

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090788** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.06.15

(22) Дата подачи заявки
2018.10.17

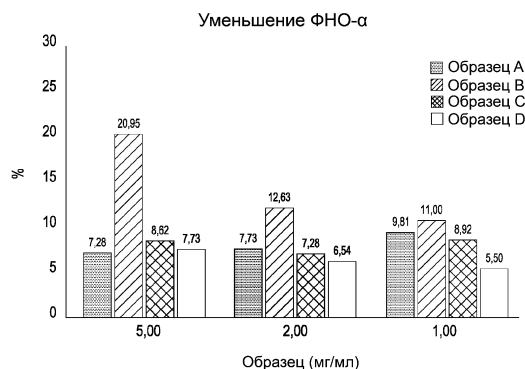
(51) Int. Cl. *A61K 47/20* (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 31/728 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/10 (2006.01)

**(54) ЖИДКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ
ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО СРЕДСТВА**

(31) 102017000117361
(32) 2017.10.17
(33) IT
(86) PCT/IB2018/058051
(87) WO 2019/077521 2019.04.25
(71) Заявитель:
АЛЬФАКЙН С.Р.Л. (IT)

(72) Изобретатель:
Феррари Алессιο (IT)
(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей или, альтернативно, состоящей из эффективного количества смеси, включающей гиалуроновую кислоту и МСМ, для применения в качестве противовоспалительного средства.



A1

202090788

202090788

A1

ЖИДКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО СРЕДСТВА

Настоящее изобретение относится к композиции для лечения и/или профилактики расстройств и/или патологий, связанных с окислительными и/или воспалительными состояниями.

Хорошо известно применение гиалуроновой кислоты и ее солей и производных для лечения и профилактики расстройств, включая артроз, путем внутрисуставной инфильтрации, отологических расстройств (для регенерации перфорированных барабанных перепонок), а также воспалений и язвенных поражений кожи и слизистой оболочки, например, рта, таких как афты и стоматит.

Кроме того, гиалуроновая кислота широко используется в дерматологии и в косметических целях в качестве основного компонента различных продуктов для местного применения, таких как филлеры для лица, гели, спреи и жидкости для полоскания рта.

In vivo гиалуроновая кислота метаболизируется специфическими ферментами, принадлежащими к семейству гиалуронидаз, которые провоцируют ее деградацию.

Таким образом, одним из основных недостатков использования гиалуроновой кислоты in vivo является ее относительно быстрая деградация гиалуронидазами. Отсюда следует, что для получения значительных, длительных эффектов введение гиалуроновой кислоты необходимо повторять с течением времени.

По-прежнему существует настоятельная необходимость в составе, обеспечивающем пролонгированное действие гиалуроновой кислоты, который по существу не имеет побочных эффектов.

Одной целью настоящего изобретения является обеспечение композиции гиалуроновой кислоты, которая является стабильной, простой в использовании, по существу свободной от побочных эффектов и позволяет достичь пролонгированного действия гиалуроновой кислоты.

В качестве решения указанной задачи настоящее изобретение предлагает композицию для применения в соответствии с прилагаемой формулой изобретения.

Настоящее изобретение относится к жидкой композиции, содержащей эффективное количество смеси, которая включает или, альтернативно, состоит по меньшей мере из (a) гиалуроновой кислоты или ее соли, и (b) метилсульфонилметана (МСМ), где (a) и (b) присутствуют в массовом соотношении от 1:2 до 1:4, и физиологически приемлемого носителя.

Настоящее изобретение относится к композиции, определенной выше, для применения в качестве лекарственного средства.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, пищевой добавке или медицинскому устройству (композиции для медицинского устройства), содержащему жидкую композицию, как определено выше.

Предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения станут понятными из подробного описания, которое следует ниже, и указано в прилагаемой формуле изобретения.

На фиг. 1a представлена коррелограмма сравнительного образца А, разведенного в воде в двух разных концентрациях.

На фиг. 1b показано распределение гидродинамических радиусов сравнительного образца А, разведенного в воде при двух разных концентрациях.

Фиг. 2 представляет собой коррелограмму образца А, разведенного в NaNO_3 в трех разных концентрациях.

На фиг. 3a и 3b показаны соответственно результаты, относящиеся к А и В, разведенным в 0,1 М NaNO_3 .

Фиг. 4 представляет собой ^1H -ЯМР сравнительного образца А, фиг. 5 представляет собой ^1H -ЯМР сравнительного образца S3410, а фиг. 6 представляет собой ^1H -ЯМР сравнительного образца В.

Фиг. 7 является наложением трех спектров ^1H -ЯМР от трех фиг 4-6, а фиг. 8-расширением спектральной области около 3 имп./мин на фиг. 7.

На фиг. 9 показана кинетика гидролиза образцов А и В.

Фиг. 10 показывает снижение ИЛ-1 β при различных концентрациях тестируемых образцов.

Фиг. 11 показывает снижение ИЛ-6 при различных концентрациях тестируемых образцов.

Фиг. 12 показывает снижение ФНО- α при различных концентрациях тестируемых образцов.

В рамках настоящего изобретения «лечение» патологии или расстройства означает терапию, направленную на восстановление состояния здоровья субъекта, поддержание существующего состояния и/или предотвращение ухудшения указанного состояния здоровья.

В рамках настоящего изобретения «профилактика» патологии или расстройства означает терапию, направленную на предотвращение возникновения такой патологии или расстройства у субъекта, также в качестве осложнения или эффекта ранее

существовавшего патологического состояния или расстройства, но не ограничиваясь этим.

Если не указано иное, в объеме настоящего изобретения проценты и количества компонента в смеси предназначены для обозначения массы этого компонента по отношению к общей массе смеси.

Если не указано иное, в рамках настоящего изобретения в отношении интервалов числовых значений для определенного признака указание «от X до Y» содержит крайние значения, то есть X и Y, а также все возможные промежуточные числовые значения.

В контексте настоящего изобретения термин «композиция (композиции)» включает фармацевтическую композицию, композицию для пищевой добавки, композицию для пищевого продукта или композицию для медицинского устройства.

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает жидкую композицию, содержащую: (i) эффективное количество смеси, которая включает или, альтернативно, состоит по меньшей мере из (a) гиалуроновой кислоты или ее соли и (b) метилсульфонилметана (МСМ), где (a) и (b) находятся в массовом соотношении от 1:2 до 1:4, и (ii) физиологически приемлемого носителя.

После обширных испытаний авторы изобретения разработали жидкую композицию, включающую гиалуроновую кислоту и метилсульфонилметан (МСМ), которая в определенных массовых пропорциях может формировать нековалентный комплекс или соединение через прочную электростатическую связь. Образование указанного соединения позволяет получить более продолжительное действие гиалуроновой кислоты по сравнению с доступными в настоящее время препаратами.

Не желая углубляться в теорию, можно утверждать, что наличие указанной сильной электростатической связи приводит к образованию комплекса с размерами и молекулярной массой, превышающими показатели для гиалуроновой кислоты как таковой. Также наблюдалось увеличение вязкости композиции по изобретению по сравнению с аналогичными растворами, содержащими только гиалуроновую кислоту или гиалуроновую кислоту и МСМ в пропорциях, выходящих за пределы, указанные выше.

После применения композиции по изобретению было обнаружено, что, вероятно, в результате образования указанной нековалентной связи гиалуроновая кислота метаболизируется гиалуронидазой медленнее, чем наблюдается для аналогичных растворов, содержащих гиалуроновую кислоту по отдельности или гиалуроновую кислоту и МСМ в пропорциях, выходящих за пределы, указанные выше. Это приводит к пролонгированному действию гиалуроновой кислоты с итоговым преимуществом, заключающимся в том, что по сравнению с известными композициями для получения сопоставимых физиологических эффектов необходимо меньшее количество приемов

препаратов, содержащих гиалуроновую кислоту.

Сокращение количества приемов позволяет минимизировать риск побочных эффектов и улучшить соблюдение режима лечения пациентами, которые проходят лечение.

В композиции согласно настоящему изобретению массовое соотношение (a) и (b) предпочтительно составляет от 1:2,5 до 1:3,5; предпочтительно указанное соотношение составляет 1:3.

В композиции согласно настоящему изобретению носитель находится в жидкой форме (жидкий носитель) и является фармакологически, то есть физиологически приемлемым, поскольку он содержит, например, жидкий раствор (воду для инъекционных препаратов), добавки к составам, разбавители и фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества. Указанный носитель в жидкой форме предпочтительно содержит апирогенный хлорид натрия и/или безводный динатрия гидрофосфат - Na_2HPO_4 и/или натрия дигидрофосфат дигидрат - $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ и/или воду для инъекционных препаратов.

Гиалуроновая кислота или ее фармацевтически приемлемая соль представляет собой линейную неразветвленную гиалуроновую кислоту, предпочтительно биоферментативного происхождения.

Гиалуроновая кислота или ее фармацевтически приемлемая соль могут иметь средневесовую молекулярную массу (Mw), составляющую от 700 кДа до 1400 кДа, предпочтительно 800-1000 кДа. Было обнаружено, что этот диапазон молекулярной массы обеспечивает идеальную аффинность к рецепторам гиалуроновой кислоты, идеальную продолжительность пролонгированного действия и лучшую стимуляцию биосинтеза гиалуроновой кислоты.

В композиции согласно изобретению гиалуроновая кислота или ее соль предпочтительно (a) имеет средневесовую молекулярную массу от 700 кДа до 1400 кДа, предпочтительно 800-1200 кДа.

Фармацевтически приемлемой солью гиалуроновой кислоты является гиалуронат натрия.

Композиция, по настоящему изобретению, предпочтительно содержит гиалуроновую кислоту и/или ее фармацевтически приемлемую соль в массовом количестве от 0,5 до 6%, более предпочтительно от 1% до 3,5% или от 1,5% до 3,2%, или от 4,5% до 5,5% по отношению к общей массе композиции.

Композиция, по настоящему изобретению, предпочтительно содержит метилсульфонилметан (МСМ, CAS номер 67-71-0) в количестве по массе, составляющем

от 1% до 12%, более предпочтительно от 2% до 7% или от 3% до 6,8%, или от 9% до 11% по отношению к общей массе композиции.

Было обнаружено, что композиция, содержащая количество МСМ, включенное в диапазоны, указанные выше, кроме того, позволяет максимизировать эффективность терапии, например, при парентеральной инфльтрационной терапии, и минимизировать побочные эффекты, в частности ощущение жжения в момент введения.

Композиция согласно настоящему изобретению может быть предназначена для терапевтического или нетерапевтического применения у людей или для ветеринарного применения, например, у домашних животных, таких как собаки или кошки, или у других млекопитающих, но не ограничиваясь ими. Композиция согласно настоящему изобретению предпочтительно предназначена для применения у людей.

Жидкая композиция для применения согласно настоящему изобретению, содержащая (i) эффективное количество смеси, которая включает или, альтернативно, состоит по меньшей мере из (a) гиалуроновой кислоты или ее соли и (b) метилсульфонилметана (МСМ), где (a) и (b) находятся в массовом соотношении от 1:2 до 1:4; и (ii) физиологически приемлемого носителя; представлена в твердой, жидкой или полутвердой (т.е. гелевой) форме для введения субъектам, нуждающимся в этом, соответствующим способом, известным специалисту в данной области техники. Указанные составы (твердые, жидкие или полутвердые) вышеуказанной жидкой композиции для применения, по настоящему изобретению, соответствуют фармацевтическим композициям, пищевым добавкам или композициям для медицинских устройств, описанным в настоящем изобретении.

В предпочтительном варианте осуществления применение композиции у субъекта осуществляют перорально, например, в форме раствора, суспензии, сиропа или продукта питания, содержащего композицию, включающую комбинацию (a) и (b), как указано выше, или в любой другой форме, известной специалисту в данной области техники.

В предпочтительном варианте осуществления применение композиции у субъекта осуществляют местно, например, путем нанесения притирания, крема, геля, мази, спрея, суспензии или раствора, содержащих композицию согласно изобретению, непосредственно на часть тела субъекта, подвергающегося лечению. Более предпочтительно, композиция согласно настоящему изобретению находится в форме раствора. Предпочтительными, но не ограничивающими примерами составов (в форме растворов) для местного применения являются растворы для влагалищного душа, назальные спреи, промывания для носа, растворы везикул и микроклизмы. Композиция согласно настоящему изобретению предпочтительно составлена в форме назального спрея

или промываний для носа.

Предпочтительно, когда жидкую композицию для применения по изобретению, включающую (i) эффективное количество смеси, которая содержит или, альтернативно, состоит по меньшей мере из (a) гиалуроновой кислоты или ее соли и (b) метилсульфонилметана (МСМ), где (a) и (b) находятся в массовом соотношении от 1:2 до 1:4; и (ii) физиологически приемлемый носитель, применяют у указанного субъекта местно, где указанная композиция представлена в жидкой форме.

Альтернативно, когда жидкая композиция по изобретению, включающая (i) эффективное количество смеси, которая содержит или, альтернативно, состоит по меньшей мере из (a) гиалуроновой кислоты или ее соли и (b) метилсульфонилметана (МСМ), где (a) и (b) находятся в массовом соотношении от 1:2 до 1:4, и (ii) физиологически приемлемого носителя, применяют у указанного субъекта местно, где указанная композиция представлена в форме геля. Гель представляет собой эластичный двухфазный коллоидный материал или состоит из жидкости, которая диспергирована и включена в твердую фазу. Предпочтительными, но не ограничивающими примерами составов в форме геля для местного применения являются ректальный гель, вагинальный гель, буккальный гель, назальный гель, глазной или периокулярный гель, местный или дермальный гель. Более предпочтительно, композиция согласно настоящему изобретению представлена в форме геля для ректального применения.

В предпочтительном варианте осуществления применение композиции у субъекта осуществляют парентерально, то есть путем инъекции раствора или суспензии, содержащей композицию по изобретению, субъекту, подлежащему лечению. Предпочтительными, но не ограничивающими примерами составов для парентерального введения являются внутривенные или внутрисуставные инъекционные растворы и подобные препараты.

Необходимо понять, что применение по изобретению может быть осуществлено одновременно, например, в одной композиции или в быстрой последовательности, например, с помощью двух или более композиций, взятых субъектом в любом порядке, в последовательности, близко расположенной по времени (например, от 1 до 5 минут) в двух разных композициях.

Композиция для применения в соответствии с настоящим изобретением может содержать, в дополнение к (a), (b) и фармацевтически приемлемому носителю, по меньшей мере один инертный ингредиент, такой как по меньшей мере одно вспомогательное вещество из обычно используемых и известных специалисту в данной области техники.

«Инертный ингредиент» означает любое вещество или комбинацию веществ, вспомогательных для производства фармацевтической, диетической или нутрацевтической формы, которое содержится в готовом продукте и не является активным ингредиентом, хотя он может изменять стабильность, высвобождение или другие его характеристики.

Неограничивающими примерами таких ингредиентов, как известно специалисту в области составов в фармацевтическом, нутрацевтическом или пищевом секторах, являются разбавитель, краситель, поверхностно-активное вещество, антиоксидант, подсластитель, ароматизатор, усилитель вязкости, эмульгирующие и увлажняющие вспомогательные вещества, консерванты, витамины, молочнокислые бактерии, растительные экстракты, хелатирующие агенты, хлорид натрия, метил- и этилпарабены, бензоат натрия, феноксиэтанол, сорбат калия, двухосновный фосфат натрия, одноосновный фосфат натрия, карбонат натрия, цитрат натрия, дегидроацетат натрия, глицирретовая кислота, производные целлюлозы, полисорбаты, глицерин, этиловый спирт и тому подобное.

В предпочтительном варианте осуществления композиция для применения в соответствии с настоящим изобретением содержит, кроме (a), (b) и фармацевтически приемлемого носителя, как определено выше, по меньшей мере один дополнительный активный ингредиент натурального или синтетического происхождения. Неограничивающими примерами указанных активных ингредиентов являются жиро- или водорастворимые витамины (A, C, E и т.д.), живые или тиндализованные молочнокислые бактерии, растительные экстракты, фосфолипиды (также в виде мицелл или липосом), противовоспалительные средства, антибиотики, вазоконстрикторы и заменители слюны.

В одном варианте осуществления композиция по изобретению предназначена для применения в качестве лекарственного средства.

В предпочтительном варианте осуществления композиция в соответствии с изобретением предназначена для использования в способе профилактического или терапевтического лечения по меньшей мере одного расстройства или патологии, вызванных или связанных с окислительным и/или воспалительным состоянием, где указанное лечение включает применение указанной композиции у субъекта.

В предпочтительном варианте осуществления композиция, по настоящему изобретению, предназначена для использования в способе лечения по меньшей мере одного расстройства или патологии из остеоартрита, вульвовагинальной атрофии, вагинальной сухости, абактериального цистита, простатита, ринита, синусита, ринореи,

аллергического ринита, мукозита, стоматита, дерматологических поражений, дефектов кожи, геморроя, трещин заднего прохода, трещин и поражений ректального канала. Жидкая композиция, по настоящему изобретению, для использования в вышеупомянутых способах лечения может быть представлена в жидкой форме, такой как, например, в форме раствора, или в полутвердой форме, такой как, например, в форме геля, или в твердой форме.

В предпочтительном варианте осуществления жидкая композиция, по настоящему изобретению, предназначена для применения при интра- и периартикулярном лечении ревматических заболеваний; в частности, указанная композиция предназначена для лечения бедра, колена, плеча, суставов и суставных поверхностей шеи, и мелких суставов кисти и стопы.

Предпочтительно указанная композиция предназначена для лечения остеоартрита коленного сустава путем внутрисуставной инъекции.

Предмет настоящего описания, кроме того, относится к способу профилактического и/или терапевтического лечения по меньшей мере одного расстройства или патологии, возникающих или связанных с окислительным и/или воспалительным состоянием, где указанный способ лечения включает применение композиции по изобретению, включающей (i) эффективное количество смеси, которая включает или, альтернативно, состоит по меньшей мере из (a) гиалуроновой кислоты или ее соли и (b) метилсульфонилметана (МСМ), где (a) и (b) находятся в массовом соотношении от 1:2 до 1:4; и (ii) физиологически приемлемого носителя, у субъекта, нуждающегося в этом.

Указанный способ лечения предпочтительно включает местное ректальное применение композиции по изобретению у указанного субъекта; в таком случае композиция по изобретению предпочтительно представлена в форме геля.

Альтернативно, указанный способ лечения включает местное назальное введение композиции по изобретению указанному субъекту; в таком случае композиция по изобретению предпочтительно представлена в форме жидкости, подходящей для назального применения (назальной жидкости или спрея).

Кроме того, указанный способ лечения включает пероральное или парентеральное введение композиции по изобретению указанному субъекту.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, пищевой добавке или медицинскому устройству (композиции для медицинского устройства), включающим жидкую композицию, содержащую по меньшей мере (a), (b) и фармацевтически приемлемый носитель, как описано выше.

В контексте настоящего изобретения термин «медицинское устройство» используется в значении согласно итальянскому Законодательному декрету № 46 от 24 февраля 1997 г. и Директиве 93/42/ ЕЕС от 14 июня 1993 г., т.е. в них указано вещество или другой продукт, независимо от того, используется ли он по отдельности или в комбинации, и который предназначен производителем для использования людьми для диагностики, профилактики, мониторинга, лечения или облегчения заболевания, и который не достигает своего основного предполагаемого действия в теле или на теле человека, для которого он предназначено фармакологическими, иммунологическими или метаболическими средствами, но который может помочь его функции такими средствами.

Предмет настоящего описания дополнительно относится к нетерапевтическому применению композиции по изобретению, как определено выше, включающей (i) эффективное количество смеси, которая включает или альтернативно, состоит по меньшей мере из (a) гиалуроновой кислоты или его соли, и (b) метилсульфонилметана (МСМ), где (a) и (b) находятся в массовом соотношении от 1:2 до 1:4, и (ii) физиологически приемлемого носителя, для нетерапевтического лечения по меньшей мере одного расстройства, вызванного или связанного с окислительным и/или воспалительным состоянием, где указанное нетерапевтическое применение включает применение композиции по изобретению у субъекта, нуждающегося в этом.

Указанная композиция для нетерапевтического применения содержит (a) и (b), как определено выше, в массовом соотношении (a):(b) от 1:2,5 до 1:3,5, предпочтительно, где указанное соотношение составляет 1:3.

Указанная композиция для нетерапевтического применения включает (a) гиалуроновую кислоту или ее соль, имеющую средневесовую молекулярную массу от 700 кДа до 1400 кДа, предпочтительно от 800 до 1200 кДа.

Указанная композиция для нетерапевтического применения включает (a) гиалуроновую кислоту или ее соль в количестве от 0,5% до 6%, более предпочтительно от 1% до 3,5% или от 1,5% до 3,2%, или от 4,5% до 5,5%, по отношению к общей массе композиции и/или МСМ (b) в количестве от 1% до 12%, более предпочтительно от 2% до 7% или от 3% до 6,8%, или от 9% до 11%, по отношению к общей массе композиции.

Указанная композиция для нетерапевтического применения включает указанную смесь, включающую или, альтернативно, состоящую из нековалентного комплекса между гиалуроновой кислотой (a) и МСМ (b).

Упомянутое нетерапевтическое применение позволяет проводить нетерапевтическое лечение по меньшей мере одного расстройства, вызванного или связанного с окислительным и/или воспалительным состоянием, выбранного из

остеоартрита, вульвовагинальной атрофии, сухости влагалища, абактериального цистита, простатита, ринита, синусита, ринореи, аллергического ринита, мукозита, стоматита, дерматологических поражений, дефектов кожи, геморроя, трещин заднего прохода, трещин и повреждений ректального канала.

Указанное нетерапевтическое применение включает парентеральное, пероральное или местное введение указанной композиции указанному субъекту, нуждающемуся в этом.

Указанное нетерапевтическое применение предпочтительно включает местное применение указанной композиции у указанного субъекта, нуждающегося в этом, где указанная композиция составлена в жидкой форме или в форме геля. Более предпочтительно, указанное местное применение представляет собой ректальное местное введение, и композиция представлена в жидкой форме или в форме геля, предпочтительно в форме геля.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению жидкой композиции, содержащей по меньшей мере (a), (b) и физиологически приемлемый носитель, для эстетических или косметических целей (нетерапевтического применения), например, в качестве наполнителя или спрея, или в качестве компонента крема, мази или геля, но не ограничиваясь этим.

Фармацевтическая композиция, пищевая добавка или медицинское устройство (композиция для медицинского устройства), по настоящему изобретению, может быть твердой, жидкой или полутвердой, например, в виде суспензии или геля, и она может быть в любой форме, известной специалисту в данной области пищевых, фармацевтических или нутрацевтических препаратов; в качестве неограничивающего примера, в форме капсулы, таблетки или порошка, который по меньшей мере частично растворяется во рту или растворим в воде, гранул, пеллет или микрочастиц, при необходимости содержащихся в саше, или в капсуле, или в мини-таблетке, жидкого или полутвердого препарата, геля, суспензии, раствора, двухфазной жидкой системы и в эквивалентных формах.

Варианты осуществления (FRn) настоящего изобретения изложены ниже:

FR1. Жидкая композиция, содержащая эффективное количество смеси, которая содержит или, альтернативно, состоит по меньшей мере из (a) гиалуроновой кислоты или ее соли и (b) метилсульфонилметана (МСМ), где (a) и (b) находятся в массовом соотношении от 1:2 до 1:4, и физиологически приемлемого носителя.

FR2. Композиция по FR1, где массовое соотношение между (a) и (b) составляет от 1: 2,5 до 1: 3,5, предпочтительно, где указанное соотношение составляет 1: 3.

FR3. Композиция по любому из предшествующих FR, где гиалуроновая кислота или ее соль (а) имеет средневесовую молекулярную массу от 700 кДа до 1400 кДа, предпочтительно от 800 до 1200 кДа.

FR4. Композиция по любому из предшествующих FR, где гиалуроновая кислота или ее соль (а) присутствует в количестве от 0,5% до 6%, более предпочтительно от 1% до 3,5% или от 1,5% до 3,2%, или 4,5% до 5,5% по отношению к общей массе композиции и/или MCM (b) присутствует в количестве от 1% до 12%, более предпочтительно от 2% до 7% или от 3% до 6,8%, или от 9% до 11%, по отношению к общей массе композиции.

FR5. Композиция по любому из предшествующих FR, где указанная смесь содержит или состоит из нековалентного комплекса между гиалуроновой кислотой (а) и MCM (b).

FR6. Композиция по любому из предшествующих FR для применения в качестве лекарственного средства.

FR7. Композиция для применения в соответствии с FR6 при профилактическом или терапевтическом лечении по меньшей мере одного расстройства или патологии, вызванной или связанной с окислительным и/или воспалительным состоянием, где указанное лечение включает применение указанной композиции у субъекта.

FR8. Композиция для применения по FR7, где указанное расстройство или патология представляет по меньшей мере одно из следующего: остеоартрит, вульвовагинальная атрофия, сухость влагалища, абактериальный цистит, простатит, ринит, синусит, ринорея, аллергический ринит, мукозит, стоматит, дерматологические поражения, дефекты кожи, геморрой, трещины заднего прохода, трещины и поражения ректального канала.

FR9. Композиция для применения по любому из FR 6-8, где указанное применение осуществляют местно или парентерально.

FR10. Фармацевтическая композиция, пищевая добавка или медицинское устройство, содержащее жидкую композицию по любому из FR 1-5.

Следующая экспериментальная часть предоставляет примеры практических вариантов осуществления изобретения, не ограничивая его объем.

Экспериментальная часть А

Целью исследования является физико-химическая характеристика образца гиалуроновой кислоты (ГК), растворенной в водном растворе с метилсульфонилметаном (МСМ) или без него. Поскольку предполагается, что нековалентное взаимодействие происходит между полисахаридом и органической молекулой с образованием комплексов ионной природы, были использованы методы, способные определять молекулярную массу

полимера, гидродинамический радиус и подвижность комплекса в растворе.

Материалы и методы

Образцы, проходящие анализ, были обозначены, как показано в таблице 1.

Таблица 1. Список образцов

Образец	Описание
ГК 1,6% + МСМ 5% (образец В согласно изобретению, G13364)	Продукт в шприце
Кондронил IAL ГК 1,6% (сравнительный образец А, G13365)	Продукт в шприце
Метилсульфонилметан (МСМ), серия 17010616	Продукт в форме порошка

Анализ HP-SEC/TDA (высокоэффективная гель-проникающая хроматография с тройным матричным детектором)

Распределение по молекулярной массе определяли с помощью инструментов и в хроматографических условиях, указанных ниже.

Прибор: система OmniSEC, Malvern Instruments.

Колонки: две колонки GMPWXL, внутр. диаметр 7,8 мм x 30 см, Tosoh Bioscience.

Температура: 40°C.

Подвижная фаза: 0,1 М NaNO₃, 0,05% NaN₃.

Поток: 0,6 мл/мин.

Детектор: показатель преломления, вискозиметр, прямоугольное и малоугловое рассеяние света.

Объем ввода: 100 мкл.

Калибровка детектора

Прибор был откалиброван по стандарту пуллулана, средневесовая молекулярная масса, характеристическая вязкость и концентрация которого были сертифицированы (PolyCAL Pullulan-57K-Std TDS3031, Malvern Instruments).

Подготовка образца

Растворы разбавляли подвижной фазой, чтобы получить концентрацию ГК около 0,4 мг/мл.

Обработка данных

Данные были обработаны с помощью специального программного обеспечения (OmniSEC, версия 4.6); получали хроматограмму от 0 до 36 мл, элюированный пик между 8,5 и 15 мл интегрировали и вводили значение dn/dc, равное 0,155, ранее определенное в институтской лаборатории.

Анализ динамического рассеяния света

Значения гидродинамического радиуса (эксперимент с ФКС (фотонной корреляционной спектроскопией)) и дзета-потенциала были определены с помощью приборов и в условиях хроматографии, указанных ниже.

Приборы

Использовали прибор DLS Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments).

Параметры сбора данных для экспериментов были следующими:

- Параметры для ФКС:

- Материал: белок
- Диспергатор: вода
- Температура: 25°C
- Время достижения системного равновесия: 30 сек.
- Кювета: одноразовая калибровочная кювета ZEN0040 (Malvern Instruments)
- Количество прогонов: 10
- Продолжительность прогона: 10 сек.
- Количество экспериментов: 3
- Задержка между экспериментами: 5 сек.
- Автоматическое затухание
- Обработка данных: общего назначения

- Параметры для дзета-потенциала:

- Материал: белок
- Диспергатор: вода
- Модель: F(Ка) Смолуховского = 1,50
- Температура: 25°C
- Время достижения системного равновесия: 30 сек.
- Кювета: одноразовая изогнутая капиллярная дзета-кювета (DTS10710)
- Количество прогонов: 10
- Количество экспериментов: 6
- Задержка между экспериментами: 5 сек.
- Автоматический выбор ослабления: Да
- Автоматическое затухание
- Обработка данных: однорежимная

Приготовление образца

Растворы разбавляли подвижной фазой, используемой для анализа HP-SEC/TDA, чтобы получить концентрацию ГК около 1,6 мг/мл, 0,32 мг/мл и 0,16 мг/мл.

ЯМР-анализ

Для анализа ЯМР использовали спектрометр Bruker Avance III HD, работающий на частоте 500 МГц и оборудованный гомо- и гетероядерным криогенным зондом (TCI Cryoprobe).

Параметры прибора ^1H -ЯМР:

- импульсная программа: zgpcrrg
- количество сканов: 16
- D1: 12 секунд
- ТД: 32К
- спектральное окно: 18 имп./мин
- температура: 303К

Приготовление образца

Образцы на основе гиалуроновой кислоты, уже растворенной в воде, разбавляли с использованием 99%D дейтерированной воды, и растворитель заменяли дейтерированной водой по меньшей мере дважды. Образцы, которые были анализировали, имели концентрацию приблизительно 8 мг ГК в 600 мкл D_2O . Образец порошка МСМ непосредственно растворяли в D_2O в концентрации 1 мг в 600 мкл.

Результаты

Высокоэффективная эксклюзионная хроматография с тройным матричным детектором

С целью анализа распределения по молекулярной массе образцы подвергали эксклюзионному хроматографическому анализу с использованием комбинации из четырех детекторов (с рассеянием света при 90° и 8° , с показателем преломления и вискозиметром). Первая повторная обработка хроматограмм позволяет определить распределение по молекулярной массе, и, следовательно, M_n (численную молекулярную массу), M_w (весовую молекулярную массу) и M_w/M_n (полидисперсность) (Ссылка: «Compendium of Polymer Terminology and Nomenclature IUPAC Recommendations», 2008-“Purple book” RSC Publishing). Используя вискозиметр, получали значение $[\eta]$ (характеристическую вязкость) для каждого значения молекулярной массы. Последние данные позволяют определить параметры Марка-Хаувинка (a и K), которые при соответствующей обработке вместе с данными рассеяния света предоставляют информацию как о макромолекулярном размере (радиусе вращения R_g), так и о любом разветвлении макромолекулы.

Чтобы обработать хроматографические данные с помощью программного обеспечения OminSEC, необходимо знать точную концентрацию образца путем наложения значения dn/dc образца, растворенного в растворе.

Все образцы вводили в двух экземплярах в соответствии с процедурами, изложенными выше. Ниже показана таблица, обобщающая полученные результаты (таблица 2) как среднее значение двух введений; в таблице приведены среднечисленная

молекулярная масса (M_n) и средневесовая молекулярная масса (M_w), выраженные в Дальтонах, полидисперсность (Pd), характеристическая вязкость $[\eta]$, выраженная в дл/г, гидродинамический радиус (R_h), выраженный в нм, и процент извлечения, который рассчитывают как процентное отношение между концентрацией, полученной из площади показателя преломления, полученной в результате наложения правильного значения dn/dc , и концентрацией приготовленного образца.

Также показаны хроматограммы проведенных введений (см. прилагаемую фигуру).

Таблица 2. Результаты HP-SEC/TDA

Образец	M_w (Да)	M_n (Да)	M_w/M_n	η (дл/г)	R_h (нм)	% извлечения
A	749100	532400	1,41	12,72	51,6	111
B	860900	552900	1,56	14,11	56,0	102

Значения средневесовой и среднечисленной молекулярной массы для образца B увеличиваются по сравнению с образцом A, также, как и значения гидродинамического радиуса и характеристической вязкости. Это может быть связано с присутствием МСМ, который увеличивает молекулярную массу полимера, с которым в этом случае он будет связан достаточно сильными взаимодействиями, которые не разрушаются во время хроматографии.

Анализ динамического рассеяния света (ФКС) и дзета-потенциала (Z_p)

Гидродинамический радиус продуктов оценивали с помощью динамического рассеяния света (ДРС). Методика измеряет скорость, с которой частицы движутся в результате броуновского движения в растворе, будь то гомогенный или коллоидный раствор: более крупные частицы движутся в нем медленнее, чем более мелкие. В частности, методика измеряет флуктуации во времени интенсивности рассеяния света и анализирует параметры времени/ рассеяния с помощью автокорреляционной функции $G(t)$ (Ссылка: Международный стандарт ISO 13321: 1996 и последующие версии и руководства производителя прибора Малверн, например: <http://149.171.168.221/partcat/wp-content/uploads/Malvern-Zetasizer-LS.pdf>).

Эта функция затухает в промежуток времени t по экспоненциальному закону:

$$G = A * e^{-\Gamma t} + 1$$

(где A - постоянная амплитуды, t - время, Γ - постоянная затухания).

В свою очередь, Γ зависит от коэффициента диффузии D_t и параметра q :

$$\Gamma = D_t * q^2$$

$$D_t = K_t / 6 \pi \eta R_h$$

$$q = (4 \pi (dn / dc) / \lambda) * \sin(\Phi)$$

где: K = постоянная Больцмана

t = температура

η = вязкость растворителя

R_h = гидродинамический радиус

n = показатель преломления растворителя

λ = длина волны лазера

Φ = угол рассеяния

Время анализа очень короткое (от 1 до 5 секунд); таким образом, можно повторить измерение несколько раз, чтобы уменьшить вариабельность отдельных измерений; программное обеспечение способно рассчитать среднюю кривую затухания из набора этих кривых.

Первым результатом, полученным путем обработки экспериментальных данных с помощью специального программного обеспечения, является распределение гидродинамических радиусов различных частиц, присутствующих в растворе. Посредством последующей математической переработки можно получить распределение средних гидродинамических радиусов, коррелирующих с молекулярной массой.

Z-среднее значение представляет собой средний размер частиц, который также учитывает наличие агрегатных структур или более коротких цепей. Однако, учитывая чрезвычайно полидисперсную природу образца и склонность заряженных полимеров к агрегации, этот параметр считается наиболее значимым для сравнения образцов, в отличие от анализа радиусов различных присутствующих видов.

На фиг. 1 показан анализ ГК (А) и ГК с МСМ (В) в различных концентрациях.

Таблица 3. Результаты ФКС с разведением в воде

Образец	[ГК] (мг/мл)	[МСМ] (мг/мл)	Z-среднее (нм)	Стандартное отклонение	Разведение
А	0,32	0	24	3,1	H ₂ O
	0,16	0	30	7,7	
В	0,32	1,0	22	1,92	H ₂ O
	0,16	0,5	48	16,6	

Корреляционные функции, полученные из этих первых экспериментов, показали существенный шум из-за присутствия агрегатных структур в значительных количествах. На фиг. 1а показаны, в качестве примера, кумулятивные кривые, полученные для образца А, и распределение по размерам, полученное в результате математического анализа кривой (фиг. 1б).

Наличие агрегатных цепочек, очевидно, влияет на определенное Z-среднее значение. Чтобы уменьшить это явление, было решено разбавить образец в 0,1 М NaNO₃, соли, используемой в подвижной фазе анализов ГПХ. В присутствии солей заряженные полисахариды обычно имеют тенденцию к значительному уменьшению электростатических взаимодействий, ответственных за явления агрегации. При

использовании физиологического раствора для разведения также было сочтено целесообразным проанализировать более концентрированный раствор (1,6 мг/мл ГК).

Явления агрегации значительно уменьшились по сравнению с образцами, разбавленными водой, что может быть выведено из анализа автокорреляционных функций, явно более интенсивных и характеризующихся меньшим уровнем шума, чем полученные ранее. На фиг. 2 показана кривая автокорреляции А в качестве примера.

Распределение гидродинамических радиусов было получено путем обработки корреляционных кривых, показанных на фиг. 3а и 3б. Как и в случае образцов, разбавленных в воде, увеличение гидродинамических радиусов наблюдается при уменьшении концентрации, что является типичным поведением для заряженных полимеров, которые имеют тенденцию к увеличению своей конформации в растворе при усилении разбавления, потому что они имеют больше «пространства». Кроме того, как и ожидалось, агрегированные виды оказались менее интенсивными по сравнению с результатами, полученными при отсутствии соли.

Таблица 4 показывает полученные Z-средние значения вместе с соответствующими стандартными отклонениями.

Таблица 4. Результаты ФКС с разведением в 0,1 М NaNO₃

Образец	[ГК] (мг/мл)	[МСМ] (мг/мл)	Z-среднее (нм)	Стандартное отклонение	Разведение
А	1,6	0	20	3,4	NaNO ₃ 0,1 М
	0,32	0	39	4,1	
	0,16	0	43	8,1	
В	1,6	5,0	19	0,5	NaNO ₃ 0,1 М
	0,32	1,0	37	2,1	
	0,16	0,5	39	6,1	

Был проведен дополнительный эксперимент с разбавлением образцов ацетатным буферным раствором с рН 5,5, чтобы частично подкислить карбоксильную группу гиалуроновой кислоты. Таблица 5 показывает полученные Z-средние значения.

Таблица 5. Результаты ФКС с разведением в ацетатном буфере с рН 5,5

Образец	[ГК] (мг/мл)	[МСМ] (мг/мл)	Z-среднее (нм)	Стандартное отклонение	Разведение
А	0,32	0	30	1,58	Ацетатный буфер
	0,16	0	38	2,68	
В	0,32	1,0	31	3,32	Ацетатный буфер
	0,16	0,5	47	2,05	

Корреляционные функции являются хорошими для обоих образцов и в обоих условиях концентрации, и присутствие агрегатов существенно уменьшается. При сравнении полученных результатов образец, содержащий ГК + МСМ (В), показывает значительно более высокое Z-среднее значение, чем гиалуроновая кислота как таковая, и это соответствует результатам GPC-TDA (таблица 2).

Дальнейшее исследование проводили, измеряя поверхностный заряд, дзета-потенциал (Z_p), который позволяет оценить степень дисперсности частиц в растворе и явления агрегации. Фактически, если значение Z_p больше, чем примерно +30 мВ или меньше, чем -30 мВ, частицы могут считаться хорошо диспергированными в растворителе; однако, если значение становится близким к нулю, это означает, что поверхностные заряды аннулируются из-за явлений электростатического взаимодействия и, таким образом, молекулы агрегируют. Этот параметр полезен в случае заряженных полимеров, поскольку он дает представление об изменении электростатических взаимодействий, когда две молекулы смешаны. Дзета-потенциал обычно измеряют путем диспергирования полимера в воде таким образом, чтобы не уменьшать поверхностные заряды при взаимодействии полимер-растворитель. В этом случае разбавление образцов проводят ацетатным буфером; как видно из анализа размеров, в присутствии только воды образец образует большие агрегаты, и поэтому значения потенциала будут нестабильными и едва ли надежными. Таким образом, предпочтительно маскировать поверхностные заряды в минимальной степени и одновременно уменьшать явления агрегации с помощью ацетатного буфера, также используемого для анализа размеров.

В таблице 6 приведены результаты, полученные в различных экспериментальных условиях.

Таблица 6. Результаты Z_p

Образец [ГК] (мг/мл)	Z_p (мВ) pH 5,5 ацетатный буфер	
	0,32	0,16
А	$-15 \pm 2,12$	$-15 \pm 1,55$
В	$-8 \pm 0,71$	$-11 \pm 2,15$

Уменьшение Z_p наблюдается в образце В по сравнению с образцом А, что указывает на то, что присутствие МСМ уменьшает отрицательный заряд гиалуроновой кислоты, следовательно, посредством электростатического взаимодействия.

ЯМР анализ

Прежде всего, регистрировали протонные спектры трех продуктов, чтобы идентифицировать характерные химические сдвиги различных функциональных групп и точно настроить условия получения. Фиг. 4 показывает ^1H -ЯМР спектр ГК, образец А.

Можно наблюдать два пика, относящихся к двум аномерным протонам дисахаридного повторяющегося звена около 4,5 имп./мин, сигналы протонов в положении 2,3,3 сахаридного кольца и, наконец, метильный сигнал при примерно 2 имп./мин, относящийся к N-ацетил глюкозамину. Значения интегралов соответствуют химической структуре полисахарида, что указывает на то, что параметры, используемые для получения спектра, пригодны для получения количественного отклика.

В следующей части исследования регистрировали протонный спектр образца МСМ; на фиг. 5 показан профиль ЯМР.

Как и ожидалось, существует только сигнал с частотой около 3 имп./мин, относящийся к двум CH_3 -группам, присутствующим в молекуле.

Наконец, регистрировали ^1H -ЯМР спектр образца, содержащего ГК и МСМ согласно настоящему изобретению (фиг. 6).

Наложение протонных спектров трех образцов (фиг. 7) показывает, что сигналы ГК резонируют с одинаковым химическим сдвигом независимо от присутствия МСМ в растворе, тогда как сигнал, относящийся к метилам органической молекулы, сдвигается один раз в смеси с полисахаридом, как подчеркнуто расширением, представленным на фиг. 8.

Этот сдвиг может зависеть от взаимодействия между гиалуроновой кислотой и МСМ, которое приводит к изменению химического сдвига.

Чтобы подтвердить взаимодействие между двумя структурами, были проведены измерения ЯМР DOSY (диффузионно-упорядоченной спектроскопии); это позволяет оценить коэффициент диффузии по способности ядра изменять положение в магнитном поле. При использовании градиента магнитного поля (то есть магнитного поля, которое постепенно изменяется вдоль вертикальной оси, вдоль направления магнитного поля), который добавляется к статическому магнитному полю прибора, каждая точка будет иметь магнитное поле, которое также зависит от ее позиции; воздействующее магнитное поле (B) будет выражаться как:

$$B = B_0 + G_{zz}$$

Где B_0 - статическое магнитное поле,

G_{zz} - коэффициент градиента,

z - положение вдоль вертикальной оси.

Следовательно, два атома водорода, которые имеют одинаковое химическое окружение в отсутствие градиента, но разное положение по вертикали, будут давать сигнал поглощения на одной и той же частоте, тогда как в присутствии градиента они будут давать две разные линии. С помощью комбинации радиочастотного импульса и откалиброванных временных интервалов можно привести две линии к одному значению, то есть перефокусировать их (как если бы мы поместили двойное изображение в фокус), чтобы снова получить единую линию. Это происходит при предположении, что за время импульса атомы водорода (точнее, молекулы, которые их содержат) не движутся. Если, напротив, они перемещаются (в результате того, что они рассеяны, то есть они перемещаются в растворе), часть сигнала будет потеряна, потому что она не будет

«перефокусирована» и будет потеряна на фоне шума. Поэтому в эксперименте DOSY интенсивность резонансных сигналов ядер водорода (I) зависит от коэффициента диффузии D , который измеряет скорость движения молекул, и временного интервала τ , используемого в «перефокусировке».

$$I = I_0 e^{-bD}$$

где I_0 - начальная интенсивность, b - коэффициент, который зависит от времени τ , а D - коэффициент диффузии.

Коэффициент диффузии, в свою очередь, прямо пропорционален температуре T и обратно пропорционален гидродинамическому радиусу (R_h), то есть размеру молекулы:

$$D = \text{const } T / R_h$$

Выполняя серию экспериментов с разными временами (то есть изменяя коэффициент b), можно определить коэффициент диффузии D для каждого сигнала.

Если мы проанализируем смесь веществ, в спектре ЯМР мы увидим все сигналы ядер водорода присутствующих молекул. В эксперименте DOSY сигналы могут быть разделены на основе их коэффициента диффузии. Сигналы ядер одной и той же молекулы дают одинаковое значение D , тогда как сигналы разных молекул с различным D будут различны. Это различие подчеркивается делением сигналов во втором измерении, которое различает значения логарифма D . Сигналы ядра водорода одной и той же молекулы будут на одной линии, а сигналы разных молекул будут на разных линиях.

Следовательно, с помощью этого эксперимента можно разделять спектры отдельных молекул без разделения соответствующих соединений, а скорее на основе их способности мигрировать; таким образом, можно сказать, что это ЯМР-эквивалент хроматографии, такой как ВЭЖХ или ГХ. В таблице 7 приведены результаты, полученные в экспериментах DOSY, проведенных на трех образцах.

Таблица 7. Результаты экспериментов DOSY

Образец	CH ₃ (м ² /с)	OAc (м ² /с)	H ₁ (м ² /с)
S3410	1,27 x 10 ⁻⁹	-	-
A	-	5,74 x 10 ⁻¹²	12,9 x 10 ⁻¹² ; 7,91 x 10 ⁻¹²
B	1,22 x 10 ⁻⁹	1,05 x 10 ⁻¹²	2,99 x 10 ⁻¹² ; 2,21 x 10 ⁻¹²

Можно наблюдать, что коэффициенты диффузии как метилов МСМ, так и протонов полисахарида в образце В ниже, чем в отдельных компонентах А и S3410. Это подтверждает взаимодействие между двумя молекулами, которое приводит к уменьшению их подвижности в растворе, следовательно, к уменьшению коэффициента диффузии и соответствующему увеличению гидродинамического радиуса, причем эти параметры обратно пропорциональны.

Выводы

Сравнительное исследование, проведенное для раствора, содержащего ГК, и раствора ГК с МСМ в массовом соотношении 1:3 (последнее в соответствии с изобретением) предоставило физико-химические параметры, полезные для характеристики не только полимерного компонента, но и взаимодействия между ГК и МСМ.

Во-первых, наблюдалось увеличение средних молекулярных масс, гидродинамического радиуса и характеристической вязкости образца, содержащего ГК + МСМ по изобретению, по сравнению с ГК как таковой. Увеличение размера было также подтверждено результатами динамического рассеяния света, хотя условия испытаний обязательно различались. Кроме того, измерения дзета-потенциала выявили изменение поверхностного заряда гиалуроновой кислоты. В частности, снижение дзета-потенциала наблюдалось в присутствии МСМ.

Наконец, взаимодействие между ГК и МСМ было подтверждено с помощью ЯМР-спектроскопии, основанной как на изменении, наблюдаемом в химическом сдвиге малой органической молекулы, так и на измерении коэффициентов диффузии протонов, участвующих в двойной системе ГК-МСМ.

На фиг. 9 показаны кривые гидролиза продукта А (G13365), содержащего только ГК, и продукта В (G13364), содержащего ГК + МСМ (все эксперименты проводили в двух повторностях).

Различные кинетики сопровождали анализом GPC-TDA разных образцов.

Было показано, что молекулярные массы в конце гидролиза аналогичны для двух продуктов, но скорость, с которой достигается значительное снижение молекулярной массы, изменяется, то есть для продукта В по изобретению наблюдается явно более медленная кинетика гидролиза.

Экспериментальная часть (В)

Сравнительная оценка *in vitro* потенциальной противовоспалительной активности композиции по изобретению.

1) Цель испытания

Цель испытания - оценить, способны ли тестируемые продукты (композиция по изобретению, сравнительные соединения и контроли) в различных концентрациях снижать продукцию цитокинов *in vitro*. По этой причине была проверена их эффективность в снижении синтеза интерлейкина-1 (ИЛ-1), интерлейкина-6 (ИЛ-6) и фактора некроза опухоли- α (ФНО- α). Считается, что такая способность делает продукт потенциальным успокаивающим или противовоспалительным кандидатом *in vivo*,

способным уменьшить процесс покраснения, раздражения и воспаления кожи.

Кожа - это самый большой орган человеческого тела с уникальной структурой, которая делает её барьером против инфекции и других потенциальных рисков/вредных факторов окружающей среды. Раздражение кожи представляет собой местную обратимую неиммунологическую реакцию воспалительного типа, характеризующуюся эритемой и отеком.

Одним из способов установления успокаивающего или противовоспалительного действия косметического или фармацевтического продукта является измерение маркеров воспаления, указывающих на раздражение кожи.

Различные раздражающие вещества могут вызывать воспалительные процессы. Основным механизмом, используемым эпидермальными клетками для участия в воспалительных реакциях кожи, является продукция цитокинов и ответ на них. В эпидермисе кератиноциты являются основным источником цитокинов вместе с клетками Лангерганса, тучными клетками кожи, дендритными клетками и макрофагами. В то время как кератиноциты в покое вырабатывают некоторые цитокины конституционно, многочисленные стимулы окружающей среды, включая ультрафиолетовое излучение и химические агенты, могут стимулировать высвобождение ими воспалительных цитокинов (ИЛ-1, ФНО- α), хемотаксических цитокинов (таких как ИЛ-8) и цитокинов, которые способствуют пролиферации клеток (таких как ИЛ-6 и ИЛ-7).

ИЛ-1 β является членом семейства интерлейкина-1. Этот цитокин продуцируется активированными макрофагами в виде пропротеина, который превращается в его активную форму путем протеолитического расщепления каспазой-1. Этот цитокин является важным медиатором воспалительного ответа и участвует в многочисленных клеточных активностях, включая пролиферацию, дифференцировку клеток и апоптоз. Увеличение выработки ИЛ-1 вызывает ряд различных аутовоспалительных синдромов.

ФНО- α представляет собой цитокин, который связывается с рецепторами TNFR-55 и TNFR-75, которые экспрессируются на всех соматических клетках. Он продуцируется различными типами клеток, но, прежде всего, активированными моноцитами, и может вызывать гибель клеток в некоторых опухолевых клеточных линиях. ФНО- α является мощным пирогеном, он запускает каскад цитокинов и увеличивает проницаемость сосудов, тем самым привлекая макрофаги и нейтрофилы в местах бактериальной, грибковой, вирусной или паразитарной инфекции. ФНО- α играет роль при заболеваниях воспалительного генеза.

II) Материал

II.1) Клеточные линии и условия культивирования:

Испытание проводили на кератиноцитах человека (Hker), культивируемых в среде DMEM (среде Игла в модификации Дульбекко), с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (10%) и глюкозы (4,5 г/л), и инкубированных в стандартных условиях культивирования (37°C, 5% CO₂). Применяли лучшие практики для клеточной культуры.

II.2) Протестированные образцы:

A. Joyflex 2% (сравнительное соединение): натриевая соль гиалуроновой кислоты 2% (Mw ГК 800-1200 кДа).

B. Joyflex Proakjn (соединение по изобретению): натриевая соль гиалуроновой кислоты 1,6% (Mw ГК 800-1200 кДа) + MSM 5%.

C. Humovis (сравнительное соединение): натриевой соли гиалуроновой кислоты гексадециламид (Mw ГК 800 кДа).

D. Synolis (сравнительное соединение): натриевая соль гиалуроновой кислоты 1,6% (Mw ГК 2200 кДа) + сорбитол 4%.

Подпись, ГК: гиалуроновая кислота

III) Методы

III.1) Оценка жизнеспособности клеток

Перед определением цитокинов был проведен анализ жизнеспособности клеток с целью выбора концентраций, на которых следует проводить последующий анализ. В конце анализа тест на жизнеспособность повторяли (при отсутствии и в присутствии ЛПС), чтобы установить, оказывала ли проведенная обработка отрицательное влияние на клетки. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью теста МТТ; МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид] представляет собой желтое соединение тетразола, которое восстанавливается клетками до фиолетового формазана. Это превращение вызвано НАДФН или НАДН, продуцируемыми дегидрогеназами, присутствующими в метаболически активных клетках. Клетки обрабатывали МТТ (1 мг/мл) и инкубировали в течение 3 часов в стандартных условиях. В конце этого периода раствор МТТ удаляли и в каждую лунку добавляли 100 мкл изопропанола для растворения образовавшихся кристаллов формазана. Абсорбцию (оптическую плотность, ОП) определяли с помощью спектрофотометрического анализа при длине волны 540 нм.

III.2) Анализ цитокинов

Испытание проводили параллельно на двух сериях клеток: необработанной и обработанной липополисахаридом (ЛПС) для стимуляции выработки интерлейкинов. Клетки обрабатывали предварительно установленными концентрациями тестируемого продукта и положительным контролем (CQ). Клетки, не обработанные образцом, представляют собой отрицательный контроль. Содержание ИЛ-1β, ИЛ-6 и ФНО-α в

культуральной среде определяли с помощью ИФА (иммуноферментного анализа), очень широко используемого биохимического метода для количественного определения белков и пептидов. В ИФА специфический антиген для идентифицируемого интерлейкина иммобилизуют на твердой поверхности (на дне лунки), куда добавляют среду для анализа. Детекцию осуществляют с помощью биотинилированного вторичного антитела, способного реагировать с конъюгатом стрептавидин-пероксидаза хрена. Колориметрическая реакция пропорциональна количеству присутствующего цитокина. Результаты считывали с помощью спектрофотометра при 450 нм. Полученные значения затем интерполировали по стандартной кривой для интерлейкина.

IV) Результаты

IV.1) Оценка жизнеспособности клеток

Таблица 8

	Концентрация образца (мг/мл)							
	0,0391	0,0781	0,156	0,313	0,625	1,25	2,5	5,0
A	98,38	108,64	103,78	113,91	105,62	114,99	103,19	88,50
B	105,84	117,35	116,19	113,02	105,25	116,53	120,01	100,29
C	101,00	108,64	105,96	110,59	102,41	108,34	104,13	108,12
D	104,78	99,60	99,18	113,08	108,11	113,68	115,16	105,62

Оптическая плотность (ОП), измеренная при 540 нм, пропорциональна жизнеспособности клеток. Проценты рассчитывали на основе значений поглощения при 540 нм, принимая во внимание поглощение отрицательного контроля (необработанные клетки) за 100%. Образец A: Joyflex 2%; Образец B: Joyflex Proakjn; Образец C: Numovis; Образец D: Synolis.

Кератиноциты обрабатывали скалярными концентрациями тестируемых продуктов (разведения 1:2, начиная с 5,0 мг/мл), и было установлено, что жизнеспособность клеток существенно не снижается при тестируемых концентрациях (таблица 8); на основании полученных результатов для анализа цитокинов были выбраны концентрации 5,0; 2,0 и 1,0 мг/мл.

IV.2) Анализ цитокинов

Для анализа цитокинов клетки обрабатывали исследуемым образцом в установленных концентрациях. Необработанные клетки представляют отрицательный контроль. Вещество с известной противовоспалительной активностью использовали в качестве положительного контроля (CQ). Продукцию цитокинов индуцировали с использованием липополисахарида (ЛПС). В конце анализа проводили второй тест МТТ для проверки жизнеспособности клеток.

IV.2.1) Испытание на жизнеспособность клеток при отсутствии и в присутствии ЛПС

Таблица 9

	ЛПС (-)			ЛПС (+)		
	Образец (мг/мл)			Образец (мг/мл)		
	5,0	2,0	1,0	5,0	2,0	1,0
A	99,11	97,87	97,95	86,22	88,40	89,24
B	95,67	94,70	95,98	87,57	85,02	84,83
C	92,77	91,64	94,24	82,22	82,75	81,40
D	84,22	88,94	86,11	85,02	82,79	81,49

Поглощение, измеренное при 540 нм, пропорционально жизнеспособности клеток. Проценты рассчитывали на основе значений поглощения при 540 нм, принимая во внимание поглощение отрицательного контроля (необработанные клетки) за 100%. Образец A: Joyflex 2%; Образец B: Joyflex Proакjn; Образец C: Нумовис; Образец D: Synolis.

Обработка ЛПС и тестируемым образцом не вызывала каких-либо существенных изменений жизнеспособности клеток (таблица 9).

IV.2.2) Анализ ИЛ-1 β

Таблица 10

	ИЛ-1 β (пг/мл)				Снижение (%)					
	Образец (мг/мл)			Положи- тельный	CQ	Образец (мг/мл)			Положи- тельный	CQ
	5,0	2,0	1,0			5,0	2,0	1,0		
A	206,05	204,47	205,26	231,75	131,79	11,09	11,77	11,43	0,00	43,13
B	186,62	195,21	197,89			19,47	15,76	14,61		
C	201,62	202,93	208,81			13,00	12,43	9,90		
D	207,10	201,44	202,85			10,64	13,08	12,47		

Поглощение, измеренное при 450 нм, прямо пропорционально количеству ИЛ-1, продуцируемого клетками. Значения интерполировали со стандартной кривой для ИЛ-1 β , а результаты выражали в пг/мл. Образец A: Joyflex 2%; Образец B: Joyflex Proакjn; Образец C: Нумовис; Образец D: Synolis.

Образец B показал способность к уменьшению выработки ИЛ-1 при всех испытанных концентрациях (таблица 10 и фиг. 10). В присутствии образцов A, C и D снижение ИЛ-1 β было значительно меньшим по сравнению с образцом B.

IV.2.3) Анализ ИЛ-6

Таблица 11

	ИЛ-6 (пг/мл)				Уменьшение (%)					
	Образец (мг/мл)			Положи- тельный	CQ	Образец (мг/мл)			Положи- тельный	CQ
	5,0	2,0	1,0			5,0	2,0	1,0		
A	981,41	970,30	962,15	1067,70	460,30	8,08	9,12	9,89	0,00	56,89
B	799,19	958,81	998,81			25,15	10,20	6,45		
C	965,48	1016,22	983,63			9,57	4,82	7,87		
D	979,56	1036,59	983,26			8,26	2,91	7,91		

Поглощение, измеренное при 450 нм, прямо пропорционально количеству ИЛ-6, продуцируемого клетками. Значения интерполировали со стандартной кривой для ИЛ-6, а результаты выражали в пг/мл. Образец A: Joyflex 2%; Образец B: Joyflex Proакjn; Образец

С: Нумовис; Образец D: Synolis.

Образец В показал способность к снижению выработки ИЛ-6 при испытанных концентрациях 5,0 и 2,0 мг/мл (таблица 11 и фиг. 11). При концентрации 5,0 мг/мл образец В был намного более эффективным, чем другие образцы А, С и D, в снижении уровня ИЛ-6.

IV.2.4) Анализ ФНО- α

Таблица 12

	ФНО- α (пг/мл)					Снижение (%)				
	Образец (мг/мл)			Положительный	CQ	Образец (мг/мл)			Положительный	CQ
	5,0	2,0	1,0			5,0	2,0	1,0		
А	519,92	517,42	505,75	560,75	264,08	7,28	7,73	9,81	0,00	52,91
В	443,25	489,92	499,08			20,95	12,63	11,00		
С	512,42	519,92	510,75			8,62	7,28	8,92		
Д	517,42	524,08	529,92			7,73	6,54	5,50		

Поглощение, измеренное при 450 нм, прямо пропорционально количеству ФНО- α , продуцируемого клетками. Значения интерполировали со стандартной кривой для ФНО- α , и результаты выражали в пг/мл. Образец А: Joyflex 2%; Образец В: Joyflex Proakjn; Образец С: Нумовис; Образец D: Synolis.

Образец В показал способность к снижению выработки ФНО- α при всех испытанных концентрациях (таблица 12 и фиг. 12).

При концентрациях 5,0 и 2,0 мг/мл образец В был более эффективным, чем другие образцы, в снижении уровня ФНО- α .

VI.3) Резюме

Из полученных результатов было установлено, что образец В (Joyflex Proakjn, соединение по изобретению) способен снижать уровни цитокинов *in vitro* в культурах кератиноцитов. В частности, он снижает уровни ИЛ-1 и ФНО- α при всех испытанных концентрациях (5,0; 2,0 и 1,0 мг/мл) и снижает уровни ИЛ-6 при испытанных концентрациях 5,0 и 2,0 мг/мл. Образец В более эффективен, чем другие образцы А, С и D (сравнительные соединения), в снижении количества рассматриваемых цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α); эффект особенно очевиден при испытанной концентрации 5,0 мг/мл.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Жидкая композиция, содержащая (i) эффективное количество смеси, которая включает или, альтернативно, состоит по меньшей мере из (a) гиалуроновой кислоты или ее соли и (b) метилсульфонилметана (МСМ), где (a) и (b) находятся в массовом соотношении от 1: 2 до 1: 4; и (ii) физиологически приемлемого носителя; где указанная композиция предназначена для использования в способе профилактического или терапевтического лечения по меньшей мере одного расстройства или патологии, вызванной или связанной с окислительным и/или воспалительным состоянием, где указанную композицию применяют у субъекта, нуждающегося в этом.

2. Композиция для применения по п. 1, где массовое соотношение между (a) и (b) составляет от 1:2,5 до 1:3,5, предпочтительно, где указанное соотношение составляет 1:3.

3. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, где гиалуроновая кислота или ее соль (a) имеет средневесовую молекулярную массу от 700 кДа до 1400 кДа, предпочтительно от 800 до 1200 кДа.

4. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, где гиалуроновая кислота или ее соль (a) присутствует в количестве от 0,5% до 6%, более предпочтительно от 1% до 3,5% или 1,5% до 3,2% или от 4,5% до 5,5% по отношению к общей массе композиции, и/или МСМ (b) присутствует в количестве от 1% до 12%, более предпочтительно от 2% до 7% или от 3% до 6,8%, или от 9% до 11% по отношению к общей массе композиции.

5. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, где указанная смесь содержит или альтернативно состоит из нековалентного комплекса между гиалуроновой кислотой (a) и МСМ (b).

6. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, где указанное расстройство или патология является по меньшей мере одним из следующих: вульвовагинальная атрофия, сухость влагалища, абактериальный цистит, простатит, ринит, синусит, ринорея, аллергический ринит, мукозит, стоматит, дерматологические поражения, дефекты кожи, геморрой, трещины заднего прохода, трещины и повреждения ректального канала.

7. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, где указанную композицию применяют у указанного субъекта парентерально.

8. Композиция для применения по любому из пп. 1-6, где указанную композицию применяют у указанного субъекта местно.

9. Композиция для применения по п. 8, где указанную композицию применяют у

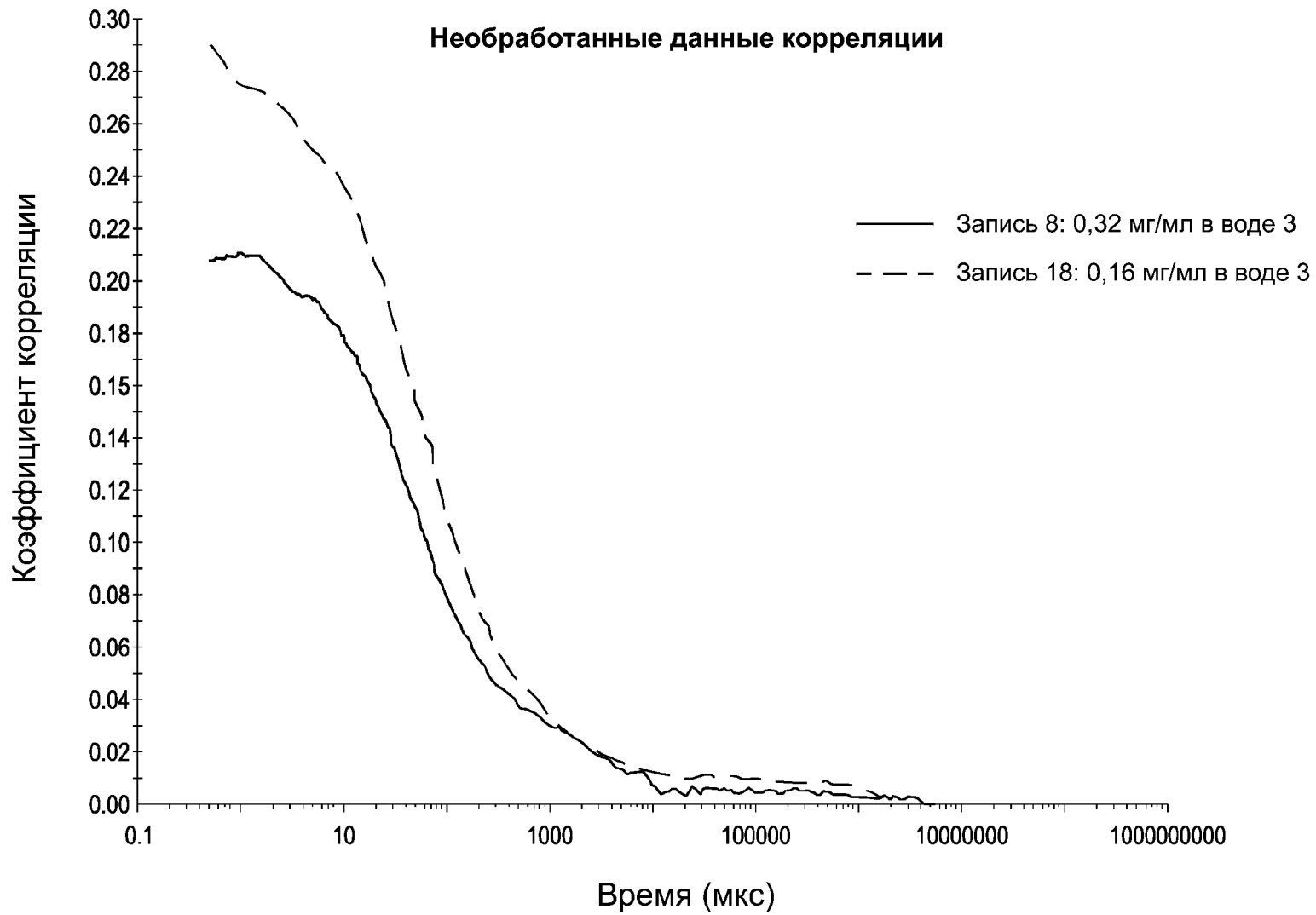
указанного субъекта местно, и указанная композиция приготовлена в жидкой форме.

10. Композиция для применения по п. 8, где указанную композицию применяют у указанного субъекта местно, и указанная композиция приготовлена в форме геля.

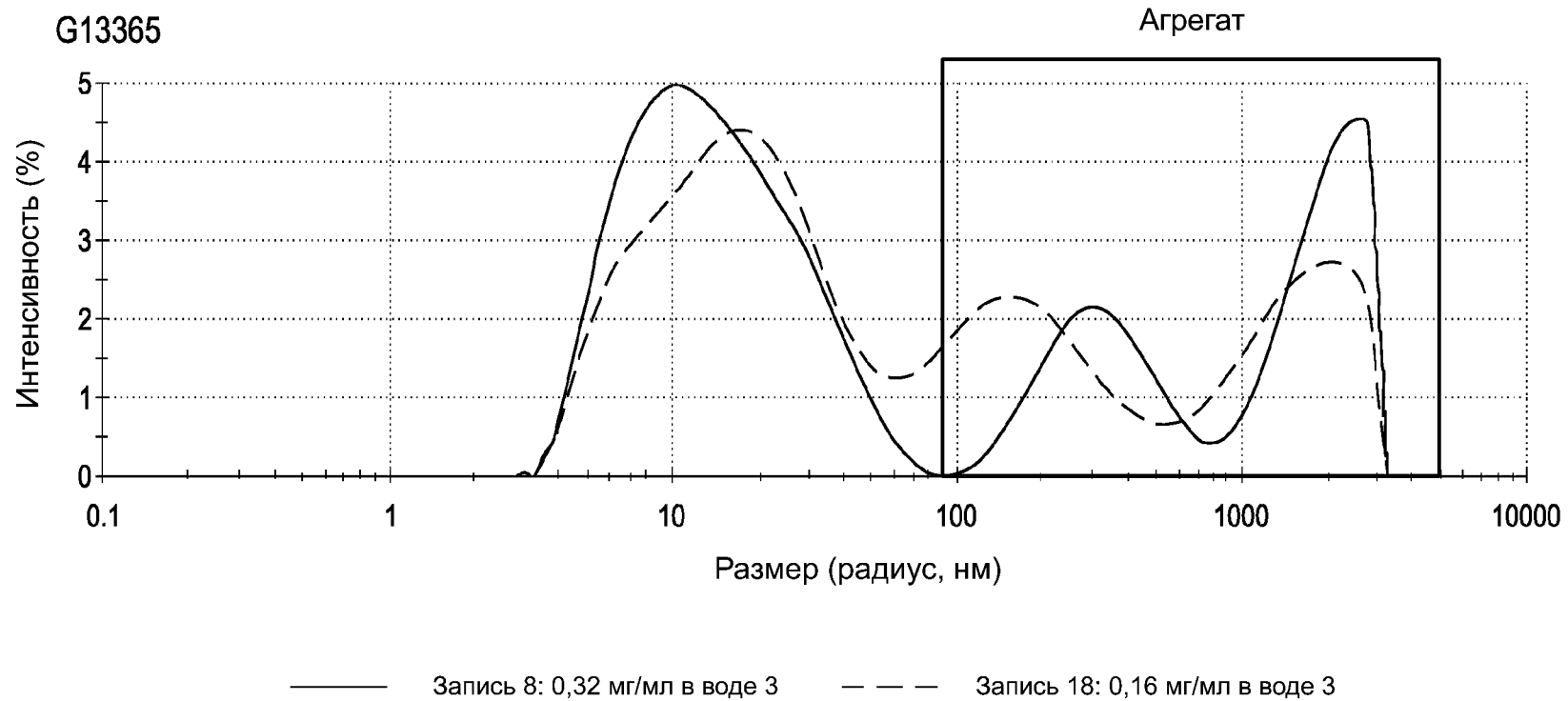
11. Композиция для применения по любому из пп. 8-10, где указанную композицию применяют у указанного субъекта ректально.

12. Нетерапевтическое применение жидкой композиции, содержащей (i) эффективное количество смеси, которая включает или, альтернативно, состоит по меньшей мере из (a) гиалуроновой кислоты или ее соли и (b) метилсульфонилметана (МСМ), где (a) и (b) находятся в массовом соотношении от 1:2 до 1:4; и (ii) физиологически приемлемого носителя; для нетерапевтического лечения по меньшей мере одного расстройства, вызванного или связанного с окислительным и/или воспалительным состоянием, где указанное нетерапевтическое применение включает применение указанной композиции у субъекта, нуждающегося в этом.

Фиг. 1А

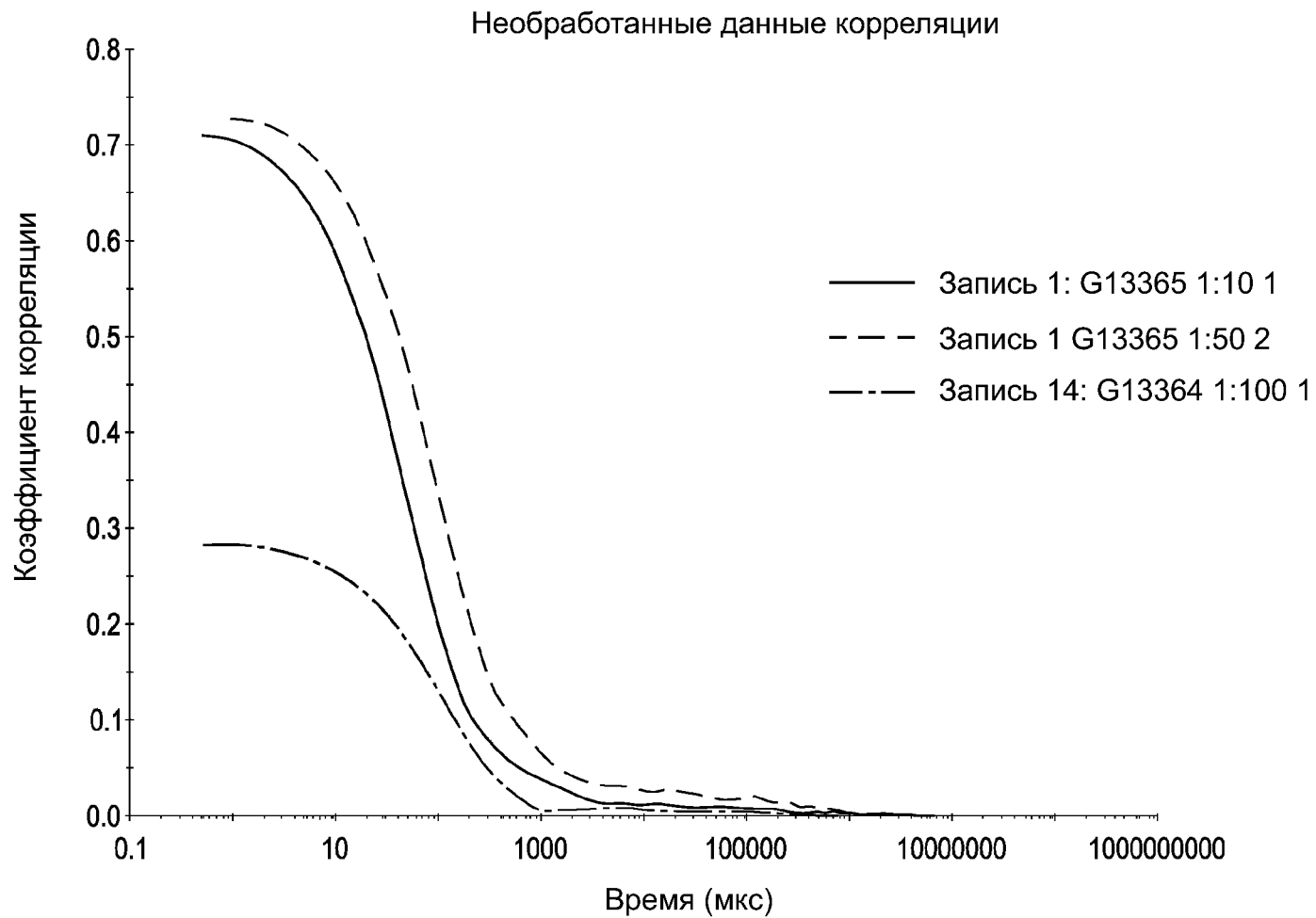


Распределение размеров по интенсивности



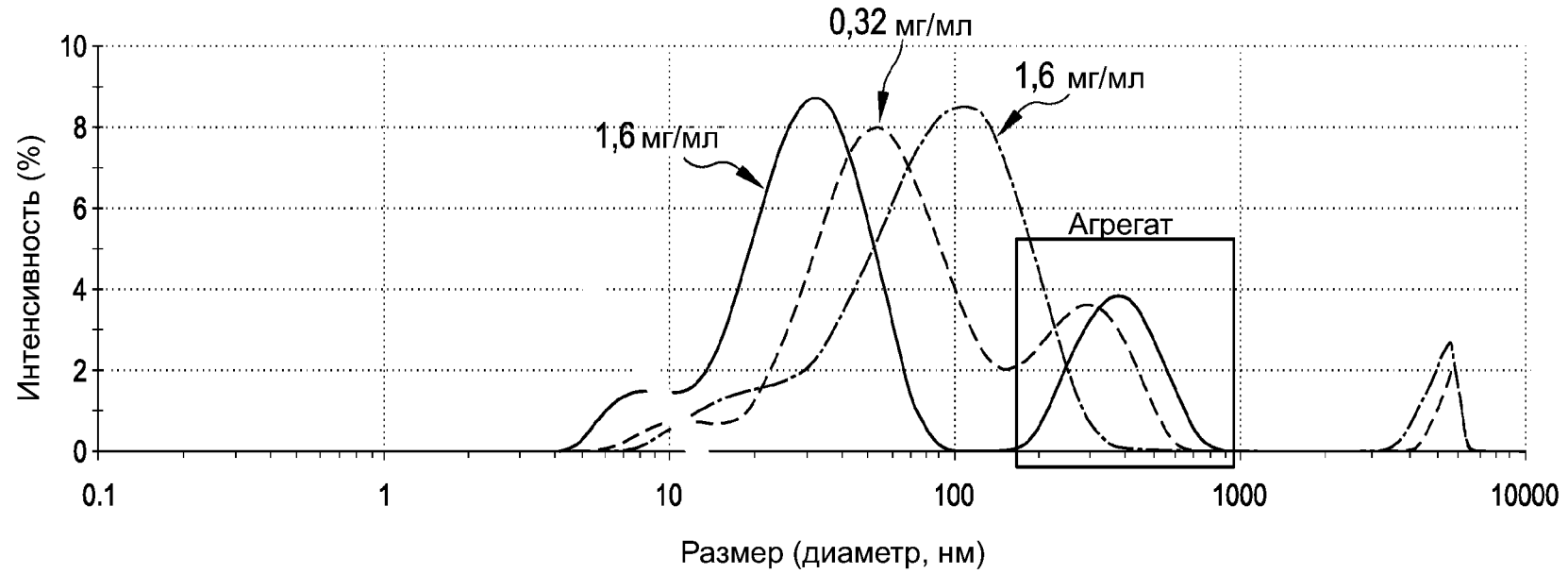
2/13

Фиг. 1В



Фиг. 2

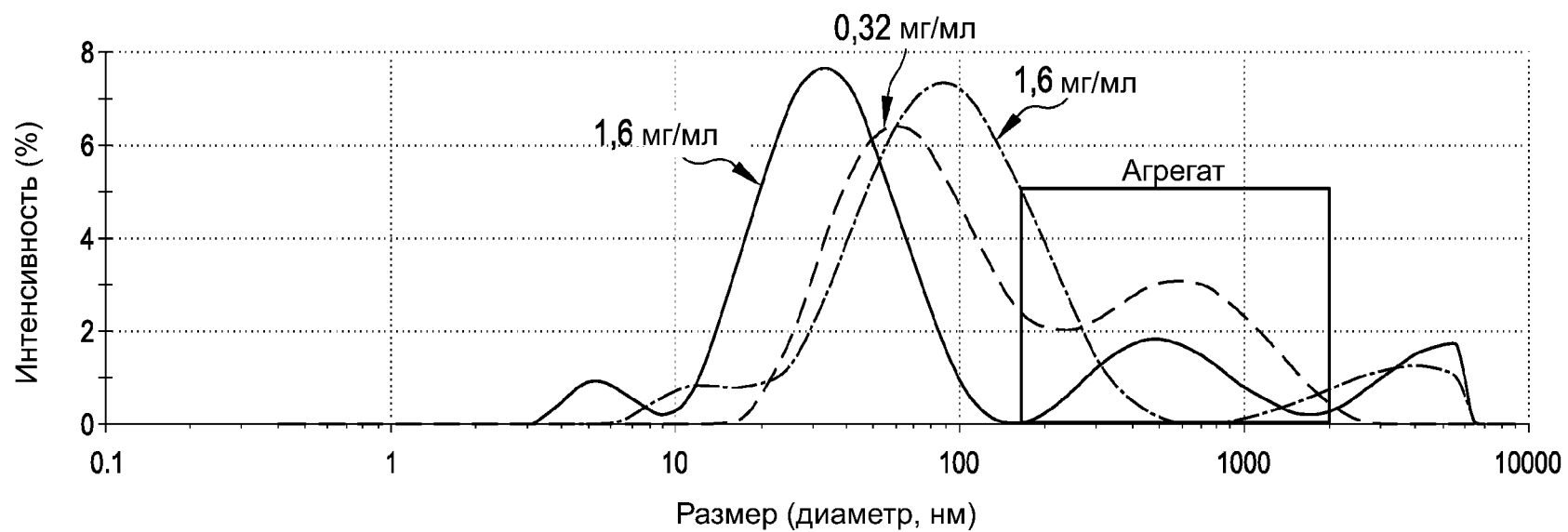
Распределение размеров по интенсивности



——— Запись 1: G13365 1:10 1 - - - Запись 5: G13365 1:50 2 - · - · - Запись 14: G13364 1:100 1

Фиг. 3А

Распределение размеров по интенсивности



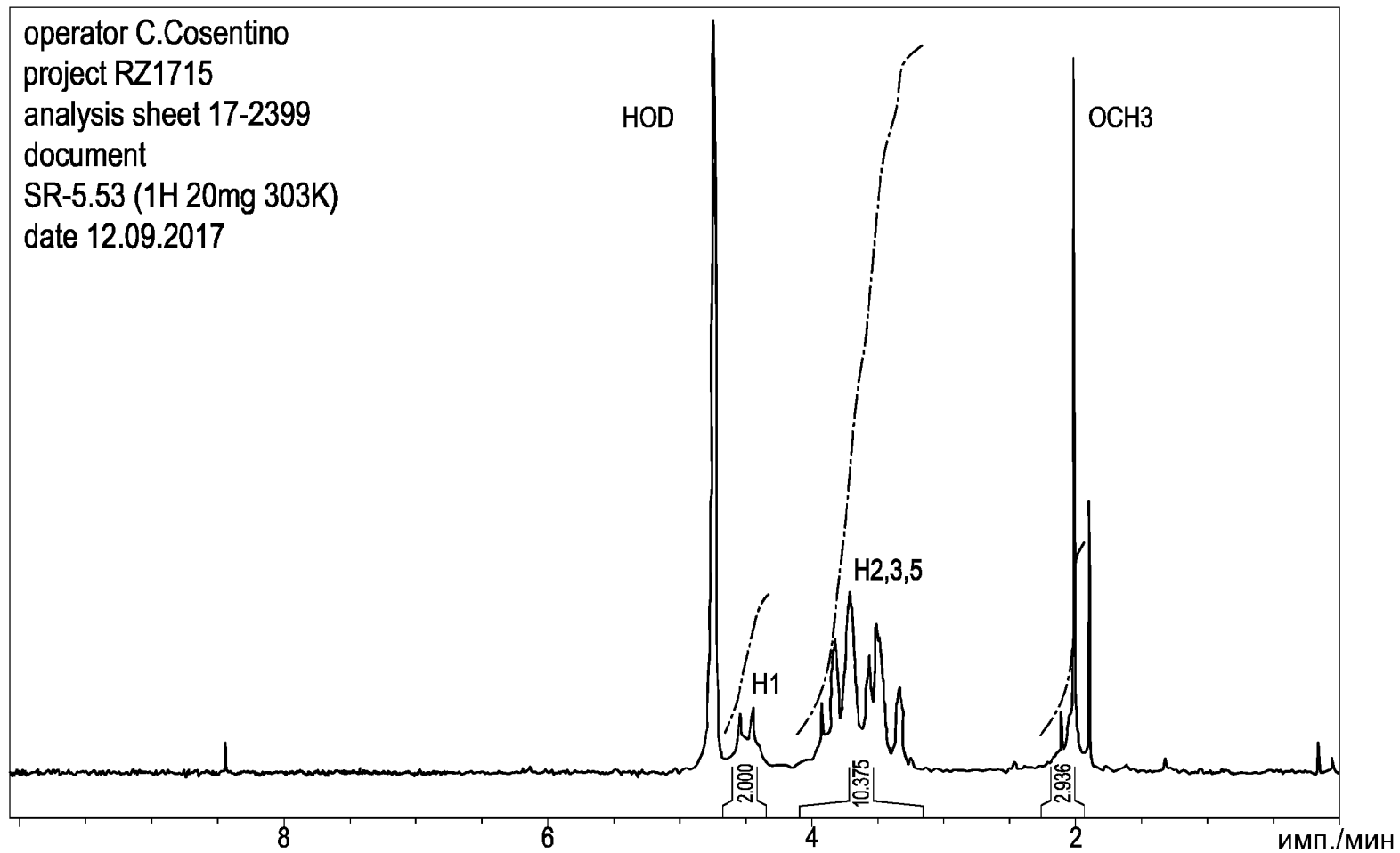
— Запись 1: G13364 1:10 2

- - - Запись 5: G13364 1:50 2

- · - · - Запись 9: G13364 1:100 3

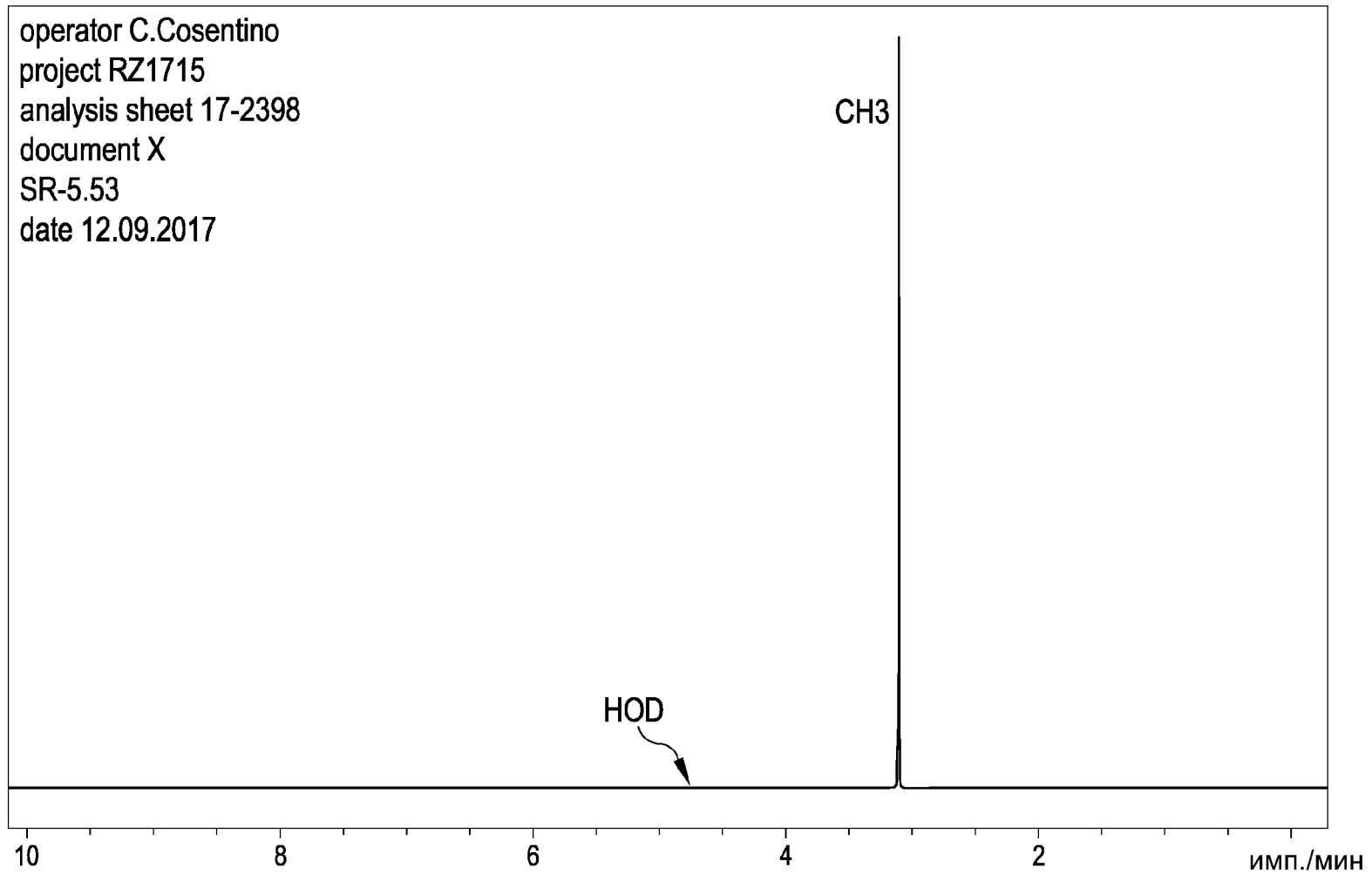
Фиг. 3В

operator C.Cosentino
project RZ1715
analysis sheet 17-2399
document
SR-5.53 (1H 20mg 303K)
date 12.09.2017



Фиг. 4

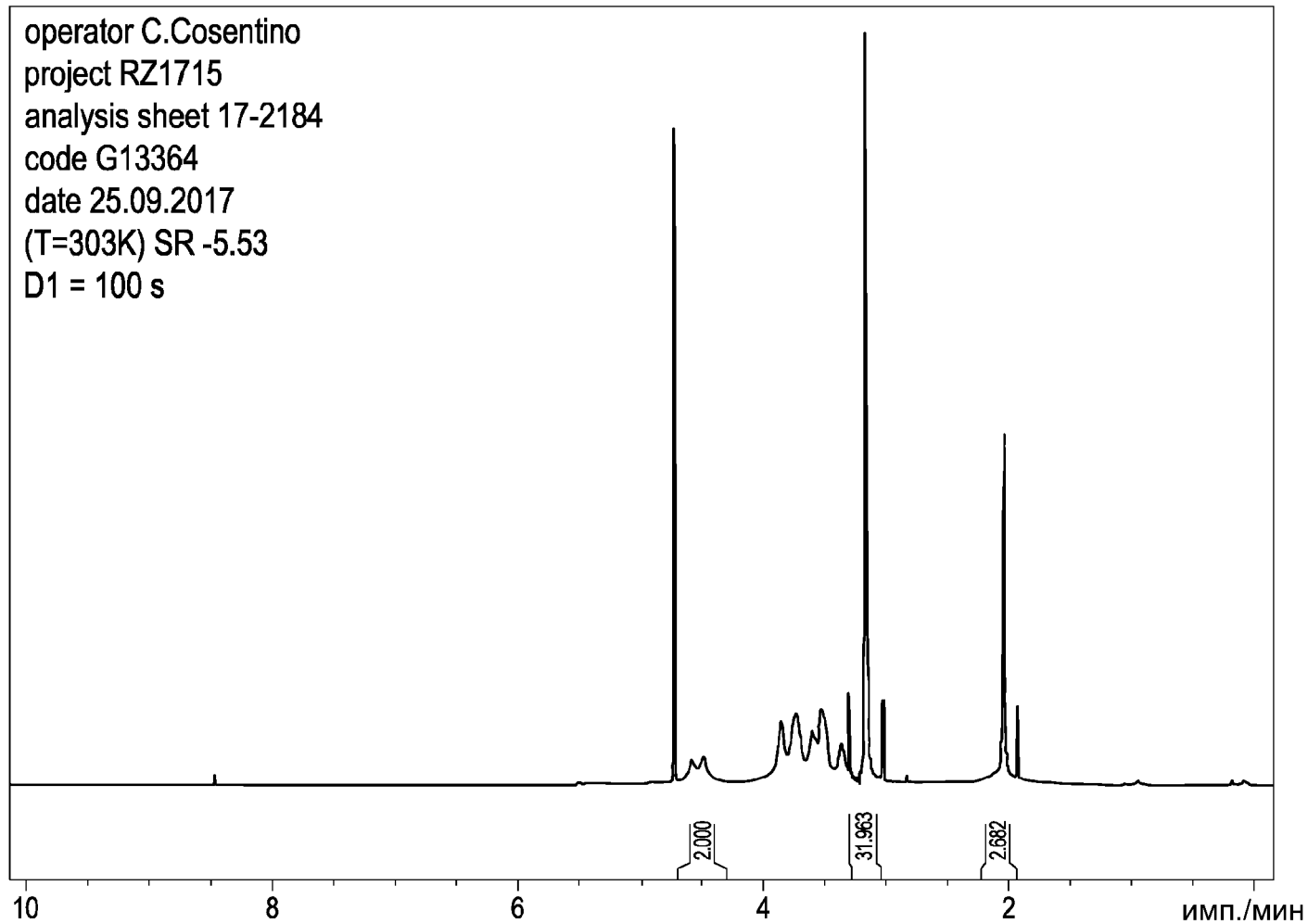
operator C.Cosentino
project RZ1715
analysis sheet 17-2398
document X
SR-5.53
date 12.09.2017



7 / 13

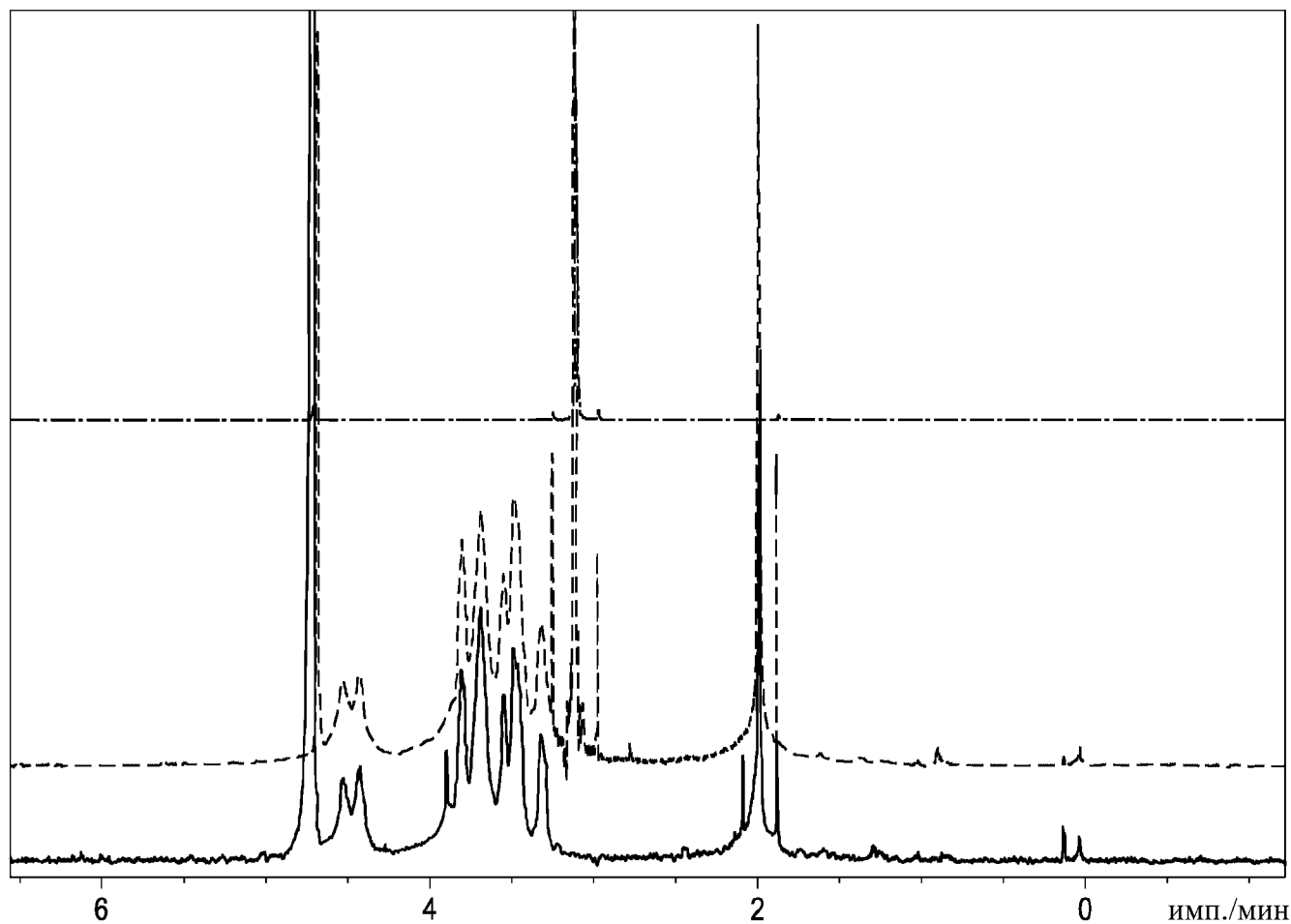
Фиг. 5

operator C.Cosentino
project RZ1715
analysis sheet 17-2184
code G13364
date 25.09.2017
(T=303K) SR -5.53
D1 = 100 s



8/13

Фиг. 6

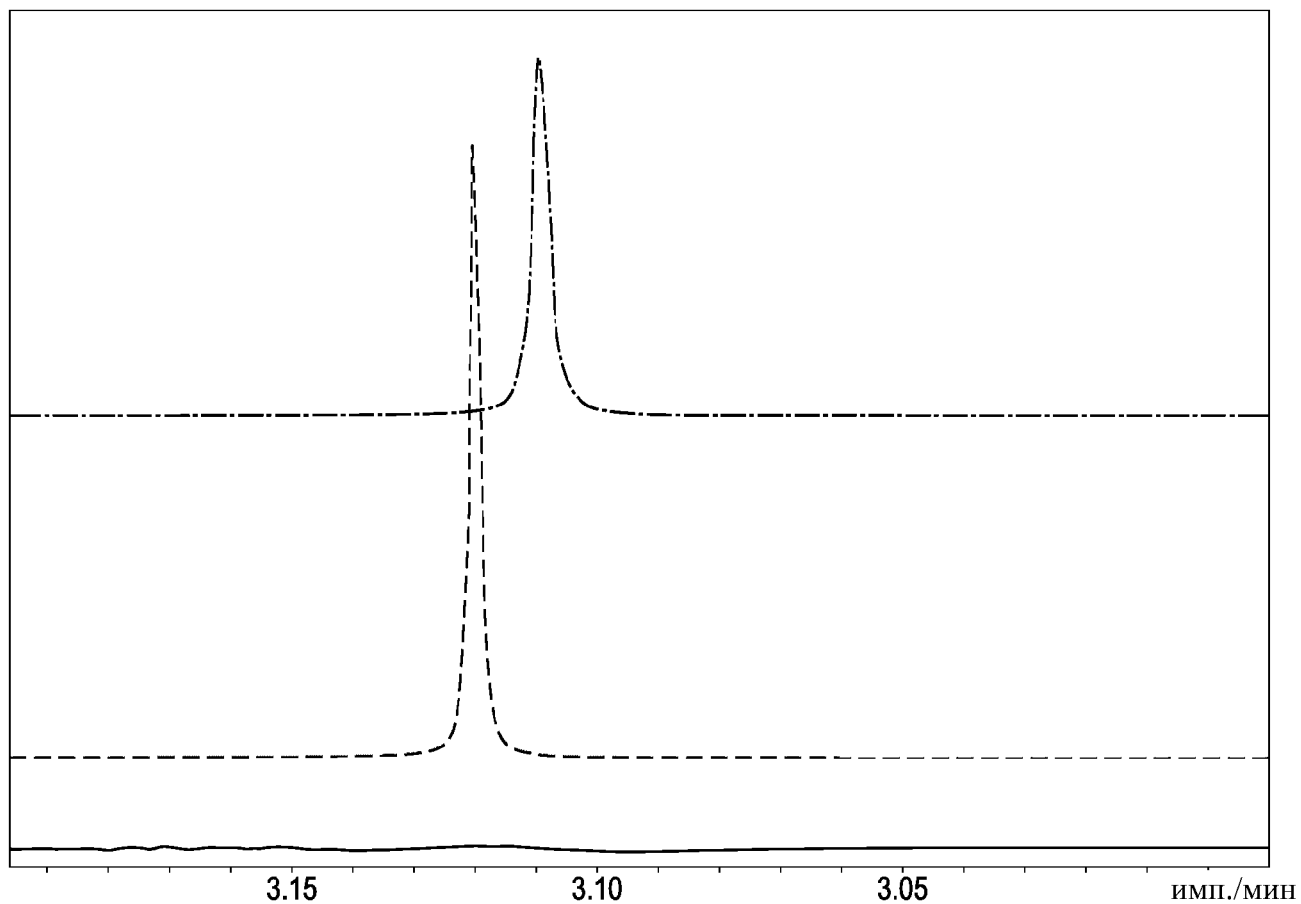


--- S3410 3 1 C:\Bruker\TopSpin3.2\data
Scale : 0.2018 Shift : 0.0303 ppm = 15.1634 Hz

--- G13364 8 1 C:\Bruker\TopSpin3.2\data
Scale : 0.9617 Shift : -0.0297 ppm = -14.8763 Hz

— G13365 5 1 C:\Bruker\TopSpin3.2\data
Scale : 4.7187 Shift : 0.00 ppm = 0.00 Hz

ФИГ. 7



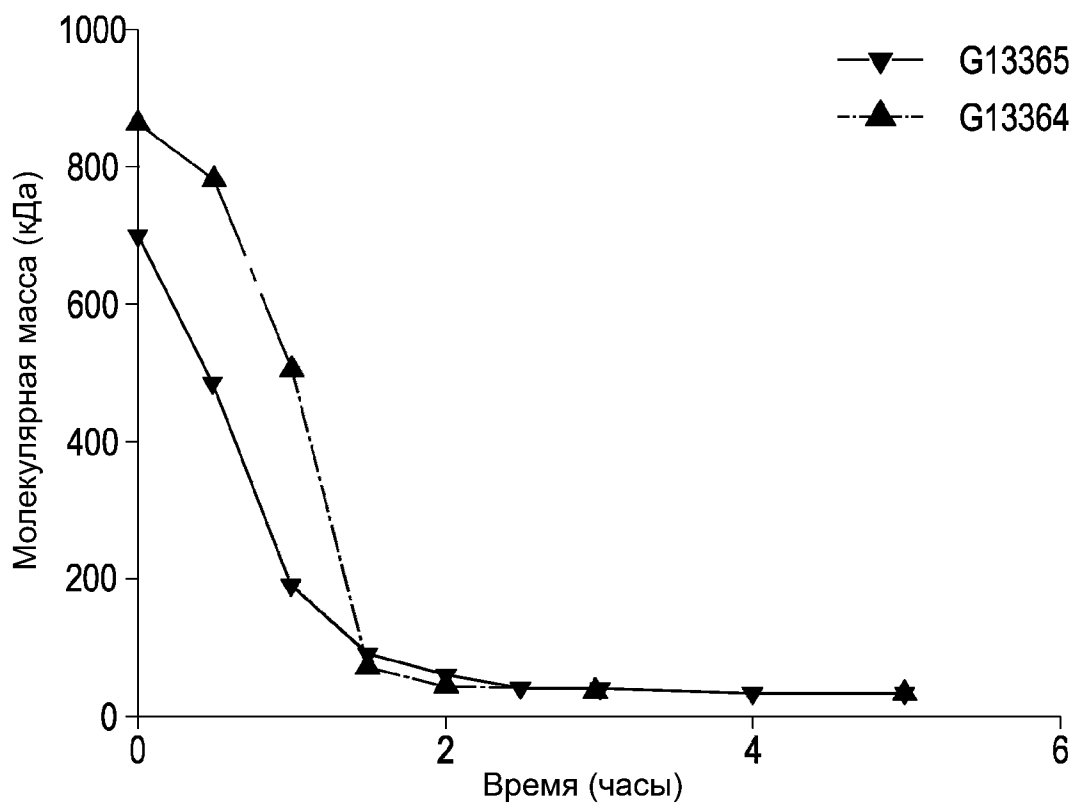
10/13

--- S3410 3 1 C:\Bruker\TopSpin3.2\data
Scale : 0.2018 Shift : 0.0303 ppm = 15.1634 Hz

--- G13364 8 1 C:\Bruker\TopSpin3.2\data
Scale : 0.9617 Shift : -0.0297 ppm = -14.8763 Hz

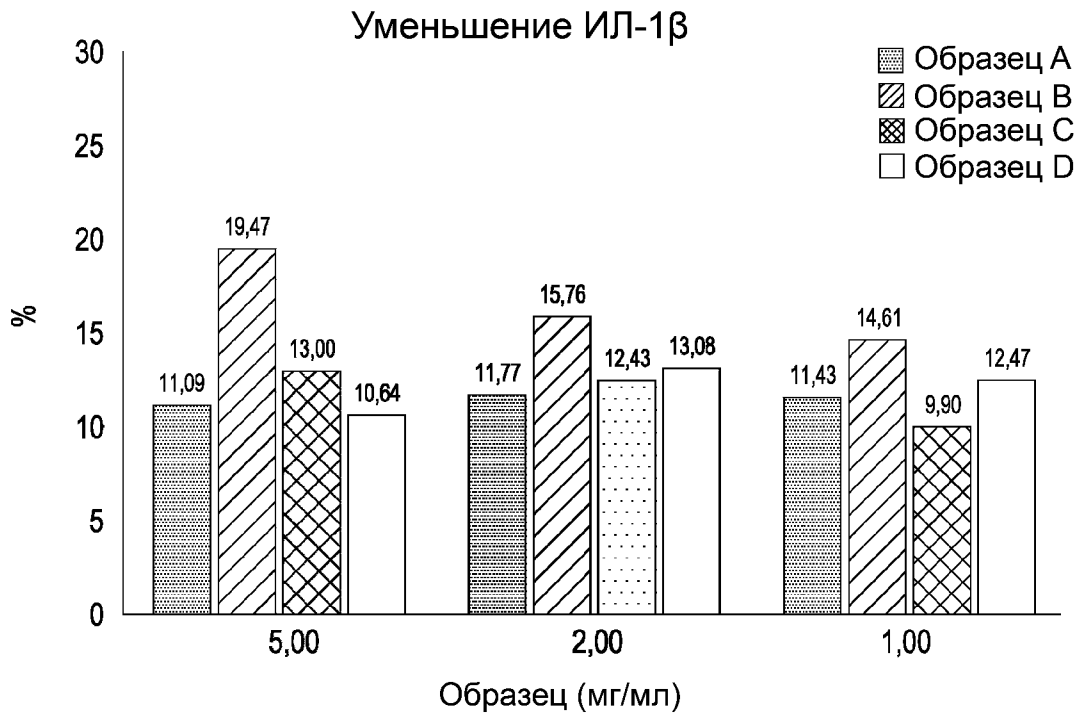
— G13365 5 1 C:\Bruker\TopSpin3.2\data
Scale : 4.7187 Shift : 0.00 ppm = 0.00 Hz

Фиг. 8

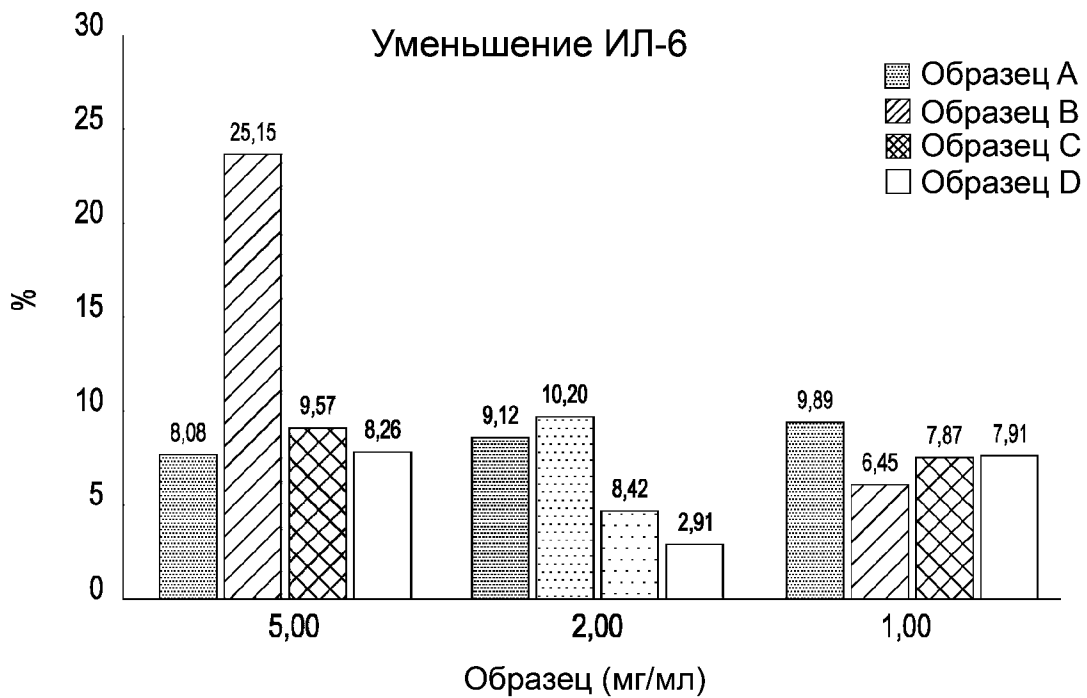


Фиг. 9

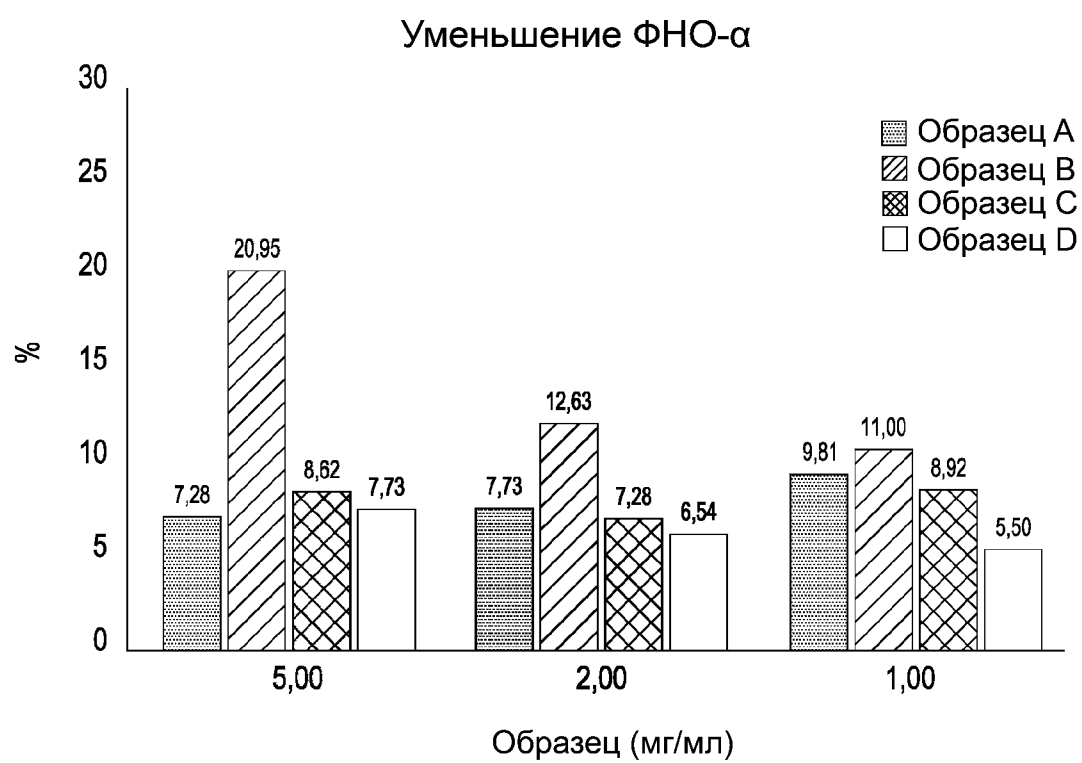
12 / 13



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12