

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202192225 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.03.15

(51) Int. Cl. A61K 31/196 (2006.01)
A61K 31/573 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.06.02

(54) КОНЬЮГАТЫ ГИАЛУРОНАНА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/856,714

(32) 2019.06.03

(33) US

(86) PCT/US2020/035780

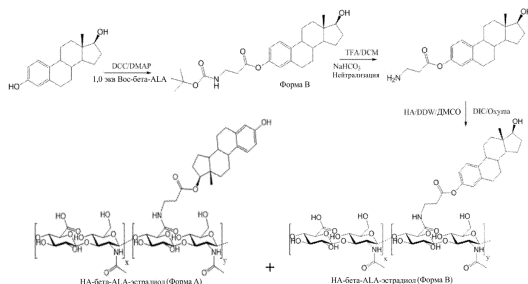
(87) WO 2020/247407 2020.12.10

(71) Заявитель:
АЙХОЛ КОРПОРЕЙШН (US)

(72) Изобретатель:
Ли Сю-Юань, Лай Пин-Шань, Линь
Чих-Ань (TW)

(74) Представитель:
Вахнин А.М. (RU)

(57) Изобретение относится к конъюгату гиалуронана, который включает в себя гиалуроновую кислоту (НА), половой гормон и линкер для связывания одной из дисахаридных единиц НА и полового гормона. Настоящее изобретение также относится к применению конъюгата гиалуронана для лечения или предотвращения нейродегенеративных заболеваний.



202192225

A1

A1

202192225

КОНЬЮГАТЫ ГИАЛУРОНАНА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0001] 1. Область техники, к которой относится изобретение

[0002] Настоящее изобретение в основном относится к конъюгатам гиалуроновой кислоты (НА) и полового гормона и их применению для лечения нейродегенеративных заболеваний.

[0003] 2. Описание предшествующего уровня техники

[0004] Нейродегенеративные заболевания центральной нервной системы (ЦНС) характеризуются прогрессирующей потерей структуры и функции нейронов, включая гибель нейронов, что в основном проявляется деменцией или затрудненным движением (например, тремором в состоянии покоя, тугоподвижностью или скованностью движений). Среди нейродегенеративных заболеваний в неврологических клиниках очень распространены болезнь Альцгеймера (AD), болезнь Паркинсона (PD), боковой амиотрофический склероз (ALS), рассеянный склероз (MS) и болезнь Хантингтона (HD). Нейродегенеративные заболевания часто связаны с популяциями среднего и пожилого возраста и очень изнурительны для пациентов и их семей. Такие заболевания отрицательно сказываются на качестве жизни пациентов и в то же время ложатся тяжелым бременем на медицинскую систему. Однако с появлением стареющего общества распространенность нейродегенеративных заболеваний неизбежно растет.

[0005] На сегодняшний день доступные в настоящее время методы лечения нейродегенеративных заболеваний предназначены только для смягчения симптомов или для отсрочки прогрессирования заболевания. Например, такие препараты, как донепезил, галантамин и ривастигмин, применяются для смягчения когнитивных, функциональных и поведенческих симптомов, задерживая катаболизм ацетилхолина, высвобождаемого в синаптическую щель, чтобы улучшить проводимость по нервам. Кроме того, такие препараты, как леводопа, элдопа и амантадин, применяются для замедления прогрессирования заболевания и увеличения выживаемости пациентов. Тем не менее, у каждого из этих препаратов есть свои ограничения, а некоторые даже имеют серьезные побочные эффекты, и, следовательно, качество жизни пациентов остается неутешительным.

[0006] Ввиду вышеизложенного, в уровне техники существует потребность в эффективном лечении нейродегенеративных заболеваний.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] Ниже представлено упрощенное изложение сущности настоящего изобретения, чтобы предоставить читателю базовое понимание. Это краткое изложение не является обширным обзором раскрытия, и оно не идентифицирует ключевые/критические элементы настоящего изобретения или очерчивает объем настоящего изобретения. Его единственная цель состоит в том, чтобы представить некоторые раскрытые здесь концепции в упрощенной форме в качестве вступления к более подробному описанию, которое будет представлено позже.

[0008] В одном аспекте настоящее изобретение относится к конъюгату гиалуронана.

[0009] В соответствии с различными вариантами осуществления настоящего изобретения конъюгат гиалуронана содержит гиалуроновую кислоту (НА) или её производное или соль, половой гормон и линкер, ковалентно связывающий половой гормон с одной из дисахаридных единиц НА или производным НА, или солью НА.

[0010] В некоторых вариантах осуществления изобретения половой гормон может представлять собой эстрон, эстрадиол, эстриол, тестостерон или 11-дезоксикортикостерон.

[0011] В соответствии с необязательными вариантами осуществления настоящего изобретения линкер настоящего конъюгата гиалуронана представляет собой любую из, одну или несколько аминокислот, липид, дигидразид- C_2 - C_{20} дикарбоновую кислоту и C_2 - C_{20} дикарбоновые кислоты.

[0012] В одном варианте осуществления изобретения линкер представляет собой аминокислоту, такую как β -аланин (β -ALA). В другом варианте осуществления изобретения линкер представляет собой дигидразид- C_2 - C_{20} дикарбоновую кислоту, например, дигидразид адипиновой кислоты (ADH)-сукцинат. В еще одном варианте осуществления изобретения линкер представляет собой C_2 - C_{20} дикарбоновую кислоту; например, янтарную кислоту.

[0013] В соответствии с другими вариантам осуществления настоящего изобретения, НА настоящего конъюгата гиалуронана имеет степень замещения от 0,1% до 60%.

[0014] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, НА настоящего конъюгата гиалуронана имеет средневесовую молекулярную массу (M_w) примерно 5-500 килодальтон (кДа). В соответствии с различными вариантами осуществления настоящего изобретения линкер связан с гидроксильной группой (-ОН) полового гормона.

[0015] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения нейродегенеративных заболеваний у нуждающегося в этом субъекта.

[0016] В соответствии с некоторыми вариантам осуществления настоящего изобретения, способ включает в себя этап введения субъекту эффективного количества конъюгата гиалуронана настоящего изобретения.

[0017] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, настоящий конъюгат гиалуронана вводят субъекту путем перорального, назального, внутрочерепного, внутриспинального, интратекального, интрамедуллярного, интрацеребрального, интрацеребровентрикулярного, внутривенного, внутриартериального, внутрисердечного, внутрикожного, подкожного, трансдермального, внутрибрюшинного или внутримышечного введения.

[0018] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения нейродегенеративное заболевание, которое можно лечить с применением настоящего конъюгата гиалуронана, представляет собой болезнь Альцгеймера (AD), болезнь Паркинсона (PD), боковой амиотрофический склероз (ALS), множественный склероз (MS), болезнь Хантингтона (HD), лобно-височную деменцию, эпилепсию, невропатическую боль или атаксию.

[0019] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения субъектом, которого можно лечить с помощью настоящего конъюгата гиалуронана, является млекопитающее, предпочтительно человек.

[0020] Объекты изобретения, которые также включены в другие аспекты настоящего изобретения, включают в себя применение гиалуронового конъюгата в получении лекарственного средства для применения при лечении нейродегенеративных заболеваний, а также гиалуроновый конъюгат или содержащую его фармацевтическую композицию для лечения нейродегенеративных заболеваний.

[0021] Многие из сопутствующих признаков и преимуществ настоящего изобретения станут более понятными со ссылкой на следующее подробное описание, рассматриваемое в связи с сопроводительными чертежами.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0022] Эти и другие признаки, аспекты и преимущества настоящего изобретения станут более понятными со ссылкой на следующее описание, прилагаемую формулу изобретения и прилагаемые чертежи, на которых:

[0023] Фиг. 1 представляет собой схему синтеза конъюгата гиалуронана НА- β ALA-C3/C17 эстрадиол (НА-E2) в соответствии с одним рабочим примером настоящего изобретения;

[0024] На фиг. 2А и 2В показаны результаты СВЭЖХ-анализа эстрадиола (Е2) и НА-Е2, соответственно, в соответствии с одним рабочим примером настоящего изобретения;

[0025] На фиг. 3 показано влияние конъюгата гиалуронана НА-С17-Е2 на уровни мембранного потенциала митохондрий (МПМ) *in vitro*; в соответствии с одним рабочим примером настоящего изобретения;

[0026] На фиг. 4А и 4В показано влияние конъюгата гиалуронана НА-Е2 на изменения уровня А β 42 в сыворотке крови и гиппокампе *in vivo* у трансгенных мышей APP/PS1, соответственно, в соответствии с одним рабочим примером настоящего изобретения;

[0027] Фиг. 5 представляет собой схему синтеза конъюгата гиалуронана НА-С17-Е2 в соответствии с одним рабочим примером настоящего изобретения;

[0028] На фиг. 6А и 6В показано влияние *in vivo* конъюгата гиалуронана НА-С17-Е2 на расстояние плавания и время плавания у крыс, подвергнутых гистероэктомию (ОНЕ), соответственно, в соответствии с одним рабочим примером настоящего изобретения;

[0029] На фиг. 7А и 7В показано влияние *in vivo* конъюгата гиалуронана НА-С17-Е2 на расстояние плавания и время плавания в целевом квадрате у крыс ОНЕ, соответственно, в соответствии с одним рабочим примером настоящего изобретения;

[0030] На фиг. 8А и 8В показано влияние *in vivo* конъюгата гиалуронана НА-С17-Е2 на расстояние плавания и время плавания у крыс ОНЕ, соответственно, в соответствии с одним рабочим примером настоящего изобретения;

[0031] На фиг. 9А и 9В показано влияние *in vivo* конъюгата гиалуронана НА-С17-Е2 на расстояние плавания и время плавания в целевом квадрате у крыс ОНЕ, соответственно, в соответствии с одним рабочим примером настоящего изобретения;

[0032] Фиг. 10А и фиг. 10В представляют собой репрезентативные микрофотографии, показывающие, соответственно, *in vivo* действие конъюгата гиалуронана НА-С17-Е2 на дистальные апикальные и дистальные базальные дендриты пирамидных нейронов в СА1 гиппокампа, в соответствии с одним рабочим примером настоящего изобретения;

[0033] На фиг. 11А и 11В показано влияние *in vivo* конъюгата гиалуронана НА-С17-Е2 на плотность апикальных и базальных дендритных шипов пирамидного нейрона СА1 гиппокампа у крыс ОНЕ, соответственно, в соответствии с одним рабочим примером настоящего изобретения; и

[0034] На фиг. 12 показано влияние *in vivo* конъюгата гиалуронана HA-C17-E2 на способность к обучению мышей, получавших МРТР, в соответствии с одним рабочим примером настоящего изобретения.

ОПИСАНИЕ

[0035] Подробное описание, представленное ниже со ссылкой на прилагаемые чертежи, является описанием настоящих примеров и не предназначено для представления единственных форм, в которых настоящий пример может быть реализован или использован. В описании излагаются функции примера и последовательность этапов для реализации и использования примера. Однако одни и те же или эквивалентные функции и последовательности могут быть осуществлены с помощью разных примеров.

[0036] Для удобства здесь собраны некоторые термины, используемые в описании, примерах и прилагаемой формуле изобретения. Если здесь не указано иное, то научная и техническая терминология, используемая в настоящем изобретении, должна иметь значения, которые обычно понимаются и используются средним специалистом в данной области техники.

[0037] Если иное не следует из контекста, то следует понимать, что термины в единственном числе должны включать в себя формы множественного числа этих терминов, а термины во множественном числе должны включать в себя единственное число. Кроме того, используемые здесь и в формуле изобретения термины «по меньшей мере, один» и «один или несколько» имеют одинаковое значение и включают в себя один, два, три или более. Кроме того, термины «по меньшей мере, один из А, В и С», «по меньшей мере, один из А, В или С» и «по меньшей мере, один из А, В и/или С», используемые в данном описании и прилагаемой формуле изобретения, предназначены для охвата одного А, одного В, одного С, А и В вместе, В и С вместе, А и С вместе, а также А, В и С вместе.

[0038] Несмотря на то, что числовые диапазоны и параметры, определяющие широкий объем изобретения, являются приблизительными, числовые значения, изложенные в конкретных примерах, указаны с максимально возможной точностью. Однако любое числовое значение по своей сути содержит определенные ошибки, обязательно являющиеся результатом стандартного отклонения, обнаруженного в соответствующих испытательных измерениях. Кроме того, используемый здесь термин «примерно» обычно означает в пределах 10%, 5%, 1% или 0,5% от данного значения или диапазона. В качестве альтернативы, термин «примерно» означает в пределах допустимой стандартной ошибки среднего значения, когда его рассматривает специалист в данной области техники. За исключением функциональных/рабочих примеров, или если иное

явно не указано, все раскрытые здесь числовые диапазоны, количества, значения и проценты, такие как количества материалов, продолжительность времени, температуры, рабочие условия, соотношения количеств и тому подобное следует понимать как измененные во всех случаях термином «примерно». Соответственно, если не указано иное, то числовые параметры, изложенные в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения, являются приблизительными, и могут варьироваться по желанию. По меньшей мере, каждый числовой параметр должен толковаться, по меньшей мере, в свете количества сообщаемых значащих цифр и с применением обычных методов округления. В настоящем изобретении диапазоны могут быть выражены как от одной конечной точки до другой конечной точки, так и указаны как диапазон между двумя конечными точками. Все раскрытые здесь диапазоны включают в себя конечные точки, если не указано иное.

[0039] Используемые здесь термины «лечение» и «лечить» могут относиться к превентивной (например, профилактической), лечебной или паллиативной мере. В частности, используемый здесь термин «лечение» относится к применению или введению конъюгата гиалуронана настоящего изобретения или содержащей его фармацевтической композиции субъекту, у которого есть медицинское состояние (например, нейродегенеративное заболевание), симптом, связанный с медицинским состоянием, заболевание или расстройство, вторичное по отношению к медицинскому состоянию, или предрасположенность к медицинскому состоянию, с целью частичного или полного ослабления, улучшения, облегчения, отсрочки начала, подавления прогрессирования, уменьшения тяжести и/или снижения частоты одного или нескольких симптомов или признаков указанного конкретного заболевания, расстройства и/или состояния. Лечение может быть назначено субъекту, у которого нет признаков заболевания, расстройства и/или состояния, и/или субъекту, у которого проявляются только ранние признаки заболевания, расстройства и/или состояния, с целью уменьшения риска развития патологии, связанной с заболеванием, расстройством и/или состоянием.

[0040] Термины «субъект» и «пациент» используются здесь взаимозаменяемо и предназначены для обозначения животного, включая человека, которое можно лечить с помощью описанного здесь конъюгата гиалуронана, содержащих его фармацевтических композиций и/или способов настоящего изобретения. Соответственно, термин «субъект» или «пациент» включает в себя любое млекопитающее, которому может быть полезно настоящее изобретение. Термин «млекопитающее» относится ко всем членам класса *Mammalia*, включая людей, приматов, домашних и сельскохозяйственных животных, таких как кролики, свиньи, овцы и крупный рогатый скот; а также животных в зоопарках, спортивных животных или животных компаньонов; и грызунов, таких как мышь и крыса.

Термин «не являющееся человеком млекопитающее» относится ко всем членам класса Mammalis, кроме человека. В одном примерном варианте осуществления изобретения пациентом является человек. Термин «субъект» или «пациент» предназначен для обозначения как мужского, так и женского пола, если конкретно не указан один пол.

[0041] Используемый здесь термин «эффективное количество» относится к количеству конъюгата гиалуронана настоящего изобретения, которое достаточно для получения желаемого терапевтического ответа. Эффективное количество агента не требуется для излечения заболевания или состояния, но обеспечивает лечение заболевания или состояния, так что начало заболевания или состояния задерживается, затрудняется или предотвращается, или симптомы заболевания или состояния улучшаются. Эффективное количество может быть разделено на одну, две или более доз в подходящей форме для введения один, два или более раз в течение обозначенного периода времени. Конкретное эффективное или достаточное количество будет варьироваться в зависимости от таких факторов, как конкретное состояние, подлежащее лечению, физическое состояние пациента (например, масса тела, возраст или пол пациента), тип млекопитающего или животного, подлежащего лечению, продолжительность лечения, характер сопутствующей терапии (если таковая имеется), а также конкретные применяемые препараты и структура соединений или их производных. Эффективное количество может быть выражено, например, как общая масса конъюгата гиалуронана или эквивалентная масса полового гормона в конъюгате гиалуронана (например, в граммах, миллиграммах или микрограммах), или как отношение массы конъюгата гиалуронана или эквивалентной массы полового гормона в конъюгате гиалуронана к массе тела, например, в миллиграммах на килограмм (мг/кг).

[0042] Термины «применение» и «введение» используются здесь взаимозаменяемо для обозначения нанесения конъюгата гиалуронана или фармацевтической композиции по настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в лечении с их применением.

[0043] В соответствии с некоторыми примерами настоящего изобретения конъюгат гиалуронана вводят два раза в неделю в течение периода тестирования. Как можно понять, эффективное количество можно регулировать соответствующим образом в зависимости от интервала и продолжительности введения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, когда субъекту вводят несколько доз, частота введения нескольких доз субъекту составляет три дозы в день, две дозы в день, одна доза в день, одна доза через день, одна доза каждый третий день, одна доза каждый четвертый день, одна доза каждый пятый день, одна доза каждый шестой день, одна доза каждую неделю, одна доза каждые две недели, одна доза в месяц или одна доза через месяц. В некоторых вариантах

осуществления изобретения частота введения множественных доз субъекту составляет одну дозу в день. В некоторых вариантах осуществления изобретения частота введения множественных доз субъекту составляет две дозы в день. В некоторых вариантах осуществления изобретения, когда субъекту вводят несколько доз, продолжительность интервала времени между первой дозой и последней дозой множества доз составляет один день, два дня, четыре дня, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, два месяца, три месяца, четыре месяца, шесть месяцев, девять месяцев, один год, два года, три года, четыре года, пять лет, семь лет, десять лет, пятнадцать лет, двадцать лет или время жизни субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения продолжительность интервала времени между первой дозой и последней дозой множества доз составляет три месяца, шесть месяцев или один год. В некоторых вариантах осуществления изобретения продолжительность интервала времени между первой дозой и последней дозой множества доз составляет продолжительность жизни субъекта. В конкретном варианте осуществления изобретения частота введения множественных доз субъекту составляет три дозы в неделю.

[0044] Кроме того, в соответствии с приведенным ниже примерами конъюгат гиалуронана вводят путем внутривенной инъекции; однако это только иллюстрация того, как настоящее изобретение может быть реализовано, и настоящее изобретение этим не ограничивается.

[0045] Например, конъюгат гиалуронана может быть включен в рецептуру фармацевтической композиции, подходящей для желаемого способа введения, вместе с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом. Некоторые фармацевтические композиции, полученные в соответствии с раскрытой здесь и изложенной в формуле изобретения идеей(-ями) изобретения, представляют собой лекарственные формы для однократного введения, подходящие для перорального, парентерального (например, подкожного, внутривенного, болюсного, внутримышечного или внутриаириального введения), интравитреального или трансдермального введения пациенту. Примеры лекарственных форм включают в себя без ограничений таблетки; капсуловидные таблетки; капсулы, такие как мягкие эластичные желатиновые капсулы; крахмальные капсулы; троши; пастилки; дисперсии; суппозитории; мази; катаплазмы (припарки); пасты; порошки; повязки; кремы; пластыри; растворы; патчи; аэрозоли (например, назальные спреи или ингаляторы); гели; жидкие лекарственные формы, подходящие для перорального введения пациенту, включая суспензии (например, водные или неводные жидкие суспензии, эмульсии типа «масло в воде» или жидкие эмульсии типа «вода в масле»), растворы и настойки; жидкие лекарственные формы, подходящие

для парентерального введения пациенту; и стерильные твердые вещества (например, кристаллические или аморфные твердые вещества), которые могут быть восстановлены для получения жидких лекарственных форм, подходящих для парентерального введения пациенту. Как можно понять, эти фармацевтические композиции также входят в объем настоящего изобретения.

[0046] Используемый здесь термин «фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество» означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или переносчик, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, носитель, растворитель или инкапсулирующий материал, участвующие в переносе или транспортировке рассматриваемых агентов из одного органа или части тела к другому органу или части тела. Каждое вспомогательное вещество должно быть «приемлемым» в смысле совместимости с другими ингредиентами препарата. Фармацевтическая композиция содержит соединение настоящего изобретения в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми ингредиентами. Вспомогательное вещество может быть в форме твердого, полутвердого или жидкого разбавителя, крема или капсулы. Эти фармацевтические препараты являются еще одним объектом настоящего изобретения. Обычно количество активных соединений составляет от 0,1 до 95% по массе препарата, предпочтительно от 0,2 до 20% по массе в препаратах для парентерального применения и предпочтительно от 1 до 50% по массе в препаратах для перорального введения. Для клинического применения способов настоящего изобретения фармацевтическую композицию настоящего изобретения получают в виде препаратов, подходящих для предполагаемого пути введения.

[0047] Используемый здесь термин «степень замещения (DS)» конъюгата НА означает среднее соотношение групп заместителей (т.е. полового гормона), присоединенных к дисахаридной единице НА.

[0048] Используемый здесь термин «гиалуроновая кислота» (НА) (также называемая гиалуронатом или гиалуронаном) представляет собой анионный несulfатированный гликозаминогликан, состоящий из повторяющейся последовательности дисахаридных единиц, в частности, D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина (-4GlcUA β 1-3GlcNAc β 1-). Её молекулярная масса может варьировать от 379 дальтон (Да) (одна дисахаридная единица) до более миллионов дальтон. НА участвует в подвижности клеток и адгезии иммунных клеток путем взаимодействия с рецептором клеточной поверхности для опосредованной гиалуронаном подвижности (RHAMM) и рецептором CD44. Термин «производное НА» относится к НА,

имеющей любую модификацию гидроксильных, карбоксильных, амидных или ацетиламино групп одной или нескольких дисахаридных единиц НА.

[0049] Используемый здесь термин «соль» относится к любой и всем солям и включает в себя фармацевтически приемлемые соли. Термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к тем солям, которые в рамках здравого медицинского заключения подходят для использования в контакте с тканями людей и низших животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции и тому подобного соразмерно разумному соотношению польза/риск. Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в данной области техники.

[0050] Используемый здесь термин «линкер» означает химический компонент (например, форму химической связи между двумя функциональными группами), который соединяет две части конъюгата. В настоящем изобретении линкер может представлять собой любой химический компонент, присутствующий между половым гормоном и НА. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения линкер может расщепляться химически или ферментативно; в качестве альтернативы он может спонтанно разлагаться.

[0051] В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления настоящего изобретения, конъюгат гиалуронана настоящего изобретения получают в виде препарата с «модифицированным высвобождением (MR)», такого как лекарственный препарат с увеличенным временем высвобождения (ER), контролируемым высвобождением (CR), замедленным высвобождением (SR), пролонгированным высвобождением (PR), длительным высвобождением (LAR) и отсроченным высвобождением (DR). В отличие от обычных лекарственных форм, которые часто обеспечивают быстрое высвобождение лекарственного вещества, в результате чего имеют место колебания концентрации лекарственного вещества в организме, и требуется многократное введение дозы для поддержания терапевтического уровня лекарственного вещества, в лекарственных формах с модифицированным высвобождением такие характеристики высвобождения как время и/или место высвобождения лекарственного вещества выбирают для достижения желаемых терапевтических целей, не достижимых с помощью обычных лекарственных форм. Терминология, относящаяся к лекарственным формам, будет иметь свои обычные значения, признанные и используемые специалистами в данной области техники. Например, термин «с увеличенным временем высвобождения» обозначает лекарственную форму, которая позволяет, по меньшей мере, вдвое снизить частоту введения дозы по сравнению с лекарственным средством, представленным в виде (традиционной) лекарственной формы с немедленным высвобождением. Термин «контролируемое высвобождение» относится к лекарственным формам, из которых

лекарственное вещество может доставляться в течение длительного периода времени; в случае инъекционных лекарственных форм этот период может варьироваться от дня до месяцев. Термин «замедленное высвобождение» относится к высвобождению лекарственного вещества с заданной скоростью, приводящей к постоянной концентрации в плазме крови в течение определённого периода времени.

[0052] Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на неожиданном открытии того факта, что конъюгаты НА-половой гормон проявляют желаемый терапевтический эффект при лечении различных нейродегенеративных заболеваний, в то же время уменьшая нежелательные побочные эффекты, вызванные действием половых гормонов на другие органы, такие как молочная железа и сердце.

[0053] Соответственно, в первом аспекте настоящее изобретение относится к конъюгату гиалуронана, который содержит гиалуроновую кислоту (НА) или её производное или соль, половой гормон и линкер для связывания полового гормона с одной из дисахаридных единиц НА, или производным НА, или солью НА.

[0054] Например, половой гормон может быть любым из эстрона (E1), эстрадиола (E2), эстриола (E3), тестостерона (T) и 11-дезоксикортикостерона (11-DOC).

[0055] В соответствии с различными вариантами осуществления изобретения линкер может представлять собой один или несколько аминокислотных остатков, липид, дигидразид- C_2 - C_{20} дикарбоновую кислоту или C_2 - C_{20} дикарбоновую кислоту. В настоящем изобретении линкер служит структурой или спейсером для соединения НА и полового гормона. Линкер с одной стороны взаимодействует с НА через связь с гидроксильной, карбоксильной, амидной или ацетиламино группой, а с другой стороны, с половым гормоном через любую возможную ковалентную связь.

[0056] В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер представляет собой один аминокислотный остаток, такой как аланин (Ala; предпочтительно, β -аланин), аргинин (Arg), аспарагин (Asn), аспарагиновая кислота (Asp), цистеин (Cys), глутаминовая кислота (Glu), глутамин (Gln), глицин (Gly), гистидин (His), изолейцин (Ilu), лейцин (Leu), лизин (Lys), метионин (Met), фенилаланин (Phe), пролин (Pro), серин (Ser), треонин (Thr), триптофан (Trp), тирозин (Tyr), валин (Val), γ -abu (4-аминобутановая кислота), δ -аминовалериановая кислота (5-аминопентановая кислота), ϵ -аминокапроновая кислота (6-аминогексановая кислота), 7-аминогептановая кислота, 8-аминооктановая кислота и 11-аминоундекановая кислота. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер может представлять собой короткий пептид, содержащий от двух до 100 аминокислотных остатков. Например, линкер может быть гибким пептидом, имеющим последовательность $(G_nS)_m$, где n и m независимо представляют собой числа от 1 до 4.

[0057] В некоторых вариантах осуществления изобретения предпочтителен липидный линкер. Такие липидные линкеры имеют гидрофильную полярную головную группу и гидрофобную цепь.

[0058] В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер представляет собой линейные или разветвленные, алифатические, ароматические или арилифатические C_2 - C_{20} дикарбоновые кислоты, которые могут быть производными, например, щавелевой кислоты, малоновой кислоты, янтарной кислоты, глутаровой кислоты, адипиновой кислоты, пимелиновой кислоты, субериновой кислоты, азелаиновой кислоты, себаценовой кислоты, додекандионовой кислоты, брассиловой кислоты, тапсиновой кислоты, диаболовой кислоты, кроцетина, малеиновой кислоты, фумаровой кислоты, глутаконовой кислоты, 2-децендионовой кислоты, травминовой кислоты, муконовой кислоты, глютиновой кислоты, цитраконовой кислоты, мезаконовой кислоты, итаконовой кислоты, тартроновой кислоты, мезоксалеиновой кислоты, яблочной кислоты, винной кислоты, щавелевоуксусной кислоты, аспарагиновой кислоты, α -гидроксиглутаровой кислоты, арабинаровой кислоты, ацетонедикарбоновой кислоты, α -кетоглутаровой кислоты, глутаминовой кислоты, диаминопимелиновой кислоты, сахаристой кислоты, фталевой кислоты, изофталевой кислоты, терефталевой кислоты, дифеновой кислоты и 2,6-нафталиндикарбоновой кислоты.

[0059] Линкер на основе дигидразид- C_2 - C_{20} дикарбоновой кислоты обычно имеет две части, т.е. дигидразид и C_2 - C_{20} дикарбоновую кислоту, в которых одна карбоксилатная группа C_2 - C_{20} дикарбоновой кислоты ковалентно связана с одной гидразидной группой дигидразида. Примеры дигидразидной части включают в себя без ограничений дигидразид адипиновой кислоты (ADH), дигидразид себаценовой кислоты (SDH), дигидразид валина (VDH), дигидразид изофталевой кислоты (IDH), карбодигидразид (CDH), дигидразид икозандионовой кислоты (LDH), дигидразид янтарной кислоты, дигидразид адипина, дигидразида сульфоксида, дигидразид щавелевой кислоты и дигидразид пимелиновой кислоты. Иллюстративные примеры, описанные выше в связи с линкером C_2 - C_{20} дикарбоновой кислоты, также подходят для использования в качестве компонента дикарбоновой кислоты для линкеров на основе дигидразид- C_2 - C_{20} дикарбоновой кислоты.

[0060] Настоящий линкер также включает в себя линкер на основе аминокислот- C_2 - C_{20} дикарбоновой кислоты, который имеет две части, то есть одну или несколько аминокислот и C_2 - C_{20} дикарбоновую кислоту. Иллюстративные примеры, описанные выше в связи с аминокислотными остатками и линкером C_2 - C_{20} дикарбоновой кислоты, также подходят для использования для образования такого линкера на основе аминокислот- C_2 - C_{20} дикарбоновой кислоты.

C₂₀ дикарбоновой кислоты. В качестве примера, а не ограничения, линкер на основе аминок-C₂-C₂₀ дикарбоновой кислоты может быть линкером на основе ALA-сукцината.

[0061] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, НА настоящего конъюгата гиалуронана имеет средневесовую молекулярную массу (Mw) в диапазоне от примерно 5 кДа до примерно 500 кДа, например, примерно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490 или 500 кДа.

[0062] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, НА настоящего конъюгата гиалуронана может быть в незамещенной (то есть НА как таковой) или замещенной (например, производной НА) форме, или может быть её солью. Как описано выше, НА может быть модифицирована по её функциональным группам, таким как гидроксильная, карбоксильная, амидная или ацетиламино группа. НА можно модифицировать этерификацией, прививкой и/или гидрофобизацией её функциональных групп (то есть гидроксильных, карбоксильных, амидных или ацетиламино групп), как описано выше, посредством реакции с рядом химических агентов. Типичные производные НА представляют собой этилсульфированную НА, деацетилованную НА или НА, модифицированную гидразидом. В одном примере настоящего изобретения НА настоящего конъюгата гиалуронана находится в незамещенной форме. В другом примере настоящего изобретения НА настоящего конъюгата гиалуронана находится в замещенной форме.

[0063] В соответствии с различными вариантами осуществления настоящего изобретения, настоящий конъюгат гиалуронана имеет степень замещения половым гормоном от 0,1 до 60%. Например, DS может быть 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 или 60%.

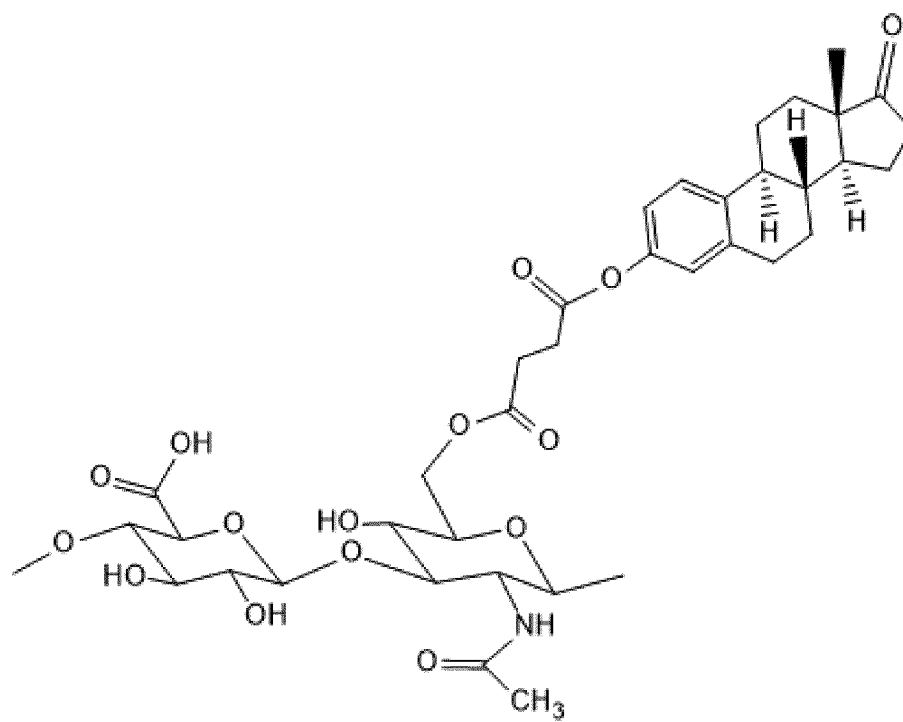
[0064] Конъюгированные дисахаридные единицы некоторых репрезентативных гиалуроновых конъюгатов настоящего изобретения приведены в Таблице 1 и следующих параграфах; однако настоящее изобретение не ограничивается этими примерами. Как можно понять, стереоизомеры иллюстративного полового гормона, показанного в Таблице 1, также предусмотрены авторами настоящего изобретения.

Таблица 1

No.	Половой гормон	Линкер
-----	----------------	--------

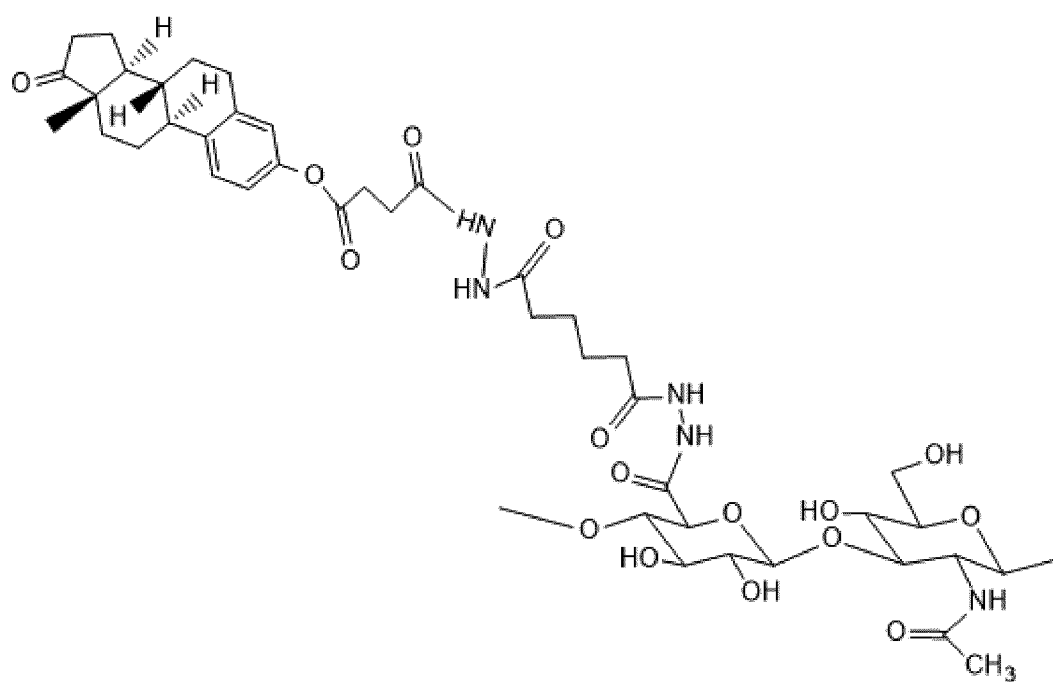
I	E1	Сукцинат
II	E1	ADH-сукцинат
III	E1	β -Ala
IV	E1	β -Ala-сукцинат
V	E2	ADH-сукцинат
VI	E2	ADH-сукцинат
VII	E2	Сукцинат
VIII	E2	Сукцинат
IX	E2	β -Ala-сукцинат
X	E2	β -Ala-сукцинат
XI	E2	β -Ala
XII	E2	β -Ala
XIII	E3	ADH-сукцинат
XIV	E3	ADH-сукцинат
XV	E3	ADH-сукцинат
XVI	E3	Сукцинат
XVII	E3	Сукцинат
XVIII	E3	Сукцинат
XIX	E3	β -Ala-сукцинат
XX	E3	β -Ala-сукцинат
XXI	E3	β -Ala
XXII	E3	β -Ala-сукцинат
XXIII	E3	β -Ala
XXIV	E3	β -Ala
XXV	11-DOC	ADH-сукцинат
XXVI	11-DOC	Сукцинат
XXVII	11-DOC	β -Ala
XXVIII	11-DOC	β -Ala-сукцинат
XXIX	T	ADH-сукцинат
XXX	T	Сукцинат
XXXI	T	β -Ala
XXXII	T	β -Ala-сукцинат

[0065]



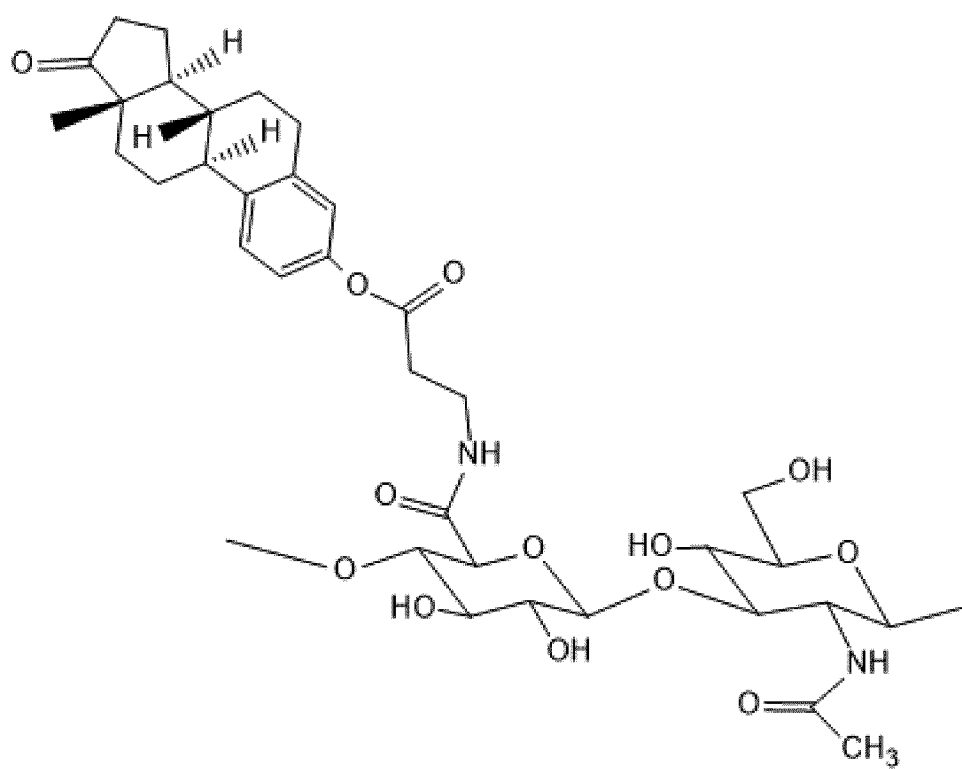
(I)

[0066]



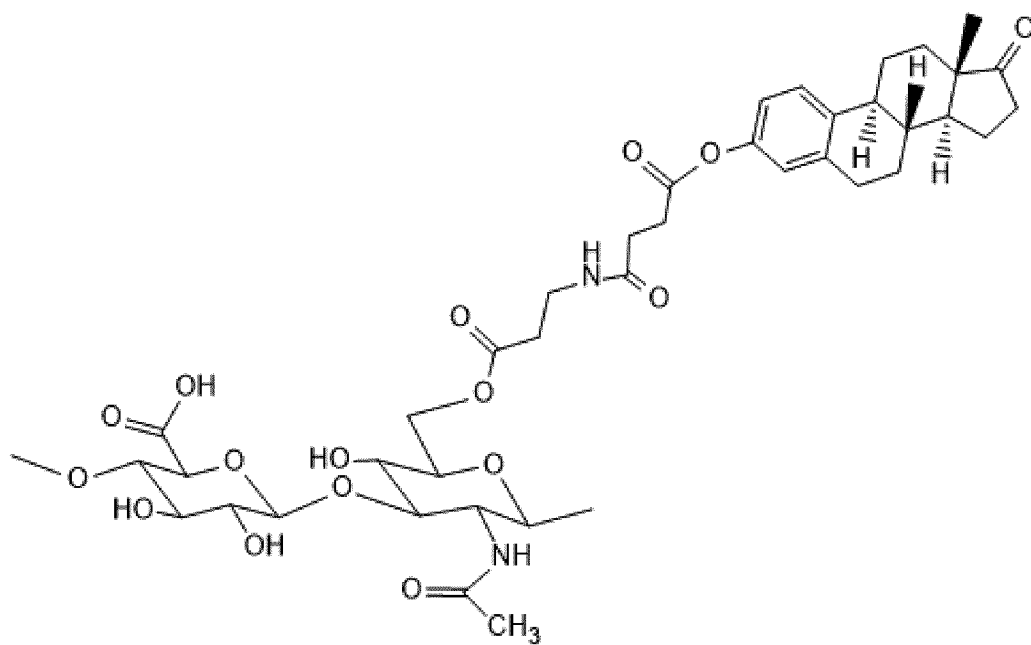
(II)

[0067]



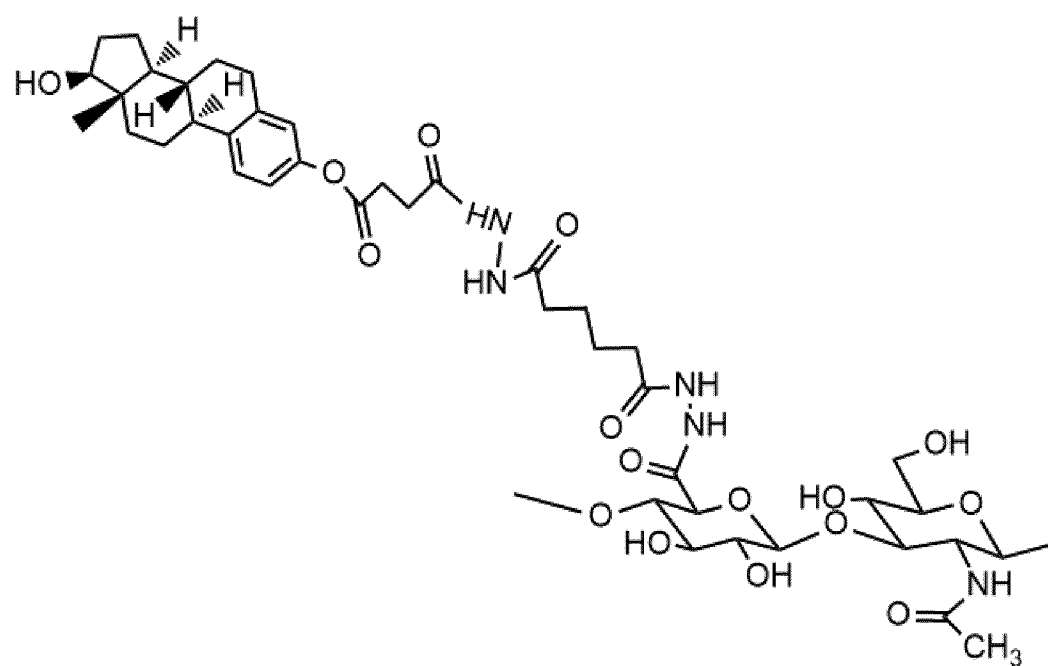
(III)

[0068]



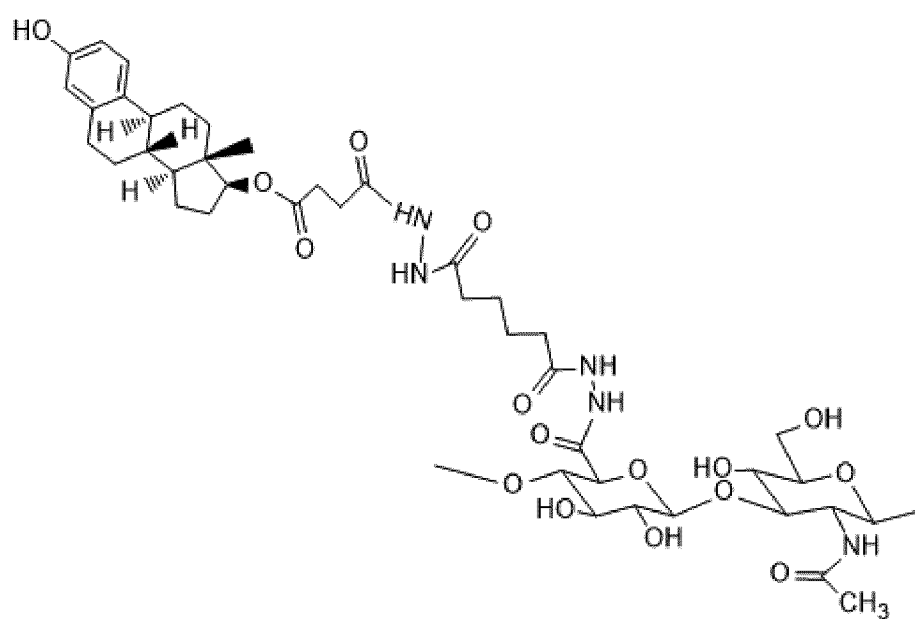
(IV)

[0069]



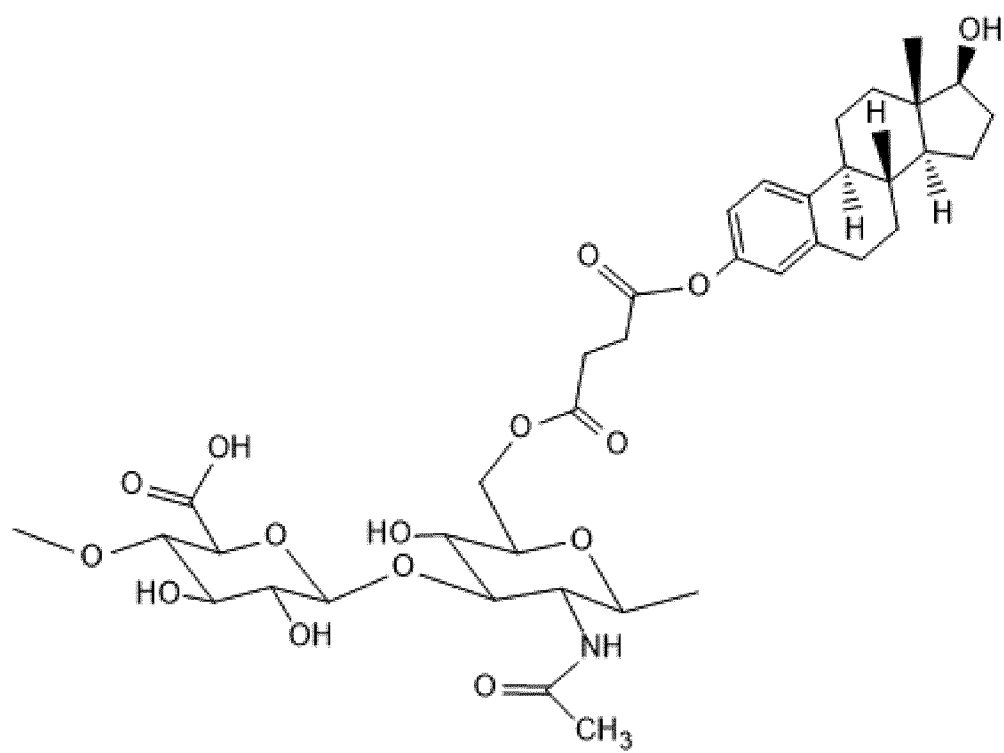
(V)

[0070]



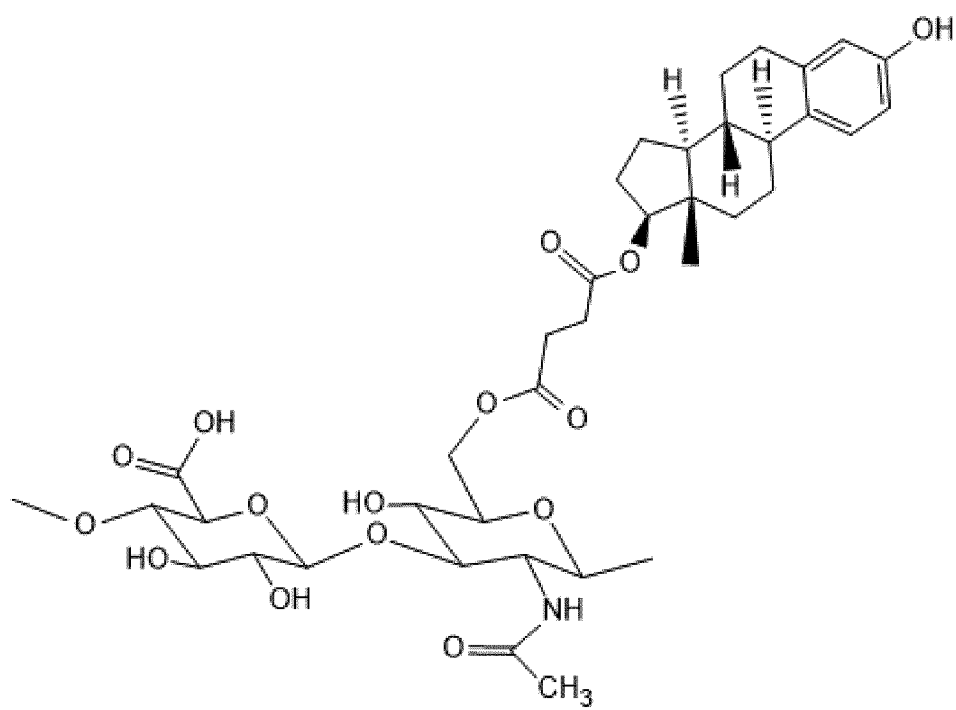
(VI)

[0071]



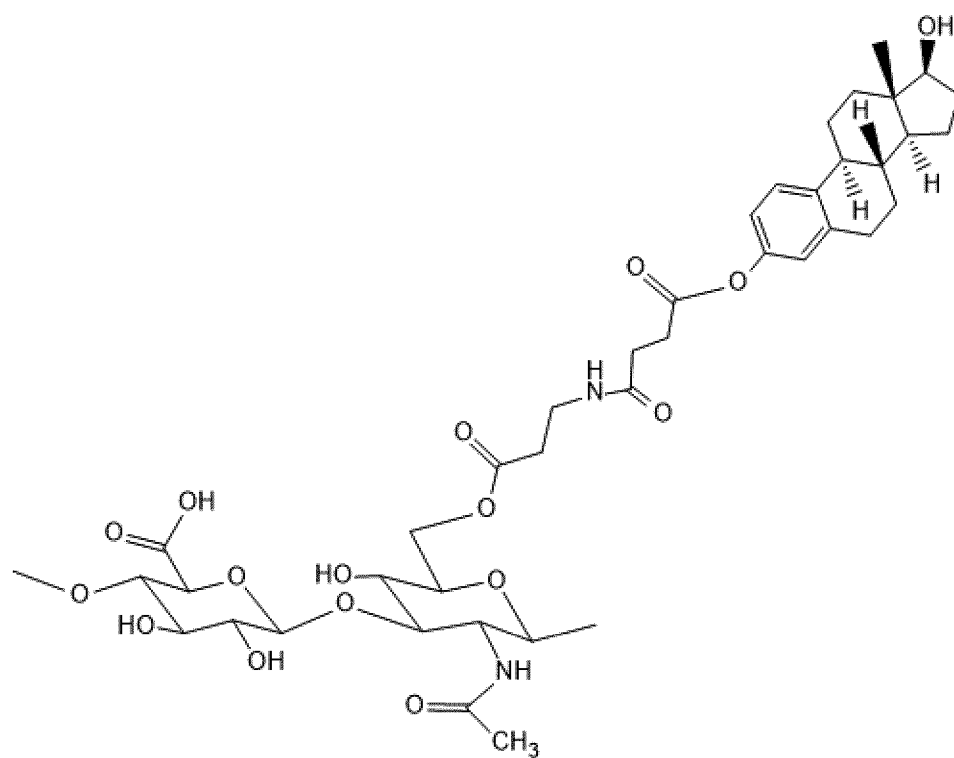
(VII)

[0072]



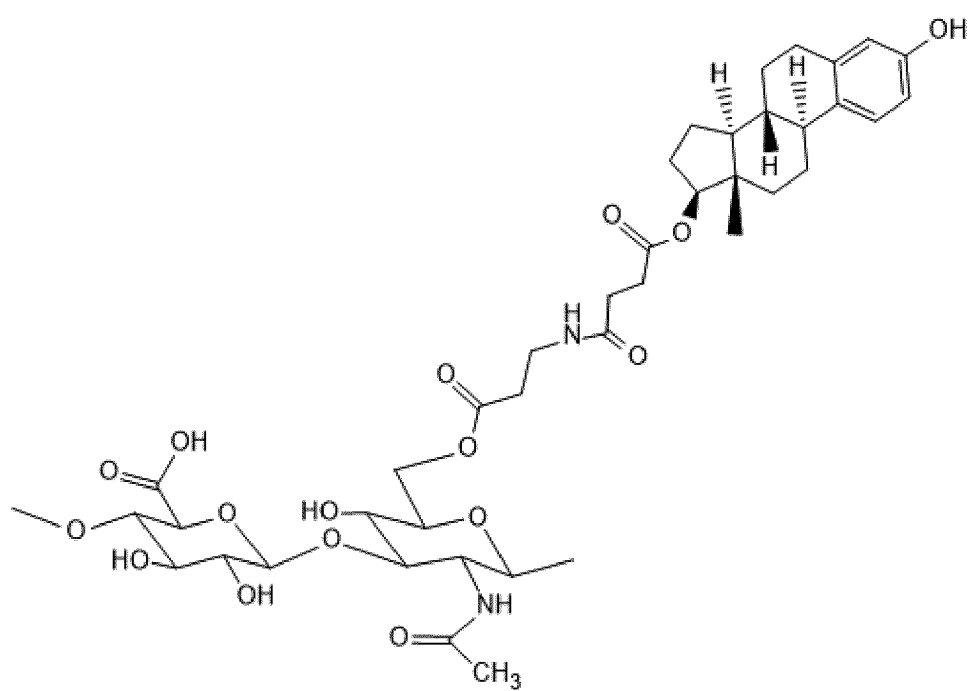
(VIII)

[0073]



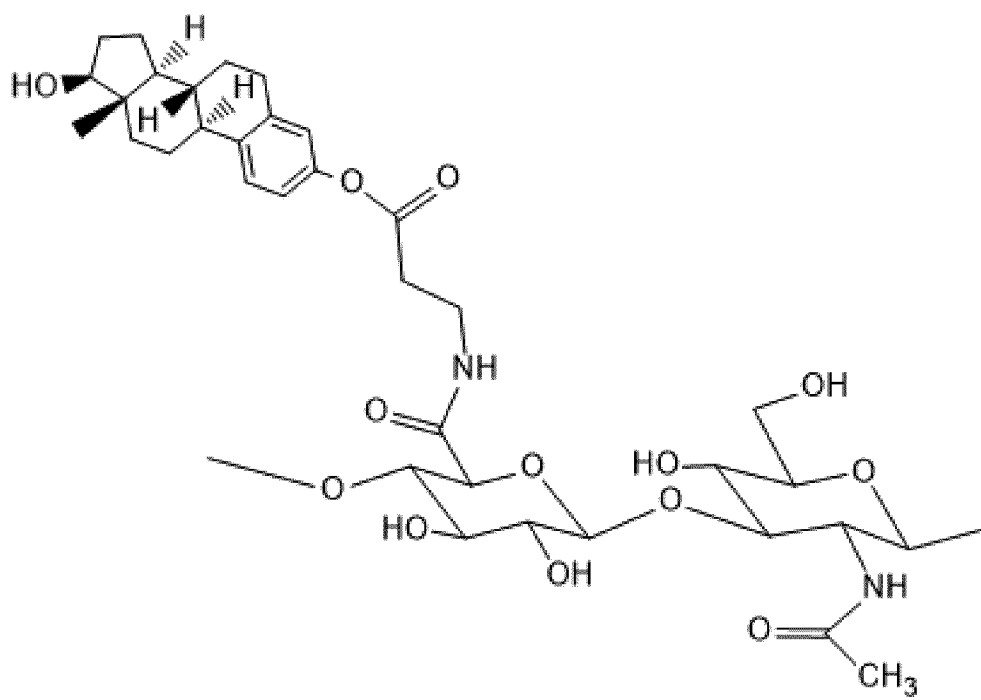
(IX)

[0074]



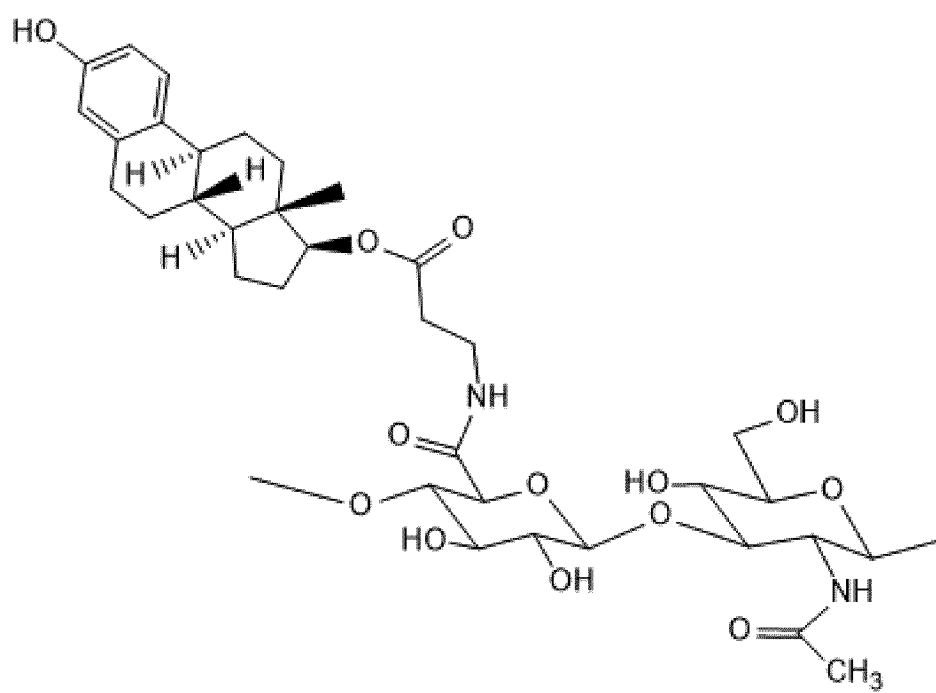
(X)

[0075]



(XI)

[0076]



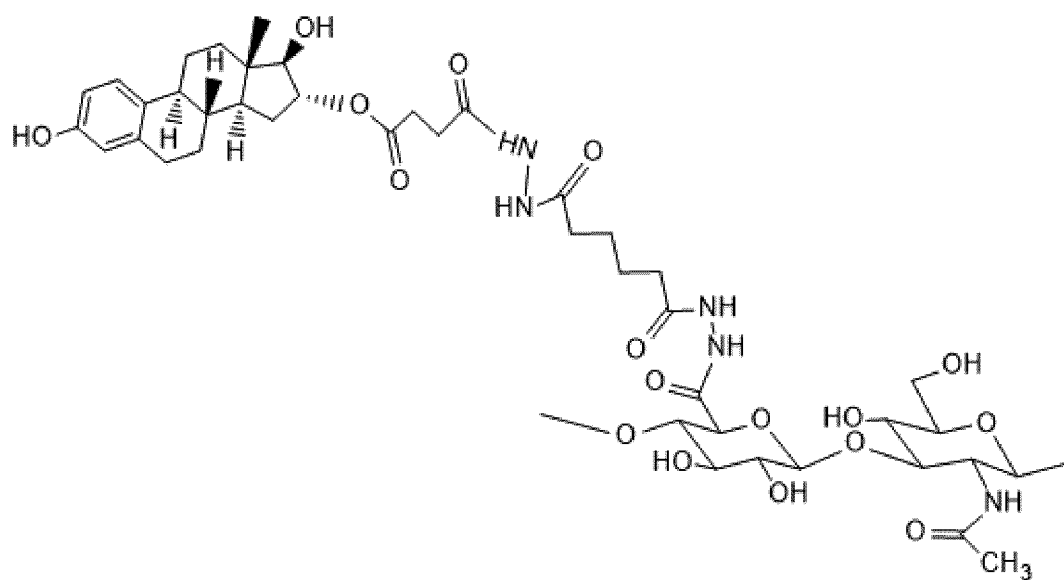
(XII)



[0078]

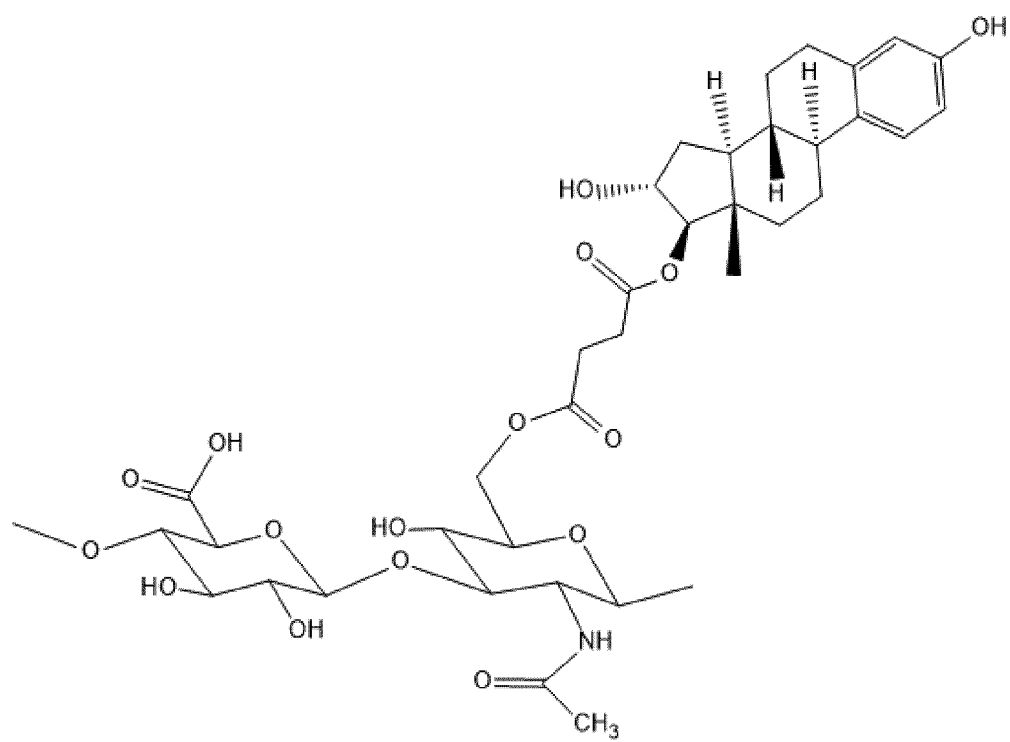


[0079]



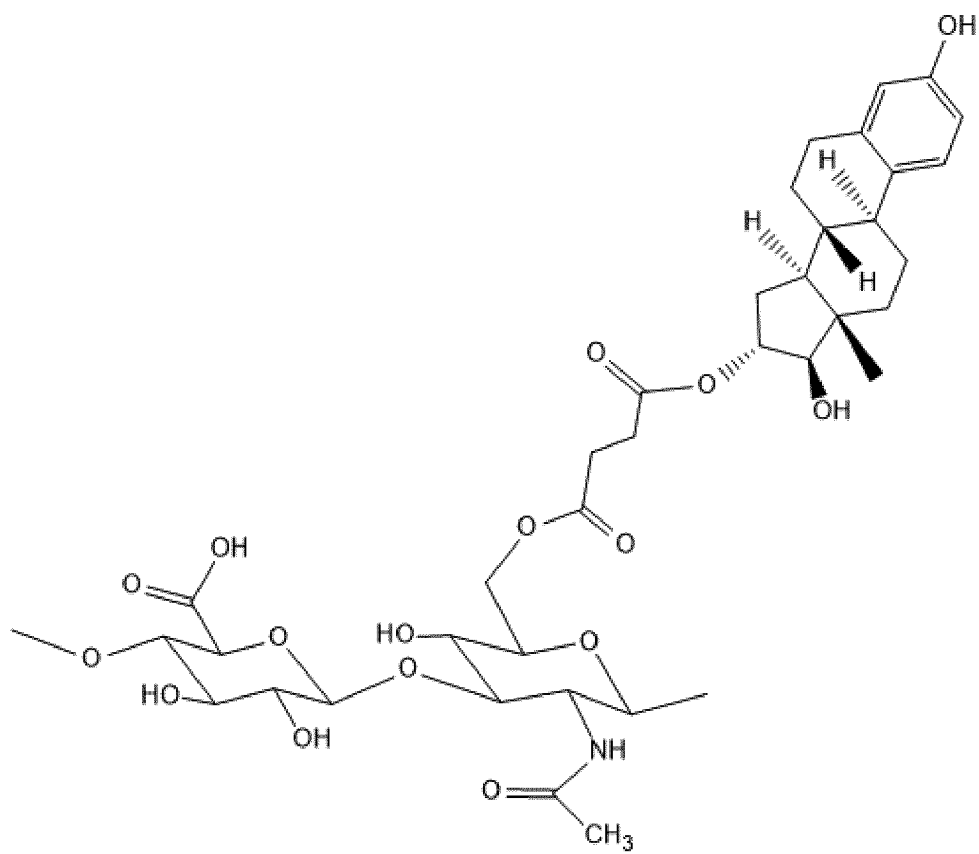
(XV)

[0080]



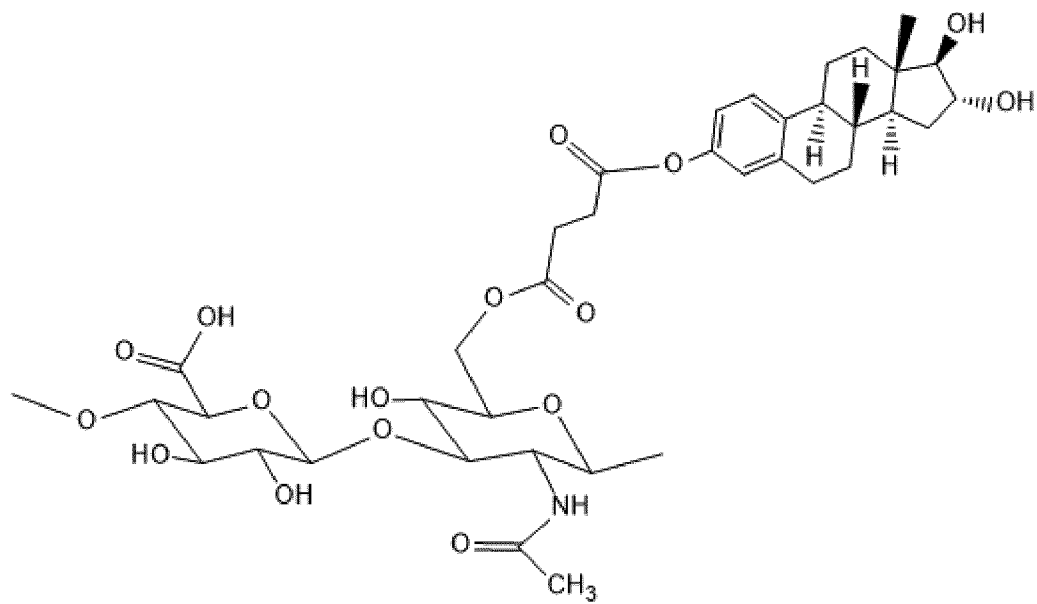
(XVI)

[0081]



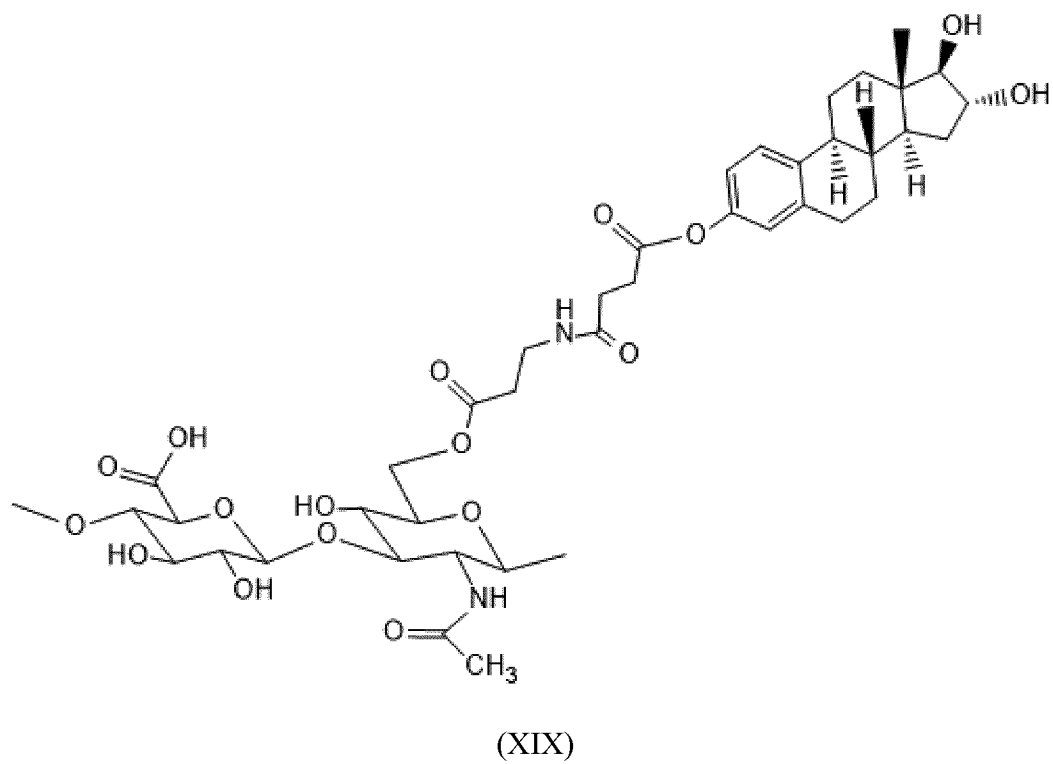
(XVII)

[0082]

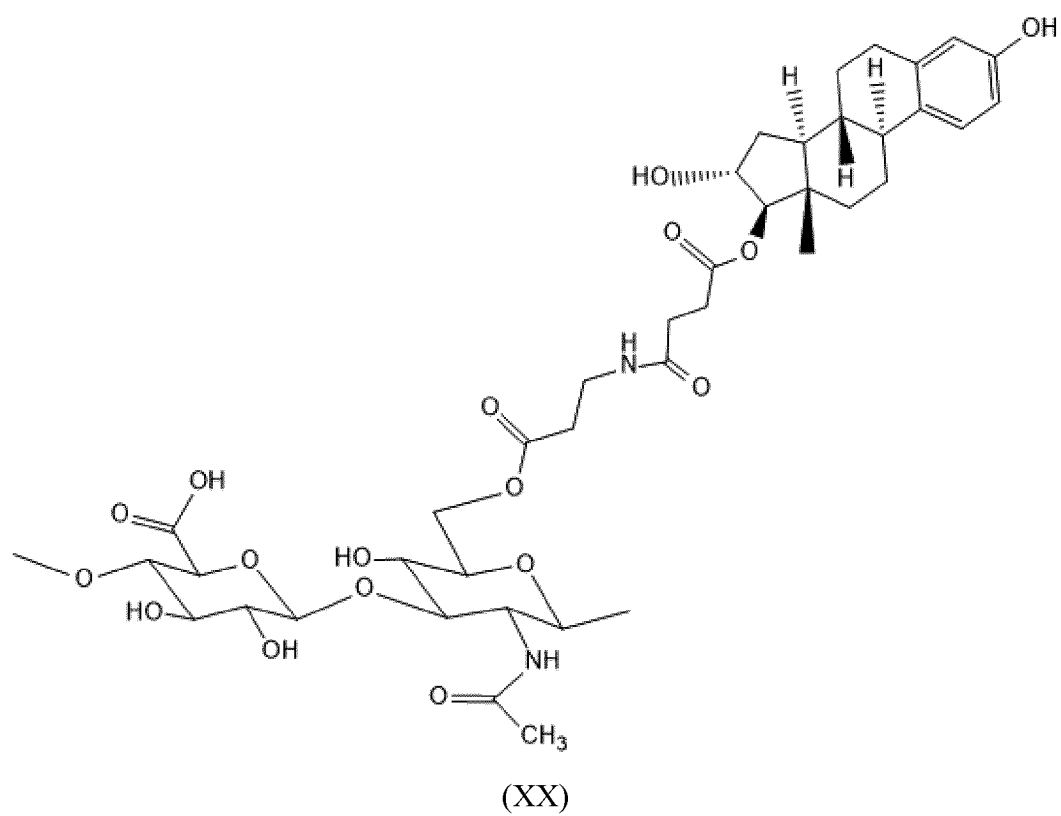


(XVIII)

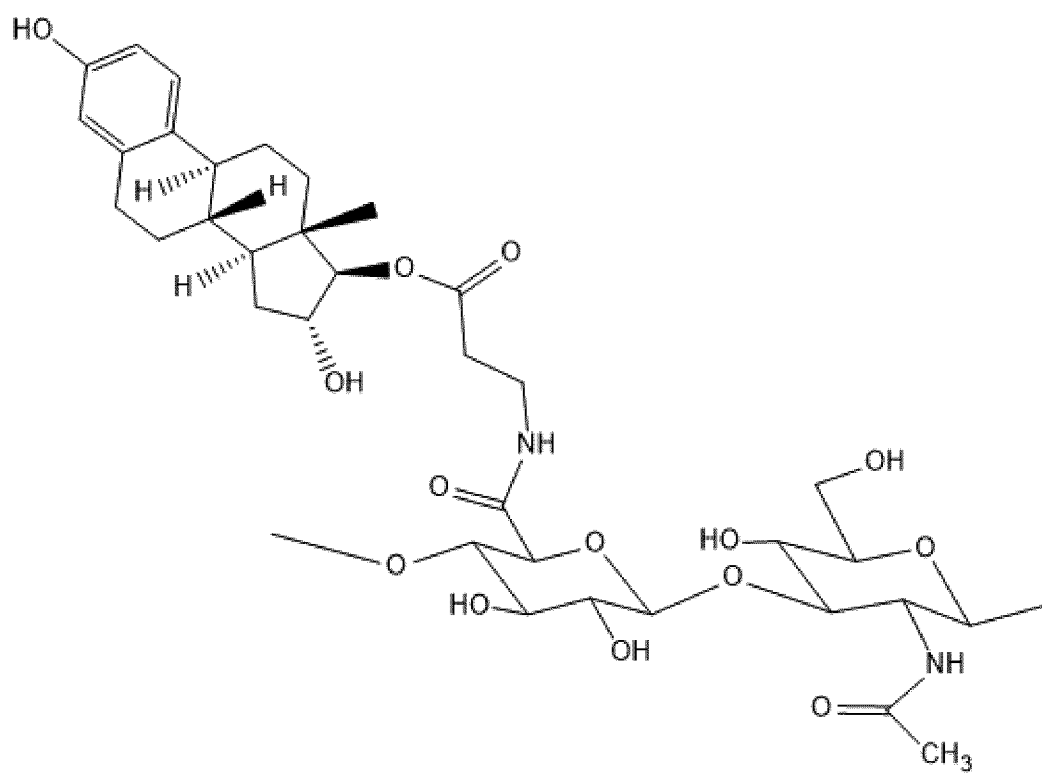
[0083]



[0084]

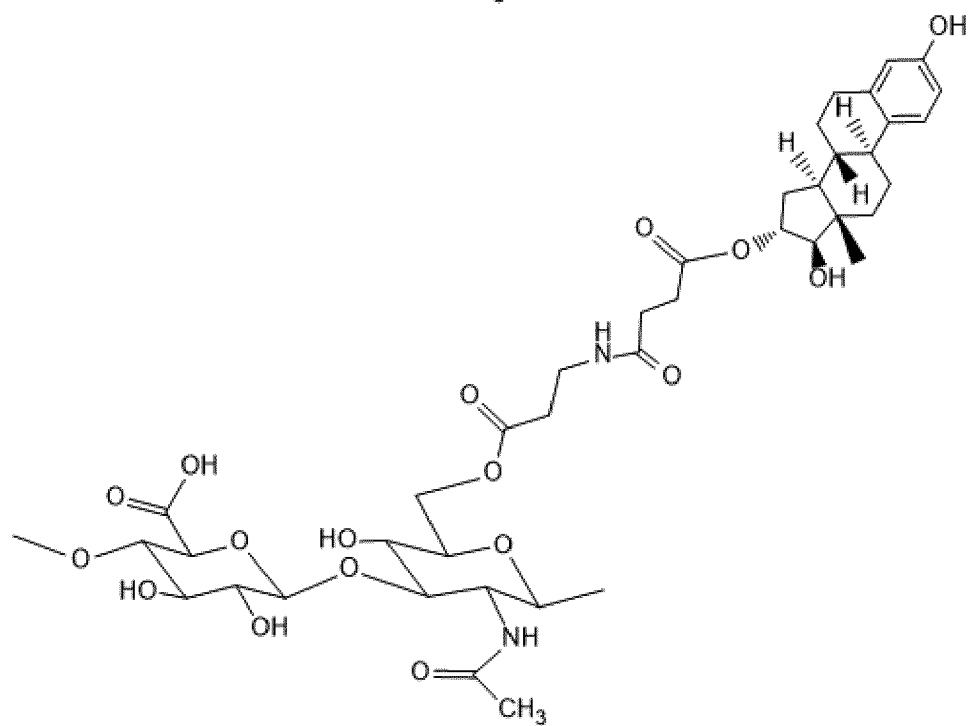


[0085]



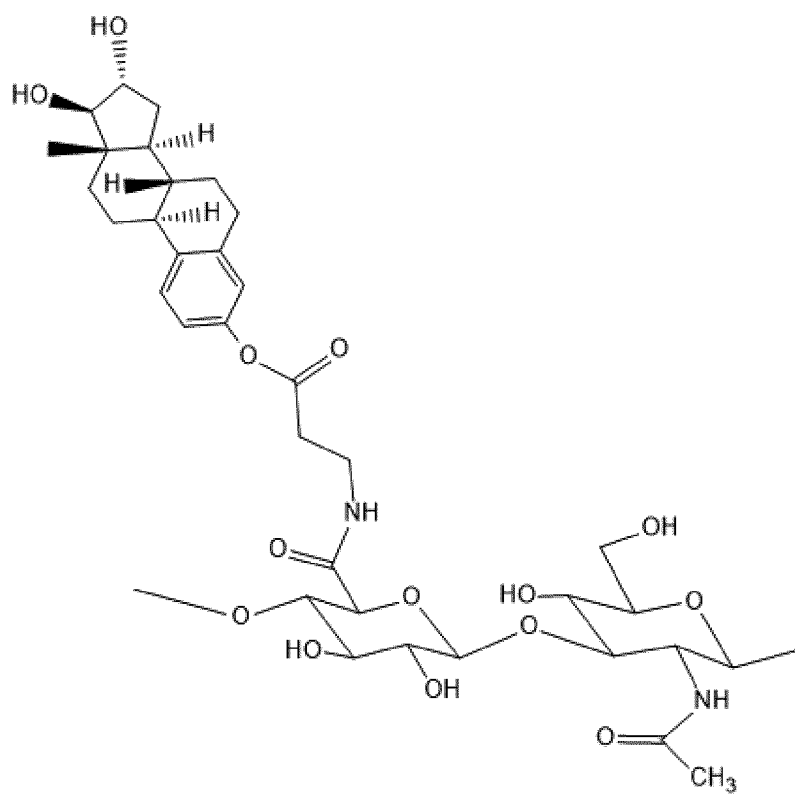
(XXI)

[0086]



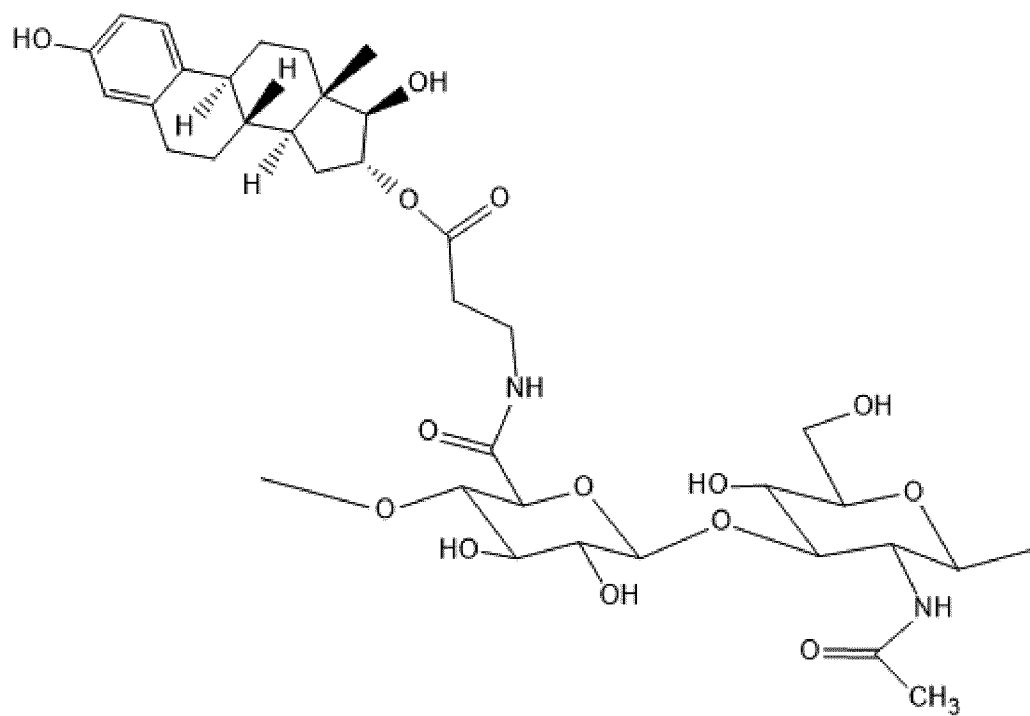
(XXII)

[0087]



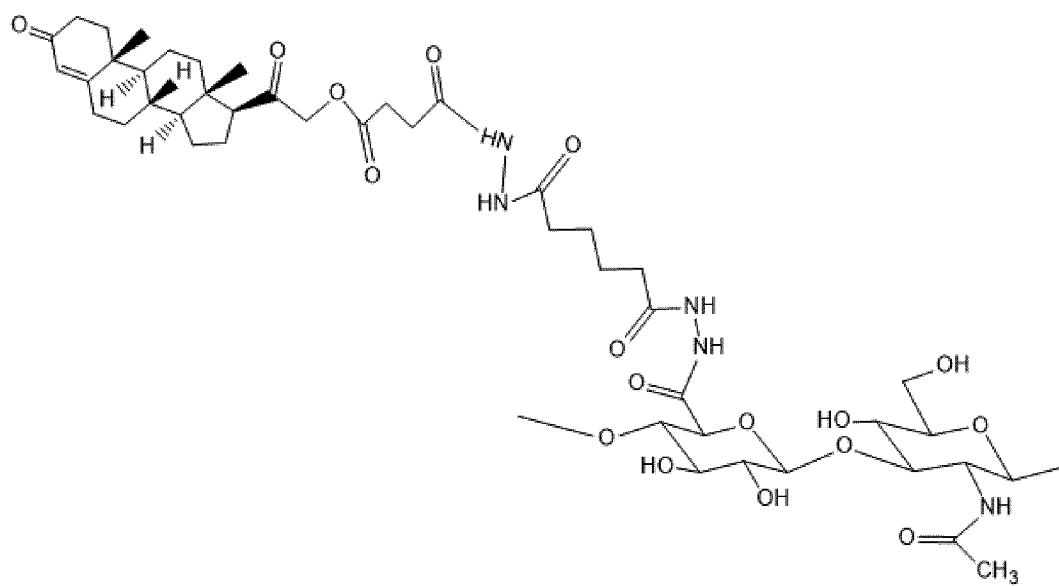
(XXIII)

[0088]



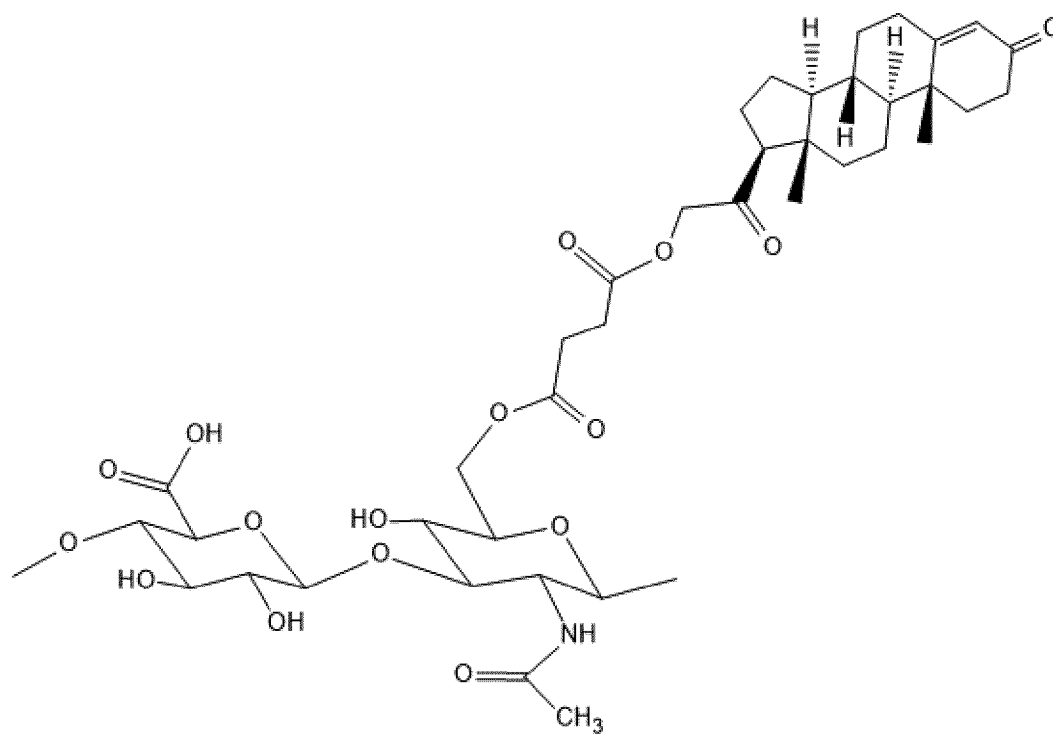
(XXIV)

[0089]



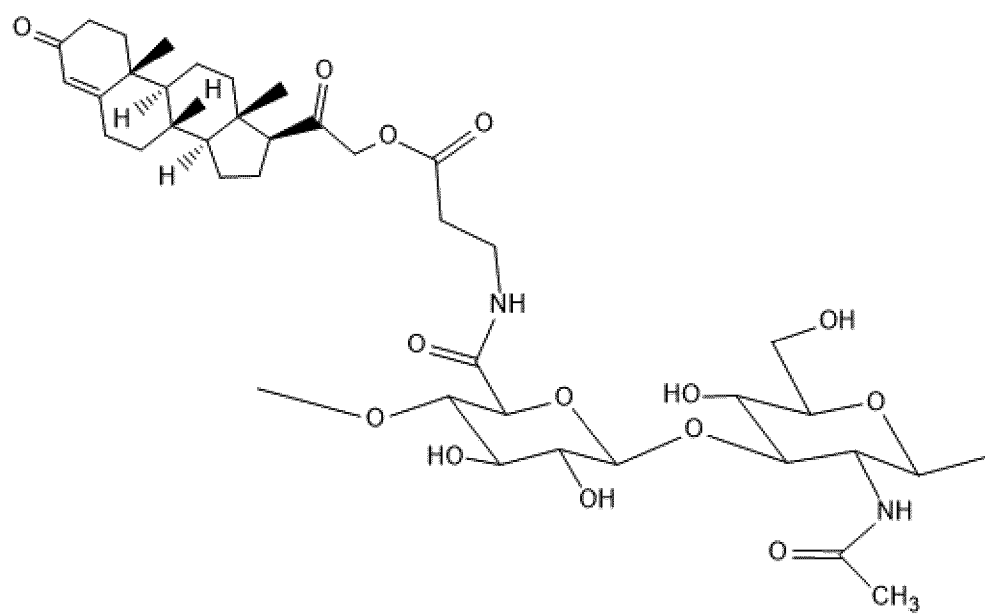
(XXV)

[0090]



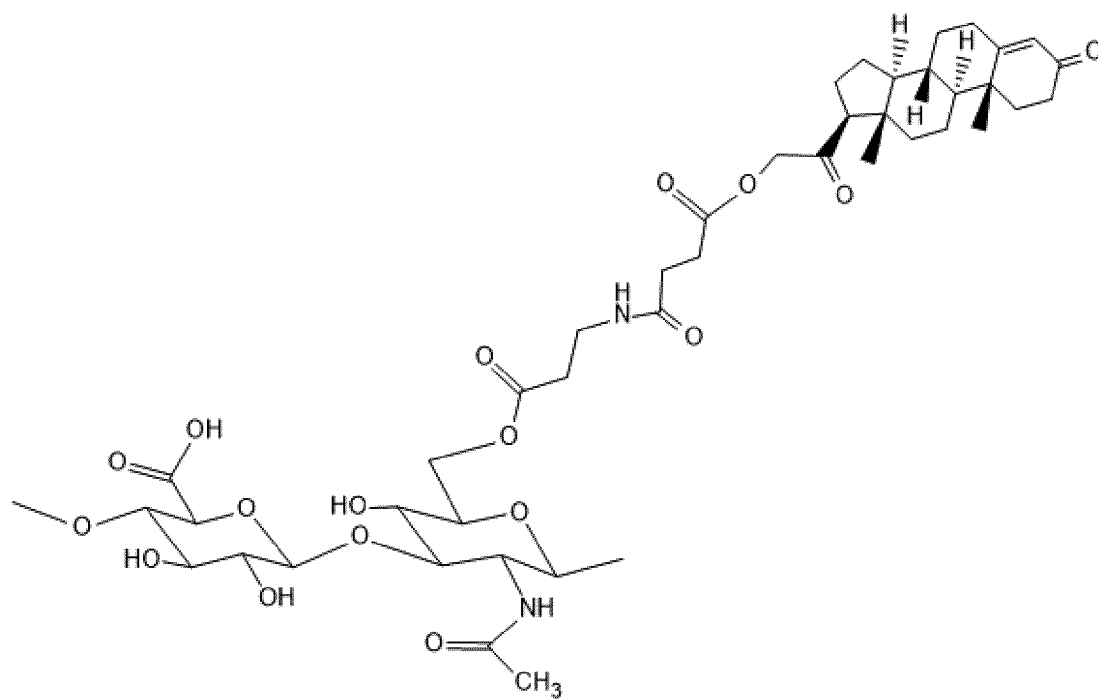
(XXVI)

[0091]



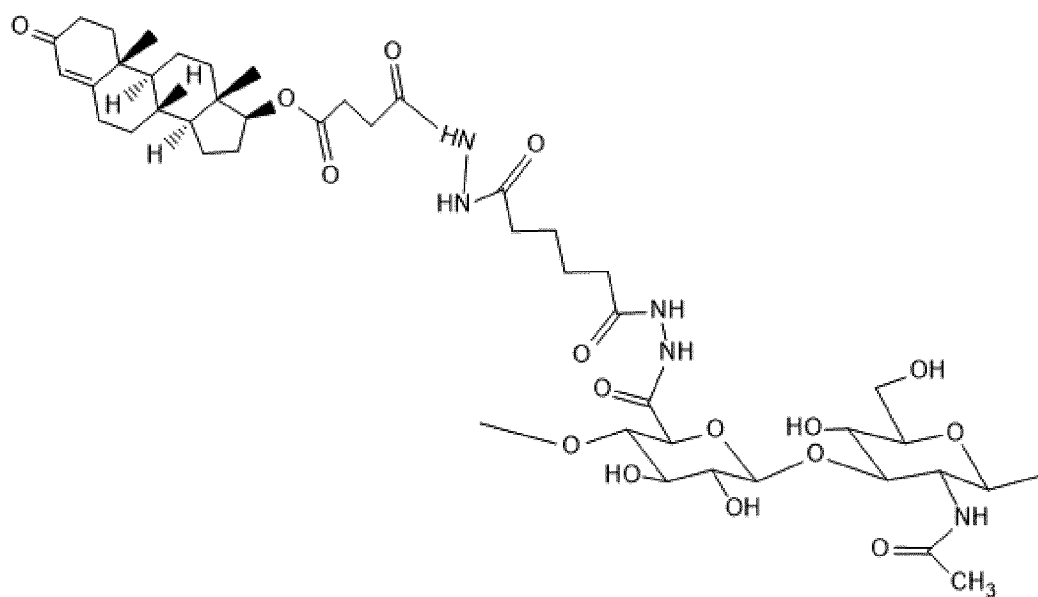
(XXVII)

[0092]



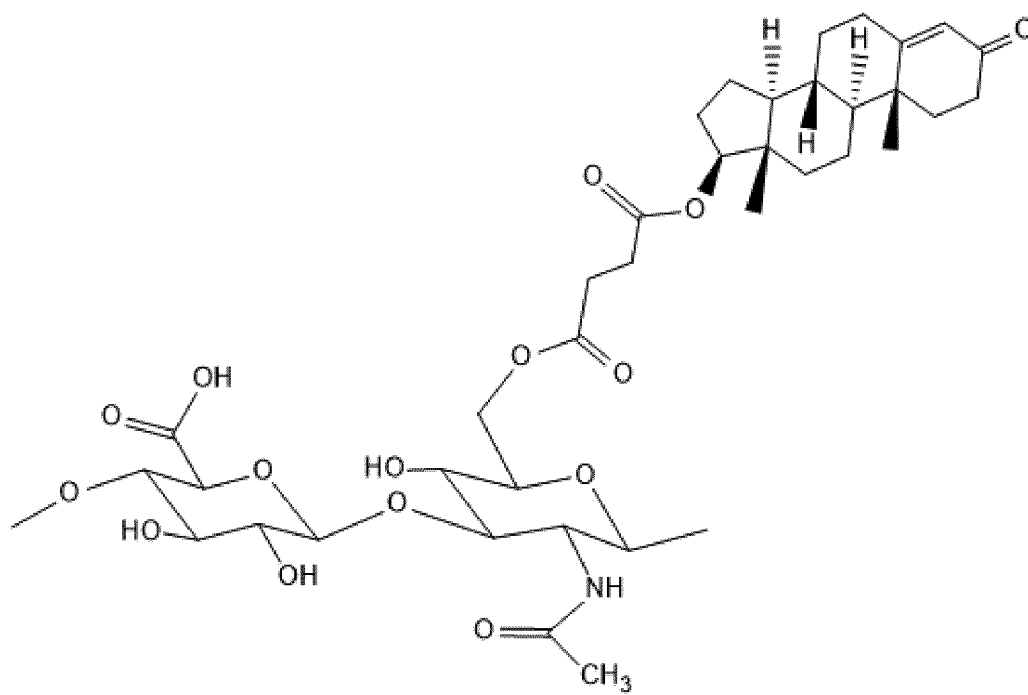
(XXVIII)

[0093]



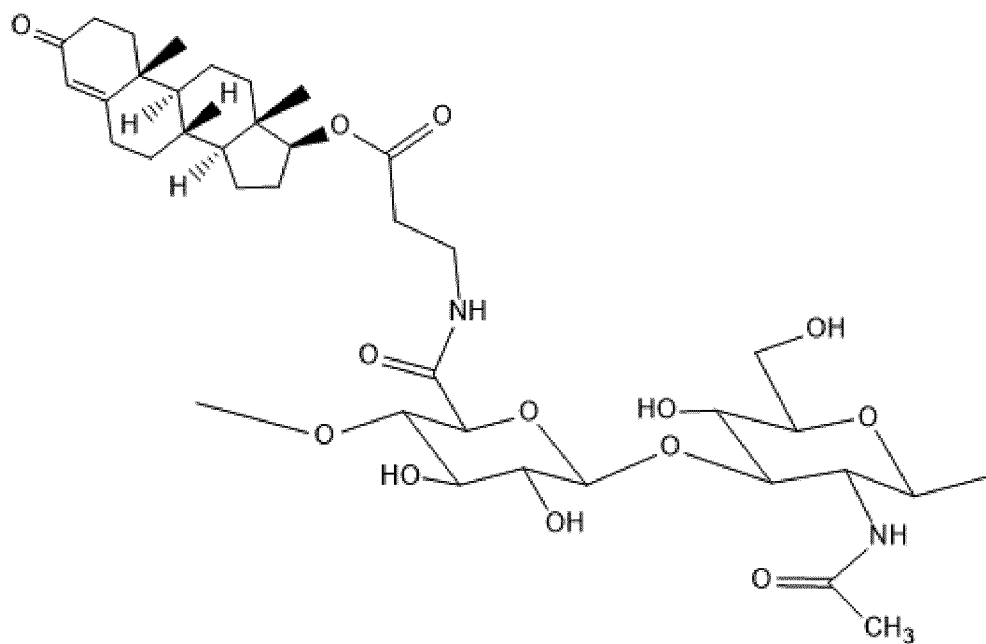
(XXIX)

[0094]



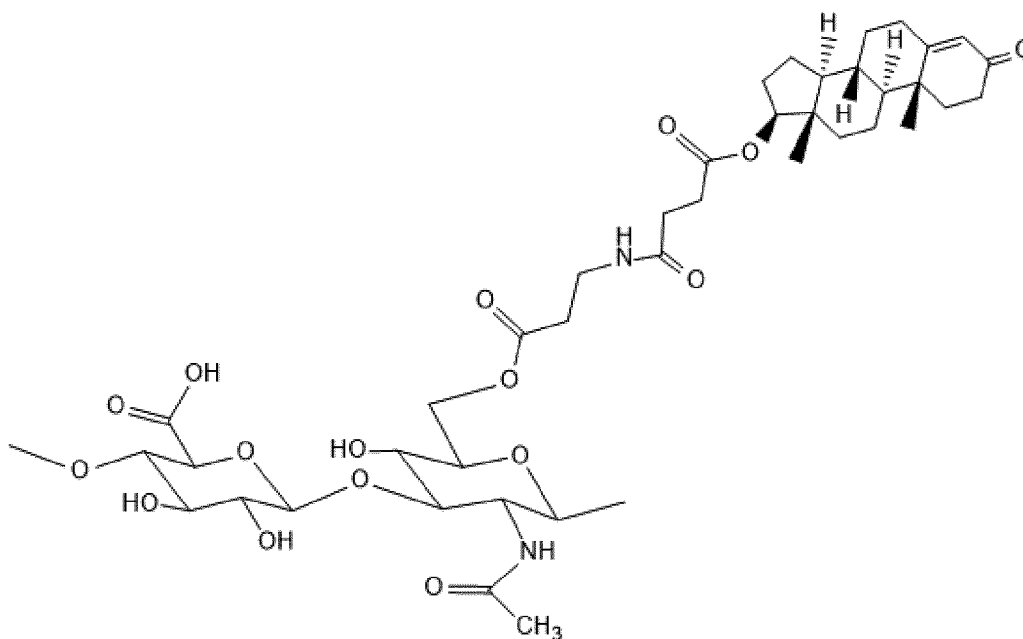
(XXX)

[0095]



(XXXI)

[0096]



(XXXII)

[0097] В соответствии с различными вариантами осуществления настоящего изобретения, линкер имеет одну функциональную группу, способную реагировать с гидроксильной группой полового гормона, и другую функциональную группу, способную реагировать с карбоксилатной группой или гидроксильной группой одной дисахаридной единицы НА, тем самым конъюгируя половой гормон с НА. Однако настоящее изобретение этим не ограничивается. В других вариантах осуществления изобретения

половой гормон может быть сначала модифицирован химическим компонентом, способным реагировать с линкером.

[0098] Настоящее изобретение также включает в себя композицию, которая содержит настоящий конъюгат гиалуронана, описанный выше; и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[0099] Приемлемые носители нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество может включать в себя буферы, такие как фосфатный, цитратный и буферы на основе других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; бензоаты, сорбат и m-крезол); полипептиды с низкой молекулярной массой (менее примерно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин, серин, аланин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстраны; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как Tween™, Pluronic™ или полиэтиленгликоль (PEG) (см. Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover).

[00100] Описанные здесь фармацевтические композиции могут быть в виде стандартных дозированных форм, таких как таблетки, пилюли, капсулы, порошки, гранулы, гели или растворы или суспензии для перорального или парентерального введения.

[00101] Настоящий конъюгат гиалуронана присутствует в фармацевтической композиции на уровне от примерно 0,1% до 99% по массе в расчете на общую массу фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления изобретения настоящий конъюгат гиалуронана присутствует на уровне, по меньшей мере, 1% по массе в расчете на общую массу фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления изобретения настоящий конъюгат гиалуронана присутствует на уровне, по меньшей мере, 5% по массе в расчете на общую массу фармацевтической композиции. В

других вариантах осуществления изобретения настоящий конъюгат гиалуронана присутствует на уровне, по меньшей мере, 10% по массе в расчете на общую массу фармацевтической композиции. В еще других вариантах осуществления изобретения настоящий конъюгат гиалуронана присутствует на уровне, по меньшей мере, 25% по массе в расчете на общую массу фармацевтической композиции.

[00102] Описанные здесь фармацевтические композиции могут быть получены любым способом, известным в области фармакологии. Как правило, такие способы получения включают в себя приведение настоящего конъюгата гиалуронана, описанного здесь (т.е. «активного ингредиента»), в ассоциацию с носителем или вспомогательным веществом и/или одним или несколькими другими вспомогательными ингредиентами, а затем, если необходимо и/или желательно, формование и/или упаковку продукта в желаемую форму, содержащую одну или несколько стандартных доз. «Стандартная доза» представляет собой дискретное количество фармацевтической композиции, содержащей заранее определенное количество активного ингредиента. Количество активного ингредиента обычно равно дозе активного ингредиента, которую следует вводить субъекту, и/или удобной части такой дозы, такой как половина или одна треть такой дозы.

[00103] Настоящий конъюгат гиалуронана, описанный здесь, обычно получают в виде стандартной лекарственной формы для простоты введения и единообразия дозировки. Однако следует понимать, что общее ежедневное применение описанных здесь композиций будет определяться врачом в рамках здравого медицинского заключения. Конкретный терапевтически эффективный уровень дозы для любого конкретного субъекта или организма будет зависеть от множества факторов, включая подлежащее лечению заболевание и тяжесть расстройства; активность конкретного применяемого активного ингредиента; конкретная применяемая композиция; вид, возраст, масса тела, общее состояние здоровья, пол и рацион питания субъекта, тяжесть побочных эффектов или расстройства; время введения, способ введения и скорость выведения конкретного применяемого активного ингредиента; продолжительность лечения; идентичность лекарственных средств конкретных настоящих конъюгатов гиалуронана, используемых в комбинации или одновременно с конкретным используемым активным ингредиентом; и подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

[00104] Таким образом, в объём настоящего изобретения также входит применение настоящих конъюгатов гиалуронана при получении фармацевтической композиции, где фармацевтическая композиция применяется для лечения нейродегенеративного заболевания у нуждающегося в этом субъекта.

[00105] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или снижения риска нейродегенеративного заболевания у субъекта, включающему в себя этап введения субъекту эффективного количества вышеупомянутого конъюгата гиалуронана или содержащей его фармацевтической композиции.

[00106] Настоящие конъюгаты гиалуронана, описанные здесь, применимы для лечения или снижения риска нейродегенеративного заболевания у субъекта (например, пациента-человека, имеющего, подозреваемого или подверженного риску нейродегенеративного заболевания). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нейродегенеративные заболевания включают в себя без ограничений болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз, рассеянный склероз, болезнь Хантингтона, лобно-височную деменцию, эпилепсию, невропатическую боль или атаксию.

[00107] Настоящие конъюгаты гиалуронана, описанные здесь, или содержащая их композиция могут вводиться подходящим путем, известным специалистам в данной области техники, включая пероральный, назальный, интракраниальный, интраспинальный, интратекальный, интрамедуллярный, интрацеребральный, интрацеребровентрикулярный, внутривенный, внутриартериальный, внутрикардиальный, внутрикожный, подкожный, трансдермальный, внутрибрюшинный или внутримышечный путь введения. Конкретно предполагаемые пути введения включают в себя пероральное введение, внутривенное введение (например, системную внутривенную инъекцию), местное введение через кровь и/или лимфу и/или прямое введение в пораженный участок. Как правило, наиболее подходящий способ введения будет зависеть от множества факторов, включая природу агента (например, его стабильность в среде желудочно-кишечного тракта) и/или состояние субъекта (например, от того, способен ли субъект переносить пероральное введение).

[00108] Точное количество настоящих конъюгатов гиалуронана или фармацевтической композиции, содержащей такое количество, необходимое для достижения терапевтического эффекта, будет варьироваться от субъекта к субъекту, в зависимости, например, от факторов, описанных выше. Эффективное количество может быть включено в разовую дозу (например, разовую пероральную дозу) или множественные дозы (например, множественные пероральные дозы). В некоторых вариантах осуществления изобретения, когда субъекту вводят несколько доз, частота введения нескольких доз субъекту составляет три дозы в день, две дозы в день, одну дозу в день, одну дозу через день, одну дозу каждые три дня, одну дозу каждую неделю, одну дозу каждые две недели, одну дозу ежемесячно или одну дозу каждые два месяца. В

некоторых вариантах осуществления изобретения частота введения нескольких доз субъекту составляет одну дозу в день. В некоторых вариантах осуществления изобретения частота введения нескольких доз субъекту составляет две дозы в день. В некоторых вариантах осуществления изобретения, когда субъекту вводят несколько доз, временной интервал между первой дозой и последней дозой нескольких доз составляет один день, два дня, четыре дня, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, два месяца, три месяца, четыре месяца, шесть месяцев, девять месяцев, один год, два года, три года, четыре года, пять лет, семь лет, десять лет, пятнадцать лет, двадцать лет или время жизни субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения временной интервал между первой дозой и последней дозой нескольких доз составляет три месяца, шесть месяцев или один год. В некоторых вариантах осуществления изобретения временной интервал между первой дозой и последней дозой нескольких доз составляет продолжительность жизни субъекта. В конкретном варианте осуществления изобретения частота введения нескольких доз субъекту составляет три дозы в неделю.

[00109] Например, в соответствии с некоторыми рабочими примерами настоящего изобретения эффективное количество, выраженное как эквивалентная масса полового гормона в конъюгате гиалуронана для лечения различных нейродегенеративных заболеваний у крыс (примерно 150 граммов), составляет от примерно 100 нг/кг массы тела до 10 мкг/кг массы тела. Следовательно, эффективное количество полового гормона в конъюгате гиалуронана для лечения крыс составляет примерно 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980 или 990 нг/кг массы тела на дозу, или 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, или 10 мкг/кг массы тела на дозу.

[00110] Кроме того, эффективное количество для лечения мышей (примерно 20 граммов) с точки зрения эквивалентной массы полового гормона в конъюгате гиалуронана составляет от примерно 150 нг/кг массы тела до 15 мкг/кг; например, примерно 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170,

171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980 или 990 нг/кг массы тела на дозу, или 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5 или 15 мкг/кг массы тела на дозу.

[00111] Для взрослого человека с массой тела примерно 60 кг эквивалентная доза для человека (HED), полученная из вышеописанных доз для крыс (коэффициент пересчета: 0,16), составляет от примерно 16 нг/кг массы тела до 1,6 мкг/кг массы тела на дозу, выраженная в эквиваленте массы полового гормона в конъюгате гиалуронана. С другой стороны, HED, основанная на дозе мышей (коэффициент пересчета: 0,08), составляет от примерно 12 нг/кг массы тела до 1,2 мкг/кг массы тела на дозу. В сумме, HED составляет от примерно 12 нг/кг массы тела до 1,6 мкг/кг массы тела на дозу в пересчете на эквивалентную массу полового гормона в конъюгате гиалуронана.

[00112] Как можно понять, диапазоны доз, описанные выше, приведены в качестве руководства для введения предложенных фармацевтических композиций взрослому. Количество, которое должно быть введено, например, ребенку или подростку, может быть определено практикующим врачом или специалистом в данной области техники, и оно может быть ниже или таким же, как количество, вводимое взрослому. Принимая во внимание возраст, вес и состояние здоровья пациента, эффективное количество для человека может составлять от примерно 6 нг/кг массы тела на дозу до 3 мкг/кг массы тела на дозу, в пересчете на эквивалентную массу полового гормона в конъюгате гиалуронана. В частности, эффективное количество эквивалентной массы полового гормона в настоящем конъюгате гиалуронана для человека может составлять 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 210, 220, 230,

240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980 или 990 нг/кг массы тела на дозу, или 1, 1,5, 2, 2,5 или 3 мкг/кг массы тела на дозу.

[00113] Как могут понять специалисты в данной области техники, эффективное количество настоящего конъюгата гиалуронана для лечения различных нейродегенеративных заболеваний может быть определено из вышеупомянутой эквивалентной массы полового гормона в конъюгате гиалуронана в сочетании с лекарственной нагрузкой (или степенью замещения) конъюгата гиалуронана. И каждое из эффективных количеств настоящего конъюгата гиалуронана, определенное таким образом, считается частью настоящего изобретения.

[00114] Например, в соответствии с некоторыми рабочими примерами настоящего изобретения, эффективное количество конъюгата гиалуронана для лечения различных нейродегенеративных заболеваний у крыс (примерно 150 граммов) составляет от примерно 25 до 2500 мкг/кг массы тела, а у мышей (примерно 20 грамм) составляет от примерно 1 до 100 мкг/кг. Следовательно, эффективное количество настоящего конъюгата гиалуронана для лечения нейродегенеративных заболеваний у крыс составляет примерно 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400 или 2500 мкг/кг массы тела на дозу. Кроме того, эффективное количество настоящего конъюгата гиалуронана для лечения мышей составляет примерно 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43,

44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 мкг/кг массы тела на дозу.

[00115] Аналогичным образом, у взрослого человека с массой тела приблизительно 60 кг HED настоящего конъюгата гиалуронана, полученная из вышеописанных доз для мышей (коэффициент пересчета: 0,08), составляет от примерно 80 нг/кг массы тела на дозу до 8 мкг/кг массы тела на дозу, а полученная из вышеописанных доз для крысы (коэффициент пересчета: 0,16) от 4 до 400 мкг/кг массы тела на дозу. В целом, HED для настоящего конъюгата гиалуронана составляет от примерно 80 нг/кг массы тела до 400 мкг/кг массы тела на дозу. Учитывая возраст, вес и состояние здоровья пациента, эффективное количество для человека может составлять от примерно 40 нг/кг массы тела на дозу до 700 мкг/кг массы тела на дозу.

[00116] В частности, эффективное количество для человека может составлять 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980 или 990 нг/кг массы тела на дозу, или 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280,

290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690 или 700 мкг/кг массы тела на дозу.

[00117] Диапазоны доз, описанные здесь, обеспечивают руководство по введению предложенных фармацевтических композиций взрослым. Количество, которое должно быть введено, например, ребенку или подростку, может быть определено практикующим врачом или специалистом в данной области техники и может быть ниже или таким же, как количество, вводимое взрослому.

[00118] Настоящий конъюгат гиалуронана, как описано здесь, можно вводить в комбинации с одним или несколькими дополнительными фармацевтическими агентами (например, терапевтически активными агентами), пригодными для лечения и/или снижения риска нейродегенеративного заболевания. В некоторых вариантах осуществления изобретения настоящий конъюгат гиалуронана, описанный здесь, и дополнительный фармацевтический агент проявляют синергетический эффект при лечении нейродегенеративного заболевания. Настоящий конъюгат гиалуронана можно вводить параллельно, до, одновременно или после одного или нескольких дополнительных фармацевтических агентов, которые могут применяться, например, в качестве комбинированной терапии при лечении и/или снижении риска нейродегенеративного заболевания у субъекта.

[00119] Фармацевтические агенты включают в себя терапевтически активные агенты. Каждый дополнительный фармацевтический агент можно вводить в дозе и/или по расписанию, определенным для этого фармацевтического агента. Дополнительные фармацевтические агенты также можно вводить вместе друг с другом и/или с композицией, содержащей настоящий конъюгат гиалуронана, описанный здесь, в одной дозе или вводить отдельно в различных дозах. В некоторых вариантах осуществления изобретения дополнительный фармацевтический агент представляет собой агент для лечения и/или снижения риска нейродегенеративного заболевания, и может быть агентом для лечения болезни Альцгеймера (AD), включая без ограничений донепезил, ривастигмин, галантамин, мемантин, селфотель, мидафотель, такрин, селегилин и витамин E.

[00120] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения субъектом, которого можно лечить с помощью настоящего конъюгата гиалуронана, является млекопитающее. В некоторых примерах субъект представляет собой мышь или крысу. В других примерах субъект представляет собой человека.

[00121] Также настоящее изобретение относится к наборам для применения при лечении любого из описанных здесь целевых нейродегенеративных заболеваний. Предлагаемые здесь наборы могут включать в себя настоящие конъюгаты гиалуронана, описанные здесь, или содержащую их фармацевтическую композицию. Необязательно, набор может дополнительно включать в себя один или несколько дополнительных фармацевтических агентов, как описано здесь.

[00122] Следующие ниже примеры приводятся для разъяснения определенных аспектов настоящего изобретения и для помощи специалистам в данной области техники в практическом применении настоящего изобретения. Эти примеры никоим образом не следует рассматривать как ограничивающие объём изобретения каким-либо образом. Без дальнейшего уточнения считается, что специалист в данной области техники может, основываясь на приведенном здесь описании, использовать настоящее изобретение в его самом полном объёме. Все цитируемые здесь публикации полностью включены в настоящее изобретение путем ссылки.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

[00124] Синтез и характеристика НА- β ALA-эстрадиола

[00125] В этом примере смесь, содержащая как НА- β ALA-C17 эстрадиол (форма А), так и НА- β ALA-C3 эстрадиол (форма В), была синтезирована в соответствии с этапами, описанными на схеме I (фиг. 1).

[00126] В кратком изложении, Вос- β -аланин (2,92 ммоль, 552 мг), DCC (3,40 ммоль, 702 мг) и 4-диметиламинопиридин (DMAP) (3,04 ммоль, 372 мг) добавляли в раствор эстрадиола (2,75 ммоль, 750 мг) в дихлорметане (DCM) (250 мл), и смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Растворитель удаляли под вакуумом, а затем осадок растворяли в метаноле. К полученной смеси добавляли 10% раствор K_2CO_3 (метанол:10% K_2CO_3 = 1:1) и перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Затем смесь концентрировали и экстрагировали DCM и водой. Большую часть DCM из смеси удаляли под вакуумом, а осадок в смеси отфильтровывали. Фильтрат промывали DCM и концентрировали под вакуумом. Остаток промывали ацетоном, и осадок отфильтровывали. После этого фильтрат концентрировали, а затем очищали хроматографией на колонке с силикагелем (элюент: ацетон:гексан = 1:1) с получением продукта, Вос- β -аланин-эстрадиол.

[00127] Поэтапная процедура синтеза НА- β ALA-эстрадиола была следующей: Флакон А: Вос- β -аланин-эстрадиол (0,19 ммоль, 83 мг) растворяли в DCM (1 мл), и раствор перемешивали при комнатной температуре. К раствору добавляли

трифторуксусную кислоту (TFA) (0,2 мл, 2 ммоль), и реакция длилась 4 часа; затем к раствору на ледяной бане по каплям добавляли раствор Na_2CO_3 (55 мг/мл) до тех пор, пока из раствора не переставали выходить пузырьки газа. Затем DCM удаляли из раствора под вакуумом. Затем к остатку добавляли этилциангидроксииминоацетат (оксима) (1,39 ммоль, 250 мг) и диметилсульфоксид (ДМСО) (20 мл) и раствор перемешивали при комнатной температуре. Флакон В: раствор НА (500 мг/25 мл) смешивали с ДМСО (20 мл), и смесь перемешивали до тех пор, пока температура не вернулась к комнатной температуре. Раствор из флакона В выливали во флакон А, и смесь тщательно перемешивали. N,N'-диизопропилкарбодиимид (DIC) (2,58 ммоль, 326 мг) добавляли в смесь до уровня, и реакция продолжалась в течение 24 часов. После этого реакционную смесь очищали диализом (диализный мешок с отсечкой по молекулярной массе (MWCO) 3500, 10 л воды в течение 12 часов; 1 л 0,3 М NaCl в течение 12 часов, дважды; и 10 л воды в течение 12 часов, 5 раз), а затем фракцию в диализном мешке собирали и лиофилизировали.

[00128] Синтезированный таким образом НА- β ALA-C3/C17 эстрадиол (НА-E2) подтверждали с помощью СВЭЖХ (детектор Acquity UPLC и PDA (Waters)); колонка: колонка ACQUITY UPLC BEH200 SEC (1,7 мкм, внутренний диаметр 4,6 мм $\times$ 150 мм); скорость потока: 0,3 мл/мин; вводимый объем: 50 мкл; детектор: УФ 280 нм; температура: для колонки 25°C, для автосэмплера 20°C; продолжительность: 18 минут; относительное время удерживания: для НА-E2 (НА- β ALA-C3/C17 эстрадиол) 2,7, для E2 (эстрадиол) 10,1. Для расчета применялась линейная регрессия для построения стандартной кривой $y = mx + b$, где: x - концентрация E2 в мкг/мл; y - площадь пика для всех стандартов; m - наклон стандартной кривой; b - точка пересечения стандартной кривой; и приемлемый коэффициент корреляции (r^2) для стандартной кривой $\geq 0,9950$.

[00129] На фиг. 2А и фиг. 2В соответственно показаны профили СВЭЖХ эстрадиола (E2) и НА- β ALA-C3/C17 эстрадиола (НА-E2).

[00130] Пример 2

[00131] Влияние конъюгатов гиалуронана на поглощение нервными клетками

[00132] В этом примере проводили парную серию экспериментов для исследования поглощения нервными клетками (клетки нейробластомы человека SH-SY5Y) настоящих конъюгатов гиалуронана. Результаты (данные не приводятся) показывают, что нервные клетки поглощают больше конъюгата НА-E1, чем только эстрогена, то же самое относится и к другим парным сериям, включая конъюгат НА-E2 по сравнению с одним эстрадиолом, конъюгат НА-E3 по сравнению с одним эстриолом, конъюгат НА-тестостерон по

сравнению с одним тестостероном и НА-дезоксикортикостерон по сравнению с одним 11-дезоксикортикостероном.

[0133] На основе предварительных результатов описанных выше экспериментов с парными сериями, НА-E2 и E2 были подвергнуты дальнейшему анализу.

[0134] Известно, что эстроген может помочь поддерживать жизнеспособность нервных клеток, и одним из проявлений этого феномена является повышение уровня АТФ в клетках. Поскольку мембранный потенциал митохондрий является движущей силой синтеза митохондриального АТФ, нервные клетки обрабатывали соответственно НА-C17-E2 и E2, а затем измеряли уровень клеточного мембранного потенциала митохондрий.

[0135] В кратком изложении, клетки нейробластомы человека SH-SY5Y выращивали в минимальной необходимой среде Игла (EMEM) с добавлением 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки (FBS), 100 единиц/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина при температуре 37°C в увлажненном инкубаторе с 5% CO₂. Для измерения мембранного потенциала митохондрий клетки SH-SY5Y инкубировали вместе с E2 (0,14, 0,34, 0,68 и 1,36 мкг/мл), НА (6,48, 16,19, 32,38 и 64,76 мкг/мл) или НА-C17-E2 (6,48, 16,19, 32,38 и 64,76 мкг/мл, соответственно, эквивалент концентрации E2) в течение 18 часов.

[0136] Метилловый эфир тетраметилпродамина (TMRM) представляет собой проникающий в клетки катионный красно-оранжевый флуоресцентный краситель, который легко поглощается активными митохондриями. Клетки трипсинизировали и ресуспендировали в 0,5 мл ФСБ, содержащего 100 нМ TMRM (Molecular Probes, Eugene, OR). После инкубации в течение 30 минут при температуре 37°C в темноте клетки немедленно переносили в пробирку на льду и измеряли интенсивность флуоресценции методом проточной цитометрии с использованием детектора FL2.

[0137] Проточный цитометр FACS Calibur (Becton Dickinson, Bedford, MA), оборудованный аргоновым лазером с длиной волны 488 нм, использовали для проточного цитометрического анализа. Прямое и боковое рассеяние использовали для определения размера области анализа и исключения из анализа клеточного дебриса. Длину волны возбуждения устанавливали 488 нм. В каждом измерении было проанализировано минимум 20 000 клеток. Данные были получены и проанализированы с использованием программного обеспечения Cell Quest (Becton Dickinson). Относительное изменение средней интенсивности флуоресценции рассчитывали как отношение средней интенсивности флуоресценции в канале обработанных клеток и контрольных клеток.

[0138] Как показано на фиг. 3, обработка НА-C17-E2 (32,38 мкг/мл, эквивалент 0,68 мкг/мл E2) или НА-C17-E2 (64,76 мкг/мл, эквивалент 1,36 мкг/мл E2) способен

увеличивать уровни мембранного потенциала митохондрий в клетках по сравнению с контрольной группой и обработкой только НА или только E2.

[0139] Пример 3

[0140] Влияние конъюгатов гиалуронана на экспрессию бета-амилоида

[0141] В этом примере исследовали влияние конъюгата гиалуронана настоящего изобретения на несколько показателей болезни Альцгеймера у трансгенных мышей APP/PS1, включая образование и распределение амилоидных бляшек, а также уровень экспрессии A β 42. Трансгенные мыши APP/PS1 избыточно продуцируют бета-амилоид (A β) и широко используются в качестве животной модели болезни Альцгеймера.

[0142] Трансгенные мыши линии APP^{swe}/PS1^{de9} (APP/PS1) были получены из лаборатории Джексона. Все процедуры выполнялись в соответствии с инструкциями Экспериментального центра по работе с животными Национального исследовательского института китайской медицины (IACUC № 106-417-4).

[00143] Мышам APP/PS1 8-недельного возраста внутривенно вводили 0,206 мг/кг E2 или 12,5 мг/кг НА-E2 (эквивалент 0,206 мг/кг E2) или контрольный носитель три раза в неделю, в общей сложности 8 недель. На 7-й неделе ежедневно внутрибрюшинно вводили 5-бром-2'-дезоксинуридин (BrdU) в дозе 50 мг/кг/сутки в течение 7 дней. Затем животных умерщвляли под анестезией, вводя внутрибрюшинно золетил/ксилазин (20 мг/кг:5 мг/кг). После глубокой анестезии кровь брали из сердца, центрифугировали при 13000 об/мин для выделения сыворотки. После перфузии физиологическим раствором с pH 7,4 кору и гиппокамп полушария мозга хирургическим путем удаляли, гомогенизировали и хранили при температуре -30°C. Другую половину мозга фиксировали путем погружения в 4% формальдегид на 3-7 дней с последующей дегидратацией 20% и 30% сахарозой в течение 3-7 дней. Ткани головного мозга замораживали для дальнейшего разделения.

[00144] Проводили двухэтапную последовательную экстракцию A β головного мозга с использованием 2% SDS и 70% муравьиной кислоты (FA) (Sigma). В кратком изложении, кортикальный гомогенат смешивали с равным объемом 4% SDS в H-буфере, содержащем ингибитор протеазы. Затем образцы обрабатывали ультразвуком и центрифугировали при 100000×g при температуре 4°C в течение 60 минут. Супернатант образцов представлял собой фракцию, растворимую в SDS. Для фракции, нерастворимой в SDS, осадок образцов дополнительно ресуспендировали в 70% FA и центрифугировали при 100000×g при температуре 4°C в течение 60 минут. Затем супернатант собирали и нейтрализовали 1М трис, pH 11. Как фракции, растворимые в SDS, так и нерастворимые в SDS, фракции хранили при температуре -80°C до анализа сэндвич-ИФА. Уровень A β

измеряли с помощью набора для ИФА человеческих A β 40 и A β 42 (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя.

[00145] Уровень экспрессии A β 42 в сыворотке крови и в гиппокампе, определенный таким образом, показан на фиг. 4А и 4В, соответственно. Уровни экспрессии A β 42 как в сыворотке крови, так и в гиппокампе мышей, получавших НА-Е2, ниже, чем у мышей, получавших только Е2 или только носитель.

[0146] Пример 4

[0147] Синтез НА- β ALA-C17 эстрадиола (НА-C17-E2)

[0148] В этом примере НА- β ALA-C17 эстрадиол (НА-C17-E2) синтезировали в соответствии со схемой III (фиг. 5).

[00149] Сначала эстрадиол (1,84 ммоль, 500 мг) растворяли в DCM (40 мл) и перемешивали в течение 15 минут. Затем к реакционной смеси добавляли 255 мкл 2,02 ммоль бензоилхлорида и 5 капель триэтиламина, после чего смесь перемешивали в течение 24 часов при температуре 20°C в атмосфере азота. Реакционную смесь концентрировали в вакууме и затем очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (элюирование: EA/DCM = 3/97) с получением бензоата эстрадиола (Bz-эстрадиол).

[0150] Затем Bz-эстрадиол (0,23 ммоль, 85 мг) растворяли в обезвоженном DCM (20 мл) и перемешивали в течение 10 минут. В реакционную смесь добавляли N,N'-дициклогексилкарбодиимид (DCC) (0,45 ммоль, 94 мг) и 4-диметиламинопиридин (DMAP) (0,23 ммоль, 27 мг) и перемешивали в течение 30 минут. После этого добавляли Вос- β -аланин (0,45 ммоль, 87 мг) и перемешивали в атмосфере азота в течение 24 часов при температуре 25°C. Реакционную смесь фильтровали и фильтрат экстрагировали с помощью DDW. Органический слой собирали, и растворитель удаляли в вакууме, чтобы получить неочищенный продукт, который затем очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (элюирование: EA/DCM = 3/97) с получением эстрадиол-бензоат-Ala-Вос (Bz-эстрадиол- β -ALA-boc).

[0151] Затем Bz-эстрадиол- β -ALA-boc (0,18 ммоль, 100 мг) растворяли в MeOH (5 мл), и доводили значение pH до 9-10 с помощью 5M NaOH. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. Через 24 часа pH реакционной смеси доводили до 6 с помощью 50% AcOH, реакционную смесь затем концентрировали с получением маслянистой жидкости. Маслянистую жидкость трижды экстрагировали EA и рассолом. Воду в органическом слое удаляли с использованием MgSO₄, а затем растворитель удаляли в вакууме, чтобы получить неочищенный продукт, который позже

очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (элюирование: EA/DCM = 5/95) с получением E2-Ala-Boc.

[0152] Поэтапная процедура синтеза HA-C17-E2 была следующей. Флакон А: HA (0,49 ммоль, 200 мг) растворяли в DDW (20 мл) путем перемешивания в течение 2 часов, а затем в реакционную смесь при перемешивании выливали ДМСО (25 мл) до тех пор, пока температура не возвращалась к комнатной температуре. Флакон В: E2-Ala-Boc (0,10 ммоль, 44,1 мг) растворяли в DCM (2 мл), а затем добавляли трифторуксусную кислоту (TFA) (1,31 ммоль, 0,1 мл). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. После этого большую часть DCM и TFA удаляли путем концентрирования, затем в реакционную смесь выливали DDW (2 мл) и доводили значение pH до 7, используя 0,5 М NaHCO₃. В реакционную смесь добавляли ДМСО до растворения осадка. Охута (0,55 ммоль, 77 мг) растворяли в ДМСО (4 мл), а затем раствор выливали во флакон А, содержимое которого затем перемешивали в течение 10 минут. Раствор из флакона В медленно добавляли во флакон А с помощью пипетки, и смесь тщательно перемешивали в течение 15 минут. DIC (2,58 ммоль, 326 мг) добавляли в смесь до уровня пипеткой, и реакция продолжалась в течение 24 часов. После этого реакционную смесь очищали диализом (диализный мешок 3500 MWCO, 5 л 0,3М NaCl в течение 12 часов, 6 раз; и 5 л воды в течение 12 часов, 6 раз), а затем фракцию в диализном мешке собирали и лиофилизировали.

[0153] Синтезированный таким образом HA-C17-E2 подтверждали с помощью СВЭЖХ (данные не показаны), и лекарственную нагрузку определяли с использованием спектрометра UV-Vis при длине волны 280 нм. В одном рабочем примере DS HA-C17-E2 составляет примерно 0,54%; в другом рабочем примере DS HA-C17-E2 составляет примерно 13,55%.

[0154] Пример 5

[0155] Влияние конъюгатов гиалуронана на когнитивные функции

[0156] Предыдущее исследование продемонстрировало, что при овариэктомии (OVX) или гистеровариоэктомии (OHE) самки крыс показали значительное уменьшение дендритных шипов пирамидных нейронов в сенсомоторной коре и области CA1 гиппокампа и проявились когнитивные дефициты, что позволило предположить, что эстроген играет определенную роль в функциях обучения и памяти у крыс.

[0157] В этих примерах самки крыс, подвергнутые гистеровариоэктомии (OHE), получали конъюгаты гиалуронана настоящего изобретения, а затем их поведение оценивали при выполнении модифицированной задачи в водном лабиринте Морриса для оценки когнитивных функций (например, обучения и памяти) у крыс.

[0158] В этом исследовании использовали самок крыс линии Спрег-Доули (SD) в возрасте 8 недель. Все животные содержались в клетке индивидуально в помещении при температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$, влажности 60%-65% и контролируемом освещении (12/12-часовой цикл свет-темнота) с неограниченным доступом к корму и воде. Все экспериментальные процедуры были одобрены Комитетом по уходу за животными и их использованию Национального университета Чжун-Син в соответствии с рекомендациями Национального научного совета Тайваня.

[0159] Для операции ОНЕ крыс подвергали глубокой анестезии 7% хлоралгидрата и 2% ксилазина (0,45 мл/100 г массы тела) и подвергали операции ОНЕ. Через две недели после операции крысам давали тестируемые препараты дважды в неделю в течение двух недель, и через четыре недели после операции крыс умерщвляли.

[0160] За пять дней до умерщвления начинали эксперимент по решению модифицированной задачи в водном лабиринте Морриса. Лабиринт представлял собой черный круглый бассейн диаметром 145 см и глубиной 22 см. Одна визуальная подсказка (картонная звезда) была расположена на краю бассейна. Круглая прозрачная платформа размещалась на 3 см ниже поверхности воды. Поведение животных регистрировали с помощью видеокамеры и анализировали с помощью системы видеонаблюдения SMART (SMART 3.0V, Panlab, Harvard Apparatus, Кембридж, Великобритания).

[0161] Чтобы оценить латентность спасения, крыс подвергали двум испытаниям в день в течение 3 дней подряд. Крыс случайным образом помещали в разные квадранты бассейна, обращенные к стене бассейна. Крысам позволяли оставаться на платформе в течение 60 секунд, если они находили её в течение 180 секунд, или, альтернативно, помещали на платформу на 60 секунд, если они не могли обнаружить подводную платформу в течение 180 секунд. Период восстановления составлял 10 минут между двумя испытаниями, проводимыми каждый день. Латентность спасения для двух каждодневных испытаний усредняли для последующего анализа.

[0162] В эксперименте по оценке пространственной памяти из бассейна удаляли платформу, и бассейн имел виртуальный целевой квадрант и виртуальную платформу, расположенную в соответствии с предыдущим местоположением платформы. После последнего задания на латентность спасения и однодневного перерыва крысу помещали в обращенную к стене бассейна область, расположенную по диагонали от целевого квадранта. Крысе позволяли плавать в течение 30 секунд и анализировали путь плавания.

[0163] Все экспериментальные данные выражали как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего (СОС). Статистическую значимость проверяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим апостериорным

тестом Стьюдента-Ньюмана-Кейлса (SNK). Различия считались статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

[0164] В одном раунде испытаний крысы ОНЕ получали 2X E2 (280 нг/кг массы тела; $n = 6$), 1X HA-C17-E2 (35 мкг/кг массы тела; DS: 0,54%; эквивалентно 140 нг/кг E2; $n = 5$) или 1,5X HA-C17-E2 (5,25 мкг/100 г массы тела; DS: 0,54%; эквивалент 210 нг/кг E2; $n = 5$). Крыс ОНЕ ($n = 6$) и нормальных крыс без операции ОНЕ ($n = 4$) использовали в качестве положительного и отрицательного контроля.

[0165] Результаты теста на латентность спасения, обобщенные на фиг. 6А (расстояние плавания) и фиг. 6В (время плавания), показывают, что операция ОНЕ отрицательно влияет на функцию обучения у крыс, в то время как введение 1X HA-C17-E2, 1,5X HA-C17-E2 и 2X E2 может улучшить обучаемость крыс ОНЕ со статистической значимостью по сравнению с группой ОНЕ.

[0166] В случае теста пространственной памяти данные, представленные на фиг. 7А (расстояние в целевом квадрате) и фиг. 7В (время в целевом квадрате), показывают, что введение 1,5X HA-C17-E2 значительно улучшило функцию памяти у крыс по сравнению с группой ОНЕ (#, $p < 0,05$), группой 1X HA-C17-E2 (@, $p < 0,05$) и группой 2X E2 (\$, $p < 0,05$). Поскольку предварительные данные из этого примера показывают, что 2X E2 менее эффективно способствует обучению и функции памяти у крыс ОНЕ, по сравнению с 1,5X HA-C17-E2 с только 75% эквивалента E2 по сравнению с 2X E2, в последующем тесте количество E2, вводимого крысам ОНЕ, было дополнительно увеличено.

[0167] В другом раунде испытаний крысы ОНЕ получали 2,5X E2 (350 нг/кг массы тела; $n = 16$) или 1,5X HA-C17-E2 (52,5 мкг/кг массы тела; эквивалент 210 нг/кг массы тела; $n = 16$). Крыс ОНЕ ($n = 8$) и нормальных крыс без операции ОНЕ ($n = 8$) использовали в качестве положительного и отрицательного контроля.

[0168] Результаты теста на латентность спасения, обобщенные на фиг. 8А (расстояние плавания) и фиг. 8В (время плавания), показывают, что операция ОНЕ отрицательно влияет на функцию обучения у крыс, в то время как введение 1,5X HA-C17-E2 и 2,5X E2 может улучшить обучаемость крыс ОНЕ со статистической значимостью по сравнению с группой ОНЕ на 3-й день (#, $p < 0,05$).

[0169] В случае теста пространственной памяти данные, представленные на фиг. 9А (расстояние в целевом квадрате) и фиг. 9В (время в целевом квадрате), показывают, что введение 1,5X HA-C17-E2 и 2,5X E2 значительно улучшило функцию памяти у крыс по сравнению с группой ОНЕ (#, $p < 0,05$).

[0170] Следует отметить, что во втором раунде экспериментов крысы, получавшие 1,5X НА-С17-Е2 или 2,5X Е2, показали значимое улучшение когнитивных функций; однако количество эквивалентного Е2 при лечении 1,5X НА-С17-Е2 составляет только 60% от количества при лечении 2,5X Е2.

[0171] Пример 6

[0172] Влияние конъюгатов гиалуронана на число дендритов и плотность шипов

[0173] Крыс подвергали глубокой анестезии 7% хлоралгидрата и 2% ксилазина (5 мл/кг массы тела) и фиксировали на столе для препарирования. Подготовка ткани для внутриклеточной инъекции красителя и иммуногистохимическое окрашивание выполняли следующим образом. В кратком изложении, крысам транскардиально перфузировали 2% параформальдегид в 0,1 М фосфатном буфере (ФБ), pH 7,3, в течение 30 минут. Головной мозг осторожно удаляли и разделяли с помощью вибратора (Technical Products International, Сент-Луис, Миссури) на две части: (1) два кусочка фронтальных срезов толщиной 350 мкм, содержащих гиппокамп для внутриклеточной инъекции красителя; (2) фронтальные срезы толщиной 1000 мкм, содержащие ядро медиальной септальной области (МС), и фронтальные срезы толщиной 2000 мкм, содержащие гиппокамп для иммуногистохимического окрашивания. Толстые срезы для иммуногистохимического окрашивания предварительно фиксировали в 4% параформальдегиде в 0,1 М ФБ в течение 1 дня. Срезы для внутриклеточной инъекции красителя вымачивали в 10^{-7} М 4',6-диамидино-2-фенилиндоле (DAPI; Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури) в 0,1 М ФБ для последующей обработки. Свежую ткань головного мозга, содержащую базальное ядро переднего мозга, кору головного мозга и гиппокамп, отбирали путем декапитации. Ткань мозга хранили в холодильнике с температурой -70°C для последующего количественного определения белка.

[0174] На фиг. 10А и фиг. 10В соответственно показаны фотографии дистального апикального дендрита и базального апикального дендрита у крыс. Как можно видеть на изображениях, у крыс ОНЕ меньше дендритов по сравнению с контрольными крысами, которые не подвергались операции ОНЕ. С другой стороны, крысы, получавшие 2,5X Е2 и 1,5X НА-С17-Е2, имеют больше дендритов по сравнению с крысами, получавшими ОНЕ.

[0175] Количественные результаты на фиг. 11А (апикальные сегменты) и фиг. 11В (базальные сегменты) показывают, что операция ОНЕ связана с уменьшением плотности шипов по сравнению с контрольными крысами (*, $p < 0,05$). С другой стороны, хотя введение 1,5X НА-С17-Е2 и 2,5X Е2 приводит к значимому улучшению плотности шипов по сравнению с крысами ОНЕ (#, $p < 0,05$), крысы, получавшие 1,5X НА-С17-Е2 имеют

немного более высокую плотность шипов по сравнению с крысами, получавшими 2,5X E2. Это неожиданный результат, учитывая тот факт, что количество эстрадиола, полученного в группе, получавшей 1,5X HA-C17-E2, составляет только 60% от количества, полученного в группе, получавшей 2,5X E2.

[0176] Случайным образом выбирали по три среза дорсального гиппокампа у каждой крысы. Для определения плотности дендритных шипов в гиппокампе анализировали дистальный апикальный и дистальный базальный дендриты пирамидной клетки области CA1. Пять независимых клеток области CA1 гиппокампа и 3 сегмента от каждого дендрита случайным образом подсчитывали на 10 мкм. Все данные выражали как среднее значение $\pm$ СОС. Статистическую значимость проверяли с помощью с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим апостериорным тестом Стьюдента-Ньюмана-Кейлса (SNK) для определения плотности шипов. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

[0177] Пример 7

[0178] Влияние конъюгатов гиалуронана на сенсомоторную функцию

[0179] В этом примере был проведен тест на спуск с вертикального шеста и перемещение по горизонтальной балке (тест «вертикальный шест») для оценки влияния конъюгата гиалуронана настоящего изобретения на сенсомоторную функцию мышей.

[0180] В этом исследовании использовали самцов мышей линии C57BL/6 в возрасте 8 недель ($n = 4-5$ на группу), приобретенных у BioLASCO Taiwan Co., Ltd. Всех животных содержали в клетке индивидуально в помещении при температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$, влажности 60%-65% и с контролируемым освещением (12/12-часовой цикл свет-темнота) с неограниченным доступом к корму и воде. Все экспериментальные процедуры были одобрены Комитетом по уходу и использованию животных Национального университета Чжун-Син в соответствии с рекомендациями Национального научного совета Тайваня.

[0181] Метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МРТР; 20 мг/кг) вводили мышам внутривенно (в.в.) четыре раза в день с 2-часовым интервалом на 1-й и 5-й день в группе индукции МРТР. 5X E2 (342 нг/кг) и 2,5X или 5X HA-C17-E2 конъюгат (1,96 или 3,92 мкг/кг массы тела; DS: 13,55%; эквивалент 171 или 342 нг/кг E2) вводили внутривенно (в.в.) экспериментальному животному на 2-й и 6-й день. Животным в контрольной группе вводили или внутривенную инъекцию физиологического раствора, или внутривенную инъекцию буфера ФСБ по той же схеме.

[0182] Мышей подвергали предварительному тесту за два дня до индукции МРТР, а на 2-й и 6-й день тест на шесте проводили через 4 часа после введения лекарственного средства. В кратком изложении, использовали трубку длиной 50 см и диаметром 1 см, и к

верхней части трубки прикрепляли шест. Животные часто естественным образом ориентируются вниз и спускаются по шесту, чтобы вернуться в свою клетку. Мыши, вернувшиеся в свою клетку путем спуска, получали оценку «0». С другой стороны, мыши, которые не могли повернуться и вместо этого сохраняли свое положение горизонтально по отношению к шесту и часто спускались вниз, как штопор, получали оценку «1». Результаты были проанализированы с использованием критерия независимости Хи-квадрат в программном обеспечении IBM SPSS Statistical 20.0; значимость была установлена на уровне $p < 0,05$.

[0183] Результаты, обобщенные на фиг. 12, показывают, что индукция МРТР отрицательно влияет на функцию координации движений мышей (*, $p < 0,05$), а введение 5X E2 не улучшает эффективно функцию координации движений мышей, получавших МРТР. Напротив, введение 2,5X или 5X НА-C17-E2 значительно улучшает функцию координации движений мышей, получавших МРТР (*, $p < 0,05$).

[0184] Приведенные выше примеры предоставляют несколько результатов тестов *in vitro* и *in vivo*, которые свидетельствуют о том, что настоящие конъюгаты гиалуронана способны стимулировать плотность дендритного шипа, улучшать когнитивные функции (такие как обучение и память) и повышать сенсомоторные функции. Взятые вместе, эти экспериментальные данные демонстрируют, что настоящие конъюгаты гиалуронана действительно могут предотвращать проявление нейродегенерации у мышей и крыс, таким образом, они могут служить важным кандидатом для разработки лекарственного средства для лечения нейродегенеративного заболевания, такого как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз, рассеянный склероз, болезнь Хантингтона, лобно-височная деменция, эпилепсия, невропатическая боль или атаксия.

[0185] Следует понимать, что приведенное выше описание вариантов осуществления изобретения дано только в качестве примера и что различные модификации могут быть сделаны специалистами в данной области техники. Приведенное выше описание, примеры и данные предоставляют полное описание структуры и применения примерных вариантов осуществления настоящего изобретения. Хотя различные варианты осуществления настоящего изобретения были описаны выше с определенной степенью конкретности или со ссылкой на один или несколько отдельных вариантов осуществления изобретения, специалисты в данной области техники могут внести многочисленные изменения в раскрытые варианты осуществления изобретения, не выходя за рамки сущности или объема настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ РСТ

1. Конъюгат гиалуронана, содержащий:
гиалуроновую кислоту (НА) или её производное или соль;
половой гормон, выбранный из группы, состоящей из эстрона, эстрадиола, эстриола, тестостерона и 11-дезоксикортикостерона; и
линкер, ковалентно связывающий половой гормон с одной из дисахаридных единиц НА или её производным или солью.
2. Конъюгат гиалуронана по п. 1, отличающийся тем, что линкер выбран из группы, состоящей из одной или нескольких аминокислот, липида, дигидразид- C_2-C_{20} дикарбоновой кислоты и C_2-C_{20} дикарбоновых кислот.
3. Конъюгат гиалуронана по п. 1, отличающийся тем, что конъюгат гиалуронана имеет степень замещения половым гормоном от 0,1 до 60%.
4. Конъюгат гиалуронана по п. 1, отличающийся тем, что НА или её производное или соль имеет средневесовую молекулярную массу (M_w) от примерно 5 до 500 килодальтон (кДа).
5. Конъюгат гиалуронана по п. 2, отличающийся тем, что линкер ковалентно связан с гидроксильной группой (-ОН) полового гормона.
6. Конъюгат гиалуронана по п. 2, отличающийся тем, что аминокислота представляет собой β -аланин (β -ALA).
7. Конъюгат гиалуронана по п. 2, отличающийся тем, что дигидразид- C_2-C_{20} дикарбоновая кислота представляет собой дигидразид адипиновой кислоты (ADH)-сукцинат.
8. Конъюгат гиалуронана по п. 2, отличающийся тем, что C_2-C_{20} дикарбоновые кислоты представляют собой янтарную кислоту.
9. Применение конъюгата гиалуронана в получении лекарственного средства для применения при лечении или предотвращении нейродегенеративного заболевания, где конъюгат гиалуронана представляет собой конъюгат гиалуронана по любому из п.п. 1-8.
10. Конъюгат гиалуронана для применения при лечении или предотвращении нейродегенеративного заболевания, где конъюгат гиалуронана представляет собой конъюгат гиалуронана по любому из п.п. 1-8.
11. Фармацевтическая композиция для лечения или предотвращения нейродегенеративного заболевания, содержащая эффективное количество конъюгат

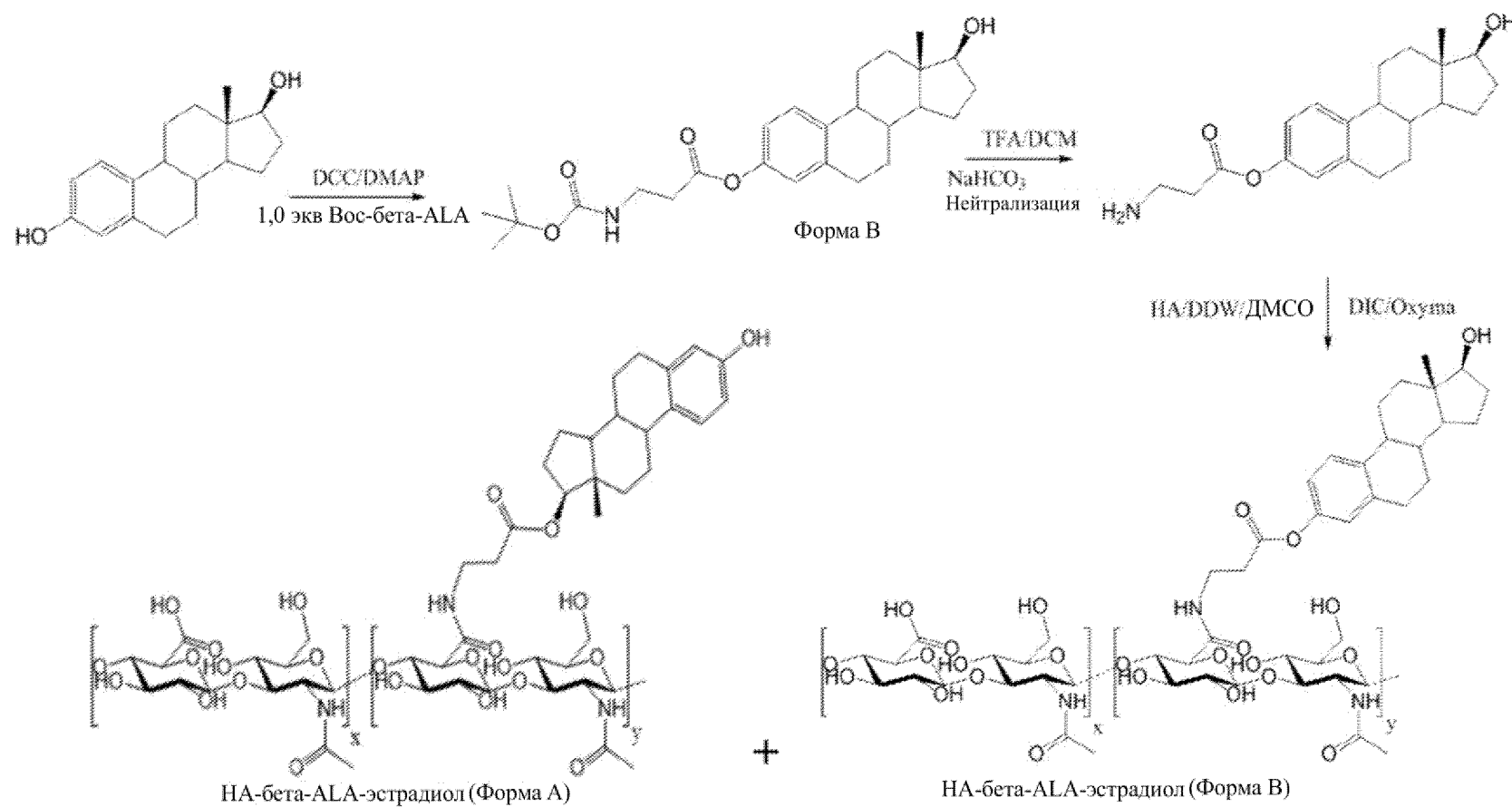
гиалуронана по любому из п.п. 1-8 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

12. Способ лечения или предотвращения нейродегенеративного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий в себя этап введения субъекту эффективного количества конъюгата гиалуронана по любому из п.п. 1-8.

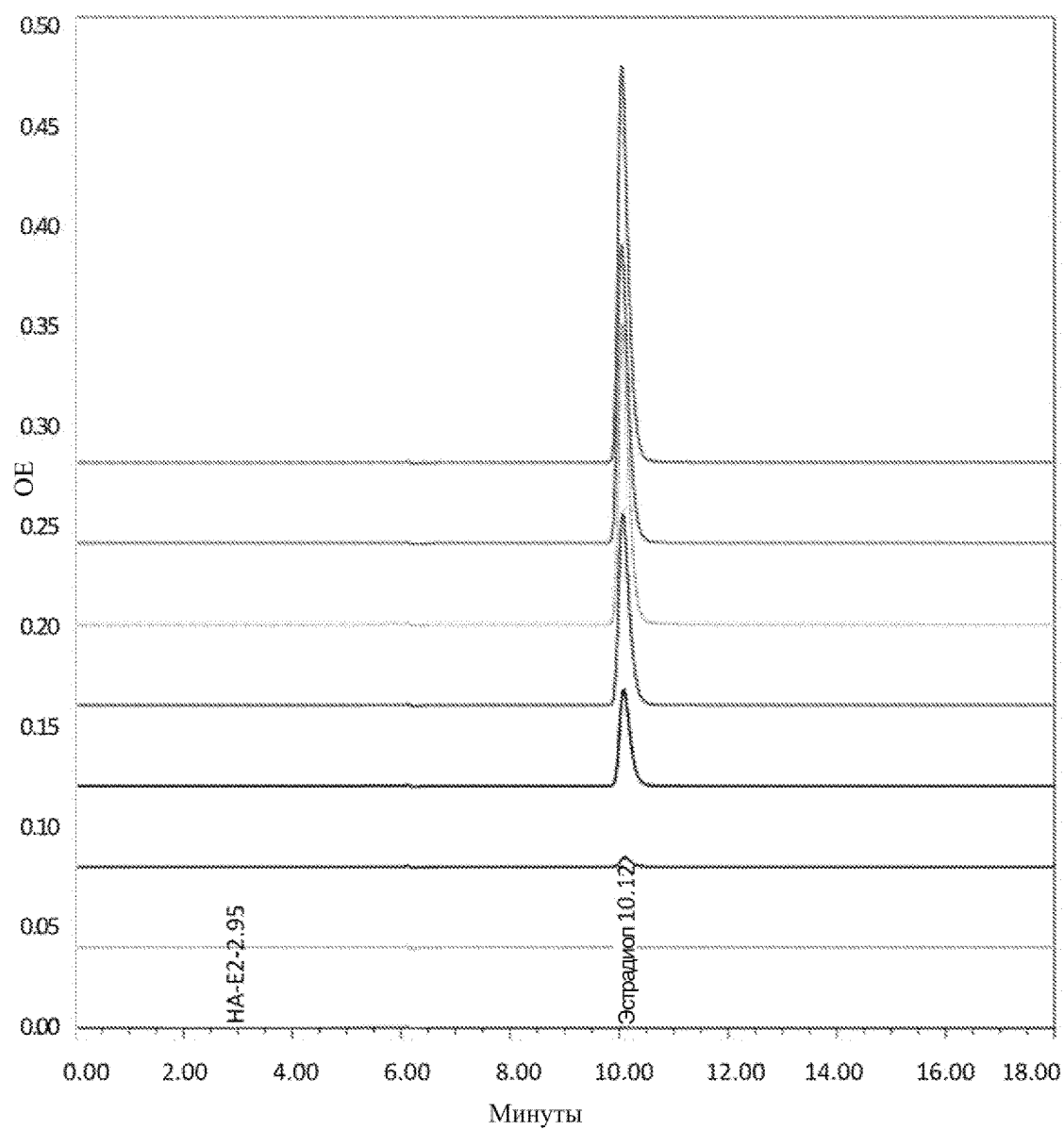
13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что конъюгат гиалуронана вводят субъекту путем перорального, назального, внутрочерепного, внутриспинального, интратекального, интрамедуллярного, интрацеребрального, интрацеребровентрикулярного, внутривенного, внутриартериального, внутрисердечного, внутрикожного, подкожного, трансдермального, внутрибрюшинного или внутримышечного введения.

14. Способ по п. 12, отличающийся тем, что нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера (AD), болезнь Паркинсона (PD), боковой амиотрофический склероз (ALS), рассеянный склероз (MS), болезнь Хантингтона (HD), лобно-височную деменцию, эпилепсию, невропатическую боль или атаксию.

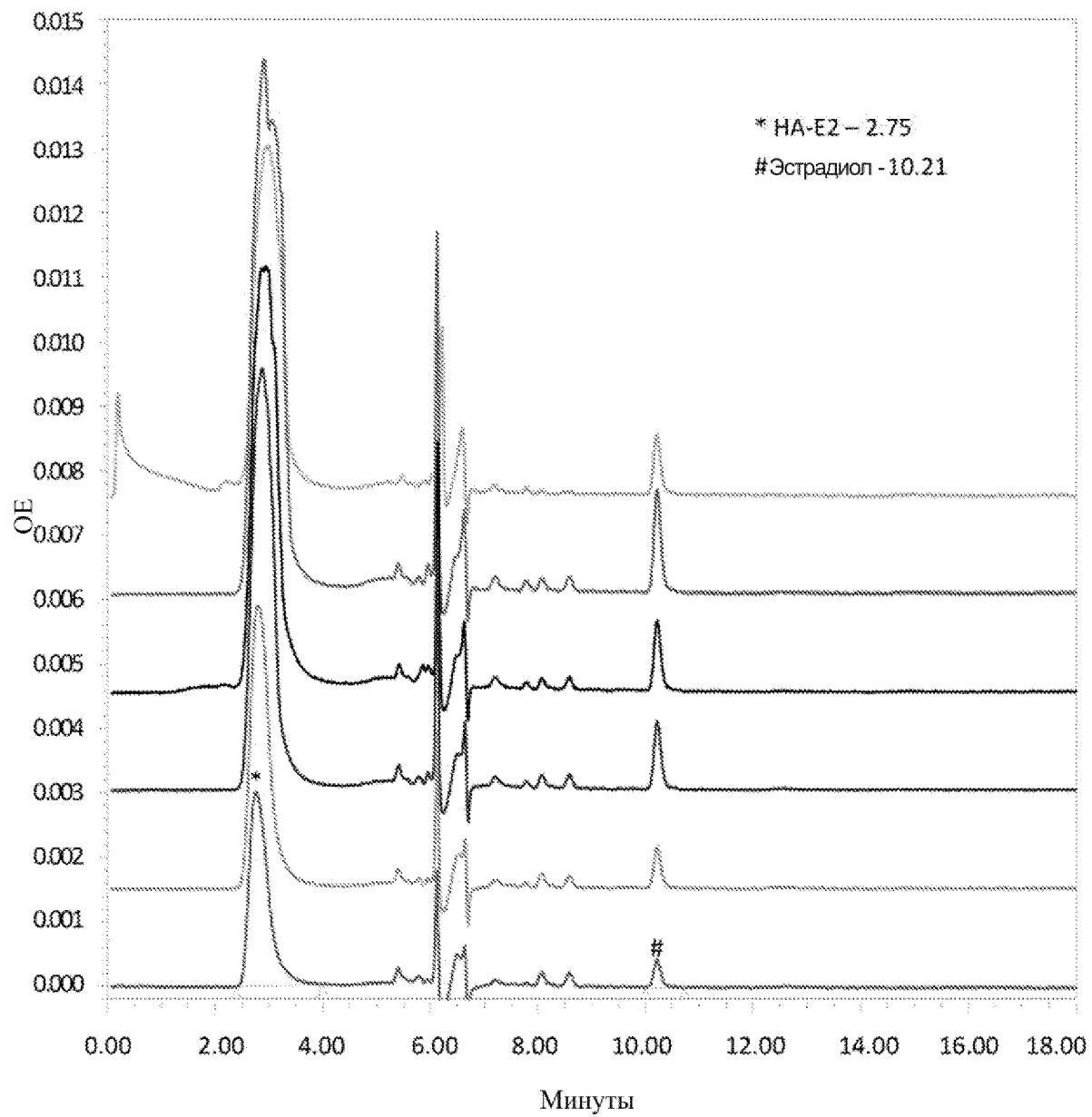
15. Способ по п. 12, отличающийся тем, что субъектом является человек.



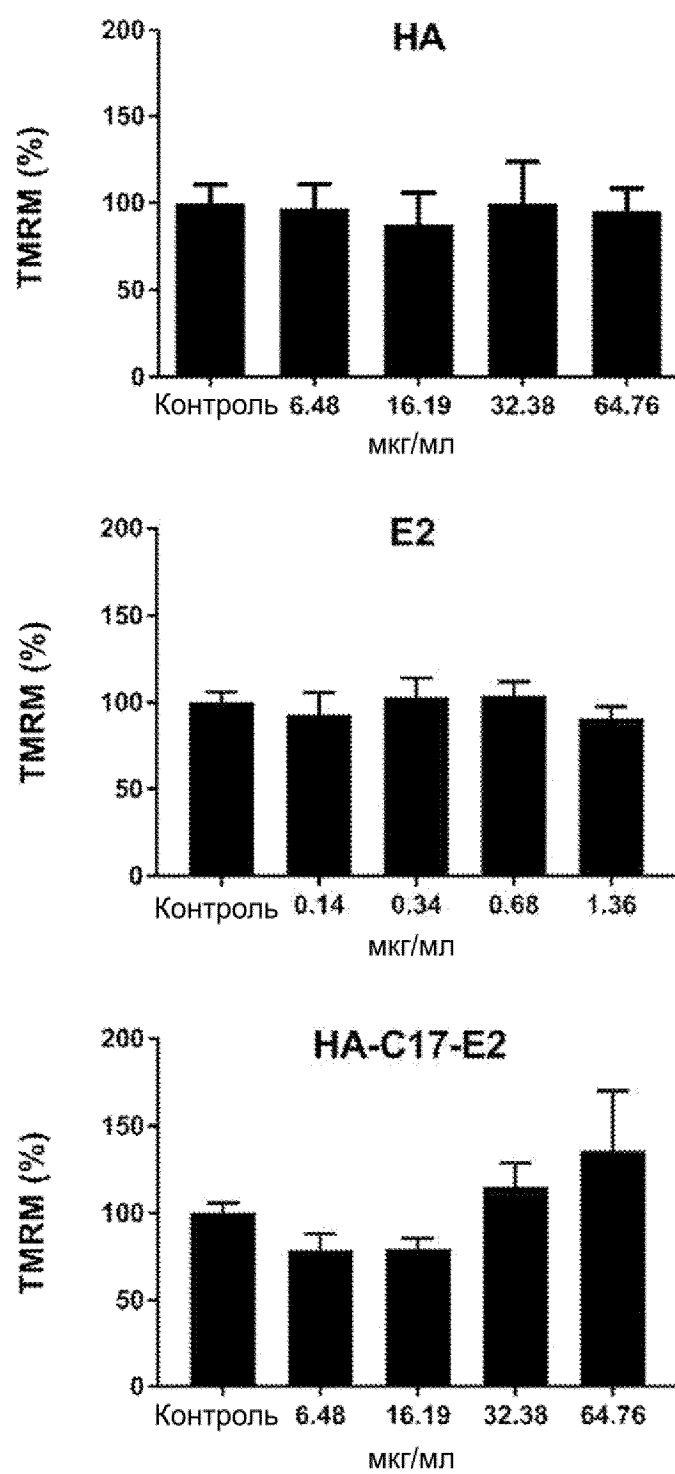
Фиг. 1



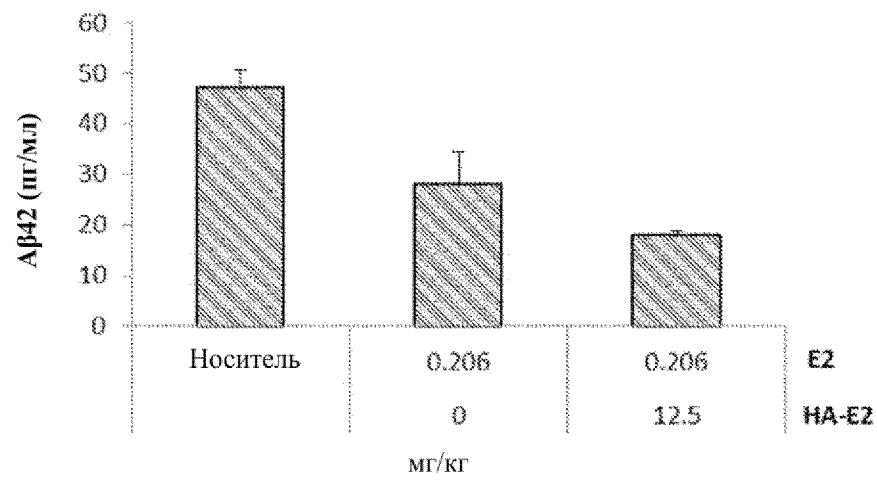
Фиг. 2А



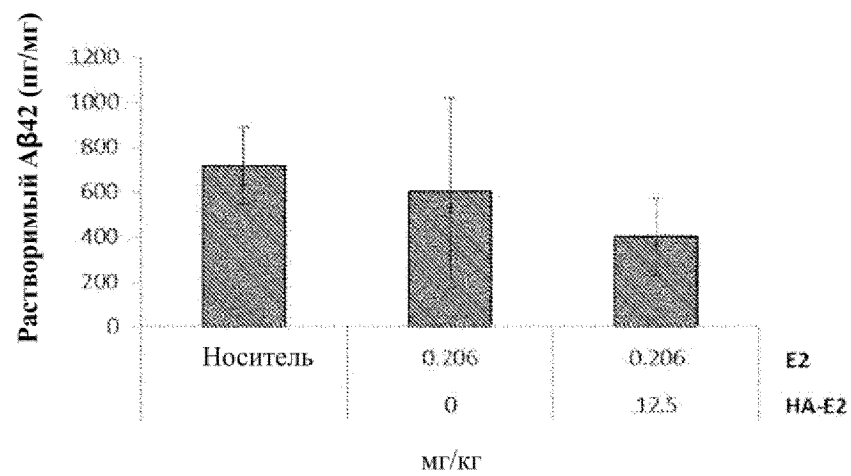
Фиг. 2В



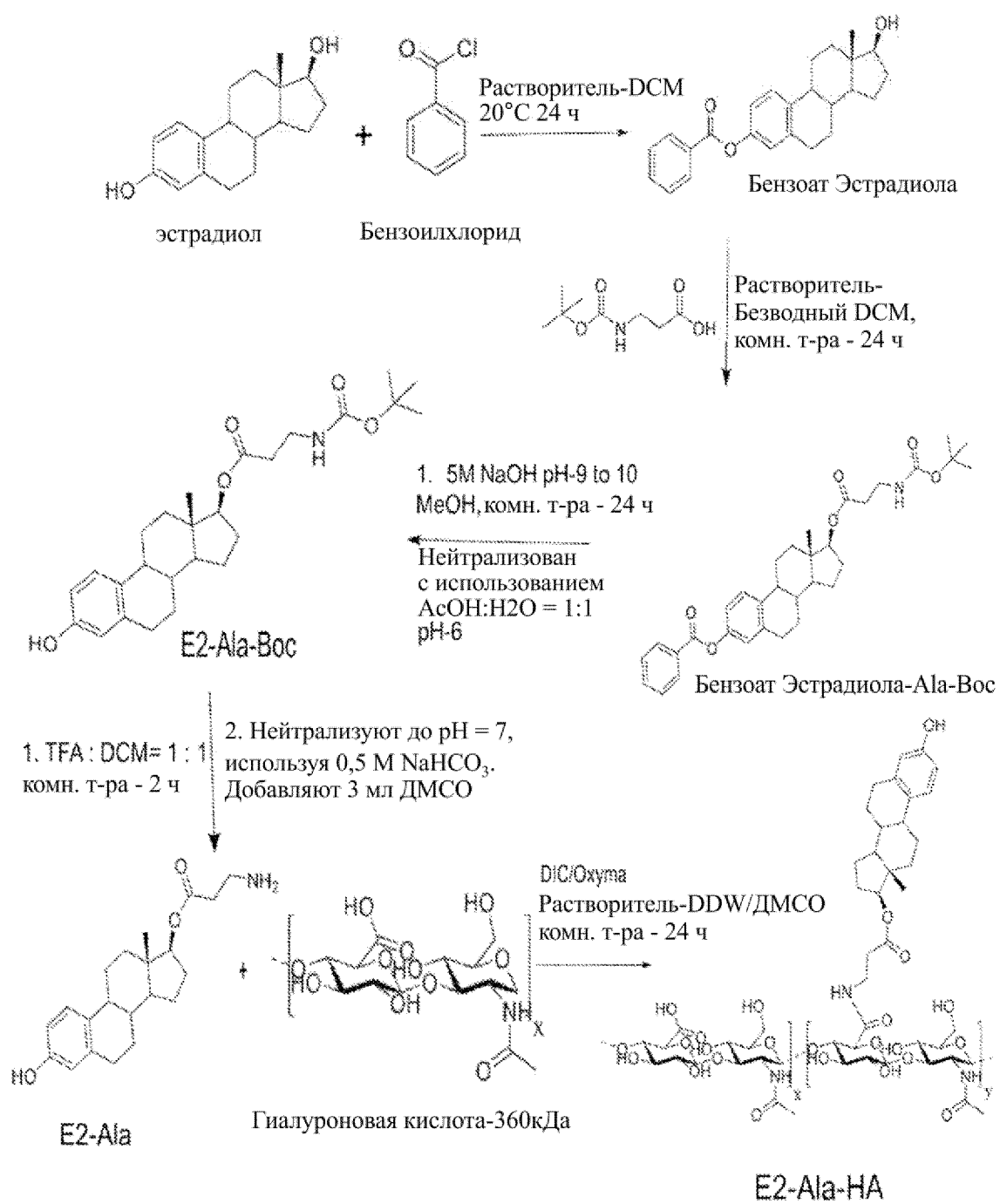
Фиг. 3

Сыворотка A β 42

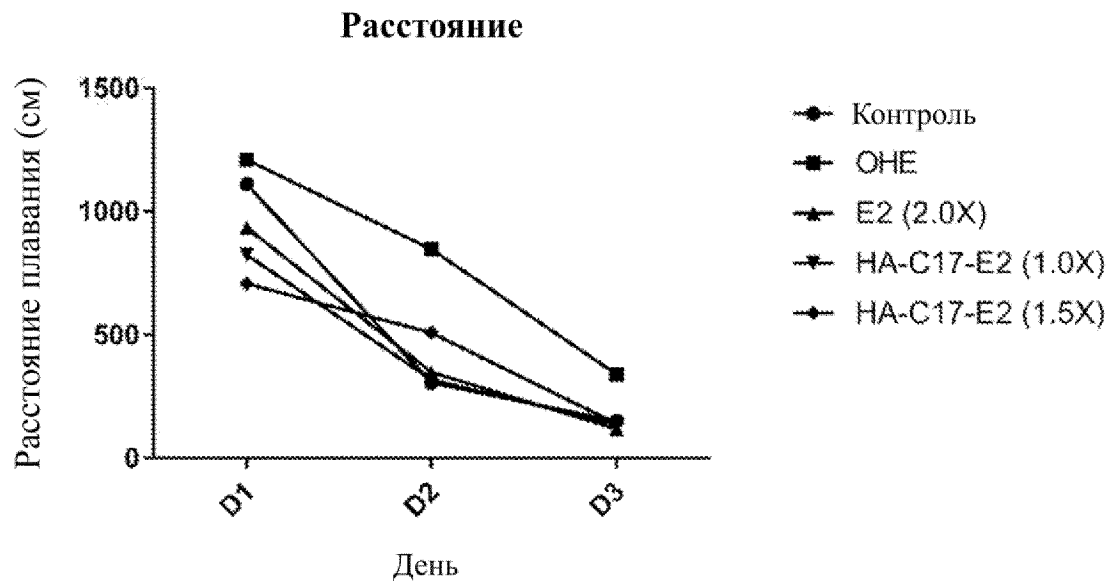
Фиг. 4А

Гиппокамп A β 42

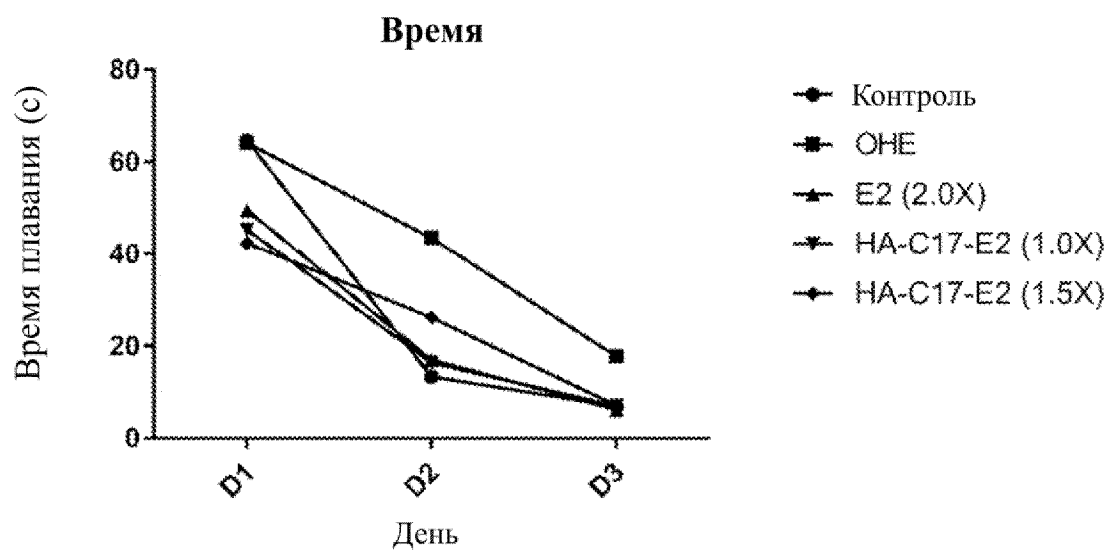
Фиг. 4В



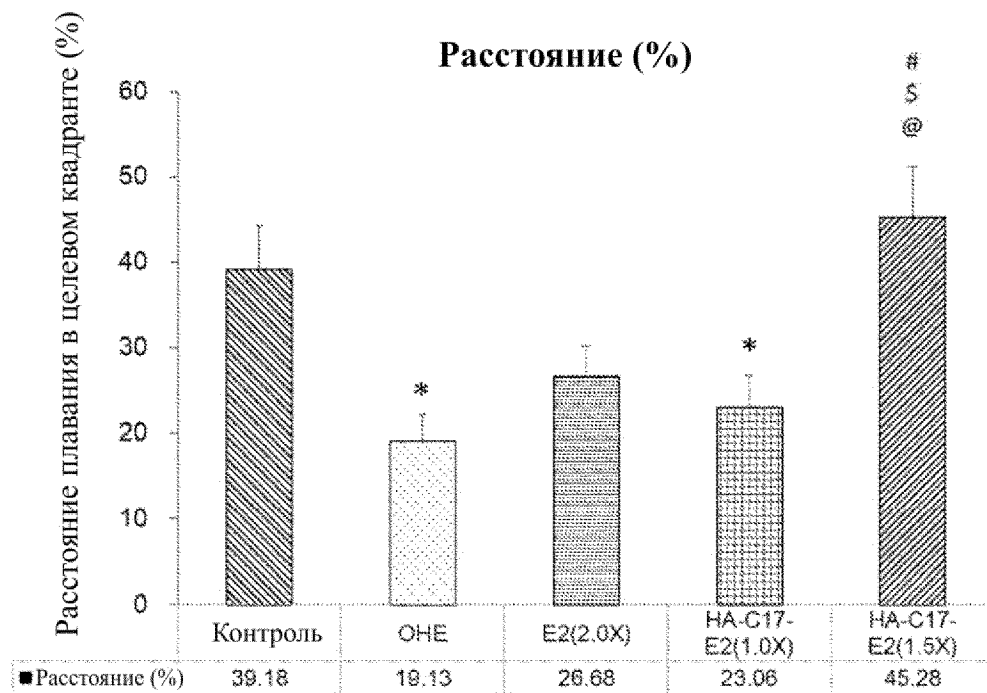
Фиг. 5



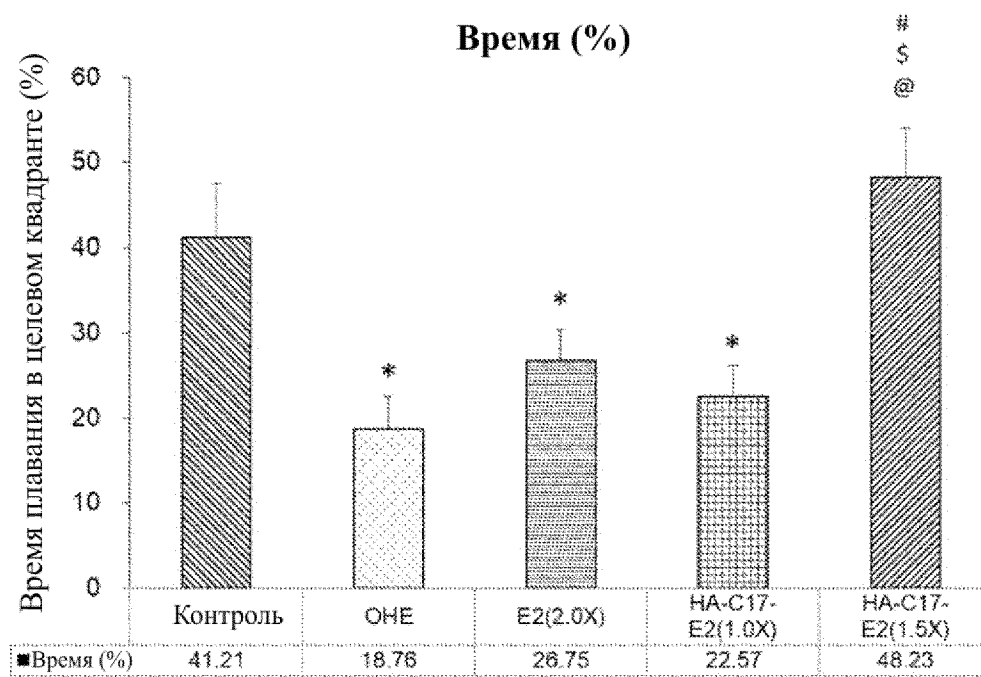
Фиг. 6А



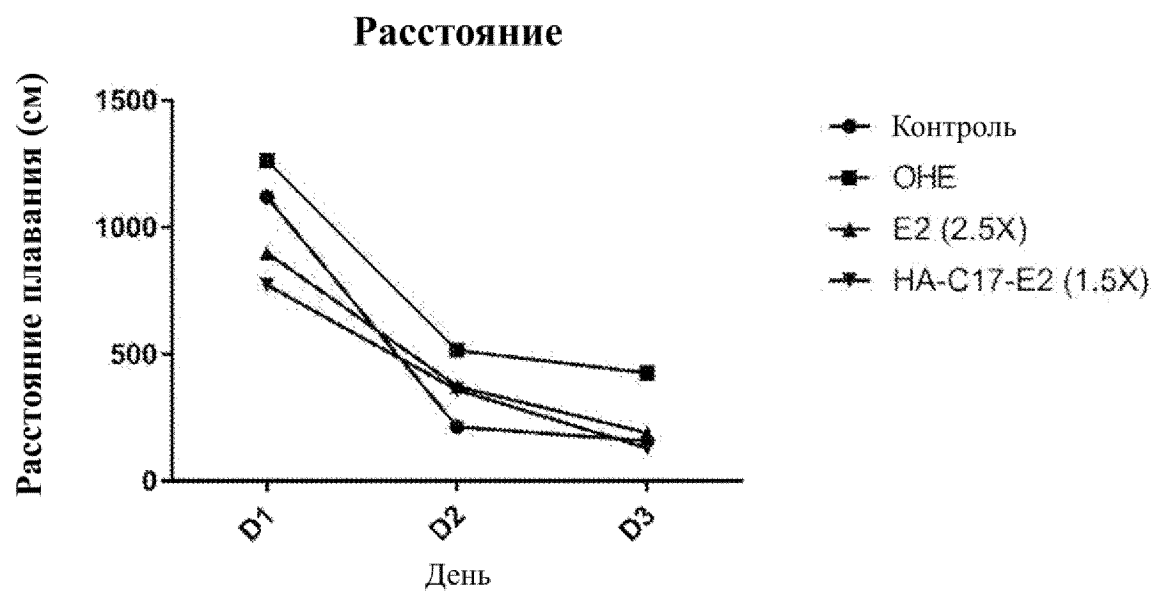
Фиг. 6В



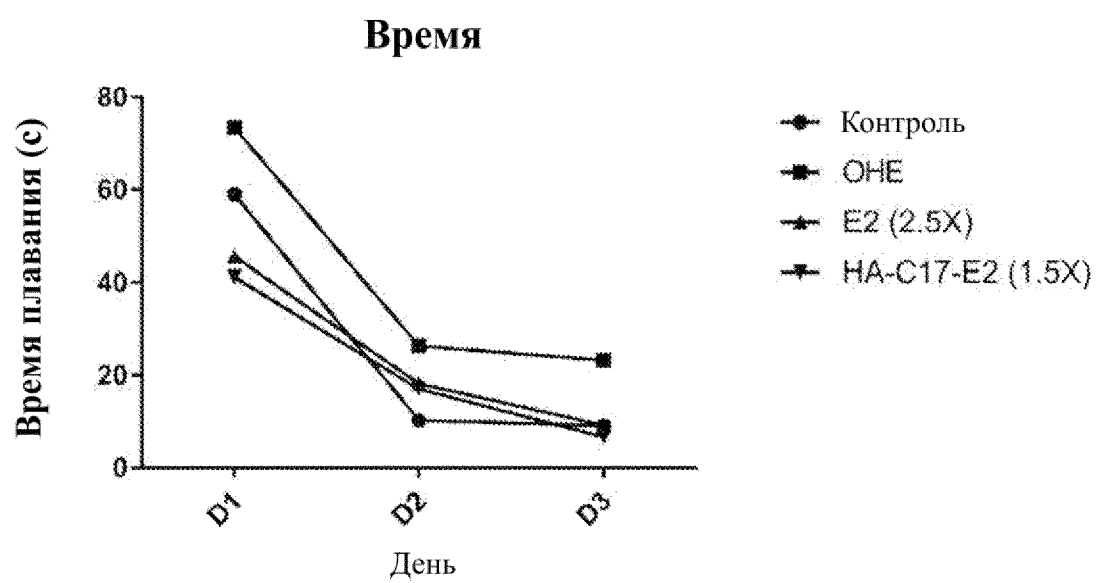
Фиг. 7А



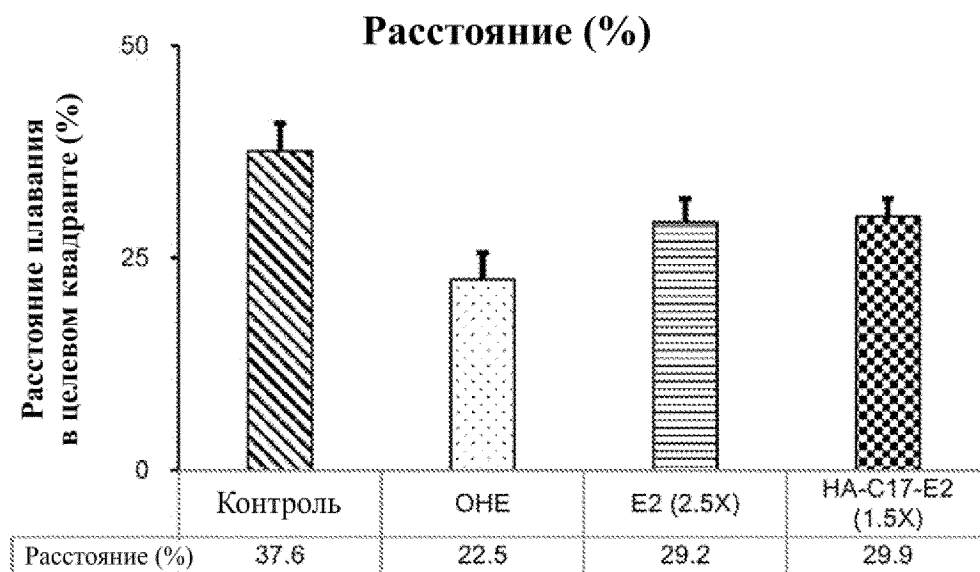
Фиг. 7В



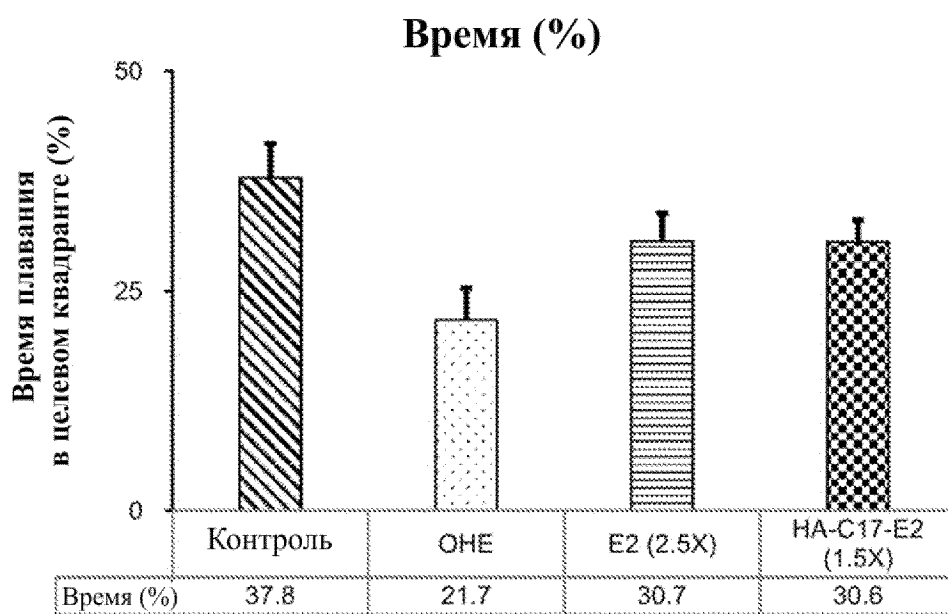
Фиг. 8А



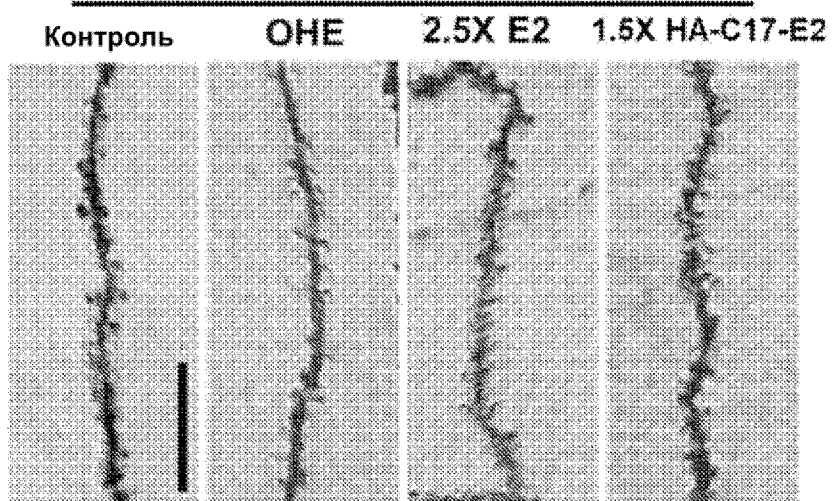
Фиг. 8В



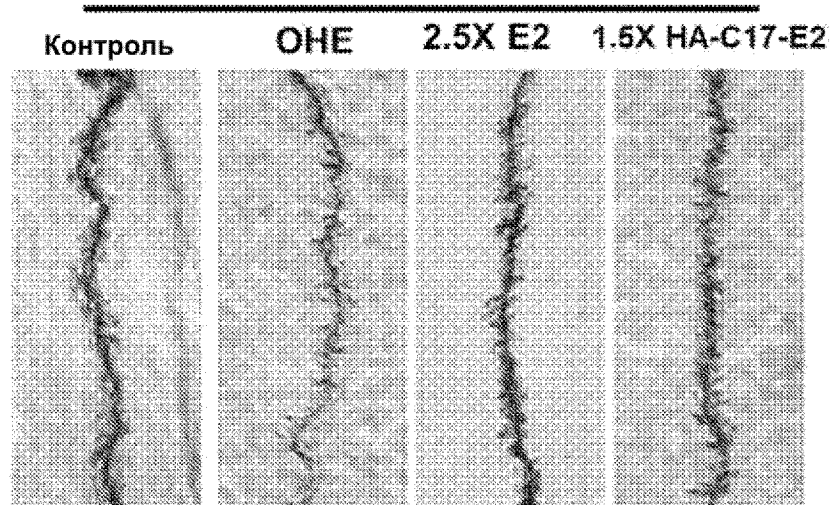
Фиг. 9А



Фиг. 9В

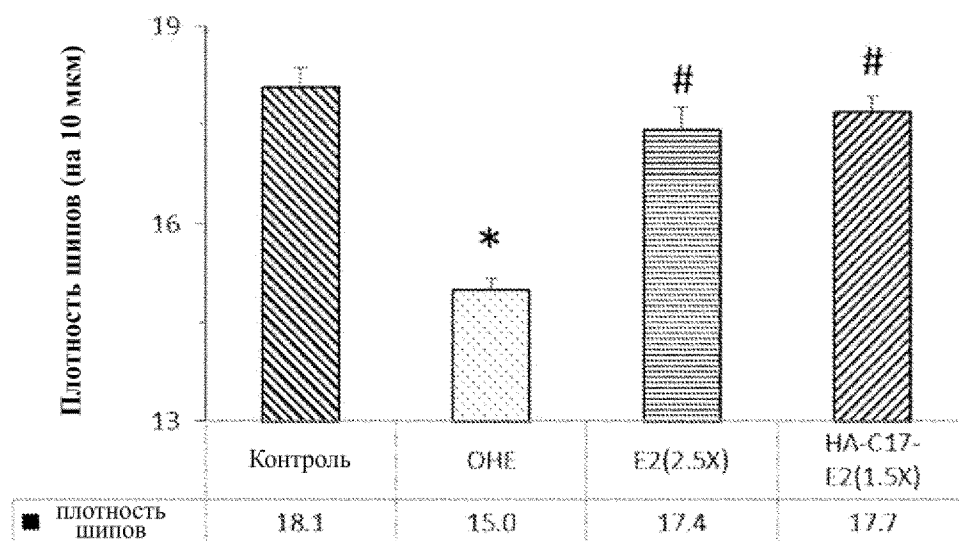
Дистальный апикальный дендрит CA1

Фиг. 10А

Дистальный базальный дендрит CA1

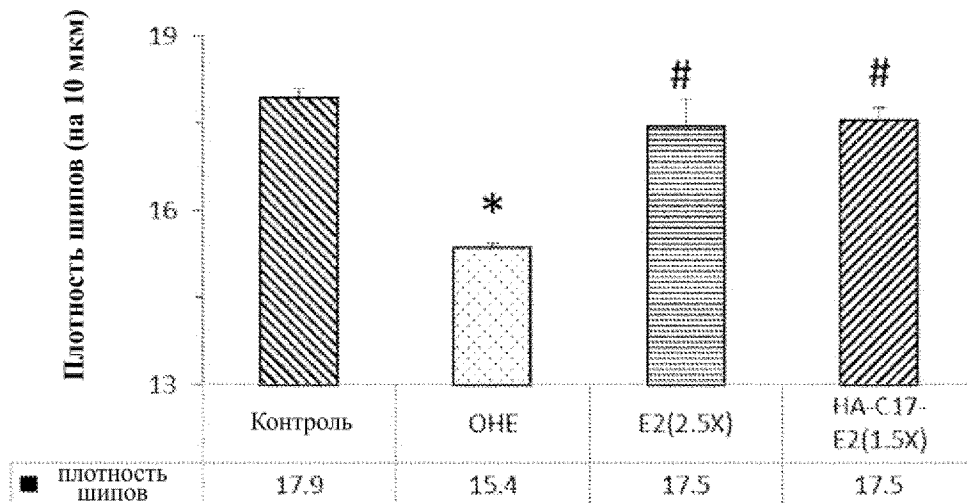
Фиг. 10В

Апикальный сегмент области CA1 гиппокампа

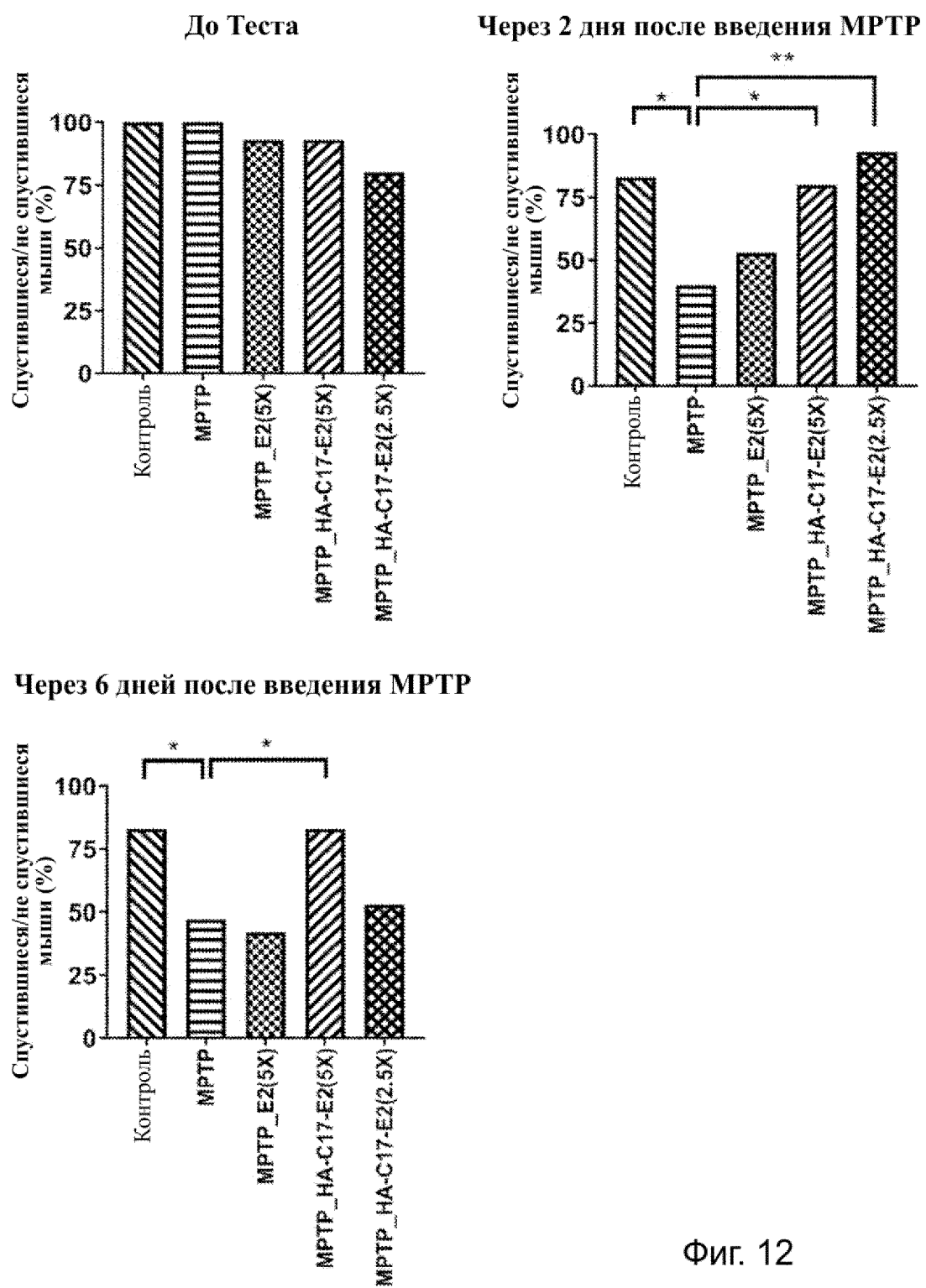


Фиг. 11А

Базальный сегмент области CA1 гиппокампа



Фиг. 11В



Фиг. 12