

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **035414**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.06.10**

**(21)** Номер заявки  
**201790574**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2015.09.04**

**(51)** Int. Cl. *A61L 27/20* (2006.01)  
*A61L 27/22* (2006.01)  
*A61L 27/24* (2006.01)  
*A61L 27/26* (2006.01)  
*A61L 27/52* (2006.01)

---

**(54) КОМБИНАЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНЫ И БЕЛКИ**

---

**(31)** РСТ/IB2014/064631;  
РСТ/IB2015/054225

**(32)** 2014.09.18; 2015.06.04

**(33)** IB

**(43)** 2017.09.29

**(86)** РСТ/IB2015/056740

**(87)** WO 2016/042434 2016.03.24

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ШОНДРОНЕСТ СА (CH)**

**(72)** Изобретатель:  
**Швитцгюэбель Тьерри (CH)**

**(74)** Представитель:  
**Новоселова С.В., Липатова И.И.,  
Дошечкина В.В., Хмара М.В.,  
Пантелеев А.С., Ильмер Е.Г., Осипов  
К.В. (RU)**

**(56)** WO-A2-9719701  
EP-A1-1384774  
WO-A2-2009031047

---

**(57)** Композиция, включающая полигидроксиуретаны, гликозаминогликаны, гидролизованные гликозаминогликаны, гликозамины гликозаминогликанов, модифицированные или немодифицированные химически, и белок или пептид, где белок представляет собой коллаген, эластин, кератин, фибронектин, актин, миозин, ламинин, пептид или смесь перечисленных белков или пептидов, фибриллированных, гидролизованных, модифицированных химически или нефибриллированных, негидролизованных, немодифицированных химически. Такую гомогенную композицию получают реакцией полимеризации или образования ковалентных связей между двумя препаратами, содержащими циклические поликарбонаты, полиамины, гликозаминогликаны, гидролизованные гликозаминогликаны, гликозамины, модифицированные или немодифицированные химически, и белки или пептиды или смеси таких белков или пептидов, фибриллированных, гидролизованных, модифицированных или нефибриллированных, негидролизованных, немодифицированных химически.

---

**035414**  
**B1**

**035414**  
**B1**

### **Область техники**

В общем, изобретение относится к комбинациям, содержащим гликозаминогликаны, частично гидролизованные гликозаминогликаны или гликозамины, химически модифицированные или немодифицированные, и белки, частично гидролизованные белки или пептиды, химически модифицированные или немодифицированные, такие как, например, коллагены.

### **Предшествующий уровень техники**

Составление гомогенных композиций, содержащих чрезвычайно гидрофильные гликозаминогликаны, частично гидролизованные гликозаминогликаны или гликозамины, модифицированные или немодифицированные химически, и белки, частично гидролизованные белки или пептиды, модифицированные или немодифицированные химически, позволяет получать вязкоэластичные твердые или полутвердые вещества с ограниченными механическими свойствами и ограниченными свойствами, подходящими для применения в биологии, фармакологии или медицине.

### **Сущность изобретения**

Задачи, упомянутые в предыдущем разделе, могут быть решены при помощи комбинации согласно изобретению.

Для этого комбинация согласно изобретению включает полигидроксиуретан (PHU), гликозаминогликан, частично гидролизованные гликозаминогликаны или гликозамины, химически модифицированные или немодифицированные, и белки, частично гидролизованные белки или пептиды, химически модифицированные или немодифицированные. Полигидроксиуретан получают образованием ковалентной связи между такими химическими функциональными группами, как циклические карбонаты ("СС") и полиамины ("РА").

Предпочтительно комбинацию получают полимеризацией или образованием ковалентной связи между препаратом, содержащим молекулы, имеющие функциональные группы циклических поликарбонатов и гликозаминогликаны, частично гидролизованные гликозаминогликаны или гликозамины, или химически модифицированные или немодифицированные, и препаратом, содержащим молекулы, имеющие полиаминные функциональные группы (функциональные группы полиаминов), белки, частично гидролизованные белки или пептиды, химически модифицированные или немодифицированные. Гликозаминогликаны, частично гидролизованные гликозаминогликаны или гликозамины и белки, частично гидролизованные или негидролизованные, или пептиды могут быть химически модифицированы составляющими полигидроксиуретанов.

Гликозаминогликаны, частично гидролизованные гликозаминогликаны или гликозамины, химически модифицированные мономерами или преполимерами (форполимерами) полигидроксиуретанов, ковалентно присоединены к белкам, частично гидролизованным белкам или пептидам, химически модифицированным или немодифицированным мономерами или преполимерами полигидроксиуретанов, с образованием новых комбинаций, имеющих инновационные физические, биологические, фармакологические или медицинские свойства.

Комбинация согласно изобретению может иметь множество применений, таких как получение микрогеля или микрочастиц для доставки активных фармацевтических веществ или для поддержания жизнедеятельности живых клеток, или обработка поверхностей, контактирующих с живыми тканями, или обработка поверхностей для придания им специфичного сродства к полисахаридам, белкам, частично гидролизованным белкам и пептидам, или химическая модификация белков, частично гидролизованных белков и пептидов для придания им новых физических, биологических, фармакологических или медицинских свойств, или реконструкция и замещение внеклеточного матрикса (экстрацеллюлярного матрикса) *in vitro* или *in vivo*.

Внеклеточный матрикс представляет собой неклеточную часть, присутствующую во всех тканях и органах. Его функции в основном связаны с его структурой и его физическими свойствами, а также с его биохимическим составом и его основными составляющими и их биомеханическими функциями.

По существу, внеклеточный матрикс (ВКМ) состоит из воды, белков и полисахаридов. Каждый ВКМ обладает уникальным биохимическим составом, но общей чертой всех ВКМ, по существу, является присутствие белков, имеющих различные конформации, такие как фибриллярная (волоконистая) структура коллагенов, в то время как гликозаминогликаны образуют гидратированные гели. В гемостатических (кровеостанавливающих) условиях ВКМ коллагены и другие фибриллярные белки, по существу, гидрофобны, в то время как гликозаминогликаны отличаются высокой гидрофильностью. Одним из основных применений инновационной композиции согласно настоящему изобретению является реконструкция ВКМ *in vitro* и *in vivo* на основании этих двух основных классов веществ с подходящими механическими характеристиками в биосовместимых условиях.

В настоящее время известны методики реконструкции или замены ВКМ, если ВКМ была повреждена или разрушена в результате различных воздействий или травм, или при ее деформации или при ее частичном или полном исчезновении в результате протекания процессов, связанных со старением, травмами или эрозией.

Эти методики могут быть разделены на три основных класса:

применение имплантатов и биосовместимых протезов, не имеющих отношения к исходному соста-

ву ВКМ и не содержащих живых клеток;

применение имплантатов и биосовместимых механических каркасов, имеющих состав, ограниченно схожий с исходным составом ВКМ, но не препятствующий пролиферации живых клеток в ВКМ-миметике;

аутологические трансплантаты, основанные на извлечении здоровой и функциональной ВКМ пациента для реконструкции поврежденных частей.

Эти методики находят широкое применение, несмотря на то что каждая из них имеет свои собственные хорошо известные недостатки, такие как

тяжелые операционные травмы и трудности при замещении протезов без живых клеток;

плохая интеграция и неудовлетворительное встраивание функционализированных каркасов в соседствующую ВКМ;

ограничение аутологических трансплантатов: сложно найти адекватную здоровую ВКМ.

Настоящее изобретение позволяет сконструировать биосовместимую ВКМ, состоящую из полигидроксиуретанов и основных составляющих исходной ВКМ, белков и гликозаминогликанов. Такую ВКМ получают *in vitro* или *in vivo* полимеризацией находящихся в мономерах или преполимерах полигидроксиуретанов функциональных групп, способствующих солюбилизации и образованию тесных контактов или ковалентных связей между белками, частично гидролизованными белками или пептидами, химически модифицированными или немодифицированными, и гликозаминогликанами, частично гидролизованными гликозаминогликанами или гликозаминами, химически модифицированными или немодифицированными, в биосовместимых условиях.

В некоторых примерах осуществления настоящего изобретения комбинацию согласно изобретению получают из двух препаратов, которые в данном документе названы "препарат а" и "препарат б".

Препарат а.

Основными составляющими компонентами препарата а, подходящими для его предполагаемого применения, являются гликозаминогликаны, такие как хондроитинсульфаты; гиалуроновая кислота; гепарансульфаты; дерматансульфаты; кератансульфаты; агрекан; их гидролизованные фракции или составляющие их гликозамины и полигликозамины, причем упомянутые выше составляющие могут быть химически модифицированными одним или более мономерными или преполимерными единицами полигидроксиуретана; а также смеси перечисленных веществ; эти вещества далее называются "GAG смесью".

"GAG смесь" препарата а диспергируют или растворяют в непрерывной среде, содержащей приемлемый растворитель в концентрации, превышающей 1%, и необязательно мономеры или преполимеры полигидроксиуретана, не связанные ковалентной связью с "GAG смесью", например, циклические поликарбонаты, циклы которых содержат от 5 до 8 атомов.

В частности, циклические поликарбонаты полигидроксилированных молекул, имеющих по меньшей мере три первичные или вторичные неароматические гидроксильные функциональные группы.

Примеры включают циклические поликарбонаты эритрита, ксилита, арабита, рибита, сорбита, дульцита, маннита, мальтита, изомальтита, лактита или простых полиэфирполиолов и смеси перечисленных соединений, а также циклические карбонаты и поликарбонаты 1,2-дигидроксиэтилового или 2,3-дигидроксипропилового простого эфира, сложного эфира, кетона, амида, фосфата, сульфата, сульфида, дисульфида, алканов, циклоалканов, алкенов, циклоалкенов, арилов и гетероциклов, содержащих один или более атомов кислорода, или ароматических гетероциклов, содержащих один или более атомов азота или серы.

Коммерчески недоступные циклические поликарбонаты, необходимые для получения препарата а, получают способами, описанными в литературе, и согласно предшествующему уровню техники, например, способом, представленным Union Carbide Corporation в патенте US 3072613 от 8 января 1963 г.

Например, коммерчески недоступный мономерный циклический поликарбонат диглицерина получают медленным нагреванием смеси, содержащей диглицерин, избыток диэтилкарбоната и каталитическое количество карбоната натрия, до температуры 130°C. Реакция имеет очень высокий выход.

Преполимеры полигидроксиуретанов, имеющие степень полимеризации, составляющую от 3 до 200000, предпочтительно от 3 до 20000, получают способами, описанными в литературе и известными из предшествующего уровня техники, например способом, представленным в патенте US 3072613. Преполимеры полигидроксиуретанов, добавляемые в препарат а, смешивают и получают таким образом, чтобы их терминальные группы представляли собой функциональные группы циклического карбоната.

Химически модифицированные гликозаминогликаны, содержащие компоненты, полигидроксиуретана получают способами, описанными в литературе и известными из предшествующего уровня техники. Например, модифицированную гиалуроновую кислоту, добавляемую в "GAG смесь", получают деацелированием этой кислоты в щелочной среде с последующей этерификацией циклическим поликарбонатом диглицерина, после чего производят реакцию образования карбамата с тем же или другим циклическим поликарбонатом после доведения pH до величины, составляющей от 5 до 8. Согласно настоящему изобретению, гликозаминогликан, химически модифицированный любым из рассмотренных выше поликарбонатов, может быть дополнительно модифицирован диамином или полиамином. Реакцию образования карбамата боковой цепи модифицированной гиалуроновой кислоты проводят в присутствии прием-

лемого растворителя, пример которого включает, без ограничений, воду, при температуре, составляющей от нуля до 150°C, предпочтительно от 15 до 80°C. Получаемая химически модифицированная гиалуроновая кислота может быть дополнительно введена в реакцию образования карбамата с циклическим поликарбонатом в рассмотренных выше условиях. Дополнительно могут быть проведены последовательные реакции образования карбамата модифицированной гиалуроновой кислоты, в результате чего на модифицированной гиалуроновой кислоте образуется боковая полигидроксиуретановая цепочка, содержащая от 3 до 25 мономерных единиц, оканчивающаяся циклическими карбонатами. Такая же процедура может быть применена к частично гидролизованным гликозаминогликанам или гликозаминам, рассматриваемым в настоящем описании.

Кроме того, препарат а может содержать белки, частично гидролизованные белки или пептиды, "Смесь белков", химически модифицированных преполимерами полигидроксиуретанов или полигидроксиуретанов, концевые группы которых представляют собой циклические карбонаты.

Химически модифицированную "Смесь белков" получают, например, растворением коллагена в бис(1,4-аминопропил)пиперазине с последующим амидированием коллагена смесью карбодиимида, (EDC), т.е. (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид) и N-гидроксисукцинимидом, после чего производят осаждение модифицированного коллагена в ТВМЕ (в трет-бутилметилом простом эфире), а затем производят растворение и нейтрализацию влажного осадка в растворе безводного этанола, содержащего 4% уксусной кислоты, и затем - осаждение модифицированного коллагена в этилацетате, центрифугирование и сушку в вакууме. Аналогично химической модификации "GAG смеси", рассмотренной выше, химически модифицированная "Смесь белков" после амидирования может быть дополнительно введена в реакцию образования карбамата с одним из циклических поликарбонатов согласно настоящему изобретению в присутствии приемлемого растворителя при температуре, составляющей от нуля до 150°C, предпочтительно от 15 до 80°C. Получаемый химически модифицированный белок может быть дополнительно введен в реакцию образования карбамата с одним из диаминов или полиаминов согласно настоящему изобретению. Дополнительно могут быть проведены последовательные реакции образования карбамата "Смеси белков" для образования на "Смеси белков" боковой полигидроксиуретановой цепи, содержащей от 2 до 26 мономерных единиц, оканчивающейся функциональными группами циклического карбоната.

Препарат а содержит составляющие согласно изобретению, которые включают терминальные непрореагировавшие группы циклического карбоната. Количество непрореагировавших функциональных групп циклического карбоната всех составляющих препарата а достаточно для полимеризации или ковалентного связывания с непрореагировавшими первичными или вторичными функциональными аминогруппами всех составляющих препарата б, что позволяет придавать целевые свойства композиции, содержащей полигидроксиуретаны и гликозаминогликаны, частично гидролизованные гликозаминогликаны или гликозамины, модифицированные или немодифицированные химически, и белки, частично гидролизованные белки или пептиды, модифицированные или немодифицированные химически.

Препарат б.

Основными составляющими препарата б, подходящими для его предполагаемого применения, являются белки, такие как коллагены, эластины, кератины, фибронектины, актины, миозины, ламинины, их гидролизованные фракции или пептиды; названные выше составляющие, химически модифицированные одним или более компонентами полигидроксиуретанов, и смеси таких веществ далее называются "Смесью белков".

Химически модифицированные белки или пептиды, содержащие компоненты полигидроксиуретана, получают способами, описанными в литературе и известными из предшествующего уровня техники. Например, модифицированный коллаген для "Смеси белков" получают растворением коллагена в бис(1,4-аминопропил)пиперазине и последующим амидированием смесью карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом, после чего производят осаждение модифицированного коллагена в ТВМЕ (в простом трет-бутилметилом эфире) и последующее растворение и нейтрализацию влажного осадка в растворе безводного этанола, содержащего 4% уксусной кислоты, и затем - осаждение модифицированного коллагена в этилацетате, центрифугирование и сушку в вакууме. Аналогично химической модификации "GAG смеси", рассмотренной выше, химически модифицированный белок или пептид после амидирования может быть дополнительно введен в реакцию образования карбамата с одним из циклических поликарбонатов согласно настоящему изобретению в присутствии приемлемого растворителя при температуре, составляющей от нуля до 150°C, предпочтительно от 15 до 80°C. Получаемый химически модифицированный белок может быть дополнительно введен в реакцию образования карбамата с одним из диаминов или полиаминов согласно настоящему изобретению. Дополнительно могут быть проведены последовательные реакции образования карбамата "Смеси белков" для образования на "Смеси белков" боковой полигидроксиуретановой цепи, содержащей от 1 до 25 мономерных единиц, оканчивающейся функциональными группами циклического карбоната.

"Смесь белков" диспергируют или растворяют в непрерывной среде препарата б, содержащей приемлемый растворитель, пример которого включает, без ограничений, воду, в концентрации, превышающей 1%, и необязательно мономеры или преполимеры полигидроксиуретана, не связанные ковалентно со

"Смесью белков", например первичные или вторичные полиамины.

Первичные или вторичные полиамины, подходящие для применения согласно настоящему изобретению, представляют собой первичные или вторичные полиамины, полученные из простого эфира, сложного эфира, кетона, амида, фосфата, сульфата, сульфида, дисульфида, алканов, циклоалканов, алкенов, циклоалкенов, арилов, замещенных или не замещенных функциональными гидроксильными группами; или первичные или вторичные полиамины и первичные или вторичные полиалкиламины, полученные из гетероциклических соединений, содержащих один или более из следующих атомов: кислород, азот или серу; или простые полиэфирамины, как таковые или смешанные с этиленгликолем и пропиленгликолем; или смеси перечисленных соединений.

Преполимеры полигидроксиуретанов, степень полимеризации которых составляет от 3 до 200000, предпочтительно от 3 до 20000, получают способами, описанными в литературе и известными из предшествующего уровня техники, например способом, представленным Union Carbide Corporation в патенте US 3072613 от 8 января 1963 года. Преполимеры полигидроксиуретанов, включаемых в препарат b, смешивают и получают таким образом, чтобы их терминальные группы представляли собой функциональные первичные или вторичные аминогруппы.

Дополнительно препарат a может содержать гликозаминогликаны, частично гидролизованные гликозаминогликаны или гликозамины, "GAG смеси", химически модифицированные преполимерами полигидроксиуретанов или полигидроксиуретанов, конечными группами которых являются функциональные первичные или вторичные аминогруппы.

Дополнительно препарат a может содержать гликозаминогликаны, частично гидролизованные гликозаминогликаны или гликозамины, "GAG смеси", химически модифицированные мономерами или преполимерами полигидроксиуретанов или полигидроксиуретанов, конечные группы которых представляют собой функциональные первичные или вторичные аминогруппы, альтернативно полученные амидированием. Например, модифицированный хондроитинсульфат "GAG смеси" получают по реакции амидирования диамином или полиамином, неограничивающий пример которого включает 1,3-диамино-2-пропанол, которая катализируется карбодимидом (EDC) и N-гидроксисукцинимидом и протекает при комнатной температуре. Степень амидирования регулируют, изменяя количество катализатора. Полученный частично или полностью амидированный хондроитинсульфат очищают проводимыми последовательно операциями промывки, осаждения и ресуспендирования в полярных и менее полярных растворителях. Частично амидированный хондроитинсульфат может быть повергнут дополнительному амидированию преполимерами полигидроксиуретанов или полигидроксиуретанов, конечными группами которых являются функциональные первичные или вторичные аминогруппы. Реакцию проводят при температуре, составляющей от нуля до 80°C, предпочтительно от 20 до 60°C, в присутствии каталитической системы, состоящей из карбодимидов и N-гидроксисукцинимидов. Модифицированный гликозаминогликан извлекают с помощью проводимых последовательно операций промывки, осаждения и ресуспендирования в полярных и менее полярных растворителях.

Препарат b содержит составляющие согласно изобретению, которые имеют терминальные непрореагировавшие функциональные первичные или вторичные аминогруппы, получаемые из ди- и полиаминов. Количество непрореагировавших функциональных первичных или вторичных аминогрупп, получаемых из ди- и полиаминов, содержащихся во всех составляющих препарата b, достаточно для полимеризации или ковалентного связывания с непрореагировавшими функциональными группами циклического карбоната всех составляющих препарата a и образования целевых функциональных групп в композиции, содержащей полигидроксиуретаны и гликозаминогликаны, частично гидролизованные гликозаминогликаны или гликозамины, модифицированные или немодифицированные химически, и белки, частично гидролизованные белки или пептиды, модифицированные или немодифицированные химически. Композиция, получаемая из препаратов a и b.

Смесь препаратов a и b позволяет создавать гомогенную композицию, содержащую составляющие согласно настоящему изобретению, а именно "GAG смесь", "Смесь белков", в комбинации с полигидроксиуретанами или ковалентно связанную с полигидроксиуретанами.

Подходящие пропорции препаратов a и b в смесевой композиции зависят от целевого применения конечного продукта. Молярное отношение количества циклических карбонатов к количеству функциональных аминогрупп устанавливают в диапазоне от 0,02 до 50. В примере, относящемся к замещению или реконструкции ВКМ, эти пропорции рассчитывают так, чтобы количество функциональных циклических карбонатных групп, предоставляемых препаратом a или препаратом b, было равно или несколько превышало количество функциональных первичных и вторичных аминогрупп, предоставляемых препаратом b или препаратом a.

Функциональные циклические карбонатные группы препарата a или препарата b вступают с функциональными первичными и вторичными аминогруппами препарата b или a препарата в реакцию полимеризации или образования ковалентных связей, в результате которой получают различные полигидроксиуретаны. В зависимости от типа составляющих фаз a и b, их концентрации и методики смешивания, выбранной из известных методик, при смешивании этих двух препаратов температура может повышаться и достигать диапазона, составляющего от 15 до 150°C. Скорость протекания полимеризации или обра-

зования ковалентных связей, в результате которых получают различные полигидроксиуретаны, дополнительно можно регулировать с помощью катализаторов, неограниченные примеры которых включают соли или ковалентные соединения цинка, магния, висмута, алюминия или источники инфракрасного излучения.

Полученная композиция, включающая полигидроксиуретаны, гликозаминогликаны и белки, может быть применена, например, для получения микрогеля или микрочастиц для доставки активных фармацевтических веществ или для поддержания живых клеток или для обработки поверхностей, контактирующих с живыми тканями, или для обработки поверхностей с целью придания им специфического сродства к полисахаридам, белкам, частично гидролизованным белкам и пептидам, или для проведения химической модификации белков и частично гидролизованных белков и пептидов для придания им новых физических, биологических, фармакологических или медицинских свойств, или для реконструкции и замещения внеклеточного матрикса *in vitro* или *in vivo*.

Инновационная композиция, получаемая смешиванием препаратов а и b, может быть дополнена физиологическим раствором, клетками и факторами, регулируемыми их рост, минералами, в частности фосфатными солями, и любыми другими компонентами, обычно находящимися в среде ВКМ или отвечающими целям применения.

Например, получаемая инновационная композиция подходит для замещения и реконструкции внеклеточного матрикса соединительной, эпителиальной, нервной, мышечной, костной, хрящевой или кожной ткани животного или человека.

Получаемая инновационная композиция также подходит для нанесения покрытий на поверхности инородных материалов, временно или пожизненно имплантируемых в живые организмы.

#### **Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения**

Изобретение более подробно раскрыто в нижеследующих разделах с помощью соответствующих примеров, сопровождаемых графическими материалами, в которых

на фиг. 1 представлены вязкоэластичные реологические свойства композиции согласно первому примеру осуществления изобретения;

на фиг. 2 - вязкоэластичные реологические свойства композиции согласно второму примеру осуществления изобретения;

на фиг. 3 - вязкоэластичные реологические свойства композиции согласно третьему примеру осуществления изобретения.

#### **Описание примеров осуществления изобретения**

Пример 1.

Препарат а.

В реактор, снабженный механической мешалкой, помещали 20 частей триглицерола (Polyglycerol-3; Solvay), 50 частей диэтилкарбоната и 0,5 части тонко размолотого карбоната натрия.

Смесь нагревали при перемешивании в течение одного часа до тех пор, пока смесь визуально не становилась гомогенной. Затем ее медленно нагревали до 130°C в течение времени, составляющего от одного до двух часов, и затем выдерживали при этой температуре еще в течение периода, составляющего от одного до двух часов. Образующийся в процессе реакции этиловый спирт удаляли отгонкой. Спустя три часа смесь помещали в вакуум, составляющий приблизительно 15 мбар (что составляет 1500 Па), для удаления остатков этилового спирта и диэтилкарбоната. Смесь фильтровали в горячем виде для удаления катализатора и добавляли 1,5 частей натриевой соли хондроитин-4-сульфата (Sigma-Aldrich).

Препарат b.

1,5 части химически гидролизованного коллагена, тип II, полученного из тканей свиньи (Meitek Technology Qinqdao Co. Ltd.), добавляли к 20 частям 1,3-диамино-2-пропанола. Препарат b перемешивали при комнатной температуре до получения вязкой гомогенной жидкости.

Композиция, получаемая из препаратов а и b.

20 частей препарата а предварительно нагревали до приблизительно 50°C. Добавляли 6,5 частей препарата b и смешивали в традиционном оборудовании для смешивания с высоким усилием сдвига. Температура композиции быстро возрастала до 80°C. Композицию охлаждали приблизительно до 45°C, добавляли 4,8 части 5%-ного раствора гиалуроновой кислоты (Sigma-Aldrich) в фосфатно-солевом буфере и смешивали с помощью указанного выше оборудования.

Полученная композиция может быть использована в качестве заменителя внеклеточного матрикса, и ее вязкоэластичные реологические свойства представлены на фиг. 1.

Пример 2.

Препарат а.

В реактор, снабженный механической мешалкой, помещали 20 частей триглицерола (Polyglycerol-3; Solvay), 12 частей сорбита (Sigma-Aldrich), 100 частей диэтилкарбоната и 1 часть тонко размолотого карбоната натрия.

Смесь нагревали при перемешивании в течение одного часа до 115°C до тех пор, пока смесь визуально не становилась гомогенной. Затем ее медленно нагревали до 130°C в течение приблизительно од-

ного часа и затем выдерживали при этой температуре еще в течение периода, составляющего от одного до 2 ч. Образующийся в процессе реакции этиловый спирт удаляли отгонкой. Спустя три часа смесь помещали в вакуум, составляющий приблизительно 15 мбар, для удаления остатков этилового спирта и диэтилкарбоната.

Смесь фильтровали в горячем виде для удаления катализатора и добавляли 3,2 части натриевой соли хондроитин-4-сульфата (Sigma-Aldrich).

Препарат b.

В смеси, содержащей 7 частей 1,3-диамино-2-пропанола, 4,9 части 3,6-диоксооктаметиленамина (JEFFAMIN EDR 148, Huntsman) и 2,1 части гексаметилендиамина, растворяли 0,7 части нерастворимого коллагена типа I, полученного из ахиллова сухожилия быка (Sigma-Aldrich). Для получения препарата b в смесь, предварительно нагретую до приблизительно 40°C, помещали 2,1 части химически гидролизованного коллагена типа II, полученного из тканей свиньи (Meitek Technology Qinqdao Co. Ltd.).

Композиция, получаемая из препаратов a и b.

20 частей препарата a предварительно нагревали до приблизительно 50°C. Добавляли 15,8 частей препарата b и смешивали в традиционном оборудовании для смешивания с высоким усилием сдвига. Температура композиции быстро возрастала до значений, превышающих 80°C.

Полученная композиция подходит, например, для нанесения покрытия на поверхности инородных материалов, временно или пожизненно имплантируемых в живые организмы. Вязкоэластичные реологические свойства композиции 2 представлены на фиг. 2.

Пример 3.

Препарат a.

В реактор, снабженный механической мешалкой, помещали 23,3 части триглицерола (Polyglycerol-3; Solvay), 6,7 частей диглицерина (TCI Europe N.V), 75 частей диэтилкарбоната и 1,5 часть тонко размолотого карбоната натрия. Смесь нагревали при перемешивании в течение одного часа до 90°C до тех пор, пока смесь визуально не становилась гомогенной. Затем ее медленно нагревали до 130°C в течение приблизительно одного часа и затем выдерживали при этой температуре еще в течение периода, составляющего от одного до двух часов. Образующийся в процессе реакции этиловый спирт удаляли отгонкой. Спустя три часа смесь помещали в вакуум, составляющий приблизительно 15 мбар, для удаления остатков этилового спирта и диэтилкарбоната. Смесь фильтровали в горячем виде для удаления катализатора и добавляли 2 части натриевой соли хондроитин-4-сульфата (Sigma-Aldrich).

Препарат b.

1 часть нерастворимого коллагена типа I, полученного из ахиллова сухожилия быка (Sigma-Aldrich), растворяли в 10 частях 1,3-диамино-2-пропанола. Для получения препарата b в полученную смесь, предварительно нагретую до приблизительно 50°C, помещали 1 часть химически гидролизованного коллагена, тип II, полученного из тканей свиньи (Meitek Technology Qinqdao Co. Ltd.).

Композиция, получаемая из препаратов a и b.

15 частей препарата a предварительно нагревали до приблизительно 50°C. Добавляли 7,25 частей препарата b и смешивали в традиционном оборудовании для смешивания с высоким усилием сдвига. Температура композиции быстро возрастала до значений, превышающих 80°C. Полученная композиция может быть применена, например, в качестве заменителя внеклеточного матрикса или для нанесения покрытия на поверхности инородных материалов, имплантируемых в живые организмы временно или пожизненно. Вязкоэластичные реологические свойства композиции 3 представлены на фиг. 3.

Пример 4.

Препарат a.

В водный раствор NaOH концентраций 0,25M помещали 5 мас.%, гиалуроновой кислоты (Sigma-Aldrich) и продукт деацетилировали при комнатной температуре в течение 12 ч. Дикарбонат диглицерина, полученный, как указано выше, помещали в 50%-ный раствор ацетона и смешивали. Добавляемое количество рассчитывали, исходя из количества свободной карбоновой кислоты, т.е. свободной гиалуроновой кислоты. Смесь выдерживали в течение времени, составляющего от 1 до 12 ч, при температуре, составляющей от 20 до 75°C, реакционную среду нейтрализовали 1M водной HCl; в процессе нейтрализации наблюдали выделение CO<sub>2</sub>. К композиции добавляли такое же, как указано выше, количество дикарбоната диглицерина в 50% ацетоне при температуре, составляющей от 20 до 75°C. Смесь перемешивали в течение времени, составляющего от 10 мин до 10 ч, и концентрировали в вакууме, получая химически модифицированный гликозаминогликан.

Препарат b.

В этилацетат помещали 5 мас.%. 1,4-бис(3-аминопропил)пиперазина и 6 мас.%, циклического дикарбоната диглицерина. Реакционную смесь нагревали до температуры, составляющей от 50°C до температуры кипения, в течение времени, составляющего от 2 до 15 ч, получая соответствующий полигидроксиуретан, концевые группы которого представляют собой функциональные аминокгруппы. Этилацетат отгоняли в вакууме и полигидроксиуретан повторно растворяли в приемлемом растворителе, таком как, например, без ограничений, вода. К преполимеру полигидроксиуретана добавляли 1% химически гидролизованного коллагена типа II, полученного из тканей свиньи (Meitek Technology Qinqdao Co. Ltd.).

Смесь а и b.

Препараты а и b смешивали в таких пропорциях, чтобы количество функциональных циклических карбонатных групп было равным или несколько превышало количество функциональных аминогрупп. Полученная композиция представляла собой твердый прозрачный продукт.

Пример 5.

Препарат b.

К 400 мл 1,4-бис(3-аминопропил)пиперазина добавляли 10 г химически гидролизованного коллагена типа II, полученного из тканей свиньи (Meitek Technology Qinqdao Co. Ltd.). Смесь перемешивали при комнатной температуре до растворения. Затем небольшими порциями добавляли 17,5 г N-гидроксисукцинимиды и 26,75 г карбодиимида (EDC) и перемешивали в течение 12 ч при комнатной температуре для амидирования белка.

Амидированный белок осаждали из реакционной смеси добавлением двукратного по отношению к объему реакционной смеси объема трет-бутилметилового эфира (TBME).

90 мл влажного осадка, полученного из фазы TBME, нейтрализовали шестикратным относительно его объема объемом смеси безводного EtOH и 4% уксусной кислоты. Повторно растворенный амидированный коллаген, находящийся в нейтрализованном органическом растворе, осаждали добавлением 2,5-кратного относительно его объема объемом этилацетата, центрифугировали и сушили в вакууме.

Смесь препарата а, полученного в примере 4, и препарата b.

Препарат а, полученный в примере 4, и препарат b смешивали в таких пропорциях, чтобы количество функциональных циклических карбонатных групп было равным или несколько превышало количество функциональных аминогрупп. Полученная композиция представляла собой вязкоэластичный прозрачный продукт.

Пример 6.

Препарат b.

Соединяли 10 частей препарата b, полученного в примере 5 ("Смесь белков"), который представлял собой модифицированный белок, 5 частей препарата b, полученного в примере 4, который представлял собой полигидроксиуретановый преполимер, оканчивающийся функциональными аминогруппами, и коллаген с 35 частями препарата b, полученного в примере 3. Полученная предварительная смесь представляла собой композицию, содержащую функциональные аминогруппы.

Препарат а.

К 20 частям препарата а, полученного в примере 4 ("GAG смесь"), который представлял собой модифицированный гликозаминогликан, добавляли 15 частей бис-(циклического карбоната) триглицерола, полученного как указано в примере 1, и растворяли при температуре, составляющей от 45 до 65°C. Получали композицию, содержащую функциональные циклические карбонатные группы.

Смесь препаратов а и b.

Полученные две предварительные смеси смешивали, получая композицию, содержащую полигидроксиуретан, модифицированные гликозаминогликаны, белки и модифицированные белки, которая представляла собой эластичную полутвердую белую пену.

Пример 7.

Препарат а.

Препарат а, полученный в примере 4.

Препарат b.

В смеси из 7 частей 1,3-диамино-2-пропанола, 4,9 частей 3,6-диоксаоктаметиленамина (JEF-FAMIN EDR 148, Huntsman) и 2,1 части гексаметилендиамина растворяли 0,7 части нерастворимого коллагена типа I, полученного из ахиллова сухожилия быка (Sigma-Aldrich). Для получения препарата b в смесь, предварительно нагретую до приблизительно 40°C, помещали 2,1 части химически гидролизованного коллагена типа II, полученного из тканей свиньи (Meitek Technology Qinqdao Co. Ltd.).

К 10 частям препарата b коллагена, содержащегося в мономере полигидроксиуретана, добавляли 5 частей преполимера полигидроксиуретана, концевые группы которого представляли собой функциональные аминогруппы, который был получен так же, как препарат b примера 4.

Получение смеси препаратов а и b.

К полученным 15 частям препарата b, который содержит функциональные аминогруппы, добавляли 20 частей препарата а, полученного в примере 4, и все смешивали, получая при 37°C прозрачный гидрогель, содержащий полигидроксиуретаны, химически модифицированные гликозаминогликаны и белки.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комбинация для применения в биологии, фармакологии или медицине, включающая первую, вторую и третью составляющие, в которой

первая составляющая представляет собой гликозаминогликан, гидролизованный гликозаминогликан, гликозамин, химически модифицированный или немодифицированный, или смесь различных гликозаминогликанов, гидролизованных гликозаминогликанов, гликозаминов, химически модифицированных



или немодифицированных;

вторая составляющая представляет собой белок, пептид или смесь различных белков или пептидов;  
третья составляющая представляет собой полигидроксиуретан (PHU), который получают образованием ковалентной связи между молекулами бис- или полициклических карбонатов (CC) и ди- или полиаминов (РА),

причем третья составляющая ковалентно соединяет первую составляющую со второй составляющей.

2. Комбинация по п.1, в которой белок представляет собой коллаген, эластин, кератин, фибронектин, актин, миозин, ламинин, пептид или смесь перечисленных белков или пептидов, гидролизованных, химически модифицированных, фибриллированных или негидролизованных, химически немодифицированных, нефибриллированных.

3. Комбинация по п.1 или 2, полученная полимеризацией или образованием ковалентной связи между составляющими двух препаратов а и б, в которой

препарат а содержит по меньшей мере 1% гликозаминогликанов, гидролизованных гликозаминогликанов, гликозаминов или химически модифицированных гликозаминогликанов, гидролизованных гликозаминогликанов, гликозаминов, соединенных с циклическими поликарбонатами или преполимерами полигидроксиуретанов, концевые группы которых представляют собой функциональные группы циклических карбонатов (PRE-CC), или смесь перечисленных различных составляющих, причем их смесь содержит приемлемые растворители и необязательно CC-мономеры или PRE-CC или смесь PRE-CC и CC, что обеспечивает наличие в препарате а функциональных групп циклических карбонатов, и

препарат б содержит по меньшей мере 1% коллагенов, эластинов, кератинов, фибронектинов, актинов, миозинов, ламининов, пептидов, которые могут быть гидролизованными, фибриллированными или негидролизованными, нефибриллированными, или химически модифицированных коллагенов, эластинов, кератинов, фибронектинов, актинов, миозинов, ламининов, пептидов, которые могут быть гидролизованными, фибриллированными или негидролизованными, нефибриллированными, соединенных с ди- или полиамином (РА) или преполимером полигидроксиуретана, концевые группы которого представляют собой функциональные аминогруппы (PRE-РА), или смесь перечисленных различных составляющих, причем их смесь содержит приемлемые растворители и необязательно РА-мономеры или PRE-РА или смесь PRE-РА и РА, что обеспечивает наличие в препарате б функциональных аминогрупп, поступающих с полиаминами.

4. Комбинация по п.1 или 2, полученная полимеризацией или образованием ковалентной связи между составляющими двух препаратов а и б, в которой

препарат а содержит по меньшей мере 1% гликозаминогликанов, гидролизованных гликозаминогликанов, гликозаминов или химически модифицированных гликозаминогликанов, гидролизованных гликозаминогликанов, гликозаминов, содержащих CC или PRE-CC, или смесь перечисленных различных составляющих и химически модифицированных коллагенов, эластинов, кератинов, фибронектинов, актинов, миозинов, ламининов, пептидов, или смесь перечисленных составляющих, которые могут быть гидролизованными, фибриллированными или негидролизованными, нефибриллированными, концевые группы которых представляют собой CC-функциональные группы, и смесь содержит приемлемые растворители и необязательно CC-мономеры или PRE-CC или смесь PRE-CC и CC, что обеспечивает наличие в препарате а функциональных групп CC; и

препарат б содержит РА-мономеры или PRE-РА или смесь PRE-РА и РА, необязательно в приемлемых растворителях, что обеспечивает наличие в препарате б функциональных аминогрупп, поступающих с полиаминами.

5. Комбинация по п.1 или 2, полученная полимеризацией или образованием ковалентной связи между составляющими двух препаратов а и б, в которой

препарат а содержит CC-мономеры или PRE-CC или смесь PRE-CC и CC, необязательно в приемлемых растворителях, что обеспечивает наличие в препарате б функциональных групп CC; и

препарат б содержит химически модифицированный гликозаминогликан, гидролизованные гликозаминогликаны, гликозамины или смесь перечисленных составляющих, концевые группы которых представляют собой функциональные аминогруппы, и по меньшей мере 1% коллагенов, эластинов, кератинов, фибронектинов, актинов, миозинов, ламининов, пептидов, которые могут быть гидролизованными, фибриллированными или негидролизованными, нефибриллированными, или химически модифицированных коллагенов, эластинов, кератинов, фибронектинов, актинов, миозинов, ламининов, пептидов, которые могут быть гидролизованными, фибриллированными или негидролизованными, нефибриллированными, содержащих РА или PRE-РА или смесь перечисленных различных составляющих, причем их смесь содержит приемлемые растворители и необязательно РА-мономеры или PRE-РА или смесь PRE-РА и РА, что обеспечивает наличие в препарате б функциональных аминогрупп, поступающих с РА.

6. Комбинация по любому из пп.1-5, в которой CC-мономеры представляют собой циклические поликарбонаты, циклы которых содержат от 5 до 8 атомов, полученные из полигидроксилированных молекул, содержащих по меньшей мере три первичные или вторичные неароматические гидроксильные функциональные группы, и РА-мономеры представляют собой первичные или вторичные РА.

7. Комбинация по п.5, в которой PRE-CC представляет собой PHU со степенью полимеризации, со-

ставляющей от 1 до 200000, предпочтительно от 1 до 20000, содержащий СС- и РА-мономер, концевые группы которого представлены СС-мономерами, и PRE-РА представляет собой PHU со степенью полимеризации, составляющей от 1 до 200000, предпочтительно от 1 до 20000, содержащий СС- и РА-мономер, концевые группы которого представлены РА-мономерами.

8. Комбинация по пп.1, 3 или 4, в которой химическая модификация гликозаминогликанов, гидролизованных гликозаминогликанов, гликозаминов гликозаминогликанов или смеси различных гликозаминогликанов, гидролизованных гликозаминогликанов, гликозаминов гликозаминогликанов представляет собой этерификацию или деацетилирование с последующей этерификацией и образованием карбамата, или деацетилирование с последующим образованием карбамата под действием СС или PRE-СС.

9. Комбинация по п.1 или 5, в которой первая составляющая химически модифицирована посредством амидирования мономером РА или PRE-РА или их комбинацией.

10. Комбинация по любому из пп.1, 3, 4 или 8, в которой первая составляющая химически модифицирована и введена в реакцию образования карбамата под действием мономера РА или PRE-РА.

11. Комбинация по любому из пп.1, 3-5 или 8-10, которая дополнительно введена в реакцию образования карбамата последовательно с СС и РА с получением PHU, оканчивающегося СС или РА, химически привитого на гликозаминогликаны, гидролизованные гликозаминогликаны, гликозамины гликозаминогликанов или смесь различных гликозаминогликанов, гидролизованных гликозаминогликанов, гликозаминов гликозаминогликанов.

12. Комбинация по любому из пп.1, 3-8 или 10, 11, в которой СС мономеры представляют собой циклические поликарбонаты эритрита, ксилита, арабита, рибита, сорбита, дульцита, маннита, мальтита, изомальтита, лактита или простых полиэфирполиолов и смеси перечисленных соединений.

13. Комбинация по любому из пп.1, 3-8 или 10, 11, в которой СС мономеры представляют собой циклические поликарбонаты 1,2-дигидроксиэтилового или 2,3-дигидроксипропилового простого эфира, сложного эфира, кетона, амида, фосфата, сульфата, сульфида, дисульфида, алканов, циклоалканов, алкенов, циклоалкенов, арилов или гетероциклов, содержащих один или более атомов кислорода, или ароматических гетероциклов, содержащих один или более атомов азота или серы.

14. Комбинация по любому из пп.1, 3-8 или 10, 11, в которой циклические поликарбонатные СС-мономеры представляют собой смесь циклических поликарбонатов, определенных в пп.12 и 13.

15. Комбинация по любому из предшествующих пунктов, в которой первая составляющая (А) представляет собой гликозаминогликан, гидролизованный гликозаминогликан, гликозамин гликозаминогликана, химически модифицированный или немодифицированный, или смесь различных гликозаминогликанов, гидролизованных гликозаминогликанов, гликозаминов гликозаминогликанов, химически модифицированных или немодифицированных, выбранных из

- хондроитинсульфатов;
- гиалуроновой кислоты;
- гепарансульфатов;
- дерматансульфатов;
- кератансульфатов;
- аггреканов.

16. Комбинация по любому из пп.2-5, в которой химическая модификация коллагенов, эластинов, кератинов, фибронектинов, актинов, миозинов, ламининов, пептидов или смеси этих белков или пептидов, которые могут быть гидролизованными, фибриллированными или негидролизованными, нефибриллированными, представляет собой амидирование под действием РА или PRE-РА или смеси РА и PRE-РА или последовательное амидирование под действием РА и PRE-РА.

17. Комбинация по любому из пп.2-5 или 16, в которой химически модифицированные коллагены, эластины, кератины, фибронектины, актины, миозины, ламинины, пептиды или смесь этих белков или пептидов, которые могут быть гидролизованными, фибриллированными или негидролизованными, нефибриллированными, вводят в реакцию образования карбамата под действием СС-мономера или преполимера PRE-СС.

18. Комбинация по любому из пп.2-5, 16 или 17, которая дополнительно введена в реакцию образования карбамата последовательно с РА и СС с получением PHU, оканчивающегося РА или СС, химически привитого на коллагены, эластины, кератины, фибронектины, актины, миозины, ламинины, пептиды или смесь этих белков или пептидов, которые могут быть гидролизованными, фибриллированными или негидролизованными, нефибриллированными.

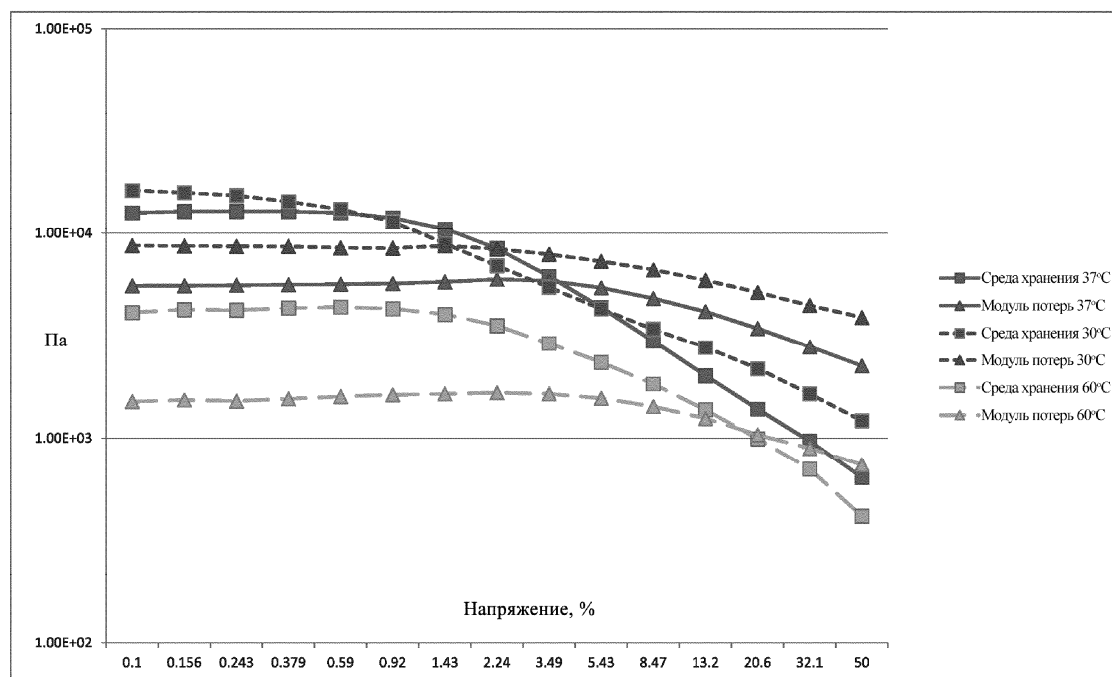
19. Комбинация по любому из пп.1-11 или 16-18, в которой первичные и вторичные РА-мономеры представляют собой первичные или вторичные полиамины простого эфира, сложного эфира, кетона, амида, фосфата, сульфата, сульфида, дисульфида, алканов, циклоалканов, алкенов, циклоалкенов, арилов, замещенных или не замещенных функциональными гидроксильными группами; или первичные или вторичные полиамины и первичные или вторичные полиалкиламины гетероциклов, содержащих один или более следующих атомов: кислород, азот или серу, замещенных или не замещенных функциональными гидроксильными группами; или простые полиэфирамины, как таковые или смешанные с этиленгликолем и пропиленгликолем; или смеси перечисленных соединений.

20. Комбинация по любому из пп.1 или 3-5, в которой отношение количества неполимеризованных или не связанных ковалентной связью функциональных групп циклического карбоната, поступающих с СС-мономерами, PRE-СС и химически модифицированными первой и второй составляющими, к количеству неполимеризованных или не связанных ковалентной связью функциональных первичных и вторичных аминогрупп, поступающих с РА-мономерами, PRE-РА и химически модифицированными первой и второй составляющими, составляет от 50 до 0,02.

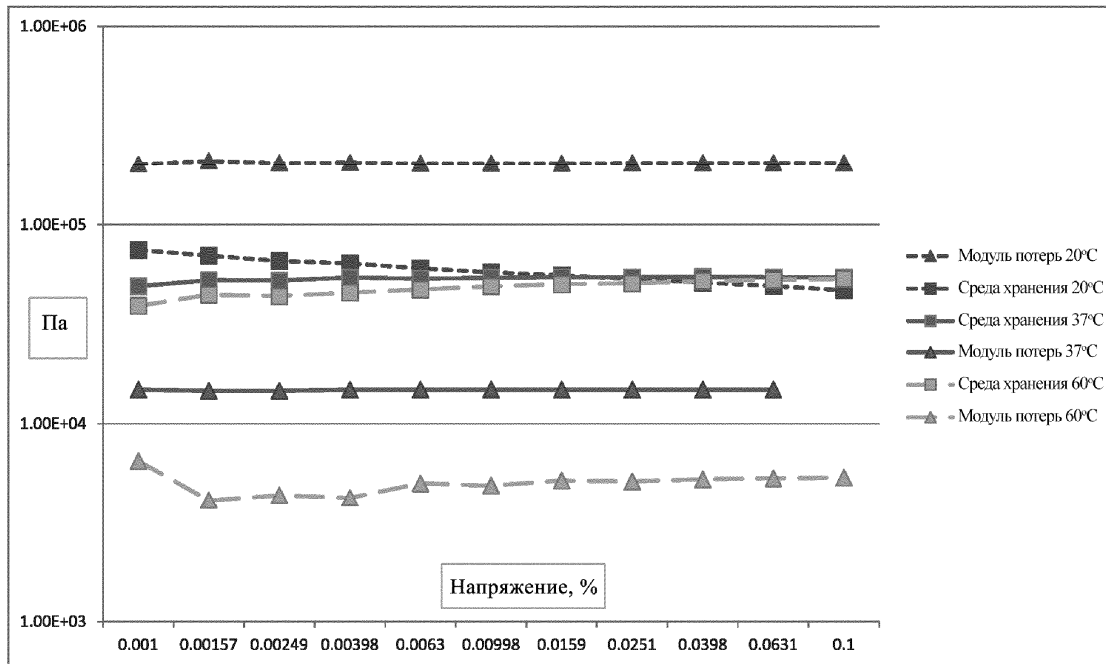
21. Комбинация по любому из пп.1-20, в которой для регулирования протекания полимеризации или образования ковалентных связей между циклическими карбонатами и функциональными первичными или вторичными аминогруппами применяется катализатор или смесь катализаторов, выбранных из ионной или ковалентной формы Li, Na, K, Mg, Zn, В и Al, или источник инфракрасного излучения.

22. Комбинация по любому из пп.1 или 3-14 или 16-21, предназначенная для замещения или реконструкции внеклеточного матрикса соединительной, эпителиальной, нервной, мышечной, костной, хрящевой или кожной ткани животного или человека, где отношение количества неполимеризованных или не связанных ковалентной связью функциональных групп циклического карбоната, поступающих с СС-мономерами, PRE-СС и химически модифицированными первой и второй составляющими, к количеству неполимеризованных или не связанных ковалентной связью функциональных первичных и вторичных аминогрупп, поступающих с РА-мономерами, PRE-РА и химически модифицированными первой и второй составляющими, составляет от 2 до 0,5.

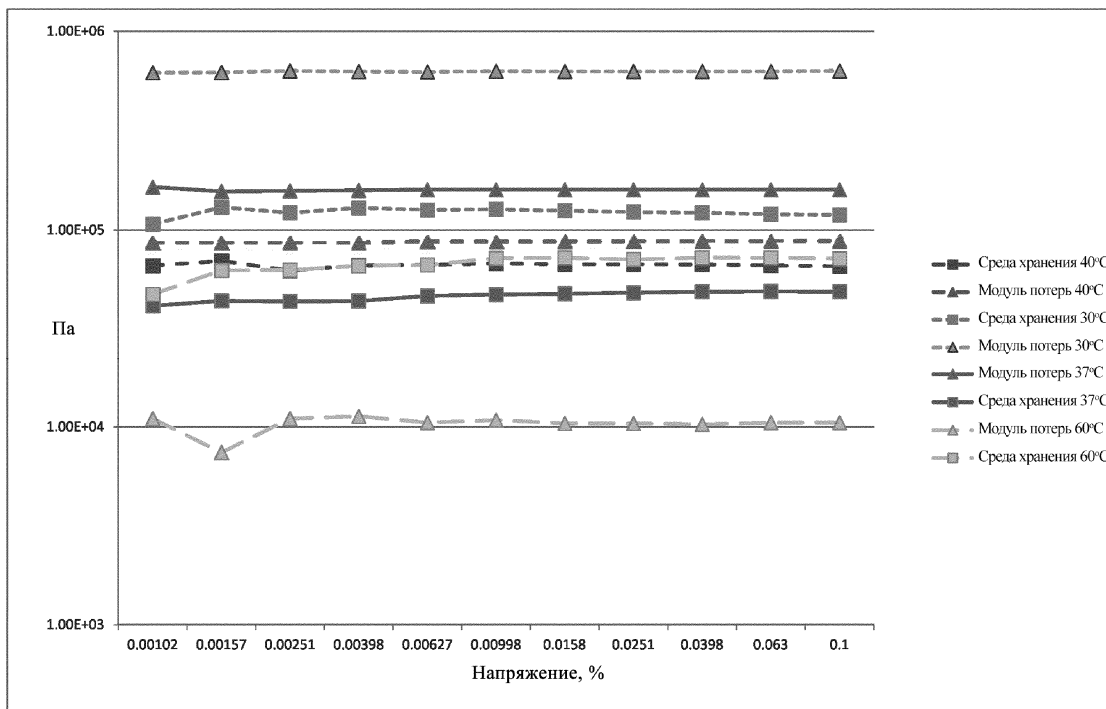
23. Комбинация по любому из пп.1-21, предназначенная для замещения или реконструкции внеклеточного матрикса соединительной, эпителиальной, нервной, мышечной, костной, хрящевой или кожной ткани животного или человека, нанесение покрытия на поверхности инородных материалов, имплантируемых в живые организмы временно или пожизненно, и применения в качестве носителя, модификатора или защиты живых клеток, биологических и фармакологических материалов и веществ.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

