



(51) МПК
C12N 9/26 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
A61K 38/02 (2006.01)
A61K 38/43 (2006.01)
A61K 38/51 (2006.01)
A61P 41/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010101892/10, 19.06.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
19.06.2008

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
19.06.2007 US 60/945,037

(43) Дата публикации заявки: 27.07.2011 Бюл. № 21

(45) Опубликовано: 10.01.2013 Бюл. № 1

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2005488 C1, 15.01.1994. WO 2004092361 A1, 28.10.2004. EP 1603541 B1, 14.12.2005. GÜRKAN KAYA, CHRISTIAN TRAN et al. «Hyaluronate Fragments Reverse Skin Atrophy by a CD44-Dependent Mechanism», PLoS Med, dec. 2006, e493, найдено по адресу <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1702558/?tool=pmcentrez>. SU 1723121 A1, 30.03.1992.

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 19.01.2010

(86) Заявка РСТ:
IB 2008/002688 (19.06.2008)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2009/037566 (26.03.2009)

Адрес для переписки:

190000, Санкт-Петербург, ул. Малая
Морская, 15, оф.5, ВОХ 1125, ООО
"ПАТЕНТИКА", пат.пов. М.И. Ниловой,
рег.№ 378

(72) Автор(ы):

Уваркина Тамара П. (RU),
Кахойн Евгений Г. (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Уваркина Тамара П. (RU),
Кахойн Евгений Г. (RU)

(54) ГИАЛУРОНИДАЗА И СПОСОБ ЕЕ ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии. Представлены выделенный белок гиалуронидазы, который имеет молекулярный вес приблизительно 44 ± 1 кДа, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 90% идентичную последовательности, которая содержит SEQ ID

NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4, приведенные в описании, а также кодирующая его ДНК. Описан фармацевтический лекарственный состав для повышения проницаемости ткани или уменьшения вязкости соединительной ткани, содержащий эффективное количество выделенной указанной гиалуронидазы и фармацевтически приемлемый эксципиент,

носитель, разбавитель или вспомогательный агент. Предложены способы: 1) предотвращения или минимизации образования рубца, включающий местное введение указанного фармацевтического состава; 2) сокращения проявления морщин посредством уменьшения вязкости соединительной ткани, включающие местное введение указанного фармацевтического состава; 3) облегчения дискомфорта или боли, вызванной ревматическим артритом, склеродермией,

тендосиновитом или тендовагинитом, включающий введение пациенту указанного фармацевтического состава; 4) улучшения проникновения лекарственного средства в ткань, включающий введение субъекту лекарственного средства совместно с указанным фармацевтическим составом. Изобретение позволяет расширить арсенал фармацевтических препаратов. 7 н. и 7 з.п. ф-лы, 23 табл., 15 ил., 12 пр.

RU 2 4 7 1 8 6 7 C 2

RU 2 4 7 1 8 6 7 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C12N 9/26 (2006.01)*C12N 9/88* (2006.01)*A61K 38/02* (2006.01)*A61K 38/43* (2006.01)*A61K 38/51* (2006.01)*A61P 41/00* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2010101892/10, 19.06.2008**

(24) Effective date for property rights:

19.06.2008

Priority:

(30) Convention priority:

19.06.2007 US 60/945,037(43) Application published: **27.07.2011 Bull. 21**(45) Date of publication: **10.01.2013 Bull. 1**(85) Commencement of national phase: **19.01.2010**

(86) PCT application:

IB 2008/002688 (19.06.2008)

(87) PCT publication:

WO 2009/037566 (26.03.2009)

Mail address:

**190000, Sankt-Peterburg, ul. Malaja Morskaja, 15,
of.5, VOKh 1125, OOO "PATENTIKA", pat.pov.
M.I. Nilovoj, reg.№ 378**

(72) Inventor(s):

Uvarkina Tamara P. (RU),**Kakhojan Evgenij G. (RU)**

(73) Proprietor(s):

Uvarkina Tamara P. (RU),**Kakhojan Evgenij G. (RU)**(54) **HYALURONIDASE AND METHOD FOR USING IT**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: there are presented hyaluronidase protein of molecular weight approximately 44±1 kDa containing an amino acid sequence at least by 90% identical to an amino acid sequence containing SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 and SEQ ID NO: 4 presented in the description, as well as DNA coding it. What is described is a pharmaceutical medical composition for increasing tissue penetration and decreasing connective tissue viscosity containing an effective amount of recovered said hyaluronidase and a pharmaceutically acceptable excipient, a carrier, a solvent and an additive agent. The following methods are presented: 1) prevented or minimised

cicatrisation involving the local introduction of said pharmaceutical composition; 2) reduced wrinkle formation by decreasing connective tissue viscosity involving the local introduction of said pharmaceutical composition; 3) relieved discomfort and pain caused by rheumatic arthritis, systemic sclerosis, peritendinitis or tendovaginitis involving the introduction of said pharmaceutical composition into a patient; 4) improved agent penetration into tissue involving the introduction of the agent together with the pharmaceutical composition into an individual.

EFFECT: invention provides extending the range of pharmaceutical preparations.

14 cl, 23 tbl, 15 dwg, 12 ex

Текст описания приведен в факсимильном виде.

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА ПРЕДШЕСТВУЮЩУЮ ЗАЯВКУ

5 [001] Настоящая заявка испрашивает приоритет в соответствии со сводом законов США 35 §119 согласно предварительной заявке на патент США № 60/945,037, поданной 19 июня 2007 г., которая полностью включена в настоящее описание посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

10 Настоящее изобретение относится к гиалуронидазе. Изобретение также относится к способам применения гиалуронидазы для изменения свойств кожи или соединительной ткани.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

15 [002] Все публикации и справочные материалы, указанные в настоящем описании, полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

20 [003] Семейство фермента гиалуронидазы включает ферменты, способные к гидролизации или «разложению» гиалуроновой кислоты полисахарида. Гиалуроновая кислота является важным компонентом соединительной ткани. Таким образом, гиалуронидазы, способные быстро распространяться и диффундировать через ткани, могут изменять
25 проницаемость и вязкость межклеточного цемента, гидролизируя гиалуроновую кислоту.

30 [004] Гиалуронидазы можно обнаружить в различных тканях животных, например, в тестикулярной и селезеночной ткани млекопитающих, в змеином яде и некоторых видах стрептококка и стафилококка. В основном семейство фермента включает три основные группы: тестикулярный тип (гиалуроноглюкоронидаза) (Международный союз биохимиков и молекулярных биологов (IUMB) № ЕС 3.2.1.35); пиявочный тип (гиалуроноглюкоронидаза) (Международный союз биохимиков и молекулярных биологов (IUMB) Е.С. 3.2.1.36); и
35 бактериальный тип (гиалуронат лиаза) (Международный союз биохимиков и молекулярных биологов (IUMB) Е.С. 4.2.2.1). Между этими группами существуют химические и биологические различия, например, в отношении специфичности к субстрату, оптимального значения рН, стабильности в водных и неводных растворах и термоустойчивости. Например,
40 многие бактериальные гиалуронидазы активны только по отношению к гиалуроновой кислоте или гиалуронату, в то время как тестикулярные гиалуронидазы гидролизуют как гиалуроновую кислоту, так и другие мукополисахариды (хондроитин, хондроитинсульфат). Однако существуют еще большее разнообразие в пределах каждой группы, частично в связи с
45 источником фермента.

50

[005] Различные гиалуронидазы и способы их приготовления и применения известны в соответствующей области техники (Linker A., Hyaluronidase. In: Methods of enzymatic analysis, Eds. Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grassl M, Verlag Chemie GmbH, Weinheim, 1984, pp. 256-262; King TP, Spangfort MD, Int Arch Allergy Immunol. 2000 Oct;123(2):99-106; Jedrzejewski MJ, Crit Rev Biochem Mol Biol, 2000;35(3):221-51; Hynes WL, Walton SL, FEMS Microbiol Lett. 2000 Feb 15;183(2):201-7; Menzel EJ, Farr C; Cancer Lett 1998;131(1):3-11). Например, патент США № 4,258,134 относится к гиалуронидазе, полученной из *Streptomyces koganeiensis*, имеющей оптимальную активность при pH приблизительно 4.0; а японские патенты №№ 63044883 и 62104579 описывают гиалуронидазу из *Streptococcus dysgalactiae*, которая представляет собой фермент, имеющий молекулярный вес приблизительно 80 кД и оптимальный диапазон pH от 5.8 до 6.6, ингибируемый Fe²⁺ и Cu²⁺. Патент Российской Федерации № 2005488 описывает препарат гиалуронидазы из *Streptomyces actinocidus*, именуемый актиногиалом, который имеет оптимальное значение pH, составляющее приблизительно 6.5, и удельную активность приблизительно 30-40 МЕ/мг. Что касается гиалуронидазы небактериального происхождения, патенты США №№ 4,904,594 и 5,061,627 описывают препараты гиалуронидазы из криля и других ракообразных; патент США № 5,593,877 рассматривает гиалуронидазы и другие белки из нуклеиновых кислот яда насекомых семейства *Vespidae*; патенты США №№ 5,747,027 и 5,827,721 описывают очищенную гиалуронидазу, полученную от млекопитающих; а патент США № 5,854,046 и международная публикация PCT WO 99/29841 описывают гиалуронидазу человека.

[006] Способы получения и очистки гиалуронидаз из различных источников описаны, например, в патенте США 4,410,531, раскрывающем способ очистки фермента из сырьевого препарата гиалуронидазы; в швейцарском патенте № CH628088, предоставляющем способ очистки гиалуронат лиаза и других белков из культур стрептококков; а также в патенте США 1,060,513, описывающем способ приготовления гиалуронидазы из органов животных. См. также SU1723121. Патент США № 4,897,349 описывает способ увеличения микробного биосинтеза гиалуронидазы посредством регулирования концентрации кислорода. Различные типы гиалуронидазы могут быть коммерчески доступны, например, в следующих компаниях: Wyeth-Ayerst (Wydase®), Abbot (Hyazyme), Bristol-Myers Squibb (Enzodase) и Ortho Pharmaceuticals (Diffusin).

[007] Одним из полезных свойств гиалуронидазы является то, что она может снизить формирование рубцовой ткани различных этиологий и «смягчить» кожу. Например, способы растворения рубцовой ткани млекопитающих посредством введения гиалуронидазы и коллагеназы в пораженные ткани раскрыты в патентах США №№ 4,524,065 и 4,645,6684; а способы улучшения проникновения через кожу различных препаратов для местного применения были описаны в международной публикации PCT WO 00/38732; WO 01/45743; и в патенте Германии №19963538. Посредством местного или парентерального применения

гиалуронидазы также можно стимулировать диффузию веществ для местного применения и инъеклируемых веществ. Это подтверждено клинически в случае, когда гиалуронидазы применяли для облегчения распределения препаратов или биологических агентов, обычно в
5 коже (Nara et al., Chem Pharm Bull (Tokyo) 1992;40:737-40; Costello and Jeske, Phys Ther 1995;75:554-63; Laugier, Br J Dermatol 2000 Feb;142(2):226-33).

[008] Гиалуронидаз Также было показано, что гиалуронидазы пригодны для широкого
10 применения в медицине, включая блокирование инвазии лимфатического узла опухолевыми клетками (международная публикация PCT WO 95/30439); лечение сосудистых заболеваний (немецкий патент № 19860541 и патент США № 4,568,543) и предстательной гипертрофии (патент США № 5,116,615); вакцинацию против гельминтозной инфекции (патент США №
15 5,811,100); и различные офтальмологические применения (патент США №№ 5,292,509; 5,856,120 и 5,866,120). Например, гиалуронидаза использовалась для снижения внутриглазного давления у пациентов, страдающих глаукомой, посредством разложения гиалуронана в пределах стекловидного тела (патент США № 4,820,516).

[009] Гиалуронидаза также применялась в терапии рака в качестве
20 «лиофилизирующего агента» для усиления эффективности химиотерапии и/или доступности опухолей для химиотерапии (Schuller et al., Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 1991;32:173, abstract no. 1034; Czejka et al., Pharmazie 1990;45:H.9), а также использовалась в комбинации с другими
25 химиотерапевтическими средствами в лечении различных видов рака, включая рак мочевого пузыря (Horn et al., 1985, J. Surg. Oncol., 2:304-307), плоскоклеточный рак (Kohno et al., 94, J. Cancer Res. Oncol., 120:293-297), рак молочной железы (Beckenlehner et al., 1992, J. Cancer Res. Oncol. 118:591-596) и рак желудочно-кишечного тракта (Scheithauer et al., 1988, Anticancer Res. 8:391-396). Прием гиалуронидазы также вызывает реактивность ранее устойчивых к
30 химиотерапии опухолей поджелудочной железы, желудка, толстой кишки, яичников и молочной железы (Baumgartner et al., Reg. Cancer Treat. 1988;1:55-58; Zanker et al., Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 1986;27:390). Кроме того, сывороточная гиалуронидаза предотвращает рост
35 опухолей, пересаженных мышам (De Maeyer et al., Int. J. Cancer 1992;51:657-660), в то время как инъекция гиалуронидазы ингибирует образование опухоли, вызванное воздействием канцерогенных веществ (Pawlowski et al., Int. J. Cancer 1979;23:105-109; Haberman et al.,
40 Proceedings of the 17th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, Washington, D.C., 1981;22:105, abstract no. 415). Внутривенная или внутримышечная инъекция гиалуронидазы также эффективна при лечении рака мозга (глиомы) (опубликованная заявка согласно PCT № WO88/02261).

[0010] Несмотря на то, что существует огромное количество действующих и
45 потенциальных терапевтических и косметических применений гиалуронидазы, остается проблема, заключающаяся в том, что в настоящее время доступные гиалуронидазы обычно являются химически и термически неустойчивыми, они часто имеют значительную
50

неспецифическую активность и демонстрируют пиковую активность при кислом значении pH, обладая таким образом субоптимальными свойствами для применений в условиях *in vivo*. Поэтому в данной области техники существует потребность в получении препаратов гиалуронидазы, которые являются устойчивыми в различных составах и демонстрируют большой запас устойчивости и активность при физиологических температурах и pH. Настоящее изобретение относится к этим и другим потребностям в соответствующей области техники.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0011] Было обнаружено, что гиалуронидаза, выделенная из штамма *Streptomyces actinocidus*, имеет важные преимущества по сравнению с гиалуронидазой описанной ранее в данной области техники. Выделенный фермент согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит димер из двух симметричных фрагментов, при этом С-концевой последовательностью является последовательность GDPXNSLSPALFYGD (SEQ ID NO:1) или функционально-консервативный вариант этой последовательности. В одном примере осуществления гиалуронидаза также содержит последовательность аминокислот (D/G)NGEYTLYTSPAQFY (SEQ ID NO:2) или функционально-консервативный вариант этой последовательности. В изобретении также предложена гиалуронидаза, содержащая последовательность полноразмерной *Streptomyces actinocidus*.

[0012] Соответственно, в изобретении предложена выделенная гиалуронидаза, содержащая последовательности SEQ ID NO:1 и/или SEQ ID NO:2 и/или SEQ ID NO:4. В одном примере осуществления гиалуронидаза представляет собой полноразмерную гиалуронидазу «дикого типа», имеющую одну или более физико-химических, структурных, функциональных или иммунологических характеристик. В другом примере осуществления гиалуронидаза представляет собой вариант полноразмерного фермента «дикого типа», обладающий одной или более физико-химических, структурных, функциональных или иммунологических характеристик полноразмерного фермента «дикого типа» и включающий SEQ ID NO:1 или функционально-консервативный вариант этой последовательности и/или SEQ ID NO:2 или функционально-консервативный вариант этой последовательности и/или SEQ ID NO:4 или функционально-консервативный вариант этой последовательности.

[0013] В изобретении также предложены композиции, содержащие фермент согласно изобретению. Такие композиции включают, без ограничения, составы, пригодные для медицинских, фармацевтических и косметических применений. Композиции согласно изобретению могут также состоять из одного или более лекарственных средств, стабилизаторов или эксципиентов. Предпочтительными примерами лекарственных средств и стабилизаторов, соответственно, но без ограничений, являются гидрокортизон и маннит (маннитол). Предпочтительными составами являются составы, содержащие соответствующие

топические носители для мазей, косметических кремов, вязких составов или гелей. Другие предпочтительные композиции включают трансдермальные пластыри, повязки, прокладки или тампоны, включающие фермент с лекарственным средством или без лекарственного средства.

5 [0014] Кроме того, в изобретении предложены способы применения фермента по изобретению для различных косметических и лечебных целей, включая, но без ограничения, сокращение и предотвращение образования складок и рубцов; усиление проникновения
10 препаратов в ткани или через кожу; снижение дискомфорта от ревматического артрита, склеродермии, тендосиновита или тендовагинита; способствование уменьшению хронического влагалищного воспаления после хирургического и консервативного лечения; и в качестве пред- или послеоперационного лечения совместно с пластической хирургией для получения лучшего
15 результата.

[0015] Вышеупомянутые признаки и множество других сопутствующих преимуществ изобретения становятся более понятными благодаря следующему подробному описанию совместно с сопутствующими фигурами.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

[0016] **Фигуры 1А и 1В.** Приготовление гиалуронидазы из культуры *Streptomyces actinocidus*. (А) Эта Фигура показывает три различные схемы очистки для производства
25 микробной гиалуронидазы согласно изобретению. Преципитация в этаноле и аэрозольная сушка с последующей серией этапов хроматографии и фильтрации позволяют создать препараты, как правило, пригодные для приготовления чистого фермента для общих экспериментальных целей, в то время как окисление фильтрованной питательной среды для культур с последующими этапами адсорбции и фильтрации позволяет получить препарат
30 гиалуронидазы, пригодный для применения в медицине, то есть фармацевтические препараты. (В) Эта Фигура показывает альтернативный способ очистки, который может привести к созданию химически чистой гиалуронидазы с активностью приблизительно 162 МЕ на мг белка.
35

[0017] **Фигура 2.** Определение молекулярного веса гиалуронидазы посредством геле-фильтрации. Колонка 1×50, биогель Р-100, PBS 0.05, рН 6.5, 5 мг/мл, 10 мл/ч.
40

[0018] **Фигура 3.** Изоэлектрическое фокусирование микробной гиалуронидазы (10 мг) при градиенте рН 4 - 6. Пунктирная линия представляет абсорбцию 280 нм. Треугольники представляют активность гиалуронидазы.

[0019] **Фигуры 4А и 4В.** Электрофореграмма гомогенной гиалуронидазы, полученной из *Streptomyces*. (А) 150 мкг белка без добавления додецилсульфат натрия и меркаптоэтанола; (В) 80 мкг белка с добавлением додецилсульфат натрия и меркаптоэтанола.
45

[0020] **Фигура 5.** Воздействие рН на активность гиалуронидазы.

50 [0021] **Фигура 6.** Исследование кажущихся констант диссоциаций гиалуронидазы.

[0022] **Фигура 7.** Стабильность гиалуронидазы (5×10^{-4} г/мл) при температуре 20°C и различном значении pH. (1) pH 6.0; (2) pH 7.0; (3) pH 8.0; (4) pH 9.0; (5) pH 10.0; (6) pH 11.0; (7) pH 5.0; (8) pH 12.0; (9) pH 4.0; (10) pH 3.0.

5 [0023] **Фигура 8.** Оптимальные температурные условия для активности гиалуронидазы (0.01 М PBS, pH 6.5).

10 [0024] **Фигура 9.** Термоустойчивость гиалуронидазы (раствор; 6.5). 1 - 20°C; 2 - 30°C; 3 - 40°C; 4 - 50°C; 5 - 60°C; 6 - 70°C.

[0025] **Фигура 10.** Скорость гидролиза гиалуроновой кислоты (1) и хондроитинсульфатов А, В, С (2) под действием гиалуронидазы.

15 [0026] **Фигура 11.** Зависимость гидролиза гиалуроновой кислоты от концентрации субстрата (фермент: 0,5 мг/мл; 0.1 М PBS, pH 6.5).

[0027] **Фигура 12.** Гель-фильтрация продуктов гидролиза после ферментного гидролиза гиалуроновой кислоты.

20 [0028] **Фигура 13.** Изменения уровня гидрокортизона в плазме после применения мази.

[0029] **Фигура 14.** Влияние на развитие отека от мазей без гиалуронидазы и с различными количествами гиалуронидазы в различные моменты времени после применения.

25 [0030] **Фигура 15.** Информация об объединенной последовательности, полученная с использованием дегенеративных праймеров для ПЦР и ДНК *Streptomyces actinocidus*. Белковая трансляция показана на основе последовательности ДНК. Последовательности праймеров показаны в малом случае; прямой праймер - основы 1-38; обратный 2 - основы 421-449; обратный 3 - основы 256-276; и обратный 4 - основы 277-306.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

35 [0031] В настоящем изобретении предложена гиалуронидаза или гиалуронат лиаза, которая может продуцироваться штаммом *Streptomyces actinocidus* 77, депонированным в Центральном музее производственных микроорганизмов 6 ноября 1980 г. под номером СМРМ S-560. Другой штамм *Streptomyces actinocidus*, обозначенный как 150, был также идентифицирован и депонирован под номером СМРМ S-561.

40 [0032] Как показано в примерах, фермент по изобретению обладает многими преимуществами по сравнению с другими гиалуронидазами, известными в данной области техники. Эти преимущества включают (1) высокую удельную активность; (2) высокую селективность по отношению к гиалуронату; (3) оптимальную активность близкую к физиологическому значению pH; (4) высокую растворимость в физиологическом растворе; (5) высокую устойчивость при комнатной температуре; и (6) низкую токсичность. Кроме того, фермент по изобретению продуцируется в невирулентном, непатогенном бактериальном

штампе и может быть приготовлен в форме с очень высокой степенью очистки при умеренных затратах. Действие гиалуронидазы может существенно изменить проницаемость ткани, размягчить рубцы, улучшить подвижность суставов и снизить или предотвратить контрактуры. Как показано в примерах, этот бактериальный фермент также является менее токсичным, чем препарат тестикулярной гиалуронидазы, обычно используемой во врачебной практике.

[0033] Гиалуронидаза согласно изобретению имеет широкий диапазон применения. Достоинства изобретения, включая высокую удельную активность, улучшенную рН-стабильность и/или высокую термоустойчивость, позволяют применять его для обеспечения улучшенной доставки лекарственного средства из различных активных веществ для снижения дозы лекарственного средства с поддержанием эффективности или для разработки нетрадиционных способов доставки лекарственного средства. Неограничивающие примеры применения описанной в настоящей заявке гиалуронидазы включают следующее: (1) применение в различных трансдермальных пластырях в качестве компонента лекарственной композиции для повышения эффективности проникновения лекарственного средства и обеспечения непрерывной постоянной доставки лекарства (например, доставка стероидов через кожу вместо перорального или парентерального введения); (2) для трансдермальной (через кожу) или трансмукозальной (через слизистую оболочку) доставки лекарства, например, инсулина; (3) для облегчения проникновения, повышения эффективности или снижения необходимого количества активного вещества в противогрибковых медицинских средствах (мази, порошки и т.д.); (4) для облегчения проникновения антибиотиков в зону поражения посредством местной доставки или обеспечения постоянной устойчивой концентрации в крови антибиотиков, вводимых трансдермально или трансмукозально; (5) в лекарственных средствах активных веществ для стимулирования или подавления роста волос для местного применения; (6) для лечения хронических кожных воспалительных процессов, когда доставка медицинского средства через кровь вызывает затруднения, например, вследствие образования капсулы; (7) для повышения эффективности местных анестезирующих средств; (8) для повышения эффективности противопсориазных препаратов; (9) для повышения эффективности противозудных препаратов; (10) для повышения эффективности препаратов, применяемых для лечения предопухолевых состояний или рака шеи посредством местного применения; (11) в вагинальных свечах для лечения, например, глубокой молочницы влагалища; (12) при лечении репродуктивных проблем (например, импрегнация яйцеклетки, имплантация яйцеклетки, сальпингит и т.д.); (13) для лечения патологий, сопровождаемых образованием капсулы, для облегчения доставки лекарства через капсулу; или (14) в онкологии для повышения эффективности противораковой терапии, например, при меланоме.

Определения

5 [0034] Термин «действующий агент» или «активное вещество» включает фармакологические, косметические или биологически активные компоненты и относится к
любому химическому или биологическому материалу, который производит желаемый эффект. Действующий агент согласно изобретению также включает гиалуронидазу, которая может
10 производить желаемые эффекты, такие как, например, изменение проницаемости кожи или снижение степени формирования рубцов.

10 [0035] Термин «лекарственное средство», означает любой и все действующие агенты, не включая гиалуронидазу. Неограниченные примеры лекарственных средств включают
противовоспалительные агенты, противогрибковые агенты, химиотерапевтические агенты,
15 антибиотики, антимикробные агенты, противовирусные агенты, гормоны, такие как инсулин, усилители роста кожи, включая усилители роста волос и ногтей, средства ухода за волосами,
противоспориазные агенты, ретиноиды, противоугревые лекарства, противоопухолевые агенты, местные анестетики, фототерапевтические агенты, солнцезащитные средства, агенты
20 для защиты кожи, альфа-оксикислоты (включая молочную кислоту и гликолевую кислоту), репелленты и т.п.

25 [0036] Термин «эффективное количество» активного агента относится к нетоксичному, но достаточному количеству активного агента для обеспечения желаемого эффекта и действия при обоснованном соотношении пользы/риска, применяя любое консервативное лечение. Эффективное количество соединения может быть первоначально
оценено либо в ходе проведения анализов культуры клеток, либо на животных моделях,
30 обычно на мышах, кроликах, собаках или свиньях. Животная модель также используется для достижения желаемого диапазона концентраций и способа введения. Затем такая информация может использоваться для определения пригодных доз и способов введения для людей. Эффективность и токсичность соединения могут быть определены в соответствии со
35 стандартными фармацевтическими процедурами в культурах клеток или подопытных животных, например, ED50 (доза, приводящая к желаемому эффекту у 50% популяции) и LD50 (смертельная доза для 50% популяции). Фармацевтически пригодная доза предпочтительно находится в пределах диапазона, который включает ED50 с небольшой или отсутствующей
40 токсичностью. Доза варьируется в зависимости от заболевания или состояния, подлежащего лечению или предотвращению, используемой формы дозы, чувствительности пациента и способа введения. Точная доза выбирается отдельным врачом в зависимости от пациента, проходящего лечение.

45 [0037] Термин «носитель», используемый в настоящем описании, относится к среде, пригодной для введения активных агентов, и включает любой жидкий или нежидкий растворитель, разбавитель или подобный материал, известный в косметических и
50

5 лекарственных областях техники, для приготовления любого жидкого или полутвердого геля, крема, мази, эмульсии, аэрозоля, пены, лосьона или подобного средства, которая при этом не оказывает неблагоприятного воздействия на живую животную ткань или не взаимодействует с
10 другими компонентами композиции неблагоприятным образом. Топические носители используются для обеспечения композиций по изобретению в их предпочтительной жидкой или нетвердой форме. Неограничивающие примеры соответствующих топических носителей для применения в этом случае включают воду, жидкие спирты, жидкие гликоли, жидкие белковые гидролизаты, жидкий ланолин и производные ланолина, а также подобные материалы и их смеси.

15 [0038] Термин «около» или «приблизительно» означает нахождение в рамках приемлемых границ погрешности для конкретного значения, определяемых среднему специалисту в данной области техники, которые будут частично зависеть от того, как выполняется измерение или определение значения, то есть от ограничивающих условий измерительной системы. Например, «около» может означать диапазон до 20%,
20 предпочтительно до 10%, более предпочтительно до 5% и еще более предпочтительно до 1% данного значения. В качестве альтернативы, особенно в отношении биологических систем или процессов, этот термин может означать нахождение в рамках порядка величины, предпочтительно в пределах 5-кратного и более предпочтительно в пределах 2-кратного
25 значения.

Молекулярная биология

30 [0039] В соответствии с настоящим изобретением можно применять традиционную молекулярную биологию, микробиологию и рекомбинантные методики ДНК в рамках уровня знаний в данной области техники. Такие методики полностью описаны в литературе. См., например, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second
35 Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (herein "Sambrook et al., 1989"); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)); *Transcription And Translation* (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984));
40 *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1986)); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, (1986)); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994). Представленное здесь значение некоторых важных терминов объясняется ниже.

45 [0040] Термин «субстрат» означает любое вещество или соединение, которое преобразуется или должно быть преобразовано в другое соединение под действием фермента. Этот термин также включает комбинации соединений, такие как растворы, смеси и другие

материалы, которые содержат, по меньшей мере, один субстрат. Предпочтительными субстратами для гиалуронидазы является гиалуроновая кислота и гиалуронат.

[0041] «Нативный» белок фермент, полинуклеотид, ген или клетка или белок фермент, полинуклеотид, ген или клетка «дикого типа», означают белок, фермент, полинуклеотид, ген или клетку, которые встречается в природе.

[0042] «Полноразмерный» фермент означает фермент, который включает все аминокислотные остатки, закодированные кодирующей областью соответствующего гена.

[0043] «Вариант» полноразмерной гиалуронидазы, гиалуронидазы «дикого» типа может иметь последовательность аминокислоты, которая отличается одной или более заменами, делециями или вставками аминокислот. Варианты также включают фрагменты, предпочтительно фрагменты, которые включают, по меньшей мере, 5, более предпочтительно по меньшей мере 50 и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 100 последовательных аминокислот фермента «дикого» типа. Замена (также известная как «мутация») может являться «функционально-консервативной». Руководство по определению, какие и сколько аминокислотных остатков может быть заменено, вставлено или удалено без отмены биологической или иммунологической активности, может быть найдено при помощи компьютерной программы, хорошо известной в данной области техники, например, посредством программного обеспечения DNASTar.

[0044] «Функционально-консервативный вариант» является белком или ферментом, в котором данный аминокислотный остаток был изменен без изменения всей структуры и функции белка или фермента, включая, но не ограничиваясь указанными, замещение аминокислоты аминокислотой, имеющей подобные свойства, включая полярную или неполярную характеристику, размер, форму и заряд. Некоторые выбранные свойства встречающихся в природе аминокислот приведены ниже.

Аминокислота	SLC	Свойство боковой цепи
Изолейцин	I	Гидрофобность
Лейцин	L	Гидрофобность
Валин	V	Гидрофобность
Фенилаланин	F	Ароматическая боковая цепь
Метионин	M	Серная группа
Цистеин	C	Серная группа
Аланин	A	Гидрофобность
Глицин	G	Гидрофобность
Пролин	P	Вторичный амин
Треонин	T	Алифатический гидроксил
Серин	S	Алифатический гидроксил

	Тирозин	T	Ароматическая боковая цепь
	Триптофан	W	Ароматическая боковая цепь
5	Глутамин	Q	Амидная группа
	Аспарагин	N	Амидная группа
	Гистидин	H	Основная боковая цепь
	Глутаминовая кислота	E	Кислая боковая цепь
10	Аспарагиновая кислота	D	Кислая боковая цепь
	Лизин	K	Основная боковая цепь
15	Аргинин	R	Основная боковая цепь

[0045] «Идентичность последовательности» в данном описании означает степень, до которой два нуклеотида или аминокислотные последовательности являются инвариантными. Идентичность аминокислотной последовательности в процентах по отношению к предпочтительному полипептиду изобретения определяли здесь как процент аминокислотных остатков в предполагаемой последовательности, которые являются идентичными с остатками в последовательности гиалуронидазы после выравнивания обеих последовательностей и внедрения разрывов в случае необходимости для достижения максимальной идентичности последовательности в процентах и без учета любых консервативных замен в виде части идентичности последовательности. Согласно изобретению вариантная гиалуронидаза может иметь идентичность аминокислотной последовательности в процентах, по меньшей мере, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97% или 99% по отношению к SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2, как определено согласно схеме выравнивания.

[0046] «Выравнивание последовательности» означает процесс выравнивания двух или больше последовательностей для достижения максимальных уровней идентичности (и, в случае аминокислотных последовательностей, сохранение) для оценки степени подобия. Многочисленные способы выравнивания последовательностей и оценки подобия/идентичности известны в данной области техники, например, кластерный метод, где подобие основано на алгоритме MEGALIGN, а также BLASTN, BLASTP и FASTA. При использовании всех этих программ предпочтительными настройками являются настройки «по умолчанию» или, в качестве альтернативы, те настройки, которые дают самое высокое подобие последовательности.

[0047] «Ферментная активность» или «активность» фермента является критерием его способности катализировать реакцию, то есть «функционировать», и могут быть выражены в виде скорости образования продукта реакции. Например, ферментная активность может быть представлена в виде количества продукта, произведенного за единицу времени или на единицу фермента (например, концентрация или вес) на основе подобия или констант диссоциаций.

Предпочтительные единицы активности для выражения активности включают каталитическую константу ($k_{cat} = v_{max}/E$; v_{max} - максимальная интенсивность круговорота; E - концентрация фермента); константа Михаэлиса-Ментена (K_m); и k_{cat}/K_m . Такие единицы могут быть

[0048] «Удельная активность» для фермента, такого как гиалуронидаза или препарат гиалуронидазы, может быть измерена в Международных единицах (МЕ) на грамм или моль фермента или ферментного препарата. Одну единицу гиалуронидазы определяли как количество, которое в течение 1 мин. в 0,3% растворе субстрата в отношении веса к объёму (гиалуронат калия или гиалуроновая кислота) при температуре 37°C и значении pH 6.5 будет продуцировать олигосахариды в количестве, эквивалентном 1 ммоль N-ацетил-D-глюкозамина (NAGA). Термин «лучшая», «повышенная», «улучшенная» или «превосходная» активность или тому подобное означает активность по сравнению с гиалуронидазой используемой ранее в данной области техники, такой как ронидаза (и определенной при тех же самых условиях), степень которой является выше, по меньшей мере, приблизительно на 10%, предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно на 25%, более предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно на 50%, более предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно на 75%, более предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно на 100 %.

[0049] Термин «иммунологическая активность» определяет способность рекомбинантной или синтетической гиалуронидазы «дикого» типа или любого ее варианта вызывать иммунную реакцию, специфическую для гиалуронидазы у соответствующих животных или в клетках, и связываться с антителами, которые связываются с ферментом.

[0050] «Стабильность» или «устойчивость» фермента означают его способность функционировать в течение долгого времени в специфической среде или при определенных условиях. Один способ оценить стабильность или устойчивость состоит в том, чтобы оценить ее способность противостоять потери активности в течение долгого времени при заданных условиях. Ферментная стабильность может также быть оценена другими способами, например, посредством определения относительной степени, до которой фермент находится в сложенном или развернутом состоянии. Таким образом, один фермент повысил стабильность или устойчивость по отношению к другому ферменту, когда он является более устойчивым, чем другой фермент к потере активности при тех же самых условиях, более устойчивым к разворачиванию или является более долговечным согласно любым соответствующим критериям. Например, более «термоустойчивый» фермент – это тот фермент, который является более устойчивым к потере структуры (разворачивание) или функции (ферментная активность) при воздействии возрастающих температур; и более «устойчивый по отношению к pH» фермент – это тот фермент, который является более устойчивым к потере структуры или активности, когда значение pH раствора увеличивается или уменьшается от оптимального значения pH.

[0051] «Промоторная последовательность» является регулирующей областью ДНК способной связывать РНК-полимеразу в клетке и инициировать транскрипцию нисходящей (3' направление) кодирующей последовательности. Для определения этого изобретения промоторная последовательность связывается в своих 3' конечных точках посредством участка инициирования транскрипции и удлиняется вверх (5' направление) для того, чтобы включить минимальное число основ или элементов, необходимых для инициирования транскрипции на уровнях, поддающихся обнаружению выше фона.

[0052] Полинуклеотиды являются «поддающиеся гибридизации» друг с другом, когда, по меньшей мере, одна нить одного полинуклеотида может соединить комплементарные нити ДНК с другим полинуклеотидом при определенных строгих условиях. Строгость гибридизации определяется, например, (а) температурой, при которой выполняется гибридизация и/или промывка, и (b) ионной силой и полярностью (например, формамид) гибридизации и промывочных растворов, а также другими параметрами. Гибридизация требует, чтобы эти два полинуклеотида содержали в основном комплементарные последовательности; в зависимости от строгости гибридизации, однако, могут допускаться рассогласования. Как правило, гибридизация двух последовательностей при высокой строгости (например, в водном растворе 0.5×SSC при температуре 65°C) требует, чтобы последовательности проявляли некоторую высокую степень комплементарности по всей последовательности. Условия промежуточной строгости (например, водный раствор 2×SSC при температуре 65°C) и низкая строгость (например, водный раствор 2×SSC при температуре 55°C) требуют соответственно менее полной комплементарности между гибридизирующими последовательностями. 1×SSC – 0.15 M NaCl, 0.015 M Na цитрат.

[0053] Термин «экспрессирующая система» означает клетку-хозяина и совместимый вектор при соответствующих условиях, например для экспрессии белка, кодируемого инородной ДНК, переносимой вектором и внедренной в клетку-хозяина. Общие экспрессирующие системы включают бактерии (например, *E. Coli*, *B. subtilis* и *Streptomyces*) или дрожжевые клетки-хозяева (например, *S. cerevisiae*) и плазмидные векторы, а также клетки-хозяева насекомых и бакуловирусные векторы. *Кишечная палочка (E. Coli)* и *стрептомицеты (Streptomyces)* являются предпочтительными клетками-хозяевами по изобретению.

[0054] Термины «вектор», «векторная конструкция» и «вектор экспрессии» означают среду, посредством которой последовательность ДНК или РНК (например, инородный ген) может быть введена в клетку-хозяина для трансформации хозяина и содействия экспрессии (например, транскрипция и трансляция) внедренной последовательности. Векторы обычно включают ДНК трансмиссивного агента, в который инородная ДНК, кодирующая белок, вставляется посредством технологии рестрикционного фермента. Общим типом вектора является «плазида», которая, как правило, представляет собой автономную молекулу

двухспиральной ДНК, которая может быстро принять дополнительную (инородную) ДНК и которая может быть быстро внедрена в соответствующую клетку-хозяина. Большое количество векторов, включая плазмиду и грибковые векторы, было описано для репликации и/или экспрессии у разнообразных эукариотических и прокариотических хозяев. Неограниченные примеры включают плазмиды pKK (Clontech, Mountain View, CA), плазмиды pUC, плазмиды pET (Novagen, Inc., Madison, WI), плазмиды pRSET или pREP (Invitrogen, San Diego, CA) или плазмиды pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) и множество соответствующих клеток-хозяев с использованием способов, раскрытых или упомянутых здесь или каким-либо другим образом известные специалистам в соответствующей области техники.

[0055] Термины «экспрессировать» и «экспрессия» означают разрешение или побуждение проявления информации в гене или последовательности ДНК, например, продуцирование белка посредством активации клеточных функций, связанных с транскрипцией и трансляцией соответствующего гена или последовательности ДНК. Последовательность ДНК экспрессируется в клетке или посредством клетки для формирования «продукта экспрессии», например, белка. Можно также сказать, что сам продукт экспрессии, например, конечный белок, «экспрессируется» посредством клетки. Полинуклеотид или полипептид экспрессируется рекомбинантно, например, когда он экспрессируется или продуцируется в инородной клетке-хозяине под контролем инородного или нативного промотора или в нативной клетке-хозяине под контролем инородного промотора.

[0056] «Выделение» или «очистка» полипептида или фермента относится к извлечению полипептида посредством удаления его из первоначальной среды (например, из его естественной среды, если это происходит естественно, или из клетки-хозяина, если он продуцируется рекомбинантными методами ДНК). Способы очистки полипептида хорошо известны в данной области техники, включая, но не ограничиваясь указанными, препаративный дисковый гель-электрофорез, изоэлектрическое фокусирование, высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), обратно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), гель-фильтрацию, ионный обмен и распределительную хроматографию, афинную хроматографию и противоточное распределение. Очищенный полинуклеотид или полипептид может содержать менее чем около 50%, предпочтительно менее чем около 75% и наиболее предпочтительно менее чем около 90% компонентов, с которыми он был первоначально ассоциирован.

Гиалуронидаза

[0057] Гиалуронидаза согласно изобретению характеризуется специфическими аминокислотными последовательностями и физико-химическими свойствами. Например, предпочтительная гиалуронидаза имеет, по меньшей мере, одно, предпочтительно, по меньшей мере, два, более предпочтительно, по меньшей мере, три и еще более предпочтительно все

нижеследующие свойства: оптимальную активность в диапазоне значений pH приблизительно от 6.5 до 7.0; оптимальную активность при температуре в диапазоне приблизительно от 50°C до 60°C; изоэлектрическое значение pH приблизительно 4.4; молекулярный вес приблизительно 44±1 кД. Кроме того, препарат гиалуронидазы предпочтительно имеет, по меньшей мере, одну, предпочтительно, по меньшей мере, две, более предпочтительно, по меньшей мере, три и еще более предпочтительно, по меньшей мере, четыре ниже следующие характеристики: очень низкую или отсутствующую активность по отношению к хондроитинсульфату А, В и С и гепарину; K_m для гиалуроната калия приблизительно 1,1 мг/мл; V_{max} для гиалуроната калия приблизительно 0,022 микромоль N-ацетил-D-глюкозамина/мин; растворимость в физиологическом растворе около 1 г на приблизительно 10 - 30 мл; и удельную активность, по меньшей мере, приблизительно 20 МЕ/г, более предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно 200 МЕ/г и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно в 2000 МЕ/г.

[0058] Предпочтительные гиалуронидазы могут также иметь С-концевую последовательность, включающую SEQ ID NO:1, и/или содержать последовательность SEQ ID NO:2. Первый аминокислотный остаток SEQ ID NO:2 может представлять собой либо аспарагиновую кислоту, либо глицин. В еще одном примере осуществления гиалуронидаза включает полную последовательность гиалуронидазы *S. actinocidus* или ее вариант, имеющий, по меньшей мере, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности. Предпочтительными являются варианты, которые представляют собой функционально-консервативные варианты, и в которых аминокислотный остаток в белке «дикого» типа замещается аминокислотой, имеющей подобные физико-химические свойства.

Продуцирование фермента

[0059] Гиалуронидаза согласно изобретению представляет собой фермент, обладающий одной или более физико-химическими, структурными, функциональными или иммунологическими характеристиками гиалуронидазы, и может быть выделен из любого вида организмов, экспрессирующих белок, включая бактерии (стрептомицеты (*Streptomyces*), стрептококки (*Streptococcus*) и т.д. или бактериальные клетки-хозяева, типа кишечной палочки (*E. Coli*) и млекопитающих, в том числе коров, овец, свиней, мышей, лошадей и человека, и из любого источника: природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного. В качестве альтернативы гиалуронидаза может быть синтезирована традиционными методами синтеза пептидов или белков.

[0060] Из *Streptomyces actinocidus* фермент согласно изобретению может быть получен посредством культивирования клеток в условиях, пригодных для экспрессии и/или секреции гиалуронидазы, с получением фермента и очищением ферментного препарата с помощью, например, одного или более способов очистки, описанных на ФИГ. 1. Например, *Streptomyces*

actinocidus можно культивировать посредством так называемого «детально проработанного метода», в котором мицелий разделяют, а фермент очищают хроматографией в кислой гидролитической карбоксильной катионной колонке KM2p (например, Biocarb-K) и изменяется первоначальный цвет с помощью активированного угля. Этот способ может быть реализован следующим образом: Первоначальное выращивание *Streptomyces actinocidus* осуществляют на твердых питательных средах, питательной среде Чапека с глюкозой или питательной среде Гаузе, в течение 9 дней при температуре приблизительно 28-30°C. Колонии перемещают в круглодонные стеклянные колбы со стерильными жидкими средами, содержащими приблизительно 1% крахмала, 0,5% пептона, 0,5% мясопептонного бульона, 0,1% фосфата калия; 0,8% сульфата аммония при pH 7.0-7.2. Питательную среду аэрируют и перемешивали в течение приблизительно 48 часов. Клетки выращивают далее в ферментерах в стерильных питательных средах, содержащих приблизительно 2,5% ферментолита или гидролизата или аутолизата микроорганизменной биомассы (например, дрожжи), 0,8% сульфата аммония; 0,1% фосфата калия, pH 7.0-7.2. Питательные среды перемешивали и аэрируют при температуре приблизительно 28-30°C в течение приблизительно 58-60 часов, а затем отделяют от продуцента с помощью пресс-фильтрации или проточного центрифугирования. Дальнейшая очистка может быть выполнена согласно любому из способов, сформулированных на ФИГ. 1.

[0061] В качестве альтернативы ген для гиалуронидазы может быть идентифицирован и упорядочен согласно способам, известным в данной области техники, с созданием вектора экспрессии и продуцированием фермента рекомбинантным способом в выбранной клетке-хозяине. Например, можно использовать олигонуклеотидные зонды соответствующие или комплементарные нуклеотидной последовательности кодирующей, по меньшей мере, 3, предпочтительно, по меньшей мере, 5 и более предпочтительно, по меньшей мере, 10 последовательных аминокислот SEQ ID NOS: 1, 2 или 4 для идентификации геномной ДНК или мРНК для гиалуронидазы. Затем можно создать векторы экспрессии посредством включения нуклеотидной последовательности кодирующей фермент или его вариант в любой соответствующий вектор, известный в данной области техники для экспрессии, например, в кишечную палочку (*E. Coli*) или стрептомицеты (*Streptomyces*).

[0062] На основе информации о нуклеотидной последовательности, раскрытой в настоящем изобретении, любой специалист в данной области техники может идентифицировать и получить нуклеотидные последовательности, которые кодируют гиалуронидазы по изобретению из различных источников посредством разнообразных способов, хорошо известных специалисту в данной области, как это описано, например, в Sambrook *et al.*, *supra*.

[0063] Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая вариант гиалуронидазы, может быть получена любым способом мутагенеза, выполненного на последовательности «дикого» типа. Такие способы включают анализы полимеразной цепной реакции (PCR), в том числе

5 полимеразную цепную реакцию пониженной точности и дегенеративную полимеразную
цепную реакцию, применение мутагенных штаммов, таких как XL1-красный штамм-мутатор
кишечной палочки (*E. Coli*) (Stratagene Inc), использование методов неспецифического
10 мутагенеза, включающих мутагенные химические вещества, такие как метил-этил сульфонат
(EMS) или включающих облучение ультрафиолетом или другими облучениями более высокой
или низкой энергии, комбинаторный каскадный мутагенез (Delagrave, et al., Bio/Technology
1993;10:1548-52), сайт-направленный мутагенез, мутагенез посредством полимеразной цепной
15 реакции (PCR), включающий инкорпорацию одного или более праймеров, кодирующих
мутации, мутагенез посредством перестановки в ДНК (например, Stemmer, Nature
1994;370:389, и другие тесно связанные методы) и мутагенез посредством любого метода
полимеразной цепной реакции (PCR).

[0064] Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая любую из описанных выше
нуклеотидных последовательностей гиалуронидазы, может альтернативно быть синтезирована
при помощи полимеразной цепной реакции (PCR) с получением олигонуклеотидных
20 праймеров полимеразной цепной реакции из представленных здесь нуклеотидных
последовательностей. См. патенты США №№ 4,683,195 и 4,683,202, принадлежащие Муллису.
Полимеразная цепная реакция (PCR) обеспечивает способ селективного увеличения
концентрации определенной последовательности нуклеиновой кислоты, даже когда эта
25 последовательность не была предварительно очищена и присутствует только в единственном
экземпляре в определенном образце. Этот способ можно использовать для усиления одно- или
двухспиральной ДНК. Сущность способа заключается в использовании двух
олигонуклеотидных зондов в качестве праймеров для матрично-зависимой, полимеразной
30 опосредованной репликация желаемой молекулы нуклеиновой кислоты. Широкое
разнообразие альтернативных методик клонирования и амплификации *in vitro* хорошо
известны специалистам в данной области техники. Примеры этих методик можно найти,
35 например, в Berger et al., Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology 152
Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (Berger).

[0065] Другой аспект настоящего изобретения направлен на векторы или
рекомбинантные векторы экспрессии, включая любую из молекул нуклеиновой кислоты,
40 описанных выше. Векторы используют в настоящем описании либо для амплификации ДНК
или РНК, кодирующей гиалуронидазу и/или для экспрессии ДНК, которая кодирует
гиалуронидазу. Типичные векторы включают, но не ограничиваются указанными, плазмиды,
бактериофаги, космиды, эписомы, вирусные частицы или вирусы, а также интегрируемые
45 фрагменты ДНК (то есть фрагменты, интегрируемые в геном хозяина посредством
гомологичной рекомбинации). Предпочтительные вирусные частицы включают, но не
ограничиваются указанными, аденовирусы, бакуловирусы, парвовирусы, вирусы герпеса,
50 поксвирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы леса Семлики, вирусы коровьей оспы и

ретровирусы. В векторах экспрессии последовательность ДНК, кодирующая гиалуронидазу, является функционально связанной или соединенной с соответствующими управляющими последовательностями, способными к оказанию влияния на экспрессию гиалуронидазы в соответствующем хозяине. Области ДНК являются функционально связанными или соединенными, если они функционально зависят друг от друга. Например, промотор является функционально связанным или соединенным с последовательностью кодирования, если он управляет транскрипцией последовательности. Векторы амплификации не требуют областей регулирования экспрессии, а скорее нуждаются только в способности мультиплицировать в хозяине, обычно наделяемой точкой начала репликации, и гене отбора для облегчения распознавания трансформантов. Потребность в управляющих последовательностях в векторе экспрессии варьируется в зависимости от выбранного хозяина и выбранного способа трансформации. Как правило, управляющие последовательности включают промотор транскрипции, произвольную операторную последовательность для управления транскрипцией, последовательность, кодирующую соответствующую рибосомную связь мРНК, и последовательности, которые управляют завершением транскрипции и трансляции. Типичные векторы экспрессии включают, но не ограничиваются указанными, pDNA3 (Invitrogen) и pSVL (Pharmacia Biotech). Другие векторы экспрессии включают, но не ограничиваются указанными, векторы pSPORT, векторы pGEM (Promega), векторы pPROEX (LTI, Bethesda, Md.), векторы Bluescript (Stratagene), векторы pQE (Qiagen), pSE420 (Invitrogen) и pYES2 (Invitrogen).

[0066] Векторы могут содержать промотор, который распознается организмом хозяина. Промоторные последовательности настоящего изобретения могут быть прокариотическими, эукариотическими или вирусными. Примеры соответствующих прокариотических последовательностей включают промоторы P_R и P_L лямбды бактериофага (The bacteriophage Lambda, Hershey, A. D., Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1973), документ полностью включен в настоящее описание посредством ссылки; Lambda II, Hendrix, R. W., Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1980), документ полностью включен в настоящее описание посредством ссылки); промоторы *trp*, *gcsA*, промотор теплового шока и *lacZ* кишечной палочки (*E. Coli*) и ранний промотор SV40 (Benoist, et al. Nature, 1981;290:304-310, документ полностью включен в настоящее описание посредством ссылки). Дополнительные промоторы включают, но не ограничиваются указанными, фактор рака молочных желез мышей, длинный концевой повтор вируса иммунодефицита человека, вирус Мэлоуни, непосредственный ранний промотор вируса цитомегалии, вирус Эпштейна-Барра, вирус саркомы Рауса, актин человека, миозин человека, гемоглобин человека, мышечный креатин человека и металлотионеин человека. В предпочтительные векторы могут быть также включены дополнительные регулирующие последовательности. Предпочтительные примеры соответствующих регулирующих

последовательностей представлены последовательностью Шайна-Дальгарно гена репликазы бактериофага MS-2 и гена сII лямбды бактериофага. Последовательность Шайна-Дальгарно может непосредственно сопровождаться ДНК, кодирующей гиалуронидазу, и приводить к экспрессии зрелого белка гиалуронидазы. Соответствующие векторы экспрессии могут также включать соответствующий маркер, который позволяет отсортировать трансформированные клетки-хозяева. Трансформацию выбранного хозяина выполняют с использованием любой из различных методик, известных эксперту в данной области техники и описанных в Sambrook et al., *supra*.

[0067] Точка начала репликации может быть также обеспечена созданием вектора для включения экзогенной точки начала или механизмом хромосомной репликации клетки-хозяина. Если вектор интегрирован в хромосому клетки-хозяина, последнее может быть достаточным. В качестве альтернативы вместо того, чтобы использовать векторы, которые содержат вирусные точки начала репликации, любой специалист в данной области техники может трансформировать клетки млекопитающих способом сотрансформации с селективируемым маркером и ДНК гиалуронидазы. Примером подходящего маркера является дигидрофолатредуктаза (DHFR) или тимидинкиназа (см. патент США № 4,399,216).

[0068] Нуклеотидные последовательности, кодирующие гиалуронидазу, можно рекомбинировать с векторной ДНК в соответствии с традиционными методиками, включая тупые или смещенные точки окончания для сшивания, расщепление рестрикционного фермента для предоставления соответствующей точки окончания, признание «липких» концов как соответствующих, обработку щелочной фосфатазой во избежание нежелательного соединения и сшивание с помощью соответствующих лигаз. Методики такого манипулирования раскрыты в Sambrook et al., *supra* и хорошо известны в данной области техники. Способы создания векторов экспрессии млекопитающих раскрыты, например, в Okayama et al., *Mol. Cell. Biol.* 1983;3:280, Cosman et al., *Mol. Immunol.* 1986;23:935; Cosman et al., *Nature* 1984;312:768, EP-A-0367566, и WO 91/18982, каждая из которых полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки.

[0069] В другом примере осуществления настоящего изобретения предложены трансформированные клетки-хозяева, имеющие вектор экспрессии, включая любую из молекул нуклеиновой кислоты, описанных выше. Экспрессия нуклеотидной последовательности происходит, когда вектор экспрессии внедряют в соответствующую клетку-хозяина. Соответствующие клетки-хозяева для экспрессии полипептидов изобретения включают, но не ограничиваются указанными, прокариоты, дрожжи и эукариоты. Если используют прокариотический вектор экспрессии, то соответствующая клетка-хозяин будет представлять собой любую прокариотическую клетку, способную к экспрессированию клонированных последовательностей. Соответствующие прокариотические клетки включают, но не ограничиваются указанными, бактерии рода *Escherichia*, *Bacillus*, *Salmonella*,

Pseudomonas, *Streptomyces* и *Staphylococcus*. Если используют эукариотический вектор экспрессии, то соответствующая клетка-хозяин будет представлять собой любую эукариотическую клетку, способную к экспрессированию клонированной последовательности.

5 Типичные эукариотические клетки включают, но не ограничиваются указанными, клетки культуры тканей млекопитающих кроме человека и клетки культуры тканей человека, например, клетки насекомых, клетки HeLa, клетки яичника китайского хомячка (клетки CHO),

10 клетки почки африканской зеленой мартышки (клетки COS), клетки 293 человека и мышинные фибробласты 3Т3. Распространение таких клеток в культуре клеток стало обычной процедурой (см. Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Patterson, eds. (1973), документ полностью включен в настоящее описание посредством ссылки). Кроме того, дрожжевую клетку можно

15 применять в качестве клетки-хозяина. Предпочтительные дрожжевые клетки включают, но не ограничиваются указанными, род *Saccharomyces*, *Pichia* и *Kluyveromyces*. Предпочтительными дрожжевыми клетками-хозяевами являются *S. cerevisiae* и *P. pastoris*. Предпочтительные дрожжевые векторы могут содержать точку начала репликационной последовательности из дрожжевого плаزمиды 2Т, автономно реплицирующую последовательность (ARS), область промотора, последовательности для полиаденилирования, последовательности для завершения

20 транскрипции и ген селективируемого маркера. «Челночные» векторы репликации в дрожжах и кишечной палочке (*E. Coli*) также включены в настоящую заявку. В качестве альтернативы клетки насекомых можно применять в качестве клеток-хозяев. В предпочтительном примере осуществления полипептиды изобретения экспрессируют с использованием бакуловирусной системы экспрессии (см. Luckow et al., Bio/Technology, 1988, 6, 47, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, O'Rielly et al. (Eds.), W. H. Freeman and Company, New York, 1992,

25 и патент США № 4,879,236, каждый из которых полностью включен в настоящее описание посредством ссылки). Кроме того, полную бакуловирусную систему экспрессии МАХВАС.ТМ. (Invitrogen) можно, например, применять для продуцирования в клетках насекомых.

30

35

[0070] После рекомбинантного продуцирования гиалуронидазы или ее варианта можно применять способы очистки подобные описанным на **ФИГ. 1** для извлечения большей частью чистого ферментного препарата. Затем препараты гиалуронидазы согласно

40 изобретению можно проверить на наличие различных свойств, применяя способы, описанные в настоящей заявке. Например, физико-химические свойства (оптимальное значение рН и температуры, рН-устойчивость и термоустойчивость, толерантность к соли и реагентам, растворимость), а также анализы специфичности и активности гиалуронидазы представлены в

45 Примерах 1-3 и 6. Фармакокинетические параметры и воздействие в условиях *in vivo* могут быть исследованы, как описано в Примерах 4 и 5. Исследования токсичности и эффективности описаны в Примере 7, а иммунологические параметры – в Примерах 8 и 9.

50

Антитела

[0071] В изобретении также предложены антитела специфические к гиалуронидазам по изобретению, включая антитела специфические для одной или более последовательностей SEQ ID NOS:1-2, 4. Такие антитела включают, но не ограничиваются указанными, поликлональные, моноклональные, химерные, однонитевые, Fab-фрагменты и Fab-экспрессионную библиотеку.

[0072] Термин «специфический для», используемый при описании антител настоящего изобретения, указывает на то, что переменные области антител изобретения распознают и связывают исключительно полипептиды гиалуронидазы согласно изобретению (то есть способны отличать такие полипептиды от других известных гиалуронидаз или белков на основании измеряемых различий в связывающей способности, несмотря на возможное существование локализованной идентичности последовательности, гомологии или подобия между гиалуронидазами по изобретению и другим белком). Будет считаться, что специфические антитела могут также взаимодействовать с другими белками (например, белком А золотистого стафилококка (*S. aureus*) или другими антителами в методиках ELISA) через взаимодействия с последовательностями вне переменной области антител и, в частности, в константной области молекулы. Скрининговые исследования для определения связывающей специфичности антитела согласно изобретению хорошо известны и широко применяются в данной области техники. В отношении всестороннего рассмотрения таких исследований см. Harlow *et al.* (Eds.), *Antibodies A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, N.Y. (1988), Chapter 6. Антитела, которые распознают и связывают фрагменты полипептидов гиалуронидазы согласно изобретению, также принимают во внимание при условии, что эти антитела являются специфическими для полипептидов гиалуронидазы, предложенных в настоящем изобретении. Антитела по изобретению можно продуцировать применяя любой способ, хорошо известный и обычно практикуемый в данной области техники.

[0073] Различные методики, известные в данной области техники, можно применять для продуцирования поликлональных антител для полипептидов гиалуронидазы. Для продуцирования антитела можно иммунизировать различные животные-хозяева посредством инъекции антигенным полипептидом, включая, но не ограничиваясь указанными, кроликов, мышей, крыс, овец, коз и т.д.

[0074] Для приготовления моноклональных антител, предназначенных для полипептидов гиалуронидазы, можно применять любую методику, которая предусматривает продуцирование молекул антитела стабильными клеточными линиями в культуре. Они включают, но не ограничиваются указанными, гибридомную методику, первоначально разработанную Колером и Мильштейном (*Nature* 1975;256:495-497), а также триомную

методику, гибридную методику с В-клеткой человека (Kozbor et al., Immunology Today 1983;4:72; Cote et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1983;80:2026-2030) и EBV-гибридную методику для продуцирования моноклональных антител человека (Cole et al., in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96, 1985). В дополнительном примере осуществления изобретения моноклональные антитела можно продуцировать в стерильных животных (Публикация международного патента № WO 89/12690).

[0075] Согласно изобретению методики, описанные для продуцирования одноцепочечных антител (Патенты США №№ 5,476,786 и 5,132,405 to Huston; Патент США № 4,946,778), могут быть адаптированы для продуцирования одноцепочечных антител специфических для полипептидов гиалуронидазы. Действительно, эти гены могут быть предоставлены для экспрессии *in vivo*. Дополнительный пример осуществления изобретения использует методики, описанные для создания Fab-экспрессионных библиотек (Huse et al., Science 1989;246:1275-1281) с целью обеспечения быстрой и простой идентификации моноклональных Fab-фрагментов с желаемой специфичностью для полипептида гиалуронидазы, его производных или аналогов, описанных в настоящей заявке. Фрагменты антитела, которые содержат генотип молекулы антитела, могут быть созданы посредством известных методик. Например, такие фрагменты включают, но не ограничиваются указанными: фрагмент F(ab')₂, который можно продуцировать пепсинным расщеплением молекулы антитела; Fab-фрагменты, которые можно продуцировать сокращением дисульфидных связей фрагмента F(ab')₂, и Fab-фрагменты, которые можно продуцировать обработкой молекулы антитела папаином и восстановителем.

[0076] При продуцировании антител отбор желаемого антитела можно осуществлять посредством методик, известных в данной области техники, например, посредством радиоиммуноанализа, ELISA (фермент связанный иммуносорбентный способ исследования), «многослойных» иммунологических анализов, радиоиммунных анализов, гель-диффузионных реакций преципитации, иммунодиффузионных анализов, прямых иммунологических анализов (например, с использованием коллоидного золота, фермента или радиоизотопных меток), вестерн-блоттингов, реакций преципитации, агглютинационных анализов (например, реакции гель-агглютинации, реакции гемагглютинации), реакций связывания комплемента, иммунофлуоресцентных анализов, анализов протеина А и иммуноэлектрофорезных анализов и т.д. В одном примере осуществления связь антитела определяли обнаружением метки на первом антителе. В другом примере осуществления первое антитело определяли обнаружением связи второго антитела или реагента с первым антителом. В другом примере осуществления отмечают второе антитело. В данной области техники известно множество способов обнаружения связи в иммунологическом анализе, которые применяются в рамках настоящего изобретения.

Лекарственные средства

[0077] В одном примере осуществления гиалуронидазу применяют для усиления всасывания или доставки лекарственного средства, включая, но не ограничиваясь указанными, трансдермальную доставку. Типичные лекарственные средства включают кортикостероиды, такие как гидрокортизон, преднизолон, беклометазон пропионат, флюметазон, триамцинолон, триамцинолон ацетонид, флуоцинолон, флуоцинолин ацетонид, флуоцинолон ацетонид ацетат, клобетазол пропионат и т.д.; анальгетирующие средства и/или противовоспалительные агенты, такие как ацетоаминофен, мефенамовая кислота, флуфенамовая кислота, диклофенак, диклофенак-натрий-алклофенак, оксифенбутазон, фенилбутазон, ибупрофен, флурбипрофен, салициловая кислота, 1-ментол, камфора, сулиндак-толметин-натрий, напроксен, фенбуфен и т.д.; гипотензивные агенты, такие как пиндолол, иденолол, нифедипин, лофексидин, нипрадинол, букумолол и т.д.; антибиотики, такие как пенициллин, тетрациклин, окситетрациклин, фрадиомицин сульфат, эритромицин, хлорамфеникол и т.д., анестезирующие агенты, такие как лидокаин, бензокаин, этиламинобензоат и т.д.; антимикробиологические средства, такие как бензалкониум хлорид, нитрофуразон, нистатин, ацетосульфамин, клотримазол и т.д.; противогрибковые агенты, такие как гентамицин, амфотерицин В, пирролнитрин, клотримазол и т.д.; витамины, такие как витамин А, эргокальциферол, холекальциферол, октотиамин, рибофлавин бутират и т.д.; противораковые агенты, такие как 5-фтороурацил, метотрексат и т.д., противогистаминные агенты, такие как дифенил-гидромин-гидрохлорид, хлорфенирамин, дифенилимидазол и т.д.; пептидные гормоны, такие как инсулин, глюкагон и пептид подобного глюкагону 1 или 2 и другие агенты.

[0078] Одним типичным лекарственным средством является гидрокортизон (кортизол; оксикортикостерон), кортикостероид, обычно применяемый во врачебной практике в качестве противовоспалительного и десенсибилизирующего агента. Его действие основано на подавлении синтеза белка в плазматических клетках и продуцировании гистамина в мастоцитах, что снижает продуцирование антител, капиллярную проницаемость и следовательно подавляет развитие грануляции и формирование рубца.

Косметические средства

[0079] В одном примере осуществления гиалуронидазу применяют для улучшения доставки лекарственного средства, включая, но не ограничиваясь указанными, трансдермальную доставку косметического средства. Типичные косметические средства включают календулу, хну, серу, успокаивающие кожу агенты и увлажняющие агенты.

Лекарственные составы

5 [0080] В настоящем изобретении предложены фармацевтическим или косметическим композициям, которые могут содержать только гиалуронидазу или гиалуронидазу в комбинации со стабилизатором, эксципиентом, носителем, разбавителем или вспомогательным средством, которое может применяться в любом биологически совместимом фармацевтическом носителе, включая, но не ограничиваясь указанными, физиологический раствор, буферный физиологический раствор, глюкозу и воду. Любой из этих составов пациент 10 может применять отдельно или в комбинации с другими лекарственными средствами или косметическими агентами. В определенных фармацевтических композициях фермент смешивают с эксципиентом (наполнителями) или фармацевтически приемлемыми носителями в стерильном лекарственном составе. В одном примере осуществления настоящего изобретения фармацевтически приемлемый носитель является фармацевтически инертным.

20 [0081] Как правило, перед созданием лекарственного состава препарат гиалуронидазы представляет собой аморфную порошковую или пенную гранулу, которая имеет светло-кремовый или легко-бежевый цвет и имеет специфический запах. Препарат можно хранить в сухом, защищенном от света месте при температуре 0–10°C в течение приблизительно 1,5 лет, предпочтительно вместе со стабилизатором. Можно использовать любой пригодный стабилизатор, такой как спирты и углеводы, которые широко используются в качестве стабилизаторов-наполнителей для ферментных препаратов. Например, лактоза, маннит и поливинилпирролидон (MW 12600) были протестированы в качестве стабилизаторов для гиалуронидазы. Поливинилпирролидон затруднял определение количества белка и удельной 25 активности. Через 1 год в препарате с лактозой приблизительно 25-30% фермента были неактивными. Из этих стабилизаторов предпочтительным является маннит (0,09-0,11 г/300 МЕ). Свежий приготовленный раствор гиалуронидазы можно хранить в холодильнике в течение 24 часов. В медицинской практике он может быть приготовлен в форме прозрачного раствора или в виде компонента мази или крема совместно с одним или более топическими носителями. Можно приготовить различные типы аппликаторов, например, бандажи, компрессы, прокладки или тампоны, добавив раствор гиалуронидазы или сухой порошок к 30 аппликатору. Ниже эти примеры осуществления описаны подробнее.

40 [0082] Препарат, пригодный для нанесения на кожу посредством аппликатора, может состоять из микробной гиалуронидазы и маннита (0,09-0,11 г на 300 МЕ фермента), упакованных в виде порошка в пенициллиновый или стерильный флакон. Раствор приготавливали, растворяя содержимое одного флакона в 5-10 мл (30-60 МЕ/мл) стерильного 45 изотонического раствора хлористого натрия или стерилизованной воды, с добавлением раствора на марлю, бандажи, тампоны и т.д. Если требуется, хотя не обязательно, маннит может быть включен в состав лекарственного средства.

50

[0083] Прием композиций из гиалуронидазы можно осуществлять перорально или парентерально, а также можно вводить посредством соответствующих средств доставки. Методы парентерального приема лекарственного средства включают топическое, 5 внутриартериальное, внутримышечное, подкожное, интрамедуллярное, интратекальное, интравентрикулярное, внутривенное, интраперитонеальное или интраназальное введение. В дополнение к активным ингредиентам фармацевтические композиции могут содержать соответствующие фармацевтически приемлемые носители, включающие инертные 10 наполнители и вспомогательные средства, которые облегчают введение активных соединений в препараты, которые могут использоваться фармацевтически. Далее можно найти подробную информацию относительно технологий приготовления и приема лекарственного средства в самой последней редакции «Фармацевтические науки Ремингтона» (Mack Publishing Co, Easton Pa.). 15

[0084] Фармацевтические композиции для перорального приема могут быть приготовлены с использованием фармацевтически приемлемых носителей, хорошо известных 20 в данной области техники в дозах, пригодных для перорального приема. Такие носители позволяют создавать фармацевтические композиции, как таблетки, пилюли, драже, капсулы, жидкости, гели, сиропы, суспензии, взвеси и т.п., для прием внутрь пациентом посредством проглатывания. Фармацевтические препараты для перорального приема могут быть получены 25 посредством комбинации активных соединений с твердым эксципиентом, произвольного измельчения окончательной смеси и производства смеси гранул после добавления соответствующих вспомогательных средств, если это требуется. Пригодными эксципиентами являются углеводы или белки, такие как сахар, включая лактозу, сахарозу, маннитол или сорбит; крахмал из кукурузы, пшеницы, риса, картофеля или других растений; целлюлоза, например, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза или натрий- 30 карбоксиметилцеллюлоза; и камедь, включая гуммиарабик и трагакант; и белки, такие как желатин и коллаген. Если требуется, могут быть добавлены разлагающие или солубилизирующие компоненты, такие как поперечно сшитый поливинилпирролидон, агар, альгиновая кислота или ее соль, например альгинат натрия. К лекарственным составам могут 35 быть добавлены красители или пигменты для идентификации продукта или определения количества активного соединения, то есть дозы. 40

[0085] Предпочтительными лекарственными составами для орального применения являются составы, пригодные для доставки гиалуронидазы в полость рта или пищевод. Такие 45 лекарственные составы известны в данной области техники и включают, например, микросферы, жидкости, гели, взвеси и суспензии. См., например, Bernkop-Schnurch and Walker, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 2001;18:459-501.

[0086] Фармацевтические лекарственные составы для парентерального введения 50 включают водные растворы активных соединений. Для инъекции фармацевтические

композиции изобретения могут быть приготовлены в водных растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферных растворах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера или забуференный физиологический раствор. Водные инъекционные суспензии могут
5 содержать вещества, которые увеличивают вязкость суспензии, такие как натрий-карбоксиметилцеллюлоза, сорбит или декстран. Дополнительно суспензии активных соединений могут быть приготовлены в виде масляных инъекционных суспензий. Соответствующие липофильные растворители или среды включают нелетучие масла, такие как
10 кунжутное масло или синтетические сложные эфиры жирных кислот, такие как этилолеат или триглицериды, или липосомы. [001] Дополнительно суспензия может также содержать соответствующие стабилизаторы или средства, которые увеличивают растворимость соединений для обеспечения возможности приготовления очень концентрированных
15 растворов.

[0087] Для местного применения можно использовать раствор, суспензию, гель, пасту, бальзам, крем или другую лекарственную состав гиалуронидазы с или без дополнительного
20 действующего агента. Приемлемые разбавители, вспомогательные средства и инертные наполнители для местного применения хорошо известны в фармацевтической и косметической области техники и описаны, например, в «Фармацевтические науки Ремингтона», Mack Mack Publishing Co., (A. R. Gennaro edit. 1985). Материалы являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях и включают буфера, такие как фосфат, цитрат, ацетат и
25 другие соли органических кислот, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, низкомолекулярные (мене чем приблизительно десять остатков) пептиды, такие как многоаргинин; протеины, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулин; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; природные или синтетические
30 масла, включая растительное масло; воск; глицерин; аминокислоты, такие как аминокусусная кислота, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота или аргинин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая целлюлозу или ее производные, глюкозу, лактозу, маннозу или декстрины, хелатообразующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная
35 кислота (EDTA), сахарные спирты, такие как маннитол или сорбит, соли, такие как хлорид натрия, и неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как Tween, Pluronic или полиэтиленгликоль. Другие пригодные инертные наполнители или носители описаны в ходе настоящего раскрытия изобретения. Предпочтительным инертным наполнителем является маннит (маннитол). Например, одним предпочтительным препаратом является лиофилизированный порошок гиалуронидазы, суспендированной или растворенной в 1 - 50
45 мМ гистидина, 0.1%-2% сахарозе, 2%-7% маннитоле при рН в диапазоне от 4.5 до 5.5, который может быть объединен с буфером нейтрального показателя рН до применения, если это требуется.

[0088] Лекарственные составы могут также включать дополнительный действующий агент кроме гиалуронидазы, то есть лекарственное средство или косметическое средство. Например, можно приготовить мази с гидрокортизоном, которые содержат приблизительно 10, 20 или 60 МЕ микробной гиалуронидазы. Типичные лекарственные составы с гидрокортизоном следующие (по весу): (1) 0,5% гидрокортизона; 1% гиалуронидазы; 50% полиэтиленоксида; 40% глицерина и 8,5% фосфатного буфера (6.5); (2) 0,5% гидрокортизона; 1% гиалуронидазы; 50% полиэтиленоксида; 47% глицерина и 8% вазелина: ланолин. Полиэтиленоксид можно использовать в различных количествах (например, 1500 или 400:4000 (1:1), можно также добавить натрий оксibuтират (2,5-5%) или тримекаин (1%).

[0089] Гиалуронидазу в комбинации с лекарственными средствами, такими гидрокортизон, антибиотики, витамины и/или гиалуронидаза, можно вводить в виде внутривенных, подкожных или внутримышечных инъекций; принимать перорально в форме гелей, суспензий или взвесей или местно в виде мазей, кремов, масок на лицо и косметических лосьонов; или трансдермально с использованием трансдермальной системы доставки. Типичные лекарственные составы для косметических областей применения описаны ниже, в то время как специфические лекарственные составы для усиленной доставки различных препаратов представлены в разделе, озаглавленном «Улучшенная доставка лекарственных препаратов».

СУХАЯ КОСМЕТИЧЕСКАЯ МАСКА С КАЛЕНДУЛОЙ И ЗВЕРОБОЕМ

Компонент	Количество (г/100 г, % в весовом отношении)
Гиалуронидаза	0.10 (200 МЕ)
Оксид магния	39.46-39.49
Белая или голубая глина	14.98
Тальк	10.25
Крахмал	13.9
Калиево-алюминиевые квасцы	1.27
Порошок цветков календулы	10.0
Порошок зверобоя	10.0
Ароматизатор (например, роза, лимон, персик)	0.02-0.05

СУХАЯ КОСМЕТИЧЕСКАЯ МАСКА С БЕСЦВЕТНОЙ ХНОЙ

5	Компонент	Количество (г/100 г, % в весовом отношении)
	Гиалуронидаза	0.10 (200 МЕ)
10	Оксид магния	39.46-39.49
	Глина (белая или голубая)	14.98
	Тальк	10.25
	Крахмал	13.9
15	Калиево-алюминиевые квасцы	1.27
	Хна (бесцветная)	20.0
	Ароматизатор (например, роза, лимон, персик)	0.02-0.05
20		

СУХАЯ КОСМЕТИЧЕСКАЯ МАСКА С СЕРОЙ

25	Компонент	Количество (г/100 г, % в весовом отношении)
	Гиалуронидаза	0.10 (200 МЕ)
	Оксид магния	46.6-46.7
30	Глина (белая или голубая)	17.75
	Тальк	12.15
	Крахмал	16.5
35	Калиево-алюминиевые квасцы	1.5
	Камфора	2.4
	Сера	2.8
40	Ароматизатор (например, роза, лимон, персик)	0.1-0.2
45		
50		

КОСМЕТИЧЕСКИЙ КРЕМ

	Компонент	Количество (г/100 г, % в весовом отношении)
5	Гиалуронидаза	0.1-0.3 (200-600 МЕ)
10	Косметическая стеариновая кислота	1.0-3.0
	Восковая эмульсия	1.0-3.0
	Растительное масло	3.0-10.0
15	Дистиллированный глицерин	3.0-8.0
	Моностеарат глицерина	1.5-5.0
	Триэтаноламин	0.1-0.3
	Каштановый экстракт	1.0-4.0
20	Экстракт крапивы	1.0-2.0
	Этилпарабен	0.1-0.3
	Пропилпарабен	0.02-1.0
25	Ароматизатор (например, лимон)	0.02-0.05
	Вода	До 100.0

КРЕМ/ГЕЛЬ ВОКРУГ ГЛАЗ

	Компонент	Количество (г/100 г, % в весовом отношении)
30	Гиалуронидаза	0.05-0.2
35	Эмульгин В-2	0.5-0.3
	Стеариновая кислота	0.5-5.0
40	Моностеарат глицерина	1.0-5.0
	Высокомолекулярный спирт	0.3-3.0
	Дезодорированное растительное масло	3.0-12.0
45	Цетиол глицерилкокоат	0.5-3.0
	Карбонол	0.2-1.0
	Дистиллированный глицерин	3.0-6.0
50	Этилпарабен	0.2-0.5

	Бевантолол	0.02-0.1
	Дрожжевой экстракт	0.3-1.0
5	Триэтаноламин	1.0-3.0
	Пищевой краситель (например, Ронсеуа Е 124)	0.001-0.005
	Ароматизатор	0.2-0.5
10	Вода	До 100.0

УВЛАЖНЯЮЩИЙ КРЕМ

	Компонент	Количество (г/100 г, % в весовом отношении)
	Косметическая стеариновая кислота	2.0
20	Эмульсионный воск	2.0
	Моностеарат глицерина	4.0
25	Дезодорированное растительное масло	7.0
	Дистиллированный глицерин	5.0
	Триэтаноламин	0.2
	Масло пшеничных зародышей	1.0
30	Экстракт из пшеничных зародышей	3.0
	Гиалуронидаза	0.2
	Этилпарабен	0.3
35	Пропилпарабен	0.1
	Ароматизатор «Фруктовый коктейль»	0.2
40	Вода	До 100.0

Масло пшеничных зародышей можно заменить маслом жожоба (1%)

Применение

45 [0090] Местное применение гиалуронидазы можно осуществлять посредством мазей, кремов, бандажей, марли, прокладок, трансдермальных пластырей, электрофореза и в виде интравагинальных тампонов. Количество применяемого лекарственного средства зависит от
50 типа поражения или повреждения кожи. При местном применении можно использовать

приблизительно 1 - 1000 МЕ, предпочтительно приблизительно 50 - 500 МЕ, более предпочтительно приблизительно 100 - 400 МЕ и наиболее предпочтительно в общей сложности 300 ± 60 МЕ. В качестве альтернативы при местном применении можно использовать поверхностную концентрацию, составляющую приблизительно 1-200 МЕ, приблизительно 10-100 или 20-60 МЕ гиалуронидазы/см². В случае необходимости и с учетом пользы для пациента доза может быть увеличена до 4-8 раз. Можно наблюдать слабую аллергенную активность препарата в повышенных дозах, но в общем гиалуронидаза имеет низкую аллергенную активность по сравнению с тестикулярными препаратами гиалуронидазы, такими как ронидаза, а также солзим и амилаза. Руководство относительно конкретных доз гиалуронидазы и способов доставки представлено в литературе (например, в Государственной фармакопее Российской Федерации, XI издание, Москва, Издательский дом «Медицина», тома 1-2, 1987-1989).

[0091] Для электрофорезных применений 300 МЕ гиалуронидазы можно растворить в 60 мл дистиллированной воды с 2-3 каплями 0.1 N соляной кислоты. Затем препарат подают анодным током на выбранный участок в течение 20-30 мин. Курс лечения может включать, например, 15-20 процедур. Электрофорезное применение можно также чередовать с компрессами или бандажом.

[0092] При применении гиалуронидазы посредством компрессов, марли или других кожных аппликаторов раствор гиалуронидазы можно наносить на соответствующий аппликатор, например, 5-6-слойную марлю. Марля должна закрывать пострадавший участок и сама быть накрыта вощеной бумагой и зафиксирована бандажом. Количество наносимого лекарственного средства зависит от участка повреждения и обычно составляет 20-60 МЕ/см², в среднем приблизительно 300 МЕ на компресс. Бандажи должны накладываться ежедневно в течение приблизительно 16-18 часов в течение приблизительно 15-60 дней. В течение длительного курса лечения рекомендуют прерывать терапию каждые две недели на 3-4 дня. Компрессы можно чередовать с электрофорезом, но приготовленный раствор необходимо использовать в течение 24 часов. Для применения посредством бандажа содержимое флакона растворяли в 5-10 мл стерильного физиологического раствора или дистиллированной воды. Стерильную 4-5-слойную марлю смачивают раствором, а марлю накладывают на поврежденный участок, накрывают вощеной бумагой и фиксируют мягким бандажом. Бандаж можно накладывать ежедневно на 15 - 18 часов в течение 15-60 дней с перерывом в течение 3-4 дней каждые 2 недели.

[0093] Для интравагинального применения содержимое одного флакона (300 ± 60 МЕ) можно растворить приблизительно в 5-10 мл стерильного физиологического раствора. Затем стерильный тампон можно смочить этим раствором и вводить во влагалище ежедневно на 5 - 6 часов в течение приблизительно 10-14 дней.

[0094] Для брюшного-поясничного-крестцового электрофореза содержимое флакона на 300 МЕ можно растворить в 30 - 60 мл дистиллированной воды и добавленных двух - трех каплях 0.1 N раствора соляной кислоты. Затем лекарственное средство можно подавать анодным током на поврежденную поверхность в течение 20 - 30 минут. Курс лечения может составлять 15 - 20 процедур. Электрофорез можно также осуществлять при помощи синусоидального модулированного тока (при частоте 100 Гц и модуляции 100%). Курс лечения электрофорезом может составлять около 15-20 процедур или согласно рекомендациям врача. Методы и устройства для трансдермального электропереноса хорошо известны в данной области техники, см., например, патенты США №№ 6,219,576; 6,181,963; 5,668,170; 5,464,170 и 5,203,768.

[0095] Различные трансдермальные системы доставки, основанные на трансдермальных пластырях, известны в данной области техники, и их можно использовать в соответствии с изобретением для доставки только гиалуронидазы или гиалуронидазы совместно с другим действующим агентом. Типичные трансдермальные системы доставки описаны, например, в патентах США №№ 5,120,546, 5,203,768, 6,230,051 и 6,231,886. Например, трансдермальные лекарственные формы, используемые в соответствии с изобретением, предпочтительно включают защитный слой, изготовленный из фармацевтически приемлемого материала, который является непроницаемым для любого активного вещества, содержащегося там. Защитный слой преимущественно служит в качестве защитного покрытия для действующего агента, а также может обеспечивать выполнение опорной функции. Примеры материалов, пригодных для изготовления защитного слоя, следующие: пленки из полиэтилена высокой и низкой плотности, полипропилена, поливинилхлорида, полиуретана, полиэфиров, таких как поли-(этилен-фталат), металлическая фольга, слоистые материалы из металлической фольги из таких пригодных полимерных пленок, текстильные ткани, если компоненты резервуара не могут проникать через ткань вследствие их физических свойств и т.п. Преимущественно материалы, используемые для слоя, представляют собой слоистые материалы из таких полимерных пленок с металлической фольгой, например, алюминиевой фольгой. Защитный слой может иметь любую соответствующую толщину, которая обеспечит выполнение требуемой защитной и опорной функции. Соответствующая толщина будет составлять приблизительно от 10 до 200 микрон. Требуемые материалы и толщина будут очевидными для квалифицированного специалиста.

[0096] В определенных предпочтительных примерах осуществления трансдермальные лекарственные формы, применяемые в соответствии с изобретением, содержат полимерный матричный слой. Обычно для формирования биологически приемлемой полимерной матрицы используются полимеры, которые способны сформовать тонкие стенки или покрытия, через которые фармацевтические препараты могут проходить с контролируемой скоростью. Неограниченный список образцовых материалов для вложения в полимерную матрицу

включает полиэтилен, полипропилен, сополимеры этилена/пропилена, сополимеры этилена/этилакрилата, сополимеры этиленвинилацетата, кремнийорганические материалы, резина, резиноподобные синтетические гомополимеры, сополимеры или блок-полимеры, полиакрилаты и их сополимеры, полиуритан, полиизобутилен, хлорированный полиэтилен, поливинилхлорид, сополимер винилхлорида-винилацетата, полимер полиметакрилата (гидрогель), поливинилиденхлорид, поли-(этилентерефталат), сополимер этилен-винилового спирта, сополимер этилена-винилоксиэтанола, кремнийорганические материалы, включая силиконовые сополимеры, такие как сополимеры полисилоксана-полиметакрилата, целлюлозные полимеры (например, этилцеллюлоза, и сложные эфиры целлюлозы), поликарбонаты, политетрафлюороэтилен и его смеси.

[0097] Предпочтительными материалами для вложения в полимерную матрицу являются силиконовые эластомеры общих полидиметилсилоксановых конструкций (например, силиконовые полимеры). Предпочтительные сшитые силиконовые полимеры являются фармацевтически приемлемыми. Другие предпочтительные материалы для вложения в полимерную матрицу включают: силиконовые полимеры, которые являются сшиваемыми сополимерами, имеющими элементы этана и/или диметилвинил силоксана, которые могут быть сшиты с помощью соответствующего перекисного катализатора. Также предпочтительными являются те полимеры, которые состоят из блок-сополимеров на основе стирола и 1,3-диенов (особенно линейные стирол-изопреновые блок-сополимеры стирол-бутадиеновых блок-сополимеров), полиизобутиленов, полимеров на основе акрилата и/или метакрилата.

[0098] Типичная трансдермальная система доставки или «пластыри» для доставки препаратов, таких как, например, стероиды, типа гидрокортизона, гормонов контроля рождаемости, эстрадиола, инсулина, включают полиэтиленовую пленку, акрилатную липкую матрицу, выбранное лекарственное средство, гиалуронидаз согласно изобретению, клей из акрилатного сополимера и соответствующие сложные эфиры жирной кислоты.

Терапевтические и косметические области применения

[0099] Как описано в настоящем документе, лечение препаратом гиалуронидазы согласно изобретению может быть полезным в терапии, хирургии, дерматологии, пластической хирургии и гинекологии для лечения рубцов и спаек различного происхождения, тугоподвижности суставов и контрактур. Лекарственное средство можно применять для лечения остеоартроза, хронического тендовагинита, контрактур Дюпюитрена, кожных симптомов склеродермии, гематомы мягких тканей, хронических воспалительных процессов и функциональных нарушений женской репродуктивной системы (влагалищная гипосекреция слизистой оболочки, недостаточность эластичности стенок влагалища и т.д.); а также гиалуронидазу можно назначать в предоперационные и послеоперационные периоды

различных типов (кожопластика, восстановительная пластическая хирургия, реконструктивная пластическая хирургия на женских репродуктивных органах и т.д.) для предотвращения образования рубцов. Гиалуронидазу также можно применять согласно предписанию врача в терапии, хирургии, дерматологии и гинекологии для лечения и профилактики рубцов, тугоподвижности суставов и контрактур, склеродермии и хронических воспалительных заболеваний женских репродуктивных органов и т.д. Кроме того, гиалуронидазу можно применять для усиления распределения и усвоения косметического средства.

[00100] Как описано в примерах и кратко изложено ниже, гиалуронидаза прошла множество клинических исследований для установления ее потенциала в отношении лечения кожи и других медицинских применений. Таким образом, в предпочтительных примерах осуществления фермент изобретения используют для облегчения распределения действующих агентов или косметических средств в коже или соединительной ткани; улучшения подвижности суставов; ослабления боли у пациентов, страдающих артритом; или предотвращения образования или появления рубцов.

Терапевтические и косметические области применения гиалуронидазы в чистом виде

[00101] Местное применение фермента изобретения уменьшает складки и рубцы различного происхождения. Например, гиалуронидаза предотвращает образование больших гипертрофических рубцов, уменьшает и размягчает существующие рубцы, полученные в результате травм и ожогов. В качестве компонента в пластической хирургии для уменьшения рубцов на лице фермент также демонстрирует существенно улучшенный результат терапии. Кроме того, фермент изобретения можно применять в качестве смягчающего кожу агента для косметических препаратов, а также в качестве косметического вспомогательного средства для профилактики рубцов; включая рубцы, обычно вызываемые угрями, травмой и ожогами, а также келоидные рубцы, и в качестве средства от морщин. Келоидные рубцы или «келоиды» представляют собой разрастание рубцовой ткани на участке травмирования кожи. Келоиды возникают вследствие таких повреждений кожи как хирургические надрезы, травматические раны, участки вакцинации, ожоги, ветрянка, угри или даже незначительные ссадины. Для уменьшения или лечения рубцов, морщин или огрубления кожи можно применять гиалуронидазу в виде компрессов и/или посредством электропереноса или соответствующих трансдермальных пластырей, кремов, мазей и т.д.

[00102] Для лечения атрофического или гипертрофического коллоидного рубца доставку препарата можно осуществлять посредством электрофореза. Курс лечения может включать пятнадцать процедур по двадцать минут каждая. Электрофорез предпочтительно применять каждый день. Оценка эффективности лечения может включать изменения клинических данных (инфильтрация, плотность, цвет, размер рубцов) и субъективных данных (болезненность под пальпацией, зуд, боль, чувство жжения). В таких исследованиях после

5 пятых процедур все пациенты, страдающие от коллоидных рубцов и имеющие зудящие, жгущие и болевые ощущения, сообщали об исчезновении субъективных ощущений. Объективная оценка включала то, что рубцы стали менее заметными в отношении своей
10 окраски, менее плотными, фактически безболезненными под пальпацией. После 10 процедур электрофореза рубцы бледнели, становились мягкими, сглаженными и безболезненными под пальпацией. После проведения курса лечения площадь коллоидных рубцов снизилась до 40% по сравнению с площадью перед лечением. Не наблюдали никакие побочные эффекты. Клиническая картина улучшалась аналогично у пациентов с гипертрофическими рубцами. Эффект был самым явным у пациентов с гипертрофическими рубцами на лице после угрей. У
15 пациентов с атрофическими рубцами, только немного выступающими над кожей лица, после 5-ой процедуры рубцы сгладились, становились мягкими и приняли одинаковый уровень с нормальной кожей.

[00103] Препараты гиалуронидазы также применяли на рубцах после ожогов в ходе подготовки к операции и в качестве консервативной терапии. Рубцы после ожогов
20 главным образом были расположены на верхних и нижних конечностях и образовались через 1-12 месяцев после заживления ожогов II-IIIА и IIIА-В. (Согласно стандартным классификациям ожогов кожи: I – покраснение кожи; II – волдыри; III – глубокие ожоги, волдыри отсутствуют; А – повреждение не распространяется за пределы кожи, В – повреждение нижележащей ткани; см., например, Merck manual. 2002 Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, USA.). После лечения рубцы размягчились, боль и зуд уменьшились, подвижность ткани увеличилась, что способствовало свободному перемещению ткани для
25 пластической хирургии. В течение консервативной терапии гипертрофических рубцов после ожогов исчез отек, боль уменьшилась, и рубцы побледнели. Более явное лечебно-оздоровительное действие наблюдали, когда компрессы чередовались с электрофорезом. Посттравматические рубцы были расположены на лице, шее, верхних и нижних конечностях и имели возраст от 1 до 2 лет. После применения препарата гиалуронидазы напряжение ткани и
30 боль уменьшились.

[00104] Кроме того, местное применение гиалуронидазы уменьшает дискомфорт от ревматического артрита, склеродермии и тендосиновита. Это может также
40 помочь уменьшить контрактуры Дюпюитрена (начальные стадии), контрактуры, тугоподвижность суставов после воспаления или травмы, сопровождаемой гематомой мягких тканей; и способствовать распространению цитотоксического лекарственного средства, поставляемого к опухоли, например, местное применение на меланомах, или посредством
45 внутриопухолевой инъекции в другие типы опухолей. Некоторые из положительных эффектов, испытываемых пациентами после лечения с местным применением гиалуронидазы согласно изобретению, приведены в Таблицах 1А и 1В ниже. В общей сложности были

50

исследованы 264 пациента, страдающих различными заболеваниями или состояниями, и 256 (95%) пациентов сообщили о положительных эффектах лечения.

5

ТАБЛИЦА 1А**Положительные эффекты от местного наружного применения гиалуронидазы**

<u>Заболевание/состояние</u>	<u>Количество пациентов</u>	<u>Положительный эффект (%)</u>
Хирургические	48	100
Рубцы		
Травматические	13	100
После ожогов	54	100
Неопределенные	50	100
Ревматический артрит и остеоартрит с ограничениями подвижности	25	93
Позвоночный остеохондроз	12	90
Контрактура Дюпюитрена	23	91
Тендовагинит	14	90
Склеродермия	25	92
Итого	264	97.9

25

ТАБЛИЦА 1В**Положительные эффекты от применения гиалуронидазы в гинекологической практике**

Гиалуронидазу вводили местно с помощью тампонов

30

<u>Заболевание/состояние</u>	<u>Количество пациентов</u>	<u>Положительный эффект (%)</u>
Хроническое воспаление, консервативное лечение	48	100
Профилактика образования рубцов в гинекологической хирургии	51	98
Лечение рубцов	8	100

35

40

45

50

[00105] Токсичность и частота возникновения побочных эффектов ферментного препарата изобретения являются низкими. Специфические тесты демонстрировали низкую токсичность и отсутствие аллергической, канцерогенной или тератогенной активности и почти полное отсутствие побочных эффектов. Можно наблюдать локальную аллергическую реакцию (покраснение кожи и зуд), но, как было продемонстрировано, все симптомы исчезали в течение 24 часов после прекращения лечения без дополнительной терапии. Несмотря на то, что в конечном счете существует зависимость от заболевания, состояния или применения, гиалуронидазу часто применяли наиболее благоприятно в ранние периоды заболевания или

состояния в качестве элемента терапии (физиотерапия, массаж, противовоспалительные и болеутоляющие препараты и т.д.)

5 [00106] Доставку препарата гиалуронидазы можно осуществлять посредством электрофореза в качестве элемента терапии ревматического артрита и хронического остеохондрита. В одном исследовании с использованием угла подвижности сустава в качестве параметра для оценки терапевтического эффекта перемещения увеличились на $17,2 \pm 1,5^\circ$ ($p < 0.05$) после терапии суставов, к которым применяли препарат. В контрольных суставах симметрично поврежденный сустав, где не применяли препарат, угол подвижности увеличился в среднем только на $7,1 \pm 0,5^\circ$ ($p < 0.05$).

10 [00107] Болеутоляющие свойства препарата определяли в группе пациентов, страдающих остеохондритом позвоночного столба и синдромом придаточного корня. Группа состояла из 12 пациентов, 5 человек и 7 женщин в возрасте 63 ± 11 лет. Продолжительность заболевания составляла от 2 до 10 лет. Доставку препарата осуществляли посредством электрофореза или компресса, применяемого в околопозвоночной области или вдоль главного нервного пути в областях, которые были наиболее болезненными под пальпацией позвоночного столба. Болеутоляющий эффект оценивали посредством оригинального количественного метода для определения порога болевой чувствительности. После того, как самая болезненная область была определена посредством пальпации, в этой области измеряли порог болевой чувствительности, прикладывая ступенчато изменяющееся давление с помощью стандартного зонда. Силу давления и площадь поверхности зонда регистрировали, когда появилось ясное ощущение боли. Порог болевой чувствительности выражали в $\text{кг}/\text{см}^2$. Порог болевой чувствительности усреднили для соответствующей области. Контрольным элементом был порог болевой чувствительности перед лечением. Порог болевой чувствительности увеличился с $0,9 \pm 0,5$ до $3,5 \pm 0,7 \text{ кг}/\text{см}^2$ ($p < 0.05$, $n=12$). Положительный эффект наблюдали у 10 из 12 пациентов.

20 [00108] У 14 пациентов с тендовагинитом воспалительного или посттравматического происхождения увеличилась амплитуда движения, и исчез воспалительный отек после применений компрессов с препаратом гиалуронидазы. Результаты применения препарата в случаях контрактур Дюпюитрена до и после операции продемонстрировали на начальных стадиях лечения заболевания препаратом в течение только одного курса, то есть 14 сеансов применения, размягчение рубцов апоневроза ладони вдоль локтевого края ладони. На стадии I-II заболевания положительные эффекты наблюдали после 2-3 курсов применения гиалуронидазы. Положительные эффекты наблюдали при лечении склеродермии: уменьшение отека и твердения кожи. У пациентов с рубцами на лице полное исчезновение рубцов наблюдали после трех курсов лечения в течение года. Побочные эффекты, такие как гиперемия и сыпь, быстро исчезли после короткого перерыва в курсе лечения и наблюдались только в 2,9% случаев (у 7 из 241).

[00109] Кроме того, при лечении репродуктивных проблем (например, импрегнация яйцеклетки, имплантация яйцеклетки, сальпингит и т.д.) можно применять свечи, содержащие гиалуронидазу в комбинации с глицеридами насыщенных жирных кислот или гидрированных растительных масел. Гиалуронидазу также можно применять в обесцвечивающих композициях, включающих очищенную воду, глицерин, фенилтриметикон, глицерилстеарат, цетиловый спирт, линолевую кислоту, гидрогенизированный лецитин, соевое масло, токоферол (витамин Е), диметикон, ретинол, карбомер и отдушку.

Улучшенная доставка лекарственных препаратов

[00110] Гиалуронидазу можно также применять для улучшения поглощения и/или терапевтической эффективности лекарственного средства или косметического средства. Совместное назначение гиалуронидазы приводит к улучшенному поглощению или абсорбции лекарственного средства, что может позволить снизить количество лекарственного средства или косметического средства для достижения желаемой концентрации лекарственного средства или эффекта. Кроме того, гиалуронидазу можно применять в лекарственной форме с контролируемым высвобождением для обеспечения пролонгированной доставки лекарственного средства и/или непрерывной постоянной концентрации в крови или ткани.

[00111] Например, препараты на основе гидрокортизона широко применяют для лечения коллагенозы, ревматического артрита и артрита другого происхождения, заболеваний позвоночного столба, заболеваний мышечно-скелетной системы, аллергических болезней кожи, глаз и бронхиальной астмы, а также заболеваний уха, горла, носа и т.д. В эксперименте с животными добавление гиалуронидазы в мазь гидрокортизона привело к в три раза более быстрой и на 98% большей проникающей способности гидрокортизона, в соответствии с измерениями, проведенными в сыворотке крови, демонстрируя улучшенное проникновение и усвоение лекарственного средства.

[00112] Для лечения диабета инсулин можно вводить трансдермально (через кожу) или трансмукозально (через слизистую оболочку) совместно с гиалуронидазой. Например, инсулин можно объединить с гиалуронидазой в трансдермальном пластыре, состоящем из полиэтиленовой пленки, акрилатной клейкой матрицы, клея из акрилатного сополимера и соответствующих сложных эфиров жирной кислоты.

[00113] Гиалуронидазу можно также применять для усиления доставки противогрибковых медицинских средств. Предпочтительно, гиалуронидазу и противогрибковое средство объединяют в виде лекарственной формы, такой как мазь или порошок. Например, в противогрибковом лосьоне циклопирокс можно объединить с гиалуронидазой, очищенной водой, кокамидом, октилдодеканолом, минеральным маслом, стеариловым спиртом, цетиловым спиртом, полисорбатом, миристиловым спиртом, сорбитанмоностеаратом и бензиловым спиртом. Кроме того, гиалуронидазу можно

объединить с таким средством, как терконазол в вагинальной свече для лечения глубокой молочницы влагалища или в лекарственных формах, включающих инертные наполнители, такие как глицериды насыщенных жирных кислот и гидрированные растительные масла.

5 [00114] В воспалительных состояниях гиалуронидазу можно применять для трансдермального или трансмукозального проникновения антибиотиков в поврежденный участок посредством местной или системной доставки. Доставку гиалуронидазы можно
10 осуществлять посредством крема, содержащего препараты, такие как полимиксин и бацитрацин, совместно с бензиловым спиртом, цетомакроголом, цетиловым спиртом, минеральным маслом, феноксиэтанолом, очищенной водой, стеариловым спиртом и ксантановой камедью. В качестве альтернативы доставку антибиотика, например,
15 вибрамицина, можно осуществлять посредством пластыря, содержащего гиалуронидазу, полиэтиленовую пленку, акрилатную клейкую матрицу, клей из акрилатного сополимера и сложные эфиры жирной кислоты.

20 [00115] Некоторые патологии, такие как хронические воспалительные состояния кожи сопровождаются образованием капсулы, которая затрудняет проникновение лекарственного средства в пораженный участок. В таких условиях гиалуронидазу можно применять для облегчения доставки лекарственного средства через капсулу, используя,
25 например, мазь, содержащую линкомицин, гиалуронидазу, бензиловый спирт, цетомакрогол, цетиловый спирт, минеральное масло, феноксиэтанол, очищенную воду, стеариловый спирт и ксантановую камедь.

30 [00116] Местную доставку анестезирующего лекарственного средства, такого как новокаин или лидокаин, можно также улучшить посредством лекарственной составас гиалуронидазой. Например, приблизительно 100 МЕ гиалуронидазы можно добавить к 4%-му раствору новокаина.

35 [00117] Гиалуронидазу можно также применять местно для улучшения доставки препаратов, стимулирующих или подавляющих рост волос. Типичные лекарственные составы для стимуляции роста волос преимущественно используют вещества, такие как эльфорнитин в комбинации с гиалуронидазой, представленные в лекарственной форме в виде крема с
40 цетеаретом, цетиариловым спиртом, диметиконом, глицерилстеаратом, метилпарабеном, минеральным маслом, феноксиэтанолом, пропилпарабеном, стеариловым спиртом и водой. Крем для стимуляции роста волос может содержать миноксидил, гиалуронидазу, цетеарет, цетиариловый спирт, диметикон, глицерилстеарат, метилпарабен, минеральное масло,
45 феноксиэтанол, пропилпарабен, стеариловый спирт и воду.

50 [00118] Гиалуронидазу также можно применять в обесцвечивающих композициях с гидрохиноном в виде крема, содержащего очищенную воду, глицерин, фенилтриметикон, глицерилстеарат, цетиловый спирт, линолевую кислоту,

гидрогенизированный лецитин, соевое масло, токоферол (витамин E), диметикон, ретинол (витамин A), карбомер и отдушку.

5 [00119] Другим предпочтительным применением гиалуронидазы является улучшение эффективности противопсориазных препаратов, таких как миноксидил. Предпочтительно лекарственный состав, включающий гиалуронидазу и алклометазон, применяется на месте поражения псориазом в виде мази, содержащей, например, пропиленгликоль, медицинский вазелин, цетиариловый спирт, глицерилстеарат, цетек, 10 одноосновный натрий гидрофосфат, хлорокрезол и очищенную воду. Для пациентов, страдающих зудом, можно применять мазь, содержащую гиалуронидазу, гидрокортизон, пропиленгликоль, медицинский вазелин, цетиариловый спирт, глицерилстеарат, цетек, 15 одноосновный натрий гидрофосфат, хлорокрезол и очищенную воду для уменьшения зуда.

[00120] Злокачественные поражения или предопухолевые состояния можно лечить с помощью лекарственных составов по изобретению для увеличения эффективности проникновения лекарственного средства и распределения в опухоли или поражении. 20 Например, пациенты, страдающие раком шейки матки, могут применять гиалуронидазу интравагинально в виде цитотоксического лекарственного средства, представленного в тампоне согласно установленным способам в данной области техники. При меланомном или немеланомном раке кожи, а также других опухолях, доступных для местного применения лекарственного средства (например, определенные ротовые и желудочные опухоли), 25 эффективность местной химиотерапии, использующей, например, 5-фторурацил, может быть повышена добавлением гиалуронидазы в топическую композицию. Как правило, в случае солидных опухолей гиалуронидаза и противоопухолевый лекарственный состав можно также 30 вводить посредством прямой внутриопухолевой инъекции.

Представленные примеры осуществления изобретения считаются лишь иллюстративными и не ограничивают изобретение или формулу изобретения.

ПРИМЕР 1

Физические свойства и активность

40 [00121] Этот Пример описывает оценку молекулярного веса (M_r) и изоэлектрического значения pH (pI) гиалуронидазы, а также воздействие выбранных солей на ее активность.

Материалы и способы

45 [00122] Молекулярный вес интактной гиалуронидазы оценивали посредством гель-фильтрационной хроматографии в биогельной колонке P-100 (1 см × 50 см), применяя 50 мМ PBS, pH 6.5, в качестве подвижной фазы при скорости потока 10 мл/ч. Калибровку колонки выполняли, применяя смесь протеинов известного молекулярного веса (включая рибонуклеазу, альфа-химотрипсин, яичный альбумин и сывороточный альбумин) и отмечая 50

5 время элюирования для каждого протеина. Затем строили калибровочную кривую, показывающую отношение времени элюирования каждого калибровочного протеина к его молекулярному весу. Затем брали образец гиалуронидазы *Streptomyces actinocidus* (5 мг/мл) и по значению времени элюирования фермента определяли молекулярный вес из калибровочной кривой.

10 [00123] Образец, представляющий собой 10 мг микробной гиалуронидазы, подвергали изоэлектрическому фокусированию при градиенте pH в пределах от pH 4 до pH 6. Измеряли поглощение в ультрафиолетовой области при 280 нм посредством геля и брали образцы из областей, демонстрирующих поглощение, для исследования активности гиалуронидазы (см. ниже).

15 [00124] Определяли воздействие выбранных солей и реагентов на активность фермента, исследуя активность гиалуронидазы в присутствии 10^{-4} , 10^{-3} и 10^{-2} М соли/соединение (см. ниже).

Результаты

20 [00125] Результаты эксперимента с гель-фильтрацией показали, что молекулярный вес (M_r) фермента составляет около 44 ± 1 кД (ФИГ. 2), а изоэлектрическое фокусирование показало, что изоэлектрическое значение pH фермента составляет pH 4.4 (ФИГ. 3).

25 [00126] Результаты эксперимента, исследующего воздействие различных соединений на активности гиалуронидазы, показаны в Таблице 2. Ни одна из исследуемых солей не активировала фермент, то есть не увеличила активность.

30 [00127] Ионы Fe^{3+} и Cu^{2+} ингибировали активность микробной гиалуронидазы на 25% при концентрации 10^{-3} М. При 10^{-2} М эти ионы ингибировали активность гиалуронидазы на 65% и 56%, Fe^{3+} и Cu^{2+} , соответственно.

35 [00128] β -меркаптоэтанол при концентрации 10^{-2} М полностью ингибировал гиалуронидазу, что предполагает наличие дисульфатных связей в ферменте. Так как не было никаких сообщений, что какие-либо другие гиалуронидазы содержат дисульфатные связи, это является еще одним указанием на уникальность свойств гиалуронидазы согласно изобретению.

40 [00129] *p*-хлор-ртуть-бензоат (*p*-СМВ) при концентрации 10^{-2} М частично ингибирует микробную гиалуронидазу, вероятно вследствие разложения белково-углеводного комплекса и инактивации фермента. Для выявления возможных сульфгидрильных групп исследовали взаимодействие микробной гиалуронидазы с 10^{-3} М *p*-СМВ. Не наблюдали какое значительное увеличение оптической плотности при 250 нм, что указывает на отсутствие свободных SH-групп в молекуле. Таким образом, *p*-СМВ не инактивировала гиалуронидазу, что отличает этот фермент от, например, гиалуронидазы из *Streptomyces hyalurolyticus*. Хотя нельзя исключить, что свободные SH-группы, недостижимые для *p*-СМВ, расположены в пределах глобулы протеина, титрование микробной гиалуронидазы с *p*-СМВ в
50

присутствии додецилсульфата натрия денатурирующего агента (SDS) не обнаружило никакие «скрытые» SH-группы.

[00130] Сравнение полученных данных с данными из литературы в отношении свойств гиалуронидаз *актиномицетов (actinomycetes)* обнаружило некоторые различия. Соль Mn^{2+} и p-CMB (10^{-3} - 10^{-4} M) не оказывали влияния на активность микробной гиалуронидазы. Тем не менее, Mn^{2+} , Hg^{2+} и p-CMB в этих концентрациях ингибировали гиалуронидазу, полученную из *Stm. Hyalurolyticus* (Ohya, Biochem Biophys Acta 1970;198(1):607-609).

ТАБЛИЦА 2

Влияния различных реагентов и солей металлов на активности микробной гиалуронидазы

<u>Реагент или соль</u>	<u>Активность гиалуронидазы (%)</u>		
	<u>Концентрация (M)</u>		
	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
Контрольный случай (реагенты отсутствуют)	100	100	100
KCl	100	100	100
NaCl	100	100	100
FeCl ₃	100	85	35
FeSO ₄	100	100	100
CuSO ₄	100	85	44
MnCl ₂	100	100	100
ZnSO ₄	100	100	100
AgNO ₃	100	100	100
LiSO ₄	100	100	100
CoCl ₂	100	100	100
CaCl ₂	100	100	100
пара-хлор-ртуть-бензоат	100	100	80
Na ₃ N	100	100	100
Этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA)	100	100	95
бета-меркаптоэтанол	100	65	0
I ₂	2010	12	0

ПРИМЕР 2**Основные свойства гиалуронидазы, продуцированной из стрептомицетов**

5 [00131] Этот Пример описывает оценку чистоты препарата гиалуронидазы, а также оптимального значения рН, стабильности рН, оптимального значения температуры, термоустойчивости, субстратной специфичности и конечных продуктов реакции гиалуронидазы.

Чистота микробной гиалуронидазы

10 [00132] Гомогенность ферментного препарата исследовали посредством электрофореза. Гиалуронидаза, очищенная по методу, сформулированному на **ФИГ. 1**, содержит приблизительно 11-13% углеводов и приблизительно 10% в весовом отношении уроновых кислот. При помощи электрофореза, в полиакриламидном геле, были обнаружены либо одна диффузная полоса, окруженную диффузным галогеном, либо несколько полос. Такое возможно вследствие образования комплексов, между белками и углеводами в препарате. Кроме того, наличие углеводов уроновой кислоты в препарате гиалуронидазы затрудняло окрашивание белков амидочёрным красителем, так как окрашенные полосы были рассеянными даже после того, как количество белков увеличили до 800-1500 микрограмм. Кумасси голубой краситель, который используется для окрашивания гликопротеинов, был более эффективным красителем. Окрашивание гиалуронидазы этим красителем выдало четкие области локализации после размещения 80 - 150 микрограммов белка (**ФИГ. 4А**).

20 [00133] Затем проанализировали ферментный препарат на полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и бета-меркаптоэтанола. При этих условиях белок денатурирует и выделяет все комплексы, включая комплексы с углеводами. Окрашивание геля амидочёрным красителем обнаружило четкую, единственную, область локализации белка. (**ФИГ. 4В**).

25 [00134] Препарат гиалуронидазы был также подвергнут гель-фильтрационной хроматографии в колонке Sephadex (G-100). Фермент элюировали на одном симметричном пике.

30 [00135] Таким образом, способ, используемый для приготовления гиалуронидазы, позволяет получить гомогенное вещество.

Оптимальное значение рН гиалуронидазы

35 [00136] Активность гиалуронидазы проверили при различных значениях рН в диапазоне 3.0-12.0. Оптимальное значение рН для расщепления гиалуроновой кислоты гиалуронидазой определяли равным приблизительно 6.5-7 (**ФИГ. 5**). Это оптимальное значение отличается от значений, сообщаемых для других гиалуронидаз, полученных из

стрептомицетов (Streptomyces), например, оптимальное значение pH для гиалуронидазы, полученной из *Stm. Hyalurolyticus* и *Stm. Koganeiensis* составляет 5.0 и 4.0, соответственно.

5 [00137] На ФИГ. 6 показана зависимость активности фермента ($I_g (V_{max}/V-1)$), то есть десятичный логарифм (Lg) отношения между максимальной скоростью и экспериментальной скоростью на pH. Кажущиеся константы диссоциаций ионогенных групп активного центра гиалуронидазы были равны 5.2 и 7.8, pK1 и pK2, соответственно. Значение pK1 является самым близким к значению pK глутаматной карбоксильной группы (3.8-5.1).
10 Ионогенная группа активного центра с pK2, составляющей 7.8, может представлять собой алфа-аминогруппу аминокислоты, такой как аланин, валин, лейцин или некоторые другие аминокислоты (pK 7.6-8.4).

15 [00138] Стабильность фермента может также быть поставлена под угрозу вследствие pH. Тем не менее, результаты показали, что гиалуронидаза имела фактически ту же самую высокую стабильность в диапазоне значений pH 5.0-11.0, так как 92-100% активности были сохранены после 48-часового инкубационного периода (ФИГ. 7).

Термоустойчивость гиалуронидазы

20 [00139] На ФИГ. 8 показана активность фермента как функция температуры реакции. Данные показали, что микробная гиалуронидаза расщепляет гиалуроновую кислоту с максимальной скоростью при температуре приблизительно 50-60°C, что является характеристикой гиалуронидаз, полученных из штамма *Streptomyces actinomycetes*.

30 [00140] Исследование кинетики термоинактивации или термоустойчивости при значении pH 6.5, инкубированном для различных периодов времени при различных температурах, обнаружило, что гиалуронидаза остается устойчивой при предельных температурах от 20 до 60°C (ФИГ. 9). Даже через 48 часов при температуре 60°C были сохранены 60% активности. При температуре 70°C фермент деактивировался быстрее,
35 поскольку только 38% активности сохранялись приблизительно через 12 часов.

Субстратная специфичность гиалуронидазы

40 [00141] Гомогенный препарат гиалуронидазы использовали для исследования субстратной специфичности фермента. Оценивали активность фермента к гиалуроновой кислоте, хондроитинсульфату А, В, С и гепарину. Обнаружили, что гиалуронидаза активна только по отношению гиалуроновой кислоте (ФИГ. 10). Это типично для многих других микробных гиалуронидаз. Таким образом, микробная гиалуронидаза имеет узкую
45 субстратную специфичность и расщепляет только гиалуроновую кислоту, что отличает ее от тестикулярной и некоторых других бактериальных гиалуронидаз.

50 [00142] Гиалуронат калия использовали в качестве субстрата для определения констант скорости реакции микробной гиалуронидазы. Для расчета кажущейся константы

Михаэлиса-Ментена (K_m) и максимальной скорости разложения субстрата (V_{max}) исследовали зависимость начальной скорости реакции от концентрации субстрата при температуре 37°C и значении pH 6.5. На **ФИГ. 11** показано, что K_m и V_{max} для гиалуроната калия составляли 1,1 мг/мл и 0,022 мкмоль N-ацетил-D-глюкозамина/мин., соответственно.

Конечные продукты реакции гиалуронидазы

[00143] Гидролиз 100 мг гиалуроновой кислоты выполняли посредством инкубации с 560 МЕ гиалуронидазы, pH 6.0, в течение 20 часов в при температуре 37°C. После гидролиза проанализировали продукты гидролиза посредством гель-фильтрационной хроматографии (Sephadex G-25 (2×88), буфер 0.2M NaCl). Определяли профили элюции, применяя абсорбцию при 232 нм и реакцию Морган-Элисона (Morgan W and Elison L, Biochem J 1943;26:988; and Reissin JL, J Biol Chem 1955;217:959-966)

[00144] Как показано на **ФИГ. 12**, в качестве конечных продуктов реакции обнаружили два олигосахаридных компонента (пики 4 и 5). Сравнивая молекулярный вес обоих пиков со стандартами (хитотетраоза, рафиноза и N-ацетил-D-глюкозамин), которые соответствовали расчетным значениям (1150 и 760, 1137 и 758 г/моль, соответственно), обнаружили, что конечными продуктами были гексасахариды и тетрасахариды.

ПРИМЕР 3

Исследование гиалуронидазы

[00145] Это Пример описывает исследование и технологию приготовления лекарственного средства гиалуронидазы, продуцируемой штаммом *стрептомицеты* (*Streptomyces*), стабилизированной маннитом и используемой в качестве лекарственного средства для наружного применения. Все реагенты, упомянутые в настоящей заявке, описаны в соответствующих главах государственной фармакопеи Российской Федерации, XI издание, Москва, Издательский дом «Медицина», тома 1-2, 1987-1989.

Свойства

[00146] Исходный препарат гиалуронидазы имел следующие свойства:

[00147] **Описание.** Аморфный порошок или пористое вещество от кремово-белого до светло-коричневатого цвета в виде таблетки. Таблетка крошится при встряске. Вещество имеет специфический запах и является гигроскопичным.

[00148] **Растворимость.** Вещество является растворимым в воде и представляет собой изотонический раствор Фармакопеи хлорида натрия XI, том 1, с. 175.

[00149] **Аутентичность.** Вещество обладает активностью гиалуронидазы (см. Количественный анализ: активность гиалуронидазы).

[00150] **Проницаемость.** Раствор 0,1 г вещества в 10 мл воды должен быть сопоставим со стандартным раствором III (Фармакопея XI, издание 1, с.198). Приготавливали два раствора: 0,5 г гидразина растворяли в 50 мл дистиллированной воды, и 3 г гексаметилентетрамина растворяли в 30 мл дистиллированной воды. Смесь различных объемов этих растворов создает ряд стандартов проницаемости. Исследуемый раствор сравнивали со стандартами.

[00151] **Цвет.** Раствор 0,05 г вещества в 5 мл воды должен быть сопоставим со стандартным раствором #2b (Фармакопея XI, издание 1, с.194). Приготавливали растворы стандартного цвета, подготовив ряд смесей растворов хлорида кобальта, бихромата калия, сульфата меди, хлорида железа и серной кислоты. Исследуемый раствор сравнивали со шкалой желтоватых стандартных растворов.

[00152] **pH.** От 6.0 до 8.0 (0,1% раствор в воде, потенциометрический метод, Фармакопея XI, издание 1, с. 113).

[00153] **Потеря массы при высушивании.** 0,1 г вещества (точное количество) высушивали при температуре 100-105°C до постоянной массы. Потеря массы не должна превышать 8% (Фармакопея XI, издание 1, с. 176).

[00154] **Бактериологическая чистота.** Допустимо, что в 1 г вещества будут содержаться не более 10^3 бактерий и не более 10^2 плесневых или дрожжевых грибов (Фармакопея XI, издание 2, с. 209). Следующие бактерии: *энтеробактерии (Enterobacteriaceae)*, *синегнойная палочка (Pseudomonas aeruginosa)* и *золотистый стафилококк (Staphylococcus aureus)* недопустимы в нестерильных препаратах. Для бактериального роста содержимое одного флакона растворяется в 1 мл стерильного буферного раствора (Фармакопея XI, издание 2, с. 209). Дальнейший анализ выполняли, как описано в Фармакопее XI, издание 2, с. 196-200, глава «Количественный анализ для микроорганизмов».

Количественный анализ: активность гиалуронидазы

[00155] Одну единицу активности гиалуронидазы определяли как такое количество гиалуронат лиазы, которое, действуя в течение 1 мин. в 0,3% в отношении веса к объёму раствора субстрата (гиалуронат калия или гиалуроновая кислота) при температуре 37°C и значении pH 6.5, будет продуцировать олигосахариды в количестве эквивалентном 1 мкмоль N-ацетил-D-глюкозамина (NAGA).

[00156] 0,3 мл 3% в отношении веса к объёму субстрата помещали в две пробирки. Пробирки помещали в термостат на 5 мин. при температуре 37°C. 0,3 мл фосфатного буфера (pH 6.5) помещали в третью пробирку (контроль). 0,2 мл 1% раствора гиалуронидазы помещали в пробирки 1, 2 и 3. Смесь инкубируют в течение 15 мин. (точно) в термостате при температуре 37°C. После инкубации добавляли 0,2 мл раствора тетрабората калия. Пробирки помещали в кипящую воду на 3 мин. (точно). Затем пробирки охлаждают до

комнатной температуры, поместив их в холодную воду. После охлаждения добавляли 3 мл реагента Эрлиха (для обнаружения N-ацетил-D-глюкозамина) к каждой пробирке. Пробирки помещали в термостат на 20 мин. при температуре 37°C (раствор в экспериментальных пробирках приобретет малиново-розовый цвет, а раствор в контрольной пробирке – желтый цвет).

[00157] Оптическую плотность определяли в экспериментальных растворах, измеряя спектральную поглощательную способность в спектрофотометре при длине волны 582 нм в лотке толщиной 1 см. Для сравнения использовали контрольный раствор.

[00158] Затем рассчитывали активность гиалуронидазы (А) как количество международных миллиединиц для 1 мг вещества (МЕ/мг) в соответствии со следующей формулой:

$$A = \frac{D_1 \times F \times 2.5 \times 100}{T \times n}$$

[00159] где: D_1 - средняя оптическая плотность экспериментальных растворов, полученных в двух измерениях; F - калибровочный коэффициент, определенный по калибровочной кривой; T - время реакции (мин.); n - количество вещества (мг); 2.5 - коэффициент разбавления и 1000 - коэффициент преобразования.

[00160] Активность гиалуронидазы 1 мг вещества не должна быть менее 2 МЕ. Активность гиалуронидазы во флаконах (X) рассчитывали в соответствии со следующей формулой:

$$X = \frac{D_2 \times F \times 2.5 \times 1000 \times 10}{T}$$

[00161] где: D_2 - среднее значение оптической плотности экспериментальных растворов (растворы 3 и 4), полученное в двух параллельных измерениях; F - калибровочный коэффициент, определенный по калибровочной кривой; T - время реакции (мин.); 10 - объем фосфатного буфера и 1000 - коэффициент преобразования.

[00162] Количество вещества в каждом флаконе должно быть не менее 240 МЕ и не более 360 МЕ.

Калибровочная кривая

[00163] 0,5 мл раствора, содержащего 0,09, 0,121, 0,181, 0,226, 0,258 и 0,301 мкмоль N-ацетил-D-глюкозамина (NAGA) в 1 мл, соответственно, помещали в пробирки, приготовленные как в Таблице 3.

ТАБЛИЦА 3**Приготовление стандартных растворов N-ацетил-D-глюкозамина (NAGA)**

	Первоначальный N-ацетил-D- глюкозамин (NAGA) (мл)	Фосфатный буфер (мл)	N-ацетил-D- глюкозамин (NAGA) (мкмоль/мл)
5			
10			
	1.0	5.0	0.301
	1.0	6.0	0.258
15	1.0	7.0	0.226
	0.5	4.5	0.181
	0.5	7.0	0.121
20	0.5	9.5	0.090

[00164] 0,2 мл раствора тетрабората калия помещали в каждую пробирку. Пробирки помещали в кипящую водяную баню на 3 мин. (точно) и охлаждали в холодной водяной бане. В каждую охлажденную пробирку добавляли 3,0 мл реагента Эрлиха и помещали пробирки в термостат на 20 мин. при температуре 37°C. Появлялся малиново-розовый цвет. Оптическую плотность растворов определяли с помощью спектрофотометра с длиной волны 582 нм в лотке толщиной 1 см. Для сравнения использовали раствор реагента Эрлиха.

[00165] Кривую строили, отмечая на оси ординаты единицы оптической плотности, а на оси абсцисс количество мкмоль N-ацетил-D-глюкозамина (NAGA) в 1 мл соответствующего стандартного раствора. Кривую строили для каждой новой партии реагентов. Коэффициент (F) определяли по калибровочной кривой: количество N-ацетил-D-глюкозамина (NAGA) в мкмоль в 0,5 мл реакционной смеси, которая соответствует одной единице оптической плотности. Например, если 0,18 мкмоль N-ацетил-D-глюкозамина (NAGA) в 0,5 мл продуцировали увеличение оптической плотности на 0,4 единиц, то $F = 0.18/0.4 = 0.45$.

Растворы

[00166] *Приготовление 1%-го раствора вещества.* 0,01 г (точное количество) растворяли в 1,0 мл фосфатного буфера со значением pH 6.5. Необходимо использовать свежеприготовленный раствор.

[00167] *Приготовление 0,3%-го раствора субстрата.* 0,03 г гиалуроната калия или гиалуроновой кислоты, полученной из петушиного гребня, помещали в метрическую

реторту на 25 мл, добавляли 10,0 мл фосфатного буфера со значением pH 6.5 и перемешивали с использованием электромагнитной мешалки до тех пор, пока не будет достигнуто полное растворение. Раствор можно использовать в течение 2 дней, если хранить его в холодильнике.

5 [00168] Приготовление фосфатного буфера со значением pH 6.5.

а) 13,6 г монофосфата калия помещали в 1 л метрическую реторту и растворяли в 200,0 мл воды. Добавляли воду до достижения объема, составляющего точно 1 л (раствор А).

10 б) 22,8 г бифосфата калия помещали в 1 л метрическую реторту и растворяли в 200,0 мл воды. Добавляли воду до достижения объема, составляющего точно 1 л (раствор В).

15 в) 500,0 мл раствора А помещали в 1 л реторту и добавляли приблизительно 300 мл раствора В для получения pH 6.7 (определяется потенциометрией) (раствор С).

20 д) 700 мл раствора С помещали в 1 л реторту, добавляли 3,1 г хлорида натрия (химически чистый) и перемешивали до тех пор, пока не будет достигнуто полное растворение. Раствор можно использовать в течение одного месяца, если хранить его в холодильнике.

25 [00169] *Приготовление раствора тетрабората калия.* 24,7 г борной кислоты помещали в коническую реторту на 500 мл и добавляли 420 мл воды. Во время перемешивания с помощью электромагнитной мешалки добавляли 11,2 г гидроксида калия (SS 24363-80) в 50,0 мл воды, продолжают перемешивание до тех пор, пока борная кислота не будет полностью растворена. Раствор необходимо использовать в течение 1 месяца.

30 [00170] *Приготовление реагента Эрлиха.* 20 г р-(диметиламино)бензальдегида помещали в 1 л термоустойчивую реторту и добавляли 600,0 мл 0.1М раствора уксусной кислоты. Смесь нагревают с помощью электрической плитки до кипения и фильтруют в 1 л коническую реторту, размещенную в ванне со льдом. Преципитат фильтруют, применяя вакуум-фильтрование через воронку, использующую фильтр, и сушат на воздухе в течение 24 часов. 5 г рекристаллизованного р-(диметиламино)бензальдегида помещали в метрическую реторту на 50 мл и растворяли в 25 мл ледяной уксусной кислоты, добавляли 6,25 мл концентрированной соляной кислоты и доводили объем до 50 мл с помощью ледяной уксусной кислоты. Раствор можно использовать в течение одного месяца, если хранить его в холодильнике. Приготавливали рабочий раствор непосредственно перед проведением анализа посредством разбавления исходного раствора ледяной уксусной кислоты в пропорции 1 к 9.

45 [00171] *Приготовление раствора N-ацетил-D-глюкозамина (NAGA).* Точно 0,01 г N-ацетил-D-глюкозамина (NAGA) помещали в метрическую реторту емкостью 25 мл, растворяли 10 мл фосфатного буфера и разбавляют буферным фосфатным раствором до

50

объема 25 мл. 1 мл раствора содержит 1,808 мкмоль N-ацетил-D-глюкозамина (NAGA). Раствор необходимо готовить непосредственно перед использованием.

5

Удельная активность

10

[00172] В две пробирки помещали 1 мл 0,1%-го раствора вещества и добавляли 0,9 мл раствора А. Пробирки помещали в термостат на 10 мин. при температуре 50°C и охлаждают до комнатной температуры. Затем добавляли 3 мл раствора С в каждую пробирку, встряхивают и помещали их в термостат на 10 мин. при температуре 50°C. В контрольном опыте, выполняемом параллельно, вместо раствора вещества использовали воду. Оптическую плотность анализируемых растворов определяли при длине волны 670 нм в лотке толщиной 1

15

[00173] Количество белка в миллиграммах белка на миллиграмм вещества (В) рассчитывают в соответствии со следующей формулой:

20

$$B = \frac{D_2 \times 6.38 \times K}{a}$$

25

[00174] где: D_2 - среднее значение оптической плотности анализируемых растворов, полученное в двух параллельных измерениях; a - концентрация вещества в мг/мл; 6.38 - эмпирический параметр для пересчета количества тирозина относительно количества белка в веществе и K - коэффициент, определяемый по калибровочной кривой.

Калибровочная кривая

30

[00175] 1 мл стандартных растворов, содержащих 0,01, 0,2, 0,03, 0,04, 0,05 мг тирозина, соответственно, помещали в пробирки, приготовленные, как указано в Таблице 4.

ТАБЛИЦА 4

Приготовление стандартных растворов тирозина

35

Первоначальный тирозин (мл)	0.2 М HCl (мл)	Окончательный тирозин (мг/мл)
1.0	9.0	0.01
1.0	4.0	0.02
1.5	3.5	0.03
1.0	1.5	0.04
1.0	1.0	0.05

50

[00176] 0,9 мл реагента А помещали в каждую пробирку. Пробирки помещали в термостат на 10 мин. при температуре 50°C и охлаждают до комнатной температуры. В охлажденные пробирки добавляли 0,1 мл реагента В и оставляют пробирки на 10 мин. при комнатной температуре. Затем добавляли 3 мл реагента С, встряхивают пробирки и помещали их в термостат на 10 мин. при температуре 50°C. В параллельном контрольном опыте используют раствор соляной кислоты 0.2 М а вместо раствора тирозина. Оптическую плотность растворов определяли посредством спектрофотометрии при длине волны 670 нм. В качестве раствора для сравнения используют контрольный раствор.

[00177] Строили контрольную кривую, отмечая на оси ординаты единицы оптической плотности, а на оси абсцисс количество тирозина в миллиграммах в 1 мл соответствующего стандартного раствора. Новую кривую строили для каждой новой партии реагентов. Согласно кривой определяли коэффициент К, то есть количество тирозина в мг в 1 мл раствора, соответствующего одной единице оптической плотности. Например, если 0,02 мг тирозина в 1 мл продуцируют увеличение оптической плотности на 0,35 единиц, то $K = 0.02/0.35 = 0.58$. Затем рассчитывают удельную активность (SA), выраженную в количестве Международных единиц в 1 мг белка (МЕ/мг белка), в соответствии со следующей формулой:

$$SA = A/B$$

[00178] где: А - активность гиалуронидазы вещества (МЕ/мг); В - количество белка (мг белка / мг вещества). Удельная активность не должна быть менее 30 МЕ/г белка.

Растворы

[00179] Приготовление 0,1%-го раствора вещества. Точно 0,05 г вещества помещали в метрическую реторту на 50 мл, растворяли 20 мл воды и доводили объем до 50 мл. Раствор приготавливали ежедневно.

[00180] *Приготовление реагента А.* 2,0 г виннокислого натрия и 100 г углекислого натрия помещали в метрическую 1 л реторту, растворяли в 500 мл 1 М раствора гидроксида натрия и доводили объем водой до 1 л. Раствор можно хранить при комнатной температуре и использовать в течение 3 месяцев.

[00181] *Приготовление реагента В.* 2,0 г виннокислого натрия и 1,0 г пентагидрата сульфата меди 5-Н₂О помещали в метрическую 100 мл реторту, растворяли в 10 мл 1 М раствора гидроксида натрия и доводили объем водой до 100 мл. Раствор можно хранить в холодильнике в течение 3 месяцев.

[00182] *Приготовление реагента С.* 50,0 г натрий тунгстенат тартрата и 12,5 г молибдената натрия 2-Н₂О помещали в метрическую 1 л реторту и растворяли в 350 мл воды, перемешивая. Добавляли 25 мл ортофосфорной кислоты (SS 6552-80) и 50 мл концентрированной соляной кислоты, смесь кипятят с рекуррентным холодильником в течение 10 часов. Раствор охлаждают до комнатной температуры и добавляли 75 г сульфата лития, 25

мл воды и 5 капель бромида. Остатки бромида дистиллируют, нагревая смесь без холодильника под вытяжным шкафом в течение 20 мин. Раствор должен иметь желтый цвет. Если раствор имеет зеленый цвет, добавление бромида необходимо повторить. Затем раствор охлаждаются до комнатной температуры и помещали в метрическую реторту на 500 мл. Объем доводили водой до 500 мл, раствор фильтруют (исходный раствор). Раствор можно хранить в темном флаконе в холодильнике в течение трех месяцев. Рабочий раствор приготавливают в день использования, разбавляя исходный раствор водой в пропорции 1 к 15.

[00183] *Приготовление исходного раствора тирозина.* Точно 0,01 г тирозина помещали в метрическую реторту на 100 мл, растворяли в 20 мл 0.2М раствора соляной кислоты и доводили объем до 100 мл раствором 0.2М соляной кислоты. 1 мл раствора содержит 0,1 мг тирозина. Раствор приготавливают ежедневно.

[00184] *Приготовление 0.2 М раствора соляной кислоты.* 17 мл концентрированной соляной кислоты (SS 3118-77, химически чистая) помещали в 1 л метрическую реторту и доводили объем водой до 1 л.

[00185] *Упаковка.* 10 флаконов, изготовленных из нейтрального стекла, герметично закрытых резиновыми пробками и соответственно опрессованных алюминиевыми колпачками, помещали вместе с спецификацией в коробки, изготовленные из картона (например, типа «хром-эрзац»). Их следует хранить в сухом месте при комнатной температуре. Срок хранения составляет 1 год.

[00186] К раствору добавляли 1 М раствор гидроксида натрия и доводили объем водой до 100 мл. Раствор можно хранить в холодильнике в течение 3 месяцев.

[00187] *Приготовление фосфатного буфера со значением рН 6.5.*

a) 13,6 г монофосфата калия помещали в 1 л метрическую реторту, растворяли в 200 мл воды и добавляли воду до тех пор, пока объем не будет составлять точно 1 л (раствор А).

b) 22,8 г дифосфата калия помещали в 1 л метрическую реторту, растворяли в 200 мл воды и добавляли воду до тех пор, пока объем не будет составлять точно 1 л (раствор В).

c) 500 мл раствора А помещали в реторту объемом 1 л и добавляли приблизительно 300 мл раствора В для получения раствора С со значением рН 6.7 (определяется потенциометрией).

d) 700 мл раствора С помещали в реторту объемом 1 л, добавляли 3,1 г хлорида натрия (химически чистый) и перемешивали до тех пор, пока не будет достигнуто полное растворение. Раствор следует использовать в течение месяца, если хранить его в холодильнике.

[00188] *Приготовление раствора тетрабората калия.* 24,7 г борной кислоты помещали в коническую реторту емкостью 500 мл и добавляли 420 мл воды. Во время

перемешивания с помощью электромагнитной мешалки добавляли 11,2 г гидроксида калия в 50 мл воды, продолжают перемешивание до тех пор, пока борная кислота не будет полностью растворена. Раствор необходимо использовать в течение 1 месяца.

5 [00189] *Приготовление реагента Эрлиха.* 20 г р-(диметиламино)бензальдегида (чистого) помещали в термоустойчивую реторту объемом 1 л и добавляли 600 мл 0.1М раствора уксусной кислоты. Смесь нагревают на электрической плитке до кипения, фильтруют
10 ее в коническую реторту емкостью 1 л и помещали в ванну со льдом. Преципитат фильтруют, применяя вакуум-фильтрацию через соответствующую воронку, и сушат на воздухе в течение 24 часов. 5 г рекристаллизованного р-(диметиламино)бензальдегида помещали в метрическую реторту емкостью 50 мл и растворяли в 25 мл ледяной уксусной кислоты,
15 добавляли 6,25 мл концентрированной соляной кислоты и доводили объем до 50 мл с помощью ледяной уксусной кислоты. Раствор можно использовать в течение одного месяца, если хранить его в холодильнике. Приготавливали рабочий раствор непосредственно перед проведением анализа посредством разбавления исходного раствора ледяной уксусной кислотой
20 в пропорции 1 к 9.

[00190] *Приготовление раствора N-ацетил-D-глюкозамина (NAGA).* Точно 0,01 г N-ацетил-D-глюкозамина (NAGA) помещали в метрическую реторту емкостью 25 мл, растворяли в 10 мл фосфатного буфера и разбавляют буферным фосфатным раствором до
25 объема 25 мл. 1 мл раствора содержит 1,808 мкмоль N-ацетил-D-глюкозамина (NAGA). Раствор приготавливали непосредственно перед использованием.

ПРИМЕР 4

Фармакокинетика микробной гиалуронидазы

30 [00191] Этот Пример описывает исследования фармакокинетики фермента изобретения. Гиалуронидазу можно применять в качестве оригинального ферментного
35 лекарственного препарата, который в качестве активного вещества содержит микробную гиалуронидазу, продуцированную штаммом *стрептомицеты (Streptomyces)*, а в качестве стабилизирующего агента и наполнителя – маннит. Фармакокинетику гиалуронидазы из *Streptomyces actinocidus* (удельная активность 3200-3400 ME/г) сравнивали с ронидазой
40 (гиалуронидаза из бычьих яичек; активность 350 ME/г).

Животные и эксперименты

45 [00192] Активность микробной гиалуронидазы и ронидазы исследовали в сыворотке крови 8 шиншилловых кроликов (вес тела 3,5 кг) после одиночного применения препаратов на коже. Микробную гиалуронидазу и ронидазу применяли в дозах 100 ME/кг и 1000 ME/кг. Эти дозы превышают одиночную терапевтическую дозу (5 ME/кг),
50 рекомендованную для клинического применения, в 20 и 200 раз, соответственно. Препараты

применяли на неповрежденном участке кожи 4x10 см и закрывали стерильной многослойной марлей. Пробы крови для определения активности лекарственного средства брали (ушная вена) через 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 24 часа. Фармакокинетику гиалуронидазы и ронидазы также исследовали на 4 кроликах после ежедневных применений 100 мг/кг в течение 5 и 6 дней. Пробы крови брали спустя 0,5, 1, 2, 20, 22 и 24 часа после 5-и и 6-и применений. Исследование активности фермента в плазме крови также проводили на 4 мышах (вес тела 20 г) после интраперитонеальной инъекции 6400 МЕ/кг. Пробы крови брали спустя 0,5, 1 и 2 часа после приема лекарственного средства. Пробы крови центрифугировали со скоростью 3000 об./мин. в течение 20 минут. Для контроля базовой активности гиалуронидазы в плазме крови пробы брали у кроликов (14 проб), крыс (12 проб) и мышей (4 проб) перед приемом лекарственного средства.

Способ определения активности фермента в биологических жидкостях

[00193] Использовали модифицированный «луночный» способ для определения активности гиалуронидазы в плазме крови. Способ основан на радиальной диффузии фермента в агар, который содержит гиалуронат калия в качестве субстрата. Активность фермента пропорциональна логарифму диаметра чистой зоны, окружающей лунку агара, в которой размещены образцы плазмы с гиалуронидазой. Показания снимали после преципитации негидролизованного гиалуроната калия с цетилпиридилхлоридом.

[00194] *Описание способа.* Основная питательная среда содержит 3%-ый агар, растворенный в 0,05 М калий фосфатном буфере (рН 6,5) с добавлением 0,1% хлорида натрия и 0,02% азида натрия. Раствор гиалуроната калия (2 мг/мл) в 0,05 М калий фосфатном буфере добавляли в расплавленную при температуре 60°C основную питательную среду для получения раствора с 1 мг/мл гиалуронатом калия, растворенным в 1,5%-ом агаре в 0,05 М калий фосфатном буфере. Расплавленную питательную среду помещали в чашки Петри в количестве 9,5 мл. После застывания 18-20 лунок (2 мм в диаметре) вырезают каждой чашке.

[00195] Полмиллилитра экспериментального образца и стандартного раствора гиалуронидазы (семь различных концентраций) помещали в отдельные лунки. Каждый экспериментальный образец помещали в три лунки, а каждый стандарт концентрации помещали в две лунки.

[00196] Стандартные растворы микробной гиалуронидазы или ронидазы приготовили с плазмой крови животных. Исходный раствор 100 мкг/мл (40 МЕ/мл) активного фермента разбавили до концентраций 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,63 и 0,31 МЕ/мл.

[00197] Чашки Петри с образцами и стандартами инкубировали при температуре 37°C в течение 20 часов. После инкубации добавили 10 мл 10%-го раствора цетилпиридинхлорида в дистиллированной воде. Преципитация произошла в течении 10-20 минут, и появились чистые зоны диффузии фермента. Их измеряли с точностью до 0,1 мм,

применяя систему визуализации, и рассчитывали средний диаметр для каждого стандарта и образца.

5 [00198] Строили кривые зависимости логарифма диаметра чистой зоны от концентрации стандартных растворов гиалуронидазы. Концентрации микробной гиалуронидазы и ронидазы в экспериментальных образцах определяли, применяя калибровочные кривые. Чувствительность способа для микробной гиалуронидазы составляла 0,3 МЕ/мл, а для ронидазы 1,0 МЕ/мл. Точность способа составляла $\pm 3\%$.

10 Результаты

15 [00199] Контрольный эксперимент в используемой испытательной системе (рН 6,5, инкубация 20 часов при температуре 37°C) не обнаружил эндогенную активность гиалуронидазы в пробах крови, полученных от контрольных животных (кролики, крысы и мыши). Микробная гиалуронидаза и ронидаза при добавлении в известных концентрациях в плазму крови контрольных животных (кролики, крысы и мыши) оставались активными, по меньшей мере, в течение 24 часов, если образцы хранятся в холодильнике при температуре 4-20 5°C. В течение периода времени 0,5-2 после интраперитонеального введения в мышей микробной гиалуронидазы в дозе 2 г/кг (LD50) активность фермента в плазме крови составляла 17-5,4 МЕ/мл.

25 [00200] После однократного применения на неповрежденной коже кроликов микробной гиалуронидазы и ронидазы в дозах, превышающих терапевтические дозы в 20 и 200 раз, не определяли никакую активность в плазме крови вплоть до 24 часового применения. Однако через 24 часа после введения препаратов наблюдали гиперемию кожи на участке 30 применения, которая была более явной после применения ронидазы. После многократных применений на коже микробной гиалуронидазы и ронидазы в суточных дозах 100 МЕ/кг не наблюдали никакую активность препаратов после пяти или шести дней в плазме крови. Более 35 длительное применение препаратов прерывали вследствие значительной кожной воспалительной реакции на участке применения препаратов. Реакция была более серьезной после применения ронидазы.

40 Выводы

45 [00201] Активность гиалуронидазы можно определить в плазме крови после интраперитонеального введения микробной гиалуронидазы или ронидазы у мышей. После однократного или многократных применений микробной гиалуронидазы или ронидазы на неповрежденной коже у кроликов нельзя было определить никакую активность лекарственного средства в плазме крови в течение 24 часов после последнего применения.

50

ПРИМЕР 5**Экспериментальные исследования фармакокинетической и фармакологической активности мази, содержащей гиалуронидазу и гидрокортизон**

5 [00202] Для решения мышечно-суставных проблем широко применяют мази на основе кортикостероидов, и применение растворимой в воде формы гидрокортизона существенно повышается его биологическую доступность. Безводную форму тестикулярной гиалуронидазы (ронидаза) применяли в попытках улучшить проникновение лекарственного средства. Однако мази на водной основе, которые содержат тестикулярную гиалуронидазу с агентами, такими как детергенты или спирт и т.д. являются неустойчивыми, в то время как основы мазей, которые содержат вазелин, ланолин, поливинилэтанол или производные целлюлозы (метилцеллюлоза, оксипропилцеллюлоза и т.д.) не обеспечивают необходимую водорастворимость.

10
15
20
25
30 [00203] В этом примере описывается разработка гидрофильной мази с гидрокортизоном, которая содержит микробную гиалуронидазу. Лечебный эффект мази основан на взаимодействии гидрокортизона и микробной гиалуронидазы. Гидрокортизон действует как противовоспалительное и противоаллергическое средство. Присутствие микробной гиалуронидазы в мази позволяет существенно снизить необходимую концентрацию гормона по сравнению с мазями, включенными в фармакопею, для получения сопоставимого эффекта. Использование гидрофильной основы, в которой гиалуронидаза из *актиномицетов* (*actinomyces*) является устойчивой, обеспечивает высокую проницаемость для гидрокортизона. Кроме того, исследование эффекта продолжительности хранения на сохранения дисперсии гидрокортизона в мази обнаружило, что длительное хранение не сказывается на свойствах дисперсии.

Материалы и способ

35 [00204] В экспериментах использовали мази, содержащие 0,5% гидрокортизона и 10, 20 или 60 МЕ микробной гиалуронидазы. Для сравнения использовали включенную в фармакопею мазь, содержащую 0,5% гидрокортизона.

40 [00205] **Исследование фармакокинетики.** Это исследование проводили на 14 самцах шиншилловых кроликов весом 3,1-4,3 кг. Два грамма мази равномерно нанесли на лишенную волос область кожи (10x8 см) на боковой стороне тела и спине. Брали многократные пробы крови из ушной вены через 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 и 48 часа после нанесения мази. Кровь центрифугировали в течение 20 мин. при скорости 5000 об./мин., а плазменный уровень гидрокортизона определяли посредством высоко эффективной жидкостной хроматографии (HPLC) (колонка Particeal ODS-2 (4.6x250) с расходом 1,5 мл/мин. и ультрафиолетовым детектированием 254 нм). Стандарты гидрокортизона (1, 5 и 10 мкг/мл)

50

приготовили, применяя плазму крови с коррекцией для начального уровня гормона для каждого кролика. Чувствительность метода была 0,1 мкг/кг с погрешностью $\pm 10\%$. Статистический анализ выполняли, применяя дисперсионный анализ (ANOVA) и критерий Стьюдента.

[00206] *Исследование противовоспалительной активности мази в модели острого воспаления.* Острый отек с распространением экссудативного компонента, вызванного каррагенаном, использовали в качестве модели острого воспаления. Эксперименты проводили на самцах мышей F₁/C57BL_x CBA/ весом 20-25 г. Каждая группа мышей включала 12-14 мышей. Отек вызывали на левой задней конечности посредством инъекции под плантарный апоневроз 0,05 мл 1%-го раствора каррагена в воде. Отек измеряли с использованием плетизмометром для определения объема конечности количеством вытесненной воды (ΔV в мл). Нанесение (полное втирание) мазей, контрольной мази и плацебо в количестве 50 мг в поверхность конечности выполняли через 2, 4 и 6 часов после инъекции каррагена. Измерение объема конечности с помощью плетизмометра выполняли через 3, 5 и 7 часов после введения каррагена. Мышей с инъекцией каррагена, но без лечения, использовали в качестве контроля. Критерий Стьюдента использовали для проведения оценки статистических расхождений, средних значений и стандартных погрешностей рассчитанного среднего значения (sem).

[00207] *Исследование противовоспалительной активности мази в модели хронического воспаления.* Использовали адьювантное воспаление у крыс в качестве модели хронического воспаления. Эксперименты проводили на 64 самцах крыс Уистара весом 150-200 г. Каждая группа состояла из 10-15 животных. Адьювантное воспаление лапы, которое, как известно, приводит к артриту, вызывали одиночной инъекцией 0,2 мл полного адьюванта Фрейнда. В экспериментах использовали животных со средней степенью воспаления. Воспаление контролировали посредством плетизмометрии объема лапы. Животных взвешивали на день 12, 19 и 26 с начала экспериментов. Начиная со дня 12 животным ежедневно наносили на поверхность обеих задних лап исследуемую мазь или контрольную мазь в количестве 250 мг. Критерий Стьюдента использовали для статистического анализа.

[00208] *Оценка терапевтической эффективности мазей на добровольцах.* Группа добровольцев с ревматическим артритом межфаланговых суставов приняла участие в двойном слепом исследовании. Произвольно назначали мази различных композиций, закодированных от 1 до 4. Мази (1-2 г) наносили на пораженные суставы, и дважды в день (утром и вечером) проводили легкий массаж. Продолжительность лечения составляла 14 дней. Для оценки противовоспалительного действия измеряли окружность проксимальных межфаланговых суставов и угол подвижности межфаланговых и трансфалангеальных суставов. Для оценка обезболивающего действия определяли силу схватывания и суставный индекс. Также использовали следующие лабораторные исследования: скорость оседания эритроцитов,

С-реактивный белок, латекс-тест, и определение альфа-2 глобулина, гаммаглобулина, билирубина крови, глюкозы, мочевины, креатинина, ALT, AST и исследование мочи. Все тесты проводили до и спустя две недели после лечения. Критерий Стьюдента использовали для статистического анализа.

Результаты

[00209] **Фармакокинетика.** В Таблице 5 представлены данные по концентрации гидрокортизона. На ФИГ. 13 представлена кинетика гормона в двух группах кроликов: группа 1 (контрольная) получала мазь, включенную в фармакопею, (мазь с 0,5% гидрокортизона), а группа 2 (экспериментальная) получала экспериментальную мазь (0,5% гидрокортизона и 20 МЕ микробной гиалуронидазы).

[00210] В контрольной группе 1 максимальная концентрация гидрокортизона достигалась через 24 часа, а концентрация гидрокортизона в экспериментальной группе 2 достигала максимума через 6 часов, в то время как начальный уровень гормона был сопоставим (0,25±0,13 мкг/мл и 0,22±0,08 мкг/мл, соответственно). В контрольной группе 80% дозы были абсорбированы между 12 и 24 часами после применения. В экспериментальной группе 80% дозы были абсорбированы между 4 и 6 часами. К 28 часам плазменный уровень гидрокортизона начал снижаться и возвратился к начальному уровню через 48 часов.

[00211] Результаты расчета параметров фармакокинетики гидрокортизона в плазме крови кроликов (Таблица 6) демонстрируют, что фармакокинетика в обеих группах существенно отличается по периоду полувыведения и среднему времени удерживания. В контрольной группе концентрация гидрокортизона в первые 12 часов после применения существенно не увеличивалась по сравнению с начальным уровнем; она увеличилась впоследствии примерно в 8 раз через 24 часа, за чем последовало постепенное снижение в течение следующих 4 часов. В экспериментальной группе в течение первых 2 часов после применения увеличение уровня гидрокортизона в плазме крови было незначительным. Вслед за этим было быстрое увеличение в ~38 раз, а затем к 24 часам наблюдали постепенное возвращение к начальному уровню. В каждой группе было большое расхождение в фармакокинетике между отдельными животными, которое частично можно объяснить трудностями в определении точной дозы мази и равномерностью абсорбции лекарственного препарата кожей. Быстрый рост концентрации гормона в экспериментальной группе по всей вероятности происходит вследствие вспомогательного действия микробной гиалуронидазы.

Фармакологическая активность мази

[00212] **Острое воспаление.** Мазь демонстрировала ясные противовоспалительные свойства в модели острого воспаления (Таблица 7). Все три варианта мази с различной концентрацией микробной гиалуронидазы существенно снижали

воспалительный отек по сравнению с контрольной группой. Терапевтический эффект наблюдали в течение 1 часа после применения мази или спустя три часа после введения каррагена. Все три варианта мази с микробной гиалуронидазой относительно аналогичным образом уменьшали объем лапы. Однако динамика терапевтического эффекта мази с 60 МЕ микробной гиалуронидазы демонстрировала более медленный эффект. В пределах нескольких часов мази с 10 и 20 МЕ микробной гиалуронидазы уменьшили объем лапы на 40% и 56% (по сравнению с контрольной группой), соответственно. В то же время мазь с 60 МЕ микробной гиалуронидазы уменьшила объем на 34%. Тем не менее, через 7 часов после инъекции каррагена объем уменьшился на 51% (ФИГ. 14). Активность мази, включенной в фармакопею, (мазь с 0,5% гидрокортизона) проявлялась существенно медленнее и была менее очевидна.

[00213] В этих экспериментах не наблюдали никаких побочных эффектов.

[00214] **Хроническое воспаление.** Ко дню 12 после введения адьюванта объем правых задних лап (где была сделана инъекция адьюванта) у животных во всех группах увеличился на ~60-80% по сравнению с начальным объемом. Объем левой лапы увеличился на ~10-25%. Начиная со дня 12, мази наносили ежедневно на кожу задней лапы в течение 14 дней.

[00215] Результаты представлены в Таблице 8. В экспериментальных группах, которые получали мази с микробной гиалуронидазой, и в группе, которая получала мазь, включенную в фармакопею, наблюдали дальнейшее увеличение объема лапы на 3-10% и 4-17%, соответственно. Тем не менее, в группе без лечения увеличение объема составило 10-22%.

Патоморфология

[00216] **Артрит без лечения.** Форма костей, включая суставы, была изменена. Суставная полость была заполнена пролиферирующими гиперпластическими синовиальными клетками и инфильтрирована множественными клеточными веществами асептического воспаления. Гиперпластическая, часто многослойная, синовиальная оболочка с гипертрофированными ворсинками и волокнистыми отложениями была видна на сохранившихся частях суставной сумки. Рост синовиальной оболочки встречался главным образом вследствие гипертрофии ее волокнистой части. Значительные области гиперпластической рыхлой волокнистой соединительной ткани имели слабые вложения жировой ткани. Все три типа синовиального покрова демонстрировали клеточную гипертрофию. Существенный рост волокна оболочки сопровождался резко выраженным фиброзом субсиновиальных тканей, где среди крупных волокон коллагена были множественные фибробласты и лейкоциты. Обширный паннус (до 1,5 мм в диаметре) наблюдали в субсиновиальной ткани и в гиподерме. В некоторых из них были массы некротического коллагена, другие были пустыми и представляли собой кисты, окруженные

многочисленными фибробластами, грануляцией и грубоволокнистой соединительной тканью в крупных волокнах коллагена. В областях фиброза соединительной ткани отмечали расширенные кровеносные сосуды, окруженные плотной мононуклеарной инфильтрацией. Суставной хрящ сохранился только в некоторых областях поверхности сустава с очагами метаплазии. Около краев кости наблюдали разрушенный хрящ, и на этих участках отмечали рост высококоллагенизированной соединительной ткани. Эта ткань соединялась с синовиальным покровом. Граница между измененным хрящом и синовиальным покровом сохранялась. Увеличенное количество пролиферирующей и гипертрофической ткани в синовиальной сумке подразумевает развитие артроза. Мышечная ткань вокруг сустава была атрофической. Волокнистое изменение включало гиподерму. Эпидермис истончился до 1-2 слоев со слабой кератинизацией. Наблюдали значительную васкуляризацию ткани.

[00217] **Артрит, леченый контрольной мазью.** Кости сустава были деформированы. Суставной хрящ был гипертрофированным. Его первоначальная структура была потеряна. Присутствовали слои слабо дифференцированных клеток с симптомами слабого кальциноза. Краевая кость и хрящ были диффузными. Общая масса ткани хряща уменьшилась. Неплотные ткани хряща и кости связаны с ареолярной покровной тканью. Последняя занимала относительно малые области и увеличила количество клеточных веществ. Ткань сустава была васкуляризирована и инфильтрирована многочисленными мононуклеарными клетками. Во многих областях субсиновиальной фибромы рост сократился. Тем не менее, все еще наблюдали области плотной фиброплазии. Размер пустых кист, которые вытеснили детрит паннуса, уменьшился. Неплотный паннус все еще содержал некротическую ткань. Общая суставная полость была чище, чем в контрольной группе.

[00218] **Артрит, подвергавшийся лечению гидрокортизоном и гиалуронидазой.** Кости были деформированы. Гиперплазия суставного хряща была менее выражена у животных, получавших мазь, включенную в фармакопею, с гидрокортизоном. Тем не менее, хрящ не имеет нормальной структуры и представлен в виде многослойного пласта. В некоторых областях он стал рыхлым (так же как и кость) и превратился в волокнистый покров синовиального пласта. По сравнению с контрольной группой гиперплазия и фиброплазия субсиновиальных и гиподермальных тканей в большей части сустава были намного меньше. Наблюдали большие области пролиферации рыхлой волокнистой соединительной ткани. Мононуклеарная инфильтрация суставной ткани уменьшилась. Стенки паннус были тонкими и не имели плотной концентрической оболочки. Грануляционная ткань субсиновиальных областей гиподермы была ясно видна, и присутствовала некоторая жировая ткань. Гипертрофию ворсинок наблюдали только в редких случаях. Все пролиферирующие ткани были хорошо васкуляризированы. Мышечная ткань была несколько атрофической. Кожа имела нормальную структуру.

[00219] Можно сделать заключение, что экспериментальная мазь с микробной гиалуронидазой и мазью, включенной в фармакопею, уменьшили пролиферацию мононуклеарных клеток и фиброплазию гиперплазированной ткани у крыс с артритом. В 5
обеих группах крыс синовиальная полость увеличилась в объеме вследствие уменьшения пролиферации ткани синовиального покрова по сравнению с крысами, не подвергавшихся лечению.

[00220] Мазь эмульсия типа масло в водес микробной гиалуронидазой вызвала 10
менее интенсивную пролиферацию хряща, более эффективно снизила объем паннуса, фиброплазию и васкуляризацию воспаленных тканей, чем мазь, включенная в фармакопею.

15 **Терапевтическая эффективность мази с гидрокортизоном/гиалуронидазой, испытанная на добровольцах**

[00221] Группа из 40 пациенток, 40-70 лет, принимала участие в исследовании. Все пациенты с 3-16 лет страдали медленно прогрессирующим ревматическим артритом. 20
Шесть пациентов имели легкий воспалительный процесс, 39 пациентов имели умеренный воспалительный процесс, и 3 имели тяжелое воспаление. У всех пациентов были затронуты проксимальные межфаланговые суставы. Рентгенографии продемонстрировали, что повреждения соответствовали стадиям II-III согласно классификации Штайнброчера (рентгеновская классификация повреждения сустава вследствие артрита). 25

[00222] Следующие мази применяли в экспериментах:

1. Гидрокортизон (0,5 %) + микробная гиалуронидаза (20 МЕ/г) + основа;
2. Гидрокортизон (1%) + микробная гиалуронидаза (20 МЕ/г) + основа;
3. Плацебо (только мазевая основа);
4. Мазь с гидрокортизоном (1%, включенная в фармакопею)

[00223] Изменения в клинических данных в течение лечения представлены в 35
Таблице 9. Мази 1 и 2 показали благотворный терапевтический эффект. У этих пациентов подвижность в поврежденных суставах увеличилась на 10°, сила схватывания увеличилась до 30 мм ртутного столба, суставной индекс уменьшился на больше чем 2, а окружность межфаланговых суставов уменьшился на 6 мм. Мази 1 и 2 были одинаково эффективны. Все 40
пациенты, которые проходили лечение этими мазями, отметили заметные улучшения. Мази 3 и 4 не проявили терапевтическую активность.

[00224] Во время лечения не были отмечены случаи побочных эффектов. 45
Лабораторные исследования не изменялись существенно (Таблица 10). Исследования функций почек и печени и анализы мочи были в пределах нормы (Таблица 11).

Заключения

[00225] Фармакокинетическое исследование продемонстрировало, что биологическая доступность мази, включая микробную гиалуронидазу, была выше, чем биологическая доступность мази, включенной в фармакопею, с гидрокортизоном. Мазь с микробной гиалуронидазой обеспечила более быстрое проникновение через кожу и более высокие уровни гидрокортизона в крови. Кроме того, результаты исследования удельной активности мази с гидрокортизоном и микробной гиалуронидазой в модели острого воспалительного отека показывают более мощное и быстрое противовоспалительное действие по сравнению со стандартной мазью с 0,5% гидрокортизона. Кроме того, применение мази с гидрокортизоном и микробной гиалуронидазой на крысах с хроническим воспалением продемонстрировало, что мазь замедляет развитие адьювантного артрита. Исследование продемонстрировало, что мазь оказывает явные противовоспалительные и болеутоляющие эффекты, улучшает функциональные индексы поврежденных суставов и рекомендуется для лечения пациентов с артритом в качестве симптоматического лекарственного средства в комбинации со стандартной терапией.

ТАБЛИЦА 5

Концентрация гидрокортизона в плазме крови кроликов в различные моменты времени после нанесения мази с или без микробной гиалуронидазы

Время после нанесения (часы)	Концентрация гидрокортизона (мкг/мл)	
	Мазь без гиалуронидазы	Мазь с гидрокортизоном
0	0.25±0.13	0.22±0.08
0.5	-	0.48±0.18
1	0.47±0.16	0.77±0.18
2	-	0.22±0.14
4	0.26±0.09	2.02±1.17
6	0.23±12	8.54±8.29
8	0.12±0.02	7.1±3.49
12	0.66±0.59	1.39±0.39
24	2.07±1.37	0.33±0.12
28	0.002±0.002	0.014±0.002

ТАБЛИЦА 6**Фармакокинетика гидрокортизона**

Параметры	Мазь с гиалуронидазой	Мазь без гидрокортизона
Полувыведение (часы)	0.40±0.01	2.37±0.14*
Время удерживания (часы)	17.0±2.7	7.89±0.56*
СI (мл/мин.)	7.78±7.42	3.78±1.45
V (л/ч)	7.95±5.58	1.79±0.76
AIS (мкг ч/мл)	21.4±14.6	44.0±14.3

* p<0.01

ТАБЛИЦА 7**Изменения в отеке задней лапы, вызванном каррагеном, после нанесения мази с различными концентрациями гиалуронидазы**

Группа	Объем Δ	Среднее значение ± sem и Δ V% изменений объема задней лапы по сравнению с исходным объемом			
		Начальн.	через 3 часа	через 5 часов	через 7 часов
Контрольная	V	0.21±0.01	0.41±0.02	0.40±0.02	0.32±0.02
	%	0	95	90	52
0,5% гидрокортизона 10 МЕ гиалуронидазы	V	0.20±0.01	0.31±0.01	0.32±0.02	0.26±0.01
	%	0	55	60	30
Контрольная	V	0.17±0.01	0.38±0.02	0.34±0.02	0.33±0.02
	%	0	124	100	88
0,5% гидрокортизона 20 МЕ гиалуронидазы	V	0.19±0.01	0.32±0.02	0.30±0.02	0.29±0.01
	%	0	68	58	55
Контрольная	V	0.22±0.01	0.38±0.02	0.37±0.02	0.38±0.02
	%	0	73	68	73
0,5% гидрокортизона 60 МЕ гиалуронидазы	V	0.23±0.01	0.32±0.02	0.30±0.01	0.28±0.01
	%	0	39	30	22
0,5% гидрокортизона	V	0.22±0.01	0.37±0.01	0.33±0.01	0.31±0.04
	%	0	68	50	41

ТАБЛИЦА 8

Эффекты мази с гидрокортизоном и гиалуронидазой из *актиномицетов (actinomyces)* по сравнению с эффектами мази, включенной в фармакопею, с гидрокортизоном на адьювантный артрит

#	День эксперимента	Объем правой лапы (мл) m+sem	Объем левой лапы (мл) m+sem	Объем задних лап (мл) m+sem
Мазь с гидрокортизоном и гиалуронидазой из <i>актиномицетов (actinomyces)</i>				
1	0	1.63+0.16	1.64+0.14	1.64+0.16
2	12	2.58+0.18	1.95+0.21	2.26+0.25
		100%	100%	100%
3	19	2.6+0.23	1.93+0.22	2.27+0.19
		101%	99%	100%
4	26	2.84+0.19	2.0+0.18	2.42+0.23
		110%	103%	107%
Мазь, включенная в фармакопею, с гидрокортизоном				
1	0	1.6+0.17	1.55+0.21	1.57+0.20
2	12	2.54+0.28	1.68+0.23	2.11+0.25
		100%	100%	100%
3	19	2.52+0.21	1.85+0.19	2.19+0.24
		99%	108%	104%
4	26	2.65+0.37	1.97+0.23	2.31+0.41
		104%	117%	109%
Контроль				
1	0	1.44+0.21	1.47+0.24	1.45+0.21
2	12	2.58+0.22	1.85+0.19	2.22+0.23
		100%	100%	100%
3	19	2.84+0.23	1.91+0.21	2.38+0.18
		110%	103%	107%
4	26	3.16+0.19	2.18+0.26	2.67+0.31
		122%*	118%	120%

* p<0.05

ТАБЛИЦА 9

**Динамика симптомов у пациентов, страдающих ревматическим артритом и
проходивших лечение различными мазями (см. текст)**

Симптом	Мазь №1 (n=15)		Мазь №2 (n=15)		Мазь №3 (n=8)		Мазь №4 (n=10)	
	до	после	до	после	до	после	до	после
Подвижность трансфалангеальных суставов (градусы)	60.9+4.8	70.9+5.0*	52.9+4.3	70.7+3.1*	59.3+4.7	59.5+5.1	53.2+6.4	53.7+5.0
Подвижность межфаланговых суставов (градусы)	80.3+4.7	87.7+4.0	87.5+3.6	90.5+3.4	83.2+6.2	82.0+4.9	67.7+6.6	68.1+6.5
Окружность межфаланговых суставов (мм)	269+7.2	263+6.1	278+6.4	272+5.0	273+6.4	272+6.4	278+5.3	278+7.7
Показатель суставного индекса	4.4+0.9	2.0+0.5*	5.7+1.0	3.8+0.9*	3.0+0.4	5.3+1.2	6.2+1.3	6.0+1.1
Сила схватывания (мм ртутного столба)	46.4+11.1	74.7+13.7	23.7+10.1	55.3+9.5*	48.0+3.8	46.3+4.7	31.1+6.7	28.5+6.4

* p<0.05

ТАБЛИЦА 10

**Динамика лабораторных данных у пациентов, страдающих ревматическим артритом и
проходивших лечение различными мазями (см. текст)**

	Мазь №1 (n=15)		Мазь №2 (n=15)		Мазь №3 (n=8)		Мазь №4 (n=10)	
	до	после	до	после	до	после	до	после
Hb (ммоль/л)	125+5.8	123+6.1	122+3.8	124+3.6	124+3.2	125+3.2	125+6.3	123+4.5
ESR (мм/ч)	28.5+3.9	20.8+2.7	28.5+5.5	20.1+3.6	24.0+2.4	20.8+2.3	23.6+3.2	20.4+4.6
Серомукоид (U)	0.30+0.03	0.288+0.03	0.266+0.02	0.223+0.12	0.292+0.06	0.268+0.05	0.243+0.05	0.235+0.04
C-реактивный белок	1.2+0.25	1.0+0.23	0.7+0.2	0.5+0.1	1.0+0.2	0.8+0.1	0.8+0.1	0.6+0.1
Ревматоидный фактор	51+4.6	40+4.7	38+3.9	27+3.2	38+3.8	42+4.9	42+4.5	38+3.9

Белок (ммоль/л)	80+1.6	78.6+1.1	86+1.9	88+1.3	87+3.5	84+2.8	84+1.6	87+1.5
гамма ₂ - глобулин (%)	13.0+0.4	12.0+0.3	12.9+0.4	12.3+0.3	11.9+0.2	10.9+0.3	12.1+0.5	11.9+0.6
гамма- глобулин	23.0+0.4	22.3+0.4	22.2+0.6	21.9+0.5	19.2+0.3	19.5+0.2	22.1+0.3	21.6+0.4

* p<0.05

ТАБЛИЦА 11

**Динамика лабораторных данных у пациентов, страдающих ревматическим артритом и
проходивших лечение различными мазями (см. текст)**

Лабораторный анализ	Мазь №1 (n=15)		Мазь №2 (n=15)		Мазь №3 (n=8)		Мазь №4 (n=10)	
	до	после	до	после	до	после	до	после
Глюкоза (ммоль/л)	4.8+0.3	4.7+0.4	4.6+0.4	4.8+0.5	4.7+0.2	4.5+0.2	4.9+0.3	4.6+0.3
Мочевина (ммоль/л)	5.5+0.7	4.9+0.4	4.7+0.4	4.5+0.3	8.6+0.5	8.2+0.4	5.3+0.6	5.2+0.4
Креатинин (ммоль/л)	119+12	109+8.8	106+11	98+9.6	121+5.0	116+6.2	108+6.8	98.7+4.1
Билирубин (ммоль/л)	8.7+1.5	8.5+1.4	8.2+1.2	6.8+1.3	13.0+0.7	11.2+0.6	8.3+1.2	8.2+1.3
ALT (Уп)	0.35+0.05	0.41+0.1	0.43+0.02	0.41+0.03	0.46+0.01	0.47+0.04	0.42+0.02	0.40+0.01
AST (Уп)	0.51+0.02	0.50+0.03	0.46+0.04	0.47+0.02	0.61+0.02	0.49+0.03	0.48+0.02	0.46+0.01

* p<0.05

ПРИМЕР 6**Исследования In Vitro и In Vivo микробной гиалуронидазы**

[00226] Этот Пример описывает различные исследования *in vitro* и *in vivo* микробной гиалуронидазы из *Streptomyces actinocidus*, такие как исследования удельной активности лекарственных препаратов *in vitro* и физических и химических свойств лекарственного средства. Лидаза и ронидаза - два основных препарата, содержащих гиалуронидазы и используемых в клинической практике. Оба вещества получают из бычьего яйца. Лидаза представляет собой препарат гиалуронидазы высокой очистки, используемый для парентерального введения, в то время как ронидаза представляет собой препарат менее высокой очистки, который применяется наружно. Альтернативный лекарственный препарат

гиалуронидазы разработан на данный момент. Гиалуронидаза, используемая в препарате, продуцируется штаммом *Streptomyces actinocidus*.

5

Удельная активность *In Vitro* и физические и химические свойства

10

15

[00227] В этом разделе описываются фармакологические и химические свойства гиалуронидазы микробного происхождения и ронидазы (гиалуронидазы животного происхождения). Исследование проводили для оценки медицинских свойств микробной гиалуронидазы по сравнению с ронидазой. В экспериментах использовали стандартные партии ронидазы и микробной гиалуронидазы. В химических реакциях использовали химически чистые гиалуронат калия, тетраборат калия, *n*-(диметиламино)-бензальдегид, *N*-ацетил-*D*-глюкозамин и неорганические химические вещества.

Материалы и способы

20

25

30

[00228] **Определение активности гиалуронидазы препаратов.** Способ основывался на спектрофотометрическом измерении количества продуктов гидролиза субстрата (гиалуронат калия) гиалуронидазой. Для измерения использовали следующие химические вещества: 0.1М калий фосфатный буфер (рН 6.5), который содержит 0.2 М хлорид натрия; 0.8 М раствор борнокислого натрия; реагент Эрлиха (приготовленный следующим образом: 10 г *n*-(диметиламино)-бензальдегида растворили в небольшом количестве ледяной уксусной кислоты, добавили 12,5 мл концентрированной соляной кислоты, с последующим добавлением дополнительной ледяной уксусной кислотой до получения объема 100 мл; и разбавлением экспериментального реагента концентрированной уксусной кислотой в пропорции 1:9 (до его разведения); 0,2% гиалуронат калия в 0.1М калий фосфатном буфере (рН 6.5); и стандартный раствор *N*-ацетил-*D*-глюкозамина, 0,4% в 0.1М калий фосфатном буфере (рН 6.5) (1 мл раствора содержит 1,82 мкМ *N*-ацетил-*D*-глюкозамина).

35

40

45

50

[00229] Для определения активности гиалуронидазы образец лекарственного средства растворили в 0.1М калий фосфатном буфере. Образцы, содержащие 0,3 мл раствора субстрата и 0,2 мл раствора лекарственного средства (0,2 мл буфера использовали в качестве контроля), инкубировали при температуре 37°C в течение 15 минут. Затем в каждый образец добавили 0,2 мл раствора тетрабората калия. Образцы выдержали в кипящей ванне в течение 3 мин. и охладили. Реагент Эрлиха (3 мл) добавили в каждый образец. Образцы инкубировали при температуре 37°C в течение 20 мин. Насыщенность малинового цвета образцов была прямо пропорциональна количеству продуктов гидролиза, которые содержат *N*-ацетил-*D*-глюкозамин в конечной части. Оптическую плотность образцов измеряли спектрофотометрией при 582 нм по сравнению с контрольным образцом. Аналогичным образом выполняли ряд разбавлений стандартного раствора (начиная с добавления тетрабората натрия). Строили калибровочную кривую для зависимости оптической плотности образца и

количества продуктов гидролиза гиалуроновой кислоты. Концентрацию N-ацетил-D-глюкозамина в экспериментальных образцах определяли по этой кривой.

[00230] Активность гиалуронидазы рассчитывали в соответствии со следующей формулой:

$$A = \frac{m \times d \times 2.5 \times 1000}{T \times n} \text{ ME/г}$$

где: m - концентрация сформированного N-ацетил-D-глюкозамина в мкМ; D - разбавление ферментного раствора; T - время реакции в минутах; n - количество лекарственного средства; 2.5 - отношение объемов реакционной смеси и ферментного раствора; 1000 - коэффициент преобразования в ME.

[00231] *Определение разрешимости лекарственного средства.* Образцы препаратов растворили в известном объеме дистиллированной воды и размешивали электромагнитной мешалкой при комнатной температуре в течение 15 минут. Осадок отделяли фильтрацией. Фильтр с известным начальным весом высушили при температуре 37°C до стабилизированного веса. Рассчитывали вес вещества, оставшегося в растворе. Результаты выразили в мг/мл воды.

[00232] *Взаимодействие ронидазы и микробной гиалуронидазы с гиалуроновой кислотой при различных условиях.* В этих экспериментах калийную соль гиалуроновой кислоты использовали вместо гиалуроновой кислоты, которая является естественным биосубстратом для гиалуронидазы.

Результаты

[00233] Результаты определения активности представлены в Таблице 12.

ТАБЛИЦА 12**Активность микробной гиалуронидазы и ронидазы, отобранных из различных партий**

5

10

15

20

Фермент	Партия	Активность фермента, МЕ/г	
		Указанная	Определенная
Микробный фермент	II	2200	2154±8
	III	2000	1957±6
	IV	2600	2665±14
	V	2400	2377±11
Ронидаз а	121286	300	254±3
	020786	300	225±5

25

30

[00234] Результаты продемонстрировали близкое соответствие между указанными и экспериментальными данными по препарату. Удельная активность микробного фермента была приблизительно в 8-10 раз выше, чем удельная активность ронидазы. Определение активности обоих ферментов выполняли при рН 6.5 (ронидаза показывает максимальную активность при рН 4.5). Это было выполнено для стандартизации условия исследования препаратов и использования значения рН близкого к нормальным физиологическим значениям рН, при которых будут применять препараты.

Определение оптимального значения рН

35

40

45

50

[00235] Это исследование проводили в 0.1М калий фосфатном буфере, используемом для приготовления субстрата и ферментов. Эта буферная система обеспечивает интервал рН от 4.5 до 8.5. Результаты представлены в Таблице 13.

ТАБЛИЦА 13
Влияние pH на активность

5

10

15

pH среды	Активность (МЕ/г)	
	Ронидаза	Микробная гиалуронидаза
	355±4	1575 ±10
4.5		
5.5	300±4	2309±9
6.5	245±2	2665±3
7.5	140±8	2133±7
8.5	95±9	1184±5

20

[00236] Оптимальное значение pH для активности ронидазы было равно или менее 4.5 (при более низком значении pH было невозможно определить активность гиалуронидазы этим методом). Оптимальное значение pH для активности микробной гиалуронидазы было приблизительно 6.5, что близко к физиологическому pH.

25

Определение оптимального значения температуры

30

[00237] Реакционные смеси инкубировали при различных температурах (20-60°C) при стандартных условиях. Результаты представлены в Таблице 14.

35

40

45

50

ТАБЛИЦА 14

Зависимость удельной активности ронидазы и микробной гиалуронидазы от температуре питательной среды

5

10

15

20

Температура (°C)	Активность (МЕ/г препарата)	
	Ронидаза	Микробная гиалуронидаза
30	140±4	1566±6
37	210±2	2550±7
45	225±5	2908±8
60	155±3	3579±11
75	35±2	1210±10

25

[00238] Активность обоих ферментов зависела от температуры. Активность ронидазы была менее зависима от температуры, чем активность гиалуронидазы из *actinocidus*. Ронидаза показала максимальную активность при температуре 45°C, которая относительно близка к нормальным условиям (37°C).

30

[00239] Характер температурной зависимости гиалуронидазы из *actinocidus* сильно напоминал температурные свойства других ферментов микробного происхождения с температурным оптимальным значением 60°C. При температуре 37°C были сохранены приблизительно 70% активности гиалуронидазы из *actinocidus*.

35

[00240] Снижение активности обоих ферментов при температуре в 75°C, вероятно, происходило вследствие постепенной денатурации белковой части молекулы фермента.

Стабильность

40

[00241] В первой серии экспериментов определяли стабильность растворов препаратов (то есть способность поддерживать свою активность) в течение длительного воздействия комнатной температуры. Образцы растворили в 0.1М калий фосфатном буфере и определяли начальную активность. Определение активности повторили через 24 и 48 часов. Результаты представлены в таблице 1.2.4 (а).

45

50

ТАБЛИЦА 15

Зависящие от времени изменения активности в растворе, хранящемся при комнатной температуре

5

10

15

Время	Активность вещества, МЕ/г	
	Ронидаза	Микробная гиалуронидаза
Начальн.	225±5	2260±6
Через 24 часов	206±3	1892±12
Через 48 часов	103±8	1227±10

20

[00242] Стабильность препаратов в растворе, хранящемся при комнатной температуре, была сопоставима. Через 48 часов активность уменьшилась примерно на 50%.

25

[00243] Во второй серии экспериментов определяли термоустойчивость препаратов. Растворы инкубировали при различной температуре в течение 30 минут. После инкубации измеряли удельную активность растворенных ферментов. Результаты представлены в Таблице 16.

30

35

40

45

50

ТАБЛИЦА 16

Удельная активность после 30 мин. инкубации при различных температурах

5

10

15

Температура инкубации	Активность раствора, МЕ/г	
	Ронидаза	Микробная гиалуронидаза
Перед инкубацией	254±3.5	21152±8
50°C	197±4	19453±6
75°C	80±5	584±10.5
100°C	0	0

20

[00244] Увеличение инкубационной температуры приводило к инаktivации ферментов. После инкубации при температуре 75°C оставшаяся активность составляла приблизительно 27-30%. Вся активность была потеряна после инкубации при температуре 100°C.

25

Значение pH растворов фермента

[00245] Вещества растворили в дистиллированной воде с начальным значением pH 6.2. Нерастворенные компоненты разделяли фильтрацией. Результаты представлены в Таблице 17.

30

ТАБЛИЦА 17**Значение pH растворов фермента**

35

40

Концентрация фермента (мг/мл)	Ронидаза (pH)	Микробная гиалуронидаза (pH)
1	6.2	7.9
5	6.3	8.0
10	6.3	8.1
25	6.35	8.2

45

[00246] Исследовали три различные партии каждого лекарственного средства. Значение pH растворов, приготовленных из различных партий, было сопоставимо (наблюдаемые различия находились в пределах погрешности метода). Значение pH только в незначительной мере зависело от концентрации лекарственного средства. Растворы ронидазы

50

5 имели слабую кислую реакцию, которая близка к значению pH дистиллированной воды. Микробная гиалуронидаза из *Streptomyces actinocidus* имела щелочную реакцию. Поэтому необходимо принять во внимание щелочную реакцию раствора, когда оценивается местная кожная реакция после наружного применения.

Растворимость лекарственных средств

10 [00247] Исследовали три различные партии микробной гиалуронидазы и ронидазы, соответственно. Микробная гиалуронидаза при концентрациях от 1 до 200 мг/мл в случае растворения в дистиллированной воде или в 0.1М фосфате калия (pH 6.5) давала в результате растворы, имеющие цвет от желтого до темно-коричневого. Раствор высокой 15 концентрации имел слегка опаловый цвет и тонкую неосаждающуюся коллоидную суспензию. Раствор ронидазы содержал нерастворимое вещество в дистиллированной воде или 0.1М калий фосфатном буфере в количестве 40-52% (по весу). Эти примеси мешали проводить измерение активности фермента (они продуцировали ошибочные показания в ходе спектрофотометрии). 20 В экспериментах на животных нельзя вводить такие компоненты, поэтому во всех экспериментах необходимо было отфильтровывать твердый компонент. Поэтому указанная концентрация ронидазы, используемой в экспериментах на животных, (мг/мл) относится к исходному количеству сухого препарата. В экспериментах использовали только жидкую часть, 25 остающуюся после фильтрации.

Влияния ферментов на изолированные органы и ткани животного происхождения

30 [00248] Цель этой части работы состояла в том, чтобы сравнить взаимодействие ронидазы и гиалуронидазы из *Streptomyces actinocidus* с их природным субстратом - гиалуроновой кислотой как элементом животной ткани. Для экспериментов были выбраны органы с естественными высокими уровнями гиалуроновой кислоты: Пуповина 35 новорожденного, *стекловидное тело* глаза и кожа (намеченная цель этих препаратов).

Материалы и способы

40 [00249] В экспериментах использовали пуповину новорожденного человека, глазные яблоки или *стекловидное тело* кролика и кожу кролика. Все ткани были получены непосредственно после препарирования.

45 [00250] *Исследование гидролиза гиалуроновой кислоты биологической ткани.* Образцы тканей препарировали, взвешивали и помещали в растворы с различной концентрацией ферментов в 0.1М калий фосфатном буфере (pH 6.5) и 0.2 М хлориде натрия и инкубировали при температуре 37°C. Количество *стекловидного тела* было выражено в мл.

50 [00251] После инкубации образцы химически активной смеси брали для исследования. Интенсивность гидролиза оценивали на основании накопления N-ацетил-D-

5 глюкозамина (NADG) (начальный шаг добавления фермента к гиалуронату калия калиевому был исключен). Результаты выразили в мкМ N-ацетил-D-глюкозамина (NADG) на 1 мл химически активной смеси (отношение ((масса субстрата) / (объем инкубационной питательной среды))) было постоянным).

10 [00252] **Измерение непрозрачности растворов.** Нефелометрию использовали для количественного анализа непрозрачности растворов, содержащих взвешенные частицы. Результаты выразили в условных оптических единицах.

15 [00253] **Определение механических свойств биологических тканей.** Измеряли прочность при растяжении человеческой пуповины и кожи кролика. После промывки фосфатным буфером пуповину рассекли на части длиной 1 см и подвергали воздействию ферментов. После воздействия ферментов образцы промокали досуха и подвешивали за крюки. Один крюк зафиксировали, второй крюк присоединили к динамометру. Образцы растягивали до разрушения и фиксировали прилагаемое усилие в кг.

20 [00254] У кроликов за два дня до эвтаназии с части кожи удалили волосы с помощью 10%-го раствора сульфита натрия. После эвтаназии нарезали полосы кожи с удаленными волосами, размером 1 x 2 см. Вдоль средней линии образца выполняли удлиненный разрез. Два крюка вставили через разрез и определили прочность при растяжении, как описано выше.

Результаты

30 [00255] **Исследование пуповины.** Эти эксперименты исследовали гидролиз гиалуроновой кислоты пуповины под действием ронидазы и микробной гиалуронидазы. Пуповину промыли фосфатным буфером (рН 6.5), рассекли на образцы весом приблизительно 0,5 грамма каждый и помещали в пробирку с раствором фермента. Добавили 10 - 200 МЕ препаратов на каждый 1 мг субстрата в 1 мл фосфатного буфера на 100 мг образца. Образцы 35 инкубировали при температуре 37°C в течение 15 часов в вибраторе. В конце инкубации определяли количество N-ацетил-D-глюкозамина (NADG) в питательной среде. Результаты представлены в Таблице 18.

ТАБЛИЦА 18

Количество N-ацетил-D-глюкозамина в инкубационной питательной среде после применения препаратов, содержащих гиалуронидазу, на образцах пуповины

5

10

15

Количество фермента (МЕ/мг субстрата)	Концентрация N-ацетил-D-глюкозамина (NADG) в инкубационной питательной среде (мкМ/мл)	
	Ронидаза	Микробная гиалуронидаза
0.05	0.015±0.006	0.020±0.009
0.2	0.093±0.014	0.086±0.018
2	0.266±0.013	0.210±0.022
5	0.520±0.028	0.479±0.012

20

25

[00256] Гиалуроновая кислота пуповины была аналогичным образом доступна для активности обоих препаратов. Для контроля неспецифического гидролиза подобные эксперименты провели после инактивации ферментов кипячением в течение 30 мин. N-ацетил-D-глюкозамин (NADG) не обнаружили после инкубации с ферментами, инактивированными кипячением. Наблюдали, что после инкубации питательная среда становилась мутной пропорционально количеству добавленного фермента. Для анализа изменений в непрозрачности реактивной смеси образцы подвергали нефелометрии.

30

35

40

[00257] *Нефелометрия.* Провели измерение инкубационной питательной среды после введения ронидазы и микробной гиалуронидазы в ткань пуповины. После инкубации прозрачная реактивная питательная среда помутнела вследствие появления слегка опаловой суспензии. Степень непрозрачности питательной среды измеряли способом фотометрии в двух сериях образцов, которые содержали препараты активного фермента или ферменты, инактивированные кипячением в водяной бане в течение 30 минут (в качестве контроля), соответственно. Образцы, которые содержали только субстрат и фосфатный буфер в количестве, подобном экспериментальным образцам, использовали в качестве оптического контроля. Результаты представлены в Таблице 19.

45

50

ТАБЛИЦА 19

Изменения в непрозрачности инкубационной среды после добавления в субстрат (ткань пуповины) растворов фермента

5

10

15

Концентрация фермента	Непрозрачность инкубационной среды (оптические единицы)	
	Ронидаза	Микробная гиалуронидаза
0.05	0.350±0.20	0.335±0.50
0.2	0.530±0.50	0.420±0.35
2	0.745±0.45	0.695±0.20
5	0.1070±0.30	0.865±0.55

20

25

[00258] Непрозрачность инкубационной питательной среды повысилась пропорционально степени гидролиза субстрата. Изменения в увеличении непрозрачности были сопоставимы после применения ронидазы и микробной гиалуронидазы. Разложение гиалуроновой кислоты пуповины под действием ферментов, вероятно, сопровождается разрушением ткани субстрата, что приводит к появлению мелких частиц в инкубационной питательной среде.

Механическая прочность пуповины после ферментативной обработки

30

35

[00259] Повреждение структуры ткани пуповины вследствие гидролиза гиалуроновой кислоты может привести к изменениям в механических свойствах ткани. Для оценки воздействий гиалуронидазы из *Streptomyces actinocidus* и ронидазы на структурной устойчивости ткани проверили прочность при растяжении пуповины после обработки ферментами.

40

45

[00260] Пуповину промыли в фосфатном буфере, рассекли на образцы размером 1 см и взвешивали. Выборки помещали в пробирки с растворами ронидазы или микробного фермента (1 мл раствора / 100 миллиграммов субстрата). Одиночный фосфатный буфер использовали в качестве контрольного раствора. Пробирки инкубировали в вибраторе при температуре 37°C в течение 15 часов. После инкубации образцы промокали досуха и измеряли их прочность при растяжении. Результаты представлены в Таблице 20.

50

ТАБЛИЦА 20**Результаты определения механической прочности ткани пуповины после применения гиалуронидазы**

5

Концентрация фермента (МЕ/мл)	Максимальное усилие при разрушении (кг)		
	Ронидаза	Микробная гиалуронидаза	Фосфатный буфер
10	1.08±0.808	1.06±0.04	1.18±0.09
20	0.86±0.045*	0.90±0.05*	1.26±0.11

15

* p< 0.05

[00261] Применение препаратов в относительно высокой концентрации снизило механическую прочность ткани пуповины на 25-30%. Эти концентрации в 400 раз превышали предельную концентрацию, при которой может быть определен N-ацетил-D-глюкозамин (NADG).

20

Воздействия ферментов на изолированные глазные яблоки и стекловидное тело

25

[00262] *Воздействия ферментов на изолированные глазные яблоки.* В экспериментах использовали глазные яблоки кроликов. Взвешенные глазные яблоки помещали в раствор ронидазы или микробной гиалуронидазы, или фосфатного буфера (который использовали для растворения препаратов) в количестве 1 мл раствора / 100 миллиграммов субстрата и инкубировали в вибратор в течение 15 часов при температуре 37°C. Не обнаружили никакие следы N-ацетил-D-глюкозамина (NADG) (продукт гидролиза гиалуроновой кислоты) в питательной среде после инкубации, даже когда концентрация ферментов составляла 10 МЕ/мл. Был сделан вывод о том, что растворы фермента не проникают в глазное яблоко.

30

35

[00263] *Воздействия на изолированное стекловидное тело глазного яблока кролика.* Стекловидное тело почти полностью состоит из гиалуроновой кислоты. Стекловидное тело извлекли из глаза в виде геля. Полученный гель 10 раз центрифугировали и растворяли с помощью фосфатного буфера. Полученный раствор использовали в качестве субстрата для ферментной реакции, которую реализовали аналогично определению активности гиалуронидазы, как описано выше. Результаты представлены в Таблице 21.

40

45

50

ТАБЛИЦА 21

Содержание N-ацетил-D-глюкозамина в инкубационной питательной среде после применения ферментов к *стекловидному телу* глазных яблок

5

10

15

20

Концентрация фермента (МЕ/мл разбавленного субстрата)	Концентрация N-ацетил-D-глюкозамина (NADG) в инкубационной питательной среде (мкМ/мл)	
	Ронидаза	Микробная гиалуронидаза
0.05	0.040±0.00	0.065±0.008
0.2	0.125±0.015	0.205±0.006
2	0.86±0.009	1.116±0.012

25

[00264] Оба лекарственных средства эффективно гидролизировали гиалуроновую кислоту, которая является компонентом, естественно встречающимся в *стекловидном теле* глазного яблока.

Воздействия на кожу кроликов

30

35

[00265] Кожу кроликов с удаленным волосяным покровом рассекли на образцы размером 1 × 2 см. Каждый образец взвешивали, помещали в пробирку и добавили раствор ронидазы или микробной гиалуронидазы (0,1 - 10 МЕ/мл), или фосфатный буфер в количестве 1 мл/100 миллиграмм субстрата. Образцы инкубировали при температуре 37°C в течение 15 часов в вибраторе. Исследование инкубационной питательной среды не выявило продукты гидролиза гиалуроновой кислоты (NADG).

40

[00266] Прочность при растяжении образцов после инкубации с любым из ферментов (20 МЕ/100 мг субстрата) не отличалась от образцов, инкубированных с фосфатным буфером.

Удельная активность *In Vivo*

45

[00267] Эксперименты проводили на обычных кроликах обоих полов (вес тела составлял приблизительно 3 кг).

Материалы и способы

50

[00268] **Измерение проницаемости кровеносных сосудов кожи.** С кожи удаляли волосы с помощью 10% сульфита натрия. За внутрикожной инъекцией растворов

ронидазы или микробной гиалуронидазы (0,2 мл) в область с удаленным волосяным покровом следовала внутривенная инъекция трипанового синего красителя (1%, 2 мл/кг). Физиологический раствор вводили внутривожно контрольным кроликам. Отслеживали синюю окраску кожи на участке внутривожной инъекции. Фиксировали латентность появления окраски, интенсивность и размер окрашенной области.

[00269] *Рубцы после ожогов* (Модель экспериментальной патологии). Оценка прочности при растяжении рубцовой ткани. С кожи на боковой стороне туловища удаляли волосы с помощью 10%-го сульфата натрия. Под анестезией с гексеналом (5%, 0,5 мл/кг) было нанесено ограниченное ожоговое повреждение. Площадь повреждения (ожог IV степени) составляла приблизительно 32 см². Звездообразные рубцы образовались через 1,5-2 месяца на месте ожогов. Для оценки прочности при растяжении рубцовой ткани кроликов подвергали эвтаназии и вырезали рубцовую ткань. Рубцовую ткань разрезали на полосы размером 2×3 см с ориентацией вдоль длинной оси. На обеих длинных сторонах вырезали треугольные кусочки таким образом, чтобы средняя часть полосы кожи была шириной 1 см. Оба конца шириной 2 см фиксировали в зажимах. Полосы растягивали до разрушения и фиксировали прилагаемое усилие в кг.

Результаты

[00270] *Воздействия ронидазы и микробной гиалуронидазы на проницаемость сосудов кожи.* Изменения проницаемости капилляров кожи в областях внутривожных инъекций ферментов оценивали по появлению синей окраски кожи после внутривожной инъекции трипанового синего красителя. Латентность появления окраски, ее интенсивность и размер окрашенной области представлены в таблице 3.2.

ТАБЛИЦА 22**Изменения проницаемости кровеносных сосудов кожи**

5

10

15

20

Лекарственное средство	Концентрация лекарственного средства (МЕ/мл)	Латентность появления окраски		Интенсивность окраски	Площадь окрашенной зоны (см ²)
		Слабое окрашивание	Интенсивное окрашивание		
Микробная гиалуронидаза	100	15±1.8	55±4.2	++++	9±1.1
	50	28±2.3	68±8.5	+++	6±0.8
	20	45±3.0	76±3.6	+	4.5±1.2
Ронидаза	100	12±2.2	46±2.8	++++	9±1.1
	50	20±1.0	52±5.7	+++	6±0.75
	20	370±3.1	69±2.7	++	3±1.4
Физиологический раствор	-	-	-	0	0

25

++++ темно-синяя окраска; +++ синяя окраска; светло-синяя ++; + очень светло-синяя; 0 окраска отсутствует.

30

[00271] Ввод обоих ферментов увеличил проницаемость сосудов кожи в участке инъекции. Рост проницаемости был сопоставим для обоих препаратов и пропорционален концентрации введенного раствора. Слабая тенденция к увеличенной проницаемости после введения ронидазы по сравнению с гиалуронидазой из *actinocidus* можно объяснить наличием значительного количества примесей в ронидазе.

35

Эксперимент воздействия на ожоговые рубцы

40

[00272] Рубцовая ткань кожи насыщена гиалуроновой кислотой. Наличие гиалуроновой кислоты в рубцах обуславливает их твердость и плотность по сравнению с нормальной кожей. Это является причиной применения препаратов, содержащих гиалуронидазу, для лечения различных рубцов, контрактур или для подготовки к операции на коже и т.д.

45

[00273] Для оценки удельной активности препаратов использовали модель ожоговых рубцов у кроликов. Для экспериментов отбирали кроликов с сопоставимыми рубцами (линейность, сопоставимый размер и продолжительность заживления). Препараты вводили в виде инъекций в рубцы (внутрикожные инъекции, 0,2 мл / 2 см длины рубца) три раза в течение 7 дней (каждый третий день). Контрольные животные получали инъекции

50

физиологического раствора. Перед вводом препаратов с кожи вокруг рубцов удаляли волосы с помощью сульфата натрия (10%). На следующий день после последней инъекции кроликов подвергали эвтаназии, а рубцы вырезали. Часть каждого образца использовали для определения прочности при растяжении, а остальную часть исследовали гистологически. Результаты исследования прочности при растяжении рубцовой ткани представлены в Таблице 23.

ТАБЛИЦА 23

Прочность при растяжении рубцовой ткани после повторенных инъекций гиалуронидазы

Препарат	Концентрация лекарственного средства		Максимальное усилие при разрушении (кг)
	МЕ/мл	МЕ/см рубца	
Микробная гиалуронидаза	200	40	1.7±0.13
Ронидаза	50	10	1.9±0.2
Физиологический раствор	50	10	2.0±0.16
	-	-	2.1±0.15

[00274] Легкое покраснение и слабый отек развились на следующий день после инъекции. Эти изменения были индивидуальными, не зависели от дозы и исчезли через 1 - 2 дня. После ввода физиологического раствора контрольным животным эти реакции не наблюдали. Присутствовала тенденция к снижению прочности рубцов после инъекции препаратов (по сравнению с контрольной группой). Эта тенденция была более явной при применении микробной гиалуронидазы в концентрации 200 МЕ/мл. Невозможно было ввести ронидазу в подобной концентрации по причине плохой растворимости и более значительной воспалительной реакции на участке инъекции.

[00275] Результаты продемонстрировали, что оба лекарственных средства имели сопоставимую активность в этих моделях.

Воздействия на развитие капсулы соединительной ткани

[00276] Стерильные стеклянные пластинки (2,5 × 2,5 см) имплантировали под кожу самцам крыс (вес тела 120-140 г) под анестезией. Через семь дней после операции крыс разделили на три группы и вводили препараты в развивающуюся капсулу, окружающую

стеклянную пластинку. Препараты (в физиологическом растворе) вводили в виде инъекции (0,5 мл) через день. Каждая крыса получала 10 инъекций.

5 [00277] Первая группа (9 крыс) получала инъекции физиологического раствора; вторая группа (10 крыс) получала инъекции суспензии ронидазы; третья группа (10 крыс) получала инъекции гиалуронидазы из *actinocidus*. Животных подвергали эвтаназии после 10 инъекций, капсулы, окружающие стеклянные пластинки, рассекали и исследовали гистологически. Капсулы в первой группе (физиологический раствор, контроль) состояли из 10 плотных нитей коллагеновых волокон, ярко окрашенных в красный цвет красным Сатурном и пикриновой кислотой. Среди нитей присутствовали зрелые фибробласты с характерными 15 большими овальными ядрами светлого цвета, капиллярами, гистиоцитами в умеренном количестве. Толщина капсулы составляла 200 ± 40 мкм. Окрашивание альциановым синим цветом кислых глюкозамин-глюканов выявило светло-голубые волокна соединительной ткани.

[00278] У животных второй группы (введение ронидазы) капсулы были более 20 толстыми (360 ± 90 мкм) и состояли из свободно расположенных неоднородных нитей коллагеновых волокон с большим количеством макрофагов среди них. Красящие свойства волокон отличались от контрольных: окрашивание красным Сатурном и пикриновой кислотой наряду с ярко окрашенными областями обнаруживало многократные неокрашенные очаги, 25 волокна были дезорганизованы, часто фрагментированы и без четких границ. Окрашивание альциановым синим было также неравным и усиливалось в некоторых областях. Эти изменения могут свидетельствовать о дегенерации коллагеновых волокон.

[00279] В третьей группе толщина капсулы составляла 280 ± 40 мкм. Структура 30 и красящие свойства не отличались от наблюдаемых в контрольной группе.

[00280] Ввод ронидазы в капсулу соединительной ткани вокруг стеклянного имплантата в дозе 10 МЕ/кг приводило к разрушению коллагеновых волокон и трансформации 35 основного вещества капсул к 27-му дню эксперимента. Микробная гиалуронидаза в той же самой дозе не оказала никакого воздействия на морфологию капсул соединительной ткани.

[00281] Различия в действии микробной гиалуронидазы и ронидазы на развитие 40 капсул соединительной ткани после ввода ферментов в развивающуюся капсулу возникают, вероятно, вследствие того, что микробные и тестикулярные гиалуронидазы производят различные воздействия на соединительную ткань животных. Тестикулярная гиалуронидаза помимо гиалуроновой кислоты также производит гидролиз хондроитин сульфата С и некоторых других веществ. Также возможно, что другие ферменты, такие как протеазы, могут 45 присутствовать в ронидазе. Однако, как описано выше, ни ронидаза, ни микробная гиалуронидаза не оказывали воздействие на изолированные глазные яблоки кроликов.

50

Обсуждение

[00282] В этом исследовании сравнивали два препарата гиалуронидаз различного происхождения - микробной и тестикулярной. Исследование проводили для осуществления оценки возможности использования гиалуронидазы из *Streptomyces actinocidus* вместо ронидазы для наружного применения.

[00283] Наблюдали, что основные свойства микробной гиалуронидазы имеют некоторые преимущества по сравнению со свойствами ронидазы. Во-первых: удельная активность микробной гиалуронидазы выше в 10 раз. Это позволяет применять меньшие количества лекарственного средства. Это можно увидеть при проведении экспериментов в условиях *in vivo* в отношении воздействий на проницаемость капилляров: удельная активность обоих препаратов была сопоставимой. Тем не менее, концентрация растворов, используемых в мг/мл для микробной гиалуронидазы, была в 10 раз меньше. Во-вторых, оптимальное значение рН для активности микробной гиалуронидазы (6.5) гораздо ближе к физиологическим значениям, чем оптимальное значение рН для активности ронидазы (4.5). В-третьих, ронидаза имеет значительное количество примесей. Сравнение других свойств (стабильность, зависимость активности от температуры) этих препаратов демонстрирует некоторые различия. Тем не менее, эти различия имеют меньшее значение.

[00284] В дальнейших экспериментах сравнивали активность обоих препаратов по отношению к субстратам, богатых гиалуроновой кислотой животного происхождения (пуповина новорожденного человека и *стекловидное тело* глазного яблока кролика). Было обнаружено, что в сопоставимой дозе препаратов в единицах активности микробная гиалуронидаза и ронидаза гидролизуют гиалуроновую кислоту животных тканей с сопоставимой скоростью. Этот вывод основан на результатах измерения продуктов гидролиза гиалуроновой кислоты, непрозрачности инкубационной питательной среды и прочности при растяжении биологических тканей. Когда использовали обычную кожу в качестве субстрата, который содержит гиалуроновую кислоту в малых количествах, не были очевидны ясные признаки действия ферментов. Тем не менее, ферменты могут быть эффективными в своем воздействии на патологические образования, такие как рубцы после ожогов, содержащие значительное количество гиалуроновой кислоты.

[00285] Эта возможность была исследована в экспериментах *in vivo* с вводом препаратов в рубцы после ожогов у кроликов. Дозу используемых препаратов определяли по их активности в МЕ. Наличие гиалуроновой кислоты в соединительной ткани рубца делает его плотным и твердым. Применение препаратов на основе гиалуронидазы в этом случае направлено на смягчение рубцовой ткани, снижение ее плотности и жесткости. В описанных экспериментах плотность рубцов после ожогов после введения препаратов имела тенденцию снижаться. Эта тенденция увеличивалась с дозой. Это свойство было сравнительно выражено

5 обоими лекарственными средствами. Эти результаты согласуются с данными, приведенными в литературе и указывающими, что препараты с гиалуронидазой оказывают мягкое и индивидуальное терапевтическое действие, и их применение рекомендуют в качестве части сложной терапии в комбинации с другими лекарственными средствами и лечением для увеличения эффективности последнего.

10 Заключения

[00286] Гиалуронидаза из *Streptomyces actinocidus* имеет удельную активность, в 10 раз превышающую удельную активность ронидазы. При введении подобных доз (в МЕ) микробная гиалуронидаза и ронидаза гидролизуют гиалуроновую кислоту пуповины человека и *стекловидного тела* кролика с сопоставимой эффективностью. Микробная гиалуронидаза и ронидаза воздействуют на стабильность рубца после ожога и проницаемость сосудов кожи подобным образом.

20 ПРИМЕР 7

Экспериментальное исследование токсичности нового лекарственного препарата гиалуронидазы

25 [00287] Этот Пример оценивает токсичность микробной гиалуронидазы из *Streptomyces actinocidus* по сравнению с ронидазой. Ронидаза доступна во флаконах, содержащих 5 или 10 граммов лекарственного средства. Ронидазу можно применять для местного лечения рубцов (после ожогов или оперативного вмешательства и т.д.), контрактуры, тугоподвижности суставов, в препарате для пластической хирургии для удаления рубцов, для лечения хронического тендовагинита, медленно заживающих ран. Порошок ронидазы наносили на сырую марлю, которую прикладывают к поврежденному участку, закрывают вощеной бумагой и фиксируют биндом. Количество ронидазы для однократного применения зависит от размера поврежденного участка и составляет в среднем 0,5-1,0 грамм (150-300 МЕ). Лекарственное средство принимают ежедневно в течение 15-30 дней. При длительном лечении делали перерывы на 3-4 дня каждые 2 недели

40 Острая токсичность

45 [00288] Острую токсичность исследовали на обычных лабораторных мышках (18-20 г) и крысах (100-120 г). Лекарственные препараты, растворенные в дистиллированной воде, вводили внутривенно или интраперитонеально. Каждую дозу лекарственных средств тестировали на шести животных. Мыши получали лекарственные препараты внутривенно в объеме 0,5 мл со скоростью 0,1 мл/сек. Крысы получали лекарственные средства в объеме 1 мл/100 г веса тела. Животных наблюдали в течение 14 дней после инъекции.

[00289] В исследовании острой токсичности после внутривенного введения мышам микробной гиалуронидазы из 5 стандартных партий установленная смертельная доза для 50% популяции (LD_{50}) варьировалась от 2740 мг/кг (партия 1/5) до 3167 мг/кг (партия 5/2), а предельно допустимая доза составляла 1500-2000 мг/кг. Мыши умерли в течение 3 дней после внутривенного введения смертельной дозы микробной гиалуронидазы. Мыши становились адинамическими, вялыми, подавленными. Смерть происходила от остановки дыхания. Мыши, выжившие в первые три дня, позже не умерли. При аутопсии умерших животных не было видимых изменений внутренних органов. Смертельная доза гиалуронидазы из *actinocidus* для 50% популяции (LD_{50}) крыс после внутривенного введения была сопоставима с соответствующей дозой, наблюдаемой у мышей.

[00290] Было невозможно изучить воздействия внутривенного введения ронидазы вследствие ее низкой растворимости в воде. Из-за этого сравнение острой токсичности микробной гиалуронидазы и ронидазы проводили, применяя интраперитонеальную инъекцию мышам. Суспензию ронидазы и раствор микробной гиалуронидазы приготавливали с помощью 0,5% раствора метилцеллюлозы. Лекарственные препараты вводили в объеме 0,5 мл в мышь.

[00291] Симптомы острой токсичности после интраперитонеального введения были подобны симптомам, наблюдаемым после внутривенного введения. Тем не менее, после интраперитонеального введения симптомы интоксикации развивались медленнее. Обычно смерть наступала через 2-3 дня после введения лекарственного средства, в то время как после внутривенного введения большинство животных умирали в течение первых 24 часов. Аутопсия умерших животных после интраперитонеальной инъекции микробной гиалуронидазы и ронидазы обнаружила расширение перитонеальных сосудов и в некоторых случаях гиперемии стенок кишечника. Серозную жидкость обнаружили в брюшной полости некоторых мышей, которые получали интраперитонеальное введение ронидазы. Данные указывали на то, что при измерении в мг/кг оба лекарственных средства имели сопоставимую токсичность. Тем не менее, микробная гиалуронидаза была в 8 раз менее токсична, чем ронидаза при выражении дозы в МЕ/кг. Это можно объяснить тем фактом, что ронидаза содержит некоторые примеси, которые обладают токсической активностью.

Хроническая токсичность

[00292] Микробную гиалуронидазу можно использовать для наружных применений путем прикладывания сырой марли с порошком фермента к поврежденному участку. Это определило выбор способа длительного применения на коже для исследования хронической токсичности микробной гиалуронидазы.

[00293] В экспериментах на кроликах с хронической токсичностью использовали дозу 0,1 г на каждое животное или в среднем 40 мг/кг (двойная доза,

используемая во врачебной практике для ронидазы). Выбор дозы основывался на том факте, что ежедневная терапевтическая доза ронидазы составляет 1 г (приблизительно 15 мг/кг), которая применяется в течение 15-60 дней (с перерывом 2-3 дня через каждые 2 недели).
5 Применения на коже лекарственных препаратов осуществляли ежедневно в течение 62 дней без перерывов. Более длительное применение микробной гиалуронидазы или ронидазы не имело смысла, поскольку никакие проявления эффектов, вызванных резорбцией, или симптомов местного раздражения не наблюдали в течение всей продолжительности
10 эксперимента.

[00294] Эксперименты проводили на 16 шиншилловых кроликах (2,16±0,13 кг) обоих полов. В качестве контроля использовали шесть дополнительных кроликов. За три дня до начала экспериментов с области кожи (10x7 см) на спине удаляли волосы с помощью 10% сульфита натрия после бритья. В течение всего эксперимента эпиляцию повторяли еще два
15 раза на кроликах, которых подвергали эвтаназии после 35 применений, и еще четыре раза на кроликах, которых подвергали эвтаназии после 62 применений.

[00295] В экспериментальных группах участок кожи с удаленным волосным покровом увлажняли и втирали порошок лекарственного средства в течение 5 минут. Втирание вызвало гиперемию кожи и обеспечило непосредственный контакт между лекарственным средством и кожей. В первой экспериментальной группе животные получали
20 применения микробной гиалуронидазы (0,1 г/животное, ~40 мг/кг), а во второй группе животные получали подобные дозы ронидазы. В контрольной группе увлажненный участок кожи животных протирали в течение пяти минут без порошка. Трех кроликов каждой группы подвергали эвтаназии после 35 дней применений (в сумме они получали 3,5 г веществ, в
25 среднем 1550 миллиграмм на кг). Других кроликов подвергали эвтаназии после 62 дней эксперимента (в течение всего периода они получали 6,2 г лекарственных препаратов, в среднем 750 мг/кг).

[00296] Животных ежедневно обследовали для оценки их общего состояния и статуса участка приема лекарственного средства. Перед началом эксперимента и каждые последующие семь дней кроликов взвешивали. Первоначально определяли и измеряли четыре
30 раза в течение эксперимента следующие параметры: гемоглобин крови, анализы крови, анализ мочи, остаточный азот крови, бромсульфопфталеиновая экскреция, ALT и AST, свёртывание крови, тромбоэластограмма, уровень глюкозы в крови, электрокардиограмма.

[00297] В конце эксперимента животных подвергали эвтаназии, внутренние органы взвешивали и исследовали гистологически. Образцы печени, почек, селезенки, сердца,
35 надпочечников и кожи с участка применений после фиксации в 10%-ом формалине промыли, нарезали тонкими слоями и окрасили гематоксилином и эозином. Статистический анализ выполняли, применяя критерий Стьюдента.

[00298] Ежедневно в течение 62 дней применения микробной гиалуронидазы и ронидазы на коже с удаленным волосяным покровом (70 см²) не оказывали никакого воздействия на общее состояние животных. Кролики, которые получали лекарственные средства, по их внешнему виду или поведению не отличались от контрольных животных или интактных животных в течение всего эксперимента. В течение всей продолжительности эксперимента кожа, в тех участках, где применяли лекарственные средства, через 30-40 мин. после применения восстанавливала нормальный внешний вид после гиперемии, вызванной втиранием. Единственным исключением был кролик №677 (применение ронидазы), у которого с третьего вплоть до седьмого дня легкая гиперемия согласно эксперименту сохранялась спустя 6-8 часов после втирания. В течение эксперимента вес тела контрольных кроликов увеличился на 640 граммов, вес тела животных, которые получали микробную гиалуронидазу, на 800 граммов, и вес тела животных, которые получали ронидазу, на 630 граммов.

[00299] Гемоглобин и анализы крови оставались в нормальных пределах в течение всего эксперимента. Анализ мочи не обнаружил никаких различий между контрольными и подопытными животными. Значительные различия и остаточный азот крови отсутствовали. Не наблюдали никакие изменения в активности плазмы крови AST и ALT, уровне глюкозы в крови и бромсульфопфталеиновой экскреции. У подопытных животных отсутствовали какие-либо изменения в электрокардиограмме или тромбозадиограммах. Относительный вес внутренних органов и количество жира в печени у контрольных и подопытных животных были сопоставимы и находились в нормальных пределах.

[00300] Макроскопические исследования при аутопсии подвергнутых эвтаназии кроликов после 35 или 62 дней применения микробной гиалуронидазы и ронидазы не выявили никакие изменения кожи, меха, видимой слизистой оболочки. Мех был гладким, блестящим, волосы не выпадали. Кожа на участках применения имела нормальную толщину и эластичность.

[00301] Топография органов груди и брюшных полостей была нормальной. Сердце имело нормальную конфигурацию, темно-красный миокард был эластичным. Печень имела коричнево-красный цвет, нормальный размер и консистенцию. Почки имели серо-розовый цвет. Фиброзная капсула была легкоотделяемой. На срезах корковые и мозговые пластинки были ясно видны с четкой границей между ними. Селезенка имела темный винно-красный цвет, нормальную консистенцию и упругость.

[00302] Под микроскопом кожа контрольных и подопытных животных имела нормальную структуру. Тонкий слой эпидермиса состоял из 3-4 клеточных слоев и относительно тонкого слоя чешуи. Состояние различных слоев кожи не было нарушено многократными применениями микробной гиалуронидазы и ронидазы. Проявления интенсивного сквамоза отсутствовали. Дерма под эпидермисом имела нормальную структуру

с волосяными фолликулами и кожными железами. Не наблюдали никакие патологические изменения в подкожной соединительной ткани. Соотношение между толщиной всех слоев кожи было сохранено.

5 [00303] У контрольных животных и кроликов, которые получали микробную гиалуронидазу и ронидазу, не было никаких изменений в микроскопической структуре внутренних органов. Миокард был нормальным: мышечные волокна имели схожую толщину и были равномерно окрашены. Поперечная борозчатость была хорошо выражена. Строма-
10 мышечные соотношения были нормальными. У всех животных печень была без изменений. Гепатоциты сформировали одинаковые связки, сходящиеся к центральным венам. У некоторых животных были немного расширены синусоидные капилляры. У всех животных наблюдали периваскулярную лимфоидную инфильтрацию на периферии печени. Структура
15 почек была нормальной и сопоставимой у животных всех групп. Почки имели одинаковый размер, эпителий извитых канальцев без дистрофии. В селезенке, надпочечниках, легких не наблюдали никакие изменения во всех группах. Можно сделать вывод о том, что длительное кожное применение гиалуронидазы из *actinocidus* или ронидазы не продуцирует никакие патологические изменения кожи или внутренних органов.
20

Воздействия на глаз кролика

25 [00304] Введение в конъюнктивный мешок у кроликов 2-3 каплей фильтрованного 10%-го раствора микробной гиалуронидазы или 10%-ой суспензии ронидазы один раз в день в течение трех недель не вызывало никаких проявлений раздражения или других побочных эффектов.
30

Заключение

35 [00305] Препарат гиалуронидазы микробного происхождения (*Streptomyces actinocidus*) представляет собой лекарственное средство с низкой токсичностью. Смертельная доза микробной гиалуронидазы для 50% популяции (LD₅₀) у мышей после внутривенного введения составляет 2914±92 мг/кг. Предельно допустимая доза микробной гиалуронидазы у мышей после внутривенной инъекции составляет 1500 мг/кг (3750 МЕ/кг) и превышает в 872
40 раза ежедневную терапевтическую дозу ронидазы (1 г / чел.-14,3 мг/кг или 4,3 МЕ/кг) и дозу микробной гиалуронидазы, рекомендованную для клинических исследований (300 МЕ-4,3 МЕ на кг) для наружного применения. Лекарственные препараты микробной гиалуронидазы и ронидазы имеют одинаковую токсичность при введении в виде интраперитонеальной
45 инъекции в том же самом количестве по весу. Тем не менее, микробная гиалуронидаза в 7 раз менее токсична, чем ронидаза при выражении дозировки в МЕ/кг.

50 [00306] Ежедневное в течение 62 дней применение микробной гиалуронидазы путем втирания через кожу в количестве 40 мг/кг (80 МЕ/кг), которое превышало ежедневную

терапевтическую дозу ронидазы и в 18,6 раз превышало однократную дозу микробной гиалуронидазы, рекомендованную для клинического исследования, не привело ни к каким изменениям кожи на участке применения и не вызвало никакие проявления патологии в результате резорбции. Эти результаты подтверждают, что микробную гиалуронидазу можно рекомендовать для клинических исследований в однократной дозе 300 МЕ в каждом применении. Эта доза сопоставима с терапевтическими дозами ронидазы. Если аллергические реакции или изменения в иммунном статусе отсутствуют, можно применять однократную дозу до 3000 МЕ.

ПРИМЕР 8

Иммунологические свойства

[00307] Гиалуронидаза повышает проницаемость ткани и может проникать в ткани. Это увеличивает риск аллергической реакции, вызванной этим веществом, что вызывает необходимость проведения исследования воздействий препаратов на основе гиалуронидазы на иммунную систему. Этот Пример предоставляет данные по сравнительному исследованию антигенных и аллергенных свойств гиалуронидазы микробного происхождения (из *Streptomyces actinocidus*) и гиалуронидазы, полученной из бычьего яичка (ронидаза), и их воздействий на иммунную систему.

Материалы и способы

[00308] Микробная гиалуронидаза, использованная в исследовании, имела удельную активность 2000 МЕ/г с 13% белка и 80% маннита. Для сравнения использовали препарат тестикулярной гиалуронидазы (ронидазы) с удельной активностью 350 МЕ/г и 35% белка. Эксперименты проводили на шиншилловых кроликах (3-3,5 кг), морских свинках (300-350 г) и мышах вида Balb/c, CBA, C₅₇BL, F₁(CBA x C₅₇BL) (18-20 г).

[00309] Способом иммуноэлектрофореза с гипериммунными кроличьими сыворотками исследовали антигенные свойства. Определение титра антитела в сыворотке крови иммунизированных животных выполняли посредством иммунопреципитации.

[00310] Анафилактогенные свойства микробной гиалуронидазы исследовали на морских свинках. Для однократной сенсibilизации лекарственные препараты вводили один раз интракардиально в дозах 8,5 мг/кг (эквивалентный вес одиночной терапевтической дозы ронидазы) и 17,5 мг/кг. Провоцированную инъекцию выполняли внутривенно спустя 21 день. Ронидазу или сравнение применяли в тех же самых дозах, что и микробную гиалуронидазу. Контрольные животные получали физиологический раствор. Каждая группа включала 7 животных. Анафилаксию оценивали по 4-бальной шкале. AI рассчитывали, применяя следующую формулу:

$$AI = \frac{(a \times 4) + (b \times 3) + (c \times 2) + (d \times 1) + (e \times 0)}{7}$$

$$(a + b + c + d + e)$$

[00311] где: a - количество животных, которые умерли (анафилактический шок 4+); b - количество животных с тяжелым шоком (3+); c - количество животных с умеренным шоком (2+); d - количество животных со слабой реакцией (1+); e - количество животных с отсутствующей реакцией.

[00312] Активную кожную анафилаксию исследовали на кроликах, которые получали микробную гиалуронидазу на бандажах (40 мг/кг в течение 35 дней). Во второй группе кролики получали ту же самую дозу ронидазы. Для кожной пробы использовали способ аллергометрического титрования. Кожные пробы выполняли спустя три недели после последнего применения лекарственных препаратов. Ферменты (100, 50, 10 мкг/мл, 0,1 мл) вводили внутрикожно. Активную кожную анафилаксию оценивали внутривенным введением 0,5% синего Эванса перед внутрикожной инъекцией фермента. Пробу считали положительной, если область реакции имела размер не менее 5 x 5 мм, а интенсивность синей окраски была не менее 2+. Интенсивность окрашивания кожи оценивали по 3-бальной шкале. Для оценки кожной реакции рассчитывали два индекса: индекс наличия реакции (IRP) и индекс интенсивности реакции (IRI). IRP рассчитывали по формуле:

$$IRP = (a/b - c/d) \times 100$$

где: a - количество животных с положительной реакцией в экспериментальной группе; b - общее количество животных в экспериментальной группе; c - количество животных с положительной реакцией в контрольной группе; d - общее количество животных в контрольной группе. В каждой группе было не менее 5 животных.

[00313] IRI рассчитывали по формуле:

$$IRI = ((a/b - c/d)/5) \times 100$$

где: a - сумма показателя интенсивности (балы) реакции в экспериментальной группе; b - количество животных в экспериментальной группе; c - сумма показателя интенсивности (балы) реакции в контрольной группе; d - количество животных в контрольной группе.

[00314] Реакция гемагглютинации. Мыши (вид СВА и С₅₇BL) получали в течение 10 дней применения микробной гиалуронидазы (8,5 мг/кг). SE (10⁸ клеток) ввели в виде интраперитонеальной инъекции на день 11 в экспериментальной и контрольной группах. В течение следующих пяти дней животные продолжали получать лекарственные препараты. Кровь брали на день 7 и день 14. Уровни антител определяли посредством реакции гемагглютинации.

[00315] Для изучения воздействий микробной гиалуронидазы на иммунные реакции на другие антигены мыши СВА и С₅₇BL получали ферменты (8,5 мг/кг в течение 10 дней). На 11-ый день эксперимента животные получали интраперитонеальную инъекцию яичного альбумина (2 мг/кг). В течение следующих пяти дней животные продолжали получать

ферменты. Титр антител к яичному альбумину определяли по RИH. Для приготовления тест-антигена использовали хлорид хрома в качестве связующего вещества.

5 [00316] Определение клеток, продуцирующих антитела (АРС). Воздействия
микробной гиалуронидазы на продуцирование антител к SE исследовали на мышах ВаLb/c.
Фермент применяли в виде прикладываний (8,5 мг/кг) в течение 15 дней. SE вводили
интраперитонеально (10^8 клеток в 1 мл физиологического раствора) за пять дней до конца
10 курса. На 5-ый день после введения SE подсчитывали количество АРС в селезенке.
Контрольные животные получали только SE.

[00317] Воздействия микробной гиалуронидазы на DHS проверили на мышах
СВА. Фермент (8,5 мг/кг) применяли в виде прикладываний в течение 10 дней.
15 Сенсibiliзирующую дозу SE (интраперитонеально 10^7 клеток в 0,05 мл физиологического
раствора) вводили на 11-ый день. В течение следующих пяти дней животные продолжали
получать фермент. Спустя пять дней животные получали провокационную инъекцию SE (10^8
клеток в 0,05 мл физиологического раствора) в подошву задней лапы. В другую лапу ввели
20 физиологический раствор в виде инъекции. Местную воспалительную реакцию оценивали
через 24 часа, сравнивая вес обеих лап. Контрольные животные получали только инъекции SE
и физиологического раствора без применения ферментов. Рассчитывали реакционный индекс.
Каждая группа включала 10 животных.

25 [00318] Исследовали ингибирование миграции лейкоцитов. Мышам СВА,
получавшим микробную гиалуронидазу, вводили СFA (500 мкг ВСG в 0,4 мл / мышь)
посредством внутрибрюшинной инъекции. На 6-ой день брали образцы крови и выполняли
30 реакцию ингибирования миграции лейкоцитов в 5-канальных капиллярных трубках.
Лимфоциты крови представляли собой исходный MSF, в то время как моноциты и
гранулоциты были мигрирующими клетками. Контрольные животные не получали
микробную гиалуронидазу. Туберкулин (0,2 мл) добавили в пробы крови (0,4 мл). В
35 контрольной группе добавили физиологический раствор. Конечная концентрация антигенов в
культуре составляла 10 и 100 мкг/мл. Капиллярные трубки запечатали, центрифугировали в
течение пяти минут при 200 г и помещали в термостат при температуре 37°C. Результаты
реакции определяли через 24 часа. Миграцию измеряли с помощью микрометрической
40 линейки. Индекс подавления миграции (IMS) рассчитывали в соответствии со следующей
формулой:

$$\text{IMS} = 100 \% - (\text{миграция без антигена} / \text{миграция с антигеном}) \times 100 \%$$

45 [00319] Реакция «трансплантат против хозяина» (ТАНР). Оценку
митостатической и лимфотоксической активности микробной гиалуронидазы выполняли с
использованием модели эндогенного формирования колоний у мышей F₁(СВА x С₅₇BL). В
течение 10 дней мыши получали фермент (8,5 мг/кг), контрольные животные получали
50 физиологический раствор. На 12-ый день эксперимента животных облучили рентгеновскими

лучами (500 рентгенов). Животные продолжили получать гиалуронидазу в течение еще 7 дней. Животных произвольно распределили в следующие группы: Группа 1 - только облучение, без лекарственного средства; Группа 2 - облучение в комбинации с местным применением гиалуронидазы; Группа 3 - облучение в комбинации с инъекцией лимфоидных клеток из родительских животных, лекарственное средство отсутствует; Группа 4 - облучение в комбинации с инъекцией лимфоидных ячеек и применением гиалуронидазы. Доза лимфоцитов мышей СВА, которая подавляла формирование колонии на 50%, составляла 10^6 клеток. После завершения применений мышей подвергали эвтаназии, извлекли селезенку и после фиксации подсчитывали количество колоний на поверхности селезенки в контрольной и экспериментальной группах.

[00320] Статистический анализ выполняли, применяя параметрические и непараметрические критерии. Принятый уровень значительного расхождения составлял 0,95.

Результаты

[00321] Иммуноэлектрофорез (ток 50 мА, 1 час, значение pH 8.3 вероналового буфера, ионная сила 0,05 в 1%-ом агаровом геле) продемонстрировал, что микробная гиалуронидаза не была гомогенным веществом, а содержала 3 белковых компонента. Анафилактические свойства микробной гиалуронидазы и ронидазы исследовали на морских свинках. Микробная гиалуронидаза показала слабую аллергенную активность. Значение по сравнению с ронидазой $n=7$ в каждой группе.

[00322] Для сравнения аллергенного потенциала микробного фермента с другими ферментами определяли одиночную минимальную сенсибилизирующую дозу, вводимую интракардиально ($5,0-5,0 \times 10^{-3}$ мг белка/кг). Через три недели выполняли провокационную инъекцию (терапевтическая доза, внутривенно). Эта доза не создавала токсические реакции у интактных животных. Все протестированные дозы микробной гиалуронидазы продуцировали относительно слабые аллергические реакции. Вероятно, минимальная сенсибилизирующая доза микробной гиалуронидазы находится за пределами протестированных доз. Аллергенная активность микробного фермента не отличалась существенно от ронидазы при использовании в том же самом весовом количестве.

[00323] Сенсибилизирующую кожную активность микробной гиалуронидазы и ронидазы исследовали на кроликах, которые получали многократные применения микробной гиалуронидазы и ронидазы. Кожные реакции в ответ на внутрикожное введение микробной гиалуронидазы развивались в течение 0,25-3 часов и были непосредственными по характеру. Размер кожной реакции был относительно большим (10×10 мм в диаметре с интенсивностью 2+). У животных, сенсибилизированных дозой ронидазы эквивалентной по весу (а не по активности), кожные реакции были менее выражены. У животных в контрольной группе кожные реакции были незначительными. Можно сделать вывод о том, что многократное

местное применение микробной гиалуронидазы запускает продуцирование антител, фиксируемых в коже.

5 [00324] Применение тест-аллергена во всех тестируемых концентрациях выявило расхождения в реакциях животных контрольной и экспериментальной групп в IRP и IRI. Снижение дозы тест-аллергена производило более слабые кожные реакции. Воздействия микробной гиалуронидазы и ронидазы не отличались существенно, когда сравненные дозы 10 были выражены в весе, а не в МЕ активности. Эксперименты продемонстрировали, что микробная гиалуронидаза после многократного местного применения в дозах эквивалентных (по весу) подобным дозам ронидазы имела кожную сенсibiliзирующую активность. В общей врачебной практике анафилактические свойства ферментных препаратов, наблюдаемые после 15 парентерального введения, позволяют определить аллергенный потенциал этих веществ. Аллергенный потенциал фермента, приведенный в действие после парентерального введения, соотносится с аллергенным потенциалом при его введении другими путями (аэрозоли, компрессы, пероральный прием и т.д.). По сравнению с аллергенным потенциалом других 20 ферментов, используемых в клинической практике, микробная гиалуронидаза имеет более низкую минимальную сенсibiliзирующую дозу.

[00325] Многократное наружное применение микробной гиалуронидазы (8,5 мг/кг) на мышах BaLb/c существенно уменьшило количество клеток, продуцирующих антитела, в селезенке по сравнению с контрольной группой. В соответствии с реакцией 25 локального гемолиза количество клеток, продуцирующих антитела, в экспериментальной группе составляло 54+10, в то время как в контрольной группе, которая не получала микробной гиалуронидазы, оно составляло 154+39. Иммунодепрессивная активность 30 микробной гиалуронидазы может быть связана с присутствием в препарате низкомолекулярных компонентов или вследствие ее удельной активности. Важная роль в создании гуморального и клеточного иммунитета принадлежит макрофагам. Микробная гиалуронидаза согласно литературе существенно подавляет фагоцитоз клеточных антигенов. 35 Возможно, что обнаруженное подавление иммунной реакции на SE связано с ингибирующими действиями микробной гиалуронидазы на фагоцитоз.

40 [00326] Ингибирующее действие микробной гиалуронидазы (8,5 мг/кг) на продуцирование антитела к клеточным или растворимым в воде антигенам также наблюдали в экспериментах с сильно и слабо реагирующими видами мышей. Как ожидается, иммуносупрессорные воздействия микробной гиалуронидазы были более явными у животных с сильной реакцией на корпускулярные антигены. Статистически значительное подавление 45 иммунных реакций ($p < 0.05$) наблюдали у животных, иммунизированных яичным альбумином, а также SE. Однако в любом случае не было никакого полного подавления иммунной реакции, вызванной этими антигенами. Можно сделать вывод о том, что микробная 50

гиалуронидаза подавляет гуморальную иммунную реакцию при ее местном применении в дозе 8,5 мг/кг.

5 [00327] Эксперименты были направлены на то, чтобы оценить воздействие фермента на некоторые показатели функциональной активности Т-лимфоцитов. С этой целью исследовали гиперчувствительность замедленного типа (DHHS), подавление миграции лимфоцитов и реакцию «трансплантат против хозяина». Многократные наружные применения гиалуронидазы из *actinocidus* не оказывали влияние на местную воспалительную реакцию при 10 оценке, осуществляемой посредством DHHS. Не наблюдали никакие значительные расхождения в реакционном показателе (RI) между контрольной и экспериментальной группами (16.6+4.1 и 18.3+2.7, соответственно, $p > 0.05$). Местные применения микробной гиалуронидазы не оказывали влияние на спонтанную миграцию лейкоцитов (6.49+0.66 в 15 контрольной группе и 6.54+1.04 в экспериментальной группе, $p > 0.05$). Туберкулин (10 мкг/кг) снизил миграцию лейкоцитов на 27% ($p < 0.005$) в контрольной группе. Тем не менее, в клеточных культурах, полученных от экспериментальных групп, которые получали микробную гиалуронидазу, миграция лейкоцитов была снижена не более чем на 4% ($p > 0.05$, по 20 сравнению с контрольной группой). Миграция в контрольной группе составляла 4.72+0.53, а в экспериментальной группе 6.26+0.64 ($p < 0.005$). Можно сделать вывод, что микробная гиалуронидаза при местном применении в дозе 8,5 мг/кг демонстрирует иммунодепрессивное 25 действие и реверсирует подавление миграции лейкоцитов.

[00328] Микробная гиалуронидаза после многократных местных применений на мышцах, которые получали сублетальную дозу рентгеновских лучей, существенно, на 55,9%, 30 снизила пролиферацию стволовых клеток (митостатический эффект), что сопоставимо с эффектом 6-меркаптопурина. Селективное лимфотоксическое воздействие микробной гиалуронидазы на Т-лимфоциты было незначительным (% выживших СРС был 6.9).

[00329] Можно сделать вывод о том, что микробная гиалуронидаза не является 35 сильным аллергеном. Многократные местные применения микробной гиалуронидазы (8,5 мг/кг) оказывали ингибирующее действие на некоторые компоненты иммунной реакции у подопытных животных. В модели реакции «трансплантат против хозяина» наблюдали, что микробная гиалуронидаза из *Streptomyces actinocidus* имеет митостатическую активность в 40 дозе, эквивалентной по весу терапевтической дозе клинически используемой ронидазы (8,5 мг/кг). В течение клинических исследований необходимо контролировать иммунный статус.

Заключения

45 [00330] Микробная гиалуронидаза в дозах, эквивалентных дозам ронидазы (по весу), имеет слабую аллергенную активность, сопоставимую с другими ферментными веществами, которые рекомендуют для клинического применения Фармакологическим 50 комитетом Министерства здравоохранения Российской Федерации (например, ронидаза,

солизим, амилаза). Для выявления сенсibilизации в отношении лекарственного средства можно использовать кожную пробу. Микробная гиалуронидаза, многократно применяемая локально в дозе 8,5 мг/кг, экспрессирует некоторую иммуноподавляющую активность и оказывает митостатическое действие.

ПРИМЕР 9

Воздействия микробной гиалуронидазы на иммунный статус

[00331] Исследовали воздействия микробной гиалуронидазы из *Streptomyces actinocidus* и тканевой гиалуронидазы (бычье яичко) (ронидаза) на иммунный статус мышей. Лекарственные препараты применяли наружно на коже в дозах, рекомендованных для терапии. В исследовании применяли следующие вещества: (1) Микробная гиалуронидаза, продуцирована бактериями *стрептомицеты* (*Streptomyces*). Активность фермента составляла 3000 МЕ/г; количество белка 7%; с маннитом в качестве разбавителя. Ежедневная терапевтическая доза микробной гиалуронидазы – 1,43 мг/кг (300 МЕ). (2) Тестикулярная гиалуронидаза (ронидаза). Активность фермента составляла 300 МЕ/г. Ежедневная терапевтическая доза лекарственного средства – 14,3 мг/кг (300 МЕ).

[00332] Исследование проводили на мышах (СВАхС57/В1/6)F₁ (вес тела 18-20-граммов). Воздействия микробной гиалуронидазы и ронидазы на иммунный статус оценивали, применяя следующие параметры: количество клеток, продуцирующих антитела, (АРС) в селезенке; количество клеток, продуцирующих ЕАС-розетки, (RPC) в селезенке; уровень гемагглютинирующих антител в крови.

[00333] Лекарственные препараты в терапевтических дозах применяли на выбритом участке (1x2 см) кожи. Первая группа мышей получала ежедневные применения микробной гиалуронидазы (1,43 мг/кг, 300 МЕ). Вторая группа получала ронидазу (14,3 мг/кг, 300 МЕ). Третья группа (контрольная) получала ежедневные применения дистиллированной воды. Непосредственно после применения мышей из экспериментальной и контрольной групп удерживали в отдельных клетках в течение 4 часов один раз в день. Вещество применяли в течение 14 дней. На 15-ый день мышей иммунизировали тимусзависимым корпускулярным антигеном - овечьими эритроцитами (0,5 мл 5%-ой взвеси эритроцитов вводили интраперитонеально). На день 5 проявилась иммунная реакция к овечьим эритроцитам. Животных подвергали эвтаназии посредством декапитации. Собрали кровь и определяли уровень гемагглютинирующих антител в сыворотке стандартным способом. Приготовили суспензия клеток селезенки. Использовали жизнеспособные клетки для определения количества клеток, продуцирующих ЕАС-розетки, (RPC) локальным гемолизом в агаре и количества клеток, продуцирующих антитела, (АРС). Критерий Стьюдента использовали для статистического анализа.

[00334] Полученные результаты не выявили какие-либо значительные различия между экспериментальной и контрольной группами в общем количестве ядросодержащих клеток в селезенке, количестве клеток, продуцирующих антитела, (АРС), количестве иммунокомпетентных клеток с поверхностными Ig-рецепторами по отношению к овечьим эритроцитам. В экспериментальных группах титр гемагглютинирующих антител был значительно ниже, чем в контрольной группе. Тем не менее, титр гемагглютинирующих антител не опускался ниже нижнего уровня нормы для этого вида мышей. Можно сделать вывод о том, что ни микробная гиалуронидаза, ни ронидаза при их применении на коже в терапевтических дозах не оказывают воздействие на гуморальную иммунную реакцию.

ПРИМЕР 10

Исследование общих токсических свойств мази с микробной гиалуронидазой и гидрокортизоном

[00335] Исследовали неспецифические токсические воздействия мази с гидрокортизоном, содержащей микробную гиалуронидазу. Мазь с гидрофильной основой для наружного применения, содержала гидрокортизон (17-оксикортикостерон) в качестве активных соединений составов в виде гидрокортизона ацетата (0,5%) и микробной гиалуронидазы (20 г МЕ/1 г мази).

[00336] Терапевтический эффект основан на взаимодействии между гидрокортизоном и гиалуронидазой. Микробная гиалуронидаза повышает проникновение гидрокортизона в ткань, усиливает ее терапевтический эффект и уменьшает лечебную дозу. В то же самое время гидрокортизон снижает активность гиалуронидазы и не позволяет распространиться воспалительному процессу. Гидрокортизон обеспечивает противовоспалительное и противоаллергическое действие лекарственного средства. Добавление гиалуронидазы позволяет существенно расширить показания к применению лекарственного средства. Кроме того, патентованная гидрофильная основа позволяет поставлять гидрокортизон в водорастворимом носителе, который существенно увеличивает его биологическую доступность.

Материалы и способы

[00337] Острую токсичность мази исследовали на белых обычных самцах и самках крыс (n=60) с весом тела 180-250 г и мышах (18-20 г, n=60). Мазь исследовали в следующих дозах: 9000, 13000, 17000, 21000, и 25000 мг/кг веса тела. Крыс и мышей произвольно распределили в одну из 10 групп, которые включали 6 самцов и 6 самок каждая. Мазь растворили в дистиллированной воде и вводили интраперитонеально в объеме 1-5 мл. В качестве контроля использовали инъекцию дистиллированной воды. После инъекции животных наблюдали в течение 14 дней. Отмечали внешний вид животных, их поведение,

стимулы к действиям, вес тела и летальность, а также определяли смертельную дозу микробной гиалуронидазы для 50% популяции (LD_{50}).

5 [00338] Исследовали общую токсичность мази на белых обычных крысах. Животных произвольно распределили в одну из трех групп по 18 крыс в каждой. Первая группа получала кожное применение мази, вторая группа получала только мазевую основу, а третья группа служила в качестве контрольной группы. Мазь и основу применяли в течение 30 дней на неповрежденной, лишенной волосяного покрова коже спины на участке размером 3 x 4 см один раз в день в количестве 0,7-1,1 г на каждое животное (4,7 г/кг). Индивидуальную дозу для каждого животного корректировали один раз в неделю для учета веса тела. После завершения лечения животных отслеживали в течение 14 дней. В качестве интегральных показателей возможной токсической реакции контролировали следующие параметры: изменения во внешнем виде животных и их поведении, потреблении пищи и воды, экскреции и весе тела. ЭКГ выполняли в стандартном отведении II. Периодически брали пробы крови из хвостовой вены для определения холинэстеразы плазмы, уровня глюкозы в крови, гемоглобина и уровня лейкоцитов в крови. Местное кожное раздражающее действие мази оценивали визуально. С этой целью фиксировали интенсивность эритемы и толщину кожной складки. Каждые две недели 6 животных из каждой группы подвергали эвтаназии посредством декапитации для проведения патологических исследований. Внутренние органы анализировали невооруженным глазом и под микроскопом. Исследовали мех и участок кожи, где применяли мазь или мазевую основу.

10
15
20
25
30 [00339] Исследование аллергенных свойств мази проводили на самцах морских свинок (250-300 г). Животных произвольно распределили в 3 группы по 15-18 животных в каждой. Одна группа была контрольной. В двух экспериментальных группах животные получали ежедневное применение мази на лишенном волосяного покрова участке на боковой стороне корпуса. Ежедневно исследовали области применения мази для исключения неаллергического дерматита. Для сенсибилизации морские свинки получали одиночную максимальную дозу 300 мг/кг с последующими 10 дозами 30 мг/кг. Оценку аллергенной активности мази проводили на половине животных спустя 10 дней и на второй половине спустя 20 дней. Раствор мази (100 мкг в 0,1 мл) вводили в виде инъекции внутрикожно для обнаружения возможной сенсибилизации на день 10 и 20, соответственно. Через 24 часа после инъекции оценивали кожную реакцию.

Результаты

45 [00340] *Острая токсичность.* Максимальная доза, составляющая 25000 мг/кг мази, вызывала 100%-ую летальность крыс и мышей в течение первых 24 часов. У мышей доза 21000 мг/кг вызывала 100%-ую летальность в течение 1-3 дней. В течение первых 24 часов введения максимальной дозы животных быстро принимали боковое положение и замирали.

Большая часть животных, которая получала 17000-21000 мг/кг, умерла в течение первых 3 дней. Животные были гиподинамическими и входили в подобное коме состояние. Животные, пережившие две недели, медленно выздоравливали. Эти животные первоначально потеряли вес. К концу периода двух недель их вес возвратился к первоначальным значениям. Однако они прибавляли в весе медленнее, чем животные в контрольной группе. Крысы, получавшие лекарственное средство в дозе 9000-13000 мг/кг, не похудели и были сопоставимы с контрольной группой. Макроскопическое исследование в течение аутопсии животных, которые умерли от острой интоксикации, обнаружило только увеличенное скопление крови в печени и селезенке. Рассчитанная смертельная доза для 50% популяции (LD50) составляла для крыс 17340 мг/кг и мышей 16670 мг/кг.

[00341] *Хроническая токсичность.* Животные, получавшие мазь или мазевую основу, не отличались по своему внешнему виду или поведению от контрольных животных. мех был гладким, блестящим и без пигментирования. Не было никаких изменений в мочевом пузыре или мочеиспускании. Вес тела подопытных животных, получавших применение мази, был существенно меньше, чем вес тела контрольных животных, начиная со второй недели лечения и до конца первой недели после этого. Через две недели после завершения лечения вес тел экспериментальных и контрольных животных не отличался. В среднем в течение шести недель эксперимента животные, получавшие лечение мазью, набрали 130 граммов или 86,6% от их начального веса тела; животные, получавшие лечение основой, набрали 189 граммов или 140% от начального веса тела, а контрольные животные набрали 187 граммов или 152% от начального веса тела. Тем не менее, потребление пищи у животных, получавших мазь, не отличалось от других групп. Спустя две недели у животных, получавших применение мази или мазевой основы, продолжительность интервалов P-Q и Q-T ЭКГ увеличилась. К концу эксперимента оба интервала нормализовались. У животных, получавших только мазевую основу в тот же самый период, амплитуды пика Т немного снизилась. Частота сердечных сокращений у всех подопытных животных оставалась в нормальных пределах. Таким образом, ежедневно в течение четырех недель втирание мази (4,7 г/кг) или мазевой основы в неповрежденную кожу спины крыс не продуцировало никакие необратимые изменения в функции сердца. Длительное применение мази (4,7 г/кг) не производило никакие значительные изменения в холинэстеразе плазмы, гемоглобине крови или анализах крови. Уровень глюкозы в крови немного, но существенно, снизился в экспериментальной группе. Аутопсия продемонстрировала отсутствие различий в общем внешнем виде внутренних органов. Сердце, печень, почки, селезенка, надпочечники, поджелудочная железа, вилочковая железа, мозг и яичко имели нормальный цвет, конфигурацию и консистенцию. Кожа и нижележащая жировая ткань, где применяли мазь, имели нормальный внешний вид и консистенцию.

[00342] *Локальные раздражающие воздействия мази на кожу.* Не наблюдали никакие признаки раздражающих кожу воздействий от длительного применения мази или мазовой основы.

5 [00343] *Аллергенные воздействия.* Применение мази или мазовой основы непрерывно в течение десяти или двадцати дней не вызвало дерматита при применении в терапевтической дозе или в дозе в десять раз выше. Повышение чувствительности организма к воздействию мази или мазовой основе не наблюдали в течение применения на коже согласно 10 данным, полученным посредством введения инъекции. Количество положительных реакций к внутрикожной инъекции раствора мази в контрольной группе было равно или превышало количество реакций в экспериментальных группах.

Заключения

15 [00344] Фактическая максимальная допустимая интраперитонеальная доза мази составляла 21000 мг/кг для крыс и 17000 мг/кг для мышей. Абсолютно допустимая 20 интраперитонеальная доза мази для крыс и мышей составляет 9000 мг/кг. Смертельная доза для 50% популяции (LD50) мази, вводимой интраперитонеально, составляет для крыс 17330+3140 мг/кг и для мышей 16730+3850 мг/кг. Ежедневное применение в течение 30 дней 25 мази на неповрежденной коже в количестве 4,7 г/кг, что превышает ежедневную терапевтическую дозу гиалуронидазы для человека более чем в 20 раз и гидрокортизона более чем в 40 раз, не вызывает никакие значительные необратимые общие или локальные изменения. Мазь не вызывает сенсибилизацию или локальное раздражение кожи при 30 применении на коже в дозах, которые превышают терапевтические дозы в 10-20 раз.

ПРИМЕР 11

Отчет о результатах клинических исследований

35 [00345] Этот Пример является сборником результатов нескольких клинических исследований. Исследовали препарат гиалуронидазы из *Streptomyces actinocidus* для 40 наружного применения. Основой лекарственного средства являлся фермент гиалуронидаза (гиалуронат лиазы, ЕС 4.2.2.1), продуцированный штаммом *Streptomyces actinocidus*. Лекарственное средство расфасовывается во флаконы, содержащие 300±80 МЕ активного вещества.

Исследование 1

45 [00346] Микробную гиалуронидазу применяли для лечения ограниченной кожной склеродермии. Продолжительность заболевания варьировалась от нескольких месяцев до 15 лет. Процесс была широко распространен. Микробную гиалуронидазу применяли 50 посредством электрофореза непосредственно на бляшках. С пятого дня применения

лекарственного средства бляшки показали регрессию. При постоянном применении микробной гиалуронидазы полное исчезновение бляшек наблюдали у 17 пациентов через 11-14 дней после начала лечения. У 4 пациентов эффекты становились очевидными через 21 день. У 2 пациентов эффект был незначительным.

Исследование 2

[00347] Микробную гиалуронидазу применяли на 42 пациентах, принадлежащих различным группам: 10 пациентов имели ревматический артрит, 12 пациентов страдали артритом соединений позвоночного столба, 3 пациента имели контрактуру Дюпюитрена, 14 пациентов имели тендинит воспалительного или посттравматического происхождения, 2 пациента боролись с бляшками на коже вследствие склеродермии и 1 пациент имел деформирующие хирургические рубцы на лице. Пациенты принадлежали к возрастным группам от 30 до 60 лет, а продолжительность патологического состояния варьировалась от нескольких месяцев до 10 лет. Лекарственное средство применяли каждый день посредством электрофореза и в комбинации с нестероидными противовоспалительными лекарственными средствами.

[00348] Положительную реакцию на лечение наблюдали у 37 пациентов. У пациентов с артритом подвижность суставов увеличилась в среднем на 17,2+1,5 градусов. У пациентов с контрактурой Дюпюитрена узлы и сухожилия становились более мягкими. У склеродермических пациентов отек и жесткость кожи снизились. У больных с тендинитом боль уменьшилась, подвижность увеличилась, воспалительный отек исчез. У пациентов с болью в поясничном отделе спины вследствие артрита соединений позвоночного столба порог болевой чувствительности повысился. У пациента с рубцом на лица деформации становились существенно более мягкими только после 3 курсов применения лекарственного средства. Общие результаты были положительными. Было особо отмечено, что лекарственное средство был очень эффективным при местном применении и вызывал минимальные побочные эффекты.

Исследование 3

[00349] Микробную гиалуронидазу применяли на 13 пациентах с рубцами после ожогов, 3 пациентах с рубцами после механической травмы, 2 пациентах с послеоперационными рубцами и 1 пациенте с контрактурой Дюпюитрена. Срок существования рубцов составлял от 1 месяца до 1,5 лет. Лекарственное средство применяли в большинстве случаев посредством прикладывания. У 2 пациентов прикладывание чередовали с электрофорезом. Лечение длилось в течение 15-30 дней.

[00350] Положительный терапевтический эффект различной степени наблюдали у всех 18 пациентов. Эффекты включали смягчение и истончение рубцов, повышение

подвижности суставов, уменьшение или полное исчезновение пигментирования и зуда. Лечение было наиболее эффективным против прямолинейных и свежих рубцов и менее эффективным по отношению к распространенным и/или коллоидным рубцам. Наиболее эффективным было чередование применения микробной гиалуронидазы посредством прикладывания и электрофореза. Применение лекарственного средства переносилось пациентами хорошо. Только в одном случае наблюдали аллергическое высыпание, которое исчезло после прекращения введения лекарственного средства.

Исследование 4

[00351] Микробную гиалуронидазу тестировали на 56 пациентах в возрасте от 16 до 62 лет (29 мужчин и 27 женщин). Сорок два пациента имели повреждение запястья в сочетании с сильным ограничением подвижности, 14 пациентов страдали от контрактуры Дюпюитрена. В обеих группах лекарственное средство применяли посредством прикладывания перед оперативным вмешательством для смягчения ткани и после восстановительной хирургии. Для каждого применения использовали приблизительно 300 МЕ. Однократное применение длилось в течение 16-18 часов. Курс лечения длился 15-60 дней с перерывом на 3-4 дня каждые 2 недели. У пациентов с контрактурой и ограничением подвижности суставов лечение микробной гиалуронидазой комбинировали с физическими нагрузками. У всех пациентов был получен положительный эффект. Терапевтический эффект был наиболее явным на свежих рубцах различного происхождения и на начальных стадиях контрактуры Дюпюитрена.

Исследование 5

[00352] Микробную гиалуронидазу применяли в виде прикладываний для лечения рубцов после ожогов у 50 пациентов, посттравматических рубцов у 30 пациентов, контрактуры Дюпюитрена у 5 пациентов и контрактуры суставов от ожога или посттравматического происхождения у 15 пациентов. Длительность заболеваний составляла от 1 месяца до 2 лет. Для однократного применения, которое длилось 12-16 часов, использовали 300 МЕ микробной гиалуронидазы. Курс лечения длился в течение 30 дней. У пациентов с контрактурой и ограничением подвижности суставов лечение микробной гиалуронидазой комбинировали с физическими нагрузками. Положительный терапевтический эффект получали в 100% случаев, он включал смягчение рубцов, снижение болевого синдрома, увеличение подвижности, уменьшение или предотвращение возникновения контрактуры. У 5 пациентов после 15-20 применений возникла местная воспалительная реакция с гиперемией кожи, которая исчезла после короткого перерыва в лечении.

[00353] Во второй группе (15 пациентов) микробную гиалуронидазу применяли посредством электрофореза у пациентов с послеожоговыми гипертрофическими и келоидными

рубцами возрастом 1-12 месяцев. Терапевтическая доза составляла 300 МЕ для процедуры, а курс включал 10-20 процедур. У всех пациентов поврежденный участок стал испытывать меньшее раздражение, боль, отек и зуд уменьшились, подвижность смягченной рубцовой ткани увеличилась. Побочные эффекты не наблюдали. Наблюдала высокую эффективность лекарственного средства, применяемого посредством электрофореза.

Исследование 6

[00354] Исследования проводили на 50 пациентах в возрасте 16-45-лет, страдающих келоидными рубцами (19 пациентов), гипертрофическими (21 пациент) и атрофическими (10 пациентов) рубцами. Курс лечения включал местный электрофорез лекарственного средства (300 МЕ) в течение 20 мин. На протяжении 15 дней. Положительные терапевтические эффекты в большинстве случаев наблюдали после пятой процедуры. Эффект включал снижение или исчезновение чувства жжения, зуда и боли. Рубцы бледнели, становились мягкими, безболезненными под пальпацией и тоньше. После полного курса площадь келоидных рубцов уменьшилась на 40%. У пациентов с гипертрофическими рубцами эффект был более очевидным: рубцы становились тоньше и более не выступали над уровнем нормальной кожи. Лечение случаев гипертрофических рубцов, которые не исчезали, с успехом завершали посредством применения дермабразии или СО-лазерной терапии. Побочные эффекты не наблюдали.

Исследование 7

[00355] Микробную гиалуронидазу применяли у 10 пациентов (возраст 2,5-59 лет) с рубцами различного происхождения (ожог, оперативное вмешательство и т.д.), возраст которых составлял от 10 дней до 1 года. Лекарственное средство применяли в виде прикладывания в течение 12-16 часов каждый день. Общая продолжительность лечения составляла 40-60 дней. Воздействия микробной гиалуронидазы наблюдали у 9 пациентов и включали истончение рубца, уменьшение боли, зуда, воспаления и увеличение амплитуды движений. На раннем этапе применения (спустя 10-14 дней после оперативного вмешательства) эффект был очевидным через 1-2 дня, более отсроченное применение после 10-15 процедур. У 2 пациентов после лечения с помощью прикладываний в течение 2 месяцев каждый день наблюдали некоторый локальный дерматит, который исчез после окончания лечения.

[00356] Подводя итог, эффективность микробной гиалуронидазы исследовали на 264 пациентах в возрасте 2,5-63 лет. Большая часть была пациентами с рубцами различного происхождения (после ожогов, посттравматические, после оперативного вмешательства и т.д.), ограничениями подвижности суставов различного происхождения (остеохондрит, ревматический артрит и т.д.) и контрактурами Дюпюитрена. Длительность заболевания

составляла от 10 дней до 15 лет. Лекарственное средство применяли в виде прикладываний или посредством электрофореза. Прикладывания использовали ежедневно в течение 12-18 часов в течение 10-60 дней. В некоторых случаях еженедельно делали короткий перерыв на 2-3 дня. Продолжительность курса электрофореза составляла 10-21 ежедневных процедур. Терапевтическая доза в среднем составляла 300 МЕ для отдельной процедуры. Микробную гиалуронидазу сочетали с нестероидными противовоспалительными лекарственными средствами и другим лечением. Результаты клинических исследований продемонстрировали 95% эффективность (256 из 264 пациентов). Воздействие микробной гиалуронидазы включало уменьшенный отек, пигментирование, зуд, болевой синдром, смягчение и истончение рубцов, увеличение подвижности и профилактику или снижение контрактуры. Отмечали, что терапевтическая эффективность была самой высокой, когда лекарственное средство применяли на ранних стадиях заболевания, когда репаративные процессы были все еще активными. Тем не менее, хороший результат был также получен у пациентов с келоидными рубцами, который наблюдали уже после пяти процедур. После лечения площадь келоидных рубцов уменьшилась на 40%. Лекарственное средство также хорошо переносилось пациентами. Побочные эффекты включали гиперемию кожи и высыпание. Любой из побочных эффектов исчезал полностью через 2-3 дня после временного прекращения приема лекарственного средства и наблюдался только у 2,6% (7 из 264 пациентов). Исследования продемонстрировали высокую эффективность микробной гиалуронидазы, ее широкий спектр применения и преимущества перед ронидазой.

Лечение хронического воспалительного заболевания женских репродуктивных органов

Исследование 1

[00357] Микробную гиалуронидазу исследовали на 57 пациентках. Первая группа пациенток (60,9%) состояла из пациенток с хроническими воспалительными заболеваниями женских репродуктивных органов: аднексит, сальпингит, офорит, цервицит, эндоцервицит, кольпит и т.д.), а вторая группа (25,0%) состояла из пациенток с доброкачественными опухолями (миома матки, киста яичника, эндометрический полип и т.д.). Третья группа состояла из пациенток с рубцовыми деформациями шейки и влагалища (атрезия цервикального канала, рубцовая деформация шейки или влагалища, мышечная недостаточность тазового дна). Возраст пациенток был 18 – 45 лет, а длительность заболевания варьировалась от 6 месяцев до 6 лет.

[00358] Микробную гиалуронидазу применяли ежедневно в виде вагинальных тампонов или электрофореза. У пациенток с вагинальной стриктурой или после операции раствор микробной гиалуронидазы применяли интравагинально через катетер. У 18 пациенток лекарственное средство применяли перед оперативным вмешательством, у 8 пациенток после операции и у 31 пациентки до и после оперативного вмешательства. Однократная доза

составляла 300+60 МЕ. Лечение длилось 6-15 дней. Оценка эффективности лекарственного средства включала субъективные жалобы, результаты бимануального обследования, лабораторные данные (биохимия, гематологическое, микробиологическое, иммунологическое обследование и т.д.) и инструментальные обследования (лапароскопия, хромогидротубация, кольпоскопия, ультразвуковое обследование и т.д.).

[00359] На основе результатов динамики заболевания положительный терапевтический эффект наблюдали у 90,2-100% пациенток. Этот положительный эффект включал следующее: исчезновение боли в нижней части живота (100%), восстановление активной половой жизни (100%), исчезновение боли в ходе бимануального обследования (90,6%), восстановление менструальной функции (100%), увеличение влагалищного секрета (90,2%). У пациенток, получавших микробную гиалуронидазу перед операцией, через 4-7 дней после начала лечения влагалищный секрет стал жидким, прозрачным, объем влагалища увеличился вследствие увеличенной упругости стенок, слизь стала более нормотрофной. Исследования влагалищного секрета продемонстрировали, что на 3-5 дней применения лекарственного средства значение рН влагалища изменилась с кислого на нейтральное, что также было важно для снижения болезненных ощущений и восстановления нормальной половой жизни. У некоторых пациенток введение микробной гиалуронидазы привело не только к уменьшению количества условной болезнетворной микрофлоры во влагалище (энтерококки снизились на 75,9 %, стафилококк - на 54,1%, кандид - на 50 %), но также в 16,7% случаев к полному ее устранению, что указывает на бактерицидное действие лекарственного средства. Анализ также указывает на положительное действие микробной гиалуронидазы на репаративные процессы в период после операций на брюшных, а также влагалищных ранах. Введение микробной гиалуронидазы снизило воспалительную реакцию и отек ткани, ускорило заживление ран с последующим образованием мягкого и небольшого рубца (сокращение на 23%). Введение микробной гиалуронидазы с первого дня после оперативного вмешательства позволяло сократить послеоперационный период госпитализации на 12%. Оба способа введения лекарственного средства были одинаково эффективными.

[00360] Наряду с хорошей переносимостью было отмечено и отсутствие побочного эффекта. Несмотря на большой процент предыдущих аллергических реакций среди пациенток, только у одной пациентки (на 1,7%) возникли неприятные ощущения во влагалище, зуд и жжение, которые полностью исчезли вскоре после того, как прием лекарственного средства был прекращен. На основе данных, демонстрирующих высокую эффективность микробной гиалуронидазы и хорошую переносимость, лекарственное средство рекомендовали для клинического применения в гинекологии как часть комплексной терапии.

Исследование 2

[00361] Микробную гиалуронидазу вводили 50 пациентам в возрасте 19 - 68 лет. Первая группа (38 пациентов) состоял из женщин с хроническим адникситом. У 18 из них это заболевание сопровождалось кольпитом, эндоцервицитом и параметритом. Вторая группа (12 пациентов) состояла из женщин после различных восстановительно-пластических хирургических вмешательств, в которых микробную гиалуронидазу применяли для предотвращения развития рубцовых деформаций, начиная с 3-го послеоперационного дня. Лекарственное средство вводили в виде вагинальных тампонов в течение 10 дней или посредством электрофореза в течение 14 дней. Однократная доза составляла 300+60 МЕ. В обеих группах введение микробной гиалуронидазы сочетали со стандартной антибактериальной, противовоспалительной, дезинтоксикационной и симптоматической терапией.

[00362] Применяя объективные наблюдения, лабораторные данные и результаты бимануального обследования, выполняли оценку клинической эффективности. Терапевтическая эффективность микробной гиалуронидазы в первой группе (хронический адниксит) составляла 100%. У 75% пациентов положительный эффект был очевиден к концу первой недели лечения. Клинический эффект включал исчезновение болевого синдрома, значительное уменьшение воспалительных изменений в околоматочном пространстве, безболезненную пальпацию, увеличение подвижности маточного тела и шейки. Снижение скорости оседания лейкоцитов и эритроцитов. Во второй группе пациентов введение микробной гиалуронидазы уменьшило болевой синдром в области оперативного вмешательства благодаря снижению послеоперационного отека влагалища и шейки. К концу первой недели благодаря введению микробной гиалуронидазы ткани в области рубца размягчились, а к концу второй недели упругость ткани в области рубца существенно повысилась, обеспечивая хороший косметический эффект особенно у пациенток после восстановительно-пластической хирургии.

[00363] Лечебное учреждение указывает на высокую терапевтическую эффективность микробной гиалуронидазы в лечении хронических воспалительных заболеваний и профилактике рубцовой деформации после восстановительно-пластической хирургии на женских репродуктивных органах. Не наблюдали никакие локальные побочные эффекты в вагинальной слизи, на брюшной стенке, шейке. Лечебное учреждение отмечало хорошую переносимость, отсутствие побочных эффектов и легкость приема лекарственного средства. Микробную гиалуронидазу рекомендовали для клинического применения в гинекологии как часть стандартной комплексной терапии.

[00364] Подводя итог, микробную гиалуронидазу исследовали в гинекологической практике на 107 пациентах в возрасте 18.– 68 лет. Лекарственное средство

применяли главным образом для предотвращения рубцовой деформации после различных типов восстановительно-пластического или другого оперативного вмешательства и для лечения хронических воспалительных заболеваний (кольпит, цервицит, эндоцервицит, адниксит, офорит и т.д.). Микробную гиалуронидазу вводили в дозе 300+60 МЕ ежедневно в виде вагинальных тампонов или посредством электрофореза. Продолжительность курса составляла 6-15 дней (Таблица 2). Микробную гиалуронидазу сочетали со стандартной противовоспалительной, антимикробной, дезинтоксикационной и симптоматической терапией. Анализ результатов клинических исследований указывает на высокую терапевтическую эффективность, наблюдаемую у всех 107 пациентов и по отдельным симптомам 90,2-100%. Действие микробной гиалуронидазы становилось очевидным через 4-7 дней и выражалось в снижении или исчезновении болевого синдрома. Значительное снижение воспалительной реакции в области патологического источника, безболезненная пальпация, увеличение маточной подвижности, влагалищный секрет становился жидким и прозрачным, упругость стенок влагалища повышалась, а объем влагалища увеличивался, значение pH повышалось с очень низкого до нейтрального. Менструальная функция восстанавливалась, также как и половая жизнь, лейкоцитоз уменьшался, а оседание эритроцитов снижалось.

[00365] Как показали исследования, микробная гиалуронидаза оказывала регулирующие воздействия на фагоциты влагалища и брюшной полости, восстанавливая и активируя кислородозависимую функцию фагоцитов. Микробная гиалуронидаза также оказывает антимикробное действие, сокращая влагалищную условно болезнетворную микрофлору (энтерококк, стафилококк, кандид). Кроме того, применение микробной гиалуронидазы до и после оперативного вмешательства было полезным для репаративных процессов в послеоперационный период в брюшных или влагалищных ранах. Применение микробной гиалуронидазы уменьшило отек, воспаление ткани, интенсивность болевого синдрома, повысило эластичность в области раны, что ускорило ее заживление и сделало последующий рубец более тонким и мягким (сокращение на 23%), и сократило период послеоперационной госпитализации на 12%. Оба способа применения микробной гиалуронидазы (применение в виде тампонов или посредством электрофореза) были одинаково эффективными. Отмечали хорошую переносимость и практически полное отсутствие побочных эффектов (0,93 % - 1 пациент из 107 пациентов) и удобство приема лекарственного средства.

ПРИМЕР 12

Определение последовательности гиалуронидазы из *Streptomyces actinocidus*

[00366] Генный фрагмент 449 bp (SEQ ID NO:3) гена гиалуронидазы из *Streptomyces actinocidus* клонировали, выделяли и упорядочивали согласно следующей методике

[00367] Белковую последовательность транслировали назад в ее нуклеотидную последовательность и использовали для генерации праймера для ПЦР с целью амплификации гена гиалуронидазы из *Streptomyces actinocidus*. Последовательности праймера представлены ниже.

5

10

Прямой праймер	GGCGAGTACAC SCTCTACACSWSSCCSGCSCAGTTCTA
Обратный праймер 1	GTGSATCTCSWWCTCCTCSGGS GTGTCGCC
Обратный праймер 2	SATSATSGCSSWSGGSGCGCCSGCSGCSGCSACSAC
Обратный праймер 3	GAASATGCCCTGSGCSGCSGTGCC
Обратный праймер 4	CTTSACSACGCCGTCSGTSGCSGTSACGAA

15

[00368] Матричную геномную ДНК готовили из свежей культуры бактерий, содержащих плазмиды, экспрессирующие геномные последовательности ДНК *Streptomyces actinocidus*. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) выполняли, применяя низкую температуру ренатурации ДНК для обеспечения максимального охвата и гибридизации обратных последовательностей праймера. Ампликоны ПЦР, использующие «вырожденные» праймеры, генерировали последовательности длиной от 300-450 основ. Примите во внимание, что W = А или Т и S = G или С в единицах идентичности нуклеиновой кислоты.

20

25

[00369] 449 основной сегмент продуцировали с прямым праймером и обратным праймером 2. Было обнаружено, что транслированная белковая последовательность (SEQ ID NO:4) была гомологичной с гиалуронидазой из *Streptococcus pyrogenes*, закодированной бактериофагом. Белковые последовательности и последовательности нуклеиновой кислоты даны на Фигуре 15.

30

35

[00370] «Вырожденные» ампликоны ПЦР клонировали произвольно и задавали последовательность 18 положительных клонов. Четырнадцать из этих клонов выровнялись друг с другом и содержали последовательности прямых и обратных праймеров. Когда последовательность ДНК транслировали в белок, несколько других экспериментально определенных белковых удлинений совпадали с транслированной последовательностью. Кроме того, белковая трансляция выровнялась гомологически с гиалуронидазами бактериофага в базе данных.

40

[00371] 449 основная последовательность закодировала часть отдельной открытой рамки считывания, и ее аминокислотная последовательность дана в SEQ ID NO: 4. Открытая рамка считывания не демонстрировала внутрирамочный запускающий и терминирующий трансляцию кодон, подразумевая, что было удлинение геномной последовательности (вверх и вниз) за пределы «известных» 449 основ. Кроме того, белковые данные поддерживали существование большего гена.

45

50

* * *

[00372] Настоящее изобретение не должно быть ограничено рамками описанных в настоящей заявке специфических примеров осуществления. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к описанным в настоящей заявке модификациям будут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания и сопутствующих фигур. Такие модификации должны входить в рамки приложенной формулы изобретения.

[00373] Патенты, заявки на патенты, публикации, описания продукта и протоколы упоминающиеся в настоящей заявке и в приложенной библиографии, полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

Перечень последовательностей_107-90RU
Docket No.: 21137/1201196-US1 (Patent)

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ НУКЛЕОТИДОВ И/ИЛИ АМИНОКИСЛОТ

SEQ ID NO:1
GDPXNSLSPALFYGD

SEQ ID NO:2
(D/G)NGEYTLYTSPAQFY

SEQ ID NO:3
GGC GAG TAC ACG CTC TAC ACS AGC CCC GCS CAG TTC TAC GGC TCG TCG ACG
ACG GCG CAC ACG GTC ACG ATC AAC CAC AAG GCT TCG TCC GGG GAC ACC GCG
GCG CTG AAC GTC ACC TCG GAC AAC CCG GCC ACC TCG GCC ATG TAC CTG ACC
GGC GTG GAG ACC TCG CGC GGG ACG CTG AAG ATA TCC CAC AAG GGG TAC GCC
GAC GGT TCG GAC CCG GGG GCC TCC GGA CTC TCG ATC GAT CTC AGG ACC TCG
GGG ACC GCC GCG CAG GGC ATC TTC GTC ACC GCG ACC GAC GGC CCG ACC AAG
GGA GCC CTG ATC GTC CTG CCG AAC AAC CCG GGC GTG GAC GAC TTC GTG GTC
AAG GGC ACG GGC CGG ACG GGC ATC GGG ATC GGC CGC GGT GAC ACG CCC CAG
TCC CAG CTC CAC GTC GTC GCC GCS GCC GGC GCC CCS AGC GC

SEQ ID NO:4
G E Y T L Y T S P A Q F Y G S S T
T A H T V T I N H K A S S G D T A
A L N V T S D N P A T S A M Y L T
G V E T S R G T L K I S H K G Y A
D G S D P G A S G L S I D L R T S
G T A A Q G I F V T A T D G P T K
G A L I V L R N N P G V D D F V V
K G T G R T G I G I G R G D T P Q
S Q L H V V A A A G A P S A

Формула изобретения

1. Выделенный белок гиалуронидазы, который имеет молекулярный вес приблизительно 44 ± 1 кД, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 90% идентичную последовательности, которая содержит SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4.
2. Выделенный белок гиалуронидазы по п.1, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 95% идентичную последовательности, которая содержит SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4.
3. Выделенный белок гиалуронидазы по п.1, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4.
4. Выделенный белок гиалуронидазы по п.1, который представляет собой полноразмерную гиалуронидазу из *S. actinocidus* 77.
5. Фармацевтический лекарственный состав для повышения проницаемости ткани

или уменьшения вязкости соединительной ткани, содержащий эффективное количество выделенной гиалуронидазы по п.1 и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель, разбавитель или вспомогательный агент.

5 6. Способ предотвращения или минимизации образования рубца, включающий местное введение фармацевтического состава по п.5 для заживления раны у пациента.

7. Способ сокращения проявления морщин посредством уменьшения вязкости соединительной ткани в результате действия гиалуронидазы, включающий местное введение фармацевтического состава по п.5.

10 8. Способ облегчения дискомфорта или боли, вызванной состоянием, выбранным из группы, состоящей из ревматического артрита, склеродермии, тендосиновита и тендовагинита, включающий введение пациенту фармацевтического состава по п.5.

15 9. Способ улучшения проникновения лекарственного средства в ткань, включающий введение субъекту лекарственного средства совместно с фармацевтическим составом по п.5.

20 10. Способ по п.9, отличающийся тем, что лекарственное средство выбирают из противовоспалительного лекарственного средства, стероида, антибиотика, противогрибкового, анестезирующего средства, противопсориазного агента, гормона и противоопухолевого агента.

11. Способ по п.9, отличающийся тем, что лекарственное средство подавляет или стимулирует рост волос.

12. Выделенная последовательность ДНК, кодирующая белок гиалуронидазы по п.1.

25 13. Выделенная последовательность ДНК по п.12, отличающаяся тем, что она кодирует белок гиалуронидазы по п.2.

14. Выделенная последовательность ДНК по п.12, отличающаяся тем, что она кодирует белок гиалуронидазы по п.3.

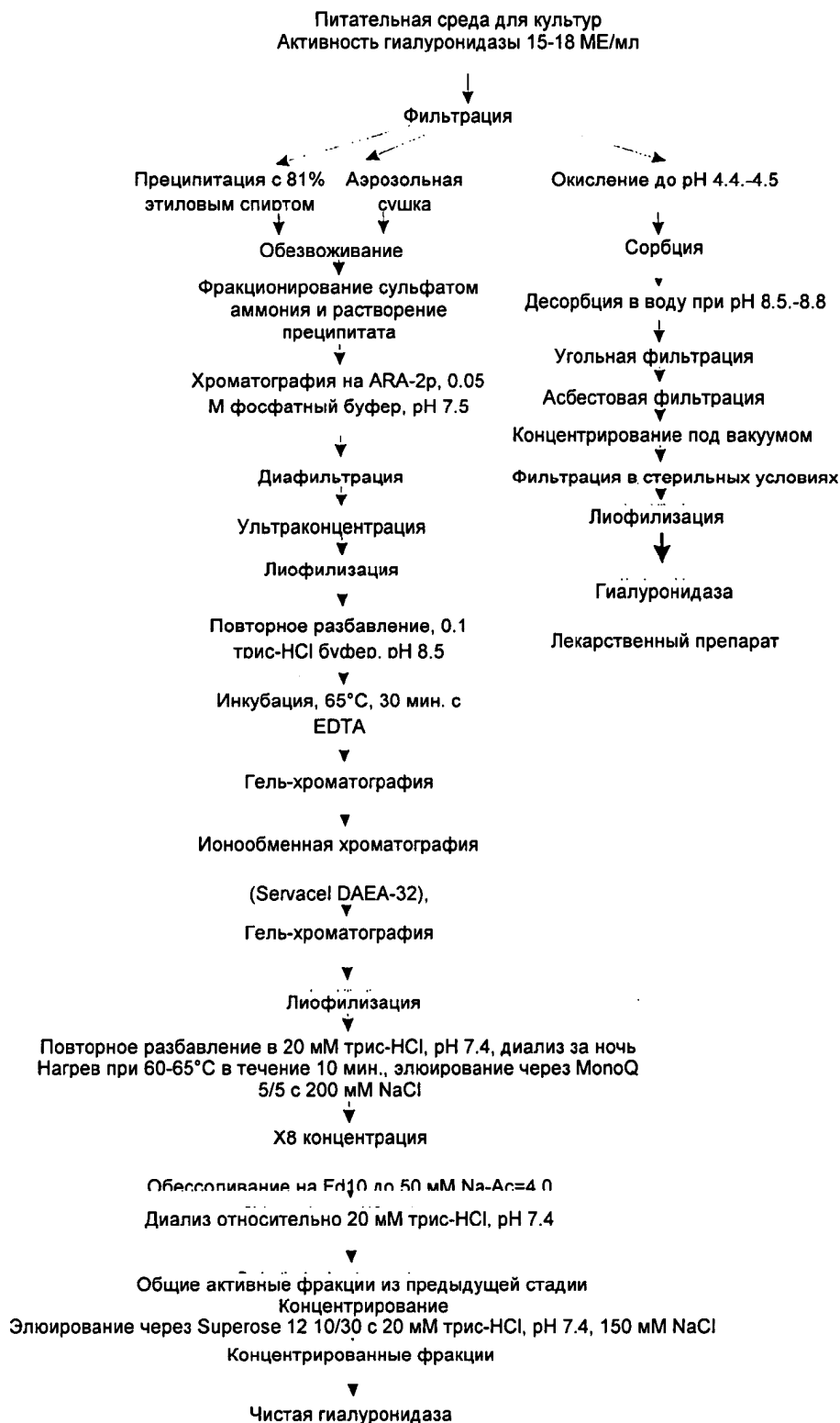
30

35

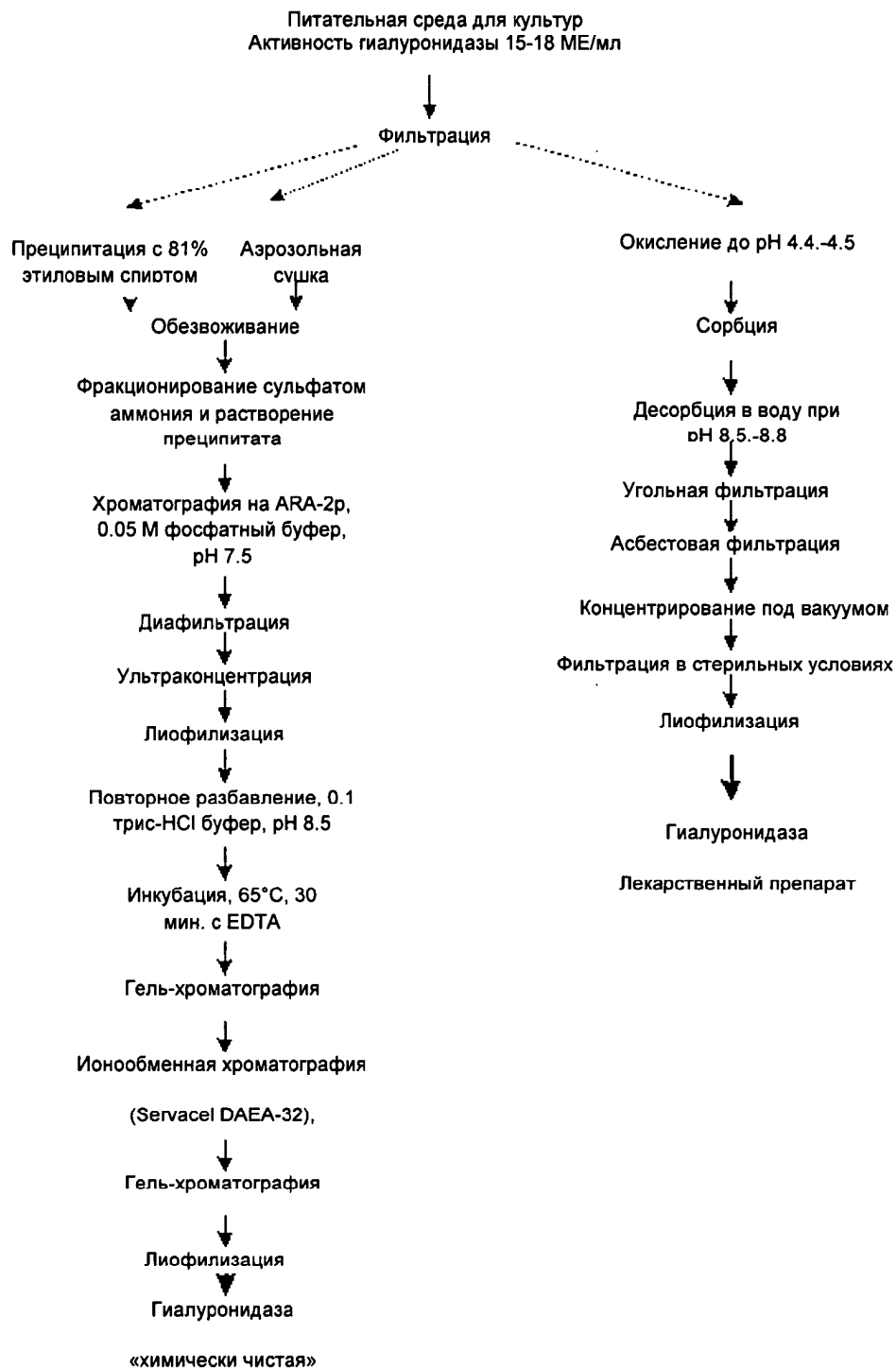
40

45

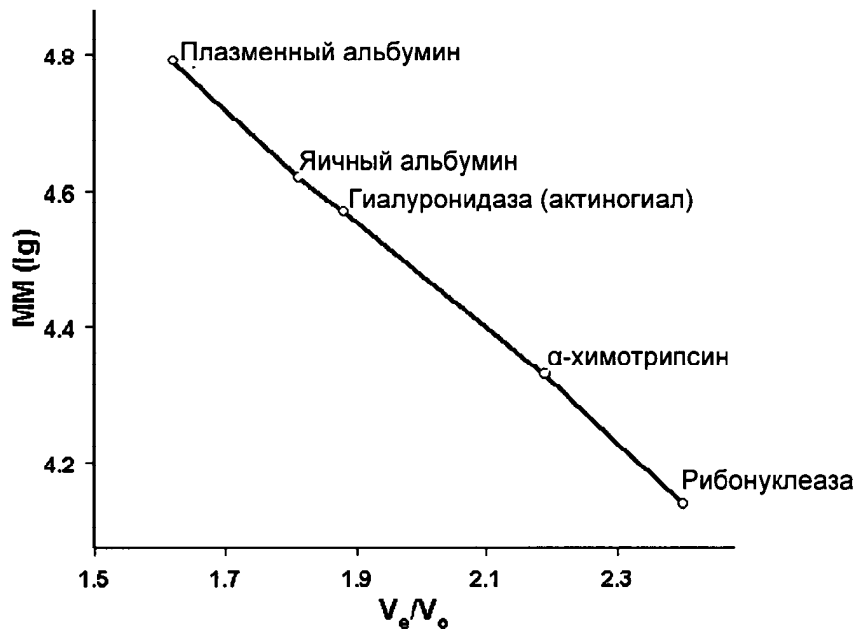
50



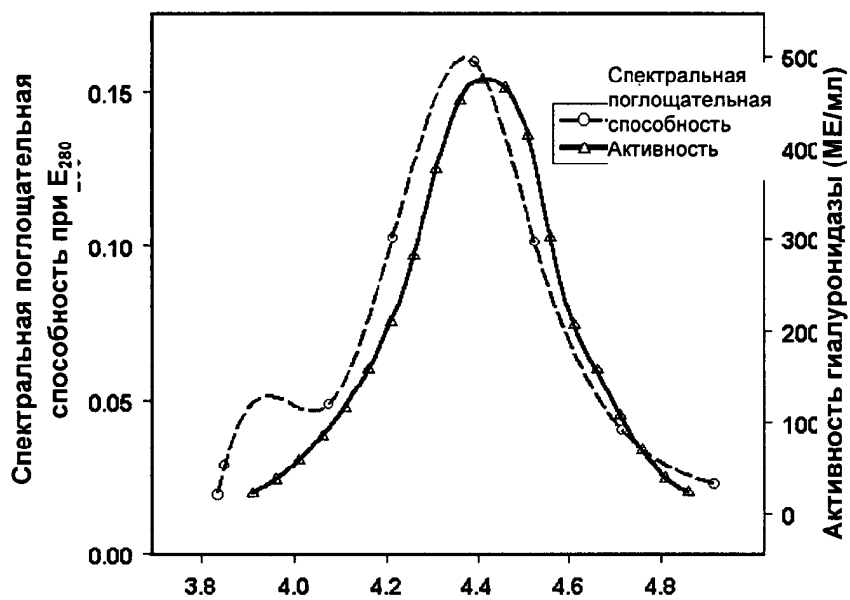
Фиг. 1А



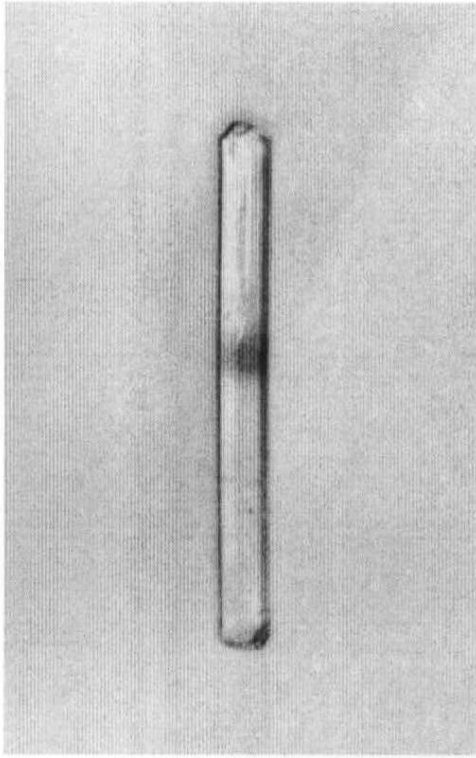
Фиг. 1В



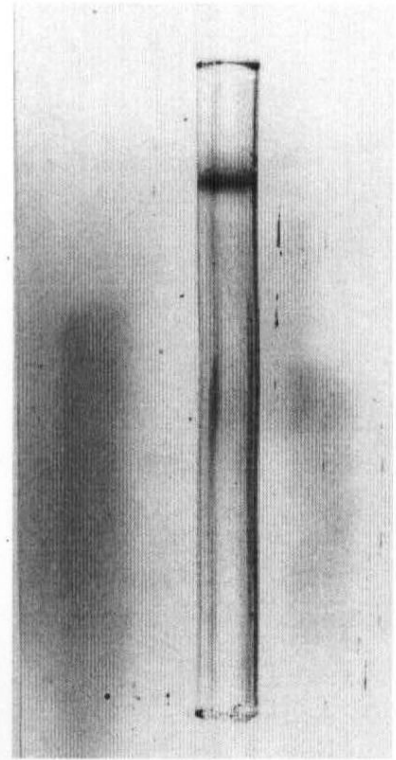
Фиг. 2



Фиг. 3

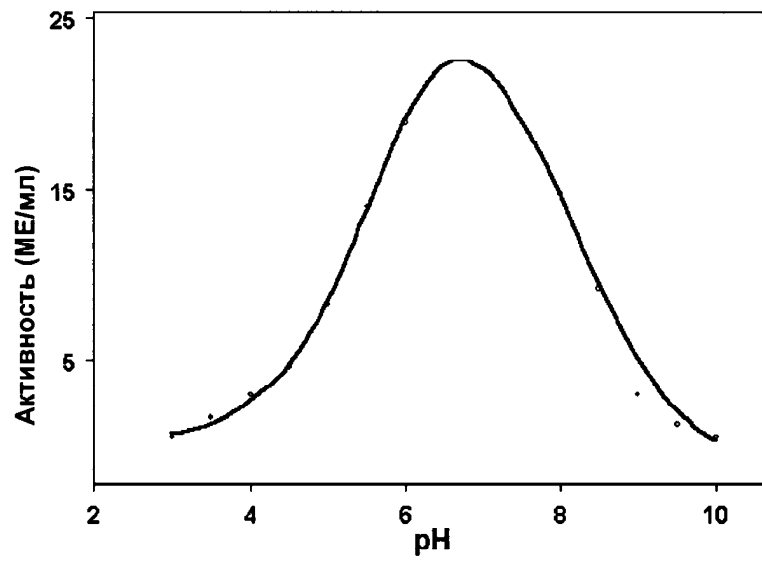


A

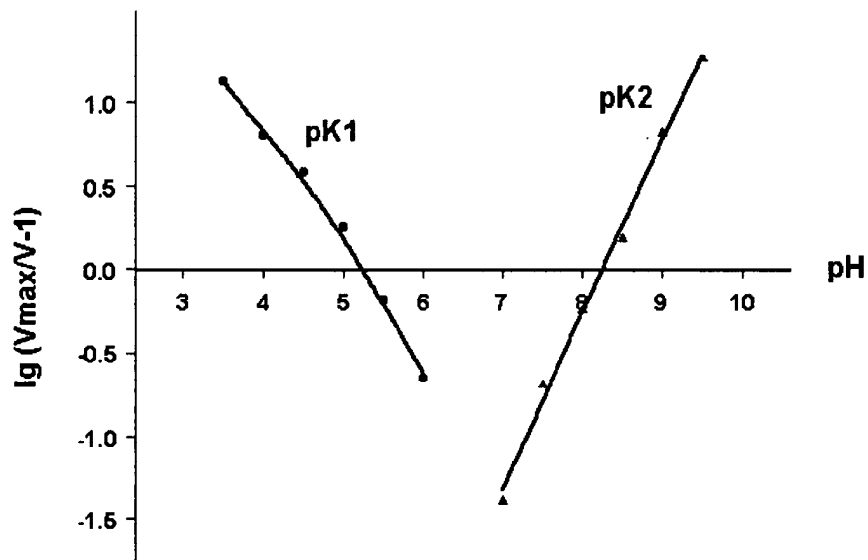


B

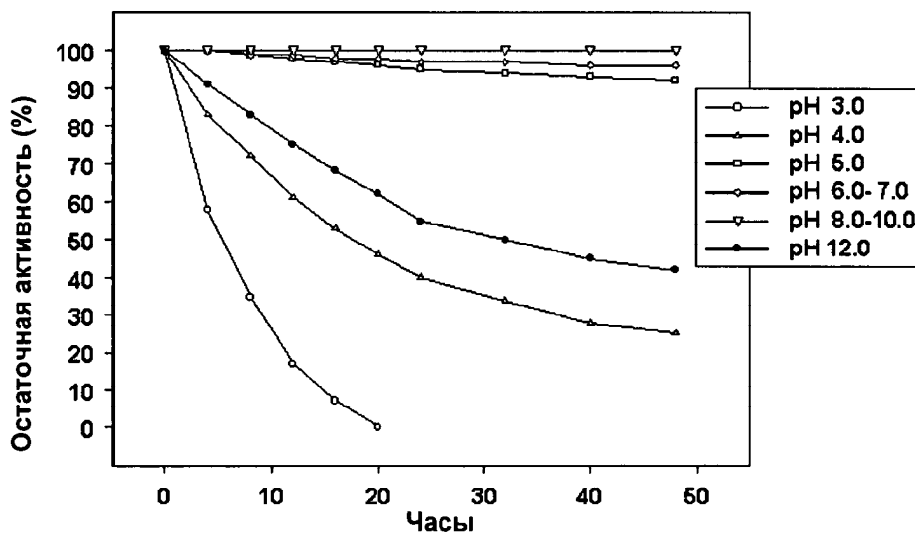
Фиг. 4



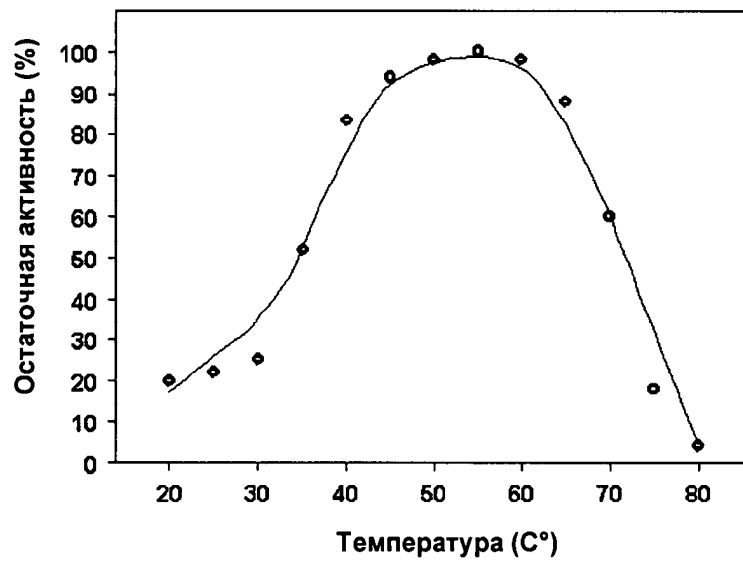
Фиг. 5



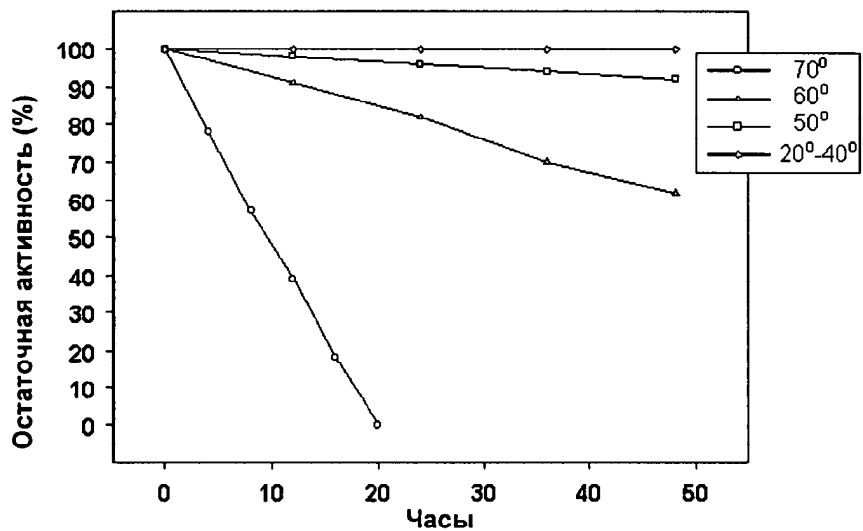
Фиг. 6



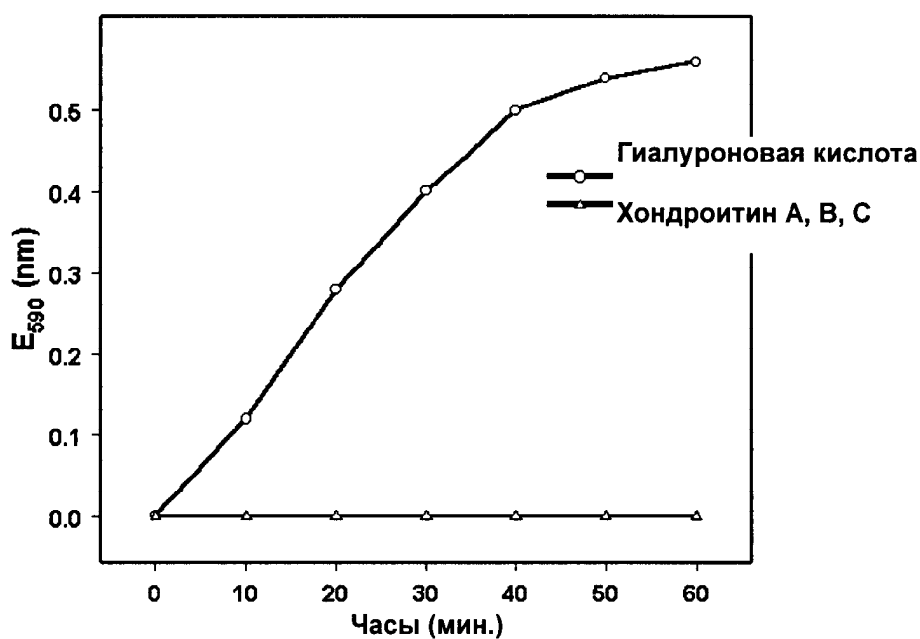
Фиг. 7



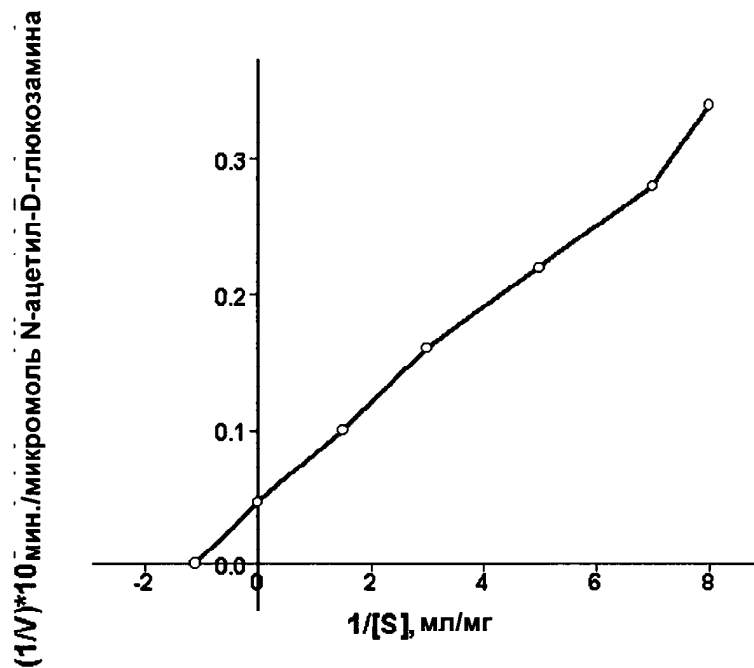
Фиг. 8



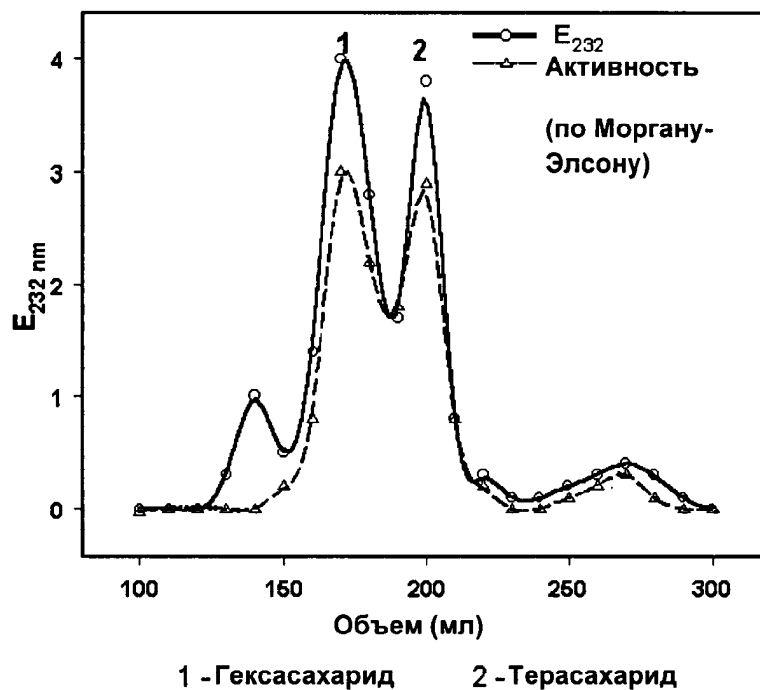
Фиг. 9



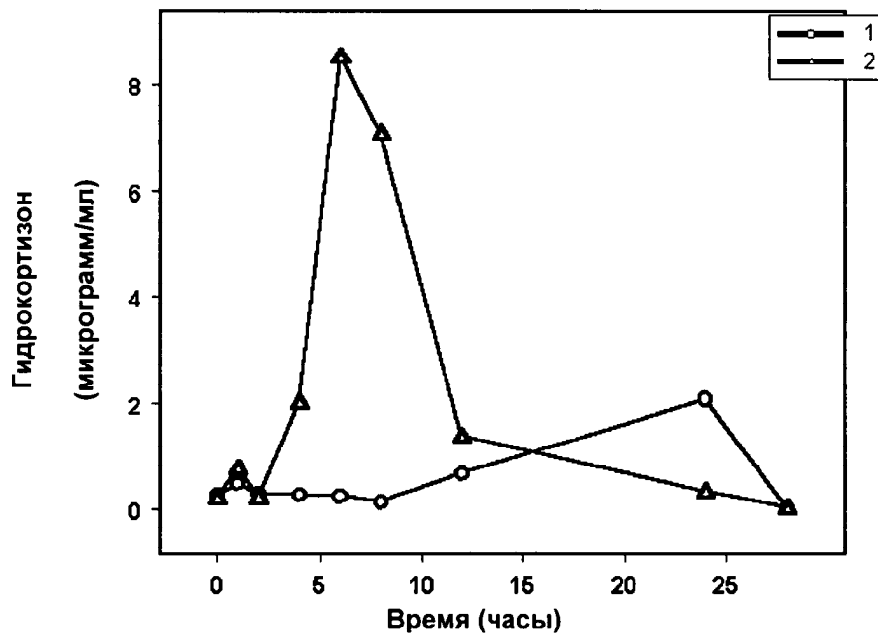
Фиг. 10



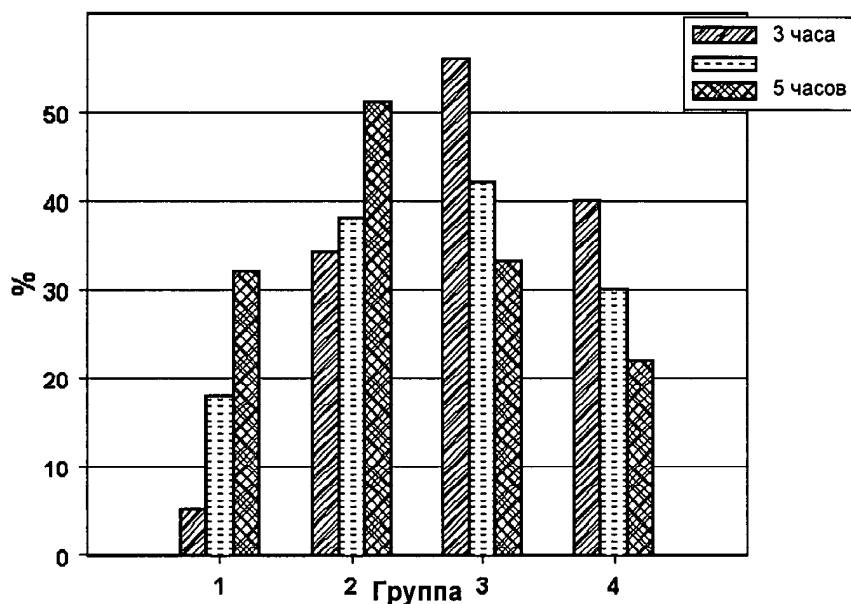
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



1 - 0,5% гидрокортизон

2 - 0,5% гидрокортизон + 60 МЕ гиалуронидаза

Фиг. 14

1 ggc gag tac acg ctc tac acs agc ccc gcs cag ttc taC GGC TCG TCG ACG
 G E Y T L Y T S P A Q F Y G S S T
 52 ACG GCG CAC ACG GTC ACG ATC AAC CAC AAG GCT TCG TCC GGG GAC ACC GCG
 T A H T V T I N H K A S S G D T A
 103 GCG CTG AAC GTC ACC TCG GAC AAC CCG GCC ACC TCG GCC ATG TAC CTG ACC
 A L N V T S D N P A T S A M Y L T
 154 GGC GTG GAG ACC TCG CGC GGG ACG CTG AAG ATA TCC CAC AAG GGG TAC GCC
 G V E T S R G T L K I S H K G Y A
 205 GAC GGT TCG GAC CCG GGG GCC TCC GGA CTC TCG ATC GAT CTC AGG ACC TCG
 D G S D P G A S G L S I D L R T S
 256 ggg acc gcc gcg cag ggc atc ttc gtc acc gcg acc gac ggc ccg acc aag
 G T A A Q G I F V T A T D G P T K
 307 GGA GCC CTG ATC GTC CTG CGG AAC AAC CCG GGC GTG GAC GAC TTC GTG GTC
 G A L I V L R N N P G V D D F V V
 358 AAG GGC ACG GGC CGG ACG GGC ATC GGG ATC GGC CGC GGT GAC ACG CCC CAG
 K G T G R T G I G I G R G D T P Q
 409 TCC CAG CTC CAC gtc gtc gcc ges gcc ggc gcc ccs agc ggc
 S Q L H V V A A A G A P S A

Фиг. 15