

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090524** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.05.28

(51) Int. Cl. *A61K 47/61* (2017.01)
A61K 47/54 (2017.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.10.03

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ ГИАЛУРОНОВУЮ КИСЛОТУ И КАРНОЗИН, И ИХ СООТВЕТСТВУЮЩЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 102017000110784

(72) Изобретатель:

(32) 2017.10.03

Скьявинато Антонелла, Греко

(33) IT

Валентина, Мессина Лучиано,

(86) PCT/IB2018/057697

Ваккаро Сузанна, Риццарелли

(87) WO 2019/069258 2019.04.11

Энрико, Шюто Себастьяно (IT)

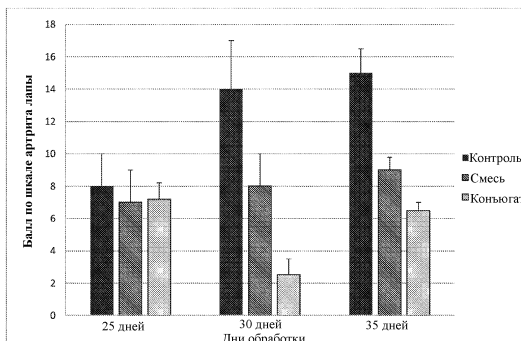
(71) Заявитель:

(74) Представитель:

**ФИДИЯ ФАРМАЧЕУТИЧИ С.П.А.
(IT)**

Носырева Е.Л. (RU)

(57) Описаны фармацевтические композиции, содержащие гиалуроновую кислоту и карнозин, для применения при лечении и предупреждении остеоартрита (ОА) и для лечения ревматоидного артрита (РА).



202090524

A1

A1

202090524

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ ГИАЛУРОНОВУЮ КИСЛОТУ И КАРНОЗИН, И ИХ СООТВЕТСТВУЮЩЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим гиалуроновую кислоту и карнозин, и их соответствующему применению.

Область техники изобретения

Остеоартрит (ОА) представляет собой тяжелую патологию с утратой трудоспособности, характеризующуюся прогрессирующей эрозией суставных хрящей из-за деградации матрикса и утраты основных хрящевых клеточных компонентов – хондроцитов.

Этиология все еще частично неизвестна, однако недавние экспериментальные результаты показали, что механический дисбаланс, который может вовлекать сустав при всей его сложности, также может быть начальной причиной возникновения вышеуказанной патологии.

Чрезмерная и/или неправильная нагрузка на суставы может фактически вызвать ответ хондроцитов, который выражается в синтезе тех ферментов, которые отвечают за деградацию самого хряща. Эти протеазные ферменты называются металлопротеазой (ММР) и синтезируются хондроцитами при стимуляции провоспалительными цитокинами, такими как IL-1, IL-6 и TNF- α , которые продуцируются и высвобождаются в суставной полости, прежде всего, из-за начала воспалительной патологии. Эти цитокины также стимулируют синтез высоких уровней оксида азота (ответственного за гибель хондроцитов в результате апоптоза) и, кроме того, ингибируют синтез протеогликанов (структурных компонентов матрикса) (Dozin B. et al., *Matrix Biology*, 2002, 21:449-459).

Высокие уровни провоспалительных молекул также были обнаружены в синовиальной жидкости пациентов, страдающих ревматоидным артритом (РА) и псориатическим артритом (Arend W.P. et al., *Arthritis Rheum*, 1995, 38:151-160).

Ревматоидный артрит (РА) представляет собой хронический анкилозирующий и

прогрессирующий воспалительный полиартрит с аутоиммунным патогенезом и неизвестной этиологией, главным образом связанный с синовиальными суставами, в которых он вызывает деформацию и боль до утраты функционирования суставов.

Прогрессирование РА фактически обуславливает сильный воспалительный ответ синовиальной оболочки с последующим набуханием ее клеток, избытком синовиальной жидкости и развитием фиброзной ткани. Более конкретно, синовиальная оболочка представляет собой мембрану мезенхимального происхождения, образованную синовиоцитами (макрофагального и фибриноидального типов), которая при заболевании подвергается гиперплазии и гипертрофии, а затем увеличивается в толщине (два/три слоя, характерные для непатологического состояния, становятся семью или более), образуя синовиальный паннус, который начинает разрушать кость, не покрытую хрящом, от периферической части.

В то же время полиморфноядерные клетки с Т-, В-лимфоцитами и плазматическими клетками перемещаются в синовиальную жидкость, усиливая воспаление пораженного сустава, при этом суставной хрящ, пораженный РА (с соответствующей подлежащей костью), затем подвергается истончению с прогрессирующим разрушением.

Эта патология обычно проявляется на системном уровне, вовлекая также другие органы и системы органов. Типичными являются ревматоидные узелки, которые могут образовываться на легочном уровне с последующим легочным фиброзом, плевритом и плевроперикардитом, на сердечном уровне может происходить ускорение развития коронарного атеросклероза, тогда как на глазном уровне могут наблюдаться ксерофтальмия, увеит и склерит. Амилоидоз и остеопороз также являются осложнениями РА (Cecil, TEXTBOOK of MEDICINE, 1988).

Ревматоидный артрит поражает от 0,5 до 1% взрослых в мире и обычно начинается в возрасте от 40 до 50 лет.

Лечение РА является сложным, оно зависит от его тяжести и типа вовлеченных органов и включает применение лекарственных средств, подходящих для борьбы с воспалением, для предупреждения и/или лечения повреждения сустава (в дополнение к другим органам) с целью замедления возникающей в результате нетрудоспособности. Обезболивающие и противовоспалительные лекарственные средства, включая стероиды и NSAID, подавляют симптомы, но не останавливают прогрессирование

состояния, однако противоревматические лекарственные средства, модифицирующие заболевание (DMARD), могут замедлять его развитие.

При более агрессивных формах обычно применяют метотрексат, антиметаболитный ингибитор синтеза фолиевой кислоты, который при низких дозах действует как иммунодепрессант, однако недавно были представлены биологические лекарственные средства, которые действуют более избирательным и специфичным путем (Canete JD et al. *Expert Opinion Biol Ther*, 2017, 17:1-15), такие как этанерцепт, слитый белок, который действует посредством противодействия провоспалительному цитокину TNF.

TNF является частью данной группы цитокинов, ответственных за острую фазу системного воспаления; он вовлечен в многочисленные процессы, такие как пролиферация клеток, дифференцировка и апоптоз, канцерогенез и репликация вируса. Главным образом, он продуцируется макрофагами; его синтез может стимулироваться бактериальными эндотоксинами и подавляться стероидами.

Воздействуя на многочисленные органы и системы, вместе с другими цитокинами, он способствует воспалительному ответу, который в свою очередь вызывает многие патологии (включая аутоиммунные заболевания), такие как РА и ОА, болезнь Крона, псориаз и астму; этот цитокин также способен активировать остеокласты, а следовательно индуцировать резорбцию кости, он способен стимулировать продуцирование макрофагами молекул с окислительным действием, он вовлечен в определенные патологии сердечно-сосудистой системы, связанные с образованием венозных тромбов, патогенезом атеросклероза и васкулита (Alam J., *Biomed Pharmacother*, 2017, 92:615-633), и, наконец, он способен повышать устойчивость тканей к инсулину, способствуя возникновению диабета II типа (Nicolau J et al., *Joint Bone Spine*, 2017, 84 (4):411-416).

Для лечения ОА и РА существуют различные типы лекарственных средств, которые эффективны в замедлении прогрессирования вышеуказанных патологий или в лечении связанных симптомов, однако они могут иметь важные побочные эффекты, часто являться токсичными, как в случае синтетических молекул (следовательно, не являющихся природными), что обусловлено как схемой фармакологического лечения, которая должна поддерживаться в течение очень длительных периодов времени, так и способом введения, как правило, парентеральным, но прежде всего пероральным, а

следовательно вовлекающим весь организм, даже если во многих случаях лечению подлежит только воспаленный сустав.

Таким образом, цель настоящего изобретения состоит в том, чтобы идентифицировать фармацевтические композиции, содержащие конъюгат гиалуроновая кислота (НА)/карнозин, особенно эффективный для применения при лечении и предупреждении ОА и при лечении РА (вместе со всеми возникающими в результате заболеваниями, вызванными непосредственно РА или опосредованно связанными с/обусловленными РА), предпочтительно с помощью перорального введения (прежде всего, в случае если заболевание характеризуется выраженными системными проявлениями) и/или внутрисуставного введения в сустав на ранней стадии заболевания или в фазе локализованной интенсивности в тот же сустав.

Карнозин представляет собой дипептид, полученный в результате реакции конденсации между β -аланином и L-гистидином в организме. Он обнаружен в больших количествах в мышцах и в головном мозге; научная литература демонстрирует всеобщее признание его антиоксидантной, антирадикальной и противовоспалительной активности (Budzen S. et al., *Adv Clin Exp Med*, 2013, 22 (5): 739-44).

Доклинические исследования продемонстрировали его антирадикальную способность при предупреждении и лечении форм катаракты (Babizhayev M. et al., *Biochim, Biophys, Acta*, 1989, 1004(3):363-371), тогда как его противовоспалительная активность была продемонстрирована в некоторых тканях пищеварительной системы, в глазах и в коже (US4508728, WO01/52808); также была продемонстрирована его специфическая активность в качестве акцептора в отношении гидроксильного радикала (La Mendola D. et al., *Helv. Chim. Acta*, 2002, 85 (6):1633-1643).

Однако пептидная природа карнозина накладывает некоторые ограничения на его применение, ограничения, связанные с его термолабильной природой и его высокой способностью к разложению *in vivo*, обусловленной специфическими пептидазами. Для того чтобы преодолеть это ограничение, было предложено применение N-ацетилкарнозина (WO95/10294), который разлагается гораздо медленнее, чем свободный вариант (Babizhayev MA et al., *Clin. Chim. Acta*, 1996, 254 (1):1-21), и в то же время химическое производное карнозина также было синтезировано с циклодекстринами (EP1176154), природными циклическими олигосахаридами,

применяемыми в медицине в качестве носителей лекарственных средств. В этом случае циклодекстрин стабилизирует дипептид, защищая его от гидролитической активности карнозиназы (Schaschke N. et al., JACS, 1998, 120 (28):7030-7038), тем самым давая возможность вышеуказанной молекуле проявлять свою биологическую активность. Исходя из того же обоснования, конъюгат карнозина с трегалозой был впоследствии запатентован как система с антиоксидантной, антигликирующей и антиагрегационной активностью (EP1860116).

Также известно производное НА, которое получают конъюгированием карнозина с указанным полисахаридом с помощью амидной связи, образованной карбоксилем НА и аминогруппой дипептида (WO2016016847).

Однако применение при лечении РА и ОА для этого производного не предусматривалось; кроме того, согласно вышеуказанному источнику, это производное может быть дериватизированным только до 25% (соотношение моль/моль между НА и карнозином).

В настоящем изобретении описана композиция, содержащая амидное производное НА с карнозином при степени дериватизации, превышающей 25%, следовательно, синтез данного конъюгата не рассматривался специалистами в данной области как осуществимый исходя из сведений, известных из уровня техники.

НА представляет собой гетерополисахарид, состоящий из чередующихся остатков D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина. Это полимер с линейной цепью с молекулярной массой, находящейся в диапазоне от 50000 до 13×10^6 Да, в зависимости от источника, из которого он получен, и применяемых способов получения. Она присутствует в природе в перицеллюлярной жидкости, в основном веществе соединительной ткани позвоночных организмов, в синовиальной жидкости суставов, в стекловидном теле и в пуповине. Следовательно, НА играет важную роль в биологическом организме, как в качестве механической поддержки клеток многих тканей, таких как кожа, сухожилия, мышцы и хрящ, так и в качестве активного средства, способного модулировать (посредством рецептора CD44) многие процессы, связанные с физиологией и биологией клеток, такие как, например, пролиферация, миграция, дифференцировка клеток и ангиогенез; также известна его роль в поддержании увлажнения тканей и смазке суставов. НА по сути является

полисахаридом, который обладает особыми вязкоупругими свойствами, синтезируется и секретируется в полость сустава главным образом синовиоцитами (Asari A. et al., Arch. Histol. Cytol., 1995, 58 (1):65-76), и он является одним из основных компонентов синовиальной жидкости. Во время медленных движений сустава НА действует как вязкое смазочное средство, тогда как при быстрых движениях она за счет упругих свойств предупреждает любые возможные травмы или микротравмы, которые могут повредить сустав.

Обмен НА в непатологической синовиальной жидкости, как правило, является очень быстрым, тогда как при ОА было обнаружено снижение концентрации со снижением средней молекулярной массы (MW), но, прежде всего, резкое снижение ее обменного потока (Balazs EA, et al., J Rheumatol, Suppl., 1993, 12: 75-82).

По этим причинам Balazs впервые предложил возможность модифицирования процесса развития остеоартрита за счет введения экзогенной НА (особенно с высокой MW) непосредственно в полость сустава, и благодаря этой лечебной терапии появилась возможность продемонстрировать защитный эффект НА против дегенерации пораженного хряща сустава, поврежденного воспалительными заболеваниями или травмой.

Подробное описание

Объект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей конъюгат гиалуроновая кислота (НА)/карнозин с прямой амидной связью между карбоксильной группой НА и аминогруппой карнозина, для применения при предупреждении и лечении ОА, при лечении РА и патологий, вызванных непосредственно РА или опосредованно связанных с/обусловленных РА, в частности для применения при лечении заболеваний, вызванных непосредственно РА, выбранных из группы, включающей фиброз легких, плеврит и плевроперикардит, ксерофтальмию, увеит и склерит, или опосредованно связанных с/обусловленных РА, выбранных из группы, включающей преждевременное патологическое старение, сердечный приступ, инсульт, атеросклероз и коронарный атеросклероз, артериальную гипертензию, деменцию, диабет, остеопороз и амилоидоз, рак, протеинурию и нефрит, поражения желудка, формы катаракты, псориатический артрит, гастрит, васкулит, диабет I типа и аутоиммунный тиреоидит. Такое применение приведет к несомненной терапевтической

пользе в качестве прямого следствия лечения РА, от которого происходят эти заболевания.

Фармацевтические композиции для применения в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно содержат конъюгат НА/карнозин при степени дериватизации (амидирования) карбоксильной группы НА (DS), превышающей 25% (от 25% до 100%), предпочтительно в диапазоне от 30% до 100%, более предпочтительно в диапазоне от 30% до 60% и еще более предпочтительно в диапазоне от $35 \pm 3\%$ (т. е. от 32% до 38%) до $45 \pm 5\%$ (т. е. от 40% до 50%).

Указанное амидное производное НА с карнозином (т. е. конъюгат НА/карнозин) получают посредством ковалентного объединения дипептида (т. е. карнозина) с гиалуроновой кислотой (НА) путем образования прямой амидной связи (без помощи постоянных спейсеров) между карбоксилем НА и аминогруппой карнозина.

Как продемонстрировано ниже, автор настоящего изобретения фактически неожиданно обнаружил, что конъюгат, являющийся объектом настоящего изобретения, характеризуется неожиданными синергетическими эффектами между карнозином и НА в терапевтическом лечении РА и ОА, что обеспечивает достижение значительного клинического/гистологического улучшения при вышеуказанных патологиях со значительным снижением уровней в плазме крови, являющихся показателями как воспаления, так и окисления липидов.

Степень дериватизации конъюгата, являющегося объектом настоящего изобретения, измерена посредством способа, описанного в нижеследующем примере 4.

НА, используемая для синтеза конъюгата НА/карнозин по настоящему изобретению, может быть получена из любого источника, например, путем экстракции из куриных гребней (EP138572), путем ферментации (с использованием *Streptococcus equi* или *Zooepidemicus*, EP716688) или путем биосинтеза (с использованием *Bacillus*, EP2614087), и может характеризоваться средней молекулярной массой (MW) в диапазоне от 400 до 3×10^6 Да, в частности от 1×10^5 Да до 1×10^6 Да, еще более конкретно в диапазоне 130-220 кДа и/или в диапазоне 500-750 кДа.

Предпочтительными являются фармацевтические композиции, где степень дериватизации НА варьируется в диапазоне от 30 до 60%, и средняя молекулярная

масса НА составляет от 1×10^5 Да до 1×10^6 Да; более предпочтительными являются фармацевтические композиции, где DS НА варьируется в диапазоне от 30 до 60%, и средняя молекулярная масса НА находится в диапазоне 130-220 кДа или 500-750 кДа, и предусматриваются соответствующие смеси.

Еще более предпочтительными являются фармацевтические композиции, где DS НА варьируется в диапазоне от 31 до 34% ($35 \pm 3\%$) или в диапазоне от 40 до 50% ($45 \pm 5\%$), и предусматриваются соответствующие смеси, и средняя молекулярная масса НА находится в диапазоне 130-220 кДа или 500-750 кДа, и предусматриваются соответствующие смеси; в частности, предпочтительными являются фармацевтические композиции, где в случае если DS НА варьируется в диапазоне $35 \pm 3\%$, то средняя молекулярная масса НА находится в диапазоне 500-750 кДа, и в случае если DS НА варьируется в диапазоне $45 \pm 5\%$, то средняя молекулярная масса НА находится в диапазоне 130-220 кДа.

Следует отметить, что средняя молекулярная масса относится к средневесовой MW, рассчитанной согласно способу «характеристической вязкости» (Terbojevich et al., Carbohydr Res, 1986, 363-377).

Гиалуроновая кислота, используемая для синтеза рассматриваемого конъюгата, выбрана из натриевой соли НА (EP138572), предпочтительно для синтеза конъюгата НА/карнозин с DS не более приблизительно 40% (следовательно, от 25% до 40%), и тетрабутиламмониевой (ТВА) соли НА (EP216453), предпочтительно для синтеза конъюгата НА/карнозин с DS более чем 40% (следовательно, от 40% до 100%), при этом конечный продукт (описанный в примерах получения, представленных в данном документе ниже) получают (предпочтительно) в виде натриевой соли конъюгата НА/карнозин, независимо от соли НА, используемой в качестве реагента.

Еще один объект настоящего изобретения относится к биоматериалам, состоящим из производных НА, конъюгированных (и в этом случае посредством амидной связи) с карнозином, с использованием механизмов и при значениях степени, описанных для НА, которые определены в данном документе как «биоматериалы на основе НА/карнозина».

Производные НА, которые могут быть использованы для образования вышеупомянутых биоматериалов, перечислены ниже.

HYAFFâ: сложные эфиры НА со спиртами алифатического, арилифатического, циклоалифатического, ароматического, циклического и гетероциклического рядов с процентным значением эстерификации, который может варьироваться в зависимости от типа и длины используемого спирта, предпочтительно от 1 до 70%, при этом оставшаяся процентная часть неэстерифицированной НА может образовывать соль с органическими и/или неорганическими основаниями (EP216453);

HYADDâ: амиды НА с аминами алифатического, арилифатического, циклоалифатического, ароматического, циклического и гетероциклического рядов с процентным значением амидирования, находящимся в диапазоне от 0,1 до 50%, при этом оставшаяся процентная часть НА, не подверженной амидированию, может образовывать соль с органическими и/или неорганическими основаниями (EP1095064);

АСРÒ: внутренние сложные эфиры НА с процентным значением эстерификации, не превышающим 20%, предпочтительно находящимся в диапазоне от 0,05 до 10% эстерификации, при этом оставшаяся процентная часть неэстерифицированной НА может образовывать соль с органическими и/или неорганическими основаниями (EP341745);

HYOXXâ: производные перкарбонатов НА, полученные путем окисления первичного гидроксила фракции N-ацетилглюкозамина при степени перкарбонирования в диапазоне от 0,1 до 100% и предпочтительно от 25 до 75%. Карбоксильные группы НА могут образовывать соли с органическими и/или неорганическими основаниями (EP1339753).

О-сульфатированные производные НА не выше 4-й степени сульфатирования (EP702699).

Также возможно начать с конъюгата НА/карнозин для синтеза (в соответствии с тем, что известно специалистам в данной области) вышеупомянутых биоматериалов на основе НА/карнозина, дополнительно дериватирующих НА: следовательно, можно использовать рассматриваемый конъюгат в качестве исходного материала (вместо натриевой соли НА или соли ТВА) для синтеза HYAFF, АСР, HYADD, HYOXX или сульфатированных производных в соответствии с тем, что известно специалистам в данной области, для получения продуктов, ранее определенных как биоматериалы на основе НА/карнозина.

В способе образования биоматериалов, являющихся объектом настоящего изобретения, среди производных НА особенно важными являются те, которые представляют собой сложные эфиры и амиды; особый интерес в случае этого профиля представляют сложные бензиловые эфиры (HYAFF) с процентным значением эстерификации, предпочтительно находящимся в диапазоне от 5 до 50%, и гексадециламид НА (HYADD4) при степени дериватизации, не превышающей 5% (измерено с помощью HPLC), при этом было доказано, что этот амид является особенно подходящим для его роли в качестве вязкоупругого геля, который может быть клинически применимым в качестве синовиального заменителя в случае повреждения сустава (EP1853279).

Многочисленные научные эксперименты наглядно продемонстрировали то, что HYAFF является полностью биосовместимым биоразлагаемым полимером (Camproscia D. et al., *Biomaterials*, 1998, 19:2101-2127) и что с применением сложноэфирных производных НА для образования волокон (EP618817), подвергнутых обработке в нетканой форме или в виде губки, может быть образован трехмерный матрикс, который можно использовать в дерматологической и ортопедической областях.

Производные АСР успешно применяются в качестве кожных наполнителей и в качестве антиадгезионных гелей (EP0850074), при этом в случае сульфатированного производного НА в качестве компонента композиций для местного нанесения, предназначенных для дерматологического применения (EP2429515), исследуются его противовоспалительные эффекты, или его защитный/регенеративный эффект в отношении хрящевого матрикса – в случае композиций для перорального или внутрисуставного введения (EP2021078, EP2786782).

Следовательно, новые биоматериалы, образованные посредством амидной связи карбоксила вышеуказанных производных НА с карнозином, находят, в соответствии с настоящим изобретением, эффективное применение в лечении РА (в дополнение ко всем заболеваниям, вызванным непосредственно РА или опосредованно связанным с/обусловленным РА) и ОА (а также в предупреждении ОА) в качестве биоматериалов, подвергнутых обработке в виде волокон, гелей, гидрогелей, микросфер, губок, тканых или нетканых материалов, пленок.

Заболевания, вызванные непосредственно РА, являются системными клиническими проявлениями одной и той же патологии с вовлечением других органов и систем

органов, отличных от сустава. В частности, существует РА, при котором наблюдается образование ревматоидных узелков на легочном уровне с последующим легочным фиброзом, плевритом и плевроперикардитом, при этом на глазном уровне присутствует ксерофтальмия, увеит и склерит.

Патологии, опосредованно связанные с/обусловленные РА, определены в данном документе как патологии, которые были опосредованно вызваны РА, поскольку они связаны с серьезными случаями измененного иммунного профиля и/или с состояниями высокого окислительного стресса. Измененное образование свободных радикалов может фактически вызвать серьезное повреждение структуры соединительных тканей, структуры белков, клеточных мембран и ДНК генов. Следовательно, окислительный стресс можно рассматривать как патологическое состояние, вызванное нарушением тонкого баланса между образованием и удалением свободных радикалов.

В настоящее время считается, что окислительный стресс активно способствует возникновению РА, и, следовательно, других важных заболеваний, которые часто возникают в контексте и/или обусловлены РА, таких как преждевременное патологическое старение, инфаркт, инсульт, атеросклероз и коронарный атеросклероз, артериальная гипертензия, деменция, диабет, остеопороз и амилоидоз, многие формы рака, некоторые заболевания печени или почек, такие как протеинурия и нефрит, поражения желудка, формы катаракты.

С другой стороны, заболевания, связанные с измененным иммунным профилем, включают псориатический артрит, гастрит, васкулит, диабет I типа и аутоиммунные заболевания, в том числе, например, аутоиммунный тиреоидит.

Фармацевтические композиции, содержащие конъюгаты НА/карнозин и биоматериалы на основе НА/карнозина, описаны для местного, перорального, внутрисуставного, парентерального или хирургического применения во всех областях, в которых указанное введение требуется в отношении предупреждения или лечения вышеописанных патологий и связанных/обусловленных заболеваний, и могут быть связаны с фармакологически и/или биологически активными веществами, такими как, например, стероиды, противовоспалительные цитокины, интерферон, факторы роста (такие как, например, BMP2 и BMP7), NSAID, и/или с системами контролируемой доставки лекарственных средств, такими как, например, циклодекстрины, и/или

природными полимерами, такими как НА и ее производные, предпочтительно с амидным производным НА с гексадециламином, называемым HYADD4 (EP1095064), или полимерами синтетической природы.

Ниже описан синтез конъюгатов НА/карнозин, которые являются объектом настоящего изобретения, при этом способ конъюгирования сложного метилового эфира карнозина и натриевой соли или тетрабутиламмониевой соли гиалуроновой кислоты происходит в среде, содержащей DMSO или DMSO/H₂O в качестве главного растворителя.

В рассмотренной выше заявке на патент WO2016016847 описан исключительно способ конъюгирования натриевой соли НА и сложного метилового эфира карнозина в THF.

Таким образом, в способе в соответствии с настоящим изобретением синтез происходит в диполярном растворителе, апротонном и сильно гигроскопическом, при комнатной температуре. Синтез в THF в соответствии с уровнем техники осуществляли в апротонном летучем растворителе, имеющем более низкую полярность, и следовательно проводили при 4°C.

Химические характеристики различных растворителей, связанные с различными температурами реакции, которые также дают возможность использовать соль НА, отличную от натриевой соли, обеспечили возможность получения значений степени дериватизации НА карнозином, описанных и заявленных ниже.

Способы получения конъюгатов НА/карнозин, являющихся объектом настоящего изобретения

Пример 1

Синтез сложного метилового эфира карнозина (в виде гидрохлоридной соли)

Реакцию проводили в безводной среде. 1,5 г карнозина обрабатывали при перемешивании в 250 мл колбе 50 мл раствора ацетилхлорида в безводном метаноле (предварительно смешанном) в соотношении 1:20 (об./об.) в течение 12 часов, после чего приблизительно 90% растворителя удаляли выпариванием под вакуумом. К реакционному остатку добавляли 20 мл безводного метанола и снова приблизительно 90% растворителя удаляли выпариванием. Операцию повторяли до тех пор, пока вся HCl (которая образовалась во время реакции) не была удалена; затем продукт

высушивали до сухого состояния под вакуумом.

Продукт подвергали контролю с помощью электрофореза на бумаге, и различные компоненты образца выявляли с использованием нингидрина.

Пример 2

Синтез конъюгата HA/карнозин с DS, предусматривающей значения в диапазоне $35 \pm 3\%$ моль/моль)

В реактор вводили 1,1 г натриевой соли гиалуроновой кислоты (HANA) с MW 700 кДа, затем в него добавляли при постоянном перемешивании (при комнатной температуре) 80 мл смеси H₂O:DMS (в соотношении 1:1 об./об.) в течение по меньшей мере 4 часов. Затем последовательно добавляли 40 мл раствора H₂O:DMSO (1:1 об./об.), содержащего 480 мкл трис[2-(2-метоксиэтокси)этил]амин (ТМЕА), 400 мг 3-гидрокси-1,2,3-бензотриазин-4(3H)-она (HOObt) в виде порошка и 20 мл H₂O, содержащей 240 мг N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида гидрохлорида (EDC HCl).

Через 30 минут добавляли 20 мл раствора, содержащего 365 мг сложного метилового эфира карнозина в DMSO. Эту смесь затем подвергали интенсивному перемешиванию в течение 4 дней при 25°C.

Продукт вышеописанной реакции затем осаждали с помощью добавления этанола (1 л), после чего проводили удаление защитной группы (основной гидролиз) сложного метилового эфира карнозина с помощью 0,1 н. NaOH при постоянном перемешивании в течение 2 часов при 25°C.

Затем pH нейтрализовали добавлением 1 н. HCl и продукт осаждали с помощью 800 мл этанола. Этот осадок затем растворяли в воде, подвергали диализу в воде в течение 2 дней, после чего лиофилизировали.

Пример 3

Синтез конъюгата HA/карнозин с DS, предусматривающей значения в диапазоне $50 \pm 5\%$ моль/моль)

В реактор вводили 1,5 г тетрабутиламмониевой соли гиалуроновой кислоты (HATBA) с MW 200 кДа, затем в него добавляли при постоянном перемешивании 50 мл DMSO

(при комнатной температуре) в течение по меньшей мере 4 часов. Затем последовательно добавляли 2,4 мл трис[2-(2-метоксиэтокси)этил]амин (ТМЕА), 400 мг 3-гидрокси-1,2,3-бензотриазин-4(3H)-она (HOObt) в виде порошка и 20 мл DMSO, содержащего 240 мг N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида гидрохлорида (EDC HCl).

Через 30 минут добавляли 10 мл раствора, содержащего 365 мг сложного метилового эфира карнозина в DMSO. Эту смесь затем подвергали интенсивному перемешиванию в течение 1 дня при 25°C.

Наконец, осуществляли второе добавление 10 мл DMSO, содержащего 240 мг N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида гидрохлорида (EDC, HCl) и 10 мл раствора, содержащего 365 мг сложного метилового эфира карнозина в DMSO.

Эту смесь оставляли при интенсивном перемешивании на 3 дня при 25°C.

Продукт вышеописанной реакции затем осаждали добавлением 5 мл насыщенного раствора NaBr и 800 мл этанола, а затем проводили удаление защитной группы (основной гидролиз) сложного метилового эфира карнозина с помощью 0,1 н. NaOH при постоянном перемешивании в течение 2 часов при 25°C.

Затем pH нейтрализовали добавлением 1 н. HCl и продукт осаждали с помощью 800 мл этанола. Этот осадок затем растворяли в воде, снова подвергали диализу в воде в течение 2 дней, после чего лиофилизировали.

Пример 4

HPLC-анализ образца, полученного в соответствии с примерами 2 и 3

(количественный анализ β-аланина, присутствующего в карнозине, связанном с карбоксилатом НА)

Получение образца:

- конъюгат НА/карнозин растворяли в 6 М HCl при концентрации 25 мг/мл при 70°C в течение 5 минут, затем разбавляли 1/10 в 6 М HCl;
- затем 0,1 мл раствора образца переносили в пробирку, в которую добавляли

1,9 мл 6 М HCl;

- образец гидролизовали в течение 2 часов при 165°C, оставляли охлаждаться, а затем добавляли 8 мл H₂O качества Milli-Q, весь образец перемешивали до полного ресуспендирования и фильтровали;

- затем 8 мл этого отфильтрованного образца переносили в 20 мл колбу, в которую добавляли 10 мл 1 М NaOH;

- 0,2 мл полученного таким образом образца переносили во флакон, а затем добавляли 0,2 мл боратного буфера, 0,2 М, pH 9,3, и 0,2 мл FMOC-Cl (полученного в концентрации 1 мг/мл в ACN (ацетонитрил)); время реакции – по меньшей мере 30 минут;

- наконец, образец вводили в HPLC с применением следующего способа HPLC с УФ-детектором:

- колонка Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (15 см, 5 мкм, 100Å),

- расход: 1 мл/мин.,

- вводимый объем: 50 мкл,

- длина волны: 262 нм,

- подвижная фаза А: Na₂HPO₄, 40 мМ, pH 7,8,

- подвижная фаза В: ACN/MeOH/H₂O 45/45/10,

- соотношение фаза А/фаза В = 60/40 (с градиентом).

Результаты: образец из примера 2 характеризовался степенью дериватизации по карбоксилу НА, составляющей 35% моль/моль, тогда как образец из примера 3 характеризовался степенью дериватизации, равной 50% моль/моль.

Эксперименты на животных с использованием конъюгатов НА/карнозин

Пример 5

Экспериментальная модель РА: коллаген-индуцированный артрит (CIA) у мышей

Пероральная обработка с использованием конъюгата НА/карнозин

В течение многих лет CIA было признано действительной экспериментальной моделью РА на мышах или крысах, так как он определяет гуморальные, клеточные, гистологические и патологические характеристики РА в животном организме (Holmdahl et al., Immunological reviews, 1990, 118: 193-232). После индукции CIA у мышей в их суставах в действительности присутствовало большое количество активированных нейтрофилов/макрофагов/лимфоцитов с последующим образованием синовиального паннуса РА.

Индукция CIA: куриный коллаген II типа (CII) растворяли в 0,01 М уксусной кислоте в концентрации 2 мг/мл, затем получали полный адъювант Фрейнда (CFA) с помощью добавления H37Ra *Mycobacterium tuberculosis* (2 мг/мл) к неполному адъюванту (состоящему из эмульсии вода/минеральное масло), затем смешивали два компонента (CII и CFA) и эмульгировали при одинаковом соотношении об./об.

Инъецировали 100 мкл полученной таким образом эмульсии (содержащей 100 мкг CII) у основания хвоста мыши путем внутрикожной инъекции (день 1). Вторую идентичную инъекцию осуществляли через 21 день.

Экспериментальные группы

Использовали самцов мышей DBA/II в возрасте девяти недель, приблизительно 30 г каждый, по 20 мышей на группу.

Группа 1. Контроль CIA: животных обрабатывали посредством индукции CIA, после чего перорально вводили дистиллированную воду через каждые 24 часа, начиная с 25-го дня после CIA и заканчивая 35-м днем – завершением эксперимента.

Группа 2. CIA + конъюгат НА/карнозин: животных обрабатывали посредством индукции CIA, после чего вышеупомянутым конъюгатом каждые 24 часа, начиная с 25-го дня после CIA до 35-го дня. Конъюгат, используемый для теста, был получен в соответствии с примером 3, следовательно, он был дериватизирован при 50% моль/моль, при этом вводимая перорально доза составляла 81 мг/кг конъюгата (20 мг карнозина и 61 мг НА).

Группа 3. Смесь CIA + НА/карнозин: животных обрабатывали посредством индукции

СИА, после чего НА/карнозином каждые 24 часа, начиная с 25-го дня после СИА до 35-го дня. Этот препарат состоял из смеси натриевой соли НА, смешанной с карнозином в воде, вводимой перорально в дозе 20 мг/кг карнозина с 61 мг/кг НА.

Клиническая оценка

Развитие заболевания оценивали ежедневно через 20 дней после первой инъекции в соответствии со следующей схемой оценки для каждой отдельной лапы:

0 = отсутствие признаков развития артрита;

1 = отек и/или покраснение лапы;

2 = отек и/или покраснение лапы в по меньшей мере 2 суставах;

3 = отек и/или покраснение лапы в по меньшей мере 3 суставах;

4 = развитие тяжелой формы артрита всей лапы с вовлечением

всех пальцев.

Для каждого животного суммарный индекс развития СИА (определенный как балл по шкале артрита лапы) рассчитывали путем суммирования полученных (и оцененных, как указано выше) значений для каждой лапы.

Индекс клинической тяжести определяли по объему лап (измеряемому каждые два дня с помощью плетизмометра), который постепенно увеличивался в течение всего периода анализа в зависимости от тяжести заболевания: увеличение стопы.

Гистологическая оценка

На момент завершения периода оценки, т. е. на 35-й день после начала эксперимента, животных умерщвляли, обработанные лапы удаляли (включая коленные суставы) и фиксировали в 10% формалине; затем декальцифицировали и пропитывали парафином для получения микротомных срезов толщиной 5 мкм, затем окрашивали гематоксилином/эозином. Анализ с помощью оптического микроскопа проводили согласно нижеследующему гистологическому баллу:

0 = отсутствие повреждения;

1 = отек;

2 = присутствие инфильтрата воспалительных клеток;

3 = признак резорбции кости.

Анализ плазмы крови

Количественное определение TNF- α в плазме крови

Уровни TNF- α измеряли в плазме крови животных на момент завершения эксперимента с использованием набора для ELISA от Calbiochem-Novabiochem Corporation, IT, для определения уровней TNF- α (предел считывания 10 пг/мл).

Количественное определение индекса перекисного окисления липидов в плазме крови

Атака свободными радикалами липидов, присутствующих в биологических мембранах, определяет начало кислород-зависимого процесса разрушения (перекисное окисление липидов), который приводит к нарушению целостности биологических мембран и образованию окисленных липидных белков и пероксидов липидов с побочными продуктами, такими как альдегиды, включая малоновый диальдегид (MDA). Все эти процессы приводят к окислительному стрессу. Для того чтобы измерить у мыши повреждение, вызванное свободными радикалами, обусловленное возникновением CIA, образцы плазмы крови (таким образом, содержащие вышеуказанные альдегиды) из обработанных групп, отобранные на момент завершения эксперимента, подвергали взаимодействию с барбитуровой кислотой (TBAR) по сравнению со стандартом, представленным MDA (т. е. 99% тетраметоксипропановые растворы, Sigma, Милан). В результате получали аддукт, легко выявляемый с помощью спектрофотометра при OD 650 нм (Ohkawa H et al., Anal. Biochem., 1979, 95: 351-358).

Результаты

Клиническая оценка

Как показано на фигуре 1 (балл по шкале артрита лапы), наблюдается максимальный индекс патологического проявления с явными признаками периартикулярной эритемы и отека лап через 30-35 дней после обработки CIA (контрольная группа); при этом пероральное введение конъюгата НА/карнозин вызывало значительное уменьшение

воспаления суставов, в особенности через 30 дней, также по сравнению с группой CIA + смесь HA/карнозин. Это существенное различие в эффективности, индексе синергизма между HA и карнозином, в случае ковалентного связывания с DS, являющимся предметом эксперимента, сохраняется в течение еще более продолжительных промежутков времени до завершения эксперимента.

На фигуре 2 показана тенденция в отношении увеличения стопы: также в данном случае обработка конъюгатом, являющимся объектом настоящего изобретения, подтверждает неожиданный эффект, показанный на фигуре 1, при котором на момент завершения эксперимента отек лапы, обработанной конъюгатом, был значительно менее выраженным по сравнению как с необработанным контролем, так и с группой, получавшей смесь HA/карнозин.

Гистологическая оценка

Фигура 3: на 35-й день (завершение) эксперимента гистологическая оценка CIA-контрольных животных показала четкие и важные гистологические признаки развития тяжелой формы RA с эрозией кости и умеренным/тяжелым некрозом тканей сустава. С другой стороны, обработка конъюгатом HA/карнозин значительно уменьшила эту эрозию как по сравнению с контролем, так и по сравнению с группой, обработанной смесью HA/карнозин.

Анализ плазмы крови. Количественное определение TNF- α в плазме крови

На момент завершения эксперимента уровень провоспалительного цитокина TNF- α в плазме крови анализировали у всех животных, подвергнутых и не подвергнутых CIA (образец плацебо, т. е. без осуществления индукции CIA, с тем чтобы он характеризовался значением TNF в плазме крови, характерным для неоперированных здоровых животных в качестве сравнения).

Как показано на фигуре 4, значение вышеупомянутого воспалительного цитокина в контрольной группе CIA было чрезвычайно высоким, почти в 5 раз выше, чем в контроле с плацебо, тогда как обработка конъюгатом, являющимся объектом настоящего изобретения, более чем вдвое уменьшала значение TNF- α , также значительно снижая его по сравнению с группой, которой вводили смесь HA/карнозин.

Пример 6

Экспериментальная модель ОА: индукция остеоартрита у крыс моноиодацетатом натрия (MIA)

ОА индуцировали в коленных суставах задних лап тестируемых крыс с помощью внутрисуставной инъекции MIA: вводили 25 мкл физиологического раствора, содержащего 1 мг/кг MIA, в сустав (колени) правой лапы каждого животного (подвергающегося обработке) через подколенную связку, тогда как левый сустав получал равный объем 0,9% физиологического раствора (Sagar DR et al, Ann. Rheum. Dis., 2013, 73: 1558-1565).

Внутрисуставная обработка конъюгатом НА/карнозин

Экспериментальные группы

Использовали самцов крыс Sprague-Dawley, по приблизительно 230 г каждый, по 20 крыс на группу.

Группа 1. Контроль с MIA: животных обрабатывали посредством индукции MIA, после чего 25 мкл дистиллированной воды, вводимой внутрисуставно в правое колено в день 7, 10, 13, 16 и 19 после MIA, на 21-й день эксперимент завершали умерщвлением животных.

Группа 2. MIA + конъюгат НА/карнозин: животных обрабатывали посредством индукции MIA, после чего 25 мкл конъюгата, полученного в соответствии с примером 2, затем дериватизированного при 35% моль/моль внутрисуставно в правое колено в день 7, 10, 13 и 16, 19 после MIA до 21-го дня. 25 мкл конъюгата НА/карнозин содержали 250 мкг конъюгата, т. е. 45,75 мкг карнозина и 204,25 мкг НА.

Группа 3. MIA + смесь НА/карнозин: животных обрабатывали посредством индукции MIA, после чего 25 мкл НА и карнозина внутрисуставно в правое колено в день 7, 10, 13, 16 и 19 после MIA до 21-го дня. Этот препарат состоял из смеси натриевой соли НА, смешанной с карнозином в воде, следовательно, 25 мкл этого препарата содержали 45,75 мкг карнозина и 204,25 мкг НА.

Количественное определение TNF- α в плазме крови

На момент завершения экспериментов измеряли уровни TNF- α в плазме крови

животных с использованием набора для ELISA от Calbiochem-Novabiochem Corporation, IT, для определения уровней TNF- α (предел считывания 10 пг/мл).

Результаты

На фигуре 6 показаны результаты, полученные в группах обработки и в группе плацебо, определенной как группа, в которой животные не подвергались обработке МІА, также в данном случае уровень в плазме крови цитокина TNF в группе контроля МІА оказался чрезвычайно высоким, тогда как обработка конъюгатом НА/карнозин значительно снижала значение TNF- α не только по сравнению с этим контролем, но также и по сравнению с группой, которой вводили смесь НА/карнозин, которая не проявляла какой-либо эффективности, продемонстрировав еще раз явно выраженный эффект конъюгата, являющегося объектом настоящего изобретения, и, следовательно, его уровня дериватизации, который является особенно высоким по сравнению с известным из уровня техники.

Пероральная обработка конъюгатом НА/карнозин

Экспериментальные группы

Использовали самцов крыс Sprague-Dawley, по приблизительно 230 г каждый, по 20 крыс на группу.

Группа 1. Контроль МІА: животных обрабатывали посредством индукции МІА, после чего перорально вводили дистиллированную воду через каждые 24 часа с 3-го дня после МІА до 20-го дня – завершения эксперимента.

Группа 2. МІА + конъюгат НА/карнозин: животных обрабатывали посредством индукции МІА, после чего вышеупомянутым конъюгатом каждые 24 часа с 3-го дня после МІА до 20-го дня. Конъюгат, используемый для эксперимента, получали в соответствии с примером 2, затем его дериватизировали при 35% моль/моль, при этом вводимая перорально доза равнялась 88,5 мг/кг конъюгата (16,2 мг карнозина и 72,3 мг НА).

Группа 3. МІА + смесь НА/карнозин: животных обрабатывали посредством индукции МІА, после чего НА/карнозином каждые 24 часа, начиная с 3-го дня после МІА до 20-го дня. Этот препарат состоял из смеси натриевой соли НА, смешанной с карнозином в

воде, вводимой перорально в дозе 16,2 мг/кг карнозина с 72,3 мг/кг НА.

Группа 4. МІА + напроксен: животных обрабатывали посредством индукции МІА, после чего напроксеном, вводимым перорально в дозе 10 мг/кг каждые 24 часа, начиная с 3-го дня после МІА до 20-го дня.

Гистологическая оценка

На момент завершения периода эксперимента, т. е. на 21-й день от начала индукции МІА, животных умерщвляли, обработанные лапы удаляли (включая коленные суставы) и фиксировали в 10% формалине. Затем их декальцифицировали и пропитывали парафином для получения микротомных срезов толщиной 5 мкм, затем окрашивали гематоксилином/эозином. Анализ с помощью оптического микроскопа выполняли согласно модифицированной гистологической шкале Мэнкина с диапазоном баллов от 0 до 12, т. е. от нормальной клеточной организации до полной дезорганизации и гипоцеллюлярности; (Mankin HJ et al., J Bone Joint Surg Am., 1971, 53 (3): 523-537).

Результаты

Гистологическое исследование образцов из группы 1 показало нарушения организации тканей с фибрилляцией поверхностного слоя, снижением количества клеток и дегенерацией хрящевого слоя. Пероральная обработка конъюгатом НА/карнозин очень значительно снижает гистологически выявляемое повреждение и дегенерацию хряща, что полностью сопоставимо с эффектом, вызванным напроксеном (известные NSAID с задокументированной эффективностью), тогда как обработка смесью НА/карнозин не приводила к каким-либо гистологически выявляемым улучшениям по сравнению с необработанными образцами из группы 1 (контроль МІА) (фигура 7).

Формула изобретения

1. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат гиалуроновая кислота (НА)/карнозин с прямой амидной связью между карбоксильной группой гиалуроновой кислоты и аминогруппой карнозина, для применения при предупреждении и лечении остеоартрита и лечении ревматоидного артрита (РА).
2. Фармацевтическая композиция по п. 1 для применения при лечении патологий, вызванных непосредственно РА, выбранных из группы, включающей легочный фиброз, плеврит и плевроперикардит, ксерофтальмию, увеит и склерит, или опосредованно связанных с/ обусловленных РА, выбранных из группы, включающей преждевременное патологическое старение, сердечный приступ, инсульт, атеросклероз и коронарный атеросклероз, артериальную гипертензию, деменцию, диабет, остеопороз и амилоидоз, рак, протеинурию и нефрит, поражения желудка, формы катаракты, псориатический артрит, гастрит, васкулит, диабет I типа и аутоиммунный тиреоидит.
3. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих пунктов, где конъюгат гиалуроновая кислота (НА)/карнозин получен путем ковалентного конъюгирования дипептида карнозина с гиалуроновой кислотой путем образования прямой амидной связи между карбоксилем НА и аминогруппой карнозина при степени дериватизации, т. е. амидирования, карбоксильной группы НА, превышающей 25%, предпочтительно в диапазоне от 30 до 100%, более предпочтительно в диапазоне от 30 до 60% и еще более предпочтительно варьирующейся в диапазоне $35 \pm 3\%$ или $45 \pm 5\%$, и предусматриваются их смеси.
4. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих пунктов, где НА характеризуется средней молекулярной массой в диапазоне от 400 до 3×10^6 Да, предпочтительно в диапазоне от 1×10^5 Да до 1×10^6 Да, еще более предпочтительно в диапазоне 130-220 кДа или в диапазоне 500-750 кДа, и предусматриваются их смеси.
5. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих пунктов, где степень дериватизации НА находится в диапазоне от 30 до 60%, и средняя молекулярная масса НА находится в диапазоне от 1×10^5 Да до 1×10^6 Да и предпочтительно находится в диапазоне 130-220 кДа или 500-750 кДа, и предусматриваются их смеси.
6. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих пунктов, где

гиалуроновая кислота, используемая для получения амидного производного НА с карнозином, представляет собой натриевую соль НА или тетрабутиламмониевую соль НА.

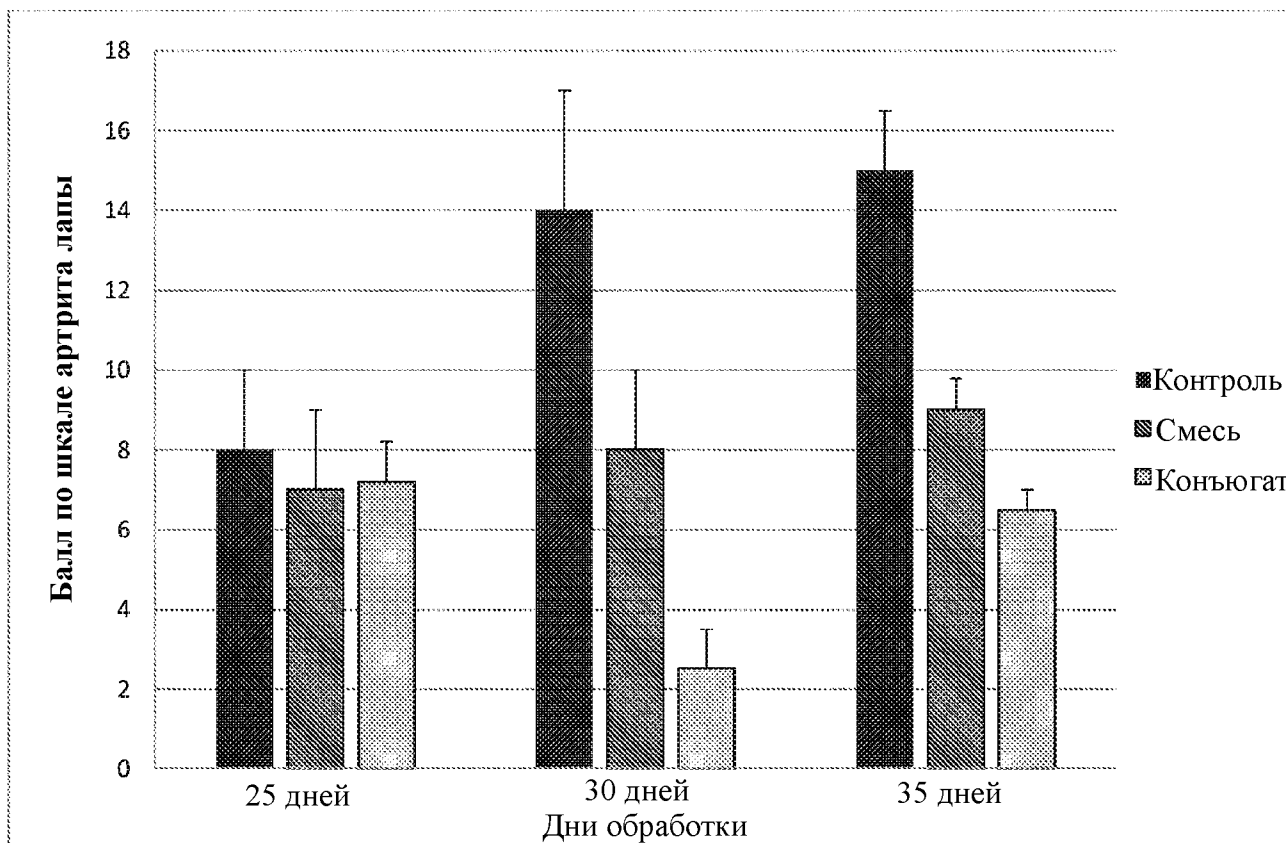
7. Фармацевтическая композиция по любому из предыдущих пунктов для местного, перорального, внутрисуставного, парентерального или хирургического применения.

8. Биоматериалы, состоящие из производных НА, конъюгированных с карнозином, где указанные производные выбраны из сложных эфиров НА, амидов НА, внутренних сложных эфиров НА, перкарбосилатов НА и сульфатов НА.

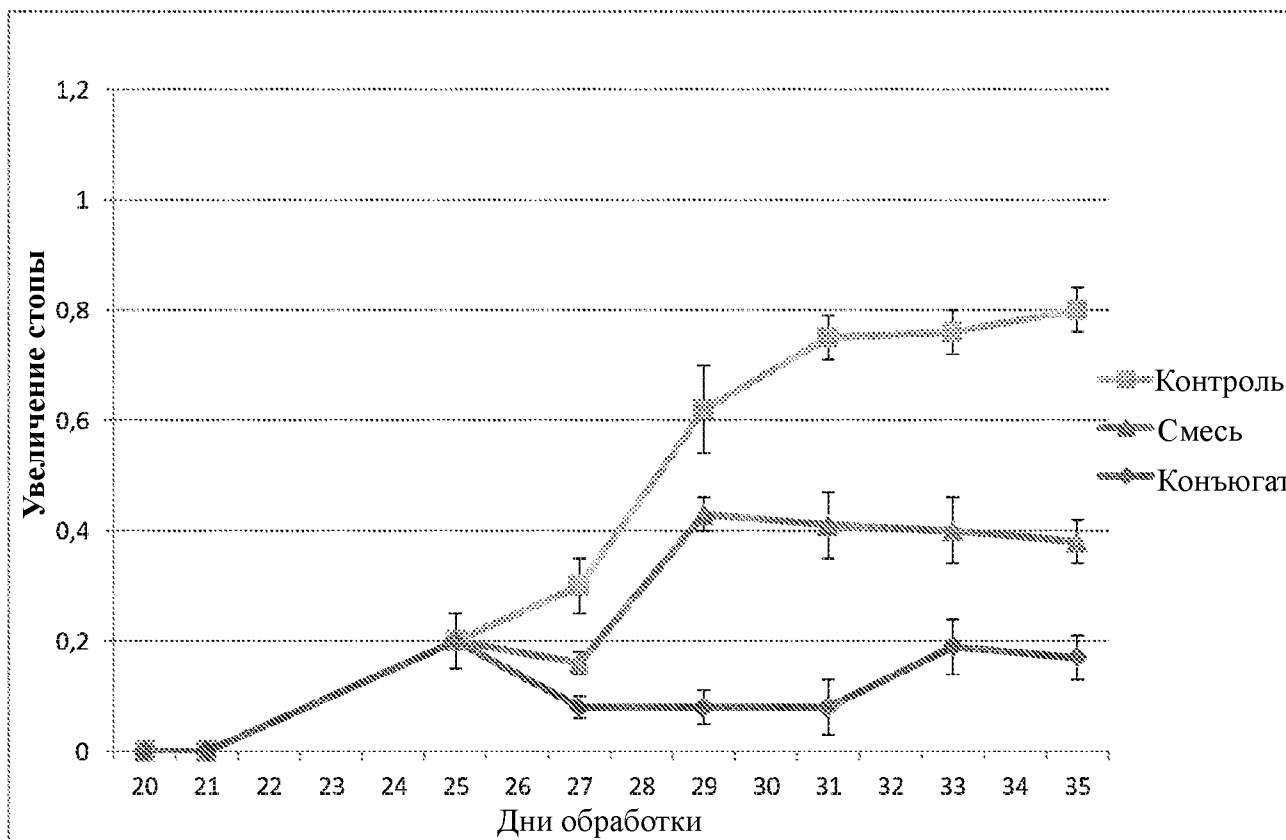
9. Биоматериалы, состоящие из производных НА, конъюгированных с карнозином, по п. 8 для применения при предупреждении и лечении остеоартрита, при лечении ревматоидного артрита (РА) и при лечении патологий, вызванных непосредственно РА, выбранных из группы, включающей легочный фиброз, плеврит и плевроперикардит, ксерофтальмию, увеит и склерит, или опосредованно связанных с/обусловленных РА, выбранных из группы, включающей преждевременное патологическое старение, сердечный приступ, инсульт, атеросклероз и коронарный атеросклероз, артериальную гипертензию, деменцию, диабет, остеопороз и амилоидоз, рак, протеинурию и нефрит, поражения желудка, формы катаракты, псориатический артрит, гастрит, васкулит, диабет I типа и аутоиммунный тиреоидит.

10. Биоматериалы, состоящие из производных НА, конъюгированных с карнозином, по п. 9 в виде волокон, гелей, гидрогелей, микросфер, губок, тканых или нетканых материалов, пленок для местного, перорального, внутрисуставного, парентерального или хирургического применения.

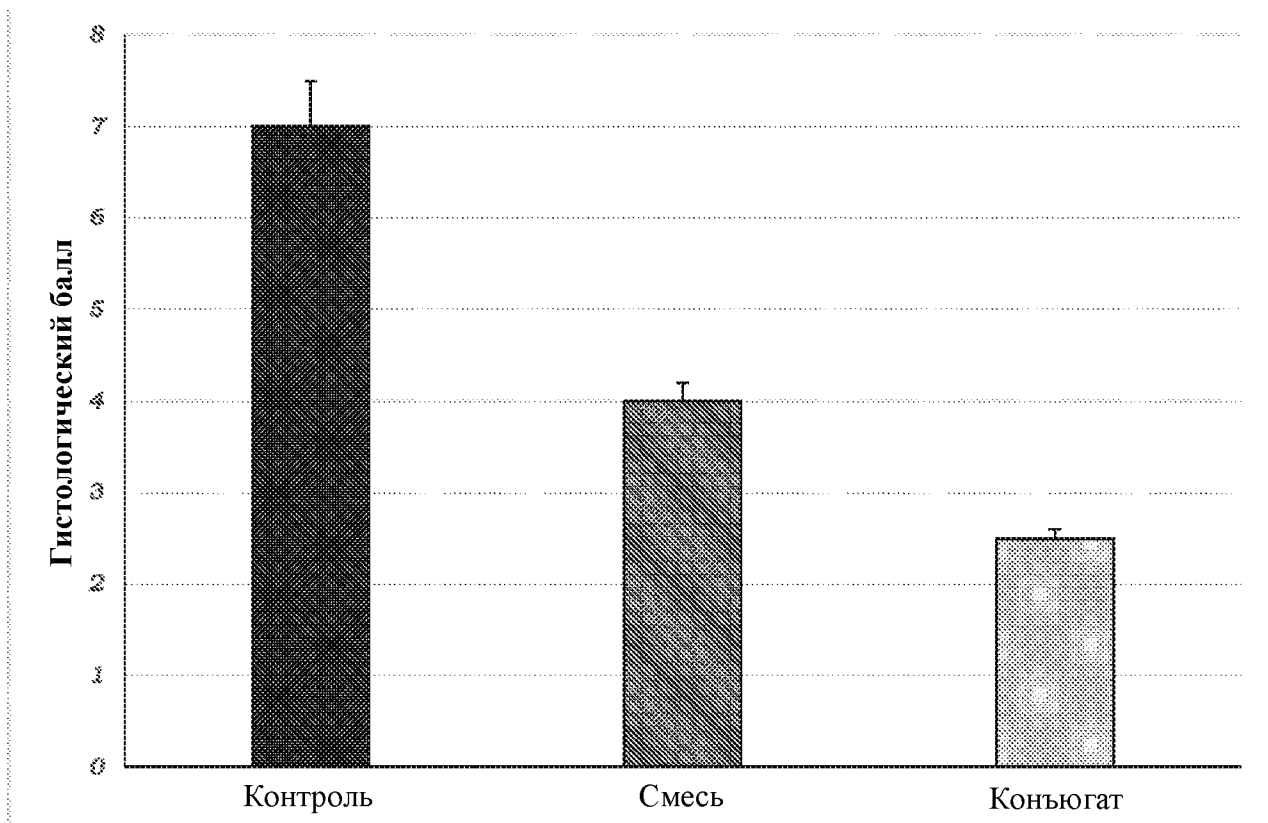
11. Фармацевтическая композиция или биоматериалы по любому из предыдущих пунктов, ассоциированные с фармакологически и/или биологически активными веществами, и/или системами контролируемого высвобождения лекарственных средств, и/или природными полимерами или полимерами синтетической природы.



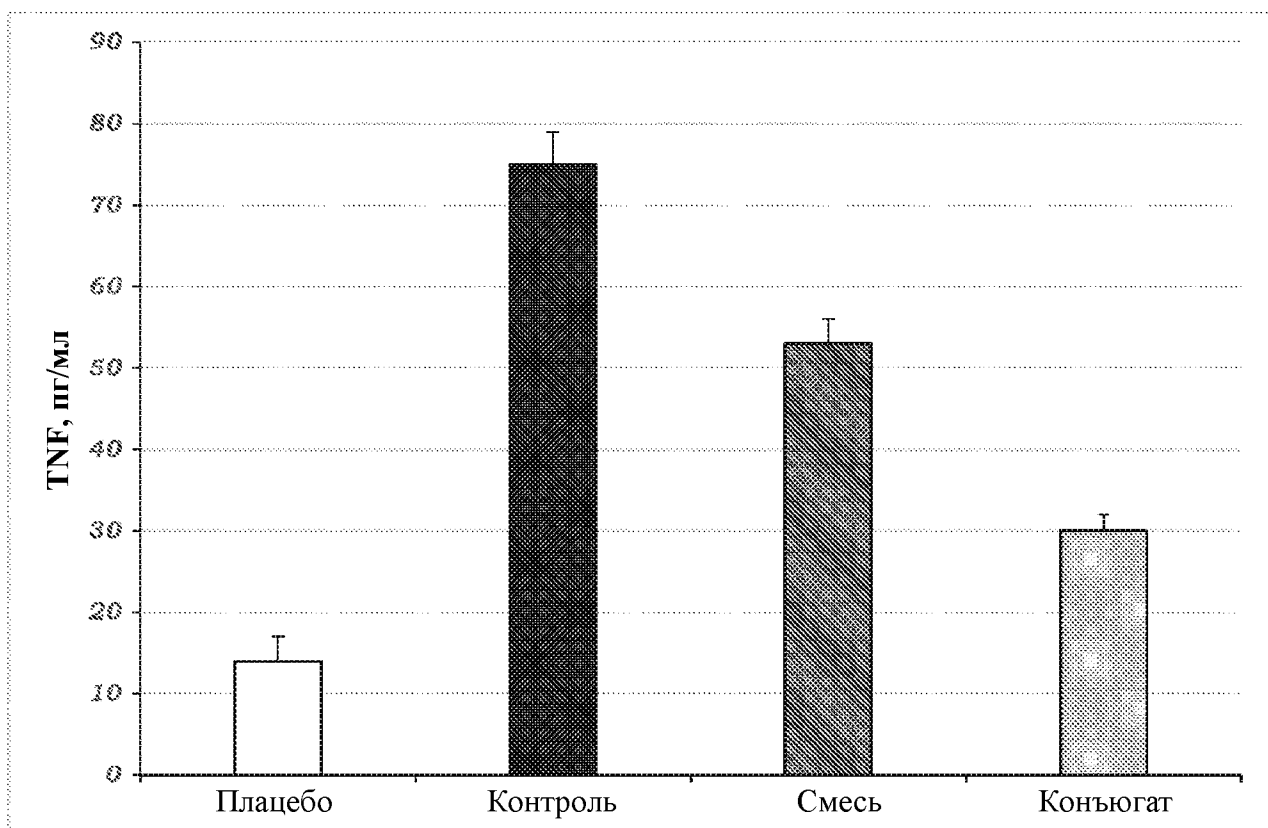
Фиг. 1



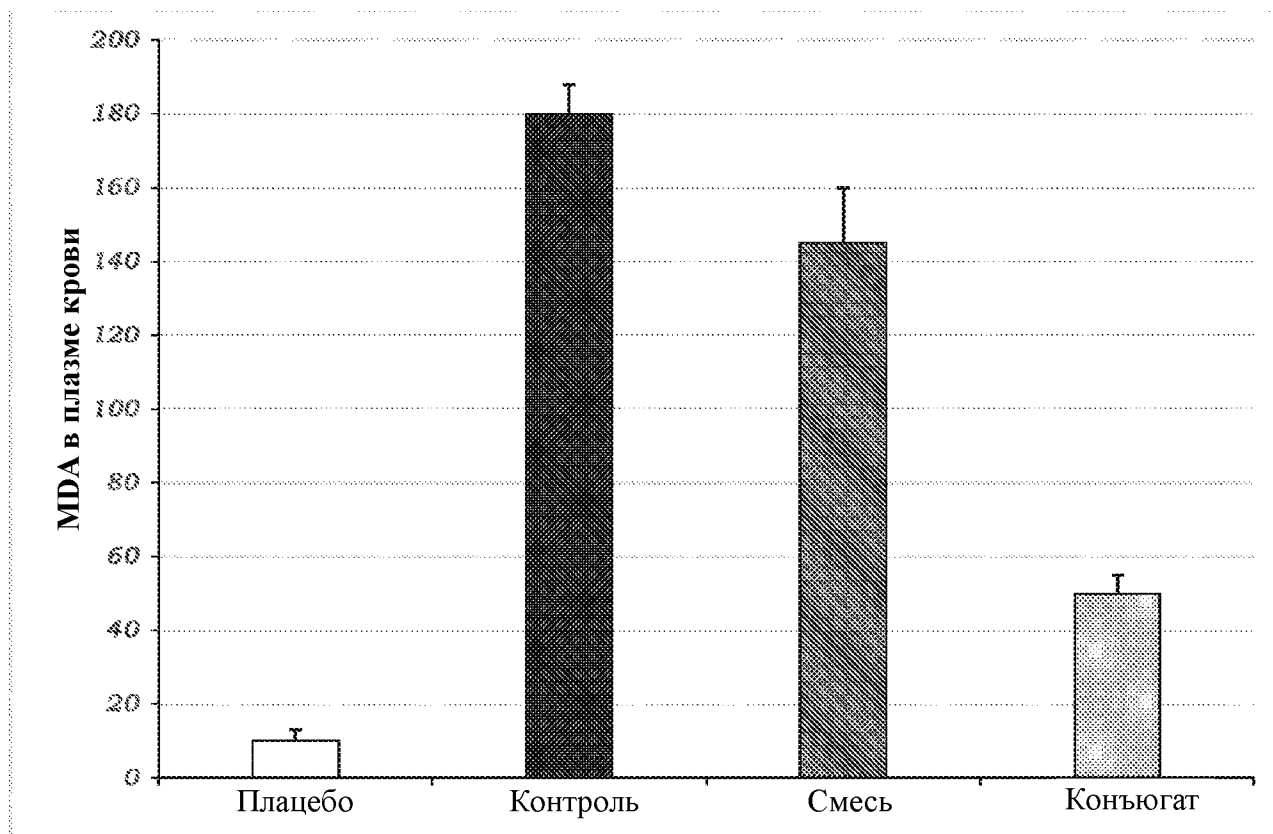
Фиг. 2



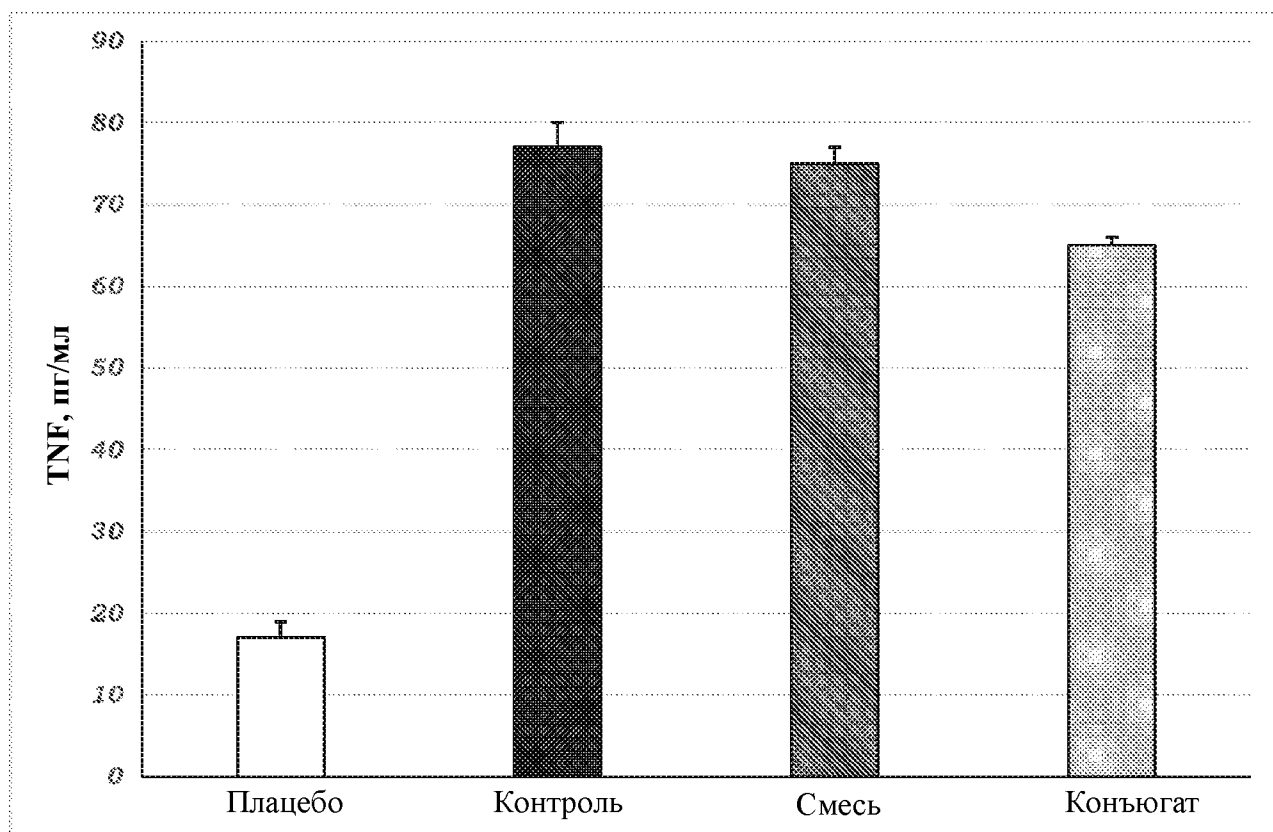
Фиг. 3



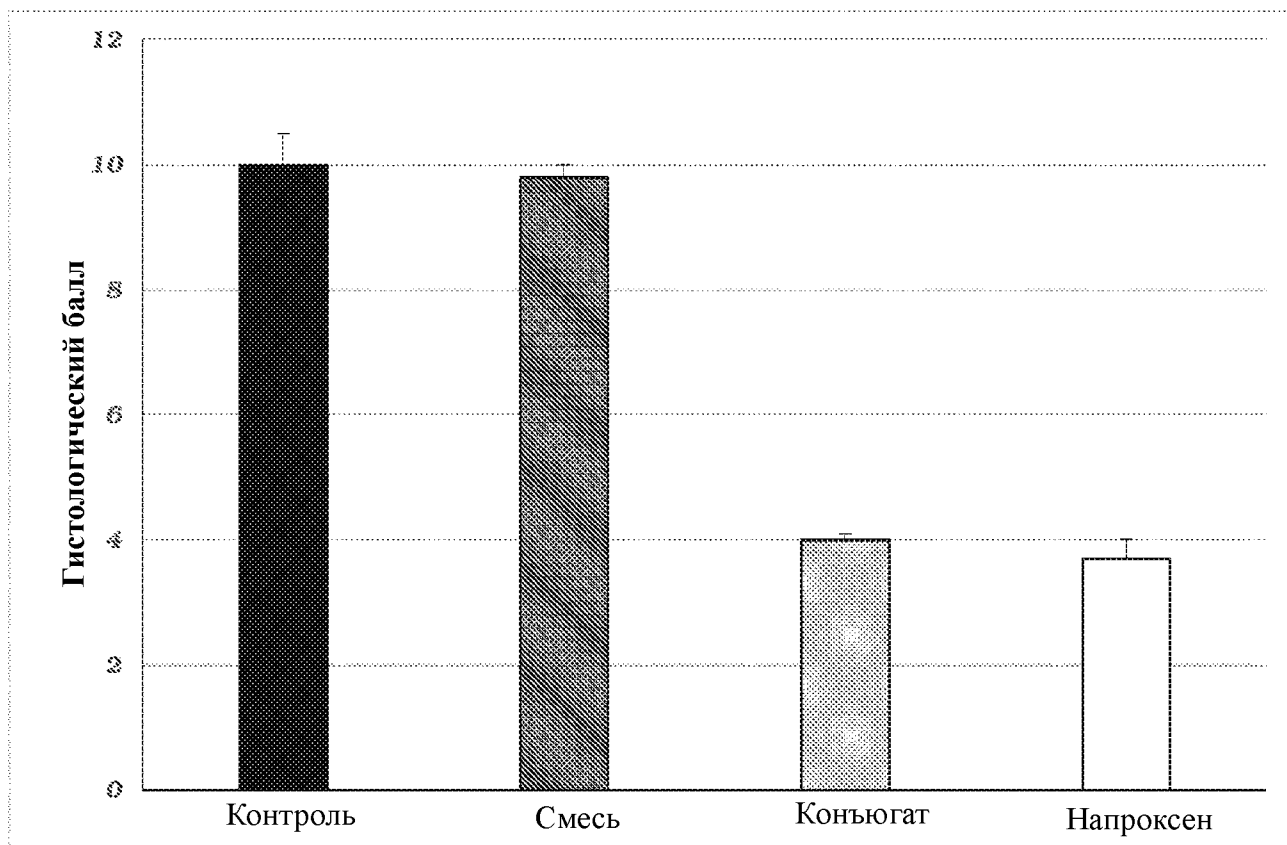
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7