

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **033936**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.12.11

(21) Номер заявки
201890969

(22) Дата подачи заявки
2016.11.15

(51) Int. Cl. **C08B 37/08** (2006.01)
A61K 31/728 (2006.01)
A61K 31/737 (2006.01)

(54) УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СУЛЬФАТИРОВАННОЙ НА ВЫСОКОЙ СТЕПЕНИ ЧИСТОТЫ

(31) **UB2015A005623**

(32) **2015.11.16**

(33) **IT**

(43) **2018.09.28**

(86) **PCT/IB2016/056868**

(87) **WO 2017/085622 2017.05.26**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ФИДИЯ ФАРМАЧЕУТИЧИ С.П.А.
(IT)

(72) Изобретатель:
Гуаризе Кристиан, Паван Мауро (IT)

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(56) **WO-A1-2010130468**
US-A1-2013209531
WO-A1-9525751

(57) Изобретение относится к усовершенствованному способу получения сульфатированной гиалуроновой кислоты (НА), сульфатированных НА-производных и/или их смесей, характеризующихся высокой степенью чистоты и степенью сульфатирования, находящейся в диапазоне от 1 до 3, который предусматривает следующие стадии: а) солибилизация НА-Na или НА-производное-Na в апротонном растворителе в присутствии органической сульфоновой кислоты; б) сульфатирование полученного раствора путем добавления избытка средства для сульфатирования; в) осаждение в этаноле до получения осадка; д) солибилизация полученного в результате осадка в смеси воды и апротонного растворителя, используемого на стадии а), в присутствии избытка NaCl с регулированием значения pH в пределах диапазона от 3 до 4; е) дополнительное осаждение с помощью этанола до получения порошка; ф) промывания порошка, образующегося в результате осуществления стадии е) и высушивание полученного в результате продукта под вакуумом. Настоящее изобретение также относится к полученным таким образом сульфатированной НА, сульфатированным производным НА и/или их смесям, характеризующимся высокой степенью чистоты и степенью сульфатирования, находящейся в диапазоне от 1 до 3, и соответствующим фармацевтическим смесям.

033936 B1

033936

B1

Настоящее изобретение относится к усовершенствованному способу получения сульфатированной НА высокой степени чистоты.

Давно была известна возможность химического синтеза производных гиалуроновой кислоты (НА) с целью получения структур, в которых сохраняются физико-химические свойства исходной молекулы, обладающих при этом новыми специфическими особенностями. Вкратце, НА представляет собой гетерополисахарид, состоящий из чередующихся остатков D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина, с линейной цепью, характеризующийся молекулярной массой, которая может находиться в диапазоне от 50000 до 13×10^6 Да, в зависимости от источника, из которого его получают, а также применяемых способов получения.

Гиалуроновая кислота фактически присутствует во всем организме человека, в котором она выполняет важную роль, в основном, но не исключительно, в качестве механической опоры клеток многочисленных тканей, таких как кожа, сухожилия, мышцы и хрящевая ткань. Также известны взаимодействия НА с ее мембранным рецептором CD44 и с опитными рецепторами.

В силу своей химической природы НА имеет множество приемлемых для получения производных функциональных групп. В данном случае, в числе разных возможных модификаций, известных специалисту в данной области, модификацией, представляющей интерес для настоящего изобретения, является сульфатирование, т. е. обогащение группами $-SO_3$. Такое получение производных может происходить с учетом как многочисленных доступных групп $-OH$ (О-сульфатирование), так и, в том числе, аминогруппы остатка N-ацетил-D-глюкозамина после его диацетилирования (N-сульфатирование) (EP 702699; EP 940410; EP 971961; EP 889055). Различные пути получения производных делают молекулы пригодными для разных применений; фактически, N-сульфатированные производные особенно применимы в получении изделий медицинского назначения. Свойства сульфатированного продукта также зависят от степени сульфатирования, выраженной в виде количества групп $-SO_3$, присутствующих на дисахаридную единицу.

Сульфатированным производным гиалуроновой кислоты, представляющим интерес для целей настоящего изобретения, является О-сульфатированное производное, которое просто обозначено в настоящей патентной заявке как HAS и которое способно легко проходить через кожный барьер, способствуя прохождению веществ, связанных с ним. Эти характеристики делают его превосходным средством-носителем для всасывания через кожу фармакологически и биологически активных молекул. Сульфатирование также придает гиалуроновой кислоте, НА, антикоагулянтные свойства, подобные таковым гепарина, которые используются, например, в покрытии сосудистых стентов.

Также недавно было обнаружено и показано, что HAS обладает полезными фармакологическими свойствами: оно является сильным противовоспалительным средством, которое проявляет свое действие путем эффективной модуляции активности множества цитокинов, как про-, так и противовоспалительных. Благодаря этому, HAS можно применять при терапии множества заболеваний, опосредованных изменением уровней цитокинов (ревматоидный артрит, астма, системные и кожные аутоиммунные заболевания, вирусные инфекции, атопический дерматит, экзема, витилиго, виды лимфомы и т.п.) (WO 2010/130468; WO 2010/130466).

Известные в настоящее время способы получения НА представляют собой способы, характеризующиеся относительно ограниченными уровнями выхода при получении и обязательными стадиями очистки, при которых строго необходима фаза диализа.

Терапевтическое применение НА и/или ее сульфатированных производных, которые теоретически представляют собой многочисленный класс веществ, таким образом, также создает проблему особенности получения, которую с помощью настоящего изобретения предлагается решить путем нахождения способа получения сульфатированной НА и/или ее сульфатированных производных, который является более быстрым, менее затратным в отношении времени и сырьевых материалов и, самое главное, особенно эффективным в отношении как уровня выхода при осуществлении способа, так и чистоты конечного продукта.

Объект изобретения

Таким образом, объектом настоящего изобретения является усовершенствованный способ получения сульфатированной гиалуроновой кислоты (НА), сульфатированных НА-производных и/или их смесей, характеризующихся высокой степенью чистоты и степенью сульфатирования, находящейся в диапазоне от 1 до 3, где указанный способ предусматривает следующие стадии:

а) солиubilизация НА-Na или производное НА-Na в апротонном растворителе, предпочтительно выбранном из диметилсульфоксида (DMSO), N,N-диметилформамида (DMF) или N-метилпирролидона (NMP), более предпочтительно DMSO, в присутствии органической сульфоновой кислоты, предпочтительно метансульфоновой кислоты, в количестве, находящемся в диапазоне от 4,5 до 5,5 мол./мол. экв., относительно повторяющейся дисахаридной единицы НА или производного НА;

б) сульфатирование раствора, полученного в конце стадии а), путем добавления избытка SO_3 -пиридина, SO_3 -триметиламина или других средств для сульфатирования, предпочтительно SO_3 -пиридина;

с) осаждение в этаноле, предпочтительно абсолютном этаноле, до получения осадка;

d) солюбилизация полученного таким образом осадка в смеси воды и апротонного растворителя, используемого на стадии а), в присутствии избытка NaCl, при этом указанный избыток рассчитан относительно остаточных сульфатных групп, с регулированием значения pH в пределах диапазона от 3 до 4;

e) дополнительное осаждение с помощью этанола, предпочтительно абсолютного этанола, до получения порошка;

f) промывания порошка, образующегося в результате осуществления стадии e), и высушивание полученного таким образом продукта под вакуумом.

Промывания, представленные на стадии f) способа в соответствии с настоящим изобретением, можно осуществлять по отношению к продукту, полученному на стадии e), следующим образом:

f') удалением растворителя путем промывания осадка три раза смесью этанол/вода в соотношении, составляющем 8:2;

f'') удалением остатков пиридина путем последовательных промываний смесью этанол/NaOH 0,1 М 8:2; смесью этанол/HCl 8:2; смесью этанол/вода 8:2 и в конце абсолютным этанолом.

Дополнительным объектом настоящего изобретения является сульфатированная гиалуроновая кислота (НА), или сульфатированные производные НА, и/или их смеси, со степенью сульфатирования, находящейся в диапазоне от 1 до 3, и со степенью чистоты, превышающей 98%, которые можно получать с помощью способа в соответствии с настоящим изобретением.

Объектом настоящего изобретения также являются фармацевтические композиции, содержащие сульфатированную гиалуроновую кислоту, или сульфатированные производные НА, и/или их смеси, со степенью сульфатирования, находящейся в диапазоне от 1 до 3, и со степенью чистоты, превышающей 98%, которые можно получать с помощью способа в соответствии с настоящим изобретением в присутствии фармацевтически приемлемых добавок.

Новый усовершенствованный способ получения сульфатированной НА в соответствии с настоящим изобретением со степенью, находящейся в диапазоне от 1 до 3, обладает основным преимуществом, заключающимся в том, что он является очень быстрым, менее затратным в отношении времени и сырьевых материалов и, самое главное, неожиданно более эффективный, чем способы получения сульфатированной НА, известные в настоящее время, в отношении как уровня выхода при осуществлении способа, так и чистоты конечного продукта.

Способ сульфатирования гиалуроновой кислоты и/или ее производных в соответствии с настоящим изобретением посредством исключения некоторых стадий (главным образом, стадии диализа), считающихся необходимыми во всех способах, известных из уровня техники, и с включением существенных технических модификаций, неожиданно обеспечивает возможность получения более чистого конечного продукта с очень высокими уровнями выхода.

Особенно преимущественный аспект способа в соответствии с настоящим изобретением фактически заключается в образовании чрезвычайно мелкого и чистого осадка в конце фазы e) осаждения, что позволяет исключить одну из главных стадий известных способов, и в частности стадию диализа. Чистота конечного продукта также влияет на его специфические характеристики; в фазе составления фармацевтических композиций, например, сведен к минимуму риск взаимодействия между "активным началом" (сульфатированной НА или НА-производным), полученным в соответствии с настоящим изобретением, и другими компонентами состава, независимо от того, являются ли они вспомогательными веществами или другими фармакологически и/или биологически активными веществами. Способ в соответствии с настоящим изобретением также характеризуется чрезвычайно высокими уровнями выхода, практически количественными, совершенно неожиданными согласно известным из уровня техники идеям.

Исходную гиалуроновую кислоту, используемую в способе в соответствии с настоящим изобретением, можно получать из любого источника, например, в результате извлечения из гребней петуха (EP 138572), ферментации, которая известна специалисту в данной области, или биосинтеза (из *Bacillus*, WO 2012/032154), и она характеризуется средней молекулярной массой, находящейся в диапазоне от 100000 до 250000 Да, предпочтительно от 180000 до 230000 Да, или от 500000 до 750000 Да, предпочтительно от 700000 до 730000 Да.

Необходимо отметить, что средняя молекулярная масса (MW) относится к среднемассовой MW, рассчитанной с помощью способа с использованием "внутренней вязкости" (Terbojevich et al., *Carbohydr. Res.*, 1986, 363-377).

В настоящей патентной заявке, в которой улучшают способ получения сульфатированной НА со степенью, находящейся в диапазоне от 1 до 3, термин "степень сульфатирования" относится к количеству групп $-SO_3$ на повторяющуюся дисахаридную единицу, а более конкретно степень 1 сульфатирования предусматривает от 0,5 до 1,5 сульфатной группы; степень 2 сульфатирования предусматривает от 1,5 до 2,5 сульфатной группы; степень 3 сульфатирования предусматривает от 2,5 до 3,5 сульфатной группы.

Способ, объект настоящего изобретения обеспечивает успешное получение не только сульфатированной НА, но также сульфатированных производных гиалуроновой кислоты, т.е. исходя из более сложных молекул, полученных путем химической модификации исходной НА, таких как амиды НА с аминами алифатического, арилатифатического, пиклоалифатического, ароматического, циклического и гетероциклического рядов с долей в процентах амидирования, находящейся в диапазоне от 0,1 до 50%, при

этом оставшийся процент НА, не подверженной амидированию, можно преобразовывать в соль с помощью органических и/или неорганических оснований (HYADD® - EP 1095064 B1); сложные эфиры НА со спиртами алифатического, арилатифатического, циклоалифатического, ароматического, циклического и гетероциклического рядов с долей в процентах эстерификации, которая может находиться в диапазоне, в зависимости от типа и длины цепи используемого спирта, предпочтительно от 50 до 100%, при этом оставшийся процент неэстерифицированной НА можно преобразовывать в соль с помощью органических и/или неорганических оснований (HYAFF® - EP 216453 B1); внутренние сложные эфиры НА с долей в процентах эстерификации, не превышающей 20%, предпочтительно с эстерификацией от 0,05 до 10%, при этом оставшийся процент неэстерифицированной НА можно преобразовывать в соль с помощью органических и/или неорганических оснований (АСР® -EP 341745 B1).

Полученную таким образом сульфатированную гиалуроновую кислоту можно использовать как есть, однако ее также можно использовать в качестве исходного соединения для дальнейших способов получения производных. Она может быть связана, например, с фотореактивными молекулами посредством спейсера или с другими химическими объектами для проведения реакций, известных из уровня техники (например, реакции клик-химии).

Подробное описание изобретения

Способы сульфатирования, известные из уровня техники, как правило, предусматривают приведенные ниже стадии: растворение НА в форме соли (предпочтительно тетрабутиламмониевой -ТВА) в апротонном растворителе (DMSO, DMF и т.п.). Даже в том случае, если растворение НА, как правило, указано на первой стадии, на практике растворения не достигается, а более возможно получение суспензии, поскольку НА не растворима в апротонном растворителе, и ее специально делают более легкорастворимой, для чего НА преобразовывают в аммониевую соль; сульфатирование путем добавления избытка SO_3 -пиридина, SO_3 -триметиламина или других эквивалентных средств, известных специалисту в данной области; первое осаждение органическим растворителем; центрифугирование с выделением осадка; растворение полученного таким образом осадка; второе осаждение "чистого" продукта и диализ с устранением растворителей и других остатков.

В способах, известных из уровня техники, стадии "растворения осадка" и "второго осаждения" повторяют разное количество раз для устранения, по меньшей мере, избытков растворителя и реагентов.

Очевидно, что способ в соответствии с настоящим изобретением существенно отличается от способов, известных из уровня техники, в частности в некоторых из стадий, приведенных в схеме, упомянутой в данном документе, принимая во внимание, прежде всего, что исходный материал в случае способа в соответствии с настоящим изобретением представляет собой исключительно натриевую соль, будь то в случае с НА как таковой или одним из производных, указанных выше. В случае если исходный полимер представляет собой НА, он будет характеризоваться средним исходным MW, находящимся в диапазоне от 100000 до 250000 Да, в частности от 180000 до 230000 Да, или от 500000 до 750000 Да, в частности от 700000 до 730000 Да. В уровне техники, несмотря на то, что натриевая соль является вариантом, принимаемым во внимание, независимо от используемого MW исходным материалом, как правило, является тетрабутиламмониевая соль, т.е. ТВА (тетрабутиламмониевая) соль гиалуроновой кислоты, которую необходимо предварительно синтезировать; из этого следует дополнительная предварительная стадия получения.

Стадии, которые определяют способ в соответствии с настоящим изобретением, представляют собой стадии а), с)-е) нижеследующего способа:

а) солюбилизация НА-Na (или НА-производного-Na) в апротонном растворителе с добавлением органической сульфоновой кислоты, предпочтительно метансульфоновой кислоты; такое добавление обеспечивает получение фактически прозрачного раствора, который при 600 нм характеризуется коэффициентом поглощения $\leq 0,04$ ЕОП, что является стандартной эталонной величиной для определения прозрачности, при этом полная солюбилизация НА обеспечивает количественное сульфатирование полимера в заранее заданной степени. Такое использование метансульфоновой кислоты или других органических сульфоновых кислот никогда не описывалось в уровне техники для этих целей; апротонный растворитель предпочтительно выбран из DMSO (диметилсульфоксид), DMF (N,N-диметилформамид) или NMP (N-метилпирролидон) и даже более предпочтительно DMSO; количество используемой метансульфоновой кислоты находится в диапазоне от 4,5 до 5,5 мол./мол. эквивалентов, и предпочтительно равно 5 мол./мол. эквивалентов, в отношении повторяющейся дисахаридной единицы НА. Более низкие значения не обеспечивают солюбилизацию, тогда как более высокие значения обеспечивают солюбилизацию, однако при окончательной фазе осаждения наблюдается существенное снижение выхода (<60%) (как показано в табл. 1); солюбилизацию осуществляют в течение периода времени, находящегося в диапазоне от 20 до 28 ч, при температуре Т, находящейся в диапазоне от 20 до 30°C, предпочтительно в течение 24 ч при 25°C, до получения прозрачного раствора;

б) сульфатирование.

Эту стадию осуществляют в соответствии со способом, известным из уровня техники, путем добавления избытка SO_3 -пиридина, SO_3 -триметиламина или других средств, известных специалисту в данной

области, предпочтительно SO_3 -пиридина (комплекс пиридина и триоксида серы);

с) первое осаждение в этаноле, предпочтительно абсолютном этаноле, до получения коричневого каучукоподобного осадка;

д) солибилизация полученного таким образом осадка в воде (известна из уровня техники) в присутствии NaCl и того же апротонного растворителя, в котором солибилизировали сырьевой материал, с регулированием значения pH в пределах диапазона от 3 до 4, предпочтительно от 3,3 до 3,5. Количество добавленного NaCl должно быть в абсолютном избытке для обеспечения того, чтобы все остаточные сульфатные группы находились в форме натриевой соли (см. табл. 2);

е) второе осаждение с помощью этанола, предпочтительно абсолютного этанола, в результате чего получают чрезвычайно мелкий и чистый осадок, при этом осуществляют только один проход, для которого не требуется диализ и который можно передавать непосредственно на последующие стадии;

ф) повторные промывания и высушивание полученного таким образом продукта под вакуумом.

Промывания, представленные на стадии ф) способа в соответствии с настоящим изобретением, можно осуществлять по отношению к продукту, полученному на стадии е), следующим образом:

ф') удалением растворителя путем промывания осадка три раза смесью этанол/вода в соотношении, составляющем 8:2;

ф'') удалением остатков пиридина путем последовательных промываний смесью этанол/ NaOH 0,1 M 8:2; смесью этанол/ HCl 8:2; смесью этанол/вода 8:2 и в конце абсолютным этанолом. Промывание смесью этанол/ NaOH 0,1 M 8:2 особенно важно на данной стадии, поскольку оно обеспечивает практически полное удаление пиридина с получением в результате порошка чрезвычайно высокой степени чистоты, всегда >98% (в табл. 3 указаны осуществляемые в данном отношении тесты).

Высушивание под вакуумом осуществляют в соответствии со способом, известным из уровня техники.

Способ в соответствии с настоящим изобретением характеризуется чрезвычайно высокими уровнями выхода, при этом способ фактически обеспечивает получение уровней выхода, составляющих $\geq 98\%$; комбинация стадий, которые определяют способ в соответствии с настоящим изобретением, обеспечивает практически количественное сульфатирование всей используемой НА. Этот результат является совершенно неожиданным, поскольку в отношении способов, известных из уровня техники, описаны намного более низкие уровни выхода:

EP 889055, Shiseido, пример 2: 1,2 г HAS получают из 2 г исходной НА (выход 50%; рассчитанная степень сульфатирования 20%);

EP 702699, Fidia, пример 1: выход примерно 62% для степени сульфатирования 3;

WO 2010/130446, Fidia, пример 2: выход, описанный в пределах диапазона 86-88%, для степени 3 HAS (9,7 г HAS 3 получают из 10 г НА-ТБА).

Способ в соответствии с настоящим изобретением также характеризуется получением продукта со степенью чистоты, превышающей 98%, при этом полученный сульфатированный продукт представляет собой чрезвычайно мелкий порошок с ничтожно малыми количествами остатков пиридина и органического растворителя, что вследствие этого не требует стадии диализа, в отличие от способов, известных из уровня техники:

EP 889055, Shiseido, пример 2: диализ "в течение ночи" с использованием 3 л дистиллированной воды, подлежащих замене 3 раза;

EP 702699, пример 1 и WO 2010/130446, пример 2: длительность диализа не обозначена, однако его осуществляют до удаления остатков веществ для проведения реакции.

Исключение стадии диализа чрезвычайно важно с промышленной точки зрения, поскольку это представляет значительную экономию (меньше стадий, короче периоды времени ожидания, меньшее количество отработанных материалов). Отсутствие какой-либо стадии диализа вследствие этого является ключевым аспектом способа в соответствии с настоящим изобретением. Таким образом, получение продукта высокой степени чистоты является важным не только потому, что это обеспечивает исключение затруднительной с промышленной точки зрения стадии, но также, в абсолютном понимании, потому, что конечный продукт, образующийся в результате осуществления способа получения, который можно использовать как есть, без каких-либо дополнительных предосторожностей в отношении степени чистоты, значительно упрощает работу технического специалиста в области составов; путем использования сульфатированной НА (или производных НА) в соответствии с настоящим изобретением он может получить фактически любую фармацевтическую форму без какого-либо риска, связанного с примесями, в норме присутствующими в конце химического синтеза.

Следует помнить, что фактически для некоторых фармацевтических форм являются удовлетворительными продукты с высокой степенью чистоты, однако не абсолютно без примесей, т.е. так называемой "косметической степени"; как правило, такие формы представляют собой фармацевтические формы, используемые, например, на неповрежденной коже, в функциональных продуктах питания или в пищевых добавках и т.п.

С другой стороны, для других фармацевтических форм необходимы продукты с "фармацевтической

степенью" чистоты, т.е. продукты должны быть чрезвычайно чистыми для того, чтобы их также можно было использовать в специальных фармацевтических формах, например, таких как инъекции (внутридермальная, внутримышечная, внутривенная, внутриглазная), или на определенных участках (коже, пораженной язвами, инфекциями, вызванными герпесвирусами, нарушениями со стороны сосудов, слизистых оболочках и т.п.).

Эти особенно преимущественные технические результаты обусловлены комбинацией различных ключевых особенностей способа в соответствии с настоящим изобретением, и в частности: присутствием органической сульфоновой кислоты, предпочтительно метансульфоновой кислоты, на стадии солюбилизации НА-Na (или НА-производного-Na) в предварительно выбранном апротонном растворителе; солюбилизацией осадка в воде в присутствии избытка NaCl и изначально используемого апротонного растворителя и регулированием значения pH в пределах очень узкого диапазона значений перед окончательным осаждением с помощью этанола.

Значения pH являются принципиальными: из данных, указанных в табл. 2 ниже, видно, что даже минимальные вариации в отношении заявленного диапазона приводят к образованию "грязного" осадка, который обязательно требует нескольких стадий диализа перед тем, как его промывают и высушивают с помощью стандартных методик.

В уровне техники отсутствует описанное или предусмотренное регулирование значения, поскольку осаждение описано в уровне техники при нейтральном значении pH (EP 8890559, WO 2010/130446) или однозначно основном (EP 702699). Следовательно, было совершенно непредсказуемым, что стабилизация при типично кислых значениях pH может привести к неожиданным результатам способа в соответствии с настоящим изобретением.

Таким образом, с помощью способа в соответствии с настоящим изобретением не только значительно улучшается уровень выхода и чистота продукта согласно данному способу, но также обеспечивается исключение некоторых стадий способа в отношении известных способов, следовательно, что также делает его более удобным с промышленной точки зрения.

Эти результаты совершенно непредсказуемы и неожиданны в контексте предыдущего уровня техники.

Таблица 1. Оценка эффекта метансульфоновой кислоты в отношении солюбилизации НА-Na в DMSO (Т 24°C; время: 24 ч)

НА-Na 200 кДа (г)	1,00 г	1,00 г	1,00 г	1,00 г	1,00 г	1,00 г
DMSO (мл)	55 мл	55 мл	55 мл	55 мл	55 мл	55 мл
Метансульфоновая кислота	0	0,16 мл	0,48 мл	0,64 мл	0,73 мл	0,89 мл
Эквиваленты (мол./мол.) на дисахаридную единицу НА	0	1	3	4	4,5	5,5
Поглощение при 600 нм (*)	0,65	0,41	0,15	0,09	0,04	0,01
Солюбилизация	Неомогенная суспензия	Неомогенная суспензия	Неомогенная суспензия	Неомогенная суспензия	Прозрачный бесцветный раствор	Прозрачный бесцветный раствор

* Измерение осуществляли с помощью UV/Vis спектрофотометра против DMSO (холостая проба); оно выражало степень прозрачности: раствор является прозрачным, если он характеризуется коэффициентами поглощения при 600 нм $\leq 0,04$ ЕОП.

Важность добавления метансульфоновой кислоты очевидна. Из дополнительных тестов видно, что при использовании больших количеств метансульфоновой кислоты (6 и 6,5 мол./мол.экв.) солюбилизация НА-Na является полной, однако в окончательной фазе осаждения наблюдалось резкое сокращение уровня выхода, который был ниже уровней выхода способов, известных из уровня техники, и к тому же полученный осадок характеризуется степенью чистоты меньше 90%.

Таблица 2. Характеристики осадка в зависимости от присутствия NaCl, DMSO и от регулирования значения pH перед 2^{-ым} осаждением с помощью этанола

	1	2	3	4	5	6	7
HAS3 (из первого осаждения) как в примере 1	Коричневый каучукоподобный осадок	Коричневый каучукоподобный осадок	Коричневый каучукоподобный осадок	Коричневый каучукоподобный осадок	Коричневый каучукоподобный осадок	Коричневый каучукоподобный осадок	Коричневый каучукоподобный осадок
Солубилизация в:							
H ₂ O (мл)	56 мл	56 мл	32 мл	32 мл	32 мл	32 мл	32 мл
NaCl (г)	1,3 г	1,3 г	0 г	1,3 г	1,3 г	1,3 г	1,3 г
DMSO (мл)	0 мл	0 мл	24 мл	24 мл	24 мл	24 мл	24 мл
pH	pH 1,9	pH 3,4	pH 3,5	pH 4,5	pH 7	pH 1,9	pH 3,5
Появление осадка (после 2 ^{-го} осаждения с помощью этанола)	Желтоватый каучукоподобный осадок	Молочная смесь	Молочная смесь	Желтоватый каучукоподобный осадок	Желтоватый каучукоподобный осадок	Белый каучукоподобный осадок	Очень мелкий желтоватый-белый порошок

Значения pH растворов, показанные в колонках 2-5 и 7, регулировали с помощью NaOH 3 М. Значения pH, показанные в колонках 1 и 6, являются теми, которые получены в окружающей среде реакции.

С помощью комбинации воды, органического растворителя и скорректированного значения pH получают необходимый эффект: полученный осадок находится в виде очень мелкого, чистого порошка с высокими уровнями выхода только в том случае, когда условия наличия DMSO, NaCl и регулирования значения pH сверены в соответствии с объектом настоящего изобретения.

Таблица 3. Влияние смеси этанол/NaOH на стадиях промывания

HAS3 после 2 ^{-го} осаждения (пример 1)	Очень мелкий желтовато-белый порошок	Очень мелкий желтовато-белый порошок	Очень мелкий желтовато-белый порошок	Очень мелкий желтовато-белый порошок
Промывания (пг.):				
Этанол/вода (8:2)	пг. 6 x 15'	пг. 6 x 15'	пг. 3 x 15'	пг. 3 x 15'
Этанол/NaOH 0,1 М (8:2)	0	0	пг. 4 x 15'	пг. 3 x 15'
Этанол/HCl 0,1 М (8:2)	пг. 2 x 15'	0	0	пг. 2 x 15'
Этанол/вода (8:2)	пг. 2 x 15'	пг. 4 x 15'	пг. 4 x 15'	пг. 2 x 15'
Этанол	пг. 2 x 15'	пг. 2 x 15'	пг. 2 x 15'	пг. 2 x 15'
Содержание пиридина после высушивания (% вес/вес)	0,47%	0,56%	0,016%	0,014%

Добавление смеси этанол/NaOH 0,1 М 8:2 на стадиях промывания обеспечивает существенное снижение содержания остаточного пиридина в конечном продукте ($\leq 0,02\%$ вес./вес.), особенно если его осуществляли перед применением смеси этанол/HCl 0,1 М. С другой стороны, в случае отдельного применения последнего, это не обеспечивает достаточное удаление пиридина.

В следующих примерах, как и в вышеприведенных таблицах, степень сульфатирования определяли с помощью анализа с применением ICP-OES (анализ с применением атомной эмиссионной спектроскопии с источником плазмы), известного специалисту в данной области; молярное DS рассчитывали с применением методики, с помощью которой выражают количество атомов S, связанных с НА, и таким образом степень замещения на дисахаридную единицу (стандартный раствор с серой для ICP "18021 Sigma-Aldrich TraceCERT®"). Средний MW на повторяющуюся единицу образца HAS рассчитывают из молярного DS, и следовательно количества молей, которое, при сравнении с таковым исходной НА, выражает % выхода (Macromolecules, 2005, 38, 4647-4654).

Примеси (пиридин и DMSO) анализировали с помощью газовой хроматографии с прямым вводом,

воздействующим на конечный продукт, рассчитывая их общее соотношение (вес./вес.%) в отношении полученной HAS в соответствии с известным из уровня техники способом (Европейская фармакопея 8.0, парагр. 5.4: остаточный растворитель).

Как уже упоминалось, сульфатированная гиалуроновая кислота (или ее производные), полученная в соответствии с настоящим изобретением, не только экономически целесообразна с промышленной точки зрения, но, прежде всего, она характеризуется высокой степенью чистоты; это означает, что ее можно применять как таковую или должным образом объединенной с другими веществами при получении фармацевтических композиций, предназначенных для любого пути введения, от кожного до внутривенного, при лечении широкого спектра заболеваний, при которых терапевтическое значение сульфатированной НА тщательно изучено с помощью научных исследований и, таким образом, хорошо известно из уровня техники.

В связи с этим следует помнить, что сульфатированную НА можно применять при: заболеваниях, связанных с нарушениями иммунной системы; заболеваниях, связанных с повышением уровня или активацией воспалительных цитокинов, например таких как TNF, который может вырабатываться как системно (при остеоартрите, ревматоидном артрите, астме, сосудистой болезни, васкулите, тромбозе глубоких вен, склеродермии и т.п.), а также в участках кожи (при неспецифическом дерматите, atopическом дерматите, себорейном дерматите, крапивнице, световом дерматозе, экземе, раздражениях кожи и/или слизистых оболочек, язвенном стоматите, трещинах и т.п.) или определенных участках (при интерстициальном цистите и т.п.); заболеваниях, связанных с дермально-кожными проявлениями повреждения эндотелия сосудов, такими как травмы, поверхностное и/или глубокое сосудистое кровотечение, отечность, гематома, удаление сгустка (фибринолитический эффект) и т.п.; аутоиммунных нарушениях, включающих в себя ревматоидный артрит, болезнь Крона и все хронические воспалительные заболевания кишечника, астму, сахарный диабет, рассеянный склероз и демиелинизирующие заболевания, астроцитоз, астроглиоз, отторжение органа после трансплантации и т.п. Кроме того, аутоиммунные заболевания с дермально-кожными проявлениями включают в себя псориаз, эритематозную волчанку и/или монетовидные дерматит, экзему и т.п.; вирусных заболеваниях, таких как инфекции, вызванные ВИЧ, Herpes simplex labialis или genitalis, Cytomegalovirus, вирусом ветряночного стоматита. Было доказано, что для этих заболеваний сульфатированная HAS степени 1 или 3 является особенно активной. Сульфатированная НА также характеризуется чрезвычайно высокими свойствами гидратирования благодаря сульфатным группам, которые обеспечивают ее прохождение через кожный барьер намного легче, чем исходной молекулы, и накопление в поверхностных слоях кожи. Эти свойства можно применять при любой форме кожного заболевания, характеризующегося сухостью, лихенификацией, шероховатостью, зудом, покраснением, воспалением и поверхностным шелушением.

Благодаря своей значительной степени проникновения через кожу, сульфатированная НА действует в качестве превосходного стимулятора кожной абсорбции молекул, которые по отдельности не способны пересекать кожный барьер. Таким образом, молекулы могут достигать слоя дермы и проявлять свой эффект. Эти молекулы могут представлять собой лекарственные средства (например, стероидные и нестероидные противовоспалительные средства, химиотерапевтические средства для местного применения, антибиотики, противовирусные средства, антикоагулянты и/или фибринолитические средства, местные анестетики, антихолинергические средства, сосудорасширяющие средства, сосудосуживающие средства), гормоны, белки, ферменты (например, молекулы коллагеназы, гиалуронидазы, протеазы), вытяжки из растений, другие полимеры (например, молекулы хондроитинсульфата, химически модифицированные производные гиалуроновой кислоты).

Фармацевтические композиции, содержащие сульфатированную гиалуроновую кислоту, или сульфатированные производные НА, и/или их смеси, со степенью сульфатирования, находящейся в диапазоне от 1 до 3, и со степенью чистоты, превышающей 98%, которые можно получать с помощью способа в соответствии с настоящим изобретением в присутствии подходящих фармацевтически приемлемых добавок, можно применять для местного введения (в форме кремов, гелей, бальзамов, мазей, пленок, лосьонов, лекарственных и трансдермальных пластырей и т.п.), перорального введения (в форме капсул, таблеток, порошков, препаратов в виде гранул, напитков, функциональных продуктов питания и т.п.), введения с помощью инъекции (внутридермального, внутрисуставного, внутривенного, внутримышечного и т.п.), трансмукозального введения (ректального, вагинального, трансбуккального), с помощью ингаляции и локорегионарного введения (например, внутриглазного, интравезикального).

Фармацевтическую форму безусловно выбирают, исходя из терапевтического применения и участка для приложения действия; независимо от выбранной фармацевтической формы, указанные фармацевтические композиции могут дополнительно содержать биологически и/или фармакологически активные вещества, как синтетического, так и природного происхождения, такие как лекарственные средства, вытяжки из трав, белки, пептиды, витамины, аминокислоты, гликозаминогликаны, полимеры природного, частично синтетического или синтетического происхождения; последняя категория также включает производные гиалуроновой кислоты, полученные с помощью эстерификации бензиновым спиртом (HYAFF®), с помощью амидирования гексадециламидом (HYADD®, степень амидирования 5%), с по-

мощью внутренней эстерификации (АСР®, степень эстерификации 5%) и т.п.

В числе возможных ассоциаций могут быть упомянуты следующие:

НАS степени 1 или 2 в соответствии с настоящим изобретением, ассоциированная с гиалуроновой кислотой, эстерифицированной с помощью бензилового спирта, с долей в процентах эстерификации, находящейся в диапазоне от 50 до 100%, предпочтительно от 50 до 75%, при лечении интерстициального цистита;

НАS степени 1 или 3, ассоциированная с природными вытяжками (Boswellia), витаминами и мочевиной, при лечении псориаза и себорейного дерматита;

НАS степени 1 или 2, ассоциированная с хондроитинсульфатом, при локорегионарном лечении заболеваний мочевыделительной системы;

НАS степени 1 или 2, и/или с хондроитинсульфатом, и/или НА для лечения повреждения хряща (в результате сноса, травмы, остеоартрита) с использованием внутрисуставного введения.

Настоящее изобретение проиллюстрировано более подробно в нижеизложенных примерах.

Пример 1. Сульфатирование натриевой соли гиалуроновой кислоты (HANa) с MW 200 кДа в DMSO - степень сульфатирования 3

1) 1,00 г HANa суспендировали в 55 мл диметилсульфоксида (DMSO). К этой суспензии добавляли 0,8 мл чистой метансульфоновой кислоты, и смесь перемешивали в течение 24 ч при 25°C; таким образом получали прозрачный бесцветный раствор (поглощение при 600 нм = 0,02 ЕОП). К этому раствору добавляли 5,0 г комплекса пиридина и триоксида серы (пиридина SO₃), оставляли смесь в условиях перемешивания на дополнительные 24 ч при 25°C.

2) Затем к раствору добавляли 90 мл этанола с получением окрашенного в коричневый цвет каучукоподобного осадка. Полученный таким образом продукт отделяли с помощью фильтрации, солибилизируют в 32 мл воды и добавляли 1,3 г NaCl. В конце, добавляли 24 мл DMSO, и значение pH регулировали до значения, равного 3,4, с помощью NaOH 3 М. Полученное таким образом производное осаждали в виде очень мелкого порошка путем добавления 90 мл этанола. Полученный таким образом продукт отделяли с помощью фильтрации, промывали 3 раза раствором этанола/воды (8/2). С целью устранения остаточного пиридина порошок промывали 3 раза раствором этанола/NaOH 0,1 М (8:2), дважды раствором этанола/HCl 0,1 М (8:2), дважды раствором этанола/воды (8:2) и в конце дважды чистым этанолом. Полученный таким образом желтовато-белый порошок высушивали с использованием вакуумного насоса при 40°C в течение 24 ч.

Получали 1,70 г очень мелкого желтовато-белого порошка, который соответствовал выходу, составляющему 98%, со степенью чистоты, составляющей 99,4%.

Пример 2. Сульфатирование натриевой соли гиалуроновой кислоты (HANa) с MW 200 кДа в DMSO - степень сульфатирования 2.

Суспендировали 1,00 г HANa в 55 мл диметилсульфоксида (DMSO). К этой суспензии добавляли 0,8 мл чистой метансульфоновой кислоты, и смесь перемешивали в течение 20 ч при 25°C; таким образом получали прозрачный бесцветный раствор (поглощение при 600 нм = 0,02 ЕОП). К этому раствору добавляли 4,0 г комплекса пиридина и триоксида серы (пиридина SO₃), оставляли смесь в условиях перемешивания на дополнительные 22 ч при 23°C.

Затем осуществляли такую же процедуру в соответствии с описанным в примере 1, п.2.

Получали 1,51 г очень мелкого желтовато-белого порошка, который соответствовал выходу, составляющему 98%, со степенью чистоты, составляющей 99,2%.

Пример 3. Сульфатирование натриевой соли гиалуроновой кислоты (HANa) с MW 200 кДа в DMSO - степень сульфатирования 1

Суспендировали 1,00 г HANa в 55 мл диметилсульфоксида (DMSO). К этой суспензии добавляли 0,8 мл чистой метансульфоновой кислоты, и смесь перемешивали в течение 26 ч при 26°C; таким образом получали прозрачный бесцветный раствор (поглощение при 600 нм = 0,02 ЕОП). К этому раствору добавляли 2,4 г комплекса пиридина и триоксида серы (пиридина SO₃), оставляли смесь в условиях перемешивания на дополнительные 27 ч при 27°C.

Затем осуществляли такую же процедуру в соответствии с описанным в примере 1, п.2.

Получали 1,26 г очень мелкого белого порошка, который соответствовал выходу, составляющему 99%, со степенью чистоты, составляющей 99,5%.

Пример 4. Сульфатирование натриевой соли гиалуроновой кислоты (HANa) с MW 700 кДа в DMSO - степень сульфатирования 3

Суспендировали 1,00 г HANa в 55 мл диметилсульфоксида (DMSO). К этой суспензии добавляли 0,8 мл чистой метансульфоновой кислоты, и смесь перемешивали в течение 20 ч при 28°C; таким образом получали прозрачный бесцветный раствор (поглощение при 600 нм = 0,02 ЕОП). К этому раствору добавляли 5,0 г комплекса пиридина и триоксида серы (пиридина SO₃), оставляли смесь в условиях перемешивания на дополнительные 1,5 ч при 29°C.

Затем осуществляли такую же процедуру в соответствии с описанным в примере 1, п.2.

Получали 1,75 г очень мелкого желтовато-белого порошка, который соответствовал выходу, со-

ставляющему 98%, со степенью чистоты, составляющей 99,1%.

Пример 5. Сульфатирование натриевой соли гиалуроновой кислоты (HANA) с MW 200 кДа в NMP - степень сульфатирования 3

Суспендировали 1,00 г HANA в 55 мл N-метил-пирролидона (NMP). К этой суспензии добавляли 0,8 мл чистой метансульфоновой кислоты, и смесь перемешивали в течение 23 ч при 25°C; таким образом получали прозрачный бесцветный раствор (поглощение при 600 нм = 0,02 ЕОП). К этому раствору добавляли 5,0 г комплекса пиридина и триоксида серы (пиридина SO₃), оставляли смесь в условиях перемешивания на дополнительные 20 ч при 24°C.

Затем осуществляли такую же процедуру в соответствии с описанным в примере 1, п.2.

Получали 1,67 г очень мелкого желтовато-белого порошка, который соответствовал выходу, составляющему 98%, со степенью чистоты, составляющей 98,9%.

Пример 6. Сульфатирование натриевой соли гиалуроновой кислоты (HA-Na) с MW 200 кДа в N,N-диметилформамиде (DMF) - степень сульфатирования 3

Суспендировали 1,00 г HANA в 55 мл N,N-диметилформамида (DMF). К этой суспензии добавляли 0,8 мл чистой метансульфоновой кислоты и смесь перемешивали в течение 25 ч при 22°C; таким образом получали прозрачный бесцветный раствор (поглощение при 600 нм = 0,02 ЕОП). К этому раствору добавляли 5,0 г комплекса пиридина и триоксида серы (пиридина SO₃), оставляли смесь в условиях перемешивания на дополнительные 25 ч при 22°C.

Затем осуществляли такую же процедуру в соответствии с описанным в примере 1, п.2.

Получали 1,73 г очень мелкого желтовато-белого порошка, который соответствовал выходу, составляющему 98%, со степенью чистоты, составляющей 99,1%.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Усовершенствованный способ получения сульфатированной гиалуроновой кислоты (HA), сульфатированных HA-производных и/или их смесей, характеризующихся высокой степенью чистоты и степенью сульфатирования, находящейся в диапазоне от 1 до 3, где указанный способ предусматривает следующие стадии:

а) солибилизация HA-Na или HA-производное-Na в апротонном растворителе, в присутствии органической сульфоновой кислоты в количестве, находящемся в диапазоне от 4,5 до 5,5 моль/моль.экв., относительно повторяющейся дисахаридной единицы HA или производного HA;

б) сульфатирование раствора, полученного в конце стадии а), путем добавления избытка SO₃-пиридина, SO₃-триметиламина или других средств для сульфатирования;

с) осаждение в этаноле с получением осадка;

д) солибилизация полученного в результате осадка в смеси воды и апротонного растворителя, используемого на стадии а), в присутствии избытка NaCl, при этом указанный избыток рассчитан относительно остаточных сульфатных групп с регулированием значения pH в пределах диапазона от 3 до 4;

е) дополнительное осаждение с помощью этанола с получением порошка;

ф) промывания порошка, образующегося в результате осуществления стадии е), и высушивание полученного таким образом продукта под вакуумом.

2. Способ по п.1, где промывания на стадии ф) являются следующими:

ф) удаление растворителя путем промывания осадка три раза смесью этанол/вода в соотношении, составляющем 8:2;

ф") удаление остатков пиридина путем последовательных промываний смесью этанол/NaOH 0,1 М 8:2; смесью этанол/HCl 8:2; смесью этанол/вода 8:2 и в конце абсолютным этанолом.

3. Способ по любому из предыдущих пунктов, где стадию а) солибилизации осуществляют в течение периода времени, находящегося в диапазоне от 20 до 28 ч, при температуре T, находящейся в диапазоне от 20 до 30°C.

4. Способ по любому из предыдущих пунктов, где стадию а) солибилизации осуществляют в присутствии органической сульфоновой кислоты, которая представляет собой метансульфоновую кислоту.

5. Способ по любому из предыдущих пунктов, где на стадии д) регулируют значение pH в пределах диапазона от 3,3 до 3,5.

6. Способ по любому из предыдущих пунктов, где гиалуроновая кислота из HA-Na, используемой на стадии а), характеризуется исходной средней молекулярной массой, составляющей от 100000 до 250000 Да или от 500000 до 750000 Да.

7. Способ по любому из предыдущих пунктов, где HA-производное из HA-производное-Na, используемой на стадии а), выбрано из

амидов HA с аминами алифатического, арилалифатического, циклоалифатического, ароматического, циклического и гетероциклического рядов с долей в процентах амидирования, находящейся в диапазоне от 0,1 до 50%;

сложных эфиров HA со спиртами алифатического, арилалифатического, циклоалифатического, ароматического, циклического и гетероциклического рядов с долей в процентах эстерификации, которая

находится в диапазоне, в соответствии с типом и длиной цепи выбранного спирта;

внутренних сложных эфиров НА с долей в процентах эстерификации, не превышающей 20%;

при этом оставшуюся долю в процентах НА, не подверженной амидированию или неэстерифицированной соответственно, преобразуют в соль с помощью органических и/или неорганических оснований.

8. Способ по любому из предыдущих пунктов, где на стадии а) апротонный растворитель выбран из диметилсульфоксида, N,N-диметилформамида или N-метилпирролидона.

9. Способ по любому из предыдущих пунктов, где на стадии а) апротонный растворитель представляет собой диметилсульфоксид.

10. Способ по любому из предыдущих пунктов, где на стадии b) сульфатирование раствора, полученного в конце стадии а), осуществляют путем добавления избытка SO₃-пиридина.

11. Способ по любому из предыдущих пунктов, где на стадии с) и стадии е) осаждение осуществляют в абсолютном этаноле.

12. Способ по любому из предыдущих пунктов, где стадию а) солубилизации осуществляют в течение 24 ч при 25°C.

13. Способ по любому из предыдущих пунктов, где гиалуроновая кислота из НА-Na, используемой на стадии а), характеризуется исходной средней молекулярной массой, составляющей от 180000 до 230000 Да или от 700000 до 730000 Да.

14. Способ по п.9, где НА-производное из НА-производное-Na, используемой на стадии а), выбрано из

сложных эфиров НА со спиртами алифатического, ариалифатического, циклоалифатического, ароматического, циклического и гетероциклического рядов с долей в процентах эстерификации, которая находится в диапазоне от 50 до 100%;

внутренних сложных эфиров НА с долей в процентах эстерификации от 0,05 до 10%;

при этом оставшийся процент неэстерифицированной НА преобразуют в соль с помощью органических и/или неорганических оснований.

