

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191034** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.07.09

(51) Int. Cl. *C08B 37/08* (2006.01)
A61K 31/728 (2006.01)
C08L 5/08 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.10.11

(54) **КОНЬЮГАТЫ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ И АМИНО-БИСФОСФОНАТОВ И ИХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) 102018000009444

(32) 2018.10.15

(33) IT

(86) PCT/IB2019/058698

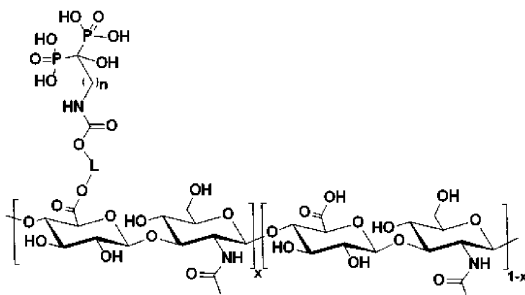
(87) WO 2020/079551 2020.04.23

(71) Заявитель:
ФИДИА ФАРМАЧЕУТИЧИ С.П.А.
(IT)

(72) Изобретатель:
**Плуда Стефано, Паван Мауро,
Барбера Карло (IT)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение описывает конъюгаты гиалуроновой кислоты (ГК) и аминок-бисфосфонатов (Н-БФ) общей формулы (I)



(I),

где L, m, n и x имеют значения по п.1, и его соли. Указанные конъюгаты и их фармацевтические композиции полезны при внутрисуставном и/или местно-регионарном лечении остеоартроза и его последствий на хрящевом и субхондральном уровне; при лечении постменопаузального или лекарственного остеопороза; при лечении ломкости костей вследствие травмы или заболевания; и при внутрикостном и/или местно-регионарном лечении заболеваний, характеризующихся измененным метаболическим обменом костной ткани, в частности болезни Педжета. Они также полезны для улучшения остеоинтеграции протезов.

A1

202191034

202191034

A1

**КОНЬЮГАТЫ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ И АМИНО-БИСФОСФОНАТОВ И
ИХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ****Область техники, к которой относится изобретение**

Изобретение относится к конъюгатам гиалуроновой кислоты (ГК (НА)) и аминокислотных бисфосфонатов (Н-БФ (N-BP)) для применения при внутрисуставном и/или местно-регионарном лечении остеоартроза и его последствий на хрящевом и субхондральном уровнях.

Уровень техники

Остеоартроз представляет собой сложное многофакторное заболевание, затрагивающее хрящ и субхондральную кость, при котором изменения в субхондральной кости отражаются на хряще вследствие «взаимовлияния». Он может поражать все суставы тела, но наиболее поражаемыми областями в целом являются руки (пальцы и основание большого пальца), шея, колени и бедра. Наиболее частые симптомы включают боль, скованность, снижение двигательной активности, отек и суставные выпоты. Одной из наиболее типичных характеристик остеоартроза является обеднение синовиальной жидкости в значениях как концентрации, так и средней молекулярной массы гиалуроновой кислоты (ГК), которая деполимеризуется, теряя свои вязкоупругие свойства и, следовательно, меняя реологию синовиальной жидкости (Balazs EA. et al., J Rheumatol Suppl, 1993, 12:75-82; Belcher C. et al., Annals Rheum Dis, 1997, 56:299-307). ГК, находящаяся в синовиальной жидкости, действуют в качестве вязкой смазки во время медленных движений, при этом ее упругие свойства позволяют амортизировать травмы или микротравмы, затрагивающие суставы при быстрых движениях. Ее деполимеризация, таким образом, сильно меняет функционирование суставов (Balazs EA, 1974, «Disorders of the Knee», Lippincott Co, Philadelphia, p. 63-75).

В общем случае ГК представляет собой линейно-цепочечный гетерополисахарид, состоящий из чередующихся остатков D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина, с молекулярной массой (MW), лежащей в интервале от 400 до 13×10^6 Да, в зависимости от источника, из которого она получена, и используемого способа получения. Она находится в природе в перичеллюлярных жидкостях, в основном в соединительной ткани позвоночных, в стекловидном теле и пуповине и, как указано, в синовиальной жидкости суставов.

ГК играет важную роль в биологических организмах, особенно в качестве механической опоры клеток многих тканей, таких как кожа, сухожилия, мускулы и хрящи.

Через свой мембранный рецептор CD44 ГК модулирует многие клеточные процессы, такие как пролиферация, миграция и дифференцировка клеток, и ангиогенез, а также выполняет другие функции, такие как гидратация тканей и смазывание суставов. Также хорошо известно защитное действие ГК против дегенерации хряща, которая может быть вызвана повреждением сустава из-за болезни или травмы; в указанной ситуации

высокая концентрация провоспалительных цитокинов, особенно интерлейкина-1 (IL-1), присутствует в суставной полости, способствуя распаду хряща и ингибируя пролиферацию хондроцитов (van Beuningen H.M. et al., *Arthritis Rheum*, 1991, 34:606-615). Разнообразные научные эксперименты показывают, что ГК препятствует действию IL-1, резко снижая его неблагоприятные эффекты и восстанавливая хрящевую ткань сустава, в который ее вводят (Stove J. et al., *J Orthop Res*, 2002, 20:551-555).

И, наконец, было продемонстрировано, что ГК проявляет обезболивающий эффект, действуя как частичный агонист k-опиоидных рецепторов (Zavan B. et al., *PLoS One*, 2013; 8, e55510).

С учетом сочетания указанных характеристик ГК является продуктом, широко используемым при лечении костно-суставных и хрящевых нарушений, в форме внутрисуставных инфузий на основе ГК «как она есть» или в ее дериватизированных формах с использованием химических методов (сшивки) или физических методов (облучение и др.).

Помимо ГК и многих других хорошо известных лекарственных средств бисфосфонаты (БФ (ВР)), класс лекарств, которые известны некоторое время, вводят для лечения остеоартроза в клинической практике. Они подавляют резорбцию кости остеокластами, что оправдывает их широкое использование при всех заболеваниях, требующих консолидации кости. БФ также используют для лечения остеопороза, болезни Педжета, метастазов в кости (при наличии или отсутствии гиперкальциемии), множественной миеломы и всех других состояний, которые могут вызывать хрупкость костей; например, они играют важную роль в предотвращении остеопороза, вызванного хроническим применением кортикостероидов. БФ также действуют как противовоспалительные средства вследствие их ингибирующего действия на матриксные металлопротеиназы, особенно MMP-13 (Heikkila et al., *Anticancer Drugs*, 2002, 13, 245-254). Известно, что MMP-13 участвуют в воспалительных процессах, характерных для костно-суставных заболеваний (таких как остеоартроз и ревматоидный артрит), которые вызывают серьезные повреждения хрящевой и костной ткани сустава, синовиальной жидкости и сухожилий.

БФ делят на две основные группы: несодержащие азот бисфосфонаты или бисфосфонаты первого поколения (этидронат, клодронат и тилудронат) и азотсодержащие бисфосфонаты или бисфосфонаты второго поколения. В частности, последние включают аминоксифосфонаты (памидронат, алендронат, ибандронат и неридронат), которые содержат атом азота как часть аминоксифосфонатной группы, и используются в настоящем изобретении. Наконец, золендронат, БФ третьего поколения, содержит два атома азота в имидазольном кольце.

БФ обычно вводят путем инъекции (внутривенной или внутримышечной) или перорально.

Биодоступность БФ второго поколения при пероральном приеме чрезвычайно низка, со значениями около или ниже 1% и даже ниже, когда их принимают во время еды.

Более того, около 78% их эффективно связывается с белками плазмы, тогда как половина из оставшегося количества выводится с мочой в течение 24 часов, и только другая половина перераспределяется в кости, особенно по отношению к сайту-мишени. Это означает, что для получения фармакологического эффекта необходимо вводить достаточно высокие дозы активного ингредиента, чтобы гарантировать, что фармакологически активное количество достигнет места действия.

Какой бы способ введения не использовался, побочные эффекты при пероральном приеме довольно серьезны: от головной боли и головокружения, сыпи, тошноты и диареи до язв пищевода. В случае парентерального введения наиболее частыми и существенными побочными эффектами являются лихорадка, миалгия и боли в костях. Хроническое введение может даже вызвать остеонекроз нижней челюсти.

Поэтому важно иметь доступ к продукту, который использует фармакологические свойства БФ, но имеет низкую токсичность и может быть доставлен непосредственно в желаемое место, что позволит избежать распространения в организме.

Публикация EP 1994945 раскрывает образование конъюгатов ГК-алендронат (ГК-АЛД (HA-ALD)), полученных за счет прямой амидной связи между амином АЛД и карбоксилем ГК. Полученный конъюгат не гидролизует; хорошо известно, что амидная связь является прочной, стабильной, негидролизуемой связью особенно в физиологических условиях.

Nejadnik с соавторами (Biomaterials, 2014, 35, 6918-29) описывают похожие производные с молекулярным спейсером; они представляют собой гидразидные производные ГК с сульфгидрильной функциональностью, способные связываться с акрильными производными АЛД под действием УФ излучения и при использовании фотоинициатора. И, снова, связь между ГК и АЛД не подвергается гидролизу при физиологических условиях.

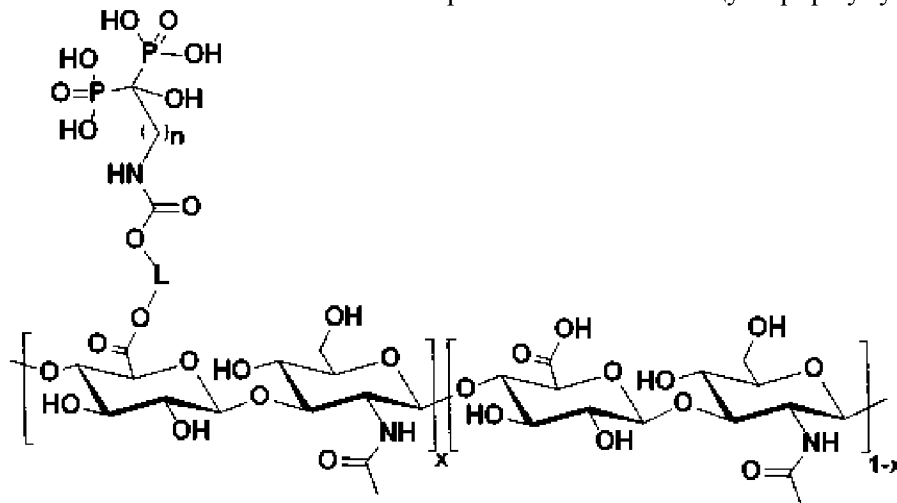
В документе EP 1284754 описана физическая смесь между БФ и агентом, способным предупреждать его мгновенную диффузию (включая ГК) после подкожной инъекции. Авторы утверждают, что постепенное высвобождение позволяет концентрациям БФ превышать обычно используемые концентрации, когда они находятся в простом водном растворе. Как будет ясно из последующего описания настоящего изобретения, документ EP 1284754 не только описывает продукт, отличающийся от конъюгатов в соответствии с изобретением, так как он относится к простой физической смеси, но также преследует совершенно другую цель, так как одна из целей изобретения состоит в использовании более низких доз БФ, чем стандартные дозы, чтобы получить продукт, в котором ГК и БФ продуцируют синергические эффекты.

Описание изобретения

Изобретение относится к конъюгату между гиалуроновой кислотой (ГК) и аминокислотным бисфосфонатом (Н-БФ), где конъюгация происходит с использованием спейсера L, состоящего из линейной алкильной цепочки или полиоксиэтиленовой цепочки. В конъюгате в соответствии с изобретением карбоксильная группа ГК связана через

сложноэфирную связь со спейсером **L**, который, в свою очередь, связан с азотом N-БФ через карбаминую связь.

Конъюгат в соответствии с изобретением имеет общую формулу (I):



(I),

где:

- **L** представляет собой спейсер формулы $-(CH_2)_m-$, где **m** означает целое число от 2 до 10; или **L** представляет собой спейсер формулы $-(CH_2CH_2O)_p-CH_2CH_2-$, где **p** означает целое число от 1 до 4;

- **n** означает целое число от 2 до 5;

- **x** представляет собой число, которое обозначает степень замещения (CЗ (DS)) ГК N-БФ относительно карбоксилатов ГК, и находится в интервале от 0,05 до 0,30 молей N-БФ/моль ГК;

- средневесовая молекулярная масса ГК составляет от 30000 до 3×10^6 Да.

Изобретение также включает соли конъюгата формулы (I), в которых фосфоновые группы amino-бисфосфонового фрагмента и карбоксильные группы ГК, не вовлеченные в конъюгацию с N-БФ, частично или полностью образуют соль с катионом щелочного или щелочноземельного металла, катионом аммония или катионом (C_1-C_4) -тетраалкиламмония, предпочтительно с катионом щелочного металла и более предпочтительно с катионом Na^+ .

После ферментативного гидролиза или гидролиза при кислом или щелочном значениях pH или при физиологических условиях сложноэфирная связь и карбаминная связь конъюгата формулы (I) расщепляется, и активный ингредиент (N-БФ) высвобождается *in situ* вместе с ГК, которая, следовательно, может проявлять хорошо известные характеристики реологии, биосовместимости и клеточного распознавания. После гидролиза спейсер **L** дает α,ω -алкилдиол или низкомолекулярный гликоль, который в используемых концентрациях и введении внутрисуставным и/или местно-регионарным путем практически лишен токсичности.

Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим конъюгат формулы (I) и, по меньшей мере, один фармацевтически приемлемый

наполнитель и/или носитель, и к терапевтическим применениям конъюгатов формулы (I) и их препаратов, особенно для вискоасплементарной терапии.

Другим объектом изобретения является вискоасплемент (препарат, улучшающий скольжение суставных поверхностей), содержащий конъюгат формулы (I) и, по меньшей мере, один фармацевтически приемлемый наполнитель и/или носитель.

Конъюгаты по изобретению, их фармацевтические композиции и вискоасплементы, которые их содержат, предназначены для применения при внутрисуставном и/или местно-регионарном лечении остеоартроза и его последствия на хрящевом и субхондральном уровне; при лечении постменопаузального или лекарственного остеопороза; при лечении ломкости костей вследствие травмы или заболевания; и при внутрикостном и/или местно-регионарном лечении заболеваний, характеризующихся измененным метаболическим обменом костной ткани. Они также полезны для содействия остеоинтеграции протезов, то есть, когда необходимо создать тесное соединение между протезом (обычно, но не обязательно из титана) и костной тканью, в которую он вставлен.

Описание чертежей

ФИГ. 1. Количественное определение *in vitro* высвобождения алендроната (АЛД (ALD)) из конъюгата ГК-АЛД (HA-ALD).

ФИГ. 2. Сравнение значений модулей вязкоупругости конъюгата ГК-АЛД примера 3, ГК и физической смеси ГК и АЛД.

ФИГ. 3. Сравнение между динамической вязкостью η конъюгата ГК-АЛД примера 3, физической смесью ГК и АЛД, ГК, Hymovis® и Synvisc®.

ФИГ. 4. Цитотоксичность в концентрациях 25 мкМ, 50 мкМ и 100 мкМ АЛД и конъюгата ГК-АЛД примера 3 на остеобластах SaOs-2 через 3 (ФИГ. 4А) дня и 7 (ФИГ. 4В) дней инкубационного периода.

ФИГ. 5. Цитотоксичность в концентрациях 25 мкМ, 50 мкМ и 100 мкМ АЛД и конъюгата ГК-АЛД примера 3 в отношении первичных хондроцитов крупного рогатого скота через 3 (ФИГ. 5А) дня и 7 (ФИГ. 5В) дней инкубационного периода.

ФИГ. 6. Определение количества растворимого коллагена, высвобождаемого после воспалительного стимула образцом хряща, взятого из бедренной кости взрослой особи крупного рогатого скота и обработанного конъюгатом ГК-АЛД примера 3.

Подробное описание изобретения

Число x означает степень замещения ($C3$ (DS)) ГК N-БФ, то есть, долю карбоксильных групп повторяющегося звена ГК, которые вовлечены в образование конъюгата с N-БФ. В конъюгатах по изобретению x означает число от 0,05 до 0,30; другими словами, карбоксильные группы ГК, вовлеченные в конъюгацию, находятся в интервале от 5 до 30% на молярной основе от общего количества карбоксильных групп, доступных для конъюгации.

Степень замещения x ГК N-БФ относительно карбоксильных групп ГК предпочтительно находится в интервале 0,10-0,30 моль/моль ($C3$ от 10 до 30% моль/моль)

и более предпочтительно от 0,10 до 0,20 моль/моль (СЗ от 10 до 20% моль/моль).

ГК, используемая в соответствии с изобретением, может происходить из любого источника, такого как петушинные гребни (EP 138572), ферментация (из *Streptococcus equi* или *zooeptidemicus*, EP 0716688) или биосинтез (из *Bacillus*, EP 2614088, EP 2614087), и может быть очищена с помощью различных методов (WO 2018020458, IT 102017000081449).

Средневесовая молекулярная масса ГК находится в интервале от 30000 до 3×10^6 Да, в частности от 1×10^5 до 1×10^6 Да, более предпочтительно от 150000 до 800000 Да и даже более предпочтительно от 170000 до 230000 Да или от 500000 до 730000 Да. «Средневесовая молекулярная масса» здесь означает массу, рассчитанную методом «характеристической вязкости» (Terbojevich et al., Carbohydr Res, 1986, 363-377).

N-БФ предпочтительно выбирают из памидроната, неридроната и алендроната. Алендронат (АЛД) особенно предпочтителен.

Когда спейсер **L** представляет собой линейную алифатическую цепочку формулы $-(CH_2)_m-$, число атомов углерода **m** предпочтительно находится в интервале от 2 до 5 и даже более предпочтительно равно 2.

Когда **L** спейсер означает спейсер формулы $-(CH_2CH_2O)_p-CH_2CH_2-$, **p** предпочтительно равно 1.

Конъюгат формулы (I), где **L** представляет собой линейную алифатическую цепочку формулы $-(CH_2)_m-$, где **m** имеет значение 2, является особенно предпочтительным.

Конъюгаты формулы I могут быть получены по реакции производного N-БФ, предпочтительно тетрабутиламмониевой соли (ТБА (ТВА)), с соединением формулы X-L-OA, где **L** имеет значения, описанные выше, **X** представляет собой уходящую группу, как правило, атом галогена, и **A** представляет собой гидрокси-активирующую группу. Полученное производное затем вводят в реакцию, даже без выделения, с производным гиалуроновой кислоты, как правило, тетрабутиламмониевой солью, в растворителе, таком как диметилсульфоксид или диметилформамид. В случае конъюгатов, в которых **L** представляет собой спейсер формулы $-(CH_2)_m-$, где **m** имеет значение 2, предпочтительным соединением формулы X-L-OA является 2-хлорэтил-1H-имидазол-1-карбоксилат. Конъюгаты, как правило, выделяют в форме динатриевых солей на фрагменте N-БФ и моноватриевых солей на карбоксильной группе ГК путем добавления насыщенного раствора хлорида натрия, после чего следует диализ при pH 6 и окончательная сушка лиофилизацией.

Конъюгация ГК, которая описана, означает систему доставки макромолекулярного лекарства для N-БФ; после введения по мере развития гидролиза конъюгат высвобождает активный ингредиент N-БФ, который действует на костную резорбцию, а ГК, которая возвращается к своей естественной форме, выполняет хорошо известные действия смазки, восстановления вязкости синовиальной жидкости, обезболивающего эффект за счет действия на ноцицепторы и др.

Конъюгат в растворе может быть стерилизован путем фильтрования или путем тепловой обработки в автоклаве, может быть приготовлен в водных растворах (например, в воде, физиологическом растворе или ФСБ (PBS)), при pH между 6 и 7 (то есть, при физиологическом pH), и может быть выдавлен даже с помощью игл малого калибра.

Конъюгат по изобретению также имеет весьма необычные, неожиданные реологические характеристики; во время его получения и применения он принимает форму вязкого раствора, но в присутствии двухвалентных ионов, в особенности ионов кальция, и в зависимости от концентрации и степени замещения его вязкость меняется радикально и образуется плотный гель с вязкоупругими характеристиками, сравнимыми или даже превосходящими характеристики наиболее широко используемых сшитых вискоэластиков. Эта необычная характеристика чрезвычайно важна, так как ионы кальция обычно присутствуют в синовиальной жидкости (Madea et al., *Forensic Sci Int*, 2001, 118, 29-35), даже когда она «истощена» остеоартрозом. Это означает, что конъюгат по изобретению может быть введен внутрисуставно в форме вязкого раствора с такими неоспоримыми преимуществами, как легкое выдавливание, и затем превращается в плотный гель без добавления других веществ (таких как сшивающие агенты) или без физической обработки (УФ излучение и др.).

Конъюгат по изобретению может быть использован:

- при внутрисуставном и/или местно-регионарном лечении остеоартроза, постменопаузального остеопороза или остеопороза, вызванного лекарствами, такими как стероиды, хрупкости костей вследствие травмы или заболеваний, таких как множественная миелома и метастазы в кости;
- при внутрикостном и/или местно-регионарном лечении всех нарушений, характеризующихся измененным метаболическим обменом костной ткани, таких как болезнь Педжета;
- для улучшения остеоинтеграции протезов.

Для терапевтических целей конъюгат по изобретению используют в форме фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество указанного конъюгата и, по меньшей мере, один фармацевтически приемлемый наполнитель и/или носитель. Указанные препараты могут быть приготовлены традиционными способами, такими как способы, описанные в публикации Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th ed., Mack Publishing Co. Дозы конъюгатов по изобретению, очевидно, будут зависеть от пути введения и других параметров, таких как вес и возраст пациента, а также тяжесть расстройства, и могут быть определены врачом на основе известной информации об эффективных клинических дозах бисфосфонатов.

Конъюгат по настоящему изобретению в дополнение к его свойствам системы доставки лекарственного средства (DDS) для высвобождения N-БФ и ГК, также обеспечивает более высокую эффективность и более низкую токсичность, чем аналогичные дозы N-БФ, вводимые напрямую.

Реологические характеристики, достигаемые конъюгатом по изобретению в

присутствии двухвалентных ионов, также означают, что он является отличным кандидатом для приложений 3D-печати и/или биопечати, таких как создание частей костных структур, утраченных в результате травм, ортопедическая хирургия и др.

Дополнительным применением конъюгата по изобретению является лечение и заполнение поражений субхондральной кости, включая поражения костного мозга, посредством внутрикостной инфузии конъюгата, заявленного в настоящем документе, под радиологическим контролем. Благодаря своим реологическим свойствам он механически уплотняет субхондральное поражение, действуя как своего рода костный цемент, и, прежде всего, используя хондропротекторные и остеогенные свойства N-БФ, тем самым активно способствуя восстановлению поражения.

Конъюгат по изобретению новаторски решает техническую проблему создания продукта, который использует фармакологические свойства БФ, но имеет низкую токсичность и может быть доставлен непосредственно в желаемое место, чтобы избежать распределения в организме, в том, что:

1. он представляет собой систему доставки с контролируемым высвобождением N-БФ лекарства с использованием локализованного введения, которая снижает необходимость высоких доз N-БФ и одновременно доставляет активный ингредиент к точному месту, на котором его эффект желателен;

2. он сочетает преимущества хондропротекторного и остеогенного действия N-БФ с преимуществами инфильтрационного лечения на основе ГК (вискосупплементация, смазывание, обезболивающая активность и т.д.);

3. он значительно повышает фармакологическую эффективность активного ингредиента, который при одинаковых дозах гораздо менее токсичен, что позволяет избежать возможных побочных эффектов, связанных с системным распространением или высокими дозами;

4. он имеет неожиданные реологические характеристики при использовании в присутствии двухвалентных катионов.

Конъюгат по изобретению синергетически использует свойства как N-БФ, так и ГК.

Изобретение дополнительно проиллюстрировано приведенными ниже примерами.

Степень замещения рассчитывают с помощью метода ICP-OES (оптической эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой) путем считывания фосфора при 213,5 нм после разложения образца в азотной кислоте.

Пример 1. Синтез тетрабутиламмониевой соли алендроната (АЛД-ТБА)

Синтез проводят, как описано в литературе (Arns, S. et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2012**, 20: 2131-2140).

Суспензию алендроновой кислоты (1,50 г, 6,02 ммоль, 1,0 экв.) в воде качества Milli-Q (40 мл) обрабатывают гидроксидом тетрабутиламмония (гидрат ТБА-ОН-30 4,82 г, 6,03 ммоль, 1,0 экв.).

Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 час,

чтобы завершить солюбилизацию, получают прозрачный бесцветный раствор. Воду удаляют лиофилизацией, получают тетрабутиламмониевую соль алендроната (АЛД-ТБА) в виде гигроскопичного белого твердого вещества (3,1 г, 100%).

Пример 2. Синтез 2-хлорэтил-1Н-имидазол-1-карбоксилата

Добавляют 2-хлорэтанол (3,00 мл, 0,04 моль, 1,00 экв.) к раствору карбонилдиимидазола (CDI) (14,51 г, 0,09 моль, 2,00 экв.) в тетрагидрофуране (ТГФ) (40 мл) в колбе при 0°C при постоянном перемешивании. Реакционную смесь нагревают до комнатной температуры и реакции дают проходить в течение 3 час.

Растворитель (ТГФ) удаляют в вакууме, твердый продукт растворяют в дихлорметане и промывают 1 М HCl в делительной воронке. Органическую фазу обезвоживают сульфатом магния и растворитель удаляют в роторном испарителе, получают продукт в виде бесцветной жидкости (7,8 г, выход 100%).

Пример 3. Синтез конъюгата ГК-алендронат (MW ГК 200 кДа, СЗ 20% моль/моль)

Раствор тетрабутиламмониевой соли алендроната, полученной, как описано в примере 1, (АЛД-ТБА 394 мг, 0,8 ммоль, 1 экв.) в ДМСО (30 мл) обрабатывают 2-хлорэтил-1Н-имидазол-1-карбоксилатом (280 мг, 1,6 ммоль, 2 экв.; получен, как описано в примере 2) и оставляют для взаимодействия при 40°C на 18 час.

Реакционную смесь добавляют к раствору тетрабутиламмониевой соли ГК (ГК-ТБА, 500 мг, 0,8 ммоль, 1 экв.) в ДМСО (50 мл) и оставляют для взаимодействия при 40°C на 48 час при перемешивании.

Продукт очищают осаждением с добавлением насыщенного раствора хлорида натрия (2 мл) и этанола (500 мл) и, наконец, подвергают диализу в дистиллированной воде (Spectra/Por® MWCO 20 кДа в течение 3 дней) при pH 6 и лиофилизации. Продукт, полученный в виде натриевой соли, имеет внешний вид рыхлого белого твердого вещества (380 мг, выход 95%).

Пример 4. Синтез конъюгата ГК-алендронат (MW ГК 200 кДа, СЗ 10% моль/моль)

Производное синтезируют, характеризуют и очищают, как описано в примере 3, начиная с 1,2 г ТБА соли ГК (2 ммоль, 1 экв.), солюбилизированной в ДМСО (80 мл), и вводят в реакцию с реакционной смесью АЛД-ТБА (1000 мг, 2 ммоль, 1 экв.) и 2-хлорэтил-1Н-имидазол-1-карбоксилатом (470 мг, 2,45 ммоль, 1,22 экв.).

Получают 774 мг рыхлого белого продукта в форме натриевой соли. (выход: 82%).

Пример 5. Синтез конъюгата ГК-алендронат (MW ГК 500 кДа, СЗ 20% моль/моль)

Производное синтезируют, характеризуют и очищают, как описано в примере 3, начиная с 1,2 г ТБА соли ГК (2 ммоль, 1 экв.), солюбилизированной в ДМСО (80 мл), и вводят в реакцию с реакционной смесью АЛД-ТБА (1000 мг, 2 ммоль, 1 экв.) и 2-хлорэтил-1Н-имидазол-1-карбоксилатом (470 мг, 2,45 ммоль, 1,22 экв.).

Получают 620 мг рыхлого белого продукта в форме натриевой соли. (выход: 68%).

Пример 6. Синтез конъюгата ГК-алендронат (MW ГК 200 кДа, СЗ 5% моль/моль)

Производное синтезируют, характеризуют и очищают, как описано в примере 3, начиная с 1 г of ГК ТБА salt (1,6 ммоль, 1 экв.), солюбилизированной в ДМСО (80 мл), и вводят в реакцию с реакционной смесью АД-ТБА (790 мг, 1,6 ммоль, 1 экв.) и 2-хлорэтил-1Н-имидазол-1-карбоксилатом (140 мг, 0,8 ммоль, 0,5 экв.)

Получают 603 мг рыхлого белого продукта в форме натриевой соли. (выход: 90%).

Пример 7. Синтез конъюгата ГК-алендронат (MW ГК 200 кДа, СЗ 30% моль/моль)

Производное синтезируют, характеризуют и очищают, как описано в примере 3, начиная с 1 г ТБА соли ГК (1,6 ммоль, 1 экв.), солюбилизированной в ДМСО (80 мл), и вводят в реакцию с реакционной смесью АД-ТБА (1,6 г, 3,2 ммоль, 2 экв.) и 2-хлорэтил-1Н-имидазол-1-карбоксилатом (560 мг, 3,2 ммоль, 0,5 экв.).

Получают 675 мг рыхлого белого продукта в форме натриевой соли. (выход: 85%).

Пример 8. Высвобождение АД из конъюгата ГК-алендронат. In vitro тест

Чтобы показать, что конъюгат по изобретению действует как макромолекулярная система доставки (DDS), сравнивают высвобождение АД из следующих веществ:

- физическая смесь, содержащая ГК с MW 200 кДа и АД (ГК+АД);
- конъюгат ГК-алендронат, полученный, как описано в примере 3 (ГК-АД);
- конъюгат ГК-алендронат, полученный через амидную связь, полученный, как описано в публикации EP 1994945 (амид ГК-АД).

Все образцы, содержащие одинаковую дозу АД, находятся в 0,1 М TRIS буфере с pH 7,4 и испытаны на диализной мембране (MWCO 10 кДа) при 37°C. Высвобождение АД количественно оценивают с помощью анализа ICP-OES фосфора в растворе, как описано выше.

Результаты представлены на ФИГ. 1.

Очевидно, что высвобождение АД из амидного производного незначительно, как и ожидалось, тогда как смесь ГК+АД высвобождает активный ингредиент очень быстро. К седьмому дню почти 80% АД уже высвобождается, при этом конъюгат по изобретению ГК-алендронат показывает лишь небольшое превышение 50%. Следовательно, его кинетика намного медленнее, что подтверждает постепенное высвобождение активного ингредиента после гидролиза.

Пример 9. Реологические свойства

Проводят анализ модулей вязкоупругости на следующих образцах, растворенных в указанной концентрации в 0,1 М TRIS, pH=7:

- конъюгат ГК-алендронат, полученный, как описано в примере 5, 20 мг/мл (содержащий 2,4 мг/мл алендроната);
- ГК с MW 500 кДа, 20 мг/мл;
- смесь ГК с MW 500 кДа, 20 мг/мл, с алендронатом (2,4 мг/мл), полученная путем непосредственного солюбилизирования ГК в 0,1 М растворе TRIS с pH=7, содержащем

определенное количество алендроната.

Образцы анализируют после добавления 20 мкл/мл раствора 100 мг/мл CaCl_2 в H_2O (конечная концентрация CaCl_2 2 мг/мл), чтобы насколько возможно близко смоделировать ситуацию в суставе, где, как уже говорилось, синовиальная жидкость содержит ионы кальция даже на стадии остеоартроза.

Аналитический метод: реометр Anton Paar MCR92; конус 50 мм 1° ; зазор 0,102 мм; температура 20°C ; развертка по частоте от 0,1 до 100 рад/сек, деформация 10%, 15 точек, полученных на логарифмической шкале.

Результаты описаны на ФИГ. 2, которая сравнивает значения модулей вязкоупругости; G' выражает эластичный компонент жидкости, а G'' - вязкий компонент.

Значения модулей смеси и одной ГК однозначно сопоставимы: алендронат «как он есть» очевидно не оказывает влияния на реологическое поведение.

Поведение конъюгата ГК-алендронат совершенно иное: эластичный и вязкий модули намного превосходят модули образцов сравнения, а значения G' и G'' соответствуют плотному гелю.

Для дополнительного подтверждения этих данных те же образцы сравнивают в двумя вискоапплементами (Hymovis® и Synvisc®) из числа наиболее используемых при внутрисуставном лечении остеоартроза, чтобы оценить их динамическую вязкость (η). Динамическая вязкость, весьма значимый параметр для оценки вязкоупругих свойств жидкости, является мерой сдвигового напряжения жидкости после приложения тангенциального усилия.

Hymovis® представляет собой гексадециламид ГК, который формирует плотный гель за счет создания подвижной сшивки. Synvisc® представляет собой смесь двух разных форм сшитой ГК, Hylan-A и Hylan-B в соотношении 80:20. Сшивка дает ГК очень высокой MW, порядка миллионов Да. И также продукт представляет собой плотный гель. Результаты представлены на ФИГ. 3.

Конъюгат по изобретению явно имеет высокую динамическую вязкость, даже выше, чем вязкость двух коммерческих продуктов, которые считаются продуктами первого выбора в клинической практике; однако эффективность одной ГК и смеси ГК+алендронат намного хуже.

Конъюгат по изобретению с точки зрения вискоапплементарной терапии, следовательно, превосходит продукты, известные и используемые в настоящее время. Этот результат является неожиданным в отношении значений динамической вязкости смеси ГА+алендронат и одной ГК с MW 500 кДа, учитывая, что алендронат «как он есть» не влияет на вязкость.

Это еще более важно с учетом того факта, что конъюгат представляет собой вязкий раствор. ГК-АЛД высвобождает алендронат постепенно и по нарастающей, в результате действуя как система доставки макромолекулярного лекарственного средства, которая избирательно доставляет активный ингредиент к месту, где он должен действовать. ГК-АЛД также можно вводить внутрисуставно в виде вязкого раствора. Его введение

является легким с использованием игл малого калибра и причиняют меньше боли или дискомфорта пациенту. Наконец, ГК-АЛД превращается в полости сустава в гель с превосходными реологическими свойствами, лучшими, чем у аналогичных продуктов, уже используемых в области вискоасплементарной терапии.

Пример 10. Цитотоксичность конъюгата ГК-алендронат в отношении остеобластов. In vitro тест

Цитотоксичность конъюгата, связанную с его способностью к высвобождению алендроната контролируемым образом, оценивают путем испытания *in vitro* на линии клеток остеобластов (Saos-2, ATCC HTB-85). Клетки Saos-2 выращивают в среде Мак-Коя (McCoy's 5A medium, Life Technologies, cat. № 36600-021, Италия), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Life Technologies, cat. № 10270106, Италия) при стандартных условиях (37°C, 5% CO₂) до полуконфлюэнтности. Клетки затем высевают в концентрации 1×10^4 клеток/лунка в 96-луночные многолуночные планшеты (Sarstedt, cat. № 833924, Германия) и делят на три группы:

- 1) контрольная группа, в которой клетки не обрабатывают и не стимулируют;
- 2) группа, обработанная свободным алендронатом, где клетки инкубируют с пониженными концентрациями свободного алендроната в течение 3 и 7 дней;
- 3) группа, обработанная конъюгатом ГК-алендронат, полученным, как описано в примере 3, где клетки обрабатывают таким же образом, как клетки в группе 2.

Каждый образец тестируют при четырех повторях.

В конце предустановленного времени инкубации количественно определяют жизнеспособность клеток с помощью анализа Alamar blue[®] (Life Technologies, cat № DAL1025, Италия) в соответствии с инструкциями производителя, определяя жизнеспособность клеток на основании количества алендроната, высвобождаемого во времени. Данные представлены на ФИГ. 4А и 4В.

Через 3 дня инкубационного периода (ФИГ. 4А) цитотоксический эффект свободного алендроната наблюдают при концентрациях 100 мкМ и 50 мкМ (жизнеспособность клеток <70% от жизнеспособности контроля). Цитотоксичность свободного алендроната растет существенно пропорционально инкубационному периоду.

При таких же условиях и при равной концентрации алендроната конъюгат ГК-алендронат проявляет цитотоксический эффект только при концентрации 100 мкМ после 7 дней инкубационного периода (ФИГ. 4В), показывая, что активный ингредиент, находящийся в конъюгате, высвобождается постепенно. Следовательно, конъюгат по изобретению однозначно намного менее токсичен, чем алендронат, при одинаковых дозах и времени воздействия.

Пример 11. Цитотоксичность конъюгата ГК-алендронат на хондроцитах. In vitro тест

Способность конъюгата контролируемым образом высвобождать алендронат, а также наличие влияния на хрящевую ткань, оценивают путем тестирования *in vitro* на первичных хондроцитах крупного рогатого скота. Первичные хондроциты крупного

рогатого скота выделяют из хряща мышечков бедренной кости в соответствии с протоколом, описанным в литературе (Mouw JK et al., Osteoarthritis and Cartilage **2005**, 13: 828-836). Выделенные хондроциты культивируют в среде DMEM/F-12 (1:1) (Life Technologies, cat. № 11320074, Италия), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Life Technologies, cat. № 10270106, Италия), при стандартных условиях (37°C, 5% CO₂) до полуконфлюэнтности. Затем клетки высевают в концентрации 1×10^4 клеток/лунка в 96-луночные многолуночные планшеты (Sarstedt, cat. № 833924, Германия) и делят на три группы:

- 1) контрольная группа, в которой клетки не обрабатывают и не стимулируют;
- 2) группа, обработанная алендронатом, в которой клетки инкубируют с пониженными концентрациями алендроната в течение 3 и 7 дней;
- 3) группа, обработанная конъюгатом ГК-алендронат, полученным, как описано в примере 3, где клетки обрабатывают таким же образом, как клетки в группе 2.

Каждый образец тестируют при четырех повторах.

В конце предустановленного времени инкубации определяют количественно жизнеспособность клеток с помощью анализа Alamar blue[®] (Life Technologies, cat № DAL1025, Италия) в соответствии с инструкциями производителя, определяя жизнеспособность клеток на основании количества алендроната, высвобождаемого во времени. Данные представлены на ФИГ. 5А и 5В.

При тех же условиях и при равной концентрации алендроната конъюгат ГК-алендронат проявляет лишь незначительный цитотоксический эффект при концентрации 100 мкМ через 7 дней инкубационного периода, показывая, что активный ингредиент высвобождается из конъюгата постепенно. Напротив, свободный алендронат действует на первичные хондроциты крупного рогатого скота уже через 72 час инкубационного периода и проявляет максимальный цитотоксический эффект в концентрациях 100 мкМ и 50 мкМ через 7 дней. Анализ этих данных ясно показывает, что конъюгат имеет значительно более низкую токсичность, чем свободный алендронат, особенно в отношении остеобластов. Этот аспект особенно важен, так как остеобласты ответственны за продуцирование органического костного матрикса, а их целостность имеет решающее значения для восстановления кости.

Пример 12. Высвобождение коллагена из хряща

Эффективность конъюгата оценивают путем измерения количества коллагена, высвобождаемого из образца, подвергнутого действию воспалительного стимула, поскольку алендронат, как известно, действует как противовоспалительное средство. Выбранная модель представляет собой *ex vivo* модель воспаления хряща после стимуляции воспалительными агентами, которая описана в публикации Arns, S. et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry **2012**, 20: 2131-2140. В частности, хрящ собирают из пателло-фemorального сочленения и мышечков бедренной кости, взятых из бедренной кости взрослой особи крупного рогатого скота, а биопсию хряща (Ø=3 мм) берут с помощью стального пробойника. Биопсии культивируют в 48-луночном многолуночном

планшете (BD Falcon, cat. № 353078, Италия) при 37°C и 5% CO₂ в течение 24 час в среде DMEM/F-12 (1:1) (Life Technologies, cat. № 11320074, Италия), содержащей 2% фетальной бычьей сыворотки (Life Technologies, cat. № 10270106, Италия). После инкубирования биопсии промывают ФСБ (PBS) 1 раз и делят на следующие группы:

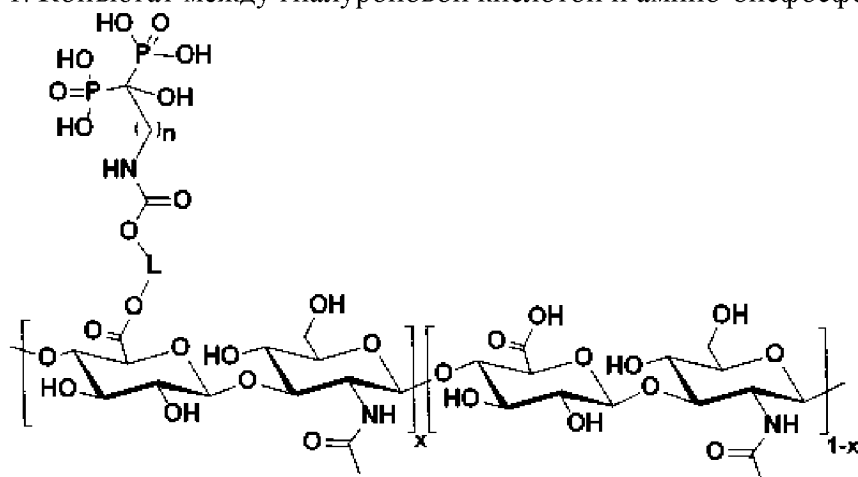
- 1) контрольная группа, в которой биопсии не обрабатывают и не стимулируют;
- 2) группа, стимулированная провоспалительными цитокинами OSM и IL-1 β (10 нг/мл каждого);
- 3) группа, стимулированная OSM и IL-1 β и обработанная конъюгатом ГК-алендронат, полученным, как описано в примере 3, 1 мМ;
- 4) группа, стимулированная OSM и IL-1 β и обработанная конъюгатом ГК-алендронат, полученным, как описано в примере 3, 0,1 мМ;
- 5) группа, стимулированная OSM и IL-1 β и обработанная конъюгатом ГК-алендронат, полученным, как описано в примере 3, 0,01 мМ.

Через 0, 7, 14 и 21 день культуральную среду биопсий аспирируют и заменяют свежей культуральной средой, содержащей воспалительные цитокины и конъюгат ГК-алендронат. Через 21 дней инкубационного периода среду биопсии собирают и высвобожденный растворимый коллаген измеряют с помощью калориметрического анализа, используя набор для анализа коллагена Sircol (Bioscolor, cat. № S1000, UK) в соответствии с инструкциями производителя. Результаты представлены на ФИГ. 6. Биопсии группы, стимулированной OSM и IL-1 β , высвобождают значительно более высокое количество растворимого коллагена в культуральную среду, чем контроль. Конъюгат существенно снижает потерю коллагена, вызванную воспалительным стимулом, вдвое уменьшая количество растворимого коллагена, измеренного в среде биопсий, обработанных раствором, содержащим производное алендроновой кислоты в концентрации 1 мМ. Указанный эффект также наблюдают в несколько меньшей степени при концентрациях 0,1 мМ и 0,05 мМ, что подтверждает способность соединения ингибировать высвобождение коллагена.

Доказанная эффективность конъюгата по изобретению при противодействии высвобождению коллагена, вызванному воспалительным стимулом, подтверждает, что он поддерживает фармакологические свойства алендроната, который продолжает действовать как противовоспалительное средство даже в конъюгированной форме.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат между гиалуроновой кислотой и аминок-бисфосфонатом формулы (I):



(I),

где:

- **L** представляет собой спейсер формулы $-(CH_2)_m-$, где **m** означает целое число от 2 до 10; или **L** представляет собой спейсер формулы $-(CH_2CH_2O)_p-CH_2CH_2-$, где **p** означает целое число от 1 до 4;

- **n** означает целое число от 2 до 5;

- **x** представляет собой число, которое обозначает степень замещения (C3 (DS)) гиалуроновой кислоты аминок-бисфосфонатом относительно карбоксильных групп гиалуроновой кислоты, находящуюся в интервале от 0,05 до 0,30 моль аминок-бисфосфоната/моль гиалуроновой кислоты;

- средневесовая молекулярная масса гиалуроновой кислоты находится в интервале от 30000 до 3×10^6 Да;

- фосфоновые группы аминок-бисфосфонового фрагмента и карбоксильные группы гиалуроновой кислоты, которые не вовлечены в конъюгацию с аминок-бисфосфонатом, необязательно частично или полностью образуют соль с катионом щелочного или щелочноземельного металла, катионом аммония или катионом (C_1-C_4) -тетраалкиламмония, предпочтительно с катионом щелочного металла, более предпочтительно с катионом Na^+ .

2. Конъюгат по п. 1, в котором **m** означает целое число от 2 до 5.

3. Конъюгат по п. 1, в котором **p** имеет значение 1.

4. Конъюгат по любому из пп. 1-3, в котором **n** имеет значение 2, 3 или 5.

5. Конъюгат по пп. 1, 2 и 4, в котором как **m**, так и **n** равны 2.

6. Конъюгат по любому из предыдущих пунктов, в котором средневесовая молекулярная масса гиалуроновой кислоты находится в интервале от 1×10^5 до 1×10^6 Да, более предпочтительно от 150000 до 800000 Да и даже более предпочтительно от 170000 до 230000 Да или от 500000 до 730000 Да.

7. Конъюгат по любому из предыдущих пунктов, в котором **x** находится в интервале от 0,10 до 0,30 моль/моль, более предпочтительно от 0,10 до 0,20 моль/моль.

8. Конъюгат формулы (I) по п. 1 для применения в качестве лекарственного средства.

9. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат формулы (I) по п. 1, и, по меньшей мере, один фармацевтически приемлемый наполнитель и/или носитель.

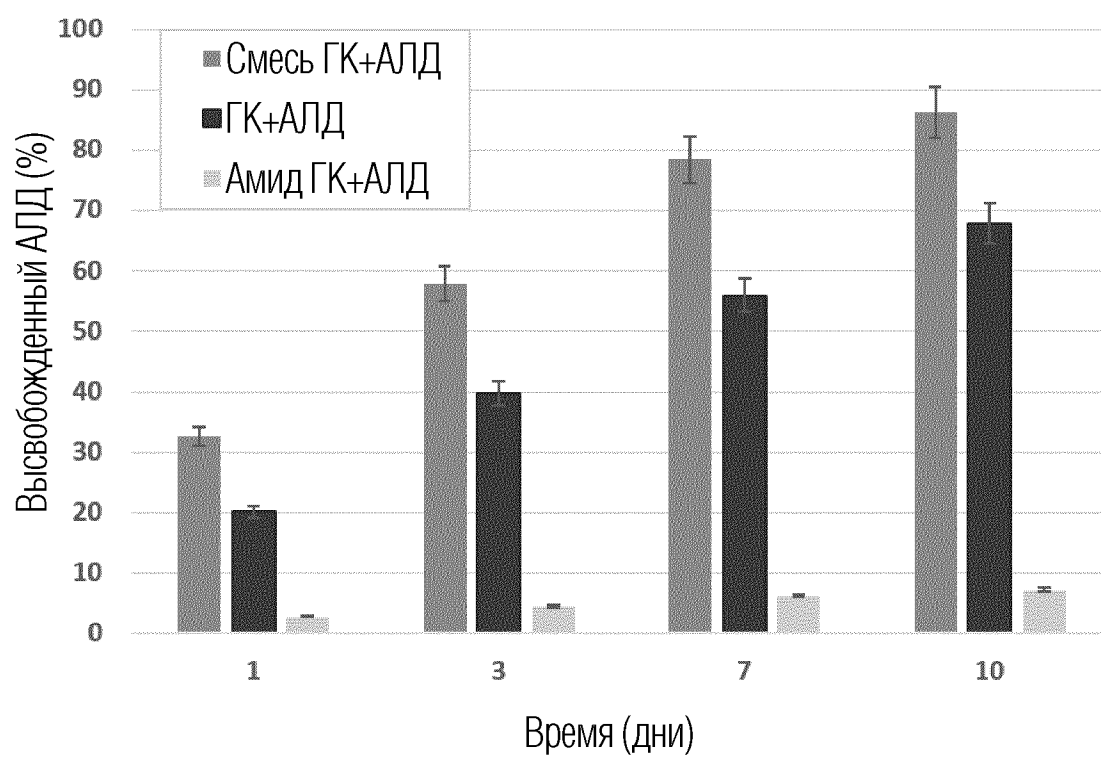
10. Конъюгат по п. 1 или композиция по п. 9 для применения при внутрисуставном и/или местно-регионарном лечении остеоартроза и его последствий на хрящевом и субхондральном уровне; при лечении постменопаузального остеопороза или остеопороза, вызванного лекарствами, особенно стероидами; при лечении ломкости костей вследствие травмы или заболевания, особенно множественной миеломы и метастаз в кости; при внутрикостном и/или местно-регионарном лечении заболеваний, характеризующихся измененным метаболическим обменом костной ткани, в частности болезни Педжета; и при лечении и заполнении поражений субхондральной кости, в том числе поражений костного мозга.

11. Конъюгат по п. 1 или композиция по п. 9 для применения для улучшения остеointegrации протезов.

12. Вискосапплемент, содержащий конъюгат формулы (I) по п. 1, и, по меньшей мере, один фармацевтически приемлемый наполнитель и/или носитель.

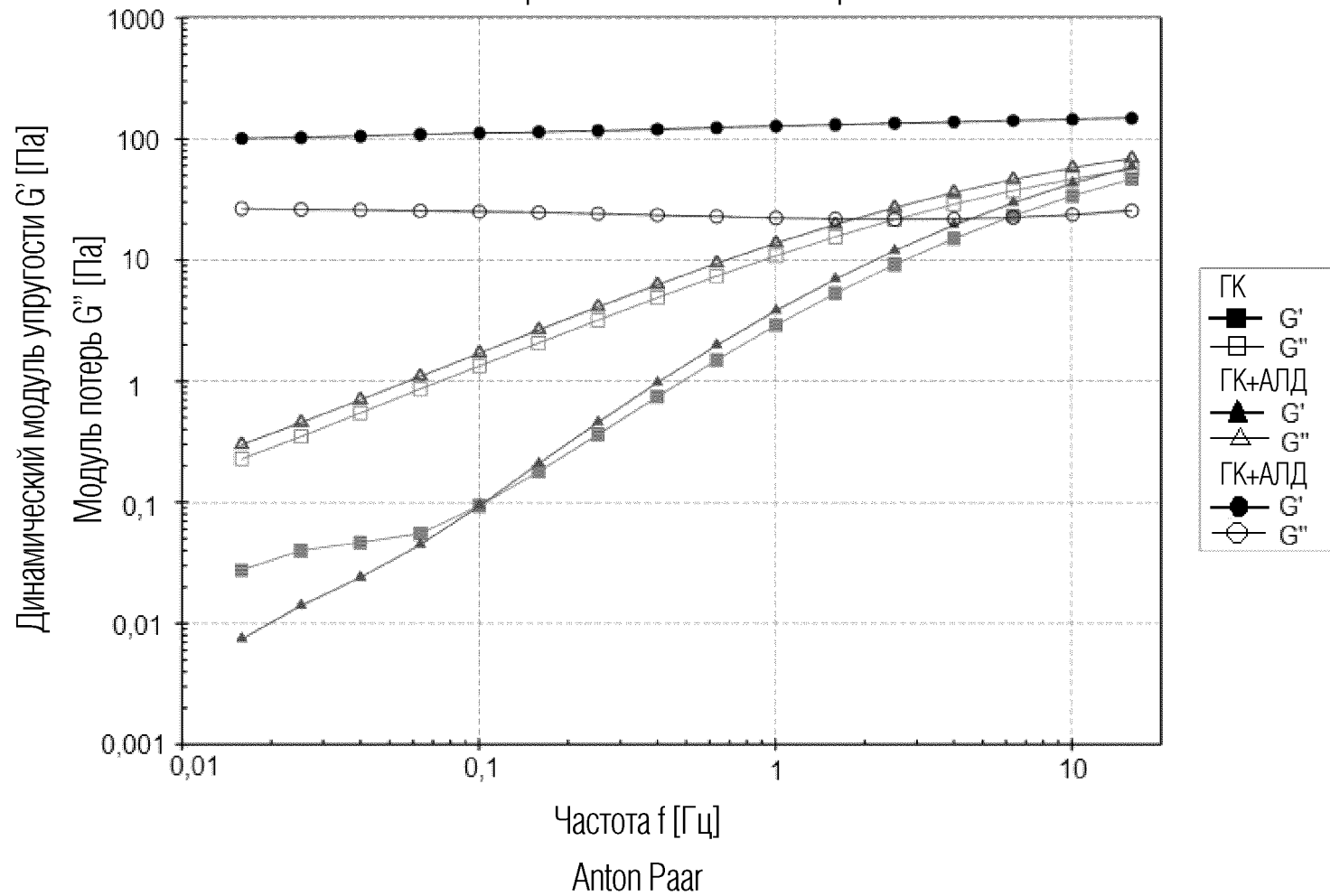
13. Вискосапплемент по п. 12 для применения при внутрисуставном и/или местно-регионарном лечении остеоартроза и его последствий на хрящевом и субхондральном уровне; при лечении постменопаузального остеопороза или остеопороза, вызванного лекарствами, особенно стероидами; при лечении ломкости костей вследствие травмы или заболевания, особенно множественной миеломы и метастаз в кости; и при внутрикостном и/или местно-регионарном лечении заболеваний, характеризующихся измененным метаболическим обменом костной ткани, в частности болезни Педжета.

ФИГ. 1



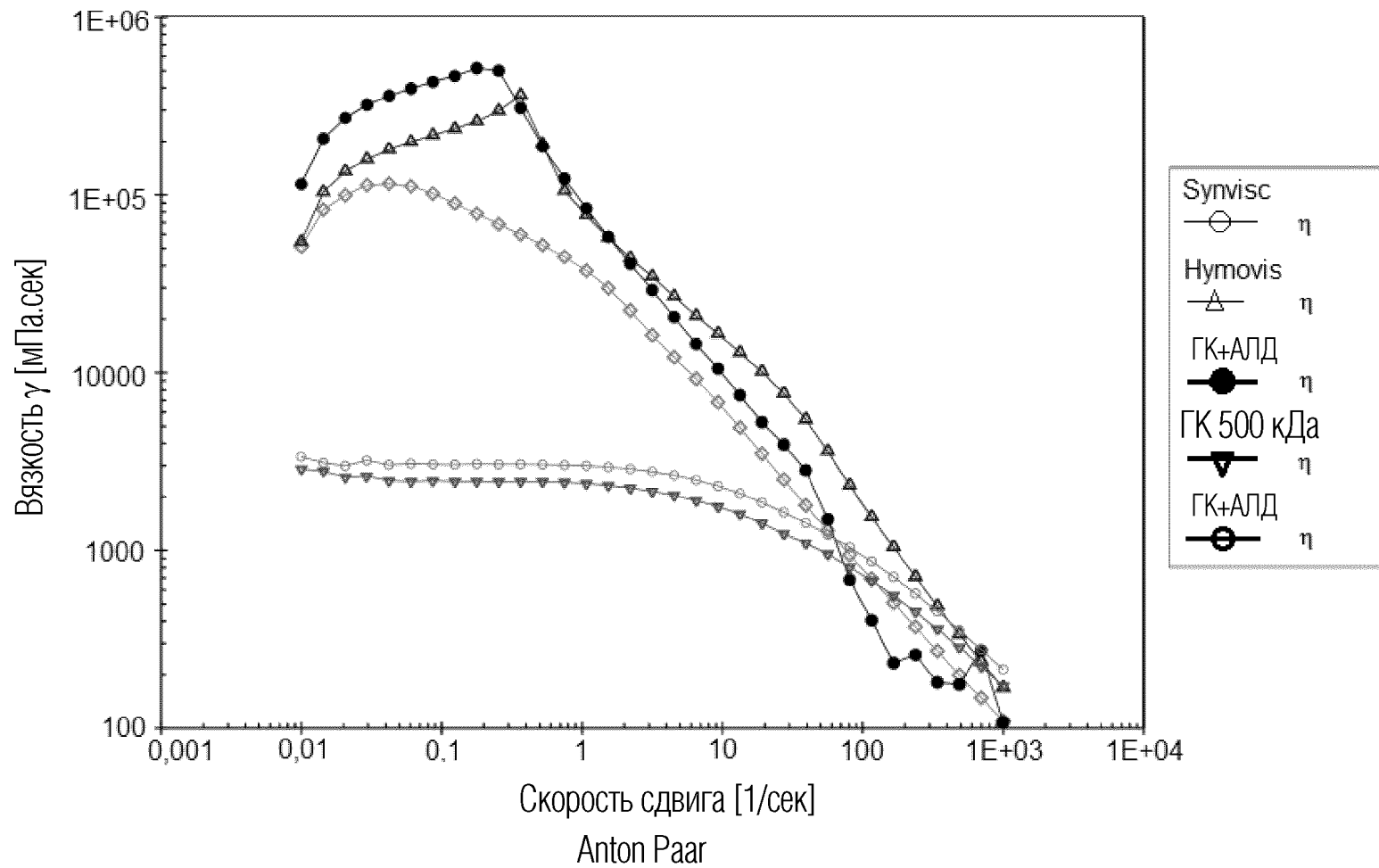
ФИГ. 2

Реометр Anton Paar от RheoCompass



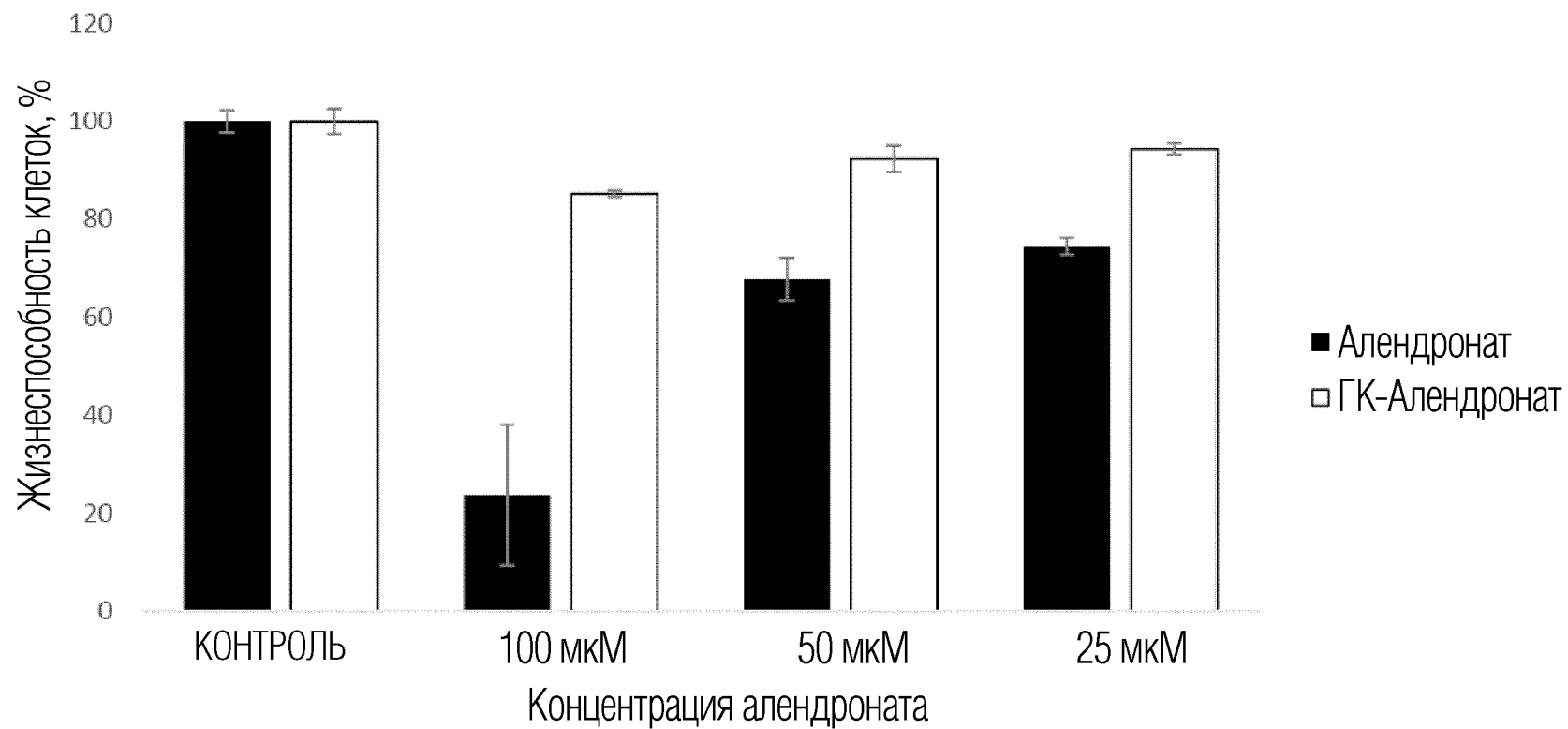
ФИГ. 3

Реометр Anton Paar от RheoCompass



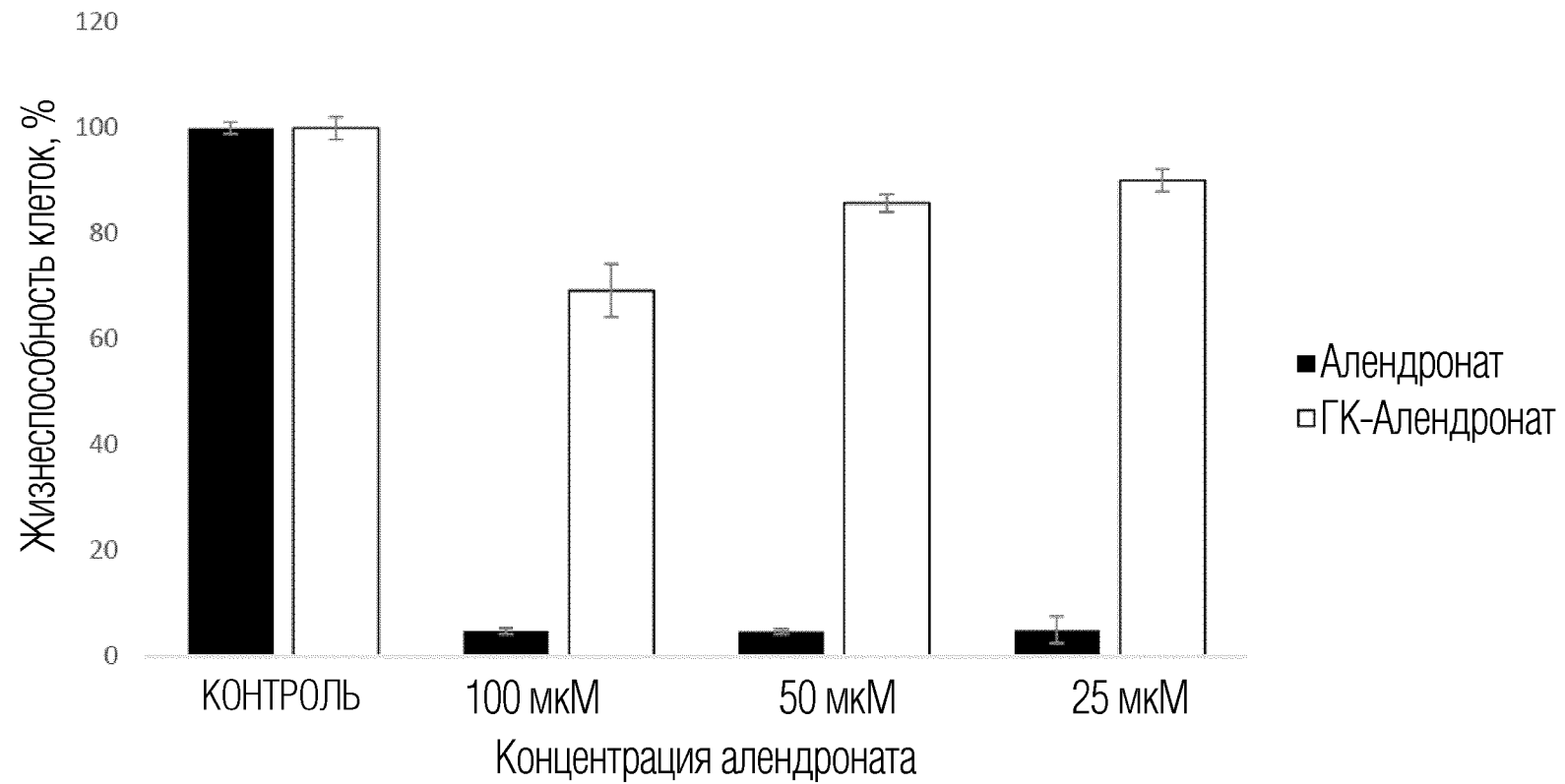
ФИГ. 4А

Цитотоксичность алендроната относительно ГК-Алендронат,
3 дня (остеобласты - Saos-2)(остеобласты - Saos-2)



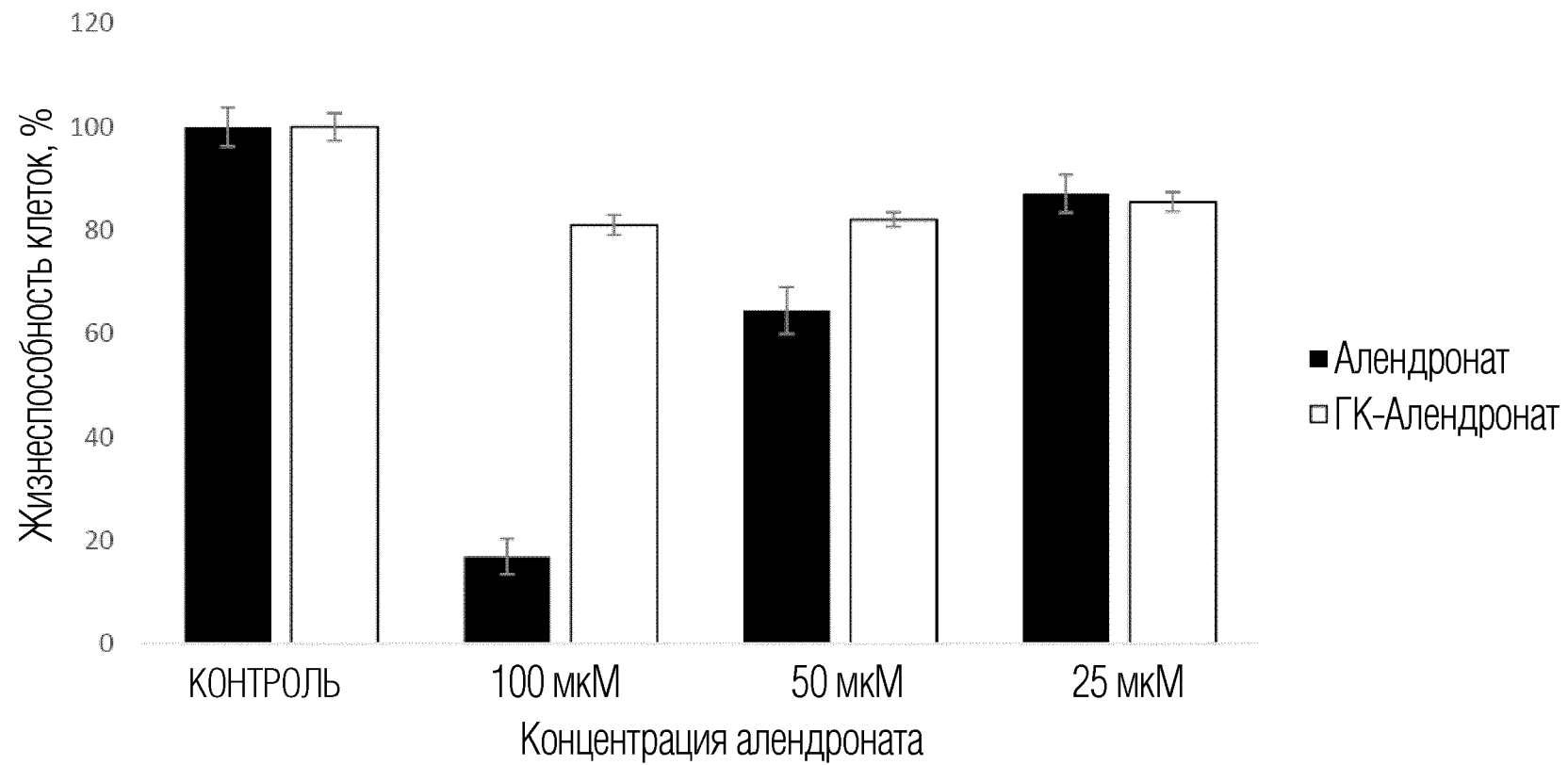
ФИГ. 4В

Цитотоксичность алендроната относительно ГК-Алендронат,
7 дней (остеобласты - Saos-2)



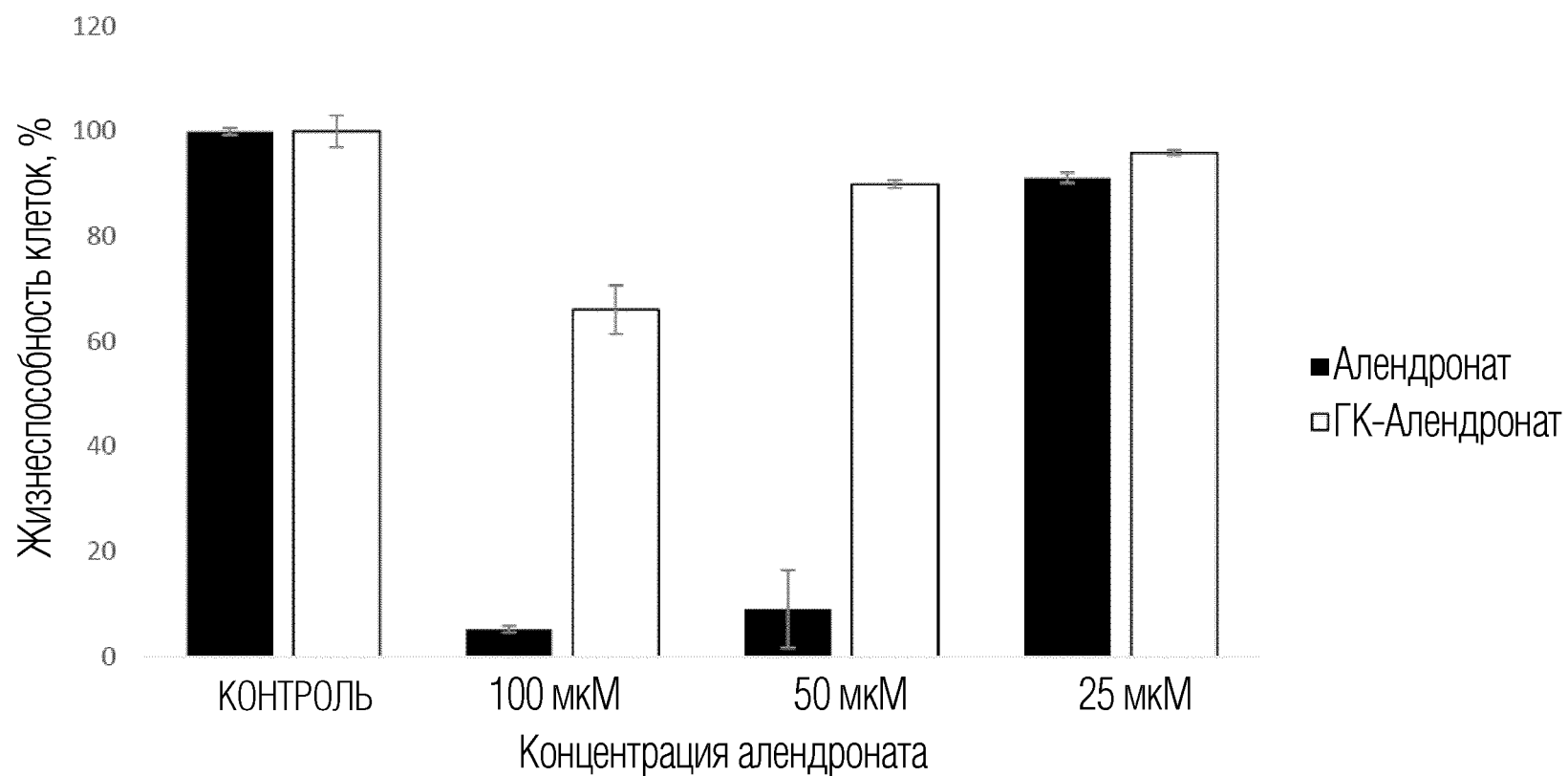
ФИГ. 5А

Цитотоксичность алендроната относительно ГК-Алендронат,
3 дня (первичные хондроциты крупного рогатого скота)



ФИГ. 5В

Цитотоксичность алендроната относительно ГК-Алендронат,
7 дней (первичные хондроциты крупного рогатого скота)



ФИГ. 6

HA-ALD

