет примерно $4,1 \pm 15\%$, примерно $4,2 \pm 15\%$, примерно $4,3 \pm 15\%$, примерно $4,4 \pm 15\%$ или примерно $4,5 \pm 15\%$, например примерно $4,1 \pm 10\%$, примерно $4,2 \pm 10\%$, примерно $4,3 \pm 10\%$, примерно $4,4 \pm 10\%$ или примерно $4,5 \pm 10\%$, например примерно $4,1 \pm 5\%$, примерно $4,2 \pm 5\%$, примерно $4,3 \pm 5\%$, примерно $4,4 \pm 5\%$ или примерно $4,5 \pm 5\%$. Например, в некоторых вариантах реализации DS_a составляет примерно $4,31 \pm 10\%$, примерно $4,32 \pm 10\%$, примерно $4,33 \pm 10\%$, примерно $4,34 \pm 10\%$, примерно $4,35 \pm 10\%$, примерно $4,36 \pm 10\%$ или примерно $4,37 \pm 10\%$, например примерно $4,31 \pm 5\%$, примерно $4,32 \pm 5\%$, примерно $4,33 \pm 5\%$, примерно $4,34 \pm 5\%$, примерно $4,35 \pm 5\%$, примерно $4,36 \pm 5\%$ или примерно $4,37 \pm 5\%$. В конкретных вариантах реализации DS_a составляет примерно $4,34 \pm 10\%$, например примерно $4,34 \pm 5\%$.

В некоторых вариантах реализации DS_a составляет примерно $4,3 \pm 15\%$, примерно $4,4 \pm 15\%$, примерно $4,5 \pm 15\%$, примерно $4,6 \pm 15\%$ или примерно $4,7 \pm 15\%$, например примерно $4,3 \pm 10\%$, примерно

4,4 ± 10%, примерно 4,5 ± 10%, примерно 4,6 ± 10% или примерно 4,7 ± 10%, например примерно 4,3 ± 5%, примерно 4,4 ± 5%, примерно 4,5 ± 5%, примерно 4,6 ± 5% или примерно 4,7 ± 5%. Например, в некоторых вариантах реализации DS_a составляет примерно 4,47 ± 10%, примерно 4,48 ± 10%, примерно 4,49 ± 10%, примерно 4,50 ± 10%, примерно 4,51 ± 10%, примерно 4,52 ± 10% или примерно 4,53 ± 10%, например примерно 4,47 ± 5%, примерно 4,48 ± 5%, примерно 4,49 ± 5%, примерно 4,50 ± 5%, примерно 4,51 ± 5%, примерно 4,52 ± 5% или примерно 4,53 ± 5%. В конкретных вариантах реализации DS_a составляет примерно 4,50 ± 10%, например примерно 4,50 ± 5%.

В некоторых вариантах реализации DS_a составляет примерно 6,1 ± 15%, примерно 6,2 ± 15%, примерно 6,3 ± 15%, примерно 6,4 ± 15% или примерно 6,5 ± 15%, например примерно 6,1 ± 10%, примерно 6,2 ± 10%, примерно 6,3 ± 10%, примерно 6,4 ± 10% или примерно 6,5 ± 10%, например примерно 6,1 ± 5%, примерно 6,2 ± 5%, примерно 6,3 ± 5%, примерно 6,4 ± 5% или примерно 6,5 ± 5%. Например, в некоторых вариантах реализации DS_a составляет примерно 6,34 ± 10%, примерно 6,35 ± 10%, примерно 6,36 ± 10%, примерно 6,37 ± 10%, примерно 6,38 ± 10%, примерно 6,39 ± 10% или примерно 6,40 ± 10%, например примерно 6,34 ± 5%, примерно 6,35 ± 5%, примерно 6,36 ± 5%, примерно 6,37 ± 5%, примерно 6,38 ± 5%, примерно 6,39 ± 5% или примерно 6,40 ± 5%. В конкретных вариантах реализации DS_a составляет примерно 6,37 ± 10%, например примерно 6,37 ± 5%.

В некоторых вариантах реализации DS_a составляет примерно 6,3 ± 15%, примерно 6,4 ± 15%, примерно 6,5 ± 15%, примерно 6,6 ± 15% или примерно 6,7 ± 15%, например примерно 6,3 ± 10%, примерно 6,4 ± 10%, примерно 6,5 ± 10%, примерно 6,6 ± 10% или примерно 6,7 ± 10%, например примерно 6,3 ± 5%, примерно 6,4 ± 5%, примерно 6,5 ± 5%, примерно 6,6 ± 5% или примерно 6,7 ± 5%. Например, в некоторых вариантах реализации DS_a составляет примерно 6,50 ± 10%, примерно 6,51 ± 10%, примерно 6,52 ± 10%, примерно 6,53 ± 10%, примерно 6,54 ± 10%, примерно 6,55 ± 10% или примерно 6,56 ± 10%, например примерно 6,50 ± 5%, примерно 6,51 ± 5%, примерно 6,52 ± 5%, примерно 6,53 ± 5%, примерно 6,54 ± 5%, примерно 6,55 ± 5% или примерно 6,56 ± 5%. В конкретных вариантах реализации DS_a составляет примерно 6,53 ± 10%, например примерно 6,53 ± 5%.

Распределение степени замещения внутри смеси незамещенных молекул бета-циклодекстрина и молекул бета-циклодекстрина, замещенных в одном или более гидроксильных положениях гидроксипропильными группами, может варьировать. Например, смесь равных частей бета-циклодекстринов, содержащих остатки глюкозы, каждый из которых замещен одной гидроксипропильной группой, и бета-циклодекстринов, содержащих остатки глюкозы, каждый из которых замещен двумя гидроксипропильными группами, имеет $DS_a = 10,5$ (среднее равных частей бета-циклодекстринов с $DS = 7$ и $DS = 14$). Несмотря на то, что $DS_a = 10,5$, в этом примере в смеси нет бета-циклодекстринов, имеющих $DS = 10$ или $DS = 11$. В других случаях большинство бета-циклодекстринов в смеси бета-циклодекстринов имеют DS , близкую к DS_a .

В некоторых вариантах реализации согласно настоящему описанию по меньшей мере примерно 50%, например по меньшей мере примерно 55, примерно 60, примерно 65, примерно 70, примерно 75, примерно 80, примерно 85, примерно 90, примерно 95 или примерно 97% бета-циклодекстринов в смеси имеют DS в диапазоне $DS_a \pm X\sigma$, где σ представляет собой стандартное отклонение и X равен 1, 2 или 3. Например, в некоторых вариантах реализации по меньшей мере примерно 50%, например по меньшей мере примерно 55, примерно 60, примерно 65, примерно 70, примерно 75, примерно 80, примерно 85, примерно 90, примерно 95 или примерно 97% бета-циклодекстринов в смеси имеют DS в диапазоне $DS_a \pm 1\sigma$. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере 70% бета-циклодекстринов имеют DS в диапазоне $DS_a \pm 1\sigma$. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере 90% бета-циклодекстринов имеют DS в диапазоне $DS_a \pm 1\sigma$. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере 95% бета-циклодекстринов имеют DS в диапазоне $DS_a \pm 1\sigma$.

В некоторых вариантах реализации по меньшей мере примерно 50%, например по меньшей мере примерно 55, примерно 60, примерно 65, примерно 70, примерно 75, примерно 80, примерно 85, примерно 90, примерно 95 или примерно 97% бета-циклодекстринов в смеси имеют DS в диапазоне $DS_a \pm 2\sigma$. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере 70% бета-циклодекстринов имеют DS в диапазоне $DS_a \pm 2\sigma$. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере 90% бета-циклодекстринов имеют DS в диапазоне $DS_a \pm 2\sigma$. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере 95% бета-циклодекстринов имеют DS в диапазоне $DS_a \pm 2\sigma$.

В некоторых вариантах реализации по меньшей мере примерно 50%, например по меньшей мере примерно 55, примерно 60, примерно 65, примерно 70, примерно 75, примерно 80, примерно 85, примерно 90, примерно 95 или примерно 97% бета-циклодекстринов в смеси имеют DS в диапазоне $DS_a \pm 3\sigma$. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере 70% бета-циклодекстринов имеют DS в диапазоне $DS_a \pm 3\sigma$. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере 90% бета-циклодекстринов имеют DS в диапазоне $DS_a \pm 3\sigma$. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере 95% бета-циклодекстринов имеют DS в диапазоне $DS_a \pm 3\sigma$.

В некоторых вариантах реализации МЗ составляет примерно 0,40, примерно 0,41, примерно 0,42, примерно 0,43, примерно 0,44, примерно 0,45, примерно 0,46, примерно 0,47, примерно 0,48, примерно 0,49, примерно 0,50, примерно 0,51, примерно 0,52, примерно 0,53, примерно 0,54, примерно 0,55, примерно 0,56, примерно 0,57, примерно 0,58, примерно 0,59, примерно 0,60, примерно 0,61, примерно 0,62, примерно 0,63, примерно 0,64, примерно 0,65, примерно 0,66, примерно 0,67, примерно 0,68, примерно 0,69, примерно 0,70, примерно 0,71, примерно 0,72, примерно 0,73, примерно 0,74, примерно 0,75, примерно 0,76, примерно 0,77, примерно 0,78, примерно 0,79 или примерно 0,80.

В некоторых вариантах реализации МЗ составляет примерно 0,571-0,686 (DS_a от примерно 4,0 до примерно 4,8). В некоторых из этих вариантов реализации МЗ находится в диапазоне от примерно 0,58 до примерно 0,68. В предпочтительных в настоящее время вариантах реализации МЗ находится в диапазоне 0,58-0,68.

В различных вариантах реализации МЗ составляет по меньшей мере примерно 0,55. В некоторых вариантах реализации МЗ составляет по меньшей мере примерно 0,56, 0,57, 0,58, 0,59 или 0,60. В некоторых вариантах реализации МЗ составляет не более примерно 0,70. В конкретных вариантах реализации МЗ составляет не более примерно 0,69, 0,68, 0,67, 0,66 или 0,65.

Гидроксипропильные группы могут быть связаны с бета-циклодекстринами в форме мономеров или сами могут быть последовательно связаны с одной или более дополнительными гидроксипропильными группами с образованием олигомеров гидроксипропила, которые затем присоединяются к бета-циклодекстринам. В некоторых вариантах реализации гидроксипропильные группы в гидроксильных положениях бета-циклодекстринов замещены гидроксипропильными цепями, имеющими структуру $-[CH_2CH(CH_3)O]_nH$, где $n \geq 1$ и среднее число гидроксипропильных цепей на бета-циклодекстрин составляет от примерно 3 до примерно 7, например от примерно 3 до примерно 6, от примерно 3 до примерно 5, от примерно 3 до примерно 4, от примерно 4 до примерно 7, от примерно 4 до примерно 6, от примерно 4 до примерно 5, от примерно 5 до примерно 7, от примерно 5 до примерно 6 или от примерно 6 до примерно 7. В некоторых вариантах реализации n равно 1, 2, 3 или 4.

В одном иллюстративном примере гидроксипропильная цепь, имеющая структуру $-CH_2CH(CH_3)OH$, содержит одну гидроксипропильную группу в гидроксипропильной цепи (т.е. $n = 1$). В другом иллюстративном примере гидроксипропильная цепь, имеющая структуру $-[CH_2CH(CH_3)O]_3H$, содержит три гидроксипропильные группы в гидроксипропильной цепи (т.е. $n = 3$).

В некоторых вариантах реализации среднее число гидроксипропильных цепей на бета-циклодекстрин составляет $3,3 \pm 0,3$, $3,4 \pm 0,3$, $3,6 \pm 0,3$ или $3,8 \pm 0,3$. В других вариантах реализации среднее число гидроксипропильных цепей на бета-циклодекстрин составляет $4,0 \pm 0,3$, $4,2 \pm 0,3$, $4,4 \pm 0,3$, $4,6 \pm 0,3$ или $4,8 \pm 0,3$. В других вариантах реализации среднее число гидроксипропильных цепей на бета-циклодекстрин составляет $5,0 \pm 0,3$, $5,2 \pm 0,3$, $5,4 \pm 0,3$, $5,6 \pm 0,3$ или $5,8 \pm 0,3$. А в других вариантах реализации среднее число гидроксипропильных цепей на бета-циклодекстрин составляет $6,0 \pm 0,3$, $6,2 \pm 0,3$, $6,4 \pm 0,3$, $6,6 \pm 0,3$ или $6,7 \pm 0,3$.

В некоторых вариантах реализации среднее число гидроксипропильных цепей на бета-циклодекстрин составляет $3,2 \pm 0,2$, $3,3 \pm 0,2$, $3,4 \pm 0,2$, $3,5 \pm 0,2$, $3,6 \pm 0,2$, $3,7 \pm 0,2$ или $3,8 \pm 0,2$. В других вариантах реализации среднее число гидроксипропильных цепей на бета-циклодекстрин составляет $4,0 \pm 0,2$, $4,1 \pm 0,2$, $4,2 \pm 0,2$, $4,3 \pm 0,2$, $4,4 \pm 0,2$, $4,5 \pm 0,2$, $4,6 \pm 0,2$, $4,7 \pm 0,2$ или $4,8 \pm 0,2$. В других вариантах реализации среднее число гидроксипропильных цепей на бета-циклодекстрин составляет $5,0 \pm 0,2$, $5,1 \pm 0,2$, $5,2 \pm 0,2$, $5,3 \pm 0,2$, $5,4 \pm 0,2$, $5,5 \pm 0,2$, $5,6 \pm 0,2$, $5,7 \pm 0,2$ или $5,8 \pm 0,2$. А в других вариантах реализации среднее число гидроксипропильных цепей на бета-циклодекстрин составляет $6,0 \pm 0,2$, $6,1 \pm 0,2$, $6,2 \pm 0,2$, $6,3 \pm 0,2$, $6,4 \pm 0,2$, $6,5 \pm 0,2$, $6,6 \pm 0,2$, $6,7 \pm 0,2$ или $6,8 \pm 0,2$.

В некоторых вариантах реализации среднее число гидроксипропильных цепей на бета-циклодекстрин составляет $3,1 \pm 0,1$, $3,2 \pm 0,1$, $3,3 \pm 0,1$, $3,4 \pm 0,1$, $3,5 \pm 0,1$, $3,6 \pm 0,1$, $3,7 \pm 0,1$, $3,8 \pm 0,1$ или $3,9 \pm 0,1$. В других вариантах реализации среднее число гидроксипропильных цепей на бета-циклодекстрин составляет $4,0 \pm 0,1$, $4,1 \pm 0,1$, $4,2 \pm 0,1$, $4,3 \pm 0,1$, $4,4 \pm 0,1$, $4,5 \pm 0,1$, $4,6 \pm 0,1$, $4,7 \pm 0,1$, $4,8 \pm 0,1$ или $4,9 \pm 0,1$. В других вариантах реализации среднее число гидроксипропильных цепей на бета-циклодекстрин составляет $5,0 \pm 0,1$, $5,1 \pm 0,1$, $5,2 \pm 0,1$, $5,3 \pm 0,1$, $5,4 \pm 0,1$, $5,5 \pm 0,1$, $5,6 \pm 0,1$, $5,7 \pm 0,1$, $5,8 \pm 0,1$ или $5,9 \pm 0,1$. А в других вариантах реализации среднее число гидроксипропильных цепей на бета-циклодекстрин составляет $6,0 \pm 0,1$, $6,1 \pm 0,1$, $6,2 \pm 0,1$, $6,3 \pm 0,1$, $6,4 \pm 0,1$, $6,5 \pm 0,1$, $6,6 \pm 0,1$, $6,7 \pm 0,1$, $6,8 \pm 0,1$ или $6,9 \pm 0,1$.

В некоторых вариантах реализации по меньшей мере примерно 50%, например примерно 55, примерно 60, примерно 65, примерно 70, примерно 75, примерно 80, примерно 85, примерно 90, примерно 95 или примерно 97% гидроксипропильных цепей имеют $n = 1$. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере 70% гидроксипропильных цепей имеют $n = 1$. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере 90% гидроксипропильных цепей имеют $n = 1$.

В некоторых вариантах реализации процентное содержание гидроксипропильных цепей, имеющих $n = 1$, составляет от примерно 50 до примерно 99%, например от примерно 55 до примерно 99%, от при-

примерно 25 до примерно 30%; например от примерно 5 до примерно 25%, от примерно 10 до примерно 25%, от примерно 15 до примерно 25%, от примерно 20 до примерно 25%; например от примерно 5 до примерно 20%, от примерно 10 до примерно 20%, от примерно 15 до примерно 20%; например от примерно 5 до примерно 15%, от примерно 10 до примерно 15% или, например, от примерно 5 до примерно 10%.

В некоторых вариантах реализации среднее число гидроксипропильных цепей на бета-циклодекстрин составляет от примерно 4 до примерно 6. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере примерно 60%, например по меньшей мере примерно 65%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 75%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95% или по меньшей мере примерно 97% бета-циклодекстринов в совокупности имеют среднее число гидроксипропильных цепей на бета-циклодекстрин от примерно 4 до примерно 6. В некоторых вариантах реализации процентное содержание бета-циклодекстринов, которые в совокупности имеют среднее число гидроксипропильных цепей на бета-циклодекстрин от примерно 4 до примерно 6, составляет от примерно 60 до примерно 97%, например от примерно 65 до примерно 97%, от примерно 70 до примерно 97%, от примерно 75 до примерно 97%, от примерно 80 до примерно 97%, от примерно 85 до примерно 97%, от примерно 90 до примерно 97%; например от примерно 60 до примерно 95%, от примерно 65 до примерно 95%, от примерно 70 до примерно 95%, от примерно 75 до примерно 95%, от примерно 80 до примерно 95%, от примерно 85 до примерно 95%, от примерно 90 до примерно 95%; например от примерно 60 до примерно 90%, от примерно 65 до примерно 90%, от примерно 70 до примерно 90%, от примерно 75 до примерно 90%, от примерно 80 до примерно 90%, от примерно 85 до примерно 90%; например от примерно 60 до примерно 85%, от примерно 65 до примерно 85%, от примерно 70 до примерно 85%, от примерно 75 до примерно 85%, от примерно 80 до примерно 85%; например от примерно 60 до примерно 80%, от примерно 65 до примерно 80%, от примерно 70 до примерно 80%, от примерно 75 до примерно 80%; например от примерно 60 до примерно 75%, от примерно 65 до примерно 75%, от примерно 70 до примерно 75%; например от примерно 60 до примерно 70%, от примерно 65 до примерно 70% или, например, от примерно 60 до примерно 65%.

6.2.1.2. Характеристические спектры замещения 6.2.1.2.1. DS-0.

В типичных вариантах реализации фармацевтически активный ингредиент содержит менее примерно 2%, например менее примерно 1,5, менее примерно 1,4, менее примерно 1,3, менее примерно 1,2, менее примерно 1,1, менее примерно 1,0, менее примерно 0,9, менее примерно 0,8, менее примерно 0,7, менее примерно 0,6, менее примерно 0,5, менее примерно 0,4, менее примерно 0,3, менее примерно 0,2, менее примерно 0,1, менее примерно 0,09, менее примерно 0,08, менее примерно 0,07, менее примерно 0,06 или менее примерно 0,05% незамещенного бета-циклодекстрина ("DS-0"; "НЦД"), как установлено по высоте пика на спектре, полученном методом МС с ионизацией электрораспылением.

В типичных вариантах реализации не более ("НБ") 1% смеси бета-циклодекстринов не замещено гидроксипропильной группой (НЦД), как установлено по высоте пика на спектре, полученном методом МС с ионизацией электрораспылением.

В некоторых вариантах реализации содержание незамещенных бета-циклодекстринов в фармацевтически активном ингредиенте составляет от примерно 0,05 до примерно 2%, например от примерно 0,05 до примерно 1,5%, от примерно 0,05 до примерно 1,4%, от примерно 0,05 до примерно 1,3%, от примерно 0,05 до примерно 1,2%, от примерно 0,05 до примерно 1,1%, от примерно 0,05 до примерно 1,0%, от примерно 0,05 до примерно 0,8%, от примерно 0,05 до примерно 0,6%, от примерно 0,05 до примерно 0,5%, от примерно 0,05 до примерно 0,4%, от примерно 0,05 до примерно 0,3%, от примерно 0,05 до примерно 0,2%, от примерно 0,05 до примерно 0,1%, от примерно 0,05 до примерно 0,07%, от примерно 0,07 до примерно 1,5%, от примерно 0,07 до примерно 1,4%, от примерно 0,07 до примерно 1,3%, от примерно 0,07 до примерно 1,2%, от примерно 0,07 до примерно 1,1%, от примерно 0,07 до примерно 1,0%, от примерно 0,07 до примерно 0,8%, от примерно 0,07 до примерно 0,6%, от примерно 0,07 до примерно 0,5%, от примерно 0,07 до примерно 0,4%, от примерно 0,07 до примерно 0,3%, от примерно 0,07 до примерно 0,2%, от примерно 0,07 до примерно 0,1%, от примерно 0,1 до примерно 1,5%, от примерно 0,1 до примерно 1,4%, от примерно 0,1 до примерно 1,3%, от примерно 0,1 до примерно 1,2%, от примерно 0,1 до примерно 1,1%, от примерно 0,1 до примерно 1,0%, от примерно 0,1 до примерно 0,8%, от примерно 0,1 до примерно 0,6%, от примерно 0,1 до примерно 0,5%, от примерно 0,1 до примерно 0,4%, от примерно 0,1 до примерно 0,3%, от примерно 0,1 до примерно 0,2%, от примерно 0,2 до примерно 1,5%, от примерно 0,2 до примерно 1,4%, от примерно 0,2 до примерно 1,3%, от примерно 0,2 до примерно 1,2%, от примерно 0,2 до примерно 1,1%, от примерно 0,2 до примерно 1,0%, от примерно 0,2 до примерно 0,8%, от примерно 0,2 до примерно 0,6%, от примерно 0,2 до примерно 0,5%, от примерно 0,2 до примерно 0,4%, от примерно 0,2 до примерно 0,3%, от примерно 0,3 до примерно 1,5%, от примерно 0,3 до примерно 1,4%, от примерно 0,3 до примерно 1,3%, от примерно 0,3 до примерно 1,2%, от примерно 0,3 до примерно 1,1%, от примерно 0,3 до примерно 1,0%, от примерно 0,3 до примерно 0,8%, от примерно 0,3 до примерно 0,6%, от примерно 0,3 до примерно 0,5%, от примерно 0,3 до примерно 0,4%, от примерно 0,4 до примерно 1,5%, от примерно 0,4 до примерно 1,4%, от примерно 0,4 до при-

мерно 1,3%, от примерно 0,4 до примерно 1,2%, от примерно 0,4 до примерно 1,1%, от примерно 0,4 до примерно 1,0%, от примерно 0,4 до примерно 0,8%, от примерно 0,4 до примерно 0,6%, от примерно 0,4 до примерно 0,5%, от примерно 0,5 до примерно 1,5%, от примерно 0,5 до примерно 1,4%, от примерно 0,5 до примерно 1,3%, от примерно 0,5 до примерно 1,2%, от примерно 0,5 до примерно 1,1%, от примерно 0,5 до примерно 1,0%, от примерно 0,5 до примерно 0,8%, от примерно 0,5 до примерно 0,6%, от примерно 0,6 до примерно 1,5%, от примерно 0,6 до примерно 1,4%, от примерно 0,6 до примерно 1,3%, от примерно 0,6 до примерно 1,2%, от примерно 0,6 до примерно 1,1%, от примерно 0,6 до примерно 1,0%, от примерно 0,6 до примерно 0,8%, от примерно 0,8 до примерно 1,5%, от примерно 0,8 до примерно 1,4%, от примерно 0,8 до примерно 1,3%, от примерно 0,8 до примерно 1,2%, от примерно 0,8 до примерно 1,1%, от примерно 0,8 до примерно 1,0%, от примерно 1,0 до примерно 1,5%, от примерно 1,0 до примерно 1,4%, от примерно 1,0 до примерно 1,3%, от примерно 1,0 до примерно 1,2%, от примерно 1,0 до примерно 1,1%, от примерно 1,1 до примерно 1,5%, от примерно 1,1 до примерно 1,4%, от примерно 1,1 до примерно 1,3%, от примерно 1,1 до примерно 1,2%, от примерно 1,2 до примерно 1,5%, от примерно 1,2 до примерно 1,4%, от примерно 1,2 до примерно 1,3%, от примерно 1,3 до примерно 1,5%, от примерно 1,3 до примерно 1,4% или от примерно 1,4% до примерно 1,5%.

В различных вариантах реализации композиция содержит не более примерно 0,01, не более примерно 0,02, не более примерно 0,03, не более примерно 0,04 или не более примерно 0,05% НЦД в смеси бета-циклодекстринов.

6.2.1.2.2. DS-1.

В типичных вариантах реализации менее 4% смеси бета-циклодекстринов представляет собой бета-циклодекстрин, замещенный только одной гидроксипропильной группой ("DS-1"), как установлено по высоте пика на спектре, полученном методом МС с ионизацией электрораспылением.

В различных вариантах реализации менее 3,9, менее 3,8, менее 3,7, менее 3,6 или менее 3,5% смеси бета-циклодекстринов представляет собой DS-1. В некоторых вариантах реализации фармацевтически активный ингредиент содержит менее 3,5, 3,4, 3,3, 3,2, 3,1 или 3,0% DS-1. В конкретных вариантах реализации фармацевтически активный ингредиент содержит менее 2,9, 2,8, 2,7, 2,6, 2,5, 2,4, 2,3, 2,2, 2,1 или 2,0% DS-1. В некоторых вариантах реализации смесь молекул бета-циклодекстрина содержит менее 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1 или 1,0% DS-1. В предпочтительных в настоящее время вариантах реализации фармацевтически активный ингредиент содержит менее 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1% DS-1, даже менее примерно 0,09, 0,08, 0,07, 0,06, 0,05, 0,04, 0,03% DS-1. В некоторых предпочтительных вариантах реализации композиция содержит менее 0,03%, даже настолько малое количество, как 0,02% DS-1.

В предпочтительных в настоящее время вариантах реализации композиция содержит менее примерно 0,05% НЦД и менее примерно 0,03% DS-1.

6.2.1.2.3. DS-2.

В различных вариантах реализации смесь бета-циклодекстринов имеет низкое процентное содержание бета-циклодекстрина, замещенного двумя гидроксипропильными группами ("DS-2"), определенное по высоте пика на спектре, полученном методом МС с ионизацией электрораспылением.

В различных вариантах реализации менее 3,9, менее 3,8, менее 3,7, менее 3,6 или менее 3,5% смеси бета-циклодекстринов представляет собой DS-2. В некоторых вариантах реализации фармацевтически активный ингредиент содержит менее 3,5, 3,4, 3,3, 3,2, 3,1 или 3,0% DS-2. В конкретных вариантах реализации фармацевтически активный ингредиент содержит менее 2,9, 2,8, 2,7, 2,6, 2,5, 2,4, 2,3, 2,2, 2,1 или 2,0% DS-2. В некоторых вариантах реализации смесь молекул бета-циклодекстринов содержит менее 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1 или 1,0% DS-2. В предпочтительных в настоящее время вариантах реализации фармацевтически активный ингредиент содержит менее 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1% DS-2, даже менее примерно 0,09, 0,08, 0,07, 0,06, 0,05, 0,04, 0,03% DS-2. В некоторых предпочтительных вариантах реализации композиция содержит менее 0,03%, даже настолько малое количество, как 0,02% DS-2.

6.2.1.2.4. DS-3.

В типичных вариантах реализации смесь содержит по меньшей мере 10% молекул бета-циклодекстринов, имеющих три гидроксипропильных заместителя ("DS-3") в процентном содержании в общей смеси, как установлено по высоте пика на спектре, полученном методом МС с ионизацией электрораспылением. В различных вариантах реализации по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24 или по меньшей мере 25% смеси бета-циклодекстринов представляет собой DS-3.

В различных вариантах реализации смесь содержит не более 30%, например не более 29, не более 28, не более 27, не более 26, не более 25, не более 24, не более 23, не более 22, не более 21, не более 20, не более 19, не более 18, не более 17, не более 16 или не более 15% DS-3 в процентном содержании в общей смеси.

В некоторых вариантах реализации процентное содержание DS-3 в общей смеси варьирует от 10 до

30%, например от 11 до 29%, от 12 до 28%, от 13 до 27%, от 14 до 26%, от 15 до 25%, от 16 до 24%, от 17 до 23%, от 18 до 22% или от 19 до 21%.

В различных вариантах реализации смесь содержит примерно 15, примерно 16, примерно 17, примерно 18, примерно 19, примерно 20, примерно 21, примерно 22, примерно 23, примерно 24 или примерно 25% DS-3.

6.2.1.2.5. DS-4.

В типичных вариантах реализации смесь содержит по меньшей мере 20% молекул бета-циклодекстринов, имеющих четыре гидроксипропильных заместителя ("DS-4"), в процентном содержании в общей смеси, как установлено по высоте пика на спектре, полученном методом МС с ионизацией электрораспылением. В различных вариантах реализации по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26, по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29, по меньшей мере 30, по меньшей мере 31, по меньшей мере 32, по меньшей мере 33, по меньшей мере 34 или по меньшей мере 35% смеси бета-циклодекстринов представляют собой DS-4.

В различных вариантах реализации смесь содержит не более 40%, например не более 39, не более 38, не более 37, не более 36, не более 35, не более 34, не более 33, не более 32, не более 31, не более 30, не более 29, не более 28, не более 27, не более 26 или не более 25% DS-4 в процентном содержании в общей смеси.

В некоторых вариантах реализации процентное содержание DS-4 в общей смеси варьирует от 20 до 40%, например от 21 до 39%, от 22 до 38%, от 23 до 37%, от 24 до 36%, от 25 до 35%, от 26 до 34%, от 27 до 33%, от 28 до 32% или от 29 до 31%.

В различных вариантах реализации смесь содержит примерно 25, примерно 26, примерно 27, примерно 28, примерно 29, примерно 30, примерно 31, примерно 32, примерно 33, примерно 34 или примерно 35% DS-4.

6.2.1.2.6. DS-5.

В типичных вариантах реализации смесь содержит по меньшей мере 15% молекул бета-циклодекстринов, имеющих пять гидроксипропильных заместителей ("DS-5") в процентном содержании в общей смеси, как установлено по высоте пика на спектре, полученном методом МС с ионизацией электрораспылением. В различных вариантах реализации по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26, по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29 или по меньшей мере 30% смеси бета-циклодекстринов представляет собой DS-5.

В различных вариантах реализации смесь содержит не более 35%, например не более 34, не более 33, не более 32, не более 31, не более 30, не более 29, не более 28, не более 27, не более 26, не более 25, не более 24, не более 23, не более 22, не более 21 или не более 20% DS-5 в процентном содержании в общей смеси.

В некоторых вариантах реализации процентное содержание DS-5 в общей смеси варьирует от 15 до 35%, например от 16 до 34%, от 17 до 33%, от 18 до 32%, от 19 до 31%, от 20 до 30%, от 21 до 29%, от 22 до 28%, от 23 до 27% или от 24 до 26%.

В различных вариантах реализации смесь содержит примерно 20, примерно 21, примерно 22, примерно 23, примерно 24, примерно 25, примерно 26, примерно 27, примерно 28, примерно 29 или примерно 30% DS-5.

6.2.1.2.7. DS-6.

В типичных вариантах реализации смесь содержит по меньшей мере 5% молекул бета-циклодекстринов, имеющих шесть гидроксипропильных заместителей ("DS-6"), в процентном содержании в общей смеси, как установлено по высоте пика на спектре, полученном методом МС с ионизацией электрораспылением. В различных вариантах реализации по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19 или по меньшей мере 20% смеси бета-циклодекстринов представляет собой DS-6.

В различных вариантах реализации смесь содержит не более 25%, например не более 24, не более 23, не более 22, не более 21, не более 20, не более 19, не более 18, не более 17, не более 16, не более 15, не более 14, не более 13, не более 12, не более 11 или не более 10% DS-6 в процентном содержании в общей смеси.

В некоторых вариантах реализации процентное содержание DS-6 в общей смеси варьирует от 5 до 25%, например от 6 до 24%, от 7 до 23%, от 8 до 22%, от 9 до 21%, от 10 до 20%, от 11 до 19%, от 12 до 18%, от 13 до 17% или от 14 до 16%.

В различных вариантах реализации смесь содержит примерно 7, примерно 8, примерно 9, примерно 10, примерно 11, примерно 12, примерно 13, примерно 14, примерно 15, примерно 16 или примерно 17% DS-6.

6.2.1.2.8. DS-7.

В типичных вариантах реализации менее 10% смеси бета-циклодекстринов представляет собой бета-циклодекстрин, замещенный семью гидроксипропильными группами ("DS-7"), в процентном содержании в общей смеси, как установлено по высоте пика на спектре, полученном методом МС с ионизацией электрораспылением. В различных вариантах реализации менее 9, менее 8, менее 7, менее 6, менее 5, менее 4, менее 3, менее 2 или менее 1% смеси бета-циклодекстринов представляет собой DS-7.

В некоторых вариантах реализации процентное содержание DS-7 в общей смеси варьирует от 1 до 10%, например от 2 до 9%, от 3 до 8%, от 4 до 7% или от 5 до 6%.

В различных вариантах реализации смесь содержит примерно 10, примерно 9, примерно 8, примерно 7, примерно 6, примерно 5, примерно 4, примерно 3, примерно 2 или примерно 1% DS-7.

6.2.1.2.9. DS-8.

В типичных вариантах реализации смесь бета-циклодекстринов содержит менее 2% бета-циклодекстрина, замещенного восемью гидроксипропильными группами ("DS-8"), в процентном содержании в общей смеси, как установлено по высоте пика на спектре, полученном методом МС с ионизацией электрораспылением. В различных вариантах реализации менее 1,5, менее 1,4, менее 1,3, менее 1,2, менее 1,1, менее 1, менее 0,9, менее 0,8, менее 0,7, менее 0,6, менее 0,5, менее 0,4, менее 0,3, менее 0,2, менее 0,1, менее 0,09, менее 0,08, менее 0,07, менее 0,06, менее 0,05, менее 0,04, менее 0,03, менее 0,02 или менее 0,01% бета-циклодекстринов представляет собой DS-8.

В некоторых вариантах реализации процентное содержание DS-8 в общей смеси варьирует от 0,01 до 2%, например от 0,02 до 1,9%, от 0,03 до 1,8%, от 0,04 до 1,7%, от 0,05 до 1,6%, от 0,06 до 1,5%, от 0,07 до 1,4%, от 0,08 до 1,3%, от 0,09 до 1,2%, от 0,1 до 1,1%, от 0,2 до 1%, от 0,3 до 0,9%, от 0,4 до 0,8% или от 0,5 до 0,7%.

В различных вариантах реализации смесь содержит примерно 1,5, примерно 1,4, примерно 1,3, примерно 1,2, примерно 1,1, примерно 1, примерно 0,9, примерно 0,8, примерно 0,7, примерно 0,6, примерно 0,5, примерно 0,4, примерно 0,3, примерно 0,2, примерно 0,1, примерно 0,09, примерно 0,08, примерно 0,07, примерно 0,06, примерно 0,05, примерно 0,04, примерно 0,03, примерно 0,02 или примерно 0,01% DS-8.

6.2.1.2.10. DS-9.

В типичных вариантах реализации не более 1% смеси бета-циклодекстринов представляет собой бета-циклодекстрин, замещенный девятью гидроксипропильными группами ("DS-9"), в процентном содержании в общей смеси, как установлено по высоте пика на спектре, полученном методом МС с ионизацией электрораспылением. В различных вариантах реализации не более 0,9, не более 0,8, не более 0,7, не более 0,6, не более 0,5, не более 0,4, не более 0,3, не более 0,2, не более 0,1, не более 0,09, не более 0,08, не более 0,07, не более 0,06, не более 0,05, не более 0,04, не более 0,03, не более 0,02 или не более 0,01% бета-циклодекстрина представляет собой DS-9.

6.2.1.2.11. DS-10.

В типичных вариантах реализации не более 1% смеси бета-циклодекстринов представляет собой бета-циклодекстрин, замещенный десятью гидроксипропильными группами ("DS-10"), в процентном содержании в общей смеси, как установлено по высоте пика на спектре, полученном методом МС с ионизацией электрораспылением. В различных вариантах реализации не более 0,9, не более 0,8, не более 0,7, не более 0,6, не более 0,5, не более 0,4, не более 0,3, не более 0,2, не более 0,1, не более 0,09, не более 0,08, не более 0,07, не более 0,06, не более 0,05, не более 0,04, не более 0,03, не более 0,02 или не более 0,01% бета-циклодекстрина представляет собой DS-10.

6.2.1.2.12. Профиль.

В различных вариантах реализации смесь бета-циклодекстринов содержит по меньшей мере 75% DS-3, DS-4, DS-5 и DS-6 в совокупности, в процентном содержании в общей смеси. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере 76, по меньшей мере 77, по меньшей мере 78, по меньшей мере 79, по меньшей мере 80, по меньшей мере 81, по меньшей мере 82, по меньшей мере 83, по меньшей мере 84, по меньшей мере 85, по меньшей мере 86, по меньшей мере 87, по меньшей мере 88, по меньшей мере 89, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97 или по меньшей мере 98% бета-циклодекстрина в смеси представляет собой DS-3, DS-4, DS-5 и DS-6 в совокупности.

В различных вариантах реализации смесь бета-циклодекстринов содержит DS-3, DS-4, DS-5 и DS-6 в совокупности, в процентном содержании в общей смеси в диапазоне от примерно 75 до примерно 98%, например от примерно 76 до примерно 97%, от примерно 77 до примерно 96%, от примерно 78 до примерно 95%, от примерно 79 до примерно 94%, от примерно 80 до примерно 93%, от примерно 81 до примерно 92%, от примерно 82 до примерно 91%, от примерно 83 до примерно 90%, от примерно 84 до примерно 89%, от примерно 85 до примерно 88% или от примерно 86 до примерно 87%.

В типичных вариантах реализации смесь бета-циклодекстринов содержит по меньшей мере 25% DS-5 и DS-6 в совокупности, в процентном содержании в общей смеси. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере 26, по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29, по меньшей мере 30, по меньшей мере 31, по меньшей мере 32, по меньшей мере 33, по меньшей мере 34, по мень-

шей мере 35, по меньшей мере 36, по меньшей мере 37, по меньшей мере 38, по меньшей мере 39, по меньшей мере 40, по меньшей мере 41, по меньшей мере 42, по меньшей мере 43, по меньшей мере 44, по меньшей мере 45, по меньшей мере 46, по меньшей мере 47, по меньшей мере 48, по меньшей мере 49 или по меньшей мере 50% бета-циклодекстрина в смеси представляет собой DS-5 и DS-6 в совокупности.

В различных вариантах реализации смесь бета-циклодекстринов содержит DS-5 и DS-6 в совокупности, в процентном содержании в общей смеси в диапазоне от примерно 25 до примерно 50%, например от примерно 26 до примерно 49%, от примерно 27 до примерно 48%, от примерно 28 до примерно 47%, от примерно 29 до примерно 46%, от примерно 30 до примерно 45%, от примерно 31 до примерно 44%, от примерно 32 до примерно 43%, от примерно 33 до примерно 42%, от примерно 34 до примерно 41%, от примерно 35 до примерно 40%, от примерно 36 до примерно 39% или от примерно 37 до примерно 38%.

В различных вариантах реализации бета-циклодекстриновые соединения, имеющие наибольшее процентное содержание в общей смеси, представляют собой DS-4.

6.2.1.3. Исходный материал.

В некоторых вариантах реализации в настоящем описании описана фармацевтическая композиция, где единственным фармацевтически активный ингредиент получают очисткой одного или более продукта гидроксипропил-бета-циклодекстрина, выбранного из Kleptose® HBP, Kleptose® HP, Trappsol® Cyclo и Cavasol® W7 HP Pharma.

Kleptose® HBP и Kleptose® HP представляют собой продукты гидроксипропил-бета-циклодекстрина, реализуемые Roquette Pharma, Лестрем, Франция. Kleptose® HBP представляет собой композицию гидроксипропил-бета-циклодекстринов для парентерального применения с контролируемым содержанием эндотоксина с DS_a , составляющей примерно 4,3. Kleptose® HP представляет собой композицию гидроксипропил-бета-циклодекстринов с контролируемым содержанием эндотоксина с более высокой DS_a , чем у Kleptose® HBP. Trappsol® Cyclo представляет собой композицию гидроксипропил-бета-циклодекстринов для парентерального применения с DS_a , составляющей примерно 6,37, и реализуется Sphingo Biotechnology, Inc., подразделением CTD Holdings, Inc., Алачуа, Флорида, США, в форме порошка или стерильной жидкости. Cavasol® W7 HP Pharma представляет собой композицию гидроксипропил-бета-циклодекстринов для парентерального применения с DS_a от примерно 4,1 до примерно 5,1, например DS_a , составляющей примерно 4,5, реализуемую Wacker Chemie AG, Мюнхен, Германия.

В иллюстративном примере фармацевтическая композиция представляет собой фармацевтическую композицию, в которой единственный фармацевтически активный ингредиент получают очисткой Kleptose® HBP. В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция представляет собой фармацевтическую композицию, в которой единственный фармацевтически активный ингредиент получают очисткой Kleptose® HBP (Roquette) с помощью гидрофильного взаимодействия, например, с помощью очистки ВЭЖХ или аффинной очистки, например аффинной хроматографии. В различных вариантах реализации фармацевтически активный ингредиент получают очисткой Kleptose® HBP (Roquette) с помощью одного или более способов, описанных в примерах 6, 7 и 9 в настоящем описании.

В различных вариантах реализации очистка обеспечивает получение порции или фракции Kleptose® HBP, имеющей повышенную активность, например повышенную аффинность к неэтерифицированному холестерину.

В других вариантах реализации фармацевтическая композиция представляет собой фармацевтическую композицию, в которой единственный фармацевтически активный ингредиент получают очисткой Trappsol® Cyclo (CTD) с помощью гидрофильного взаимодействия, например, с помощью очистки ВЭЖХ или аффинной очистки, например аффинной хроматографии. В различных вариантах реализации фармацевтически активный ингредиент получают очисткой Trappsol® Cyclo с помощью абсорбционной хроматографии на оксиде алюминия с помощью одного или более способов, описанных в примерах 6, 7 и 9 в настоящем описании.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция, полученная очисткой Trappsol® Cyclo (CTD), содержит смесь молекул бета-циклодекстрина, замещенных в одном или более гидроксильных положениях гидроксипропильными группами, необязательно включающую незамещенные молекулы бета-циклодекстрина, и разбавитель, который является фармацевтически приемлемым для интратекального, интрацеребровентрикулярного или внутривенного введения. Композиция содержит не более ("НБ") 5 ЕЭ эндотоксинов на 1 г смеси бета-циклодекстринов, не более 0,5% пропиленгликоля, где указанное содержание измерено методом ВЭЖХ, приведенным в статье Фармакопеи США на гидроксипропилбетадекс, и не более 1 ppm пропиленоксида, где указанное содержание определено в соответствии со статьей Фармакопеи США на гидроксипропилбетадекс.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция, полученная очисткой Trappsol® Cyclo (CTD), содержит НБ 1,5 ЕЭ эндотоксинов на 1 г смеси бета-циклодекстринов. В некоторых вариантах реализации композиция содержит не более 0,01% пропиленгликоля, где указанное содержание измерено методом ВЭЖХ, приведенным в статье Фармакопеи США на гидроксипропилбетадекс.

В некоторых вариантах реализации фармацевтически активный ингредиент, полученный очисткой Trappsol® Cyclo (CTD), содержит менее 5%, например менее 4,5, менее 4, менее 3,5, менее 3, менее 2,5, менее 2, менее 1,5, менее 1, менее 0,5 или менее 0,1% незамещенного бета-циклодекстрина ("DS-0"), бета-циклодекстрина, замещенного одной гидроксипропильной группой ("DS-1"), и бета-циклодекстрина, замещенного двумя гидроксипропильными группами ("DS-2"), в совокупности, как установлено по высоте пиков на спектре, полученном методом МС с ионизацией электрораспылением.

В некоторых вариантах реализации фармацевтически активный ингредиент, полученный очисткой Trappsol® Cyclo (CTD), содержит по меньшей мере 50%, например по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85 или по меньшей мере 90% бета-циклодекстрина, замещенного пятью гидроксипропильными группами ("DS-5"), бета-циклодекстрина, замещенного шестью гидроксипропильными группами ("DS-6"), и бета-циклодекстрина, замещенного семью гидроксипропильными группами ("DS-7"), в совокупности, как установлено по высоте пиков на спектре, полученном методом МС с ионизацией электрораспылением.

В некоторых вариантах реализации фармацевтически активный ингредиент, полученный очисткой Trappsol® Cyclo (CTD), содержит менее 5%, например менее 4,5, менее 4, менее 3,5, менее 3, менее 2,5, менее 2, менее 1,5, менее 1, менее 0,5 или менее 0,1% бета-циклодекстрина, замещенного девятью гидроксипропильными группами ("DS-9"), и бета-циклодекстрина, замещенного десятью гидроксипропильными группами ("DS-10"), в совокупности, как установлено по высоте пиков на спектре, полученном методом МС с ионизацией электрораспылением.

В остальных других вариантах реализации фармацевтическая композиция представляет собой фармацевтическую композицию, в которой единственный фармацевтически активный ингредиент получают очисткой Cavasol® W7 с помощью гидрофильного взаимодействия, например, с помощью очистки ВЭЖХ или аффинной очистки, например аффинной хроматографии. В различных вариантах реализации фармацевтически активный ингредиент получают очисткой Cavasol® W7 HP с помощью одного или более способов, описанных в примерах 6, 7 и 9 в настоящем описании.

В некоторых вариантах реализации очистка одного или более продуктов гидроксипропил-бета-циклодекстрина, выбранных из Kleptose® HBP, Kleptose® HP, Trappsol® Cyclo и Cavasol® W7 HP Pharma, включает одно или более из комплексообразования, осаждения и адсорбционной хроматографии. В некоторых вариантах реализации очистка включает один способ, например адсорбционную хроматографию. В некоторых вариантах реализации очистка включает два или более способов, например осаждение в комбинации с адсорбционной хроматографией. В случае, когда очистка включает два или более способов, используемых в комбинации, способы могут быть объединены в любом порядке для очистки продукта гидроксипропил-бета-циклодекстрина. В иллюстративном примере Kleptose® HBP или Trappsol® Cyclo сначала могут быть подвергнуты адсорбционной хроматографии, затем одна или более выбранных после хроматографической стадии фракций могут быть подвергнуты осаждению растворителем из системы растворителей для осаждения для обеспечения дополнительной очистки. В альтернативном примере Kleptose® HBP сначала может быть подвергнута осаждению растворителем из системы растворителей для осаждения, затем осадки могут быть подвергнуты адсорбционной хроматографии для обеспечения дополнительной очистки.

В некоторых вариантах реализации очистка одного или более продуктов гидроксипропил-бета-циклодекстрина, например Kleptose® HBP или Trappsol® Cyclo, приводит к повышению DS_a вследствие удаления незамещенных ($DS = 0$) и/или монозамещенных ($DS = 1$) бета-циклодекстринов. В иллюстративном примере коммерческий образец Kleptose® HBP, имеющий $DS_a = 4,34$, содержит 0,6% незамещенных бета-циклодекстринов ($DS = 0$) и 3,68% монозамещенных бета-циклодекстринов ($DS = 1$). DS_a после удаления соединений с $DS = 0$ и $DS = 1$ может быть вычислена с использованием следующих уравнений:

$$\begin{aligned}x(0) + y(1) + z(DS_a) &= 4,34 \\x + y + z &= 1\end{aligned}$$

где x = фракция незамещенных бета-циклодекстринов; y = фракция монозамещенных бета-циклодекстринов; z = фракция бета-циклодекстринов с $DS \geq 2$. В данном случае DS_a полученного образца после удаления бета-циклодекстринов, имеющих $DS = 0$ и $DS = 1$, составляет 4,5.

Соответственно в некоторых вариантах реализации в настоящем описании предложен способ очистки одного или более продуктов гидроксипропил-бета-циклодекстрина, выбранных из Kleptose® HBP, Kleptose® HP, Trappsol® Cyclo и Cavasol® W7 HP Pharma, в частности Kleptose® HBP или Trappsol® Cyclo, причем указанный способ очистки снижает количество пропиленгликоля или олигомеров пропиленгликоля (например, путем осаждения растворителем) и/или количество незамещенного бета-циклодекстрина ($DS = 0$) и/или количество монозамещенного бета-циклодекстрина ($DS = 1$) (например, с помощью адсорбционной хроматографии) в продукте. В некоторых из таких вариантов реализации, в которых количество незамещенного бета-циклодекстрина ($DS = 0$) и/или количество монозамещенного бета-циклодекстрина ($DS = 1$) в продукте снижено, очищенный продукт имеет повышенную DS_a . Таким

образом, в некоторых вариантах реализации в настоящем описании предложен способ повышения DS_a одного или более продуктов гидроксипропил-бета-циклодекстрина, выбранных из Kleptose® НВР, Kleptose® НР, Trappsol® Cyclo и Cavasol® W7 HP Pharma, в частности Kleptose® НВР или Trappsol® Cyclo, причем указанный способ включает снижение количества незамещенного бета-циклодекстрина ($DS = 0$) и/или монозамещенного бета-циклодекстрина ($DS = 1$) в продукте, например, согласно одной или более стадиям очистки, описанным в настоящем описании, таким как адсорбционная хроматография.

Хотя каждый из Kleptose® НВР, Kleptose® НР, Trappsol® Cyclo и Cavasol® W7 HP Pharma имеет указанную DS_a , согласно обсуждению выше DS_a представляет собой среднее значение, и таким образом каждый из этих продуктов гидроксипропил-бета-циклодекстрина состоит из гидроксипропил-бета-циклодекстринов с различными значениями DS . В некоторых вариантах реализации фармацевтически активный ингредиент, описанный в настоящем описании, получен с помощью выделения из одного или более из этих продуктов одной или более фракций гидроксипропил-бета-циклодекстрина с DS_a , описанной в настоящем описании.

6.2.2. Уровни эндотоксина.

В некоторых вариантах реализации фармацевтические композиции согласно настоящему описанию содержат низкий уровень бактериальных эндотоксинов. Низкий уровень бактериальных эндотоксинов позволяет вводить описанные фармацевтические композиции посредством определенных путей, например путем интратекального или интрацеребровентрикулярного введения, в течение более длительных периодов времени и в более высоких дозах, чем это может быть безопасно выполнено с применением других композиций, имеющих более высокие уровни эндотоксинов.

В контексте настоящего описания "МЕ" относится к международным единицам бактериального эндотоксина, также известным как единицы эндотоксина ("ЕЭ") согласно Фармокопее Соединенных Штатов (USP). Уровень бактериальных эндотоксинов (МЕ, в качестве синонима для ЕЭ) в композиции определяют с помощью реакции с лизатом амебоцитов мечехвоста в соответствии со способами, приведенными в "<85> Тесте на бактериальные эндотоксины" фармокопейной конвенцией Соединенных Штатов, Interim Revision Announcement, от 1 апреля 2011 г. ("статья USP на эндотоксин"), включенном в настоящее описание посредством ссылки во всей его полноте.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит менее примерно 10 МЕ, например менее примерно 6, примерно 5, примерно 4, примерно 3, примерно 2, примерно 1,5, примерно 1,2, примерно 1, примерно 0,8, примерно 0,6, примерно 0,5, примерно 0,4, примерно 0,3, примерно 0,2, примерно 0,1, примерно 0,07 или примерно 0,05 МЕ эндотоксина на 1 г фармацевтически активного ингредиента. В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит уровень бактериального эндотоксина в диапазоне от примерно 0,05 до примерно 10 МЕ, например от примерно 0,05 до примерно 6 МЕ, от примерно 0,05 до примерно 5 МЕ, от примерно 0,05 до примерно 4 МЕ, от примерно 0,05 до примерно 3 МЕ, от примерно 0,05 до примерно 2 МЕ, от примерно 0,05 до примерно 1,5 МЕ, от примерно 0,05 до примерно 1,2 МЕ, от примерно 0,05 до примерно 1 МЕ, от примерно 0,05 до примерно 0,8 МЕ, от примерно 0,05 до примерно 0,6 МЕ, от примерно 0,05 до примерно 0,5 МЕ, от примерно 0,05 до примерно 0,4 МЕ, от примерно 0,05 до примерно 0,3 МЕ, от примерно 0,05 до примерно 0,2 МЕ или от примерно 0,05 до примерно 0,1 МЕ эндотоксина на 1 г смеси бета-циклодекстринов.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит не более ("НБ") 5 ЭЕ/г смеси бета-циклодекстринов, НБ 4 ЭЕ/г смеси бета-циклодекстринов, НБ 3 ЭЕ/г смеси бета-циклодекстринов или не более 2 ЭЕ/г смеси бета-циклодекстринов. В предпочтительных вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит НБ 1,5 ЭЕ/г смеси бета-циклодекстринов. В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит НБ 1,4 ЭЕ/г смеси бета-циклодекстринов, НБ 1,3 ЭЕ/г смеси бета-циклодекстринов, НБ 1,2 ЭЕ/г смеси бета-циклодекстринов, НБ 1,1 ЭЕ/г смеси бета-циклодекстринов или НБ 1,0 ЭЕ/г смеси бета-циклодекстринов.

6.2.3. Технологические примеси.

Фармацевтические композиции, содержащие смеси гидроксипропил-бета-циклодекстринов, могут содержать примеси, возникающие в результате синтеза гидроксипропил-бета-циклодекстринов. Такие примеси могут содержать непрореагировавшие исходные вещества, такие как незамещенные бета-циклодекстрины и пропиленоксид, и побочные продукты реакции, такие как пропиленгликоль и олигомеры пропиленгликоля. В некоторых вариантах реализации фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, демонстрируют пониженные уровни одной или более из таких примесей.

6.2.3.1. Пропиленгликоль.

В некоторых вариантах реализации фармацевтически активный ингредиент содержит менее примерно 1%, например менее примерно 0,9, 0,8, 0,7, 0,6 или 0,5%, пропиленгликоля, где указанные содержания определены в соответствии со статьей Фармакопее США на гидроксипропилбетадекс. В различных вариантах реализации фармацевтически активный ингредиент содержит менее примерно 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1% пропиленгликоля, где указанные содержания определены в соответствии со статьей Фармакопее США на гидроксипропилбетадекс. В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит менее примерно 0,09, 0,08, 0,07% или менее примерно 0,05% пропиленгликоля, где ука-

занные содержания определены в соответствии со статьей Фармакопеи США на гидроксипропилбетадекс. В предпочтительных в настоящее время вариантах реализации фармацевтически активный ингредиент содержит не более 0,5% пропиленгликоля, где указанные содержания определены в соответствии со статьей Фармакопеи США на гидроксипропилбетадекс.

В некоторых вариантах реализации фармацевтически активный ингредиент содержит от примерно 0,05 до примерно 1% пропиленгликоля, например от примерно 0,05 до примерно 0,8%, от примерно 0,05 до примерно 0,6%, от примерно 0,05 до примерно 0,5%, от примерно 0,05 до примерно 0,4%, от примерно 0,05 до примерно 0,3%, от примерно 0,05 до примерно 0,2%, от примерно 0,05 до примерно 0,1%, от примерно 0,05 до примерно 0,07%, от примерно 0,07 до примерно 1%, от примерно 0,07 до примерно 0,8%, от примерно 0,07 до примерно 0,6%, от примерно 0,07 до примерно 0,5%, от примерно 0,07 до примерно 0,4%, от примерно 0,07 до примерно 0,3%, от примерно 0,07 до примерно 0,2%, от примерно 0,07 до примерно 0,1%, от примерно 0,1 до примерно 1%, от примерно 0,1 до примерно 0,8%, от примерно 0,1 до примерно 0,6%, от примерно 0,1 до примерно 0,5%, от примерно 0,1 до примерно 0,4%, от примерно 0,1 до примерно 0,3%, от примерно 0,1 до примерно 0,2%, от примерно 0,2 до примерно 1%, от примерно 0,2 до примерно 0,8%, от примерно 0,2 до примерно 0,6%, от примерно 0,2 до примерно 0,5%, от примерно 0,2 до примерно 0,4%, от примерно 0,2 до примерно 0,3%, от примерно 0,3 до примерно 1%, от примерно 0,3 до примерно 0,8%, от примерно 0,3 до примерно 0,6%, от примерно 0,3 до примерно 0,5%, от примерно 0,3 до примерно 0,4%, от примерно 0,4 до примерно 1%, от примерно 0,4 до примерно 0,8%, от примерно 0,4 до примерно 0,6%, от примерно 0,4 до примерно 0,5%, от примерно 0,5 до примерно 1%, от примерно 0,5 до примерно 0,8%, от примерно 0,5 до примерно 0,6%, от примерно 0,6 до примерно 1%, от примерно 0,6 до примерно 0,8% или от примерно 0,8 до примерно 1,0%, где указанные содержания определены в соответствии со статьей Фармакопеи США на гидроксипропилбетадекс.

В некоторых вариантах реализации фармацевтически активный ингредиент содержит менее примерно 0,01% мономеров пропиленгликоля, где указанное содержание определено в соответствии со статьей Фармакопеи США на гидроксипропилбетадекс. В некоторых вариантах реализации фармацевтически активный ингредиент содержит менее примерно 0,2% димеров пропиленгликоля, где указанное содержание определено в соответствии со статьей Фармакопеи США на гидроксипропилбетадекс. В некоторых вариантах реализации фармацевтически активный ингредиент содержит менее примерно 0,2% тримеров пропиленгликоля, где указанное содержание определено в соответствии со статьей Фармакопеи США на гидроксипропилбетадекс.

6.2.3.2. Пропиленоксид.

В некоторых вариантах реализации фармацевтически активный ингредиент содержит менее примерно 1 ppm, например менее примерно 0,8, менее примерно 0,6, менее примерно 0,5, менее примерно 0,4, менее примерно 0,3, менее примерно 0,2, менее примерно 0,1, менее примерно 0,07 или менее примерно 0,05 ppm пропиленоксида, где указанные содержания определены в соответствии со статьей Фармакопеи США на гидроксипропилбетадекс. Например, фармацевтически активный ингредиент может содержать примерно 1, примерно 0,8, примерно 0,6, примерно 0,5, примерно 0,4, примерно 0,3, примерно 0,2, примерно 0,1, примерно 0,07 или примерно 0,05 ppm пропиленоксида, где указанные содержания определены в соответствии со статьей Фармакопеи США на гидроксипропилбетадекс.

В некоторых вариантах реализации фармацевтически активный ингредиент содержит количества пропиленоксида в диапазоне от примерно 0,05 до примерно 1 ppm, такие как от примерно 0,05 до примерно 0,8, от примерно 0,05 до примерно 0,6, от примерно 0,05 до примерно 0,5, от примерно 0,05 до примерно 0,4, от примерно 0,05 до примерно 0,3, от примерно 0,05 до примерно 0,2, от примерно 0,05 до примерно 0,1, от примерно 0,1 до примерно 1, от примерно 0,1 до примерно 0,8, от примерно 0,1 до примерно 0,6, от примерно 0,1 до примерно 0,5, от примерно 0,1 до примерно 0,4, от примерно 0,1 до примерно 0,3, от примерно 0,1 до примерно 0,2, от примерно 0,2 до примерно 1, от примерно 0,2 до примерно 0,8, от примерно 0,2 до примерно 0,6, от примерно 0,2 до примерно 0,5, от примерно 0,2 до примерно 0,4, от примерно 0,2 до примерно 0,3, от примерно 0,3 до примерно 1, от примерно 0,3 до примерно 0,8, от примерно 0,3 до примерно 0,6, от примерно 0,3 до примерно 0,5, от примерно 0,3 до примерно 0,4, от примерно 0,4 до примерно 1, от примерно 0,4 до примерно 0,8, от примерно 0,4 до примерно 0,6, от примерно 0,4 до примерно 0,5, от примерно 0,5 до примерно 1, от примерно 0,5 до примерно 0,8, от примерно 0,5 до примерно 0,6, от примерно 0,6 до примерно 1, от примерно 0,6 до примерно 0,8 или примерно 0,8 до примерно 1 ppm, где указанные содержания определены в соответствии со статьей Фармакопеи США на гидроксипропилбетадекс.

6.2.4. Другие характеристики композиций.

В настоящем описании предложены композиции гидроксипропил-бета-циклодекстринов, содержащие фармацевтически активный ингредиент согласно настоящему описанию и, необязательно, один или более дополнительных терапевтических агентов, таких как комбинация терапевтических агентов, описанная в разделе 4.3.3.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит от примерно 100 до примерно 2000 мг, например от примерно 100 до примерно 1800, от примерно 100 до примерно 1600, от примерно 100 до примерно 1500, от примерно 100 до примерно 1200, от примерно 100 до примерно 1000,

от примерно 100 до примерно 800, от примерно 100 до примерно 600, от примерно 100 до примерно 500, от примерно 100 до примерно 400, от примерно 100 до примерно 300, от примерно 100 до примерно 200, от примерно 200 до примерно 2000, от примерно 200 до примерно 1800, от примерно 200 до примерно 1600, от примерно 200 до примерно 1500, от примерно 200 до примерно 1200, от примерно 200 до примерно 1000, от примерно 200 до примерно 800, от примерно 200 до примерно 600, от примерно 200 до примерно 500, от примерно 200 до примерно 400, от примерно 200 до примерно 300, от примерно 300 до примерно 2000, от примерно 300 до примерно 1800, от примерно 300 до примерно 1600, от примерно 300 до примерно 1500, от примерно 300 до примерно 1200, от примерно 300 до примерно 1000, от примерно 300 до примерно 800, от примерно 300 до примерно 600, от примерно 300 до примерно 500, от примерно 300 до примерно 400, от примерно 400 до примерно 2000, от примерно 400 до примерно 1800, от примерно 400 до примерно 1600, от примерно 400 до примерно 1500, от примерно 400 до примерно 1200, от примерно 400 до примерно 1000, от примерно 400 до примерно 800, от примерно 400 до примерно 600, от примерно 400 до примерно 500, от примерно 500 до примерно 2000, от примерно 500 до примерно 1800, от примерно 500 до примерно 1600, от примерно 500 до примерно 1500, от примерно 500 до примерно 1200, от примерно 500 до примерно 1000, от примерно 500 до примерно 800, от примерно 500 до примерно 600, от примерно 600 до примерно 2000, от примерно 600 до примерно 1800, от примерно 600 до примерно 1600, от примерно 600 до примерно 1500, от примерно 600 до примерно 1200, от примерно 600 до примерно 1000, от примерно 600 до примерно 800, от примерно 800 до примерно 2000, от примерно 800 до примерно 1800, от примерно 800 до примерно 1600, от примерно 800 до примерно 1500, от примерно 800 до примерно 1200 или от примерно 800 до примерно 1000 мг фармацевтически активного ингредиента. Например, фармацевтическая композиция может содержать примерно 100, примерно 200, примерно 300, примерно 400, примерно 500, примерно 600, примерно 800, примерно 1000, примерно 1200, примерно 1400, примерно 1500, примерно 1600, примерно 1800 или примерно 2000 мг фармацевтически активного ингредиента.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция для введения, например фармацевтическая композиция, подходящая для интратекального введения, имеет концентрацию от примерно 10 мг/мл до примерно 200 мг/мл, такую как от примерно 10 до примерно 180, от примерно 10 до примерно 150, от примерно 10 до примерно 120, от примерно 10 до примерно 100, от примерно 10 до примерно 80, от примерно 10 до примерно 60, от примерно 10 до примерно 50, от примерно 10 до примерно 40, от примерно 10 до примерно 30, от примерно 10 до примерно 20, от примерно 20 до примерно 200, от примерно 20 до примерно 180, от примерно 20 до примерно 150, от примерно 20 до примерно 120, от примерно 20 до примерно 100, от примерно 20 до примерно 80, от примерно 20 до примерно 60, от примерно 20 до примерно 50, от примерно 20 до примерно 40, от примерно 20 до примерно 30, от примерно 30 до примерно 200, от примерно 30 до примерно 180, от примерно 30 до примерно 150, от примерно 30 до примерно 120, от примерно 30 до примерно 100, от примерно 30 до примерно 80, от примерно 30 до примерно 60, от примерно 30 до примерно 50, от примерно 30 до примерно 40, от примерно 40 до примерно 200, от примерно 40 до примерно 180, от примерно 40 до примерно 150, от примерно 40 до примерно 120, от примерно 40 до примерно 100, от примерно 40 до примерно 80, от примерно 40 до примерно 60, от примерно 40 до примерно 50, от примерно 50 до примерно 200, от примерно 50 до примерно 180, от примерно 50 до примерно 150, от примерно 50 до примерно 120, от примерно 50 до примерно 100, от примерно 50 до примерно 80, от примерно 50 до примерно 60, от примерно 60 до примерно 200, от примерно 60 до примерно 180, от примерно 60 до примерно 150, от примерно 60 до примерно 120, от примерно 60 до примерно 100, от примерно 60 до примерно 80, от примерно 80 до примерно 200, от примерно 80 до примерно 180, от примерно 80 до примерно 150, от примерно 80 до примерно 120, от примерно 80 до примерно 100, от примерно 100 до примерно 200, от примерно 100 до примерно 180, от примерно 100 до примерно 150, от примерно 100 до примерно 120, от примерно 120 до примерно 200, от примерно 120 до примерно 180, от примерно 120 до примерно 150, от примерно 150 до примерно 200, от примерно 150 до примерно 180 или примерно 180 до примерно 200 мг/мл фармацевтически активного ингредиента. Например, фармацевтическая композиция может иметь концентрацию, составляющую примерно 10, примерно 20, примерно 30, примерно 40, примерно 50, примерно 60, примерно 70, примерно 80, примерно 90, примерно 100, примерно 110, примерно 120, примерно 130, примерно 140, примерно 150, примерно 160, примерно 170, примерно 180, примерно 190 или примерно 200 мг/мл фармацевтически активного ингредиента. В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция для интратекального введения имеет концентрацию, составляющую примерно 200 мг/мл фармацевтически активного ингредиента.

В некоторых вариантах реализации фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, демонстрируют низкий уровень ототоксичности в случае введения животному. В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция проявляет более низкую ототоксичность, чем Trappsol® Суclo. Ототоксичность может быть оценена *in vitro* посредством определения токсичности в отношении клетки кортиева органа (House Ear Institute-organ of Corti 1) (HEI-OC1) или *in vivo* с помощью исследования акустических стволовых вызванных потенциалов (АСВП) у животного, такого как мышь, крыса, кошка, собака, обезьяна, шимпанзе или человек; см., например, источник Leigh-Paffenroth, E. et al. "Ob-

jective Measures of Ototoxicity," Sept. 2005, vol. 9, No. 1, p. 10-16, in Perspectives on Hearing and Hearing Disorders: Research and Diagnostics, Special Interest Division 6 of the American Speech-Language-Hearing Association, включенный в настоящее описание посредством ссылки во всей его полноте.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция, например фармацевтическая композиция, подходящая для интратекального введения, имеет осмоляльность в диапазоне от примерно 300 до примерно 450 мОсм/кг, например от примерно 300 до примерно 400, от примерно 300 до примерно 350, от примерно 350 до примерно 450 или от примерно 350 до примерно 400 мОсм/кг. В некоторых вариантах реализации композиция имеет осмоляльность, составляющую примерно 300, примерно 320, примерно 350, примерно 380, примерно 400, примерно 420 или примерно 450 мОсм/кг.

Подходящие разбавители для фармацевтических композиций согласно настоящему описанию, например фармацевтических композиций, подходящих для интратекального или интрацеребровентрикулярного введения, включают изотонический солевой раствор. Композиции, такие как фармацевтическая композиция, подходящая для интратекального введения, также могут быть разбавлены раствором Elliotts B® (электролит для интратекального применения, содержащий буферный раствор/инъекция декстрозы, поставляемый Lukare Medical, LLC, Scotch Plains, Нью-Джерси, США).

В некоторых вариантах реализации фармацевтическую композицию для инъекций получают путем растворения активного фармацевтического ингредиента (смесь молекул бета-циклодекстрина) в воде, добавления хлорида натрия до 0,9% мас./об, и при необходимости доведения pH до 6,0-8,0 с помощью 0,01н. гидроксида натрия. Затем фармацевтическую композицию подвергают стерилизующей фильтрации во флаконы и автоклавируют. Продукт стабилен и может храниться при температуре 15-25°C.

Композиции обычно поставляют в составе стерильной фармацевтической композиции, которая обычно включает фармацевтически приемлемый носитель. Эта композиция может быть в любой подходящей форме (в зависимости от желаемого способа введения). Например, фармацевтическая композиция может быть приготовлена в виде водного раствора и введена путем интратекальной инъекции или интратекальной инфузии.

В некоторых вариантах реализации фармацевтические композиции включают формы с однократными дозами, которые содержат количество фармацевтически активного ингредиента согласно настоящему описанию в расчете на дозу. Такая единичная форма может содержать, например, но без ограничения, от примерно 5 мг до примерно 5 г, например от 5 мг до примерно 4 г, от 5 мг до примерно 3 г, от 5 мг до примерно 2 г, от 5 мг до примерно 1 г, от примерно 50 мг до примерно 5 г, от примерно 50 мг до примерно 4 г, от примерно 50 мг до примерно 3 г, от примерно 50 мг до примерно 2 г, от примерно 50 мг до примерно 1 г, от примерно 200 мг до примерно 5 г, от примерно 200 мг до примерно 4 г, от примерно 200 мг до примерно 3 г, от примерно 200 мг до примерно 2 г, от примерно 200 мг до примерно 1 г, от примерно 400 мг до примерно 5 г, от примерно 400 мг до примерно 4 г, от примерно 400 мг до примерно 3 г, от примерно 400 мг до примерно 2 г, от примерно 400 мг до примерно 1 г, от примерно 500 мг до примерно 5 г, от примерно 500 мг до примерно 4 г, от примерно 500 мг до примерно 3 г, от примерно 500 мг до примерно 2 г, от примерно 500 мг до примерно 1 г, от примерно 600 мг до примерно 5 г, от примерно 600 мг до примерно 4 г, от примерно 600 мг до примерно 3 г, от примерно 600 мг до примерно 2 г, от примерно 600 мг до примерно 1 г, от примерно 800 мг до примерно 5 г, от примерно 800 мг до примерно 4 г, от примерно 800 мг до примерно 3 г, от примерно 800 мг до примерно 2 г, от примерно 800 мг до примерно 1 г, от примерно 1 г до примерно 5 г, от примерно 1 г до примерно 4 г, от примерно 1 г до примерно 3 г, от примерно 1 г до примерно 2 г, от примерно 1200 мг до примерно 5 г, от примерно 1200 мг до примерно 4 г, от примерно 1200 мг до примерно 3 г, от примерно 1200 мг до примерно 2 г, от примерно 1400 мг до примерно 5 г, от примерно 1400 мг до примерно 4 г, от примерно 1400 мг до примерно 3 г, от примерно 1400 мг до примерно 2 г, от примерно 1600 мг до примерно 5 г, от примерно 1600 мг до примерно 4 г, от примерно 1600 мг до примерно 3 г, от примерно 1600 мг до примерно 2 г, от примерно 1800 мг до примерно 5 г, от примерно 1800 мг до примерно 4 г, от примерно 1800 мг до примерно 3 г или от примерно 1800 мг до примерно 2 г фармацевтически активного ингредиента. Конкретные варианты реализации включают однократные дозы, которые содержат примерно 900 мг, примерно 1200 мг и примерно 1800 мг фармацевтически активного ингредиента.

В некоторых вариантах реализации однократные дозы могут содержать между примерно 200 и примерно 900 мг фармацевтически активного ингредиента согласно настоящему описанию, например примерно 200, примерно 250, примерно 300, примерно 350, примерно 400, примерно 450, примерно 500, примерно 550, примерно 600, примерно 650, примерно 700, примерно 750, примерно 800, примерно 850 или примерно 900 мг фармацевтически активного ингредиента.

Фармацевтические композиции смесей гидроксипропил-бета-циклодекстринов согласно настоящему описанию могут быть получены для хранения в форме лиофилизированных составов или водных растворов путем смешивания фармацевтически активного ингредиента, имеющего желаемую степень чистоты, с, необязательно, фармацевтически-приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами, обычно применяемыми в данной области техники (все из которых упомянуты в настоящем описании как "носители"), т.е. буферные агенты, стабилизирующие агенты, консерванты, изотонирующие добавки, неионогенные детергенты, антиоксиданты и прочие другие добавки; см. Re-

mington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition (Osol, ed. 1980).

В некоторых вариантах реализации буферные агенты используют для поддержания pH в диапазоне, приближенном к физиологическим условиям, от примерно 2 до примерно 50 мМ, например от примерно 2 до примерно 40, от примерно 2 до примерно 30, от примерно 2 до примерно 20, от примерно 2 до примерно 10, от примерно 10 до примерно 50, от примерно 10 до примерно 40, от примерно 10 до примерно 30, от примерно 10 до примерно 20, от примерно 20 до примерно 50, от примерно 20 до примерно 40, от примерно 20 до примерно 30 или от примерно 40 до примерно 50 мМ. Например, один или более буферных агентов могут присутствовать в концентрации, составляющей примерно 2, примерно 5, примерно 10, примерно 15, примерно 20, примерно 25, примерно 30, примерно 35, примерно 40, примерно 45 или примерно 50 мМ. Подходящие буферные агенты для применения согласно настоящему описанию включают как органические, так и неорганические кислоты и их соли, такие как цитратные буферные растворы (например, смесь однозамещенного цитрата натрия-двузамещенного цитрата натрия, смесь лимонной кислоты-трехзамещенного цитрата натрия, смесь лимонной кислоты-однозамещенного цитрата натрия и т.д.), сукцинатные буферные растворы (например, смесь янтарной кислоты-однозамещенного сукцината натрия, смесь янтарной кислоты-гидроксида натрия, смесь янтарной кислоты-двузамещенного сукцината натрия и т.д.), буферные растворы тартрата (например, смесь винной кислоты-тартрата натрия, смесь винной кислоты-тартрата калия, смесь винной кислоты-гидроксида натрия и т.д.), буферные растворы фумарата (например, смесь фумаровой кислоты-однозамещенного фумарата натрия, смесь фумаровой кислоты-двузамещенного фумарата натрия, смесь однозамещенного фумарата натрия-двузамещенного фумарата натрия и т.д.), буферные растворы глюконата (например, смесь глюконовой кислоты-глюконата натрия, смесь глюконовой кислоты-гидроксида натрия, смесь глюконовой кислоты-глюконата калия и т.д.), оксалатный буферный раствор (например, смесь щавелевой кислоты-оксалата натрия, смесь щавелевой кислоты-гидроксида натрия, смесь щавелевой кислоты-оксалата калия и т.д.), лактатные буферные растворы (например, смесь молочной кислоты-лактата натрия, смесь молочной кислоты-гидроксида натрия, смесь молочной кислоты-лактата калия и т.д.) и ацетатные буферные растворы (например, смесь уксусной кислоты-ацетата натрия, смесь уксусной кислоты-гидроксида натрия и т.д.). Дополнительно могут быть использованы фосфатные буферные растворы, буферные растворы гистидина и соли триметиламина, такие как Трис.

В некоторых вариантах реализации для замедления микробного роста добавляют консерванты в количествах в диапазоне 0,01-1% (мас./об.), таких как 0,1-1%, 0,2-1%, 0,3-1%, 0,5-1%, 0,01-0,5%, 0,02-0,5%, 0,05-0,5%, 0,1-0,5%, 0,2-0,5% или 0,05-0,2% (мас./об.). Например, может быть добавлен консервант в количестве, составляющем примерно 0,02, примерно 0,05, примерно 0,1, примерно 0,2, примерно 0,5, примерно 0,8% (мас./об.). Подходящие консерванты для применения согласно настоящему описанию включают фенол, бензиновый спирт, мета-крезол, метилпарабен, пропилпарабен, хлорид октадецилдиметилбензиламмония, галогениды бензалкония (например, хлорид, бромид и иодид), хлорид гексаметония и алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцинол, циклогексанол и 3-пентанол.

В некоторых вариантах реализации изотонические добавки, иногда упоминаемые как "стабилизаторы", добавляют для обеспечения изотоничности жидких композиций согласно настоящему описанию, и изотонические добавки включают многоатомные сахароспирты, например трехатомные или высшие сахароспирты, такие как глицерин, эритрит, арабит, ксилит, сорбит и маннит. Стабилизаторы относятся к широкой категории вспомогательных веществ, функции которых могут варьировать от объемобразующего агента до добавки, которая солубилизует терапевтический агент или помогает предотвратить денатурацию или прилипание к стенке емкости. Типичные стабилизаторы могут представлять собой многоатомные сахароспирты (перечисленные выше); аминокислоты, такие как аргинин, лизин, глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аланин, орнитин, L-лейцин, 2-фенилаланин, глутаминовая кислота, треонин и т.д., органические сахара или сахароспирты, такие как лактоза, трегалоза, стахиоза, маннит, сорбит, ксилит, рибит, мионизит, галактит, глицерин и тому подобное, включая циклиты, такие как инозитол; полиэтиленгликоль; полимеры аминокислот; серосодержащие восстановители, такие как мочевины, глутатион, тиоктовая кислота, тиогликолят натрия, тиоглицерин, α -монотиоглицерин и тиосульфат натрия; полипептиды с низкой молекулярной массой (например, пептиды из 10 или менее остатков); белки, такие как человеческий сывороточный альбумин, бычий сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как моносахариды поливинилпирролидона, такие как ксилоза, манноза, фруктоза, глюкоза; дисахариды, такие как лактоза, мальтоза, сахароза и трисахариды, такие как раффиноза; и полисахариды, такие как декстран. В некоторых вариантах реализации стабилизаторы присутствуют в диапазоне от 0,1 до 10000 мас.ч. на массовую часть фармацевтически активного ингредиента, например от 0,1 до 1000, от 0,2 до 2000, от 0,5 до 5000, от 1 до 10000 или от 1 до 1000 мас.ч. на массовую часть фармацевтически активного ингредиента. Например, стабилизаторы могут присутствовать в количестве примерно 0,2, примерно 0,5, примерно 1, примерно 5, примерно 10, примерно 20, примерно 50, примерно 100, примерно 200, примерно 500, примерно 1000, примерно 2000, примерно 5000 или примерно 8000 мас.ч. на массовую часть фармацевтически активного ингредиента.

В некоторых вариантах реализации ионогенные поверхностно-активные вещества добавляют для облегчения солубилизации терапевтического агента, а также для защиты активного ингредиента от агре-

гации, вызванной взбалтыванием. В некоторых вариантах реализации неионогенные поверхностно-активные вещества или детергенты (также упоминаемые как "смачивающие агенты") добавляют для облегчения солюбилизации терапевтического агента, а также для защиты активного ингредиента от агрегации, вызванной взбалтыванием. Подходящие неионогенные поверхностно-активные вещества включают полисорбаты (20, 80 и т.д.), полиоксамеры (184, 188 и т.д.), поверхностно-активные многоатомные спирты, моноэфиры полиоксиэтиленсорбитана (TWEEN®-20, TWEEN®-80 и т.д.). В некоторых вариантах реализации неионогенные поверхностно-активные вещества присутствуют в диапазоне от примерно 0,05 до примерно 1,0 мг/мл, например от примерно 0,05 до примерно 0,2 мг/мл, от примерно 0,07 до примерно 0,2 мг/мл, от примерно 0,1 до примерно 0,3 мг/мл или от примерно 0,1 до примерно 0,5 мг/мл. Например, неионогенные поверхностно-активные вещества могут присутствовать в количествах примерно 0,05, примерно 0,07, примерно 0,08, примерно 0,1, примерно 0,2, примерно 0,3, примерно 0,4, примерно 0,5, примерно 0,6, примерно 0,8 или примерно 1,0 мг/мл.

Прочие дополнительные вспомогательные вещества включают объемобразующие агенты (например, крахмал), хелатирующие агенты (например, ЭДТА), антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту, метионин, витамин Е) и сорастворители.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция согласно настоящему описанию также содержит комбинацию терапевтических агентов, например второй терапевтический агент помимо фармацевтически активного ингредиента согласно настоящему описанию (смеси бета-циклодекстринов, описанной в настоящем описании). Примеры подходящей комбинации терапевтических агентов приведены ниже в разделе 4.3.3.

В некоторых вариантах реализации фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, солюбилизируют липиды в водной среде. Водная среда может представлять собой, например, дистиллированную воду или деионизированную воду или может представлять собой водную среду, например кровь, спинномозговую жидкость или лимфатическую жидкость, в теле субъекта. Солюбилизирующая способность композиций обычно может быть измерена с помощью пропускающих свойств раствора в УФ-области, контролируемых, например, с помощью спектрометрии в УФ-области или ВЭЖХ, с корреляцией между уменьшением пропускания и формированием суспензии в растворе. В некоторых вариантах реализации солюбилизируемые липиды включают неэтерифицированный или этерифицированный холестерин; метаболиты холестерина, например 7-кетохолестерол, 7 β -гидроксихолестерол, 24S-гидроксихолестерол, 25-гидроксихолестерол, 27-гидроксихолестерол и холестан-3 β ,5 α ,6 β -триол; сфинголипиды; гликолипиды; церамиды; ганглиозиды, например GM2 ((2S,3R,4E)-3-гидрокси-2-(октадеканоиламино)-октадек-4-ен-1-ил 2-ацетамидо-2-деокси- β -D-галактопиранозил-(1 \rightarrow 4)-[5-ацетамидо-3,5-дидеокси-D-глицеро- α -D-галактонон-2-улопиранозил-(2 \rightarrow 3)]- β -D-галактопиранозил-(1 \rightarrow 4)- β -D-глюкопиранозид) или GM3 (моносиалодигексозилганглиозид) или любую их комбинацию.

В контексте настоящего описания масса на объем ("масса/объем" или "мас./об.") раствора относится к массе растворенного вещества, растворенного в объеме воды. В иллюстративном примере 10% (мас./об.) раствор гидроксипропил-бета-циклодекстринов содержит 1 г растворенного вещества в 10 мл водного раствора. В другом примере 20% (мас./об.) раствор гидроксипропил-бета-циклодекстринов содержит 200 мг растворенного вещества в 1 мл водного раствора.

В некоторых вариантах реализации 1 мл 20% (мас./об.) раствора фармацевтически активного ингредиента, описанного в настоящем описании, солюбилизирует по меньшей мере 2 мг, например по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8 или по меньшей мере 10 мг неэтерифицированного холестерина в дистиллированной воде при комнатной температуре, при измерении, например, с помощью спектрометрии в УФ-области, через примерно 24 ч. В некоторых вариантах реализации примерно 200 мг фармацевтически активного ингредиента солюбилизирует по меньшей мере 2 мг, например по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8 или по меньшей мере 10 мг неэтерифицированного холестерина в дистиллированной воде при комнатной температуре при измерении через примерно 24 ч.

6.3. Способы лечения.

В настоящем описании предложены способы лечения болезни Ниманна-Пика типа С (БНПС), такой как болезнь Ниманна-Пика типа С1 (БНПС1) или болезнь Ниманна-Пика типа С2 (БНПС2), включающие введение субъекту с болезнью Ниманна-Пика терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции согласно настоящему описанию.

В контексте настоящего описания "субъект" представляет собой млекопитающее, такое как мышь, крыса, кошка, собака, корова, свинья, лошадь. В некоторых вариантах реализации млекопитающее представляет собой примата, такого как обезьяна, шимпанзе или человек. Например, субъект может представлять собой субъекта, являющегося человеком, т.е. пациента, являющегося человеком. В некоторых вариантах реализации пациент представляет собой педиатрического пациента или взрослого пациента. Педиатрические пациенты, являющиеся людьми, включают педиатрических пациентов с заболеванием, характеризующимся началом в раннем детском возрасте (в возрасте менее 2 лет), началом в позднем дет-

ском возрасте (в возрасте от 2 до менее чем 6 лет), началом в подростковом возрасте (в возрасте от 6 до менее чем 15 лет) и началом в юношеском возрасте (в возрасте 15 или более лет).

Термины "вводить", "введение" или "лечение" относятся к введению фармацевтической композиции, описанной в настоящем описании, для того, чтобы полезным образом модулировать уровень одного или более липидных биомаркеров или терапевтических эффектов, как описано в разделе 4.3.4, по сравнению с исходным уровнем. Типичная фаза лечения включает повторное введение фармацевтической композиции, описанной в настоящем описании, где значение одного или более используемых для оценки параметров согласно шкале тяжести БНПС, как определено в разделе 4.3.4.2, снижается по сравнению с предшествующим исходным значением.

Термины "поддерживать", "поддерживающий" или "поддержание" относятся к введению фармацевтической композиции, описанной в настоящем описании, для поддержания постоянного исходного уровня одного или более биологических эффектов, как описано в разделе 4.3.4. Поддерживающая фаза введения может предотвратить прогрессирование БНПС по сравнению с отсутствием введения или введением плацебо. Иллюстративный пример поддерживающей фазы представляет собой повторное введение фармацевтической композиции, описанной в настоящем описании, где значение одного или более используемых для оценки параметров согласно шкале тяжести БНПС, как определено в разделе 4.3.4.2, сохраняется на том же уровне, что исходное значение.

6.3.1. Введение фармацевтических композиций гидроксипропил-бета-циклодекстринов.

В некоторых вариантах реализации способ включает введение субъекту от примерно 200 до примерно 3000 мг, например от примерно 200 до примерно 2800, от примерно 200 до примерно 2600, от примерно 200 до примерно 2500, от примерно 200 до примерно 2400, от примерно 200 до примерно 2200, от примерно 200 до примерно 2000, от примерно 200 до примерно 1800, от примерно 200 до примерно 1600, от примерно 200 до примерно 1500, от примерно 200 до примерно 1200, от примерно 200 до примерно 1100, от примерно 200 до примерно 1000, от примерно 200 до примерно 800, от примерно 200 до примерно 700, от примерно 200 до примерно 600, от примерно 200 до примерно 500, от примерно 200 до примерно 400, от примерно 200 до примерно 300; примерно 300 до примерно 3000, от примерно 300 до примерно 2800, от примерно 300 до примерно 2600, от примерно 300 до примерно 2500, от примерно 300 до примерно 2400, от примерно 300 до примерно 2200, от примерно 300 до примерно 2000, от примерно 300 до примерно 1800, от примерно 300 до примерно 1600, от примерно 300 до примерно 1500, от примерно 300 до примерно 1200, от примерно 300 до примерно 1100, от примерно 300 до примерно 1000, от примерно 300 до примерно 800, от примерно 300 до примерно 700, от примерно 300 до примерно 600, от примерно 300 до примерно 500, от примерно 300 до примерно 400; например от примерно 400 до примерно 3000, от примерно 400 до примерно 2800, от примерно 400 до примерно 2600, от примерно 400 до примерно 2500, от примерно 400 до примерно 2400, от примерно 400 до примерно 2200, от примерно 400 до примерно 2000, от примерно 400 до примерно 1800, от примерно 400 до примерно 1600, от примерно 400 до примерно 1500, от примерно 400 до примерно 1200, от примерно 400 до примерно 1100, от примерно 400 до примерно 1000, от примерно 400 до примерно 800, от примерно 400 до примерно 700, от примерно 400 до примерно 600, от примерно 400 до примерно 500; например от примерно 500 до примерно 3000, от примерно 500 до примерно 2800, от примерно 500 до примерно 2600, от примерно 500 до примерно 2500, от примерно 500 до примерно 2400, от примерно 500 до примерно 2200, от примерно 500 до примерно 2000, от примерно 500 до примерно 1800, от примерно 500 до примерно 1600, от примерно 500 до примерно 1500, от примерно 500 до примерно 1200, от примерно 500 до примерно 1100, от примерно 500 до примерно 1000, от примерно 500 до примерно 800, от примерно 500 до примерно 700, от примерно 500 до примерно 600; например от примерно 600 до примерно 3000, от примерно 600 до примерно 2800, от примерно 600 до примерно 2600, от примерно 600 до примерно 2500, от примерно 600 до примерно 2400, от примерно 600 до примерно 2200, от примерно 600 до примерно 2000, от примерно 600 до примерно 1800, от примерно 600 до примерно 1600, от примерно 600 до примерно 1500, от примерно 600 до примерно 1200, от примерно 600 до примерно 1100, от примерно 600 до примерно 1000, от примерно 600 до примерно 800, от примерно 600 до примерно 700; например от примерно 700 до примерно 3000, от примерно 700 до примерно 2800, от примерно 700 до примерно 2600, от примерно 700 до примерно 2500, от примерно 700 до примерно 2400, от примерно 700 до примерно 2200, от примерно 700 до примерно 2000, от примерно 700 до примерно 1800, от примерно 700 до примерно 1600, от примерно 700 до примерно 1500, от примерно 700 до примерно 1200, от примерно 700 до примерно 1100, от примерно 700 до примерно 1000, от примерно 700 до примерно 800; например от примерно 800 до примерно 3000, от примерно 800 до примерно 2800, от примерно 800 до примерно 2600, от примерно 800 до примерно 2500, от примерно 800 до примерно 2400, от примерно 800 до примерно 2200, от примерно 800 до примерно 2000, от примерно 800 до примерно 1800, от примерно 800 до примерно 1600, от примерно 800 до примерно 1500, от примерно 800 до примерно 1200, от примерно 800 до примерно 1100, от примерно 800 до примерно 1000, от примерно 800 до примерно 1000; например от примерно 1000 до примерно 3000, от примерно 1000 до примерно 2800, от примерно 1000 до примерно 2600, от примерно 1000 до примерно 2500, от примерно 1000 до примерно 2400, от примерно 1000 до примерно 2200, от примерно 1000 до примерно 2000, от примерно 1000 до примерно 1800, от примерно 1000 до примерно 1600, от примерно 1000 до примерно 1500, от примерно

1000 до примерно 1200, от примерно 1000 до примерно 1100; например от примерно 1100 до примерно 3000, от примерно 1100 до примерно 2800, от примерно 1100 до примерно 2600, от примерно 1100 до примерно 2500, от примерно 1100 до примерно 2400, от примерно 1100 до примерно 2200, от примерно 1100 до примерно 2000, от примерно 1100 до примерно 1800, от примерно 1100 до примерно 1600, от примерно 1100 до примерно 1500, от примерно 1100 до примерно 1200; например от примерно 1200 до примерно 3000, от примерно 1200 до примерно 2800, от примерно 1200 до примерно 2600, от примерно 1200 до примерно 2500, от примерно 1200 до примерно 2400, от примерно 1200 до примерно 2200, от примерно 1200 до примерно 2000, от примерно 1200 до примерно 1800, от примерно 1200 до примерно 1600, от примерно 1200 до примерно 1500; например от примерно 1500 до примерно 3000, от примерно 1500 до примерно 2800, от примерно 1500 до примерно 2600, от примерно 1500 до примерно 2500, от примерно 1500 до примерно 2400, от примерно 1500 до примерно 2200, от примерно 1500 до примерно 2000, от примерно 1500 до примерно 1800, от примерно 1500 до примерно 1600; например от примерно 1600 до примерно 3000, от примерно 1600 до примерно 2800, от примерно 1600 до примерно 2600, от примерно 1600 до примерно 2500, от примерно 1600 до примерно 2400, от примерно 1600 до примерно 2200, от примерно 1600 до примерно 2000, от примерно 1600 до примерно 1800; например от примерно 1800 до примерно 3000, от примерно 1800 до примерно 2800, от примерно 1800 до примерно 2600, от примерно 1800 до примерно 2500, от примерно 1800 до примерно 2400, от примерно 1800 до примерно 2200, от примерно 1800 до примерно 2000; например от примерно 2000 до примерно 3000, от примерно 2000 до примерно 2800, от примерно 2000 до примерно 2600, от примерно 2000 до примерно 2500, от примерно 2000 до примерно 2400, от примерно 2000 до примерно 2200; например от примерно 2200 до примерно 3000, от примерно 2200 до примерно 2800, от примерно 2200 до примерно 2600, от примерно 2200 до примерно 2500, от примерно 2200 до примерно 2400; например от примерно 2400 до примерно 3000, от примерно 2400 до примерно 2800, от примерно 2400 до примерно 2600, от примерно 2400 до примерно 2500; например от примерно 2500 до примерно 3000, от примерно 2500 до примерно 2800, от примерно 2500 до примерно 2600; например от примерно 2600 до примерно 3000, от примерно 2600 до примерно 2800 или от примерно 2800 до примерно 3000 мг, фармацевтически активного ингредиента на одно введение.

В некоторых вариантах реализации схема введения состоит из введения один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в месяц, один раз в два месяца, или один раз в три месяца. Например, способ может включать введение субъекту примерно 200, примерно 300, примерно 400, примерно 500, примерно 600, примерно 700, примерно 800, примерно 900, примерно 1000, примерно 1200, примерно 1400, примерно 1500, примерно 1600, примерно 1800, примерно 2000, примерно 2200, примерно 2400, примерно 2500 или примерно 3000 мг фармацевтически активного ингредиента на одно введение.

В некоторых вариантах реализации введение производят в однократной дозе на одно введение. В других вариантах реализации фармацевтическую композицию вводят в отдельных дозах, с общей дозой, разделенной на две дозы, три дозы или даже четыре дозы на одно введение, например, в течение недели, двух недель, месяца, двух месяцев и т.д., в частности в течение двух недель. Композицию также могут вводить непрерывно или в любом эффективном диапазоне или значении в нем в зависимости от состояния, подлежащего лечению, пути введения и возраста, массы и состояния субъекта.

В некоторых вариантах реализации фармацевтические композиции согласно настоящему описанию являются подходящими для интратекального или интрацеребровентрикулярного введения. В некоторых вариантах реализации интратекальное введение фармацевтической композиции осуществляют через интратекальный порт. В некоторых из этих вариантов реализации порт представляет собой порт Celsite® (B. Braun Medical, Франция). В некоторых вариантах реализации интратекальное введение включает введение путем медленной интратекальной болюсной (1-2 мин, в зависимости от вводимого объема) инъекции с помощью люмбальной пункции (максимальная скорость введения = 4,5 мл/мин). В некоторых вариантах реализации выполнение люмбальной пункции включает использование нережущей иглы, такой как игла Whitecage или Sprotte, введение параллельно волокнам твердой мозговой оболочки и замену стилета перед удалением иглы. В некоторых вариантах реализации перед инъекцией удаляют объем спинномозговой жидкости, равный объему, подлежащему введению.

В другом иллюстративном примере интрацеребровентрикулярное введение может представлять собой введение с помощью резервуара Оммайя.

Для лечения БНПС, описанной в настоящем описании, эффективная доза фармацевтически активного ингредиента, смеси гидроксипропил-бета-циклодекстринов, может составлять от примерно 0,001 до примерно 1000 мг/кг, например от примерно 0,1 до примерно 1000, от примерно 1 до примерно 1000, от примерно 10 до примерно 1000, от примерно 20 до примерно 1000, от примерно 50 до примерно 1000, от примерно 100 до примерно 1000, от примерно 200 до примерно 1000, от примерно 300 до примерно 1000, от примерно 400 до примерно 1000, от примерно 500 до примерно 1000, от примерно 600 до примерно 1000, от примерно 800 до примерно 1000; например от примерно 0,1 до примерно 800, от примерно 1 до примерно 800, от примерно 10 до примерно 800, от примерно 20 до примерно 800, от примерно 50 до примерно 800, от примерно 100 до примерно 800, от примерно 200 до примерно 800, от примерно 300 до

примерно 800, от примерно 400 до примерно 800, от примерно 500 до примерно 800, от примерно 600 до примерно 800; например от примерно 0,1 до примерно 600, от примерно 1 до примерно 600, от примерно 10 до примерно 600, от примерно 20 до примерно 600, от примерно 50 до примерно 600, от примерно 100 до примерно 600, от примерно 200 до примерно 600, от примерно 300 до примерно 600, от примерно 400 до примерно 600, от примерно 500 до примерно 600; например от примерно 0,1 до примерно 500, от примерно 1 до примерно 500, от примерно 10 до примерно 500, от примерно 20 до примерно 500, от примерно 50 до примерно 500, от примерно 100 до примерно 500, от примерно 200 до примерно 500, от примерно 300 до примерно 500, от примерно 400 до примерно 500; например от примерно 0,1 до примерно 400, от примерно 1 до примерно 400, от примерно 10 до примерно 400, от примерно 20 до примерно 400, от примерно 50 до примерно 400, от примерно 100 до примерно 400, от примерно 200 до примерно 400, от примерно 300 до примерно 400; например от примерно 0,1 до примерно 300, от примерно 1 до примерно 300, от примерно 10 до примерно 300, от примерно 20 до примерно 300, от примерно 50 до примерно 300, от примерно 100 до примерно 300, от примерно 200 до примерно 300; например от примерно 0,1 до примерно 200, от примерно 1 до примерно 200, от примерно 10 до примерно 200, от примерно 20 до примерно 200, от примерно 50 до примерно 200, от примерно 100 до примерно 200; например от примерно 0,1 до примерно 100, от примерно 1 до примерно 100, от примерно 10 до примерно 100, от примерно 20 до примерно 100, от примерно 50 до примерно 100; например от примерно 0,1 до примерно 50, от примерно 1 до примерно 50, от примерно 10 до примерно 50, от примерно 20 до примерно 50; например от примерно 0,1 до примерно 20, от примерно 1 до примерно 20, от примерно 10 до примерно 20; например от примерно 0,1 до примерно 10, от примерно 1 до примерно 10 или от примерно 0,1 до примерно 1 мг/кг.

В некоторых вариантах реализации способ включает фазу лечения, где введение осуществляют каждую неделю, каждые две недели, каждые три недели или каждый месяц для уменьшения симптомов БНПС.

В некоторых вариантах реализации способ включает поддерживающую фазу, где введение осуществляют каждые три недели, каждый месяц, каждые два месяца или каждые три месяца для поддержания стабильного состояния заболевания.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическую композицию вводят в форме болюса, затем в постоянной поддерживающей дозе.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическую композицию вводят ежемесячно путем интратекального или интрацеребровентрикулярного введения. В некоторых вариантах реализации фармацевтическую композицию вводят непрерывно путем интратекального или интрацеребровентрикулярного введения.

В некоторых вариантах реализации способ включает фазу лечения, где пациенту вводят 900 мг фармацевтически активного ингредиента в качестве начальной дозы, и поддерживающую фазу, где менее 900 мг фармацевтически активного ингредиента вводят один раз в две недели путем интратекального введения.

6.3.2. Комплексные пути введения.

В некоторых вариантах реализации способ включает введение фармацевтически активного ингредиента с использованием комплексных путей введения. В некоторых вариантах реализации способ включает введение фармацевтически активного ингредиента (i) интратекально или путем интрацеребровентрикулярного введения и (ii) внутривенно. Эти варианты реализации полезны для снижения накопления холестерина как в центральной нервной системе, так и в периферических органах.

В некоторых вариантах реализации внутривенное введение включает введение пациенту от примерно 200 до примерно 4000 мг/кг смеси бета-циклодекстринов путем внутривенной инфузии в течение от 6 до 8 ч. В некоторых вариантах реализации внутривенное введение включает введение пациенту от примерно 500 до примерно 4000 мг/кг смеси бета-циклодекстринов путем внутривенной инфузии в течение от 6 до 8 ч.

В типичных вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит примерно 200 мг/мл смеси бета-циклодекстринов. В некоторых других вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит примерно 250 мг/мл смеси бета-циклодекстринов. В некоторых вариантах реализации фармацевтическую композицию вводят один раз в три дня, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в месяц, один раз в два месяца или один раз в три месяца. В некоторых вариантах реализации внутривенное введение начинают вскоре после рождения. В некоторых других вариантах реализации внутривенное введение начинают после начала интратекального (или интрацеребровентрикулярного) введения. В некоторых вариантах реализации контролируют объем печени, объем селезенки и/или активность ферментов печени пациента для определения эффективности лечения, а также для коррекции схемы введения.

6.3.3. Комбинированная терапия.

Ниже описаны способы комбинированной терапии, в которых необязательно могут быть применены фармацевтические композиции гидроксипропил-бета-циклодекстринов согласно настоящему описанию. В некоторых вариантах реализации комбинированные способы согласно настоящему описанию

включают введение субъекту по меньшей мере двух агентов, первый из которых представляет собой смесь гидроксипропил-бета-циклодекстринов, описанную в настоящем описании (например, в фармацевтической композиции, описанной в настоящем описании), а дополнительный агент (агенты) представляет собой комбинируемый терапевтический агент. Смесь гидроксипропил-бета-циклодекстринов и комбинируемый терапевтический агент (агенты) могут быть введены совместно (например, в фармацевтической композиции, описанной в настоящем описании), последовательно или отдельно.

Способы комбинированной терапии согласно настоящему описанию могут приводить к эффекту, превышающему аддитивный эффект, то есть синергетическому эффекту, например, обеспечивая терапевтическую пользу, превышающую ожидаемую суммарную пользу смеси гидроксипропил-бета-циклодекстринов и комбинируемого терапевтического агента, когда каждый из них вводят индивидуально.

В некоторых вариантах реализации смесь гидроксипропил-бета-циклодекстринов и комбинируемый терапевтический агент вводят одновременно, или совместно, или последовательно. В контексте настоящего описания считают, что смесь гидроксипропил-бета-циклодекстринов и комбинируемый терапевтический агент вводят последовательно, если их вводят субъекту в течение одного дня, например, в течение одного визита субъекта. Последовательное введение может быть осуществлено через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 ч. Напротив, считают, что смесь гидроксипропил-бета-циклодекстрина и комбинируемый терапевтический агент вводят отдельно, если их вводят субъекту в разные дни, например смесь гидроксипропил-бета-циклодекстринов и комбинируемый терапевтический агент могут быть введены с 1-дневным, 2-дневным или 3-дневным, 1-недельным, 2-недельным или месячным интервалами. В способах согласно настоящему описанию введение смеси гидроксипропил-бета-циклодекстринов может предшествовать введению или следовать за введением комбинируемого терапевтического агента.

В качестве неограничивающего примера смеси гидроксипропил-бета-циклодекстринов и комбинируемый терапевтический агент могут быть введены одновременно в течение определенного периода времени с последующим вторым периодом времени, в котором введение смеси гидроксипропил-бета-циклодекстрина и комбинируемого терапевтического агента чередуется.

Ввиду потенциального синергетического эффекта введения смеси гидроксипропил-бета-циклодекстринов и комбинируемого терапевтического агента такие агенты можно вводить в виде терапевтически эффективной комбинации в количествах, которые не являются терапевтически эффективными при отдельном введении одного или обоих из этих агентов.

В некоторых вариантах реализации комбинируемый терапевтический агент представляет собой витамин Е или его производное, средство ферментозаместительной терапии, стероид, ингибитор ферментов глюкозилтрансфераз, ингибитор гистоновой деацетилазы (HDAC) или активатор молекулярных шаперонов.

Витамин Е или производные витамина Е включают, но не ограничиваются ими, альфа-токоферол, дельта-токоферол и производные токоферола. В некоторых вариантах реализации производные витамина Е включают этерифицированные токоферолы, например токоферилацетат, и химически родственные производные токоферола, такие как описано в публикации РСТ № WO 2014/078573, включенной в настоящее описание посредством ссылки во всей ее полноте.

Средства ферментозаместительной терапии включают, но не ограничиваются ими, агалсидазу бета (Фабразим (Fabrazyme®)), имиглюцеразу (Церезим (Cerezyme®)), велаглюцеразу альфа (ВПРИВ (VPRIV™)), талиглюцеразу (Элелисо (Elelyso™)), алглюкозидазу альфа (Миозим (Myozyme®) или Люмизим (Lumizyme®)), ларонидазу (Альдуразим (Aldurazyme®)), внутривенную идурсульфазу (Элапразу (Elaprase®)) и галсульфазу (Наглазим (Naglazyme™)).

Стероиды включают, но не ограничиваются ими, нейростероиды, такие как аллопрегнанолон и гонаксолон.

Ингибиторы ферментов глюкозилтрансфераз включают, но не ограничиваются ими, ингибиторы глюкоцерамидсинтазы, такие как миглустат (Завеска (Zavesca®)).

Ингибиторы HDAC включают, но не ограничиваются ими, вориностат, ромидепсин, трихостатин А, вальпроат, бутират, трапоксины и апицидин.

Активаторы молекулярных шаперонов включают аримокломол, но не ограничиваются им.

6.3.4. Биологические эффекты способов.

6.3.4.1. Действие на биомаркеры.

В некоторых вариантах реализации способы лечения БНПС включают поддержание или модулирование уровней одного или более липидов, таких как неэтерифицированный холестерин или ганглиозиды, которые накапливаются в одном или более органах тела, например в головном мозге, и обуславливают симптомы заболевания. В некоторых вариантах реализации модулирование уровней одного или более липидов включает снижение уровней одного или более липидов. В некоторых вариантах реализации эффективность способов определяют с помощью измерения уровня накопления одного или более липидов до (исходный уровень) и после начала лечения. Например, в некоторых вариантах реализации описанные способы снижают уровни одного или более липидов на примерно 20, примерно 25, примерно 30, при-

85%, от примерно 75 до примерно 80%; например от примерно 80 до примерно 97%, от примерно 80 до примерно 95%, от примерно 80 до примерно 90%, от примерно 80 до примерно 85%; например от примерно 85 до примерно 97%, от примерно 85 до примерно 95%, от примерно 85 до примерно 90%; например от примерно 90 до примерно 97%, от примерно 90 до примерно 95% или от примерно 95 до примерно 97% относительно исходного уровня.

У пациентов с БНПС измерение уровня накопления одного или более липидов может быть осуществлено с помощью контроля одного или более биомаркеров в образце спинномозговой жидкости (СМЖ), плазмы или мочи. В некоторых вариантах реализации СМЖ используют для прямого определения уровня выведения одного или более липидов. В некоторых вариантах реализации контролируют биомаркер, который представляет собой подконтрольный белок, уровень которого модулируется вследствие изменения уровней одного или нескольких липидов. В некоторых вариантах реализации способ включает введение количества фармацевтически активного ингредиента, достаточного для модулирования, например снижения относительно исходного, уровня в спинномозговой жидкости одного или более из: белка тау, амилоидного пептида, легкого белка нейрофиламентов (NFL), глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), стерола, окистерола, активности хитотриозидазы, кальбиндина, белка лизосомальной мембраны 1 (LAMP-1), ганглиозидов GM2 или GM3, сфингозина и сфингозин-1-фосфата (S1P).

В некоторых вариантах реализации образцы плазмы используют для определения уровней одного или более липидов, например холестерина или метаболитов холестерина, присутствующих в крови до и после начала лечения. В некоторых вариантах реализации способ включает введение количества фармацевтически активного ингредиента, достаточного для модулирования, например снижения относительно исходного, уровня в плазме одного или более из 7-кетохолестерола, 7 β -гидроксихолестерола, 24S-гидроксихолестерола, 25-гидроксихолестерола, 27-гидроксихолестерола и холестан-3 β ,5 α ,6 β -триола.

Контроль других липидов, таких как метаболиты, подобные 3 β -сульфокси-7 β -N-ацетилглюкозаминил-5-холен-24-овой кислоте (SNAG- Δ^5 -CA), конъюгированной с глицином 3 β -сульфокси-7 β -N-ацетилглюкозаминил-5-холен-24-овой кислоте (SNAG- Δ^5 -CG) и конъюгированной с таурином 3 β -сульфокси-7 β -N-ацетилглюкозаминил-5-холен-24-овой кислоте (SNAG- Δ^5 -CT), о которых сообщалось, что они присутствуют в моче пациентов с БНПС1, может обеспечить пригодные для применения биомаркеры (Maekawa, M. et al. "Focused metabolomics using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry for analysis of urinary conjugated cholesterol metabolites from patients with Niemann-Pick disease type C and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency". *Annals of Clinical Biochemistry Online First*, published March 2, 2015). В некоторых вариантах реализации способ включает введение количества фармацевтически активного ингредиента, достаточного для модулирования, например снижения относительно исходного, уровня в моче одной или более из: 3 β -сульфокси-7 β -N-ацетилглюкозаминил-5-холен-24-овой кислоты (SNAG- Δ^5 -CA), конъюгированной с глицином 3 β -сульфокси-7 β -N-ацетилглюкозаминил-5-холен-24-овой кислоты (SNAG- Δ^5 -CG) и конъюгированной с таурином 3 β -сульфокси-7 β -N-ацетилглюкозаминил-5-холен-24-овой кислоты (SNAG- Δ^5 -CT).

6.3.4.2. Терапевтические эффекты.

В некоторых вариантах реализации способы согласно настоящему описанию оказывают благоприятное действие в отношении одного или более симптомов БНПС.

Одной из мер для характеристики и количественной оценки прогрессирования болезни НПС является использование шкалы тяжести БНПС, которая определяет клинические признаки и симптомы девяти основных используемых для оценки параметров (ходьбы, когнитивной деятельности, движения глаз, мелкой моторики, слуха, памяти, судорог, речи и глотания) и восьми второстепенных используемых для оценки параметров (акустических стволовых потенциалов, поведения, геластической катаплексии, гиперрефлексии, недержания, нарколепсии, психических и респираторных нарушений) (Yanjanin et al., "Linear Clinical Progression, Independent of Age of Onset, in Niemann-Pick Disease, Type C", *Am. J. Med. Genet. Part B* 153B:132-140 (2010)) ("Yanjanin 2010"). Общая оценка клинической тяжести (или "общая оценка") представляет собой совокупность всех значений каждого из основных и второстепенных используемых для оценки параметров и определяется суммой значений всех значений, используемых для оценки индивидуальных параметров, см. табл. 1 ниже; см. также фиг. 1.

Таблица 1

Шкала клинической тяжести БНПС (согласно Yanjanin, 2010)

Движение глаз	Значение	Ходьба	Значение
Нормальное движение глаз	0	Нормальная	0
Легкий вертикальный надъядерный паралич взора (ВНПВ), обнаруженный только врачом	1	Неловкость	1
Функциональный ВНПВ, отмеченный семьей, или компенсация движениями головы	2	Атаксическая походка без посторонней помощи или отсутствие ходьбы к 18 месяцам	2
Общий ВНПВ, могут присутствовать аномальные горизонтальные саккады	3	Ходьба с посторонней помощью или отсутствие ходьбы к 24 месяцам	4
Общая офтальмоплегия (вертикальные и горизонтальные саккады отсутствуют)	5	Перемещение в инвалидной коляске	5
Речь	Значение	Глотание	Значение
Нормальная речь	0	Нормальное, дисфагия отсутствует	0
Легкая дизартрия (легко понимаемая)	1	Кашель во время еды	1
Тяжелая дизартрия (затруднена для понимания)	2	Переменяющаяся дисфагия * жидкостей	+1
		твердой пищи	+1
Невербальные/функциональные навыки коммуникации при необходимости	3	Дисфагия* жидкостей	+2
		твердой пищи	+2
Минимальная коммуникация	5	Назогастральный зонд или желудочный зонд для дополнительного питания	4
		Питание только через назогастральный зонд или желудочный зонд	5
Мелкая моторика	Значение	Когнитивная деятельность	Значение
Нормальная	0	Нормальная	0
Незначительная дисметрия/дистония (независимые моторные навыки)	1	Легкая задержка в обучении в степени, соответствующей возрасту	1

Легкая дисметрия/дистония (не нуждается или нуждается в небольшой помощи, способен принимать пищу без затруднений)	2	Умеренная задержка в обучении, индивидуальный план обучения или измененные условия труда	3
Умеренная дисметрия/дистония (ограниченная мелкая моторика, затруднения при приеме пищи)	4	Тяжелая задержка/остановка, больше не посещает школу или не способен больше работать, некоторая утрата когнитивной функции	4
Тяжелая дисметрия/дистония (ограниченная общая моторика, нуждается в помощи для действий по уходу за собой)	5	Минимальная когнитивная функция	5
Слух (нейросенсорный)	Значение	Память	Значение
Нормальная слух (слуховой порог (СП) для всех тонов ≤ 15 дБ)	0	Нормальная	0
Потеря слуха на высоких частотах (СП с РТА** ≤ 15 дБ, СП > 15 дБ на высоких частотах)	1	Легкая утрата кратковременной и долговременной памяти	1
		Умеренная утрата кратковременной и долговременной памяти (может заблудиться)	2
Незначительная - легкая потеря слуха (СП с РТА 16–44 дБ)	2	Затруднения при выполнении команд	3
Умеренная потеря слуха (СП с РТА 45–70 дБ)	3	Неспособен выполнять команды или утрата кратковременной и долговременной памяти	4
Тяжелая потеря слуха (СП с РТА 71–90 дБ)	4		
Глубокая потеря слуха (СП с РТА > 90 дБ)	5	Минимальная память	5
Судороги	Значение		
Судороги отсутствуют в анамнезе	0		
Единичный судорожный приступ в анамнезе	1		
Редкие судороги	2		
Судороги, хорошо контролируемые медикаментами	3		
Судороги, сложно контролируемые медикаментами	5		
Модификаторы	Значение	Модификаторы	Значение
Геластическая катаплексия		Гиперрефлексия	
Отсутствие в анамнезе	0	Отсутствует	0
Определена в анамнезе	+1	Легкая (3+)	+1
Частая (каждый месяц)	+2	Тяжелая (+ клонус)	+2
Нарколепсия		Недержание	
Отсутствие в анамнезе	0	Нарушения отсутствуют	0
Определена в анамнезе	+1	Периодическое	+1
Частая (каждый месяц)	+2	Частое	+2
Поведение		Акустические стволовые потенциалы (АСП)	
Нарушения отсутствуют	0	Нормальные	0
СДВГ в анамнезе, агрессивен	+1	Аномальные	+1
Опасен для себя/других	+2	Отсутствуют	+2
Психиатрические нарушения отсутствуют	0	Дыхание	
Легкая форма депрессии в анамнезе	+1	Нарушения отсутствуют	0
Большая депрессия, галлюцинации или психотические эпизоды в анамнезе	+2	Пневмония в анамнезе	+1
		Пневмония > 2 раз/год или с активным терапевтическим вмешательством	+2

* Значение является аддитивным в пределах этих двух подпунктов.

** РТА (pure tone average) = среднее значение чистого тона, представленное на аудиограмме.

В некоторых вариантах реализации способ включает поддержание или снижение значений одного или более используемых для оценки параметров согласно шкале тяжести БНПС, выбранных из ходьбы, мелкой моторики, когнитивной деятельности, речи, глотания, движения глаз, памяти, слуха, судорог, акустических стволовых потенциалов, поведения, геластической катаплексии, гиперрефлексии, недержания, нарколепсии, психических и респираторных нарушений. В некоторых вариантах реализации способ включает поддержание или снижение значений одного или более используемых для оценки параметров согласно шкале тяжести БНПС, выбранных из ходьбы, мелкой моторики, когнитивной деятельности, речи, глотания, движения глаз, памяти, слуха и судорог. В некоторых вариантах реализации способ включает поддержание или снижение значений одного или более используемых для оценки параметров согласно шкале тяжести БНПС, выбранных из ходьбы, мелкой моторики, когнитивной деятельности,

речи, глотания, памяти и судорог. В некоторых вариантах реализации способ включает поддержание или снижение значений одного или более используемых для оценки параметров согласно шкале тяжести БНПС, выбранных из ходьбы, мелкой моторики, когнитивной деятельности и глотания.

В некоторых вариантах реализации лечение, которое улучшает состояние пациента, включает снижение значений одного или более используемых для оценки параметров согласно шкале тяжести БНПС в сравнении с исходной оценкой. В некоторых вариантах реализации снижение значения составляет от примерно 20 до примерно 95%, например от примерно 30 до примерно 95%, от примерно 40 до примерно 95%, от примерно 50 до примерно 95%, от примерно 60 до примерно 95%, от примерно 70 до примерно 95%, от примерно 80 до примерно 95%, от примерно 90% до примерно 95%; например от примерно 30 до примерно 90%, от примерно 40 до примерно 90%, от примерно 50 до примерно 90%, от примерно 60 до примерно 90%, от примерно 70 до примерно 90%, от примерно 80 до примерно 90%; например от примерно 20 до примерно 80%, от примерно 30 до примерно 80%, от примерно 40 до примерно 80%, от примерно 50 до примерно 80%, от примерно 60 до примерно 80%, от примерно 70 до примерно 80%; например от примерно 20 до примерно 70%, от примерно 30 до примерно 70%, от примерно 40 до примерно 70%, от примерно 50 до примерно 70%; например от примерно 20 до примерно 60%, от примерно 30 до примерно 60%, от примерно 40 до примерно 60%, от примерно 50 до примерно 60%; например от примерно 20 до примерно 50%, от примерно 30 до примерно 50%, от примерно 40 до примерно 50%; например от примерно 20 до примерно 40%, от примерно 30 до примерно 40% или от примерно 20 до примерно 30% в сравнении с исходной оценкой. Например, снижение оценки может составлять примерно 20, примерно 30, примерно 40, примерно 50, примерно 60, примерно 70, примерно 80, примерно 90 или примерно 95% в сравнении с исходной оценкой.

В некоторых вариантах реализации описанные способы снижают значение одного или более используемых для оценки параметров на $20 \pm 5\%$, $25 \pm 5\%$, $30 \pm 5\%$, $35 \pm 5\%$, $40 \pm 5\%$, $45 \pm 5\%$, $50 \pm 5\%$, $55 \pm 5\%$, $60 \pm 5\%$, $65 \pm 5\%$, $70 \pm 5\%$, $75 \pm 5\%$, $80 \pm 5\%$, $85 \pm 5\%$, $90 \pm 5\%$ или $95 \pm 5\%$ относительно исходного уровня.

В некоторых вариантах реализации описанные способы снижают значение одного или более используемых для оценки параметров на $20 \pm 3\%$, $25 \pm 3\%$, $30 \pm 3\%$, $35 \pm 3\%$, $40 \pm 3\%$, $45 \pm 3\%$, $50 \pm 3\%$, $55 \pm 3\%$, $60 \pm 3\%$, $65 \pm 3\%$, $70 \pm 3\%$, $75 \pm 3\%$, $80 \pm 3\%$, $85 \pm 3\%$, $90 \pm 3\%$, $95 \pm 3\%$ или $97 \pm 3\%$ относительно исходного уровня.

В некоторых вариантах реализации описанные способы снижают значение одного или более используемых для оценки параметров на $20\% \pm 2\%$, $25\% \pm 2\%$, $30\% \pm 2\%$, $35\% \pm 2\%$, $40 \pm 2\%$, $45 \pm 2\%$, $50 \pm 2\%$, $55 \pm 2\%$, $60 \pm 2\%$, $65 \pm 2\%$, $70 \pm 2\%$, $75 \pm 2\%$, $80 \pm 2\%$, $85 \pm 2\%$, $90 \pm 2\%$, $95 \pm 2\%$ или $97 \pm 2\%$ относительно исходного уровня.

В некоторых вариантах реализации лечение, которое улучшает состояние пациента, включает снижение общей оценки согласно шкале тяжести БНПС в сравнении с исходной общей оценкой. В некоторых вариантах реализации снижение общей оценки составляет от примерно 20 до примерно 97%, например от примерно 25 до примерно 97%, от примерно 30 до примерно 97%, от примерно 35 до примерно 97%, от примерно 40 до примерно 97%, от примерно 45 до примерно 97%, от примерно 50 до примерно 97%, от примерно 55 до примерно 97%, от примерно 60 до примерно 97%, от примерно 65 до примерно 97%, от примерно 70 до примерно 97%, от примерно 75 до примерно 97%, от примерно 80 до примерно 97%, от примерно 85 до примерно 97%, от примерно 90% до примерно 97%; например от примерно 20 до примерно 95%, от примерно 25 до примерно 95%, от примерно 30 до примерно 95%, от примерно 35 до примерно 95%, от примерно 40 до примерно 95%, от примерно 45 до примерно 95%, от примерно 50 до примерно 95%, от примерно 55 до примерно 95%, от примерно 60 до примерно 95%, от примерно 65 до примерно 95%, от примерно 70 до примерно 95%, от примерно 75 до примерно 95%, от примерно 80 до примерно 95%; например от примерно 20 до примерно 90%, от примерно 25 до примерно 90%, от примерно 30 до примерно 90%, от примерно 35 до примерно 90%, от примерно 40 до примерно 90%, от примерно 45 до примерно 90%, от примерно 50 до примерно 90%, от примерно 55 до примерно 90%, от примерно 60 до примерно 90%, от примерно 65 до примерно 90%, от примерно 70 до примерно 90%, от примерно 75 до примерно 90%, от примерно 80 до примерно 90%; например от примерно 20 до примерно 85%, от примерно 25 до примерно 85%, от примерно 30 до примерно 85%, от примерно 35 до примерно 85%, от примерно 40 до примерно 85%, от примерно 45 до примерно 85%, от примерно 50 до примерно 85%, от примерно 55 до примерно 85%, от примерно 60 до примерно 85%, от примерно 65 до примерно 85%, от примерно 70 до примерно 85%, от примерно 75 до примерно 85%, от примерно 80 до примерно 85%; например от примерно 20 до примерно 80%, от примерно 25 до примерно 80%, от примерно 30 до примерно 80%, от примерно 35 до примерно 80%, от примерно 40 до примерно 80%, от примерно 45 до примерно 80%, от примерно 50 до примерно 80%, от примерно 55 до примерно 80%, от примерно 60 до примерно 80%, от примерно 65 до примерно 80%, от примерно 70 до примерно 80%, от примерно 75 до примерно 80%; например от примерно 20 до примерно 75%, от примерно 25 до примерно 75%, от примерно 30 до примерно 75%, от примерно 35 до примерно 75%, от примерно 40 до примерно 75%, от при-

мерно 45 до примерно 75%, от примерно 50 до примерно 75%, от примерно 55 до примерно 75%, от примерно 60 до примерно 75%, от примерно 65 до примерно 75%, от примерно 70 до примерно 75%; например от примерно 20 до примерно 70%, от примерно 25 до примерно 70%, от примерно 30 до примерно 70%, от примерно 35 до примерно 70%, от примерно 40 до примерно 70%, от примерно 45 до примерно 70%, от примерно 50 до примерно 70%, от примерно 55 до примерно 70%, от примерно 60 до примерно 70%, от примерно 65 до примерно 70%; например от примерно 20 до примерно 65%, от примерно 25 до примерно 65%, от примерно 30 до примерно 65%, от примерно 35 до примерно 65%, от примерно 40 до примерно 65%, от примерно 45 до примерно 65%, от примерно 50 до примерно 65%, от примерно 55 до примерно 65%, от примерно 60 до примерно 65%; например от примерно 20 до примерно 60%, от примерно 25 до примерно 60%, от примерно 30 до примерно 60%, от примерно 35 до примерно 60%, от примерно 40 до примерно 60%, от примерно 45 до примерно 60%, от примерно 50 до примерно 60%, от примерно 55 до примерно 60%; например от примерно 20 до примерно 55%, от примерно 25 до примерно 55%, от примерно 30 до примерно 55%, от примерно 35 до примерно 55%, от примерно 40 до примерно 55%, от примерно 45 до примерно 55%, от примерно 50 до примерно 55%; например от примерно 20 до примерно 50%, от примерно 25 до примерно 50%, от примерно 30 до примерно 50%, от примерно 35 до примерно 50%, от примерно 40 до примерно 50%, от примерно 45 до примерно 50%; например от примерно 20 до примерно 45%, от примерно 25 до примерно 45%, от примерно 30 до примерно 45%, от примерно 35 до примерно 45%, от примерно 40 до примерно 45%; например от примерно 20 до примерно 40%, от примерно 25 до примерно 40%, от примерно 30 до примерно 40%, от примерно 35 до примерно 40%; например от примерно 20 до примерно 35%, от примерно 25 до примерно 35%, от примерно 30 до примерно 35%; например от примерно 20 до примерно 30%, от примерно 25 до примерно 30% или, например от примерно 20 до примерно 25% в сравнении с исходной общей оценкой. Например, снижение общей оценки согласно шкале тяжести БНПС может составлять примерно 20, примерно 25, примерно 30, примерно 35, примерно 40, примерно 45, примерно 50, примерно 55, примерно 60, примерно 65, примерно 70, примерно 75, примерно 80, примерно 85, примерно 90, примерно 95 или примерно 97 в сравнении с исходной общей оценкой.

В некоторых вариантах реализации описанные способы снижают общую оценку на $20 \pm 5\%$, $25 \pm 5\%$, $30 \pm 5\%$, $35 \pm 5\%$, $40 \pm 5\%$, $45 \pm 5\%$, $50 \pm 5\%$, $55 \pm 5\%$, $60 \pm 5\%$, $65 \pm 5\%$, $70 \pm 5\%$, $75 \pm 5\%$, $80 \pm 5\%$, $85 \pm 5\%$, $90 \pm 5\%$ или $95 \pm 5\%$ относительно исходного общего уровня.

В некоторых вариантах реализации описанные способы снижают общую оценку на $20 \pm 3\%$, $25 \pm 3\%$, $30 \pm 3\%$, $35 \pm 3\%$, $40 \pm 3\%$, $45 \pm 3\%$, $50 \pm 3\%$, $55 \pm 3\%$, $60 \pm 3\%$, $65 \pm 3\%$, $70 \pm 3\%$, $75 \pm 3\%$, $80 \pm 3\%$, $85 \pm 3\%$, $90 \pm 3\%$, $95 \pm 3\%$ или $97 \pm 3\%$ относительно исходного общего уровня.

В некоторых вариантах реализации описанные способы снижают общую оценку на $20 \pm 2\%$, $25 \pm 2\%$, $30 \pm 2\%$, $35 \pm 2\%$, $40 \pm 2\%$, $45 \pm 2\%$, $50 \pm 2\%$, $55 \pm 2\%$, $60 \pm 2\%$, $65 \pm 2\%$, $70 \pm 2\%$, $75 \pm 2\%$, $80 \pm 2\%$, $85 \pm 2\%$, $90 \pm 2\%$, $95 \pm 2\%$ или $97 \pm 2\%$ относительно исходного общего уровня.

В некоторых вариантах реализации поддерживающая фаза, в которой состояние пациента поддерживают постоянным, включает поддержание значения используемого для оценки параметра согласно шкале тяжести БНПС в диапазоне значений, сопоставимых с исходным значением. В некоторых вариантах реализации поддержание значения относится к значению в пределах примерно 15%, например в пределах примерно 10 или примерно 5% от значения на исходном уровне.

В некоторых вариантах реализации описанные способы приводят к значению, которое находится в пределах $5 \pm 3\%$, $10 \pm 3\%$ или $15 \pm 3\%$ относительно исходного значения. В некоторых вариантах реализации описанные способы приводят к значению, которое находится в пределах $5 \pm 2\%$, $10 \pm 2\%$ или $15 \pm 2\%$ относительно исходного значения.

В некоторых вариантах реализации поддерживающая фаза, в которой состояние пациента поддерживают постоянным, включает поддержание общей оценки согласно шкале тяжести БНПС в диапазоне значений, сопоставимых с исходной общей оценкой. В некоторых вариантах реализации поддержание общей оценки относится к общей оценке в пределах примерно 15%, например в пределах примерно 10 или примерно 5% от общей оценки на исходном уровне.

В некоторых вариантах реализации описанные способы приводят к общей оценке, которая находится в пределах $5 \pm 3\%$, $10 \pm 3\%$ или $15 \pm 3\%$ относительно исходной общей оценки. В некоторых вариантах реализации описанные способы приводят к общей оценке, которая находится в пределах $5 \pm 2\%$, $10 \pm 2\%$ или $15 \pm 2\%$ относительно исходной общей оценки.

Другие меры, которые могут быть применены для характеристики эффективности способов согласно настоящему описанию, включают глобальную область, включающую слепую общую клиническую оценку изменений врачом (CGI-Clinician) или общую клиническую оценку изменений лицом, осуществляющим уход (CGI-Caregiver) после лечения, тест на время "Встань и иди" (TUG), тест с 9 отверстиями и стержнями (9-HPT), показатели качества жизни, такие как оценка Национальных институтов здравоохранения США PROMIS-PRO (Система информации об оценке исходов пациентами - исходы по оценке пациентов) качества жизни лицом, осуществляющим уход.

Способы согласно настоящему описанию могут быть охарактеризованы клиническими мерами без-

опасности, которые включают одно или более из: характеристики и тяжести клинических неблагоприятных явлений; аудиологического тестирования, например, с помощью теста АСВП; клинических лабораторных исследований, например гематологии, клинической химии, коагуляции, анализа мочи, анализа СМЖ; показателей жизненно важных функций; результатов физического и неврологического обследования и электрокардиограмм.

6.3.5. Лечение других лизосомных болезней накопления.

Как показано в примере 8 (см. раздел 5.8.2.5), смеси гидроксипропил-бета-циклодекстринов, описанные в настоящем описании, оказывают значительное влияние на гены, связанные с аутофагией, демонстрируя, что фармацевтически активный ингредиент и фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, будут эффективны в улучшении некоторых последствий нарушений при других лизосомных болезнях накопления.

Соответственно в другом аспекте представлены способы для лечения лизосомных болезней накопления, отличных от болезни Ниманна-Пика типа С (БНПС), включающие введение субъекту, имеющему лизосомную болезнь накопления, отличную от БНПС, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, как описано в настоящем описании.

В различных вариантах реализации лизосомная болезнь накопления выбрана из аспартилглюкозаминурии, болезни Вольмана, цистиноза, болезни Данона, болезни Фабри, болезни Фарбера, фукозидоза, болезни Гоше, GM1-ганглиозидоза типов I/II/III, GM2-ганглиозидоза, альфа-маннозидоза типов I/II, бета-маннозидоза, метахроматической лейкодиетрофии, сиалидоза типов I/II, муколипидоза типа IV, синдрома Шейе, синдрома Хантера, синдрома Санфилиппо А, синдрома Санфилиппо В, синдрома Санфилиппо С, синдрома Санфилиппо D, галактосиалидоза типов I/II, болезни Краббе, болезни Сандхоффа, болезни Шпильмейера-Фогта, синдрома Херлера, болезни Ниманна-Пика, отличной от болезни Ниманна-Пика типа С, болезни I-клеток (муколипидоза типа II), псевдополидиетрофии Гурлер, синдрома Моркио, синдрома Марото-Лами, синдрома Слая, мукополисахаридоза типа IX, множественной сульфатазной недостаточности, болезни Баттена, болезни Тея-Сакса, болезни Помпе, болезни Баттена, болезни Баттена позднего детского возраста (late infantile), северной эпилепсии, пикнодизостоза, болезни Шиндлера, сиалурии и болезни Салла.

В некоторых вариантах реализации лизосомная болезнь накопления представляет собой болезнь Тея-Сакса, сфинголипидозы, болезнь Гоше, муколипидоз, галактосиалидоз, болезнь Салла, цистиноз, болезнь Данона, болезнь Фабри, болезнь Фарбера, липофусцинозы, болезнь Помпе, ганглиозидоз, болезни накопления сиаловой кислоты детского возраста (ISSD), болезнь Краббе, болезнь Ниманна-Пика, отличную от БНПС, лейкодиетрофию, болезнь Гурлер, болезнь Шейе, болезнь Хантера, болезнь Санфилиппо, болезнь Сандхоффа, болезнь Шиндлера, болезнь Баттена или болезнь Вольмана.

В дополнительном варианте реализации лизосомная болезнь накопления представляет собой болезнь Ниманна-Пика, отличную от БНПС, болезнь Тея-Сакса, болезнь Фабри, болезнь Фарбера, болезнь Санфилиппо, болезнь Баттена или болезнь Вольмана.

7. Примеры

Следующие примеры представлены в качестве пояснения и иллюстрации, а не ограничения.

7.1. Пример 1. Клиническое исследование фазы I для болезни Ниманна-Пика типа С.

Клиническое исследование фазы I было инициировано НИИ с применением поставляемых на рынок смесей гидроксипропил-бета-циклодекстринов для парентерального введения в соответствии со следующим протоколом.

7.1.1. Протокол.

В этом нерандомизированном открытом одноцентровом исследовании фазы I, проводимом НИИ, гидроксипропил-бета-циклодекстрин (Kleptose® НРВ, Roquette) вводят когортам, каждая из которых состоит из 3 пациентов, ранее не получавших медикаментозного лечения, интратекально путем люмбальной инъекции в начальных дозах, составляющих 200 мг, с последующим повышением до 300, 400 и 900 мг. Все пациенты в когорте (три пациента на когорту) получают ГП-бета-ЦД один раз в месяц в количестве по меньшей мере двух доз, и решение об увеличении дозы основывается на безопасности и биохимических данных. Последующие повышения дозы осуществляют с приращениями до 300 мг. Безопасность оценивают на основании неблагоприятных явлений (НЯ), аудиологической оценки, клинических лабораторных исследований, показателей жизненно важных функций, физического обследования, рентгенограммы грудной клетки, электрокардиограмм (ЭКГ). Биохимическую эффективность измеряют на основании изменений 24(S)-ГХ в плазме относительно исходных значений. Фармакокинетику (ФК) оценивают для ГП-бета-ЦД в плазме.

7.1.2. Лекарственный продукт (Kleptose® НРВ).

Продукт гидроксипропил-бета-циклодекстринов, который применяли в этом клиническом исследовании фазы I, представлял собой Kleptose® НРВ (Roquette, Франция) с DS_a, составляющей примерно 4,34 ± 10%.

7.1.3. Критерии включения.

Критериями правомерности включения пациента являлось следующее.

- 1) Возраст старше или равен 2 и менее или равен 25 годам на момент включения, любого пола и любой этнической принадлежности.
- 2) Диагноз БНПС1, основанный на одном из следующего:
 - a) две мутации NPC1;
 - b) положительный результат теста на окраску филиппином и по меньшей мере одна мутация NPC1;
 - c) вертикальный надъядерный паралич зрения (ВНПВ) в комбинации с любым:
 - i) одна мутация NPC1 или
 - ii) положительный результат теста на окраску филиппином и отсутствие мутаций NPC2.
- 3) Пациенты по меньшей мере с одним неврологическим проявлением БНПС1. Например, но не ограничиваясь ими, потерей слуха, вертикальным надъядерным параличом зрения, атаксией, деменцией, дистонией, судорогами, дизартрией или дисфагией.
- 4) Возможность неоднократно прибывать в КЦ НИН для оценки и последующего наблюдения.
- 5) В случае приема миглустата пациент должен принимать постоянную дозу лекарственного средства в течение не менее 3 месяцев до исходной оценки и должен быть готов поддерживать этот уровень дозы на протяжении всего исследования.
- 6) Готовность прекратить прием всех безрецептурных добавок, за исключением поливитаминов, соответствующих возрасту.
- 7) Женщины репродуктивного возраста должны быть готовы использовать эффективный способ контрацепции на протяжении всего исследования.
- 8) Готовность участвовать во всех аспектах дизайна исследования, включая периодическое взятие крови и СМЖ.

7.1.4. Критерии исключения.

Критериями правомерности исключения пациента являлось следующее.

- 1) Возраст младше 2 или старше 25 лет при включении в исследование.
- 2) Субъекты исключаются, если их масса может привести к уровню эндотоксина, превышающему 0,2 ЭЕ/кг при введении солевого раствора или лекарственного средства.
- 3) Тяжелые проявления БНПС1, которые мешали бы способности пациента соблюдать требования данного протокола.
- 4) Пациенты без неврологических симптомов.
- 5) Пациенты, получавшие любую форму циклодекстрина при попытке лечения БНПС1. Лечение с применением другого лекарственного препарата по другому медицинскому показанию, содержащего циклодекстрин в качестве вспомогательного вещества, не приводит к исключению пациента.
- 6) Реакции гиперчувствительности к циклодекстрину или компонентам состава в анамнезе.
- 7) Беременность или грудное вскармливание в любое время во время исследования.
- 8) Пациенты с подозрением на инфекцию ЦНС или любую системную инфекцию.
- 9) Деформация позвоночника, которая могла бы повлиять на возможность проведения люмбальной пункции.
- 10) Инфекция кожи в поясничной области.
- 11) Нейтропения, определяемая как абсолютное количество нейтрофилов (АКН) менее 1500.
- 12) Тромбоцитопения (количество тромбоцитов менее 75000 на 1 мм^3).
- 13) Подтверждение нарушения циркуляции СМЖ.
- 14) Противопоказания к анестезии.
- 15) Предшествующее применение антикоагулянтов или анамнез/наличие нарушения свертываемости крови с повышенным риском клинического кровотечения или МНО более 2.
- 16) Пациенты с клиническим подтверждением острого заболевания печени, имеющие симптомы желтухи или боль в правом верхнем квадранте.
- 17) Наличие анемии, определяемое как два стандартных отклонения ниже нормы согласно возрасту и полу.
- 18) Для субъектов в возрасте 18 лет и старше СКФ автоматически рассчитывается и сообщается лабораторией КЦ НИН с использованием формулы СКД-ЕРІ-креатинин 2009. Субъектов в возрасте 18 лет или старше исключают, если СКФ менее или равна $60 \text{ мл/мин/1,73 м}^2$. Для субъектов в возрасте < 18 лет используют калькулятор NKDEP (<http://www.nkdep.nih.gov/lab-evaluation/gfr-calculators/children-conventional-unit.shtml>). Результаты представляют как $> 75 \text{ мл/мин/1,73 м}^2$ или ниже. Субъектов в возрасте < 18 лет исключают, если СКФ менее или равна $75,15 \text{ мл/мин/1,73 м}^2$.
- 19) Гематурия по одному анализу мочи, определенная Американской ассоциацией урологов (AUA) как пять или более красных клеток крови в поле зрения под большим увеличением (или $> 25/\text{мкл}$) при микроскопической оценке осадка мочи из образца мочи для анализа, собранного надлежащим образом. Пациент не будет исключен, если 2 последующих образца мочи будут иметь отрицательный результат анализа на гематурию в соответствии с определением AUA.
- 20) Протеинурия (белок 1+ при анализе мочи), если только она не оценена и не классифицирована как доброкачественная первичным медицинским учреждением пациента или консультантом НИН по нефрологии или в контексте нормального отношения белок-креатинин в моче и при отсутствии клинических

симптомов (отека, гипертонии).

21) Активное заболевание легких, потребность в кислороде или клинически значимый анамнез сниженного насыщения крови кислородом, легочная терапия или необходимость активного дренажа.

22) Пациенты, неспособные пройти поведенческую аудиологическую оценку, включая оценку порога чистого тона (от 500 до 8000 Гц) для контроля ототоксичности, и для которых не может быть надежно получена ОАЭ (отоакустическая эмиссия) на исходном уровне.

23) Пациенты с продолжающимися судорогами, которые нестабильны по частоте, типу или продолжительности в течение 2-месячного периода перед включением, которым требуется изменение дозы противоэпилептических лекарственных средств (отличных от корректировки на массу) в течение 2-месячного периода перед включением или которым требуется 3 или более противоэпилептических лекарственных средств для контроля судорог.

24) Пациенты, которые по мнению исследователей не могут соблюдать протокол или имеют определенные проблемы со здоровьем, которые потенциально могли бы увеличить риск участия.

7.1.5. Первоначальный анализ клинических данных.

Первоначальные данные этого исследования наряду с дополнительными данными по индивидуальным IND в другой организации, где также используют интратекальное введение Kleptose® НРВ ("I-IND"), анализировали следующим образом.

7.1.5.1. Обобщенный анализ первоначальных данных.

Авторы изобретения провели анализ, чтобы изучить скорость изменения оценки клинической тяжести БНПС и ее основных проявлений в совокупности данных, которые включают как субъектов НИН, так и трех субъектов из исследования I-IND в другой организации. Основные выводы перечислены ниже.

При сравнении табл. 2 и 3 (см. ниже) доза препарата влияет на скорость изменения оценки клинической тяжести БНПС и ее проявлений с наиболее глубокими изменениями, наблюдаемыми для слуха.

Циклодекстрин в целом понижает скорость снижения оценки клинической тяжести БНПС и ее компонентов (табл. 4) (ниже). Это справедливо для всех компонентов, за исключением движения глаз, слуха и судорог.

При ограничении до сравнения циклодекстрина с исследованием НИН естественного течения для субъектов НИН (табл. 5) распределение также согласуется с тем, что снижение в группе циклодекстрина происходит с меньшей скоростью, за исключением движения глаз.

Результаты первоначального анализа данных клинических исследований фазы I обобщены на фиг. 2 и 3.

7.1.5.2. Методы анализа.

Цель анализа, приведенного ниже, заключалась в том, чтобы понять изменения с течением времени у двенадцати субъектов исследования НИН фазы 1 (идентификаторы которых начинаются с "CDA") и трех субъектов из другого исследовательского центра, также получающих лечение с интратекальным применением Kleptose® НРВ (идентификаторы которых начинаются с "I-IND"). Следующие результаты относятся к 15 субъектам, получавшим гидроксипропил-бета-циклодекстрин. Субъекты CDA113 и CDA114 не включены в следующий анализ, поскольку они еще не получили дозу гидроксипропил-бета-циклодекстрина. Четыре (4) из 15 субъектов имеют доступные данные на исходном уровне и через 6 месяцев (субъекты CDA110, CDA111, CDA112 и I-IND-3); остальные 11 субъектов имеют доступные данные на исходном уровне через 6 и 12 месяцев (CDA101-CDA109, I-IND-1).

Авторы настоящего изобретения использовали линейную смешанную модель для получения углового коэффициента изменений с течением времени. Слово смешанная в "линейной смешанной модели" использовано для обозначения того факта, что модель включает как "фиксированные", так и "случайные" эффекты. "Случайная" часть модели учитывает повторные измерения для каждого субъекта, или лонгитудинальный характер данных. "Фиксированная" часть модели предоставляет оценку среднего изменения за период времени, которое представляет собой угловой коэффициент изменения. Такой подход является целесообразным, поскольку он задействует все собранные данные, а эффект взаимодействия позволяет исследовать разные скорости изменения в группах. Эта модель представляет собой сглаживание с учетом неструктурированной корреляционной матрицы, что означает, что не было сделано никаких предположений о корреляции между множественными измерениями и каждая корреляция была оценена. В будущем анализе к приведенным ниже моделям могут быть добавлены ковариаты для исследования эффектов ковариат, таких как доза.

Авторы настоящего изобретения вычислили диагностические критерии регрессии для каждой модели, представленной в этом анализе, и использовали расстояние Кука (Cook's D) для идентификации потенциальных выбросов/выделяющихся наблюдений, перестраивая модели, где были идентифицированы выбросы/выделяющиеся наблюдения (примечание: выброс/выделяющееся наблюдение определено как наблюдение со значением расстояния Кука, составляющим 0,4 или более). Авторы настоящего изобретения выбрали расстояние Кука в качестве исследуемого диагностического критерия, поскольку оно включает как исход, так и любые ковариаты для выявления потенциальных выбросов. Когда выбросы идентифицированы, представляют два набора моделей; первая представленная модель основана на полном

наборе данных, в то время как второй набор моделей основан на данных с удаленными выбросами. Для этого анализа авторы настоящего изобретения удалили все значения субъекта I-IND-1, а не только исходное значение. Эти значения представлены в последних двух колонках табл. 2 и 3. Следует заметить, что результаты, полученные из этих двух анализов, могут быть совершенно различными вследствие относительно небольшого размера выборки из 15 субъектов в исследовании фазы 1 и в общей сложности 41 наблюдения, включенного в модели (когда включен полный набор данных).

Авторы настоящего изобретения также использовали тот же подход для сравнения субъектов фазы 1 с набором данных НИН для естественного течения. Набор данных НИН для естественного течения описан в источнике Yanjanin et al., "Linear Clinical Progression, Independent of Age of Onset, in Niemann-Pick Disease, Type C", Am. J. Med. Genet. Part B 153B:132-140(2010).

Для анализа, представленного в настоящем описании, авторы настоящего изобретения построили эталонные модели для субъектов, получавших циклодекстрин (представлены в табл. 2). Для этого анализа авторами настоящего изобретения представлено расчетное изменение соответствующего исхода БНПС за период времени, составляющий один год. В табл. 3 авторами настоящего изобретения представлены результаты для среднего изменения за период времени, в течение которого контролировали получаемую дозу. В табл. 4 и 5 представлены модели, в которых сравнивают субъектов, получавших циклодекстрин, с субъектами сопоставимого возраста в исследовании НИН для естественного течения. Представленные результаты представляют собой угловой коэффициент для каждой из двух групп и р-значение для проверки равенства угловых коэффициентов между двумя группами.

7.1.5.3. Изменения с течением времени у субъектов, получающих циклодекстрин.

В табл. 2 представлен средний угловой коэффициент для общей оценки БНПС и каждого из ее компонентов для 15 субъектов, которые получали по меньшей мере одну дозу циклодекстрина. Эти результаты предоставляют информацию о скорости изменения исхода в течение одного года. Эти скорости меньше, чем те, которые наблюдали в полной популяции естественного течения, которая была представлена в предыдущем анализе. Примечание: авторы настоящего изобретения удалили исходные данные для одного субъекта I-IND, имевшего общую оценку, составляющую 31, общую оценку, составляющую 31 без учета слуха, значение параметра ходьбы 4, глотания 3, мелкой моторики 4 и когнитивной деятельности 4. В целом, с течением времени состояние этого субъекта улучшилось. Кроме того, значение для одного субъекта НИН представляло собой выброс в анализе движения глаз вследствие того, что данное значение было высоким и составляло 5 для этого параметра. Анализ для полного набора данных представлен в колонках 2 и 3, а результаты, полученные при удалении выбросов, представлены в колонках 4 и 5.

Таблица 2

Среднее изменение за период времени (в годах) для оценки БНПС и ее компонентов для субъектов в исследованиях фазы 1

Оценка БНПС	Ср. изменение за период времени в годах (ст. ошибка)	р-значение	Ср. изменение за период времени в годах без учета субъекта I-IND-1 (ст. ошибка)	р-значение
Общая оценка	0,74 (0,59)	0,22	1,16 (0,42)	0,01
Общая оценка без учета слуха	0,31 (0,62)	0,62	0,89 (0,44)	0,06
Общая оценка без учета слуха и АСП ^а	-0,02 (0,64)	0,97	0,61 (0,46)	0,19
Ходьба	0,001 (0,16)	0,99	0,19 (0,10)	0,07
Мелкая моторика	0,002 (0,08)	0,98	0,002 (0,09)	0,98
Когнитивная деятельность	-0,04 (0,06)	0,47	-0,05 (0,06)	0,47
Глотание	-0,10 (0,27)	0,71	0,15 (0,19)	0,43
Движение глаз ^б	0,24 (0,17)	0,18	0,26 (0,12)	0,66
Речь	-0,16 (0,15)	0,29	-0,08 (0,15)	0,57
Слух	0,44 (0,18)	0,02	-0,29 (0,15)	0,07
Память	-0,04 (0,13)	0,77	0,05 (0,12)	0,69
Судороги	Модель нестабильна	-	-	-

Примечания:
 а. После удаления одного дополнительного выброса получали 0,20 (0,35) и р-значение 0,57.
 б. После удаления оценки движения глаз, составляющей 5, получали 0,05 (0,13) и р-значение 0,67 (CDA105).

Табл. 3 содержит результаты анализа, которые включают дозу в качестве части модели. Эти модели предоставляют информацию о влиянии дозы лекарственного средства. Следует обратить внимание на это влияние в отношении слуха. Когда доза включена в модель, угловой коэффициент для изменения с течением времени уже не является значимым.

Таблица 3

Среднее изменение за период времени (в годах) для оценки БНПС и ее компонентов для субъектов в исследованиях фазы 1 с учетом дозы

Показатель БНПС	Ср. изменение за период времени в годах (ст. ошибка)		р-значение	Ср. изменение за период времени в годах без учета субъекта I-IND-1 (ст. ошибка)		р-значение
Общая оценка ^a	1,79	(1,59)	0,27	0,81	(1,12)	0,48
Общая оценка без учета слуха ^b	1,50	(1,67)	0,38	0,61	(1,18)	0,61
Общая оценка без учета слуха и АСП ^c	0,93	(1,73)	0,60	0,07	(1,21)	0,95
Ходьба	0,41	(0,43)	0,35	0,19	(0,26)	0,47
Мелкая моторика	-0,10	(0,22)	0,65	-0,10	(0,24)	0,69
Когнитивная деятельность ^d	0,13	(0,15)	0,41	0,14	(0,16)	0,38
Глотание	0,49	(0,70)	0,49	0,10	(0,50)	0,85
Движение глаз ^e	0,16	(0,45)	0,73	0,20	(0,47)	0,68
Речь	-0,09	(0,39)	0,83	-0,16	(0,38)	0,68
Слух	0,40	(0,49)	0,43	0,27	(0,40)	0,52
Память	-0,22	(0,35)	0,59	-0,33	(0,31)	0,30
Судороги	Модель нестабильна		-	-		-
Примечания:						
a. После удаления одного дополнительного выброса получали 1,09 (0,85) с р-значением 0,22.						
b. После удаления одного дополнительного выброса получали 0,91 (0,90) с р-значением 0,32.						
c. После удаления одного дополнительного выброса получали 0,38 (0,92) с р-значением 0,42.						
d. Дополнительные выбросы после удаления I-IND-1; однако модель не сходится после удаления этих выбросов.						
e. После удаления оценки движения глаз субъекта CDA105 за 1 год, составляющей 5, получали 0,30 (0,32) с р-значением 0,37.						

7.1.5.4. Сравнение субъектов фазы 1 и I-IND с соответствующими субъектами в исследовании естественного течения.

Для лучшего понимания эффекта циклодекстрина авторы настоящего изобретения сравнили субъектов в исследованиях фазы 1 и I-IND с субъектами сравнимого возраста НИИ в исследовании естественного течения. Для этого сравнения авторы настоящего изобретения ограничили набор данных до субъектов возрастом от 6 до 26 лет, для которых были получены результаты более чем в один момент времени. Авторы настоящего изобретения построили смешанную модель со временем, группой лечения и временем по эффекту взаимодействия групп лечения в модели. Результаты этого анализа представлены ниже в табл. 4.

Результаты, представленные в табл. 4, согласуются с более медленной скоростью изменения в группе циклодекстрина в сравнении с популяцией естественного течения за исключением подпунктов движения глаз и слуха.

Таблица 4

Среднее изменение за период времени отдельно для применения циклодекстринов у субъектов НИИ фазы 1, НИИ естественного течения и I-IND

Оценка БНПС	Ср. изменение за период времени в годах (ст. ошибка) для группы циклодекстрина		Ср. изменение за период времени в годах (ст. ошибка) для исследования естественного течения		р-значение для различия в угловых коэффициентах между двумя группами
Общая оценка	0,74	(0,67)	2,53	(0,27)	0,02
Общая оценка без учета слуха	0,31	(0,68)	2,36	(0,27)	0,01
Общая оценка без учета слуха и АСП	-0,02	(0,69)	2,23	(0,28)	0,004
Ходьба	0,001	(0,18)	0,27	(0,07)	0,18
Мелкая	0,03	(0,10)	0,11	(0,04)	0,34

моторика					
Когнитивная деятельность	-0,04	(0,16)	0,31	(0,06)	0,04
Речь	-0,16	(0,13)	0,09	(0,05)	0,09
Движение глаз	0,22	(0,16)	0,08	(0,06)	0,42
Глотание	-0,11	(0,23)	0,20	(0,09)	0,22
Слух	0,44	(0,16)	0,17	(0,06)	0,13
Память	-0,04	(0,12)	0,18	(0,05)	0,10
Судороги	не определено		не определено		не определено

7.1.5.5. Сравнение субъектов фазы 1 с соответствующими субъектами в исследовании естественного течения.

Для лучшего понимания эффекта циклодекстрина в пределах популяции НИН авторы настоящего изобретения сравнили субъектов в исследованиях фазы 1 с субъектами сравнимого возраста в исследовании естественного течения. Для этого сравнения авторы настоящего изобретения ограничили набор данных до субъектов возрастом от 6 до 26 лет, для которых были получены результаты более чем в один момент времени. Авторы настоящего изобретения построили смешанную модель со временем, группой лечения и временем по эффекту взаимодействия групп лечения в модели. В таблице ниже представлены результаты этого анализа, которые аналогичны результатам в табл. 4. Следует обратить внимание, что исход судорог несколько нестабилен вследствие нескольких выбросов. Представлены результаты только полного набора данных. За исключением движения глаз, все значения показателей в группе циклодекстрина меньше, чем в исследовании естественного течения.

Таблица 5

Среднее изменение с течением времени отдельно для применения циклодекстринов у субъектов НИН фазы 1 и НИН естественного течения

Показатель	Ср. изменение за период времени в годах (ст. ошибка) для группы циклодекстринов	Ср. изменение за период времени в годах (ст. ошибка) для исследования естественного течения	р-значение для различия в угловых коэффициентах между двумя группами
Общая оценка БНПС	1,16 (0,68)	2,53 (0,24)	0,06
Общая оценка без учета слуха	1,06 (0,66)	2,36 (0,24)	0,08
Общая оценка без учета слуха и АСП	0,86 (0,68)	2,23 (0,24)	0,06
Ходьба	0,21 (0,18)	0,27 (0,06)	0,78
Мелкая моторика	0,06 (0,11)	0,11 (0,04)	0,66
Когнитивная деятельность	-0,05 (0,18)	0,31 (0,07)	0,07
Речь	-0,10 (0,14)	0,09 (0,05)	0,24
Движение глаз	0,32 (0,18)	0,08 (0,06)	0,21
Глотание	0,17 (0,21)	0,20 (0,08)	0,88
Слух ^а	0,11 (0,12)	0,17 (0,04)	0,66
Память	0,06 (0,13)	0,18 (0,05)	0,38
Судороги	не определено	не определено	не определено
Примечания: а. В этой модели были обнаружены и удалены выбросы для получения меньших значений углового коэффициента в группе естественного течения.			

7.1.5.6. Анализ, включающий сравнение только тех субъектов, которые когда-либо применяли миглустат.

Результаты, представленные ниже, включают субъектов, которые применяли миглустат в течение периода времени. Они включают восемь субъектов из исследования естественного течения и 14 субъектов из исследования фазы 1. Авторы настоящего изобретения повторили анализы, представленные в табл. 4, для этой популяции. Эти результаты представлены в табл. 6 ниже.

Таблица 6

Среднее изменение за период времени отдельно для применения циклодекстринов у субъектов НИИ фазы 1 и НИИ естественного течения, сообщивших о применении миглустата

Показатель БНПС	Ср. изменение за период времени в годах (ст. ошибка) для группы циклодекстринов		Ср. изменение за период времени в годах (ст. ошибка) для для исследования естественного течения		р-значение для различия в угловых коэффициентах между двумя группами
Общая оценка	0,71	(0,67)	2,58	(0,24)	0,01
Общая оценка без учета слуха	0,59	(0,66)	2,39	(0,23)	0,01
Общая оценка без учета слуха и АСП	0,37	(0,67)	2,25	(0,24)	0,01
Ходьба	0,12	(0,16)	0,26	(0,06)	0,38
Мелкая моторика	0,06	(0,10)	0,08	(0,04)	0,89
Когнитивная деятельность	-0,07	(0,21)	0,33	(0,07)	0,09
Речь	-0,23	(0,14)	0,08	(0,05)	0,05
Движение глаз	0,12	(0,11)	0,05	(0,04)	0,55
Глотание	0,07	(0,22)	0,20	(0,08)	0,58
Слух	0,13	(0,14)	0,19	(0,05)	0,68
Память	0,06	(0,15)	0,21	(0,05)	0,38
Судороги	не определено		не определено		не определено

Ниже в табл. 7 представлены результаты, которые включают только субъектов НИИ. Три субъекта исследования I-IND удалены из этого сравнения. Результаты, представленные здесь, аналогичны результатам, представленным выше в табл. 5. Разница между двумя популяциями заключается в том, что пять субъектов НИИ в исследовании естественного течения и один субъект НИИ в исследовании фазы 1 были удалены из популяции, поскольку эти субъекты сообщили, что не применяли миглустат ни в какой период времени.

Таблица 7

Среднее изменение за период времени отдельно для применения циклодекстринов у субъектов как НИИ фазы 1, так и I-IND, сообщивших о применении миглустата

Показатель БНПС	Ср. изменение за период времени в годах (ст. ошибка) для группы циклодекстринов		Ср. изменение за период времени в годах (ст. ошибка) для для исследования естественного течения		р-значение для различия в угловых коэффициентах между двумя группами
Общая оценка	0,34	(0,67)	2,58	(0,27)	0,004
Общая оценка без учета слуха	-0,13	(0,68)	2,39	(0,27)	0,001
Общая оценка без учета слуха и АСП	-0,49	(0,69)	2,25	(0,28)	0,001
Ходьба	-0,10	(0,17)	0,26	(0,07)	0,06
Мелкая моторика	0,002	(0,10)	0,08	(0,04)	0,48
Когнитивная деятельность	-0,04	(0,17)	0,33	(0,07)	0,06
Речь	-0,27	(0,13)	0,08	(0,05)	0,01
Движение глаз	0,05	(0,11)	0,05	(0,04)	0,97
Глотание	-0,21	(0,24)	0,20	(0,10)	0,13
Слух	0,48	(0,18)	0,19	(0,07)	0,15
Память	-0,04	(0,14)	0,21	(0,06)	0,10
Судороги	не определено		не определено		не определено

7.1.6. Дополнительный анализ клинических данных.

Дополнительный анализ проводили на том же наборе данных клинических исследований НИИ, но с 4 точками данных, включенными в набор контрольных данных, которые не были включены в анализ, описанный выше. Этот анализ обобщен на фиг. 4-6 и 8.

7.2. Пример 2. Стандартный анализ лекарственного продукта.

Продукт гидроксипропил-бета-циклодекстрина, используемый в клиническом исследовании фазы I, описанном в примере I, представлял собой Kleptose® HPB (Roquette, Франция) с DS_n, составляющей

примерно $4,34 \pm 10\%$. Стандартный анализ иллюстративных партий Kleptose® НРВ, выполненный производителем, представлен на следующих 4 страницах.

Субстанция KLEPTOSE® НРВ (иллюстративная партия 1).

Определение:

ГИДРОКСИПРОПИЛБЕТАДЕКС представляет собой частично замещенный полигидроксипропиловый эфир бетадекса.
CAS n°: 128446-35-5
EINECS: 420-920-1
INCI: ГИДРОКСИПРОПИЛ-ЦИКЛОДЕКСТРИН

Спецификация.

А) Описание.

ВНЕШНИЙ ВИД Белый или почти белый аморфный или кристаллический порошок.

РАСТВОРИМОСТЬ Легко растворим в воде и пропиленгликоле.

В) Подлинность.

ИСПЫТАНИЕ НА ПОДЛИННОСТЬ А	EP-USP/NF	См. испытание
ИСПЫТАНИЕ НА ПОДЛИННОСТЬ В	EP-USP/NF	См. испытание

С) Анализ.

ИК-СПЕКТРОСКОПИЯ	EP-USP/NF	Соответствует
ВНЕШНИЙ ВИД РАСТВОРА	EP-USP/NF	Прозрачный, бесцветный
ПРОВОДИМОСТЬ	EP-USP/NF	200 мкСм/см макс.
СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ПРИМЕСИ		
-ПРИМЕСЬ А: БЕТА-ЦИКЛОДЕКСТРИН	EP	1,5 % макс.
-ПРИМЕСЬ А: БЕТА-ЦИКЛОДЕКСТРИН	USP/NF	1,5 % макс.
-ПРИМЕСЬ В: ПРОПАН-1,2-ДИОЛ	EP	2,5 % макс.
-ПРИМЕСЬ В: ПРОПАН-1,2-ДИОЛ	USP/NF	2,5 % макс.
-СУММА ПРИМЕСЕЙ, ОТЛИЧНЫХ ОТ А	EP	1,0 % макс.
-ЛЮБАЯ ДРУГАЯ ПРИМЕСЬ	USP/NF	0,25 % макс.
-ОБЩЕЕ СОДЕРЖАНИЕ ДРУГИХ ПРИМЕСЕЙ	USP/NF	1 % макс.
ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ	EP-USP/NF	20 ppm макс.
ПОТЕРЯ В МАССЕ ПРИ ВЫСУШИВАНИИ	EP-USP/NF	10,0 % макс.
МОЛЯРНОЕ ЗАМЕЩЕНИЕ	EP-USP/NF	0,40 – 1,50
ПРОПИЛЕНОКСИД (**)	USP/NF	0,0001 %

МИКРОБНАЯ КОНТАМИНАЦИЯ:

-ОБЩЕЕ ЧИСЛО АЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ	EP-USP/NF	100 КОЕ/г макс.
-ОБЩЕЕ ЧИСЛО ДРОЖЖЕЙ И ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ	EP-USP/NF	100 КОЕ/г макс.

* Сведения о соответствии - испытание не проводилось.

** План мониторинга.

Субстанция KLEPTOSE® НРВ (иллюстративная партия 1).

ESHCHERICHIA	EP-USP/NF	Отсутствие в 10 г
SALMONELLA	EP-USP/NF	Отсутствие в 10 г.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭНДОТОКСИНЫ	EP-USP/NF	10 МЕ/г макс.
---------------------------	-----------	---------------

Характерные значения:

НОМИНАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ МОЛЯРНОГО ЗАМЕЩЕНИЯ	0,62
МОЛЯРНОЕ ЗАМЕЩЕНИЕ (МЗ)	0,58 – 0,68

ВНУТРЕННИЕ ТРЕБОВАНИЯ К СПЕЦИФИЧЕСКИМ ПРИМЕСЯМ:

ПРИМЕСЬ А: БЕТА-ЦИКЛОДЕКСТРИН	собственная методика (/com)	1,0 % макс.
ПРИМЕСЬ В: ПРОПАН-1,2-ДИОЛ	собственная методика (/com)	0,5 % макс.
ЛЮБАЯ ДРУГАЯ ПРИМЕСЬ	собственная методика (/com)	0,1 % макс.

РАЗМЕР ЧАСТИЦ:

ОСТАТОК НА 315 мкм	Сито	20 % макс.
ОСТАТОК НА 100 мкм		50 % макс.

Комментарии.

Способы, используемые Roquette, могут представлять собой способы согласно EP или USP или внутренние валидированные способы, которые были сопоставлены с фармакопейной статьей.

Данная субстанция подходит для применения для получения препаратов для парентерального введения.

Соответствие.

Действующая фармакопея: E.P. (1804) и U.S.P/N.F.

Хранение.

Хранение:

хранить в хорошо закрытых контейнерах;

гигроскопичный продукт: для применения в помещении в контролируемых условиях.

Дата повторного контроля.

Через 3 года в оригинальной упаковке.

* Сведения о соответствии - испытание не проводилось.

** План мониторинга.

Субстанция KLEPTOSE® НРВ (иллюстративная партия 2).

Определение.

ГИДРОКСИПРОПИЛБЕТАДЕКС представляет собой частично замещенный полигидроксипропиловый эфир бетадекса.

CAS n°: 128446-35-5

EINECS: 420-920-1

INCI: ГИДРОКСИПРОПИЛ-ЦИКЛОДЕКСТРИН

Спецификация.

А) Описание.

ВНЕШНИЙ ВИД	Белый или почти белый аморфный или кристаллический порошок.
РАСТВОРИМОСТЬ	Легко растворим в воде и пропиленгликоле.

В) Подлинность.

ИСПЫТАНИЕ НА ПОДЛИННОСТЬ А	EP-USP/NF	См. испытание
ИСПЫТАНИЕ НА ПОДЛИННОСТЬ В	EP-USP/NF	См. испытание

С) Анализ.

ИК-СПЕКТРОСКОПИЯ	EP-USP/NF	Соответствует
ВНЕШНИЙ ВИД РАСТВОРА	EP-USP/NF	Прозрачный, бесцветный
ПРОВОДИМОСТЬ	EP-USP/NF	200 мкСм/см макс.

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ПРИМЕСИ

ПРИМЕСЬ А: БЕТА-ЦИКЛОДЕКСТРИН	EP-USP/NF	1,0 % макс.
-------------------------------	-----------	-------------

ПРИМЕСЬ В: ПРОПАН-1,2-ДИОЛ	EP-USP/NF	0,50 % макс.
----------------------------	-----------	--------------

ЛЮБАЯ ДРУГАЯ ПРИМЕСЬ	EP-USP/NF	0,1 % макс.
----------------------	-----------	-------------

ОБЩЕЕ СОДЕРЖАНИЕ ДРУГИХ ПРИМЕСЕЙ	EP-USP/NF	1,0 % макс.
----------------------------------	-----------	-------------

ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ	EP-USP/NF	20 ppm макс.
-----------------	-----------	--------------

ПОТЕРЯ В МАССЕ ПРИ ВЫСУШИВАНИИ	EP-USP/NF	10,0 % макс.
--------------------------------	-----------	--------------

МОЛЯРНОЕ ЗАМЕЩЕНИЕ	EP-USP/NF	0,40 – 1,50
--------------------	-----------	-------------

ПРОПИЛЕНОКСИД (**)	EP-USP/NF	1 ppm макс.
--------------------	-----------	-------------

* Сведения о соответствии - испытание не проводилось.

** План мониторинга.

Субстанция KLEPTOSE® НРВ (иллюстративная партия 2).

МИКРОБНАЯ КОНТАМИНАЦИЯ:

ОБЩЕЕ ЧИСЛО АЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ	EP-USP/NF	100 КОЕ/г макс
--------------------------------------	-----------	----------------

ОБЩЕЕ ЧИСЛО ДРОЖЖЕЙ И ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ	EP-USP/NF	100 КОЕ/г макс
--	-----------	----------------

ESHCHERICHIA	EP-USP/NF	Отсутствие в 10 г.
--------------	-----------	--------------------

SALMONELLA	EP-USP/NF	Отсутствие в 10 г.
------------	-----------	--------------------

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭНДОТОКСИНЫ	EP-USP/NF	10 МЕ/ г макс
---------------------------	-----------	---------------

Характерные значения:

НОМИНАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ	0,62
----------------------	------

МОЛЯРНОГО ЗАМЕЩЕНИЯ	0,58 – 0,68
---------------------	-------------

МОЛЯРНОЕ ЗАМЕЩЕНИЕ (МЗ)	0,58 – 0,68
-------------------------	-------------

РАЗМЕР ЧАСТИЦ:	Сито
----------------	------

ОСТАТОК НА 315 мкм	20 % макс
--------------------	-----------

ОСТАТОК НА 100 мкм	50 % макс
--------------------	-----------

Комментарии.

Способы, используемые Roquette, могут представлять собой способы согласно EP или USP или внутренние валидированные способы, которые были сопоставлены с фармакопейной статьей.

Данная субстанция подходит для применения для получения препаратов для парентерального введения.

Соответствие.

Действующая фармакопея: E.P. (1804) и U.S.P/N.F.

Хранение.

Хранение:

хранить в хорошо закрытых контейнерах;

гигроскопичный продукт: для применения в помещении в контролируемых условиях.

Дата повторного контроля.

Через 3 года в оригинальной упаковке.

* Сведения о соответствии - испытание не проводилось.

** План мониторинга.

7.3. Пример 3. Разделение смесей гидроксипропил-бета-циклодекстринов методом ВЭЖХ.

Для оценки компонентного состава смеси циклодекстринов в поставляемой на рынок фармацевти-

ческой композиции гидроксипропил-бета-циклодекстринов для парентерального введения Kleptose® НРВ, партии которой применяли в клиническом исследовании фазы I, использовали различные хроматографические методы.

7.3.1. Колонка для анализа производных циклодекстрина (CD-Screen).

Для разделения компонентов поставляемой на рынок Kleptose НРВ® (Roquette) использовали метод ВЭЖХ согласно статье номер 1804 Европейской фармакопеи (гидроксипропилбетадекс) (редакция от 1 января 2009 г.).

Условия ВЭЖХ: неподвижная фаза: CD-Screen, размер частиц 5 мкм (ChiroQuest), колонка: 1 = 250 мм, Ø = 4,0 мм; температура: 30°C. Подвижная фаза: подвижная фаза А: вода; подвижная фаза В: вода:метанол (10:90 об./об.). Скорость потока: 1,0 мл/мин; детекция: испарительный детектор светорассеяния Alltech 3300; газ-носитель: азот; скорость потока: 1,5 л/мин; температура испарителя: 70°C; объем вводимой пробы: 20 мкл.

Программа градиента (метод согласно Европейской фармакопее).

Таблица 8

Время (мин)	Подвижная фаза А (% об./об.)	Подвижная фаза В (% об./об.)
0-5	52	48
5-15	52 → 0	48 → 100
15-20	0	100

На фиг. 9 приведены результаты ВЭЖХ с использованием метода анализа производных циклодекстрина (метод CD-Screen) для анализа гидроксипропил-бета-циклодекстрина Kleptose® НРВ ($DS_a = 4,2$). Соединения выходили в порядке возрастания DS. Незамещенный бета-циклодекстрин выходил на примерно 5 мин, тогда как монозамещенный гидроксипропил-бета-циклодекстрин выходил на примерно 6 мин. На фиг. 10 изображены сравнительные хроматограммы гидроксипропил-бета-циклодекстринов с использованием колонки CD-Screen и градиентов растворителей - метанола и ацетонитрила (градиент метанола: 0 мин - 30% В, 40 мин - 100% В; градиент ацетонитрила: 0-5 мин - 18% В, 25 мин - 40% В. Другие параметры метода оставались неизменными). Время удерживания варьировали в зависимости от силы растворителя и полярности подвижной фазы.

Масс-спектрометрические методы детекции: ВЭЖХ хроматограф Agilent 1260 с тройным квадрупольным масс-спектрометром Triple Quadrupole mass spectrometer 6460.

Источник ионизации электрораспылением (ESI) Agilent Jet Stream, режим отрицательно заряженных ионов, m/z 500-3000; напряжение фрагментатора: 35 В, параметры источника: температура газа: 300°C, расход газа: 13 л/мин, распылитель: примерно 0,41 МПа (60 psi), расход продувочного газа: 11 л/мин, температура продувочного газа (нагревателя): 400°C, напряжение на капилляре: 3500 В. Для измерений методом ВЭЖХ-МС в подвижной фазе вместо воды использовали буферный раствор формиата аммония (0,1 М, рН 6,0).

На фиг. 11 изображена экстрагированная ионная хроматограмма образца, полученная при анализе методом ВЭЖХ-МС. НЦД = незамещенный бета-циклодекстрин; DSx = гидроксипропил-бета-циклодекстрины со значением DS, равным x. Например, "DS3" относится к гидроксипропил-бета-циклодекстринам, имеющим DS = 3.

7.3.2. Хроматография на колонке C18 с обращенной фазой.

Анализировали Kleptose® НРВ (Roquette) (ту же партию, которую использовали в разделе 5.3.1). Аналитическую колонку (4×250 мм) наполняли силикагелем LiChrospher RP18. Один набор условий для исследования включал следующие: неподвижная фаза: силикагель LiChrospher RP18, размер частиц 25-40 мкм (Merck), колонка: 1 = 250 мм, Ø = 4,0 мм; температура: 30°C. Подвижная фаза: подвижная фаза А: вода; подвижная фаза В: вода:метанол R (10:90 об./об.). В программе градиента использовали следующие условия: градиент от 0 мин при 10% подвижной фазы В до 20 мин при 100% подвижной фазы В. Скорость потока: 1,0 мл/мин; детекция: испарительный детектор светорассеяния Alltech 3300; газ-носитель: азот; скорость потока: 1,5 л/мин; температура испарителя: 70°C.

На фиг. 12 показана типичная хроматограмма ВЭЖХ Kleptose® НРВ ($DS_a = 4,2$) на неподвижной фазе LiChrosphere C18. На фиг. 13 показаны сравнительные хроматограммы гидроксипропил-бета-циклодекстринов с использованием колонки LiChrosphere C18 с градиентом растворителей - метанола и ацетонитрила. (Градиент метанола: 0 мин - 10% В, 15 мин - 30% В, 40 мин - 80% В. Градиент ацетонитрила: 0 мин - 5% В, 40 мин - 80% В. Другие параметры метода оставались неизменными.)

Использовали условия масс-спектрометрии, описанные в разделе 5.3.1. На фиг. 14 показана экстрагированная ионная хроматограмма гидроксипропил-бета-циклодекстринов, имеющих различные DS, полученная при анализе методом ВЭЖХ-МС.

7.3.3. Жидкостная хроматография гидрофильных взаимодействий (HILIC).

В жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий (HILIC) используют гидрофильные неподвижные фазы с элюентами, обычно используемыми в обращенно-фазовой хроматографии. В этом

подходе используются принципы жидкостно-жидкостной распределительной хроматографии, вследствие чего аналиты выходят в порядке возрастания полярности. В способах, описанных в настоящем описании, использовали аминоколонку, содержащую аминопропильные группы, связанные с поверхностью силикагеля.

Анализировали Kleptose® HBP (Roquette) (ту же партию, которую использовали в разделе 5.3.1). Условия ВЭЖХ: неподвижная фаза: Nucleosil NH₂, размер частиц 5 мкм (Macherey Nagel), колонка: 1 = 250 мм, Ø = 4,0 мм; температура: 30°C. Подвижная фаза: подвижная фаза А: ацетонитрил-вода (80:20 об./об.); подвижная фаза В: вода. Скорость потока: 1,0 мл/мин; детекция: испарительный детектор светорассеяния Agilent 385; газ-носитель: азот; скорость потока: 1,2 л/мин; температура испарителя: 50°C; температура распылителя: 30°C.

На фиг. 15 показано разделение гидроксипропил-бета-циклодекстринов с использованием метода HPLC на колонке Nucleosil NH₂.

Условия масс-спектрометрии были такими же, как описано в разделе 5.3.1. На фиг. 16 показана экстрагированная ионная хроматограмма гидроксипропил-бета-циклодекстринов, имеющих различные DS, полученная при анализе методом ВЭЖХ-МС. НЦД = незамещенный бета-циклодекстрин; DSx = гидроксипропил-бета-циклодекстрины со значением DS, равным x. Например, "DS3" относится к гидроксипропил-бета-циклодекстринам, имеющим DS = 3. В этом методе ВЭЖХ замещенные гидроксипропил-бета-циклодекстрины с большей DS выходили первыми.

7.3.4. Хроматография на силикагеле.

Анализировали Kleptose® HBP (Roquette) (ту же партию, которую использовали в разделе 5.3.1). Метод ВЭЖХ: неподвижная фаза: LiChrosphere Si-60, размер частиц 5 мкм (Merck), колонка: 1 = 250 мм, Ø = 4,0 мм; температура: 30°C. Подвижная фаза: подвижная фаза А: ацетонитрил - 0,1 М формиат аммония с pH 7,5 (80:20 об./об.); подвижная фаза В: 0,1 М формиат аммония с pH 7,5. Скорость потока: 1,0 мл/мин; детекция: испарительный детектор светорассеяния Agilent 385; газ-носитель: азот; скорость потока: 1,2 л/мин; температура испарителя: 50°C; температура распылителя: 30°C.

На фиг. 17 показано разделение компонентов гидроксипропил-бета-циклодекстринов с использованием колонки LiChrosphere Si 60. В этом случае образец содержал добавку бета-циклодекстрина для облегчения детекции.

Условия масс-спектрометрии были такими же, как описано в разделе 5.3.1. На фиг. 18 показана экстрагированная ионная хроматограмма гидроксипропил-бета-циклодекстринов, имеющих различные DS. НЦД = незамещенный бета-циклодекстрин; DSx = гидроксипропил-бета-циклодекстрины со значением DS, равным x. Например, "DS3" относится к гидроксипропил-бета-циклодекстринам, имеющим DS = 3. В этом методе ВЭЖХ замещенные гидроксипропил-бета-циклодекстрины с большей DS выходили первыми.

7.4. Пример 4. Усовершенствованные аналитические методы.

7.4.1. Газовая хроматография.

Включенный в статью Европейской фармакопеи способ определения содержания пропиленгликоля (ПГ) в гидроксипропилбетадексе имеет предел количественной оценки лишь примерно 0,5% относительно ГПБЦД. Соответственно был необходим более чувствительный аналитический способ, и был разработан усовершенствованный способ с модифицированной подготовкой образца (по сравнению с анализом гидроксипропилбетадекса согласно Европейской фармакопее, номер статьи: 1804, редакция от 1 января 2009 г.). Этот способ использовали для количественной оценки ПГ на уровне 0,01% (относительно ГПБЦД), что свидетельствует о гораздо большей чувствительности относительно предела обнаружения способом согласно Европейской фармакопее.

Условия способа были следующими: инструменты: газовый хроматограф: Shimadzu GC-17A; детектор: пламенно-ионизационный детектор (ПИД); инжектор: автоматический инжектор Shimadzu AOC-5000; программное обеспечение: Shimadzu Class-VP версия 7.4; газы: газ-носитель: гелий (99,999%), другие газы: азот (99,999%), синтетический воздух (99,999%), водород (полученный с использованием генератора водорода Whatman).

Колонка: Supelco Supercowax-10 (30 м × 0,32 мм × 1,0 мкм)

Скорость (°C/мин)	Температура (°C):	время (мин):
-	150	0
	200	10
40	240	1

Время удерживания пропиленгликоля ~6,35 мин; время удерживания внутреннего стандарта этиленгликоля ~7,15 мин.

Пять калибровочных точек: в диапазоне от 0,1 до 2 мг/мл, что соответствует 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2% ПГ относительно ГПБЦД.

Исходные калибровочные растворы получали из растворов, содержащих примерно 200 мг пропиленгликоля, точную навеску помещали в градуированную стеклянную колбу объемом 10 мл и наполняли очищенной водой до метки (табл. 14). Для получения концентраций, перечисленных ниже в таблице,

выполняли необходимое разбавление. После достижения целевой концентрации (см. табл. 14 ниже) 1 мл этого раствора, 100 мкл раствора внутреннего стандарта (ВСТ), 500 мг NaCl и 1 мл воды добавляли во флакон с завинчивающейся крышкой и подвергали раствор экстракции 1 мл дихлорметана (ДХМ). Образцы отбирали из органической фазы и вводили в том же виде.

Таблица 14

Получение калибровочных образцов для ГХ

Образец	Исходный раствор	Разбавление	Получение образца	Экстракция с применением
Целевая концентрация ВСТ: 50 мг/мл	250 мг этиленгликоля (ЭГ) / 5 мл воды	Не применимо	Не применимо	Не применимо
КАЛ1 Целевая концентрация ПГ: 0,1 мг/мл	200 мг ПГ/ 10 мл воды	50 мкл / 10 мл воды	100 мкл ВСТ + 1 мл КАЛ 1 + 500 мг NaCl + 1 мл воды	1 мл ДХМ
КАЛ2 Целевая концентрация ПГ: 0,2 мг/мл	200 мг ПГ/ 10 мл воды	100 мкл / 10 мл воды	100 мкл ВСТ + 1 мл КАЛ 2 + 500 мг NaCl + 1 мл воды	1 мл ДХМ
КАЛ3 Целевая концентрация ПГ: 0,5 мг/мл	200 мг ПГ/ 10 мл воды	250 мкл / 10 мл воды	100 мкл ВСТ + 1 мл КАЛ 3 + 500 мг NaCl + 1 мл воды	1 мл ДХМ
КАЛ4 Целевая концентрация ПГ: 1,0 мг/мл	200 мг ПГ/ 10 мл воды	500 мкл / 10 мл воды	100 мкл L ВСТ + 1 мл КАЛ 4 + 500 мг NaCl + 1 мл воды	1 мл ДХМ
КАЛ5 Целевая концентрация ПГ: 2,0 мг/мл	200 мг ПГ/ 10 мл воды	1 мл / 10 мл воды	100 мкл ВСТ + 1 мл КАЛ 5 + 500 мг NaCl + 1 мл воды	1 мл ДХМ

Калибровочный раствор КАЛ2 использовали для определения пригодности системы путем проведения пяти параллельных измерений (требования: $OSO < 5\%$ - OSO отношения площадей ПГ и ЭГ).

Контрольный образец для экстракции: 1 мл ДХМ добавляли к 0,1 мл раствора ВСТ, 500 мг NaCl и 2 мл дистиллированной воды, затем энергично перемешивали в течение 0,5 мин и оставляли на некоторое время. После разделения фаз примерно 0,2 мл фазы ДХМ помещали во флакон.

Получение образца: 1 мл ДХМ добавляли к 1,0 г образца ГПБЦД, 0,1 мл раствора ВСТ, 500 мг NaCl и 2 мл дистиллированной воды во флаконе с завинчивающейся крышкой, энергично перемешивали в течение 0,5 мин и оставляли на некоторое время. После разделения фаз примерно 0,2 мл фазы ДХМ помещали во флакон. Типичная хроматограмма образца Kleptose НРБ® (Roquette), содержащего ~0,18% ПГ, изображена на фиг. 25.

Содержание пропиленгликоля (ПГ) в образцах ГПБЦД рассчитывали, построив калибровочную кривую, отображающую отношение массовых концентраций (в мг/мл) пропиленгликоля/этиленгликоля (ПГ/ЭГ) в зависимости от площади пиков ПГ/ЭГ. В образцах ГПБЦД неизвестным параметром было содержание ПГ, которое получали из других трех факторов и уравнения калибровочной кривой.

Пригодность способа для отделения монопропиленгликоля от его ди- и тризамещенных производных показана на фиг. 26. Более замещенные гликоли обуславливали появление нескольких пиков и выходили позднее вследствие более высоких температур кипения. Содержание ди- и трипропиленгликоля определяли в исходном продукте и в конечных образцах.

Линейность способа была подтверждена путем исследования пяти образцов ПГ в диапазоне концентраций от 0,1 до 2 мг/мл, что соответствует 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2% ПГ относительно ГПБЦД, как описано в табл. 14. Каждый образец анализировали в трех повторностях для оценки точности способа. В табл. 15 обобщены экспериментальные данные анализа точности и линейности. Кривая линейности калибровочного набора изображена на фиг. 27.

Таблица 15

Экспериментальная и статистическая оценка точности и линейности способа

Образец	КАЛ1 ПГ/ЭГ (площадь)	КАЛ2 ПГ/ЭГ (площадь)	КАЛ3 ПГ/ЭГ (площадь)	КАЛ4 ПГ/ЭГ (площадь)	КАЛ5 ПГ/ЭГ (площадь)	Угловой коэффициент регрессия	
						коэффи- циент	регрессия
I	0,1372	0,3252	0,7359	1,6351	2,9511	7,6382	0,9966
II	0,1520	0,3168	0,7052	1,5245	3,2239	7,6551	0,9988
III	0,1688	0,2839	0,6601	1,4519	2,9009	7,2976	0,9986
среднее	0,153	0,309	0,700	1,537	3,029		
ст. откл.	0,016	0,022	0,038	0,092	0,180		
OSO	10,4	7,1	5,4	6,0	5,9		

ПГ = пропиленгликоль;

ЭГ = этиленгликоль;

OSO = относительное стандартное отклонение.

Данные в табл. 15 свидетельствуют о том, что способ являлся линейным в диапазоне содержания ПГ 0,01-0,2%.

7.4.2. Аналитическая ВЭЖХ.

Содержание остаточного НЦД (незамещенного бета-циклодекстрина), фракции ГПБЦД со степенью замещения 1 и суммы родственных циклодекстрину (ЦД) примесей, отличных от НЦД, определяли методом ВЭЖХ согласно Европейской фармакопее 7.8 (гидроксипропилбетадекс, статья номер: 1804, редакция от 1 января 2009 г.) и описанию в разделе 5.3.1. Характеристические спектры распределения веществ регистрировали тем же методом.

7.4.3. ЯМР.

Среднюю степень замещения (DS_a) рассчитывали из отношения сигнала от трех протонов метильной группы в составе гидроксипропильной группы и сигнала от протона, связанного с углеродом C1 (аномерного протона) ангидроглюкозных остатков в спектре 1H -ЯМР.

В спектре 1H ЯМР измеряли площади пиков дублета метильных групп при $\sim 1,2$ ppm (A) и сигналов аномерных протонов между $+5$ ppm и $+5,4$ ppm (B). Типичный спектр показан на фиг. 28. В качестве эталона площадь пика аномерных протонов принимали равной 7,0, поскольку 7 протонов обуславливают наличие этого пика у производных бета-циклодекстрина. После установления эталонного пика среднюю степень замещения рассчитывали с использованием выражения: $DS_a = A/3$.

7.4.4. Анализ солюбилизации холестерина.

Анализ солюбилизации холестерина *in vitro* проводили следующим образом. Исследуемый раствор смеси гидроксипропил-бета-циклодекстринов в дистиллированной воде перемешивали при комнатной температуре, после чего добавляли избыточное количество неэтерифицированного холестерина таким образом, что часть холестерина оставалась нерастворенной. Через 24 ч твердую фазу отфильтровывали и измеряли холестерин, присутствующий в растворе, методом ВЭЖХ.

Условия ВЭЖХ: аналитическая колонка: Nucleosil 120, C8, 5 мкм, $100 \times 4,0$ мм (Macherey Nagel); температура колонки: $40^\circ C$; подвижная фаза: ацетонитрил:вода = 78:22; скорость потока: 1,5 мл/мин; объем вводимой пробы: 20 мкл; детектор: УФ 210 нм; время остановки: 5 мин.

Исходный раствор холестерина получали посредством взвешивания и переноса 10 мг холестерина в 10 мл ацетонитрила/изопропанола (75:25). Эталонный раствор холестерина получали посредством разбавления исходного раствора подвижной фазой ВЭЖХ в десять раз (для получения концентрации 0,1 мг/мл).

После фильтрации образцы для экспериментов по растворимости разбавляли ацетонитрилом в два раза, а для дополнительного разбавления, если необходимо, использовали дополнительную порцию подвижной фазы ВЭЖХ.

Концентрацию растворенного холестерина определяли с помощью следующих уравнений.

$$\text{Концентрация холестерина (мг/мл)} = (\text{Площадь}_B / \text{Площадь}_A) \times \text{Конц.}_э$$

Площадь_B = площадь пика холестерина на хроматограмме исследуемого раствора

Площадь_A = площадь пика холестерина на хроматограмме эталонного раствора

$\text{Конц.}_э$ = концентрация водорастворимого сульфобутилового эфира бета-циклодекстрина (SBECD-WS) в стандартном калибровочном растворе (мг/мл).

7.5. Пример 5. Анализ методом МС с ионизацией электрораспылением.

Как обсуждалось выше в примере 2, Kleptose® HPB имеет среднее молярное замещение, составляющее 0,58-0,68 (DS_a 4,06-4,76), две типичные партии имеют среднее молярное замещение, составляющее 0,62 (DS_a 4,34). Trappsol® Cyclo™, композиция гидроксипропил-бета-циклодекстринов, реализуемая различными производителями, имеет более высокое заявленное среднее молярное замещение, составляющее примерно 0,91 (DS_a 6,37).

Анализ методом масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением выполняли для образцов, поставляемых на рынок Kleptose® HPB и Trappsol® Cyclo™ (CTD Holdings, Inc.) ("Trappsol ®") двумя различными лабораториями.

Методы, используемые первой лабораторией, были следующими. Примерно 50 мкг образца гидроксипропил-бета-циклодекстринов ("ГПБЦД") растворяли в 1 мл 1% муравьиной кислоты в 80% метаноле в воде. Этот раствор ГПБЦД вводили в масс-спектрометр API-4000 (Applied Biosystems). Для МС сканирования m/z от 1100 до 2000 применяли режим электрораспыления положительно заряженных ионов. Регистрировали спектры МС (10-15 средних сканирований). Измеряли высоту каждого сигнала продуктов присоединения пропиленоксида к бета-циклодекстрину и совокупность аддуктов пропиленоксида в ГПБЦД рассчитывали по сумме высот отдельных сигналов. Для работы МС использовали программное обеспечение Analyst 1.51 (Applied Biosystems). Как показано на фиг. 29, данные МС с ионизацией электрораспылением из первой лаборатории демонстрируют, что различия в среднем молярном замещении обусловлены заметными различиями в степени и распределении гидроксипропильного замещения в Kleptose® HPB (фиг. 29А) и Trappsol® (фиг. 29В). Числа добавляли к спектрам для идентификации количества гидроксипропильных фрагментов в каждом пике.

Методы, используемые второй лабораторией, были следующими. Образцы для электрораспыления были получены в концентрации 1 мг/мл в воде и разбавлены до ~ 5 мкМ в воде:ацетонитриле 1:1. Ионы

были получены с использованием источника Agilent Nanospray source со скоростью прямого введения 600 нл/мин (температура продувочного газа 150°C и скорость потока 5 л/мин при напряжении на капилляре 1500 В). Потенциалы на границе раздела между источником ионизации электрораспылением и пролетной трубкой для измерения подвижности ионов были отрегулированы для оптимальной интенсивности сигналов. Спектры накапливались в течение 3 мин при одном потенциале пролетной трубки и явно демонстрировали разделение подвижности ионов между несколькими классами ионов в потоке электро-спрея. Используемый анализатор представлял собой Agilent 6560, линейный масс-спектрометр подвижности ионов со слабым магнитным полем, и его можно рассматривать как, по существу, модифицированную версию Agilent Q-TOF с пролетной трубкой для измерения подвижности ионов, размещенной вблизи отверстия для ввода проб для МС, с использованием технологии ионной воронки. Данные МС с ионизацией электрораспылением из второй лаборатории, показанные на фиг. 30, подтверждают различие в характеристических спектрах замещения (в сравнении с фиг. 30А (Kleptose® НРВ) и фиг. 30В (Trappsol®)). Указанные данные также подтверждают, что МС с ионизацией электрораспылением является достаточно надежным аналитическим инструментом, который может быть использован обычным образом различными лабораториями для получения воспроизводимых характеристических спектров композиций гидроксипропил-бета-циклодекстринов.

На фиг. 31 приведено сравнение данных для трех различных партий Kleptose® НРВ, полученных методом МС с ионизацией электрораспылением, выполненным двумя различными лабораториями (фиг. 31А и фиг. 31В, вторая лаборатория; фиг. 31С, первая лаборатория), и продемонстрировано, что характеристические спектры замещения почти одинаковы между партиями. Низкая вариабельность от партии к партии в характеристическом спектре замещения согласуется с наблюдением, что среднее молярное замещение было одинаковым между двумя иллюстративными партиями Kleptose® НРВ, как обсуждалось выше в примере 2. На фиг. 32 представлены спектры для двух различных партий Trappsol®, полученные методом МС с ионизацией электрораспылением двумя различными лабораториями (фиг. 32А, первая лаборатория; фиг. 32В, вторая лаборатория) с использованием тех же условий, которые использовали для получения данных для Kleptose, показанных на фиг. 31А и фиг. 31В, и продемонстрировано, что в характеристическом спектре замещения Trappsol® имеется значительная вариабельность от партии к партии.

На фиг. 33 показаны спектры, полученные методом МС с ионизацией электрораспылением второй лабораторией, на которых ось Y была расширена по сравнению с фиг. 29-32, чтобы показать пики между m/z 1090 и 1230. Фиг. 33А представляет собой спектр, полученный для Trappsol®. Фиг. 33В представляет собой спектр, полученный для Kleptose® НРВ. Спектры свидетельствуют о наличии значительного содержания пропиленгликоля в Trappsol® (пики пропиленгликоля отмечены на фиг. 33А), но не в Kleptose® НРВ. Kleptose® НРВ содержит малое, но определяемое количество незамещенного циклодекстрина, демонстрируемое пиком, отмеченным на фиг. 33В.

На фиг. 34 показаны дополнительные различия между образцами Kleptose® НРВ и Trappsol® 1) DS значительно различается между двумя образцами; для Trappsol® показаны реакции конденсации, которые должны включать как аксиальные, так и экваториальные гидроксилы; 2) основные ионы обоих образцов представляют собой продукты присоединения NH_4^+ вследствие наличия аммония в твердой фазе; для каждого значения DS также присутствуют ионы MH^+ ; 3) изотопные кластеры для каждого из основных ионов демонстрируют наличие двухзарядных гомодимеров аддуктов аммония. В случае Trappsol® также наблюдают двухзарядные димеры протонированных ионов; 4) для обоих исследуемых продуктов наблюдают двухзарядные гомодимеры вследствие присоединения как протона, так и аммония; 5) двухзарядные гетеродимеры, наблюдаемые в случаях DS6-DS7 при m/z 1530, формируются в обоих исследуемых продуктах, но обладают намного большей интенсивностью в Trappsol®, чем в Kleptose® НРВ; 6) все эти различия сохранялись при концентрациях 2,5 мкМ в 80% ацетонитриле. Это указывает на то, что димеры образуют сильные межмолекулярные связи.

На фиг. 35 представлены дополнительные различия между образцами Kleptose® НРВ и Trappsol® в форме трехзарядных димеров как гомо-, так и гетероприсхождения. Они имеют большую интенсивность в Trappsol® и практически отсутствуют в Kleptose® НРВ.

В целом, анализ методом МС с ионизацией электрораспылением демонстрирует значительные отличия в характеристическом спектре замещения композиции гидроксипропил-бета-циклодекстринов, примененной в клиническом исследовании фазы I, описанном в примере 1, Kleptose® НРВ, по сравнению с характеристическим спектром замещения другой композиции гидроксипропил-бета-циклодекстринов, которая представляет собой поставляемый на рынок Trappsol® Cyclo™. Kleptose® НРВ имеет низкую вариабельность в характеристическом спектре замещения от партии к партии и низкое содержание примесей, в частности пропиленгликоля. Trappsol®, напротив, проявляет высокую вариабельность в характеристическом спектре замещения от партии к партии и имеет значительно более высокое содержание пропиленгликоля, предполагаемого ототоксина. В Trappsol® также продемонстрировано наличие трехзарядных димеров циклодекстринов как гомо-, так и гетероприсхождения, которые отсутствуют в Kleptose® НРВ.

7.6. Пример 6. Очистка композиций гидроксипропил-бета-циклодекстринов.

Исследовали три способа очистки (комплексобразование, осаждение и адсорбцию) в отношении их способности обеспечивать дополнительное снижение содержания примесей пропиленгликоля (ПГ) и незамещенного бета-циклодекстрина (DS = 0) в Kleptose® НВР.

7.6.1. Комплексобразование/связывание с органическими соединениями.

Эксперимент 5.6.1А: 1,0 г ГПБЦД (Kleptose НВР® (Roquette)) растворяли в воде (10 мл). К растворам добавляли п-ксилол (опыт № 5.6.1.1) или толуол (опыт № 5.6.1.2) (1,0 мл) и перемешивали смеси в течение 24 ч при комнатной температуре и 1 ч при 5-7°C. Опалесцирующие растворы фильтровали через мембранный фильтр из ацетата целлюлозы с диаметром пор 0,45 мкм и фильтраты упаривали при 40°C до сухого состояния.

Опыт № 5.6.1.1: 0,7 г; выход: 70%.

Опыт № 5.6.1.2: 0,8 г; выход: 80%.

Эксперимент 5.6.1В: 2,0 г ГПБЦД (Kleptose НВР® (Roquette)) растворяли в воде (4 мл). К раствору добавляли D-лимонен (опыт № 5.6.1.3, 0,04 мл, ~10 экв.) или L-ментол (опыт № 5.6.1.4, 0,04 г, ~10 экв.) или бензиловый спирт (опыт № 5.6.1.5, 0,03 мл, ~10 экв.) или холестерин (опыт № 5.6.1.6, 0,1 г, ~10 экв.) и перемешивали смесь в течение 72 ч при комнатной температуре. Растворы выдерживали при 5°C в течение 4 ч.

В опыте № 5.6.1.4 и опыте № 5.6.1.5 растворы оставались прозрачными, осадок не образовывался.

В опыте № 5.6.1.3 и опыте № 5.6.1.6 образовывался осадок. Каждый из растворов из опыта № 5.6.1.3 и опыта № 5.6.1.6 фильтровали через мембранный фильтр из ацетата целлюлозы с диаметром пор 0,45 мкм и фильтраты упаривали при 40°C до сухого состояния.

Опыт № 5.6.1.3: 2,1 г; выход: 105%. Опыт № 5.6.1.6: 1,4 г; выход: 70%.

Результаты для образцов, полученных в результате избирательного комплексобразования или связывания с малыми молекулами, обобщены в табл. 9.

Таблица 9

Анализ образцов ГПБЦД после избирательного комплексобразования или связывания

Испытание	Kleptose® НВР	Опыт №5.6.1.1 (п-ксилол)	Опыт №5.6.1.2 (толуол)	Опыт №5.6.1.3 (D-лимонен)	Опыт №5.6.1.6 (L-ментол)
Содержание пропиленгликоля	0,18%	н/о	н/о	н/о	н/о
Содержание незамещенного β-циклодекстрина	0,60%	0,38%	0,54%	0,21%	0,60%
Содержание ГПБЦД с DS = 1	3,68%	3,14%	3,25%	2,61%	3,42%
Другие примеси, родственные циклодекстрину	0,23%	0,23%	0,19%	0,14%	0,24%

н/о = Не определено.

В опытах №№ 5.6.1.1, 5.6.1.2 и 5.6.1.3 было показано снижение содержания незамещенного бета-циклодекстрина в сравнении с поставляемой на рынок Kleptose® НВР. Помимо этого, для D-лимонена в опыте № 5.6.1.3 было показано снижение содержания монозамещенного гидроксипропил-бета-циклодекстрина ("ГПБЦД DS = 1") и других примесей, родственных циклодекстрину (см. фиг. 19). На фиг. 19 показаны примеси незамещенного бета-циклодекстрина (НЦД) при времени удерживания ~5 мин, монозамещенных гидроксипропил-бета-циклодекстринов (DS-1) при времени удерживания ~6 мин и гидроксипропил-бета-циклодекстринов, имеющих DS = 2 (DS-2) при времени удерживания ~7,4 мин.

7.6.2. Осаждение.

Общий способ: 1,0 г ГПБЦД (Kleptose НВР® (Roquette)) растворяли в 5 или 2 мл растворителя (Р) и осаждали в 50 или 20 мл осаждающего агента (ОА). Отфильтрованную твердую фазу 3 раза промывали 3 мл ОА. Исключением был опыт № 5.6.2.11: 1,0 г ГПБЦД растворяли в воде (2 мл) и экстрагировали хлороформом (3×10 мл). Органические фазы объединяли, сушили над Na₂SO₄, декантировали и упаривали при 40°C до сухого состояния. Подготовка к каждому опыту приведена в табл. 10.

Таблица 10

Получение образцов для осаждения

Опыт №	Растворитель (Р)	Количество Р (мл)	Осаждающий агент (ОА)	Количество ОА (мл)	Выход (%)	Комментарии	
5.6.2.1	метанол	5	ацетон	50	92	Растворители и осаждающие агенты имели квалификацию «технический»; отфильтрованную твердую фазу сушили на воздухе при комнатной температуре	
5.6.2.2			ацетонитрил		96		
5.6.2.3			хлороформ		78		
5.6.2.4			ацетон		95		
5.6.2.5			ацетонитрил		98		
5.6.2.6			хлороформ		98		
5.6.2.7			ацетон		99		
5.6.2.8	вода		ацетонитрил		99	сушили на воздухе при комнатной температуре	
5.6.2.9			хлороформ	3×10	96		экстракция
5.6.2.4.2	метанол	2	ацетон	50	90		Растворители и осаждающие агенты квалификацию «для ВЭЖХ» или «для ГХ»;
5.6.2.5.2			ацетонитрил		94		
5.6.2.7.2	вода		ацетон		84		отфильтрованную твердую фазу сушили сушили под вакуумом при комнатной температуре
5.6.2.8.2			ацетонитрил		91		
5.6.2.10	метанол		ацетон		92		
5.6.2.11	вода		хлороформ	20	н/о		

н/о = Не определено.

Аналитические результаты экспериментов по осаждению растворителем обобщены в табл. 11.

Таблица 11

Сравнительный анализ образцов ГПБЦД, очищенных с помощью осаждения

Испытание	Kleptose® НРВ	Опыт 5.6.2.10	Опыт 5.6.2.2	Опыт 5.6.2.3	Опыт 5.6.2.7.2	Опыт 5.6.2.8.2	Опыт 5.6.2.11
Пропиленгликоль	0,18%	0,015%	0,035%	0,14%	< 0,01%	< 0,01%	0,18%
β-циклодекстрин	0,60%	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
ГПБЦД с DS=1	3,68%	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
Общее содержание других примесей, родственных циклодекстрину	0,23%	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о

н/о = Не определено.

Как показано в табл. 11, осаждение снижало уровень пропиленгликоля в образцах гидроксипропил-бета-циклодекстринов. В опытах №№ 5.6.2.10, 5.6.2.2 и 5.6.2.3 с использованием метанола в комбинации с ацетоном, ацетонитрилом или хлороформом в качестве осаждающих агентов соответственно удавалось снизить содержание пропиленгликоля на 92, 81 и 22% соответственно. В опытах №№ 5.6.2.7.2 и 5.6.2.8.2 с использованием воды в комбинации с ацетоном или ацетонитрилом в качестве осаждающих агентов соответственно содержание пропиленгликоля было снижено на > 95% (см. фиг. 20, где приведено сравнение опыта № 5.6.2.7.2 с Kleptose НРВ®). Для сравнения, в опыте № 5.6.2.11 с использованием воды и хлороформа не наблюдали значительного изменения содержания пропиленгликоля по сравнению с поставляемой на рынок Kleptose НРВ®.

7.6.3. Адсорбция.

7.6.3.1. Очистка с помощью оксида алюминия.

2,0 г ГПБЦД (Kleptose НРВ® (Roquette)) растворяли в метаноле (8 мл, опыт № 5.6.3.1.1) или этаноле (8 мл, опыт № 5.6.3.1.2) и перемешивали в течение 0,5 ч с оксидом алюминия (2,0 г, оксид алюминия 90 стандартизированный, Merck) при комнатной температуре. Оксид алюминия отфильтровывали, промывали метанолом или этанолом (3×2 мл) и водой (3×2 мл). Фильтраты (SZ) и первые промывочные растворители (M1 [метанол] или E1 [этанол]) упаривали при 40°C до сухого состояния.

Опыт №5.6.3.1.1: образец 5.6.3.1.1-SZ: 1,6 г; выход: 80 %.

Опыт №5.6.3.1.1: образец 5.6.3.1.1-M1: 0,2 г; выход: 10 %.

Опыт №5.6.3.1.2: образец 5.6.3.1.2-SZ: 1,5 г; выход: 75 %.

Опыт №5.6.3.1.2: образец 5.6.3.1.2-E1: 0,2 г; выход: 10 %.

7.6.3.2. Хроматография на оксиде алюминия.

Опыт № 5.6.3.2.1: 2,0 г ГПБЦД (Kleptose НРВ® (Roquette)) растворяли в метаноле (2 мл) и пропускали через оксид алюминия (10 г, оксид алюминия 90 стандартизированный, Merck) в метаноле, скорость потока: 3 мл/мин, 1 мин/фракцию, 30 фракций. Колонку промывали водой, скорость потока: 10 мл/мин, 20 мин (П). Следующие фракции объединяли и упаривали при 40°C до сухого состояния.

Образец 5.6.3.2.1А: фракция 2: 0,5 г, выход: 25 %.
 Образец 5.6.3.2.1В: фракции 3-8: 1,1 г, выход: 55 %.
 Образец 5.6.3.2.1С: фракции 9-14: 0,2 г, выход: 10 %.
 Образец 5.6.3.2.1D: фракции 15-П: 0,2 г, выход: 10 %.

Опыт № 5.6.3.2.2: 5,0 г ГПБЦД (Kleptose НВР® (Roquette)) растворяли в метаноле (10 мл) и пропускали через оксид алюминия (200 г, оксид алюминия 90 стандартизированный, Merck) со следующим градиентом растворителя: 100% метанола, скорость потока: 5 мл/мин, 3 мин/фракцию, фракции 1-30; 80% метанола, 20% воды, 5 мл/мин, 3 мин/фракцию, фракции 31-43; 50% метанола-воды, 5 мл/мин, 3 мин/фракцию, фракции 44-60; 100% воды, 5 мл/мин, 3 мин/фракцию, фракции 61-70; промывка (П): 100% воды, 10 мл/мин, 30 мин.

Следующие фракции объединяли и упаривали при 40°C до сухого состояния.

Образец 5.6.3.2.2А: фракции 0-5: 0,1 г, выход: 2 %.
 Образец 5.6.3.2.2В: фракции 6-10: 0,6 г, выход: 12 %.
 Образец 5.6.3.2.2С: фракции 11-16: 0,5 г, выход: 10 %.
 Образец 5.6.3.2.2D: фракции 17-45: 1,1 г, выход: 22 %.
 Образец 5.6.3.2.2Е: фракции 46-51: 0,5 г, выход: 10 %.
 Образец 5.6.3.2.2F: фракции 52-56: 0,9 г, выход: 18 %.
 Образец 5.6.3.2.2G: фракции 57-66: 0,5 г, выход: 10 %.
 Образец 5.6.3.2.2H: фракции 67-П: 1,3 г, выход: 26 %.

7.6.4. Анионообменная смола.

Опыт № 5.6.3.3: 1,0 г ГПБЦД растворяли в воде (10 мл), устанавливали рН от 10 до 12 (измеряли с помощью универсальной индикаторной бумаги, Merck, рН 1-14) с помощью 0,1н. NaOH. Раствор перемешивали с 5,0 г анионообменной смолы (Purolite, код продукта: 47111) в течение 14 ч. Смолу отфильтровывали, фильтрат нейтрализовали с помощью катионообменной смолы (Purolite, код продукта: 15131) и обрабатывали активированным углем. Твердый образец выделяли упариванием при 40°C до сухого состояния для получения образца 5.6.3.3, выход: 0,9 г, 90%.

Характеристика образцов после адсорбции

Таблица 12

Сравнительный анализ образцов ГПБЦД,
очищенных с помощью избирательной адсорбции

Образец	Kleptose® НВР	5.6.3.1.1 -SZ	5.6.3.1.2 -SZ	5.6.3.2.1 А	5.6.3.2.1 В	5.6.3.2.1 С	5.6.3.3
Пропиленгликоль	0,18%	н/о	н/о	0,10%	0,18%	н/о	0,15%
β-циклодекстрин	0,60%	0,13%	0,33%	0,14%	0,12%	0,23%	0,36%
ГПБЦД DS=1	3,68%	2,11%	2,45%	1,74%	2,16%	4,74%	2,69%
Общее содержание других примесей, родственных циклодекстрину	0,23%	0,1%	0,15%	0,06%	0,06%	0,12%	0,19%

н/о = Не определено.

Таблица 13

Сравнительный анализ образцов ГПБЦД, очищенных
с помощью избирательной адсорбции (хроматографии)

Образец	Kleptos e® НВР	5.6.3.2.2							
		А	В	С	Д	Е	F	G	Н
Пропиленгликоль	0,18%	н/о	0,26%	0,06%	0,31%	0,16%	0,05%	0,05%	0,03%
бета-циклодекстрин	0,60%	<0,05 %	<0,05 %	<0,05 %	<0,05 %	<0,05 %	<0,05 %	<0,05 %	1,53%
ГПБЦД с DS=1	3,68%	<0,05 %	0,05%	<0,05 %	<0,05 %	0,07%	0,14 %	0,49%	10,79 %
Общее содержание других примесей, родственных циклодекстрину	0,23%	0,38%	<0,05 %	<0,05 %	0,08%	0,23%	0,20%	0,51%	1,18%

н/о = Не определено.

Графическое представление данных табл. 12 и 13 изображено на фиг. 21-24. Фракции от А до Н соответствуют образцам от 5.6.3.2.2А до 5.6.3.2.2Н соответственно. В то время как анионообменная смола с последующей обработкой активированным углем служила для снижения содержания некоторых примесей (опыт № 5.6.3.3, фиг. 21), было обнаружено, что адсорбция на оксиде алюминия эффективна для

снижения содержания примесей, родственных циклодекстрину (опыт № 5.6.3.1, фиг. 22), особенно при применении в хроматографии (фиг. 23). На фиг. 21-23 показаны примеси незамещенного бета-циклодекстрина (НЦД) при времени удерживания ~5 мин, а также монозамещенных гидроксипропил-бета-циклодекстринов (DS-1) при времени удерживания ~6 мин и гидроксипропил-бета-циклодекстринов, имеющих DS = 2 (DS-2), при времени удерживания ~7,4 мин. Восемь фракций (от А до Н), собранных в опыте № 5.6.3.2.2, изображены на фиг. 24. Фракции В-Д содержали целевые примеси, пропиленгликоль и НЦД, в чрезвычайно низких концентрациях. Во фракциях А-Г содержание НЦД было снижено ниже предела количественного определения. Одновременно содержание ГПБЦД DS-1 составляло менее 0,15% во фракциях А-Г (96% или большее снижение) и содержание других примесей, родственных ЦД, было значительно снижено во фракциях В-Д. На основании этих результатов хроматографию на основе Al_2O_3 считали подходящей для эффективного удаления примесей, родственных ЦД, из ГПБЦД.

7.7. Пример 7. Очистка в большем масштабе.

Для подготовки к клиническому исследованию фазы II исследовали три способа очистки (осаждение, адсорбция на оксиде алюминия и сочетание осаждения и адсорбции на оксиде алюминия) в отношении их способности обеспечивать снижение содержания примесей пропиленгликоля (ПГ) и незамещенного бета-циклодекстрина (DS = 0) в Kleptose® НВР в большем масштабе. Проводили очистку партий ГПБЦД (Kleptose® НВР (Roquette)) массой 10 г; также проводили осаждение партии массой 30 г. Результаты, полученные для партий массой 10 г, приведены в табл. 16-18. Результаты, полученные для партии массой 30 г, приведены в табл. 19.

7.7.1. Осаждение растворителем.

В процессе получения 10 г ГПБЦД проводили осаждение из воды с ацетоном. ГПБЦД растворяли в половине эквивалентного количества воды (20 г ГПБЦД в 10 мл воды), выливали в пятикратный объем (100 мл) ацетона и три раза промывали двойным объемом (40 мл) ацетона после декантации. Растворение занимает 30-60 мин при использовании ультразвука и перемешивания. Липкая консистенция осадка была уменьшена трехкратным промыванием ацетоном перед фильтрованием. Выход составлял 87-93%.

В масштабе 30 г для растворения ГПБЦД вместо воды использовали метанол. 43 г ГПБЦД растворяли в 43 мл метанола и затем выливали в 430 мл ацетона. После трехкратного промывания ацетоном (43 мл) осадок легко фильтровался. Выход составлял 99%. Согласно результатам ГХ использование метанола во время очистки ускоряло очистку и обеспечивало лучший выход, чем использование воды.

7.7.2. Хроматография на оксиде алюминия.

ГПБЦД растворяли в метаноле, получая растворы с концентрацией примерно 1 мг/мл. Например, 10,0 г ГПБЦД растворяли в метаноле (10 мл) и пропускали через оксид алюминия (колонка объемом 180 см³, наполненная 220 г оксида алюминия) в метаноле, скорость потока 5 мл/мин, фракции собирали каждые 10 мин с общим количеством фракций 8-20. Элюент представлял собой 100% метанол. Для получения 10 г очищенных ГПБЦД использовали 20-22 г исходных продуктов с выходом чистого продукта 70-75%.

7.7.3. Комбинация хроматографии на оксиде алюминия и осаждения растворителем.

Для протокола комбинации после описанного выше осаждения растворителем следовала описанная выше хроматография на оксиде алюминия для партий ГПБЦД массой 10,0 г.

Таблица 16

Анализ образцов ГПБЦД, очищенных с помощью осаждения растворителем (ID партии: CYL-4061)

Испытание	Анализ	Результат
Подлинность	ВЭЖХ, ЯМР	соответствует
Средняя степень замещения	ЯМР	4,2
Содержание незамещенного β-циклодекстрина	ВЭЖХ	0,6%
ГПБЦД DS-1	ВЭЖХ	3,7%
Общее содержание других примесей, родственных циклодекстрину	ВЭЖХ	0,08%
Содержание пропиленгликоля	ГХ	0,01%
Содержание дипропиленгликоля	ГХ	< 0,2%
Содержание трипропиленгликоля	ГХ	< 0,2%
Способность к солубилизации холестерина (при концентрации ЦД 50 мг/мл)	ВЭЖХ	23 мг/мл
Растворимость (в 100 см ³ растворителя при 25° Цельсия)		Метанол: > 60 г Этанол: > 60 г

Таблица 17

Анализ образцов ГПБЦД, очищенных с помощью абсорбционной хроматографии на оксиде алюминия (ID партии: CYL-4062)

Испытание	Анализ	Результат
Подлинность	ВЭЖХ, ЯМР	соответствует
Средняя степень замещения	ЯМР	н/о
Содержание незамещенного β-циклодекстрина	ВЭЖХ	< 0,05%
ГПБЦД DS-1	ВЭЖХ	0,1%
Общее содержание других примесей, родственных циклодекстрину	ВЭЖХ	0,05%
Содержание пропиленгликоля	ГХ	0,05%
Содержание дипропиленгликоля	ГХ	< 0,2%
Содержание трипропиленгликоля	ГХ	< 0,2%
Способность к солюбилизации холестерина (при концентрации ЦД 50 мг/мл)	ВЭЖХ	27 мг/мл
Растворимость (в 100 см ³ растворителя при 25° Цельсия)		Метанол: > 60 г Этанол: > 60 г

Таблица 18

Анализ образцов ГПБЦД, очищенных с помощью комбинации абсорбционной хроматографии на оксиде алюминия и осаждения растворителем (ID партии: CYL-4063)

Испытание	Анализ	Результат
Подлинность	ВЭЖХ, ЯМР	соответствует
Средняя степень замещения	ЯМР	4,6
Содержание незамещенного β-циклодекстрина	ВЭЖХ	< 0,05%
ГПБЦД DS-1	ВЭЖХ	0,02%
Общее содержание других примесей, родственных циклодекстрину	ВЭЖХ	< 0,05%
Содержание пропиленгликоля	ГХ	< 0,01%
Содержание дипропиленгликоля	ГХ	< 0,2%
Содержание трипропиленгликоля	ГХ	< 0,2%
Способность к солюбилизации холестерина (при концентрации ЦД 50 мг/мл)	ВЭЖХ	22 мг/мл
Растворимость (в 100 см ³ растворителя при 25° Цельсия)		Метанол: > 60 г Этанол: > 60 г

Таблица 19

Анализ образцов ГПБЦД (30 г), очищенных с помощью комбинации абсорбционной хроматографии на оксиде алюминия и осаждения растворителем (ID партии: CYL-4077)

Испытание	Анализ	Результат
Подлинность	ВЭЖХ, ЯМР	соответствует
Средняя степень замещения	ЯМР	4,7
Содержание незамещенного β-циклодекстрина	ВЭЖХ	< 0,02%
ГПБЦД DS-1	ВЭЖХ	0,12%
Общее содержание других примесей, родственных циклодекстрину	ВЭЖХ	< 0,02%
Содержание пропиленгликоля	ГХ	< 0,02%
Способность к солюбилизации холестерина (при концентрации ЦД 50 мг/мл)	ВЭЖХ	22 мг/мл
Растворимость (в 100 см ³ растворителя при 25° Цельсия)		Метанол: > 60 г Этанол: > 60 г

В табл. 20 приведено сравнение результатов 3 способов очистки.

Таблица 20

Сравнение способов очистки

	Kleptose® НРВ	осаждение растворителем	абсорбционная хроматография на оксиде алюминия	комбинация абсорбционной хроматографии и на оксиде алюминия и осаждения растворителем (вода-ацетон) (10г)	комбинация абсорбционной хроматографии и на оксиде алюминия и осаждения растворителем (метанол-ацетон) (30г)
		ID партии: (CYL-4061)	ID партии: (CYL-4062)	ID партии: (CYL-4063)	ID партии: (CYL-4077)
Испытание					
Подлинность		соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Средняя степень замещения	4,34	4,2	не определена	4,6	4,7
Содержание незамещенного β-циклодекстрина	0,60%	0,6%	< 0,05%	< 0,05%	< 0,02%
ГПБЦД DS-1	3,68%	3,7%	0,1%	0,02%	0,12%
Общее содержание других примесей, родственных циклодекстрину	0,23%	0,08%	0,05%	< 0,05%	< 0,02%
Содержание пропиленгликоля	0,18%	0,01%	0,05%	< 0,01%	< 0,02%
Содержание дипропиленгликоля		< 0,2%	< 0,2%	< 0,2%	
Содержание трипропиленгликоля		< 0,2%	< 0,2%	< 0,2%	
Способность к солюбилизации холестерина (при концентрации ЦД 50 мг/мл)		23 мг/мл	27 мг/мл	22 мг/мл	22 мг/мл
Растворимость (в 100 см ³ растворителя при 25° Цельсия)		Метанол: > 60 г Этанол: > 60 г	Метанол: > 60 г Этанол: > 60 г	Метанол: > 60 г Этанол: > 60 г	Метанол: > 60 г Этанол: > 60 г

7.7.4. Влияние очистки на характеристический спектр замещения.

Анализ методом МС с ионизацией электрораспылением проводили, по существу, как описано в примере 5 (вторая лаборатория) для аликвоты партии CYL-4063, очищенной с помощью комбинации абсорбционной хроматографии на оксиде алюминия и осаждения растворителем (вода-ацетон), и для аликвоты исходной партии Kleptose® НРВ. Сравнение спектров приведено на фиг. 36, на фиг. 36А показан спектр исходного продукта и на фиг. 36В показан спектр очищенной партии. Как можно видеть, очистка устраняет незамещенные молекулы бета-циклодекстрина ("DS-0"), почти все молекулы циклодекстрина с единственным гидроксипропильным заместителем ("DS-1") и снижает концентрацию молекул циклодекстрина, содержащих два гидроксипропильных заместителя ("DS-2"). Спектры также предполагают небольшое изменение относительных долей и, таким образом, распределение более высокозамещенных производных гидроксипропил-бета-циклодекстрина, DS3, DS4, DS5, DS6 и DS7.

Авторы настоящего изобретения количественно оценили распределение пиков 14 партий Kleptose® НРВ ("ЕОххх") и очищенной партии CYL-4063. Сигнал каждого пика и процентное содержание каждого пика, вносящее свой вклад в общий сигнал, обобщены в табл. 21.

Таблица 21

Количественное представление распределения пиков

ID партии	m/z 1152 (DS-0)	m/z 1210 (DS-1)	m/z 1268 (DS-2)	m/z 1326 (DS3)	m/z 1384 (DS4)	m/z 1442 (DS5)	m/z 1500 (DS6)	m/z 1558 (DS7)	m/z 1618 (DS8)	Общий сигнал	DS-2 /DS-1
EO190	8271	40791	139700	321271	418999	312241	154341	50521	0	1446134	3,4
	0,6%	2,8%	9,7%	22,2%	29,0%	21,6%	10,7%	3,5%	0,0%	100,0%	
EO194	0	74463	261482	581280	683474	493534	235243	78741	0	2408217	3,5
	0,0%	3,1%	10,9%	24,1%	28,4%	20,5%	9,8%	3,3%	0,0%	100,0%	
EO197	14510	67730	211808	438806	488923	334509	155845	52450	0	1764582	3,1
	0,8%	3,8%	12,0%	24,9%	27,7%	19,0%	8,8%	3,0%	0,0%	100,0%	
EO199	14595	80072	258738	547035	604472	417563	202219	67725	8196	2200613	3,2
	0,7%	3,6%	11,8%	24,9%	27,5%	19,0%	9,2%	3,1%	0,4%	100,0%	
EO230	9783	51565	178426	349066	380442	264898	125560	41141	0	1400879	3,5
	0,7%	3,7%	12,7%	24,9%	27,2%	18,9%	9,0%	2,9%	0,0%	100,0%	
EO234	12101	64237	210693	427987	486218	329743	152141	49506	0	1732625	3,3
	0,7%	3,7%	12,2%	24,7%	28,1%	19,0%	8,8%	2,9%	0,0%	100,0%	
EO240	10871	55903	187803	365483	390189	270539	127936	42957	0	1451681	3,4
	0,7%	3,9%	12,9%	25,2%	26,9%	18,6%	8,8%	3,0%	0,0%	100,0%	
EO242	7678	31064	101220	192348	192221	128433	60981	23856	0	737801	3,3
	1,0%	4,2%	13,7%	26,1%	26,1%	17,4%	8,3%	3,2%	0,0%	100,0%	
EO253	11527	53739	174134	335106	358419	254261	119699	44125	0	1351010	3,2
	0,9%	4,0%	12,9%	24,8%	26,5%	18,8%	8,9%	3,3%	0,0%	100,0%	
EO265	0	40533	128930	263039	296342	203297	98477	32960	0	1063578	3,2
	0,0%	3,8%	12,1%	24,7%	27,9%	19,1%	9,3%	3,1%	0,0%	100,0%	
EO270	18518	101531	340195	681274	764792	530914	241841	82688	0	2761754	3,4
	0,7%	3,7%	12,3%	24,7%	27,7%	19,2%	8,8%	3,0%	0,0%	100,0%	
EO277	15144	69571	229585	488128	540927	377689	178205	59435	8755	1967438	3,3
	0,8%	3,5%	11,7%	24,8%	27,5%	19,2%	9,1%	3,0%	0,4%	100,0%	
EO237	27395	143476	478761	988885	1124832	769561	363246	123518	0	4019673	3,3
	0,7%	3,6%	11,9%	24,6%	28,0%	19,1%	9,0%	3,1%	0,0%	100,0%	
EO245	0	295840	965902	1907408	2345018	1807732	880668	285778	0	8488345	3,3
	0,0%	3,5%	11,4%	22,5%	27,6%	21,3%	10,4%	3,4%	0,0%	100,0%	
Средне	0,6%	3,6%	12,0%	24,5%	27,6%	19,3%	9,2%	3,1%	0,1%	100,0%	3,3
	С.О.	0,3%	0,3%	1,0%	1,0%	0,7%	1,1%	0,7%	0,2%	0,1%	0,1
CYL-4063	0	0	258436	1401875	2525377	2328043	1223567	409420	35622	8182339	н/о
	0,0%	0,0%	3,2%	17,1%	30,9%	28,5%	15,0%	5,0%	0,4%	100,0%	

7.8. Пример 8. Влияние очистки на профили экспрессии генов.

Как обсуждалось в примере 7, попытки очистки в больших масштабах были успешны в отношении снижения содержания пропиленгликоля, который является предполагаемым ототоксином; молекул бета-циклодекстрина, не имеющих гидроксипропильных заместителей (DS-0), которые, как известно, образуют осадки; и бактериального эндотоксина, обладающего высокой провоспалительной активностью. Однако авторы настоящего изобретения наблюдали, что абсорбционная хроматография на оксиде алюминия, независимо от того, используют ли ее отдельно или в комбинации с осаждением растворителем, также приводит к значительному изменению в профиле или характеристическом спектре композиции, по существу снижая количество гидроксипропил-бета-циклодекстрина DS-1 и - в партии, проанализированной методом МС с ионизацией электрораспылением, которую предварительно очищали с помощью комбинации абсорбционной хроматографии на оксиде алюминия и осаждения растворителем, - снижая количество гидроксипропил-бета-циклодекстрина DS-2 наряду с небольшим очевидным влиянием на наличие и соотношение в большей степени замещенных соединений, содержащихся в Kleptose® HPB (DS3, DS4, DS5, DS6, DS7).

Для оценки потенциальных фармакологических эффектов этого существенного изменения в характеристическом спектре композиции авторы настоящего изобретения выполняли определение профиля экспрессии генов.

7.8.1. Материалы и методы.

7.8.1.1. Клетки.

Клетки GM18453 (гомозиготные по мутации NPC1) и клетки GM05659 дикого типа были получены из Медицинского Института Кориелла (Coriell Medical Institute). Линии клеток культивировали в 10% ЭБС, среде DMEM и 100 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина. Перед обработкой циклодекстринами клетки в концентрации 500000 клеток/лунку подвергали синхронизации с применением 10 мкг/мл митомицина. Гидроксипропил-циклодекстрины (ГПЦД) растворяли в ФСБ в диапазоне концентраций, используемом в исследовании (от 0,1 до 10 мМ).

7.8.1.2. Получение РНК и анализ полного транскриптома.

Клетки NPC1 (GM18453) и клетки дикого типа (GM05659) лизировали и экстрагировали РНК с помощью реагента Trizol® (Invitrogen). Затем клетки подвергали обработке ДНКазой I (Qiagen). Чистоту и концентрацию образцов проверяли с помощью спектрофотометра Qubit и инструмента Nano Drop ND-1000, а целостность РНК (RIN) оценивали с использованием биоанализатора Agilent 2100. Экстрагированную мРНК обогащали с использованием набора RiboMinus™ Eukaryote (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Конечное количество РНК составляло 10 мкг на реакцию. Библиотеки кДНК, полученные с использованием набора SMARTer Stranded RNA-Seq Kit (Clontech), были выбраны по размеру в диапазоне 150-250 п.о. и секвенированы в соответствии с протоколом, предоставленным Illumina. Образцы секвенировали с помощью платформы HiSeq 2000 с использованием прямого праймера размером 75 п.о. и обратного праймера размером 35 п.о.

7.8.1.3. Анализ результатов секвенирования РНК.

Секвенирование библиотек кДНК приводило к получению 20941134-42375128 парных чтений на образец. Для улучшения качества картирования парные чтения были обрезаны до 50 пар оснований. Все чтения в формате color-space были выравнены на референсный геном человека (Ensembl, релиз 73) с использованием программного обеспечения TopHat v2.1.0, использующего Bowtie версии 1.0.0. Значения RPKM (количество чтений на тысячу нуклеотидов транскрипта на миллион картированных чтений) для оценки уровней экспрессии генов рассчитывали с помощью программного обеспечения Cufflinks v2.0.2, а исходные подсчеты были получены с помощью приложений Illumina BaseSpace Core Apps с использованием генных аннотаций генов, кодирующих белки, загруженных из Ensembl (релиз 73). Дифференциальную экспрессию/кратность изменения оценивали по исходным подсчетам с помощью программного обеспечения edgeR. Все программы использовали с их параметрами по умолчанию, а TopHat настраивали таким образом, чтобы не находить новые сайты соединения.

Кратность изменения для каждого гена визуализировали с помощью программного обеспечения TIBCO Spotfire (версии 6.5). Для отображения изменений дифференциальной экспрессии генов использовали комбинацию древовидной карты и гистограмм. Для просмотра изменений полного транскриптома при обработке 10 мМ ГПЦД показания гистограмм были оптимальными.

7.8.1.4. Анализ валидации результатов секвенирования РНК.

Исходные парные чтения нуклеотидов секвенирования РНК подвергали прямому компьютерному анализу на наличие выбранного набора генов гомеостаза холестерина для установления реакции на обработку Kleptose® НРВ. Выбранные гены перечислены ниже в табл. 22.

Таблица 22

Гены гомеостаза холестерина, выбранные для анализа ответа генов в клетках GM18453 и GM05659

ID гена	Классификация
AIDOB	транспорт холестерина
ABACA1	транспорт холестерина
ABCG1	транспорт холестерина
ABCG2	транспорт холестерина
ACAT	этерификация холестерина
ANKFY1	лизосомальный
APOA1	метаболизм липидов
APOEC1	метаболизм липидов
CEL	транспорт липидов
CETP	перенос эфиров холестерина
CH25H	транспорт липидов
DHCR7	сборка липопротеинов
FDFT1	синтез холестерина
GGPS1	синтез холестерина
ID11	синтез холестерина
LIPA	метаболизм липидов
MVD	синтез холестерина
SC4MOL	синтез холестерина
SC5DL	синтез холестерина
SOAT2	сборка липопротеинов
SREBF2	синтез холестерина

7.8.1.5. Анализ метаболических путей.

Результаты всех обработок клеток циклодекстринами анализировали для определения затронутых ключевых метаболических путей в линии клеток 18453 NPC1. ID гена, кратность изменения и р-значение

для каждого гена использовали для получения графиков рассеяния для большого массива данных с использованием программного обеспечения Ingenuity Pathway Analysis. На этих графиках были продемонстрированы активируемые и подавляемые при различных обработках гены. Затем для групп генов оценивали вероятность их способности изменять определенные метаболические пути ($-\log_{10}(p\text{ACCC})$) по сравнению с их дифференциальными уровнями экспрессии ($-\log_{10}(p\text{ORA})$). Вероятностное картирование элементов гена, которые могут изменять пути, не обязательно исключает вовлеченность других элементов гена в изменение других путей.

Эти данные были проанализированы в контексте путей, полученных из базы данных Энциклопедии генов и геномов Киото (KEGG) (релиз 73.0+/03-16 марта 2015 г.) (Kanehisa et al., 2000; Kanehisa et al., 2002), онтологии генов из базы данных Консорциума геномной онтологии (19 сентября 2014 г.) (Ashburner et al., 2000; Gene Ontology Consortium, 2001), микроРНК из miRBase (релиз 21) и баз данных TARGET-SCAN (TargetScan релиз 6.2 (обновлен в марте 2015 г.)) (Griffiths-Jones et al., 2008; Kozomara and Griffiths-Jones, 2014; Friedman et al., 2009; Grimson et al., 2007) и заболеваний из базы данных KEGG (релиз 73.0+/03-16 марта 2015 г.) (Kanehisa et al., 2000; Kanehisa et al., 2002).

Программа Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen) оценивает пути с помощью факторного анализа, предложенного в источнике (Draghici et al., 2007; Tarca et al., 2009; Khatir et al., 2007). В факторном анализе используют два типа доказательств: i) преобладание дифференциально экспрессируемых (DE) генов в данном пути и ii) изменение этого пути, вычисленное посредством распространения измеренных изменений экспрессии по топологии пути. Эти аспекты охватываются двумя независимыми значениями вероятности, $p\text{ORA}$ и $p\text{Acc}$, которые затем объединяют в единое совокупное p -значение. Топологии путей, состоящие из генов и их взаимодействий, получают из базы данных KEGG (Kanehisa et al., 2000; Kanehisa et al., 2010; Kanehisa et al., 2012; Kanehisa et al., 2014).

Первая вероятность, $p\text{ORA}$, представляет собой вероятность получения числа генов DE, принадлежащих данному пути, большего или равного случайно наблюдаемому числу (Draghici et al., 2003; Draghici 2011). Предположим, что в эксперименте проведено определение для N генов, причем M из них принадлежат данному пути. Основываясь на предшествующем отборе генов DE, было обнаружено, что K из M генов являются дифференциально экспрессируемыми. Вероятность наблюдения точно x дифференциально экспрессируемых генов, принадлежащих данному пути, вычисляют на основе гипергеометрического распределения: поскольку гипергеометрическое распределение является дискретным распределением, вероятность случайного наблюдения менее чем x генов, принадлежащих данному пути, может быть вычислена посредством суммирования вероятностей получения 1 или 2 или... или $x-1$ генов, принадлежащих данному пути:

$$(1) \quad P(X=x|N,M,K) = \frac{\binom{M}{x} \binom{N-M}{K-x}}{\binom{N}{K}}$$

Для вычисления избыточного p -значения для получения числа генов DE, принадлежащих данному пути, большего или равного наблюдаемому числу, инструмент Ingenuity Pathway вычисляет $p\text{ORA} = p(x) = 1 - p(x-1)$:

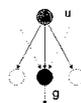
$$(2) \quad p_d(x-1) = P(X=1) + P(X=2) + \dots + P(X=x-1) = \sum_{i=0}^{x-1} \frac{\binom{M}{i} \binom{N-M}{K-i}}{\binom{N}{K}}$$

Вторую вероятность, $p\text{Acc}$, рассчитывают на основе количества изменений, измеренных для каждого пути. Фактор изменения вычисляют для каждого гена, принадлежащего данному пути, используя

$$(3) \quad p_d(x) = 1 - \sum_{i=0}^{x-1} \frac{\binom{M}{i} \binom{N-M}{K-i}}{\binom{N}{K}}$$

В приведенном уравнении член $\text{AE}(g)$ представляет собой имеющее знак нормированное измеренное изменение экспрессии гена g , а $a(g)$ представляет собой априорное значение, основанное на типе гена. Второй член представляет собой сумму факторов изменений всех генов u , расположенных непосредственно выше целевого гена g , нормированное на число нижерасположенных генов для каждого такого гена $N(u)$. Величина β характеризует силу взаимодействия между генами g и u . Знак β представляет собой тип взаимодействия: плюс для сигналов, подобных активации, и минус для сигналов, подобных ингибированию. Следовательно, Ingenuity Pathway Analysis вычисляет полное накопление изменений на уровне каждого гена $\text{Acc}(g)$ как разность между фактором изменения $\text{PF}(g)$ и наблюдаемым логарифмом кратности изменений:

$$(4) \quad \text{PF}(g) = a(g) \cdot \Delta E(g) + \sum_{u \in \text{parents}(g)} \beta_{gu} \frac{\text{PF}(u)}{N_u(u)}$$



$$(5) \quad \text{Acc}(g_i) = \text{PF}(g_i) - \Delta E(g_i)$$

Все накопления изменений вычисляют одновременно путем решения системы линейных уравнений, возникающей в результате объединения приведенного выше уравнения (см. выше) для всех генов

данного пути. После вычисления всех накоплений изменений Ingenuity Pathway вычисляет общее накопление для пути как сумму абсолютных накоплений для всех генов. Значимость случайного получения большего значения общего накопления (pAcc) оценивается посредством самонастройки.

Два типа доказательств, pORA и pAcc, объединяют в одно окончательное p-значение с использованием метода Фишера. Затем это p-значение корректируют для множественных сравнений с помощью ожидаемой доли ложных отклонений (false discovery rate, FDR) и поправки Бонферрони (Bonferroni). Метод Бонферрони является самым простым и более консервативным из двух (Bonferroni, 1935; Bonferroni, 1936). Он уменьшает частоту ложных обнаружений путем наложения более жесткого порога на каждое сравнение, взвешенное по общему числу сравнений. FDR является более мощным в отношении обнаружения большего числа ложных положительных результатов (Benjamini and Hochberg, 1995; Benjamini and Yekutieli, 2001). Это гарантирует, что общий процент ложных положительных результатов ниже выбранного порогового значения.

7.8.2. Результаты.

7.8.2.1. Валидация анализа.

Перед проведением исследований полного транскриптома клетки GM18453 и GM05659 обрабатывали Kleptose® НРВ в диапазоне концентраций (от 0,1 до 10 мМ) и оценивали влияние на выбранные гены, связанные с гомеостазом холестерина.

Результаты приведены ниже в табл. 23 и изображены на фиг. 37. Результаты выражены в виде кратности изменений (КИ) ($\log(\text{КИ})$).

Таблица 23

Обработка клеток GM05659 и GM18453с применением Kleptose® НРВ

ID гена	Классификация гена	необработанные клетки GM05659 (дикого типа)	необработанные GM18453	0,1мМ GM18453	1,0мМ GM18453	10,0 мМ GM18453
A1DOB	транспорт холестерина	1,723	0,721	0,6332	2,016	2,558
ABACA1	транспорт холестерина	1,115	0,403	0,345	1,7634	4,569
ABCG1	транспорт холестерина	1,316	0,805	0,717	1,23	3,109
ABCG2	транспорт	1,432	1,222	1,101	1,893	2,467

ID гена	Классификация гена	необработанные клетки GM05659 (дикого типа)	необработанные GM18453	0,1мМ GM18453	1,0мМ GM18453	10,0 мМ GM18453
	холестерина					
ACAT	этерификация холестерина	1,742	1,124	1,112	2,371	2,4322
ANKFY1	лизосомальный	1,823	0,957	0,786	2,254	2,279
APOA1	метаболизм липидов	2,672	1,459	1,93447	2,7346	4,9437
APOEC1	метаболизм липидов	1,217	1,081	0,9996	1,5988	2,1115
CEL	транспорт липидов	2,045	1,038	1,006	1,989	3,229
CEPT	перенос эфиров холестерина	1,789	1,106	1,4803	2,005	3,7633
ХОЛЕСТЕРИН 25Н	транспорт липидов	1,643	0,845	1,2246	2,007	1,788
DHCR7	сборка липопротеинов	1,821	0,677	0,4668	1,634	1,228
FDFT1	синтез холестерина	1,145	0,781	0,8491	0,9572	1,117
GGPS1	синтез холестерина	1,509	1,512	1,432	1,648	1,589
ID11	синтез холестерина	2,28	1,402	1,227	2,766	3,444
LIPA	метаболизм липидов	1,607	0,917	0,893	1,339	1,7232
MVD	синтез холестерина	1,7224	1,593	1,5423	1,6772	2,1077
SC4MOL	синтез холестерина	1,837	1,71	1,6632	1,8905	1,9436
SC5DL	синтез холестерина	2,734	1,893	2,2911	3,244	4,131
SOAT2	сборка липопротеинов	1,436	0,533	0,6021	0,9978	1,639
SREBF2	синтез холестерина	1,6044	0,821	0,5299	1,7541	1,9444

Результаты демонстрируют дозозависимое действие Kleptose® НРВ на клетки, гомозиготные по мутации NPC1, и дополнительно демонстрируют, что из трех исследованных концентраций 1,0 мМ Kleptose® НРВ подходит для получения значимых данных.

7.8.2.2. Анализ очищенных композиций.

7.8.2.2.1. Влияние на экспрессию предварительно выбранных генов гомеостаза холестерина.

Как обсуждалось в примере 7, авторы настоящего изобретения обнаружили, что протоколы очистки, которые включают адсорбцию на оксиде алюминия, значительно изменяют характеристический спектр замещения смеси гидроксипропил-бета-циклодекстринов. Для оценки того, насколько это изменение изменяет фармакологическое действие композиции, авторы настоящего изобретения сравнили действие (i) очищенных различным образом композиций и (ii) Kleptose® НРВ на экспрессию генов гомеостаза холестерина в клетках GM18453, гомозиготных по мутации NPC1.

К своему удивлению, авторы настоящего изобретения не обнаружили различий.

На фиг. 38 показана кратность изменений экспрессии в клетках GM18453, гомозиготных по мутации NPC1, подмножества генов гомеостаза холестерина, экспрессия которых статистически значимо отличалась ($p < 0,001$) после обработки, для четырех различных композиций: СТД ("стандартный" препарат Kleptose® НРВ); АС (Kleptose® НРВ, очищенная с помощью хроматографии на оксиде алюминия); ОР (Kleptose® НРВ, очищенная путем осаждения растворителем) и АО (Kleptose® НРВ, очищенная с помощью хроматографии на оксиде алюминия и осаждения растворителем); см. пример 7 для получения подробных сведений о протоколах очистки и соответствующих композициях.

Ни одна из очищенных композиций в любой из исследуемых концентраций, по существу, не отличалась от исходной композиции, Kleptose® НРВ ("СТД"), несмотря на отсутствие соединений с низким значением DS в композициях, очищенных на оксиде алюминия. Таким образом, представляется, что со-

ответствующая фармакологическая активность композиции - ее действие на гомеостаз холестерина - относится к более замещенным соединениям, содержащимся в Kleptose® HPB, поскольку удаление незамещенных молекул бета-циклодекстрина (DS-0), монозамещенных гидроксипропил-бета-циклодекстринов (DS-1) и существенное снижение содержания дизамещенных гидроксипропил-бета-циклодекстринов (DS-2) не оказывало заметного влияния на способность композиции изменять экспрессию генов гомеостаза холестерина в клетках NPC1.

7.8.2.2.2. Анализ полного генома.

В анализе, описанном выше, авторы настоящего изобретения оценивали изменения экспрессии генов, которые были предварительно выбраны как соответствующие первичному дефекту, вызванному мутацией NPC1, и сравнивали влияние на экспрессию только того подмножества предварительно выбранных генов, экспрессия генов которого статистически значимо отличалась после обработки гидроксипропил-бета-циклодекстрином. Для подтверждения наблюдения, что удаление соединений с низким значением DS не оказывает заметного влияния на соответствующую фармакологическую активность, и для дополнительного изучения возможных различий между композициями авторы настоящего изобретения выполнили анализ полного генома для определения на основе статистических расчетов биологических путей, подвергшихся наибольшему воздействию при обработке.

Авторы настоящего изобретения выполнили анализ путей полного генома клеток NPC1, обработанных 1,0 мМ Kleptose®HPB и 1,0 мМ очищенной партии CYL-4063. Как подробно описано в примере 7, CYL-4063 получали из Kleptose® HPB с помощью комбинации абсорбционной хроматографии на оксиде алюминия и осаждения растворителем. Как показано в табл. 21 в примере 7, очистка значительно снижала долю соединений с низким значением DS, причем только 3,2% циклодекстриновых соединений в CYL-4063 имели 0, 1 и 2 заместителя в совокупности, по сравнению со средним общим содержанием DS-0, DS-1 и DS-2 в Kleptose® HPB, составляющим 16,2%.

Как показано на фиг. 39, три из четырех важнейших путей, определенных как статистически наиболее значительно затронутые обработкой 1,0 мМ Kleptose® HPB, также входят в число четырех важнейших путей, статистически наиболее значительно затронутых обработкой 1,0 мМ CYL-4063, и это сигнальный путь *erbB*, сигнальный путь *MARK* и сигнальный путь *GnRH*. Эти результаты подтверждают малое изменение общей активности смеси гидроксипропил-бета-циклодекстринов в клетках GM 18453, несмотря на удаление из CYL-4063 соединений с низким значением DS.

Кроме того, авторы настоящего изобретения наблюдали также, что путь биосинтеза стероидов, непосредственно затронутый первичным дефектом, вызванным мутацией NPC1 в этих клетках, является вторым путем, наиболее значимо затронутым после обработки 1,0 мМ CYL-4063, но только шестым, наиболее статистически значимо затронутым обработкой 1,0 мМ Kleptose® HPB. Эти результаты согласуются с гипотезой о том, что влияние композиции на гомеостаз холестерина относится к более замещенным соединениям циклодекстринов, содержащимся в очищенной композиции в более высоких концентрациях.

7.8.2.3. Активность фракций, имеющих различную степень замещения.

Для того чтобы непосредственно оценить неравный вклад соединений циклодекстрина, имеющих различную степень гидроксипропильного замещения, авторы настоящего изобретения провели фракционирование партии Kleptose® HPB с получением трех объединенных фракций, имеющих соответственно низкую, среднюю и высокую степень гидроксипропильного замещения, и исследовали действие этих объединенных фракций на экспрессию генов в клетках NPC1.

7.8.2.3.1. Способы.

(а) Фракционирование.

Фракции получали из Kleptose® HPB партии E0245. Распределение соединений бета-циклодекстрина в исходном продукте E0245 представлено в табл. 21 (пример 7), выдержка из соответствующей части - в табл. 24 ниже.

Таблица 24

Количественное представление распределения пиков

ID партии	m/z 1152 (DS-0)	m/z 1210 (DS-1)	m/z 1268 (DS-2)	m/z 1326 (DS3)	m/z 1384 (DS4)	m/z 1442 (DS5)	m/z 1500 (DS6)	m/z 1558 (DS7)	m/z 1618 (DS8)	Общий сигнал
E0245	0	295840	965902	190740	234501	180773	880668	285778	0	848834
	0,0%	3,5%	11,4%	22,5%	27,6%	21,3%	10,4%	3,4%	0,0%	100,0%

Образец Kleptose® HPB (партии E0245) массой 15 г разделяли на колонке CD-screen, по существу, как описано выше в примере 5.3.1, и собирали фракции. На фиг. 40 показаны хроматограммы различных фракций, полученных путем препаративного хроматографического разделения методом CD-Screen, снабженные примечаниями для демонстрации степени замещения хроматографически разделенных соединений гидроксипропил-бета-циклодекстринов.

Фракция 2 была выбрана в качестве фракции с низкой степенью замещения, "L" (CYL-4103). Фракция, содержащая соединения со средней степенью замещения, "M" (CYL-4104), представляет собой объединенные фракции 4-15. Фракция, имеющая высокую степень замещения, "H" (CYL-4105), представля-

ет собой объединенные фракции 16-24. На фиг. 41 показаны спектры, полученные методом МС с ионизацией электрораспылением, для (А) Kleptose® НРВ партии E0245, снабженные примечаниями для идентификации сигналов по степени гидроксипропильного замещения; (В) объединенной фракции "L"; (С) объединенной фракции "М" и (D) объединенной фракции "Н".

(b) Определение профиля экспрессии.

Линию клеток NPC GM18453 (500000 клеток на лунку) параллельно обрабатывали 1,0 мМ фракций "L", "М" и "Н". После каждой обработки выделяли РНК с последующим получением библиотек кДНК в соответствии с предыдущими методами. Секвенирование библиотек кДНК приводило к получению 28891287-50245721 парных чтений на образец. Для улучшения качества картирования парные чтения были обрезаны до 50 пар оснований. Все чтения в формате color-space были выравнены на референсный геном человека (Ensembl, релиз 73) с использованием программного обеспечения TopHat v2.1.0, использующего Bowtie версии 1.0.0. Значения RPKM (количество чтений на тысячу нуклеотидов транскрипта на миллион картированных чтений) для оценки уровней экспрессии генов рассчитывали с помощью программного обеспечения Cufflinks v2.0.2, а исходные подсчеты были получены с помощью приложений Illumina Base Space Core Apps с использованием геновых аннотаций генов, кодирующих белки, загруженных из Ensembl (релиз 73). Дифференциальную экспрессию/кратность изменения оценивали по исходным подсчетам с помощью программного обеспечения edgeR. Все программы использовали с их параметрами по умолчанию, а TopHat настраивали таким образом, чтобы не находить новые сайты соединения. Кратность изменения для каждого гена визуализировали с помощью программного обеспечения TIBCO Spotfire (версии 7.0). Для отображения изменений дифференциальной экспрессии генов использовали комбинацию древовидной карты и гистограмм.

Для сравнения аналогичные исследования проводили с применением Kleptose® НРВ и нефракционированной очищенной партии CYL-4077 (см. пример 7).

7.8.2.3.2. Результаты.

Авторы настоящего изобретения провели анализ транскриптома полного генома, чтобы определить на основе статистических расчетов 10 биологических путей, подвергшихся наибольшему воздействию при обработке фракциями "L", "М" и "Н".

На фиг. 42 показаны 10 биологических путей, подвергшихся наибольшему воздействию при обработке клеток NPC 1,0 мМ фракций "L", "М" и "Н", расположенных в порядке снижения статистической значимости. В соответствии с предыдущими наблюдениями авторов настоящего изобретения фракция "L" не вызвала статистически значимых изменений в экспрессии генов пути биосинтеза стероидов. Совершенно противоположным образом путь биосинтеза стероидов является биологическим путем, наиболее статистически значимо затронутым при обработке клеток NPC1 фракцией "М". Фракция "М" в основном состоит из бета-циклодекстриновых соединений, содержащих 3, 4, 5 и 6 гидроксипропильных заместителей (DS3, DS4, DS5 и DS6). Фракция "Н", содержащая в основном DS5, DS6 и DS7, также приводит к изменениям в экспрессии генов пути биосинтеза холестерина, причем путь биосинтеза холестерина является вторым наиболее значимым путем.

Эти результаты предоставляют прямые доказательства того, что способность восстанавливать гомеостаз холестерина относится к содержащимся в Kleptose® НРВ соединениям циклодекстринов, которые имеют более высокую степень гидроксипропильного замещения.

7.8.2.4. Сравнение фракций с нефракционированными композициями.

Следствием наблюдения авторов настоящего изобретения, что соединения циклодекстрина, имеющие различную степень гидроксипропильного замещения, избирательно влияют на экспрессию генов в клетках NPC, является то, что общая фармакологическая активность композиции в целом должна зависеть от характеристического спектра композиции, то есть от относительных долей в различной степени гидроксипропилированных соединений, содержащихся в композиции.

Авторы настоящего изобретения подтвердили эту гипотезу путем сравнения изменений экспрессии генов на основании изменений от конкретного гена к конкретному гену (то есть на основании ID гена) после обработки клеток NPC 1,0 мМ либо (i) нефракционированной Kleptose® НРВ, либо (ii) нефракционированной CYL-4077, которую предварительно выделяли из Kleptose® НРВ с помощью абсорбционной хроматографии на оксиде алюминия и избирательного осаждения растворителем, либо (iii) фракции "L", (iv) фракции "М" или (v) фракции "Н".

Авторы настоящего изобретения наблюдали, что 64% генов, экспрессия которых подвержена значительному влиянию Kleptose® НРВ в концентрации 1,0 мМ, также подвержены значительному влиянию при обработке очищенной партией (партия CYL-4077) в концентрации 1,0 мМ.

Это общее процентное содержание значительно выше, чем процентное содержание генов, экспрессия которых подвержена значительному влиянию при обработке как 1,0 мМ Kleptose® НРВ, так и 1,0 мМ любой одной из фракций "L", "М" и "Н" (37, 43 и 48% соответственно).

Аналогично, 64% общей идентичности генов, подверженных влиянию как Kleptose® НРВ, так и CYL-4077, значительно выше, чем процентное содержание генов, экспрессия которых подвержена значительному влиянию при обработке как 1,0 мМ CYL-4077, так и 1,0 мМ любой одной из фракций "L",

"М" и "Н" (41, 38 и 44% соответственно).

7.8.2.5. Гены, вовлеченные в аутофагию.

Было продемонстрировано, что гидроксипропил-бета-циклодекстрин усиливает аутофагический клиренс агрегатов протеолипидов, которые накапливаются при болезни НПС (Song et al., 2014, J. Biol. Chem. vol. 289(14), p. 10211-10222). Поэтому авторы настоящего изобретения проанализировали влияние обработки 1,0 и 10,0 мМ Kleptose® НРВ, CYL-4077 и каждой из фракций "Н", "М" и "L" на экспрессию генов, связанных с аутофагией, в клетках NPC GM18453.

В табл. 25 приведены все гены аутофагии, изменения в экспрессии которых после обработки были статистически значимы ($p < 0,05$), и продемонстрировано, что концентрации 1,0 мМ оказывают небольшое влияние на гены, связанные с аутофагией.

Таблица 25

Анализ генов аутофагии клеток GM18453 (1,0 мМ)

Kleptose® НРВ		CYL-4077		«Н»		«М»		«L»	
ID гена	кратность изменения	ID гена	кратность изменения	ID гена	кратность изменения	ID гена	кратность изменения	ID гена	кратность изменения
ATG2B	-0,995	ATG2B	1,1123	--	--	--	--	--	--

В табл. 26 приведены все гены аутофагии, изменения в экспрессии которых после обработки были статистически значимы ($p < 0,05$) при концентрациях 10,0 мМ.

Таблица 26

Анализ генов аутофагии клеток GM18453(10,0 мМ)

Kleptose® НРВ		CYL-4077		«Н»		«М»		«L»	
ID гена	кратность изменения	ID гена	кратность изменения	ID гена	кратность изменения	ID гена	кратность изменения	ID гена	кратность изменения
ATG10	1,23	ATG10	1,045	ATG5	3,11	ATG5	4,332	ATG10	2,7
ATG2A	-0,53	ATG12	0,79	ATG2	-2,65	ATG10	2,705		
ATG16L 2	0,57	ATG2 A	-0,53	ATG10	-5,4	ATG16	11,294		
ATG3	-0,71	ATG2B	1,1023	ATG18	4,5	ATG12	8,34		
ATG4A	1,72	ATG3	-0,68	ATG10 I	2	BECN1	2,7		
BECN1	0,45	BECN1	0,96	BECN1	7,12	VPS15	3,356		
				VPS15	5,63	VPS13 B	9,28		
				VPS13 B	-4,793	VPS36	-4,899		
				VPS36	-4,112	VPS37 B	-4,897		
				VPS37 B	4,42				

Результаты обработки с применением 10,0 мМ демонстрируют, что Kleptose®НРВ и CYL-4077 оказывают одинаковое влияние на экспрессию генов, вовлеченных в аутофагию, и дополнительно демонстрируют, что это влияние обеспечивается соединениями, имеющими более высокую степень замещения, принимая во внимание, что фракция "L" оказывает наименьшее влияние на экспрессию генов, вовлеченных в аутофагию, по сравнению с фракцией "Н" и фракцией "М".

7.8.3. Обсуждение.

Используя эксперименты по определению профиля экспрессии генов, авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что композиция гидроксипропил-бета-циклодекстринов для парентерального введения, Kleptose® НРВ, способна восстанавливать уровни экспрессии генов гомеостаза холестерина в клетках, гомозиготных по мутации NPC1, и усиливать экспрессию генов, связанных с аутофагией. Эти результаты согласуются с данными, полученными в результате клинического исследования на людях, демонстрирующими, что интратекальное введение Kleptose® НРВ эффективно для стабилизации или замедления прогрессирования симптомов у пациентов с болезнью НПС. Корреляция с клиническими данными демонстрирует, что анализ экспрессии генов может быть использован для измерения эффективности *in vitro*.

Методом МС с ионизацией электрораспылением продемонстрировано, что Kleptose® НРВ представляет собой сложную смесь, содержащую молекулы бета-циклодекстринов, имеющие различную степень гидроксипропилирования, в воспроизводимых пропорциях.

Способ очистки, который авторы настоящего изобретения разработали для удаления технологических и других примесей из Kleptose® НРВ, дополнительно обеспечивает удаление соединений бета-

циклодекстрина с низкой степенью замещения, изменяя характеристический спектр композиции. Эксперименты по определению профиля экспрессии генов продемонстрировали, что, несмотря на указанное изменение в характеристическом спектре композиции, значительного изменения способности композиции нормализовать экспрессию генов путей биосинтеза холестерина в клетках, гомозиготных по мутации NPC, не наблюдалось.

Эти данные свидетельствуют о том, что соответствующая фармакологическая активность обеспечивается прежде всего соединениями с большей степенью замещения, чем у тех, которые удаляются во время очистки.

Авторы настоящего изобретения подтвердили этот вывод путем фракционирования сложной смеси с получением объединенных фракций, содержащих соединения бета-циклодекстрина с низкой ("L"), средней ("M") и высокой ("H") степенью гидроксипропильного замещения, и оценки воздействия на экспрессию генов в клетках NPC. Результаты показали, что фракция "L" не оказывает заметного влияния на экспрессию генов путей биосинтеза холестерина или аутофагии, тогда как фракции "M" и "H" значительно влияют на экспрессию генов биосинтеза холестерина и аутофагии. Эти эксперименты также продемонстрировали, что фармакологическая активность композиции в целом складывается из активностей, отдельно обеспечиваемых бета-циклодекстриновыми соединениями, имеющими различную степень гидроксипропильного замещения; общая фармакологическая активность зависит от характеристического спектра композиции, то есть от относительных долей в различной степени гидроксипропилированных соединений, содержащихся в композиции.

Хотя фармакологическая активность композиции в целом складывается из активностей, отдельно обеспечиваемых бета-циклодекстриновыми соединениями, имеющими различную степень гидроксипропильного замещения, неожиданно было обнаружено, что соединения с низкой степенью гидроксипропильного замещения, удаляемые способом очистки, разработанным авторами настоящего изобретения, вносят незначительный вклад, если вносят вообще, в специфическую активность смеси, имеющую фармакологическое значение для лечения болезни НПС. Этот обнаруженный факт позволит производить введение более высокоочищенной композиции ГПБЦД с определенным составом, разработанной авторами настоящего изобретения, посредством интратекального или интрацереброваскулярного пути в СМЖ пациентов с болезнью НПС в течение более длительных периодов времени с обеспечением терапевтического эффекта и повышенной безопасности.

7.9. Пример 9. Альтернативная методика препаративного фракционирования.

Как обсуждалось в примере 8, три фракции, имеющие различную среднюю степень замещения, для применения в экспериментах по определению профиля экспрессии генов получали с использованием колонки CD-Screen для хроматографического разделения.

В качестве альтернативы авторы настоящего изобретения также получали фракции Kleptose® НРВ (партия E0245) с использованием колонки с оксидом алюминия, по существу, как описано выше в примере 5.7.2. Образец наносили на колонку с оксидом алюминия и изократически элюировали 100% метанолом. На фиг. 43 показаны хроматограммы различных фракций, снабженные примечаниями, чтобы показать пронумерованные фракции, объединенные при получении фракций "А"- "F" и "К", и дополнительно снабженные примечаниями, чтобы показать степень замещения хроматографически разделенных соединений гидроксипропил-бета-циклодекстринов.

Экспериментальные параметры были дополнительно оптимизированы для максимально возможного удаления из Kleptose® НРВ незамещенного НЦД и ГПБЦД DS1 с наименьшей потерей ГПБЦД DS2 и DS3. Подробные сведения о способах очистки приведены ниже.

Одинаковые параметры для каждого испытанного способа (способы II-XI):

колонка с оксидом алюминия массой 210 г;

скорость потока 30 мл/мин;

100 сек/фракцию;

время задержки 60 с.

Только MeOH в качестве элюента:

Способ II. 21 г Kleptose, 30 фракций, элюент: изократическое элюирование 100% MeOH, выход: 79,4%.

Способ III. 10,5 г Kleptose, 30 фракций, элюент: изократическое элюирование 100% MeOH, выход: 72,3%.

Способ IV. 15 г Kleptose, 30 фракций, элюент: изократическое элюирование 100% MeOH, выход: 77,7%.

MeOH + вода в качестве элюентов.

Способ V. 10,4 г Kleptose, 30 фракций, элюент: изократическое элюирование 100% MeOH (выход: 73,8%) + 30 фракций, изократическое элюирование 100% MeOH (общий выход 60 фракций: 75,9%) + 30 фракций, 3-стадийное изократическое элюирование (90, 80, 70% MeOH, 15 мин каждое) с короткими (100 с) промежуточными градиентными элюированиями между стадиями, общий выход 90 фракций: 83,1%.

Способ VI. 10,5 г Kleptose, элюент: MeOH+вода, 75 фракций, градиентное элюирование 20 мин 100→80% MeOH, изократическое элюирование 106 мин 80% MeOH, выход: 82,8%.

Способ VII. Такой же, как способ VI, но с 70% MeOH вместо 80%, выход: 91,2%.

Способ VIII. 10,5 г Kleptose, элюент: MeOH+вода, изократическое элюирование 75% MeOH, 30 фракций, выход: 86,4%.

Способ IX. 10,6 г Kleptose, элюент: MeOH+вода, изократическое элюирование 70% MeOH, 30 фракций, выход: 89,2%.

EtOH (чистота 96%) + вода в качестве элюентов.

Способ X. 10,5 г Kleptose, 30 фракций, элюент: изократическое элюирование 100% EtOH (выход: 27,6%) + 30 фракций, изократическое элюирование 70% EtOH, общий выход 60 фракций: 82,1%.

Способ XI. 10,5 г Kleptose, 60 фракций, элюент: изократическое элюирование 80% EtOH, выход: 82,3%.

На фиг. 44 показаны хроматограммы смеси ГПБЦД после использования различных способов очистки. Отношение DS2/DS1 в смеси после очистки обобщено в табл. 27.

Таблица 27

Отношение DS2/DS1

Образец	площадь DS1	площадь DS2	DS2/DS1
Способ II	790,2	10187,9	12,893
Способ III	282,8	7836,0	27,706
Способ IV	607,1	10563,8	17,400
Способ V	537,5	11873,2	22,090
Способ VI	344,7	11678,9	33,885
Способ VII	982,1	14857,8	15,129
Способ VIII	318,9	10708,8	33,577
Способ IX	729,9	13698,6	18,768
Исходный ГПБЦД (для способов II – IX)	5013,215	16290,0	3,249
Способ X	1371,7	14023,1	10,223
Способ XI	274,1	9445,5	34,464
Исходный ГПБЦД (для способов X – XI)	5161,88	17371,5	3,365

7.10. Пример 10. Клиническое исследование фазы I для БНПС через 18 месяцев.

Был проведен дополнительный анализ по данным клинического исследования фазы I для болезни Ниманна-Пика типа C, включая результаты эффективности через 18 месяцев. Результаты показаны на фиг. 45-50. Как обобщено на фиг. 45, для анализа данных клинического исследования фазы I через 18 месяцев были использованы угловой коэффициент в пересчете на год, изменение относительно исходных значений и анализ данных пациентов, ответивших на лечение. На основании скорости изменений в пересчете на год результаты лечения в течение 18 месяцев показывают, что смесь ГПБЦД представляет собой лекарственное средство, изменяющее течение заболевания (фиг. 46). При применении смеси ГПБЦД у пациентов с БНПС показано достоверное улучшение или стабилизация заболевания относительно исходного уровня (фиг. 47). Лечение с применением смеси ГПБЦД также обуславливает больший процент пациентов, демонстрирующих стабильное заболевание или улучшение течения заболевания (фиг. 48). Влияние лечения на слух наблюдается, в первую очередь, в диапазоне высоких частот и поддается коррекции с помощью слуховых аппаратов (фиг. 49). На фиг. 50 обобщены сделанные на настоящий момент заключения в отношении влияния лечения на слух.

8. Эквиваленты и включение посредством ссылки

Все публикации, патенты, заявки на патенты и другие документы, цитируемые в настоящей заявке, настоящим включены в настоящее описание посредством ссылки во всей их полноте во всех отношениях в той же степени, как если бы для каждой отдельной публикации, патента, заявки на патент или другого документа было бы индивидуально указано, что они включены посредством ссылки для всех целей.

Несмотря на то что были проиллюстрированы и описаны различные конкретные варианты реализации, следует понимать, что могут быть сделаны различные изменения без отступления от сущности и объема настоящего описания.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Активный фармацевтический ингредиент, содержащий смесь молекул бета-циклодекстринов, замещенных в одном или более гидроксильных положениях гидроксипропильными группами, необязательно содержащую незамещенные молекулы бета-циклодекстрина,

где указанная смесь содержит менее 1% незамещенного бета-циклодекстрина ("DS-0") и бета-

циклодекстрина, замещенного одной гидроксипропильной группой ("DS-1"), в совокупности;

по меньшей мере 85% бета-циклодекстрина, замещенного тремя гидроксипропильными группами ("DS-3"), бета-циклодекстрина, замещенного четырьмя гидроксипропильными группами ("DS-4"), бета-циклодекстрина, замещенного пятью гидроксипропильными группами ("DS-5"), и бета-циклодекстрина, замещенного шестью гидроксипропильными группами ("DS-6"), в совокупности;

менее 1% бета-циклодекстрина, замещенного девятью гидроксипропильными группами ("DS-9"), и бета-циклодекстрина, замещенного десятью гидроксипропильными группами ("DS-10"), в совокупности, как установлено по высоте пиков на спектре, полученном методом масс-спектрометрии (МС) с ионизацией электрораспылением; и

указанная смесь имеет среднее молярное замещение ("МЗ") в диапазоне от 0,50 до 0,80.

2. Активный фармацевтический ингредиент по п.1, где менее 0,1% смеси бета-циклодекстринов представляет собой DS-0 и DS-1 в совокупности или менее 0,01% смеси бета-циклодекстринов представляет собой DS-0 и DS-1 в совокупности.

3. Активный фармацевтический ингредиент по п.1, где по меньшей мере 87% смеси бета-циклодекстринов представляет собой DS-3, DS-4, DS-5 и DS-6 в совокупности или по меньшей мере 90% смеси бета-циклодекстринов представляет собой DS-3, DS-4, DS-5 и DS-6 в совокупности.

4. Активный фармацевтический ингредиент по любому из пп.1-3, где менее 0,1% смеси бета-циклодекстринов представляет собой DS-9 и DS-10 в совокупности или менее 0,01% смеси бета-циклодекстринов представляет собой DS-9 и DS-10 в совокупности.

5. Активный фармацевтический ингредиент по любому из пп.1-4, где МЗ находится в диапазоне от 0,60 до 0,70 или в диапазоне от 0,64 до 0,68 или МЗ составляет примерно 0,66-0,67.

6. Активный фармацевтический ингредиент по любому из пп.1-5, дополнительно содержащий фармацевтически приемлемый разбавитель.

7. Активный фармацевтический ингредиент по пп.1-6, где указанная композиция содержит не более 5 ЕЭ эндотоксинов на 1 г смеси бета-циклодекстринов или не более 1,5 ЕЭ эндотоксинов на 1 г смеси бета-циклодекстринов.

8. Активный фармацевтический ингредиент по любому из пп.1-7, содержащий не более 0,5% пропиленгликоля или не более 0,01% пропиленгликоля.

9. Активный фармацевтический ингредиент по любому из пп.1-8, содержащий не более 1 ppm пропиленоксида.

10. Активный фармацевтический ингредиент по любому из пп.1-9, где указанный активный фармацевтический ингредиент подходит для интратекального или интрацеребровентрикулярного введения.

11. Активный фармацевтический ингредиент по п.10, где указанный фармацевтически активный ингредиент имеет осмоляльность от примерно 300 до примерно 450 мОсм/кг.

12. Активный фармацевтический ингредиент по п.10 или 11, где указанный активный фармацевтический ингредиент содержит от примерно 10 до примерно 200 мг/мл смеси бета-циклодекстринов.

13. Активный фармацевтический ингредиент по любому из пп.1-12,

где указанная смесь содержит менее 3% незамещенного бета-циклодекстрина ("DS-0"), бета-циклодекстрина, замещенного одной гидроксипропильной группой ("DS-1"), и бета-циклодекстрина, замещенного двумя гидроксипропильными группами ("DS-2"), в совокупности;

по меньшей мере 65% бета-циклодекстрина, замещенного пятью гидроксипропильными группами ("DS-5"), бета-циклодекстрина, замещенного шестью гидроксипропильными группами ("DS-6"), и бета-циклодекстрина, замещенного семью гидроксипропильными группами ("DS-7"), в совокупности;

менее 3% бета-циклодекстрина, замещенного девятью гидроксипропильными группами ("DS-9"), и бета-циклодекстрина, замещенного десятью гидроксипропильными группами ("DS-10"), в совокупности, как установлено по высоте пиков на спектре, полученном методом МС с ионизацией электрораспылением.

14. Способ лечения болезни Ниманна-Пика, включающий введение пациенту с болезнью Ниманна-Пика типа С терапевтически эффективного количества активного фармацевтического ингредиента по любому из пп.1-13.

15. Способ по п.14, где указанное введение представляет собой интратекальное или интрацеребровентрикулярное введение.

16. Способ по п.14 или 15, включающий введение пациенту от примерно 300 до примерно 2000 мг смеси бета-циклодекстринов.

17. Способ по любому из пп.14-16, где указанное введение осуществляют один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в месяц, один раз в два месяца или один раз в три месяца.

18. Способ по любому из пп.14-17, включающий введение пациенту от примерно 900 до примерно 1800 мг смеси бета-циклодекстринов один раз в две недели или примерно 900 мг смеси бета-циклодекстринов один раз в две недели.

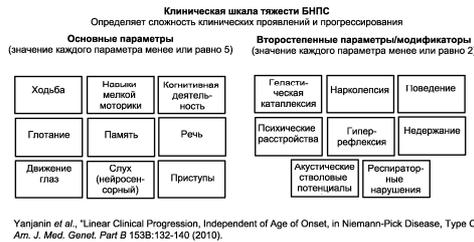
19. Способ по любому из пп.14-18, включающий введение количества активного фармацевтического ингредиента,

достаточного для модулирования уровня в спинномозговой жидкости одного или более из: белка тау, амилоидного пептида, легкого белка нейрофиламентов (NFL), глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), стерола, оксистерола, активности хитотриозидазы, кальбиндина, белка лизосомальной мембраны 1 (LAMP-1), ганглиозидов GM2 или GM3, сфингозина и сфингозин-1-фосфата (S1P); или

достаточного для модулирования уровня в плазме одного или более из 7-кетохолестерола, 7β-гидроксихолестерола, 24S-гидроксихолестерола, 25-гидроксихолестерола, 27-гидроксихолестерола и холестан-3β,5α,6β-триола; или

достаточного для модулирования уровня в моче одной или более из 3β-сульфокси-7β-N-ацетилглюкозаминил-5-холен-24-овой кислоты (SNAG-Δ⁵-CA), конъюгированной с глицином 3β-сульфокси-7β-N-ацетилглюкозаминил-5-холен-24-овой кислоты (SNAG-Δ⁵-CG) и конъюгированной с таурином 3β-сульфокси-7β-N-ацетилглюкозаминил-5-холен-24-овой кислоты (SNAG-Δ⁵-CT); или

достаточного для поддержания или снижения значений одного или более используемых для оценки параметров согласно шкале тяжести БНПС, выбранных из ходьбы, мелкой моторики, когнитивной деятельности, речи, глотания, движения глаз, памяти, слуха и судорог.



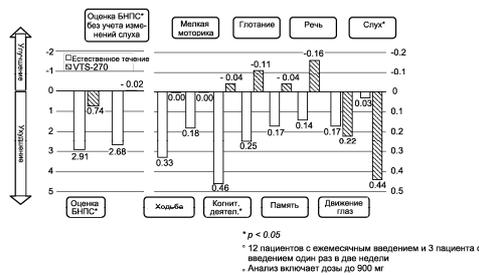
Фиг. 1

Оценка БНПС	VTS-270	Естественное течение	p-значение для различия в угловых коэффициентах
	Ср. изменение за один год (ст. ошибка)		
Общая	0.74 (0.67)	2.53 (0.27)	0.02
Общая без учета слуха и АСП	-0.02 (0.69)	2.23 (0.28)	0.004
Ходьба	0.001 (0.18)	0.27 (0.07)	0.18
Мелкая моторика	0.03 (0.10)	0.11 (0.04)	0.34
Когнитивная деятельность	-0.04 (0.16)	0.31 (0.08)	0.04
Глотание	-0.11 (0.23)	0.23 (0.09)	0.22
Речь	-0.18 (0.13)	0.08 (0.05)	0.09
Движение глаз	-0.22 (0.16)	0.08 (0.06)	0.42
Слух	0.44 (0.16)	0.17 (0.06)	0.13
Память	-0.04 (0.12)	0.18 (0.05)	0.10
Приступы	н/о	н/о	н/о

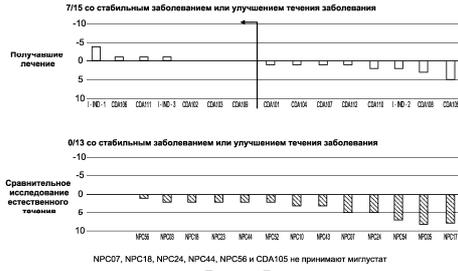
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

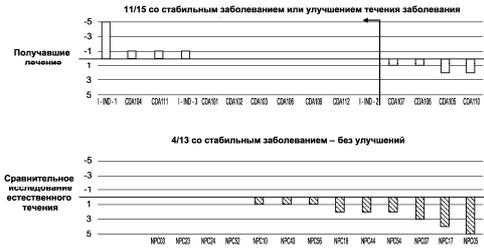


Фиг. 6

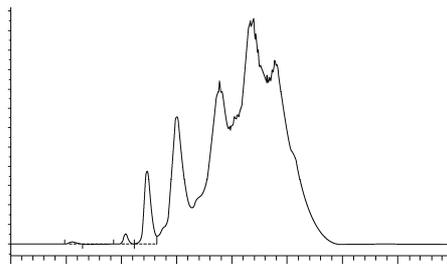
Новая «комбинированная» конечная точка БНПС

- Комбинированная оценка, включающая
- Ходьбу
- Мелкую моторику
- Когнитивную деятельность
- Глотание

Фиг. 7

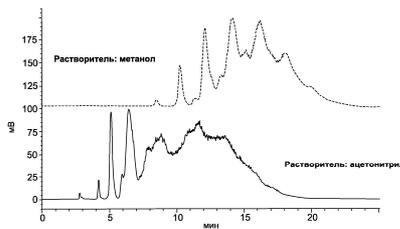


Фиг. 8



Фиг. 9

— *ELS1 A, напряжение сигнала (L:\NPLC3\NPLC3_2015\NPRCD\NPRCD_0306\2015-03-06\NPRCD_M09_1.D)
 — *ELS1 A, напряжение сигнала (Z:\DATA\NPRCD_0507\NPRCD_0507 2015-05-07\NPRCD_M05_1.D)

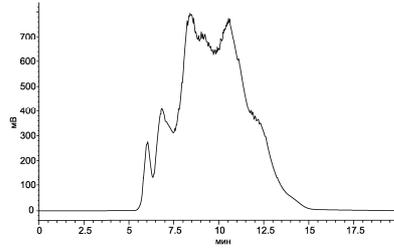


Фиг. 10



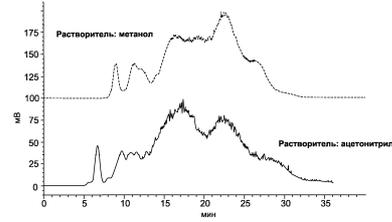
Фиг. 11

— ELS1 A, напряжение сигнала (L:\HPLC3\HPLC3_2015\HPBCD\HPBCD_0422\2015-04-22\HPBCD_M01_3.D)

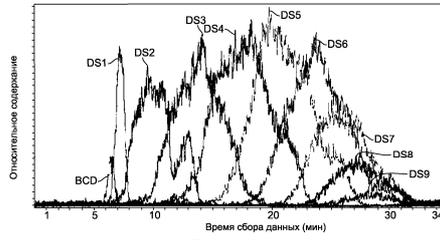


Фиг. 12

— ELS1 A, напряжение сигнала (Z:\DATA\HPBCD_0508\2015-05-08\HPBCD_M05_1.D)
 — ELS1 A, напряжение сигнала (L:\HPLC3\HPLC3_2015\HPBCD\HPBCD_0422\2015-04-22\HPBCD_M05_1.D)

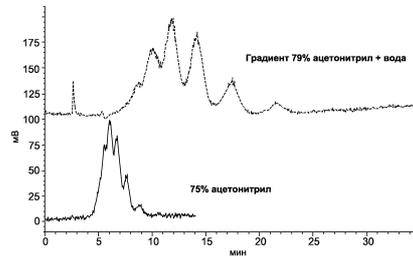


Фиг. 13

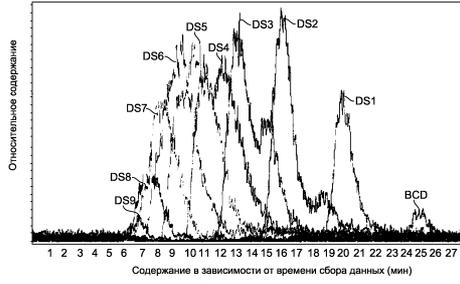


Фиг. 14

— ELS1 A, напряжение сигнала (X:\HPB0508\2015-05-08\HPB_0508M1_5UL.D)
 — ELS1 A, напряжение сигнала (X:\HPB0510\2015-05-11\HPB_BCD_0508M5_50UL.D)

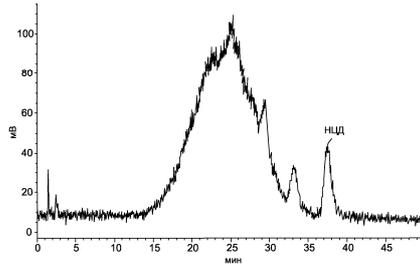


Фиг. 15



Фиг. 16

ELS1 A, напряжение сигнала (X:\HPB0512\2015-05-12\HPB_BCD_0512M11_10UL_2.0)

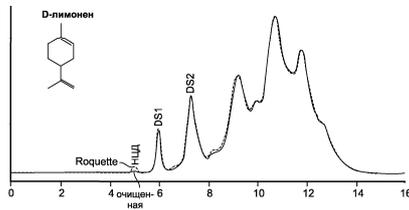


Фиг. 17

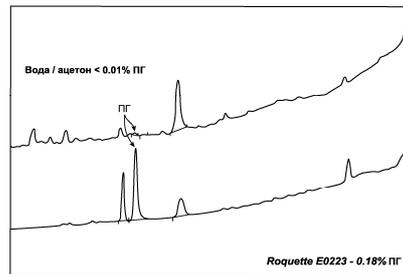


Фиг. 18

—Roquette E0223: 0.6% НЦД, 3.7% DS-1, 0.2% других
—Очищенная: 0.2% НЦД, 2.6% DS-1, 0.1% других

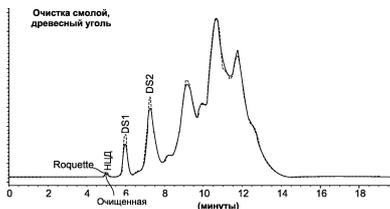


Фиг. 19



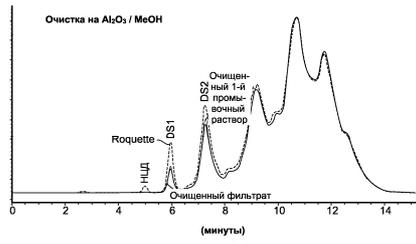
Фиг. 20

—Roquette E0223: 0.6% НЦД, 3.7% DS-1, 0.2% других
—Очищенная: 0.4% НЦД, 2.7% DS-1, 0.2% других

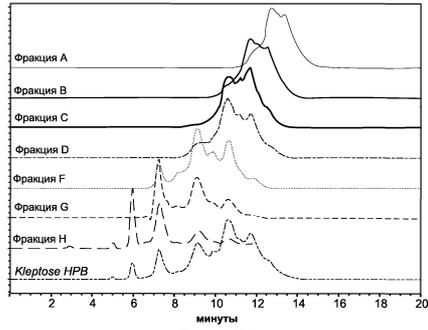


Фиг. 21

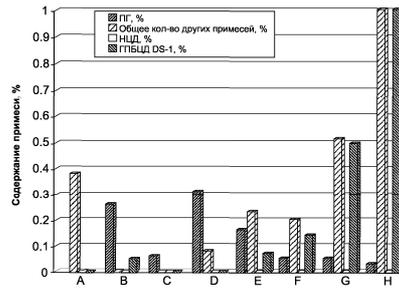
—Roquette E0223: 0.6% НЦД, 3.7% DS-1, 0.2% других
 — Очищенный фильтрат: 0.1% НЦД, 2.1% DS-1, 0.1% других
 — Очищенный 1-й промывочный раствор: 0.1% НЦД, 2.0% DS-1, 0.1% других



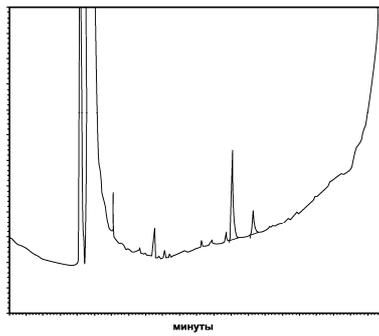
Фиг. 22



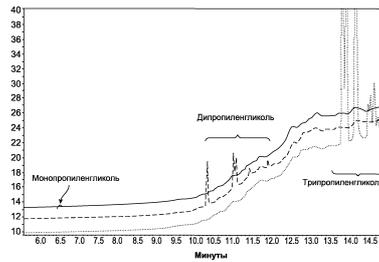
Фиг. 23



Фиг. 24

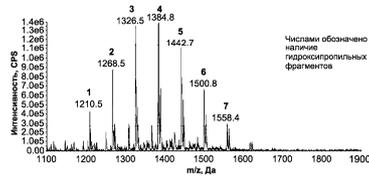
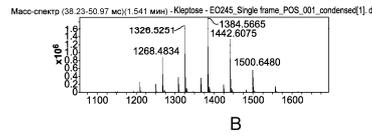
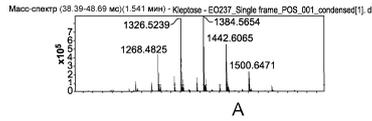


Фиг. 25

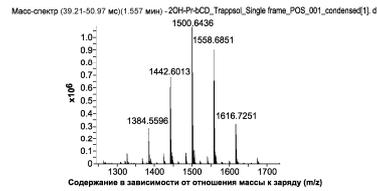
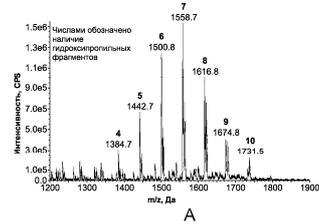


Фиг. 26

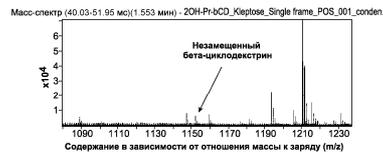
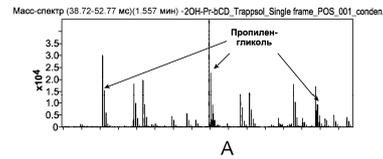
033892



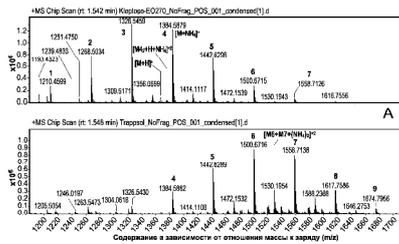
Фиг. 31



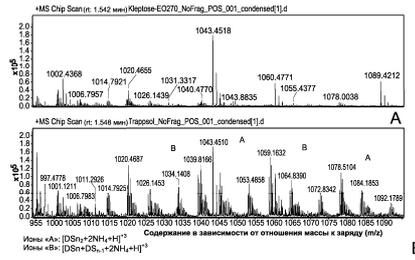
Фиг. 32



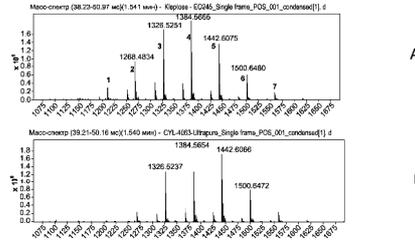
Фиг. 33



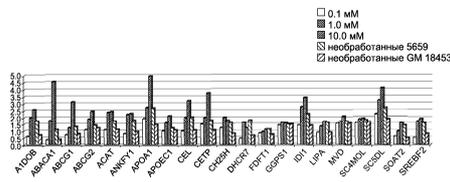
Фиг. 34



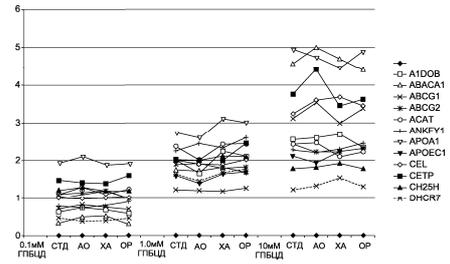
Фиг. 35



Фиг. 36



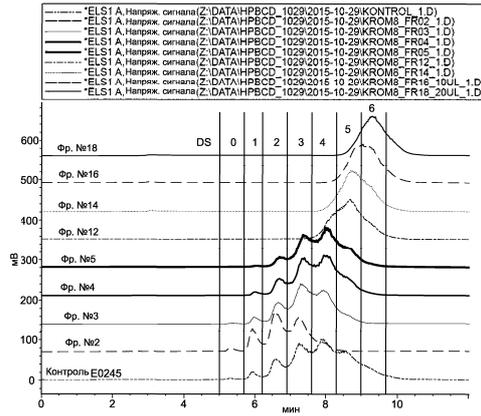
Фиг. 37



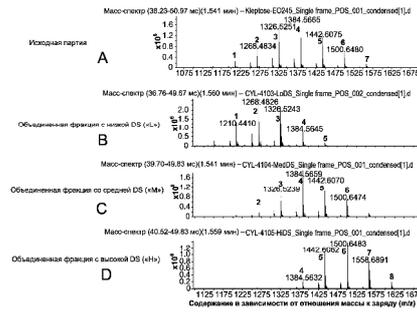
Фиг. 38

Klerptose® НРВ 1.0 мМ	Batch CYL-4063 1.0 мМ
Важнейшие биологические пути	Важнейшие биологические пути
Сигнальный путь EgrB	Сигнальный путь MAPK
Сигнальный путь MAPK	Биосинтез стероидов
Сигнальный путь GnRH	Сигнальный путь GnRH
Эстрогеновый сигнальный путь	Сигнальный путь EgrB
Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП)	Метаболические сигнальные пути
Биосинтез стероидов	Переносчики семейства ABC
Передача сигнала в эпителиальных клетках при инфицировании <i>Neisseria meningitidis</i>	Сигнальный путь PPAR
Алкоголизм	Сигнальный путь T-клеточного рецептора
Процессинг белков в эндоплазматическом ретикулуме	Сигнальный путь B-клеточного рецептора
Меланнома	Инфицирование вирусом простого герпеса

Фиг. 39



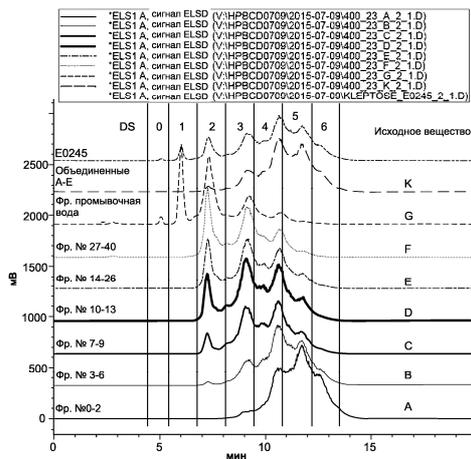
Фиг. 40



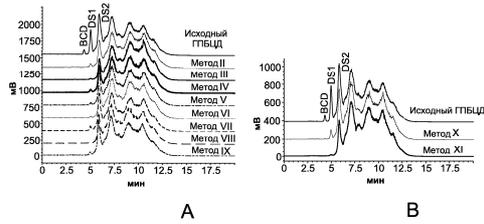
Фиг. 41

1 * 1.0 мМ	1 * 1.0 мМ	1 * 1.0 мМ
Важнейшие биологические пути	Важнейшие биологические пути	Важнейшие биологические пути
Первичный сигнал в эпителиальных клетках при инфицировании <i>Neisseria meningitidis</i>	Синтез стероидов	Эстрогенный сигнальный путь
Эстрогенный сигнальный путь	Эстрогенный сигнальный путь	Синтез стероидов
Сигнальный путь EtsB	Первичный сигнал в эпителиальных клетках при инфицировании <i>Neisseria meningitidis</i>	Первичный сигнал в эпителиальных клетках при инфицировании <i>Neisseria meningitidis</i>
Сигнальный путь MAPK	Сигнальный путь EtsB	Сигнальный путь p53
Сигнальный путь GsRH	Сигнальный путь GsRH	Апоптоз
Нарушение регуляции транскрипции при раке	Апоптоз	Сигнальный путь GsRH
МикроРНК при раке	Сигнальный путь MAPK	Сигнальный путь MAPK
Сигнальный путь NF-κB в раке	Нарушение регуляции транскрипции при раке	Инфицирование HTLV-1
Сигнальный путь ФНО	МикроРНК при раке	Зависимость от ацетата
Взаимодействие циткина с рецептором к цитокину	Инфицирование HTLV-1	Зависимость от циткина

Фиг. 42



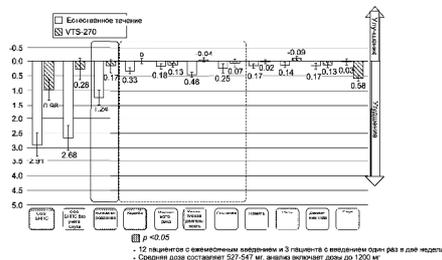
Фиг. 43



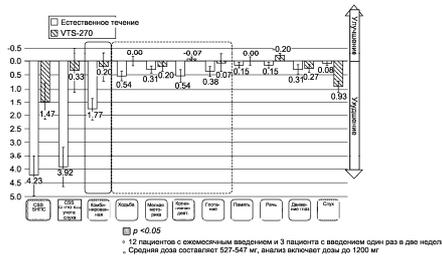
Фиг. 44



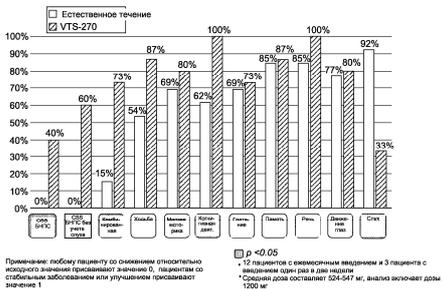
Фиг. 45



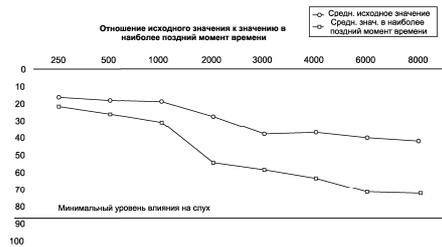
Фиг. 46



Фиг. 47



Фиг. 48



Фиг. 49

Влияние на слух

заключение на настоящий момент

- На настоящий момент отсутствует влияние качества жизни
- Различная чувствительность
 - Кратковременный эффект, с частичным или полным восстановлением
- Симптомы поддаются коррекции с помощью слуховых аппаратов
 - Большинство нуждались в слуховых аппаратах до воздействия
 - Все нуждаются в настоящий момент
- Этиология и влияние
 - Влияние на слух в области высоких частот является следствием нарушения функции внешних волосковых клеток
 - Влияние на слух не коррелирует с дозой VTS-270; представляется возможным усиление влияния на слух, обусловленного заболеванием

Фиг. 50

