



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 120037

(13) C2

(51) МПК

A61K 38/18 (2006.01)

A61F 2/18 (2006.01)

A61L 15/28 (2006.01)

A61L 15/44 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ  
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА  
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА  
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2015 11095

(22) Дата подання заявки: 09.04.2014

(24) Дата, з якої є чинними  
права на винахід: 25.09.2019

(31) Номер попередньої  
заявки відповідно до  
Паризької конвенції: 61/823,749

(32) Дата подання  
попередньої заявки  
відповідно до  
Паризької конвенції: 15.05.2013

(33) Код держави-учасниці  
Паризької конвенції,  
до якої подано  
попередню заявку: US

(41) Публікація відомостей  
про заявку: 10.03.2016, Бюл.№ 5

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: 25.09.2019, Бюл.№ 18

(86) Номер та дата  
подання міжнародної  
заявки, поданої  
відповідно до  
Договору РСТ PCT/US2014/033536,  
09.04.2014

(72) Винахідник(и):

Санта Марія Пітер Люк (US),  
Янг Юньчжи Пітер (US),  
Кім Сунву (US),  
Домвілль-Льюїс Хлоя (US)

(73) Власник(и):

ЗЕ БОАРД ОФ ТРАСТЕЕС ОФ ЗЕ ЛЕЛАНД  
СТАНФОРД ДЖУНІОР ЮНІВЕРСІТІ,  
Office of the General Counsel, Building 170,  
3rd Floor, Main Quad, P.O. Box 20386,  
Stanford, CA 94305-2038, United States of  
America (US)

(74) Представник:

Кістерський Тимофій Арсенійович,  
реєстр. №457

(56) Перелік документів, взятих до уваги  
експертизою:

US 20070038298 A1, 15.02.2007

US 20090148486 A1, 11.06.2009

US 20120282173 A1, 08.11.2012

US 20030133979 A1, 17.07.2003

MA Y. et al. Topical treatment with growth  
factors for tympanic membrane perforations:  
progress towards clinical application. Acta  
otolaryngologica, Scandinavian university  
press, Oslo, NO, 2002, Vol. 122, P. 586 – 599  
MIYAMOTO et al. A novel anti-human HB-  
EGF monoclonal antibody with multiple  
antitumor mechanisms against ovarian cancer  
cells. Clin cancer res., 2011, Vol. 17, P. 6733 –  
6741

SANTA MARIA P.L. et al. The role of  
epidermal growth factor in the healing  
tympanic membrane following perforation in  
rats. Journal of molecular histology, Kluwer  
academic publishers, DO, 2010, Vol. 41, no. 6,  
P. 309 – 314

SHIRAKATA Y. et al. Heparin-binding EGF-  
like growth factor accelerates keratinocyte  
migration and skin wound healing. Journal of  
cell science, 2005, Vol. 118, no. 11, P. 2363 –  
2370

SEONWOO H. et al. Regeneration of chronic  
tympanic membrane perforation using an  
EGF-releasing chitosan patch. Tissue  
engineering: part A, 2013, Vol. 19, no. 17-18,  
P. 2097 – 2107

UA 120037 C2

**(54) ЗАСТОСУВАННЯ ГЕПАРИНЗВ'ЯЗУВАЛЬНОГО ЕПІДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТУ БІЛКА ДЛЯ ЗАГОЄННЯ ХРОНІЧНОЇ ПЕРФОРАЦІЇ БАРАБАННОЇ ПЕРЕТИНКИ**

---

**(57) Реферат:**

Винахід стосується застосування гепаринзв'язувального епідермального фактора росту білка (HB-EGF) для лікування хронічної перфорації барабанної перетинки та фармацевтичної композиції, що містить гепаринзв'язувальний епідермальний фактор росту білка (HB-EGF) для лікування хронічної перфорації барабанної перетинки.

## Рівень техніки

[001] Перфорація барабанної перетинки (БП) найчастіше виникає внаслідок середнього отиту або травми. Найбільш частими клінічними проявами перфорації БП є кондуктивна приглухуватість і хронічна інфекція. Найпоширенішою причиною перфорації БП є інфекція. Перфорації, пов'язані з неускладненим гострим середнім отитом, звичайно є невеликими; переважна більшість загоюється спонтанно після ослаблення інфекції. Крім того, більші перфорації можуть виникнути внаслідок інфікування некротизуючими мікроорганізмами. Іншою основною причиною перфорації БП є травма вуха. Звичайно причинами травми є тупі й проникаючі пошкодження, швидкі зміни барометричного тиску (баротравми) і надмірний звуковий тиск.

[002] Як відомо, після травми тканини проходять декілька стадій загоєння. Незважаючи на те, що загоєння ран у барабанній перетинці включає спочатку гемостатичну й протизапальну стадії, які схожі на звичайне загоєння шкіри, проліферативна й міграційна фази в барабанній перетинці суттєво відрізняються від цих фаз у інших тканинах. У більшості ситуацій загоєння ран утворюється основа грануляційної тканини, яка слугує як платформа, на якій відбувається реепітелізація. При загоєнні барабанної перетинки ці події відбуваються у зворотному порядку. Шар плоского епітелію спочатку утворює міст через рану, і тільки потім відбувається переформування волокнистого компонента. БП унікальна тим, що шар епідермісу відіграє критичну роль у початковій міграції, причому цей процес контролює проліферуючий базальний шар.

[003] Більшість перфорацій барабанної перетинки загоюється спонтанно; однак низка чинників може затримувати або запобігати закриттю, що призводить до хронічної перфорації. Постійно існуючі перфорації звичайно виникають в умовах довготривалої інфекції, що погіршує процес відновлення. У цих ситуаціях не відбувається процес регенеративного загоєння мембрани, хемотаксис і наступна міграція епітеліальних клітин у рані. Гістологічно при хронічних перфораціях плоский епітелій росте по краю перфорації до зустрічі з медіальним шаром слизової оболонки БП.

[004] Цілями лікування хронічної перфорації БП є лікування або попередження хронічного середнього отиту й відновлення слуху. Звичайна терапія включає використання трансплантатів тканини, наприклад, при використанні в тимпанопластичі ауто-трансплантатів, як ауто-трансплантат можна використовувати скроневу фасцію. Можна використовувати поверхневу скроневу фасцію, що складається з фібробластів у колагеновій матриці. Хоча тимпанопластика з використанням трансплантата з аутологічної сполучної тканини є досить успішним способом відновлення постійно існуючих перфорацій БП, було б корисно розробити процедуру, яка не вимагає мікрохірургічних навичок, є менш витратною й може застосовуватися в умовах поліклініки. Цей винахід задовольняє цю потребу.

## Публікації

[001] Santa Maria et al. (2010) J Mol Histol. 2010 Dec;41(6):309-14. Santa Maria (2011) Thesis, University of Western Australia. Johnson and Wang (2013) J Control Release 166(2):124-9. Ishihara et al. (2003) J Biomed Mater Res A. 64(3):551-9. Tolino et al. (2011) Biochim Biophys Acta. 1810(9):875-8; Shirakata et al. (2005) J Cell Sci. 118(Pt 11):2363-70; Hüttenbrink (2005) HNO 53(6):515-6; Ma et al. (2002) Acta Otolaryngol. 122(6):586-99. WO 2007/037514. US 2010/0222265.

## Суть винаходу

[002] Пропонуються композиції й способи лікування хронічної перфорації барабанної перетинки. У способах згідно з цим винаходом хронічно перфорована барабанна перетинка перебуває в місцевому контакті з ефективною дозою гепарин-зв'язувального епідермального фактора росту, HB-EGF, або агента, що володіє активністю HB-EGF, протягом періоду часу, достатнього для забезпечення покращеного загоєння перфорації мембрани. У деяких варіантах реалізації цього винаходу доза HB-EGF пропонується в композиції з уповільненим вивільненням; в інших варіантах реалізації цього винаходу пропонується регулярне введення композиції без уповільненого вивільнення. У деяких варіантах реалізації цього винаходу композиція уповільненого вивільнення є біорозкладною. В інших варіантах реалізації цього винаходу уповільнене вивільнення здійснюється пристроєм, наприклад насосом або іншим пристроєм для вивільнення.

[003] БП, що піддається лікуванню, контактує з HB-EGF протягом періоду часу, достатнього для покращення загоєння перфорації БП, тобто, щоб отримати в результаті значне закриття перфорації, наприклад до площі перфорації менше ніж приблизно 0,1 мм<sup>2</sup>. Закриття можна контролювати візуально, у тому числі мікроскопічно; функціонально, наприклад, за зменшенням приглухуватості; тощо. Період часу контактування з HB-EGF може становити щонайменше одну добу, щонайменше 3 доби, щонайменше 5 діб, щонайменше 7 діб, щонайменше 10 діб,

щонайменше 2 тижні, щонайменше 3 тижні; і може становити аж до однієї доби, аж до 3 діб, аж до 5 діб, аж до 7 діб, аж до 10 діб, аж до 2 тижнів, аж до 3 тижнів або більше, відповідно до потреб індивідуума.

[004] У деяких специфічних варіантах реалізації цього винаходу ефективна доза HB-EGF надається в не ототоксичній композиції уповільненого вивільнення, наприклад, у гелі, піні, вставці тощо, переважно, у біорозкладній композиції. В одному такому варіанті реалізації цього винаходу ефективну дозу HB-EGF вводять до складу гелю, що містить хітозан, полімолочну кислоту й фібриноген.

[005] В одному варіанті реалізації цей винахід включає спосіб, що складається з (i) ідентифікації пацієнта, що має хронічну перфорацію БП; (ii) контактування ураженої БП із ефективною дозою HB-EGF, наприклад, що надається у формі крапель для введення через відповідні проміжки часу, в пристрої для уповільненого вивільнення HB-EGF, у композиції уповільненого вивільнення тощо; і (iii) моніторинг індивідуума для визначення ефективного закриття перфорації.

[006] Інший аспект цього винаходу відноситься до застосування агента з активністю HB-EGF при виробництві лікарського засобу для лікування хронічної перфорації БП, причому зазначений лікарський засіб вводять пацієнтові з хронічною перфорацією БП протягом періоду часу й у дозі, достатніх, щоб спричинити закриття перфорації.

[007] У ще одному аспекті цього винаходу пропонується набір для лікування хронічної перфорації БП. Набір містить композицію, яка забезпечує ефективну дозу HB-EGF, наприклад, у формі крапель, пристроїв, композицій тощо. Набір також може містити в собі пристрій доставки, наприклад, дозатор для вушних крапель, шприц для доставки композиції, двоствольний шприц для доставки двокомпонентної композиції тощо. Набір може також містити інструкції із застосування.

[008] В інших варіантах реалізації цього винаходу пропонуються способи тимчасового відкриття барабанної перетинки, наприклад для введення трубок тощо. У таких варіантах реалізації цього винаходу БП контактує з ефективною дозою інгібітора HB-EGF включаючи, без обмеження, інгібітор шедінгу ліганда EGFR, протягом періоду часу, достатнього для створення невеликої перфорації в БП. У деяких таких варіантах реалізації цього винаходу невелику перфорацію можна зробити механічним шляхом до контактування з інгібітором.

Короткий опис графічних матеріалів

[009] Фігура 1. Типові зображення БП після перфорацій, які лікували з використанням OSU8-1 (інгібітор шедінгу ліганда EGFR) на (а) день 2 (b) день 14 (c) день 44 (d) день 90 (3 місяці). Перфорація обведена блакитним кольором.

[0010] Фігура 2. Пограничні показники тесту-відповіді слухового відділу стовбура мозку (ABR) і отоакустичних виділень продуктів викривлення (DPOAE) визначали у 9 мишей через 60 днів після хірургічної перфорації обох барабаних перетинок. В одне вухо не вводили ін'єкцію (контроль), у той час як протилежне вухо заповнили полімерним засобом доставки для доставки хітозану, фібриногену й полілактиду.

[0011] Фігура 3. Євстахієва труба (ЕТ) перед (а) і після (b) оклюзії гутаперчею. Процедуру у щурів адаптували шляхом відкриття слухової булли за допомогою пристрою для висічення із фрезею 0,5 мм. Відкриття булли латерально дозволяє гутаперчі наповнювати ЕТ у напрямку вниз із меншою ретракцією дихальних шляхів. ЕТ досліджували посмертно, що підтверджувало повну оклюзію.

[0012] Фігура 4. Лікування хронічних перфорацій з використанням GF у мишачій моделі оклюзії ЕТ. У верхньому ряду представлені (а) репрезентативні зображення групи лікування, що демонструють загоєння перфорацій. У нижньому ряду представлені (b) репрезентативні зображення контрольної групи (введення тільки полімеру), що демонструють перфорацію, що зберігається (обведена блакитним кольором). Примітка. Деякі БП у верхньому ряду зажили з утворенням тимпаносклерозу.

[0013] Фігура 5. Транстимпанальна доставка фактора росту.

[0014] Фігура 6. Транстимпанальна доставка фактора росту.

[0015] Фігура 7. Транстимпанальна доставка фактора росту.

[0016] Фігура 8. Інтратимпанальна доставка фактора росту.

[0017] Фігура 9. Засіб доставки лікарського засобу до регіону, що прилягає до барабанної перетинки.

[0018] Фігура 10. Текуча композиція для доставки лікарського засобу.

[0019] Характерні ознаки й багато інших переваг цього винаходу стануть зрозумілішими з нижченаведеного докладного опису, наведеного в комбінації із прикладеними кресленнями.

Докладний опис варіантів реалізації цього винаходу

[0020] Перед подальшим описом цього винаходу необхідно зрозуміти, що винахід не обмежений конкретними варіантами реалізації цього винаходу, описаними нижче, оскільки можуть бути зроблені зміни конкретних варіантів реалізації, які усе ще будуть попадати в обсяг прикладеної формули винаходу. Крім того, необхідно враховувати, що використовувана термінологія призначена для опису конкретних варіантів реалізації цього винаходу й не призначена для обмеження. У цьому описі й прикладеній формулі винаходу одна з посилань на множину, якщо з контексту очевидно не випливає зворотне.

[0021] У випадку якщо пропонується діапазон значень, необхідно розуміти, що кожне проміжне значення, до десятих часток одиниці нижньої межі, якщо контекстом чітко не зазначено інше, між верхньою й нижньою межею цього діапазону, а також будь-яке інше зазначене або проміжне значення в цьому зазначеному діапазоні, включається в обсяг цього винаходу. Згадані верхня й нижня межі цих менших діапазонів можуть незалежно включатися в менші діапазони й також входять в обсяг цього винаходу при дотриманні будь-якої конкретно виключеної межі в зазначеному діапазоні. У тому випадку, якщо зазначений діапазон включає одну або обидві межі, діапазони, що виключають будь-яку або обидві згадані включені межі, також включені в цей винахід.

[0022] Якщо не зазначено інше, всі технічні й наукові терміни, використовувані в цьому документі, мають ті ж самі значення, що звичайно розуміє фахівець у тій галузі техніки, до якої відноситься цей винахід. Незважаючи на те, що при практичному здійсненні або випробуванні цього винаходу можуть використовуватися будь-які способи, пристрої й матеріали, подібні або еквівалентні описаним у цьому документі, далі буде представлений опис ілюстративних способів пристроїв і матеріалів.

[0023] Усі публікації, згадані в цьому документі, включені в нього за допомогою посилання з метою описання й розкриття компонентів згідно з винаходом, які описані в зазначених публікаціях, тих компонентів, які можна використовувати у зв'язку з описаним винаходом.

[0024] Цей винахід описаний у термінах конкретних варіантів реалізації, встановлених або запропонованих авторами цього винаходу для охоплення кращих форм практичного застосування цього винаходу. Фахівцям у цій галузі техніки буде зрозуміло, що у світлі цього опису в конкретних проілюстрованих варіантах реалізації цього винаходу можуть бути зроблені численні модифікації й зміни, не відступаючи від передбачуваного обсягу цього винаходу. Наприклад, з міркувань біологічної функціональної еквівалентності в структурі білка можуть бути зроблені зміни, що не впливають на вид або розмір біологічної дії. Усі такі модифікації призначені для внесення в обсяг прикладеної формули винаходу.

#### Визначення

[0025] Терміни, використовувані в цьому описі, у рамках цього винаходу й у конкретному контексті, у якому використовується кожен термін, як правило, мають свої звичайні прийняті в цій галузі техніки значення. Деякі терміни будуть розглянуті нижче або в інших місцях цього опису, щоб забезпечити додаткове керівництво в описі композицій і способів цього винаходу, їх отримання й застосування.

[0026] Суб'єкт. Індивідууми, що підлягають лікуванню способами згідно з цим винаходом, можуть належати до будь-якого виду ссавців або птахів, включаючи людину. Тварини, що не відносяться до людського роду, включають, без обмеження, ссавців, експериментальних тварин, таких як миші, щури, кролики, хом'яки, морські свинки, шиншили тощо; свійських тварин, таких як собаки й кішки; і сільськогосподарських тварин, таких як вівці, кози, свині, коні й корови. Тварини згідно з цим винаходом, що не відносяться до людського роду, можуть бути ссавцями або не ссавцями; хребетними або безхребетними.

[0027] «Лікування» суб'єкта або «лікування» суб'єкта від захворювання або патологічного стану в цьому описі означає зниження або ослаблення клінічних симптомів захворювання або патологічного стану, такого як хронічна перфорація БП.

[0028] «Стимулювання», «підвищення» або «покращення» загоєння барабанної перетинки або рани звичайно означає збільшення швидкості загоювання рани або перфорації або зменшення ступеня залишкового рубця або появи келоїдної або некротичної тканини під час або після загоєння рани або перфорації.

[0029] «Рана» являє собою руйнування або розрив у структурі органа або тканини, включаючи епітелій, сполучну тканину й м'язову тканину. Приклади ран включають, але не обмежуються перерахованим, рани шкіри, гематоми, виразки, пролежні, садна, тріщини, порізи, проколи, псоріатичні рани, перфорації барабанної перетинки, подряпини й розриви рогівки й опіки.

[0030] «Місцеве» застосування відноситься до несистемного місцевого нанесення активного інгредієнта на поверхню рани.

[0031] Барабанна перетинка. Барабанна перетинка являє собою тонку, конусоподібну мембрану, яка у людей і інших ссавців відокремлює зовнішнє вухо від середнього вуха. Її функція полягає в передачі звуку з повітря на кісточки всередині середнього вуха, а потім у овальне вікно в заповнену рідиною завитку. Отже, вона, в остаточному підсумку, підсилює й перетворює вібрацію в повітрі на вібрацію в рідині. Кісточка молоточок є містком у проміжку між барабанною перетинкою й іншими кісточками.

[0032] У барабанній перетинці розрізняють дві основні ділянки: ненапружену частину й напружену частину. Ненапружена частина складається з двох шарів, є відносно слабкою, і пов'язана з дисфункцією евстахієвої труби й холестеатомами. Більша за розміром ділянка напруженої частини складається із трьох шарів: шкіри, волокнистої сполучної тканини й слизової оболонки. Вона порівняно міцна і являє собою ділянку, яка найчастіше пов'язана з перфораціями.

[0033] Розрив або перфорація БП може бути результатом різних травм, інфекції тощо. Перфорації БП можуть призводити до кондуктивної приглухуватості (CHL), яка коливається в діапазоні від незначної до 50 дБ. Перфорації можуть варіювати за площею й локалізацією, наприклад, передня, задня або та і інша; і за площею від приблизно 0,1 до приблизно 60 мм<sup>2</sup>, як правило, у діапазоні від приблизно 2,5 до 10 мм<sup>2</sup> (див. Mehta et al. (2006) Otol Neurotol. 27(2): 136–143). Перфорація може бути гострою або хронічною. Гостру перфорацію звичайно не лікують, оскільки БП зазвичай загоюється спонтанно. Однак у деяких індивідуумів не відбувається загоєння БП, що призводить до хронічної перфорації.

[0034] Хронічна перфорація барабанної перетинки. Перфорація, яка не загоюється за відсутності лікування або при лікуванні звичайними способами, наприклад, при лікуванні антибіотиками, може розглядатися як хронічна перфорація. Фахівцям у цій галузі техніки буде зрозуміло, що між індивідуумами можуть бути відмінності в тривалості часу, необхідного для загоєння, але, як правило, перфорація, що не зажила після періоду аж до приблизно 3 місяців, після періоду аж до приблизно 2 місяців, після періоду аж до приблизно 1 місяця, може бути класифікована як хронічний патологічний стан.

[0035] Хронічні рани або рани, що не загоюються являють собою відкриті рани, які не епітелізувалися й не закрилися за розумний строк. Ці рани є клінічно застійними без ознак подальшого закриття. Хронічні рани можуть розглядатися як рани з відсутністю відповідних «стартових» сигналів. (Див., наприклад, Lorenz and Longaker, in Wounds: Biology, Pathology, and Management, Chapter 7, pp 77–88).

[0036] «Гепарин-зв'язувальний епідермальний фактор росту» при використанні в цьому документі відноситься до фактора, що ендогенно зустрічається у ссавців, наприклад, до гепарин-зв'язувального епідермального фактора росту людини, альбумінового гепарин-зв'язувального епідермального фактора росту, функціональних консервативних похідних гепарин-зв'язувального епідермального фактора росту, функціонально активних фрагментів гепарин-зв'язувального фактора росту й гомологів гепарин-зв'язувального епідермального фактора росту, таких як гепарин-зв'язувальний фактор росту, подібний епідермальному фактору росту. HB-EGF також відноситься до варіантів форм HB-EGF, наприклад до тих, які забезпечують підвищену активність, підвищену стабільність, підвищений вихід або кращу розчинність. Композиції для використання в способах згідно з винаходом можуть містити одну або суміш із видів активності HB-EGF, наприклад, містити множину різних молекул HB-EGF. Звичайно активність HB-EGF, при використанні в цьому документі, відноситься до зв'язування зі спорідненим рецептором, активації зазначеного рецептора, проявам видів біологічної активності, які є результатом зв'язування рецептора й активації тощо.

[0037] HB-EGF є переважним фактором росту процесу епітелізації, необхідним для загоєння ран шкіри. Мітогенний й міграційний вплив HB-EGF на кератиноцити й фібробласти сприяє відновленню шкіри й ангіогенезу, необхідним для загоєння ран, і цей фактор є основним компонентом рідин рани. Зв'язування HB-EGF клітинної поверхні з гепарансульфат-протеогліканами підвищує можливості мітогенного стимулювання, прискорюючи загоєння ран шкіри, скорочуючи час, необхідний для приживлення трансплантата шкіри людини, і сприяє швидкому загоєнню виразок, опіків і епідермальних ран розщепленого клаптя.

[0038] HB-EGF синтезується у вигляді пов'язаного з мембранною мітогенного й хемотаксисного глікопротеїну. HB-EGF є глікопротеїном, що складається з 87 амінокислот, який демонструє експресію гена з високою точністю регулювання. Шедінг ектодомену призводить до утворення розчинної зрілої форми HB-EGF, яка впливає на фактори мітогенності й хемотаксису гладком'язових клітин і фібробластів. Трансмембранна форма HB-EGF є унікальним рецептором для дифтерійного токсину й функціонує під час юстакринної передачі сигналу в клітинах. Обидві форми HB-EGF беруть участь у нормальних фізіологічних процесах і в

патологічних процесах, включаючи прогресування й метастазування пухлин, гіперплазію органів і атеросклероз. Для цілей цього винаходу, як правило, використовується розчинна, зріла форма білка. Білок або агент може бути по суті чистим, наприклад, не містити інші білки, не містити клітинний матеріал тощо, звичайно він може бути щонайменше приблизно на 50% чистим, щонайменше приблизно на 75% чистим, щонайменше приблизно на 80% чистим, щонайменше приблизно на 90% чистим, щонайменше приблизно на 95% чистим, щонайменше приблизно на 99% чистим.

[0039] У переважному варіанті реалізації цього винаходу використовують по суті чистий препарат HB-EGF людини. HB-EGF можна придбати в очищеній формі або отримати шляхом очищення компонента від людей або інших тварин, або шляхом рекомбінантної продукції в клітинах-хазяїнах, включаючи прокаріотичні клітини-хазяїни, такі як *S. cerevisiae* або *E. coli* і, переважніше, клітини-хазяїни ссавців, такі як клітини CHO. HB-EGF може бути людським дикого типу, гомологом ссавців або модифікованим/мутуючим. Зокрема, можуть бути використані фрагменти компонента, які зберігають щонайменше частину необхідної активності повнорозмірного компонента.

[0040] У деяких варіантах реалізації цього винаходу HB-EGF являє собою HB-EGF людини й містить амінокислотну послідовність номера доступу GenBank: L17032.1 GI 348175 або номера доступу GenBank: L17033.1 GI 34817 або номера доступу GenBank: L17032.1 GI 348175, включаючи, зокрема, розчинні зрілі форми білків, описані в цьому документі.

[0041] «Функціонально консервативні варіанти» являють собою білки, в яких цей амінокислотний залишок замінений без зміни всієї конформації й функції білка, включаючи, але не обмежуючись перерахованим, заміну амінокислоти іншою амінокислотою, що має аналогічні властивості (такі як, наприклад, кислотні, основні, гідрофобні тощо). Амінокислоти з аналогічними властивостями добре відомі в цій галузі техніки. Наприклад, аргінін, гістидин і лізин є гідрофільними основними амінокислотами й можуть бути взаємозамінними. Аналогічно, ізолейцин, гідрофобна амінокислота, може бути замінений лейцином, метіоніном або валіном. Амінокислоти, відмінні від зазначених як консервативні амінокислоти, можуть відрізнятися в білку або ферменті таким чином, що відсотковий вміст білка або подібність амінокислотної послідовності між будь-якими двома білками з аналогічною функцією, може варіюватися, і може становити, наприклад, від 70% до 99%, як визначається у відповідності зі схемою вирівнювання, наприклад, за допомогою кластерного способу, у якому подібність визначається на основі алгоритму MEGALIGN. «Функціонально консервативний варіант» також включає в себе поліпептид або фермент, що має щонайменше 60% амінокислотної ідентичності при визначенні алгоритмами 20 BLAST або FASTA, переважно щонайменше 75%, переважніше щонайменше 85%, навіть ще переважніше щонайменше 90%, і ще переважніше 95%, і який має такі самі або по суті аналогічні властивості або функції, що й нативний або батьківський білок або фермент, з яким його порівнюють.

[0042] При використанні в цьому документі термін HB-EGF може включати в себе варіанти, гомологи й ортологи наданих послідовностей. Варіант може бути по суті аналогічним нативній послідовності, тобто відрізнятися щонайменше однією амінокислотою, і може відрізнятися щонайменше двома, але звичайно не більш ніж приблизно десятьма амінокислотами (кількість відмінностей залежить від розміру нативної послідовності). Зміни послідовності можуть являти собою заміни, інсерції або делеції. Скануючі мутації, які систематично вводять аланін або інші залишки, можуть бути використані для визначення ключових амінокислот для збереження у варіантних послідовностях. Консервативні амінокислотні заміни, які можуть бути використані, щоб забезпечити варіантну послідовність згідно з винаходом, звичайно включають заміни в межах наступних груп: (гліцин, аланін); (валін, ізолейцин, лейцин); (аспарагінова кислота, глутамінова кислота); (аспарагін, глутамін); (серин, треонін); (лізин, аргінін); і (фенілаланін, тирозин).

[0043] Амінокислотна послідовність білка, що зустрічається в природі, може бути змінена різними відомими в цій галузі техніки способами для генерації цільових змін у послідовності й, таким чином, забезпечувати варіантні послідовності згідно з винаходом. Такі варіанти звичайно будуть являти собою функціонально-збережені варіанти, які відрізняються, як правило послідовністю, від відповідного нативного або батьківського білка, але як і раніше зберігають бажану або демонструють підвищену біологічну активність і/або функцію. Різні способи, відомі в цій галузі техніки, можна використовувати для генерації цільових змін, наприклад, спосіб фагового дисплея в комбінації з випадковими й цільовими мутаціями, введення скануючих мутацій тощо, а також забезпечити варіантну послідовність згідно з винаходом. Як приклад у цей опис включено додавання міток His або епітопних міток з метою полегшення очищення. Ферменти, модифіковані для забезпечення специфічної характеристики, що представляє

інтерес, можуть бути додатково модифіковані, наприклад, за допомогою мутагенезу, «перемішування» екзонів тощо, як відомо в цій галузі техніки, з наступним скринінгом або відбором, з оптимізацією або відновленням активності ферменту, наприклад, до рівнів дикого типу, і в такий спосіб забезпечувати інші варіантні послідовності згідно з винаходом.

5 [0044] Термін «HB-EGF» також включає в себе біологічно активні фрагменти. Фрагменти, що представляють інтерес, включають фрагменти, що складаються щонайменше із приблизно 20 суміжних амінокислот, звичайно щонайменше із приблизно 50 суміжних амінокислот, і можуть містити 100 або більше амінокислот, аж до повнорозмірного білка, і можуть подовжуватися далі й містити додаткові послідовності.

10 [0045] Модифікації білка, що представляють інтерес і не змінюють первинну послідовність, але забезпечують інші варіантні білки згідно з винаходом, включають хімічну дериватизацію білків, у тому числі, наприклад, ацилювання, наприклад лаурильних, стеарильних, міристильних, децильних груп тощо, ПЕГілювання, етерифікацію або амідування. Такі модифікації можуть бути використані для підвищення стійкості ферменту до протеолізу, наприклад за допомогою  
15 приєднання бічних ланцюгів ПЕГ або лаурильних груп до поверхневих лізінів. Також включені модифікації глікозилювання, наприклад, виконані за допомогою модифікації паттернів глікозилювання білка в процесі його синтезу й обробки або на подальших етапах обробки; наприклад, піддаючи білок дії ферментів, які впливають на глікозилювання, наприклад, ферментів ссавців, які викликають глікозилювання або деглікозилювання. Також охоплені  
20 послідовності, що мають фосфорильовані залишки амінокислот, наприклад, фосфотирозин, фосфосерин або фосфотреонін.

[0046] Також підходять для використання на практиці й запропоновані в цьому винаході білки, які були модифіковані за допомогою способів молекулярної біології й/або хімії для покращення їхньої стійкості до протеолітичної деградації, окиснення тощо, а також для  
25 оптимізації властивостей розчинності або для того, щоб зробити їх більш придатними для застосування як терапевтичного агента. Наприклад, кістяк білка можна піддавати циклізації для підвищення стабільності (див. Friedler et al. (2000) J. Biol. Chem. 275:23783-23789). Аналоги таких білків включають ті, що крім природних L-амінокислот містять і інші залишки, наприклад, D-амінокислоти або синтетичні амінокислоти, що не зустрічаються в природі.

30 [0047] Міметики HB-EGF. HB-EGF агенти, що представляють інтерес, також включають у себе міметики, наприклад малі молекули, білки, аптамери тощо, які забезпечують біологічну активність HB-EGF. Такі види активності включають зв'язування HB-EGF з рецептором EGF і гепаринсульфат-протеогліканами на клітинній поверхні.

[0048] Про-HB-EGF синтезується у вигляді одного трансмембранного білка-попередника I типу, який потім підлягає значній протеолітичній обробці, що називається шедінгом ектодомену (див., наприклад, Yan et al. J Cell Biol. 2002;158(2):221-6; Asakura et al. Nat Med. 2002;8(1):35-40; Izumi et al. Embo J. 1998;17(24):7260-72; Nakagawa et al. J Biol Chem. 1996;271(48):30858-63). Це забезпечує вивільнення розчинної зрілої форми HB-EGF. Металопротеїнази (включаючи ADAM  
35 9, 10, 12, 17), які відповідають за шедінг ектодомену про-HB-EGF, переважно регулюють зв'язування зрілого HB-EGF і регулюють активацію EGFR (див. Cisse et al. J Biol Chem. 2005; 280(49):40624-31; Peschon et al. Science. 1998;282(5392):1281-4; Sahin and Blobel FEBS Lett. 2007;581(1):41-4; Sahin et al. J Cell Biol. 2004;164(5):769-79). Згодом HB-EGF діє як через EGFR-залежні, так і через EGFR-незалежні механізми. HB-EGF містить EGF-подібний домен, який, як вважають, є необхідним для представників сімейства EGF для зв'язування й активації EGFR  
40 (Thompson et al. J Biol Chem. 1994;269(4):2541-9).

[0049] Представники сімейства EGF можуть індукувати юстакринну, аутокринну, паракринну або ендокринну передачу сигналів залежно від навколишнього середовища клітини, тому що під дією металопротеїназ вони відщеплюються від мембрани з утворенням зрілого розчинного фактора росту (Singh and Harris, Cell Signal. 2005;17(10):1183-93). Існує чотири ідентифіковані  
50 представники сімейства EGFR (HER1, HER2, HER3 і HER4). Вони є структурно спорідненими з тирозинкіназою з одним трансмембранним доменом і доменом у цитоплазмі (Plowman, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(5):1746-50; Taylor et al. Semin Cell Dev Biol. 2014). Представники сімейства EGF мають одмінну від сімейства EGFR активність зв'язування. На відміну від EGF, HB-EGF зв'язується як з HER1, так і з HER4, як це роблять бетацелюлін і нейрегулін 2. Див. Higashiyama et al. Science. 1991;251(4996):936-9; Chang et al. Nature. 1997;387(6632):509-12; Carraway et al. Nature. 1997;387(6632):512-6; Shing et al. Science. 1993; 259(5101):1604-7. HB-EGF також зменшує кількість епітеліальних маркерів, таких як кератини 1, 5, 10 і 14, при цьому збільшуючи кількість генів клітинної рухливості, таких як SNA1, ZEB1, COX-2 і MMP1 (див. Stoll et al. J Invest Dermatol. 2012;132(9):2148-57).  
55



[0050] Термін «ефективна кількість» або «терапевтично ефективна кількість» HB-EGF або агента, що забезпечує активність HB-EGF, являє собою дозу, яка при застосуванні протягом певного періоду часу, покращує загоєння хронічної перфорації БП.

[0051] Композиція, тобто рідкі краплі, гель із уповільненим вивільненням тощо, може містити HB-EGF або агент із еквівалентною активністю, що забезпечує активність HB-EGF, у концентрації, що становить щонайменше приблизно 1 нг/мл, щонайменше приблизно 10 нг/мл, щонайменше приблизно 100 нг/мл, щонайменше приблизно 1 мкг/мл, щонайменше приблизно 10 мкг/мл, щонайменше приблизно 100 мкг/мл, щонайменше приблизно 200 мкг/мл, щонайменше приблизно 500 мкг/мл, щонайменше приблизно 750 мкг/мл, щонайменше приблизно 1 мг/мл, щонайменше приблизно 5 мг/мл, щонайменше приблизно 10 мг/мл, щонайменше приблизно 50 мг/мл, щонайменше приблизно 100 мг/мл і аж до приблизно 10 мг/мл, аж до приблизно 25 мг/мл, аж до приблизно 50 мг/мл, аж до приблизно 100 мг/мл, аж до приблизно 500 мг/мл. Композиція, призначена для уповільненого вивільнення, може бути надана з вищою вихідною концентрацією порівняно з композицією для повторного введення.

[0052] Об'єм композиції, як правило, є таким, який необхідний для забезпечення відповідного контакту з барабанною перетинкою, наприклад, аж до приблизно 5 мкл, аж до приблизно 10 мкл, аж до приблизно 25 мкл, аж до приблизно 35 мкл, аж до приблизно 50 мкл, аж до приблизно 75 мкл, аж до приблизно 100 мкл, аж до приблизно 250 мкл, аж до приблизно 375 мкл, аж до приблизно 500 мкл. Альтернативно може бути надана крапельниця, у якій доза становить одну краплю, дві краплі, три краплі, причому, як відомо в цій галузі техніки, крапля має об'єм близько 50 мкл.

[0053] Терапевтично ефективна кількість забезпечує клінічно значущу відповідь у суб'єкта, яка проявляється в тому, наприклад, що відбувається стимуляція загоєння перфорації барабанної перетинки. Альтернативно, терапевтично ефективна кількість є достатньою для покращення клінічно значущого стану загоєння рани у хазяїна.

[0054] Можуть бути розроблені композиції або пристрій для уповільненого або пролонгованого вивільнення, що мають  $t_{1/2}$  вивільнення лікарського засобу, тобто проміжок часу для вивільнення половини активного агента, що підходить для початкової дози й бажаної локальної концентрації, наприклад,  $t_{1/2}$  становить приблизно 24 години, приблизно 48 годин, приблизно 3 доби, приблизно 4 доби, приблизно 5 діб, приблизно 1 тиждень, приблизно 10 діб, приблизно 2 тижні, приблизно 3 тижні тощо.

[0055] Композиція, що не є композицією уповільненого або пролонгованого вивільнення, наприклад, рідкі вушні краплі тощо, може бути введена з інтервалами, що підходять для підтримки ефективної дози, наприклад, приблизно кожні 3 години, приблизно кожні 4 години, приблизно кожні 6 годин, приблизно кожні 12 годин, приблизно кожні 18 годин, приблизно кожні 24 години, приблизно кожні 48 годин тощо.

[0056] Альтернативно, ефективна кількість HB-EGF або агента, що забезпечує активність HB-EGF, являє собою кількість, яка призводить до швидшого загоєння перфорації або рани порівняно з загоєнням за відсутності такого агента. Ефективна кількість може також означати кількість або дозу, достатню для збільшення локальних і/або системних рівнів HB-EGF, наприклад, приблизно на 10 відсотків, переважно, приблизно на 50 відсотків, і переважніше приблизно на 100 відсотків від рівня, виявленого до введення активного агента або лікарського засобу.

[0057] Період часу контактування з HB-EGF може становити аж до однієї доби, аж до 2 діб, аж до 3 діб, аж до 5 діб, аж до 7 діб, аж до 10 діб, аж до 12 діб, аж до 2 тижнів, аж до 3 тижнів або більше відповідно до потреб індивідуума.

[0058] «Контроль», «контрольне значення» або «еталонне значення» в аналізі являє собою значення, яке використовується для виявлення зміни, наприклад, загоєння перфорованої барабанної перетинки або рани шкіри, або в яких-небудь інших аналізах, описаних у цьому документі. Наприклад, при вивченні загоєння перфорації барабанної перетинки, інгібуючий/стимулюючий вплив агента можна оцінити шляхом порівняння загоєння рани або перфорації з контрольним загоєнням. Контроль або еталон може являти собою, наприклад, попередньо задане еталонне значення або може бути визначений експериментально. Наприклад, у такому аналізі контроль або еталон може являти собою загоєння аналогічної рани або перфорації у тварини, що не зазнала впливу лікарського засобу або активного агента, або у тварини, пролікованої тим самим препаратом або активним агентом, але у якій здатність загоєння ран не порушена.

[0059] Термін «інгібітор» включає природну або синтетичну композицію або речовину, яка запобігає дії HB-EGF, яка знижує рівень HB-EGF або його рецептора, яка блокує внутрішньоклітинну передачу сигналів, коли HB-EGF приводить у дію свій споріднений рецептор

тощо. Інгібітори включають у себе нуклеїнові кислоти, наприклад, антисмислові, міРНК, рибозими тощо; антитіла, специфічні для HB-EGF або його спорідненого рецептора, інгібітори малих молекул тощо. У деяких варіантах реалізації цього винаходу інгібітор являє собою OSU8-1/KB-R7785 (див. Tokomaru et al. (2000) JCB 151:209–219, включений у цей документ шляхом посилання). Антитіла, специфічні для HB-EGF, і реагенти міРНК, мшРНК відомі в цій галузі техніки й комерційно доступні (наприклад, див. Santa Cruz Biotechnology або Bertram et al. (2009) Mech. Ageing Dev. 130: 657–669).

[0060] Альтернативно, моноклональні антитіла можуть бути отримані за допомогою звичайних способів отримання моноклональних антитіл, причому можна використовувати будь-який спосіб, який забезпечує антитіла, що виробляються культурами стабільних клітинних ліній. Приклади включають методику гібридоми (Kohler & Milstein, Nature, 256:495–497 (1975)), методику тріоми, методику В-клітинної гібридоми людини (Kozbor et al., Immunology Today 4:72 (1983)) і методику EBV-гібридоми для отримання моноклональних антитіл людини (Cole, et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)). Методики, описані для отримання одноланцюгових антитіл (патент США № 4946778) можуть бути адаптовані для отримання одноланцюгових антитіл до продуктів імуногенного поліпептиду згідно з цим винаходом. Крім того, для експресії гуманізованих антитіл до продуктів імуногенних поліпептидів згідно з цим винаходом, можуть використовуватися трансгенні миші.

[0061] Термін «структура», відносно доставки HB-EGF або інгібіторів HB-EGF, включає, але не обмежується перерахованим, будь-який каркас, полімер, конструкцію, споруду, установку, підтримку, диск, блок, покриття, шар, опору, підкладку, пристрій, піну. Він також включає використання власної тканини пацієнта, залишків органічних речовин у рані або трансплантат для дії як спосіб доставки. Структура може застосовуватися або у сформованому стані або може бути нанесена у вигляді в'язкої рідини, яка згодом приймає твердий стан або залишається в рідкій формі.

[0062] Термін «засіб доставки», коли мова йде про доставку HB-EGF або інгібіторів HB-EGF, включає, але не обмежується перерахованим, будь-який полімер, агент, носій, інструмент, процес, середовище, апарат, прилад, пристосування, гаджет, інструмент, віджет, приналежності або посуд. Термін «засіб доставки» також відноситься до будь-якого розчинного носія або допоміжної речовини, включаючи, але не обмежуючись перерахованим, фізіологічний розчин, буферний фізіологічний розчин, декстрозу, воду, гліцерин і їхні комбінації. Композиція повинна відповідати способу введення. Приклади підходящих композицій, відомих у цій галузі техніки, наведені в публікації Remington's Pharmaceutical Sciences (останнє видання), Mack Publishing Company, and Easton, Pa.

[0063] При використанні в цьому документі терміни «близько» або «приблизно» означають у межах 50 відсотків, переважно в межах 20 відсотків, переважніше в межах 5 відсотків від заданого значення або діапазону.

[0064] Значення, яке «значуще відрізняється» від іншого значення може означати, що існує статистично значуща різниця між цими двома значеннями. Будь-який підхожий статистичний спосіб, відомий у цій галузі техніки, може бути використаний для оцінки того, чи є відмінності значущими чи ні.

[0065] «Статистично значуща» відмінність означає значущість, що визначається в довірчому інтервалі, щонайменше в 90%, переважніше в 95% довірчому інтервалі.

[0066] Відповідно до цього винаходу в ньому можуть бути використані звичайні способи молекулярної біології, мікробіології й методики рекомбінантних ДНК у межах кваліфікації в цій галузі техніки. Такі методики докладно описані в літературі. Див., наприклад, Sambrook et al (Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989); Glover (DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II, 1985); Hames and Higgins (Nucleic Acid Hybridization, 1985); Hames and Higgins (Transcription And Translation, 1984); Freshney (Animal Cell Culture, 1986); Perbal (A Practical Guide To Molecular Cloning, 1984); і Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1994).

#### Фармацевтичні композиції

[0067] Композиції, які можуть бути використані для доставки HB-EGF і агента HB-EGF, або інгібітора HB-EGF, або інші композиції відповідно до цього винаходу, включають, але не обмежуються перерахованим, лікарські форми для ін'єкцій, інфузій, гель, пасти, бальзами, воски, лосьйони, креми для шкіри, а також різні інші форми для місцевого застосування, відомі в цій галузі техніки. Композиції також можуть бути доставлені місцево у формі порошку або розчину, що розпилюється на рану. Альтернативно, композиції згідно з винаходом можуть бути представлені у вигляді ранових пов'язок, прокладок, пластирів, марлі або інших засобів для нанесення на рану, з яких вони переносяться на ділянку рани. Такі пристрої також містять у собі

пристрої уповільненого вивільнення, які безупинно вивільняють HB-EGF, або інгібітор HB-EGF, або інші компоненти протягом пролонгованого періоду часу. Що стосується загоєння барабанних перетинок, введення композиції з використанням гелю, спрею або введення по краплях через зовнішній слуховий канал, є одним із переважних варіантів реалізації цього винаходу. Лікарські форми для ін'єкцій або інфузій містять розчин HB-EGF або інгібітора EGF-HB у фармацевтично прийнятній рідині, такий як, наприклад, ізотонічний сольовий розчин, стерильна вода або водні буферні системи. Засіб доставки може також включати будь-яку структуру, що проходить через рану. У випадку барабанної перетинки він включає, але не обмежується перерахованим, вушні шунти або катетери.

[0068] Фармацевтичні композиції можуть включати в себе, залежно від бажаного складу, фармацевтично прийнятні нетоксичні носії або розріджувачі, які визначаються як засоби доставки, звичайно використовувані для розробки фармацевтичних композицій для введення тваринам або людині. Розріджувач вибирають так, щоб він не впливав на біологічну активність активного агента. Прикладами таких розріджувачів є дистильована вода, забуферена вода, фізіологічний розчин, ФСБ, розчин Рінгера, розчин декстрази й розчин Хенкса. Крім того, фармацевтична композиція або склад може містити в собі інші носії, ад'юванти або нетоксичні, нетерапевтичні, неімунотенні стабілізатори, допоміжні речовини тощо. Композиції можуть також містити додаткові речовини, щоб наблизитися до фізіологічних умов, такі як регулюючі рівень рН і буферні агенти, агенти, що регулюють тонічність змочувальні агенти й детергенти.

[0069] Композиція може також містити будь-який із множини стабілізуючих агентів, такий як, наприклад, антиоксидант. Якщо фармацевтична композиція містить поліпептид, зазначений поліпептид може бути присутнім у вигляді комплексу з різними добре відомими сполуками, які підвищують стабільність поліпептиду *in vivo*, або іншим способом підсилюють його фармакологічні властивості (наприклад, збільшують період напівжиття поліпептиду, знижують його токсичність, підвищують розчинність або поглинання). Приклади таких модифікацій або комплексоутворюючих агентів включають сульфат, глюконат, цитрат і фосфат. Поліпептиди композиції можуть також утворювати комплекси з молекулами, які покращують їхні характеристики *in vivo*. Такі молекули включають, наприклад, вуглеводи, поліаміни, амінокислоти, інші пептиди, іони (наприклад, натрій, калій, кальцій, магній, марганець) і ліпіди.

[0070] Подальші вказівки щодо композицій, які підходять для різних типів введення, можна знайти в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed. (1985). Див. короткий огляд способів доставки лікарських засобів у публікації Langer, Science 249:1527-1533 (1990).

[0071] Фармацевтичні композиції можуть бути введені для терапевтичних видів лікування. Токсичність і терапевтична ефективність активного інгредієнта може бути визначена у відповідності зі стандартними фармацевтичними процедурами в культурах клітин і/або з використанням експериментальних тварин, включаючи, наприклад, визначення LD50 (دوزи, летальної для 50% популяції) і ED50 (دوزи, терапевтично ефективною для 50% популяції). Співвідношення доз між токсичним і терапевтичним ефектами являє собою терапевтичний індекс, який виражають як співвідношення LD50/ED50. Переважними є сполуки, що демонструють більші терапевтичні індекси.

[0072] Дані, отримані з досліджень у культурах клітин і/або з використанням тварин, можна застосовувати для визначення діапазону доз для людини. Доза активного інгредієнта звичайно перебуває в межах діапазону циркулюючих концентрацій, які включають ED50 з низькою токсичністю. Доза може змінюватися в межах цього діапазону залежно від використовуваної лікарської форми й шляху введення.

[0073] Фармацевтичні композиції, описані в цьому документі, можна вводити, використовуючи множини різних способів. Приклади включають введення композиції, що містить фармацевтично прийнятний носій за допомогою місцевих шляхів введення, наприклад на поверхню БП, усередину барабанної перетинки, через барабанну перетинку тощо.

[0074] Відповідні композиції включають водні й неводні ізотонічні стерильні розчини для ін'єкцій, які можуть містити антиоксиданти, буфери, бактеріостатичні й розчинені речовини, які надають композиції ізотонічність, і водні й неводні стерильні суспензії, які можуть включати суспендуючі агенти, солубілізатори, загущувачі, стабілізатори й консерванти.

[0075] Компоненти, використовувані для розробки фармацевтичних композицій є переважно компонентами високої чистоти й по суті не містять потенційно шкідливих домішок (наприклад, щонайменше відповідають категорії чистоти згідно з вимогами Національної комісії із продовольства США (NF), як правило, щонайменше відповідають аналітичній категорії, і більш типово щонайменше фармацевтичної категорії). Крім того, композиції, призначені для застосування *in vivo*, як правило, є стерильними. У випадку якщо цю сполуку необхідно

синтезувати перед застосуванням, отриманий продукт, як правило, по суті не містить будь-яких потенційно токсичних речовин, зокрема будь-яких ендотоксинів, які можуть бути присутніми в процесі синтезу або очищення. Композиції для парентерального введення також є стерильними, по суті ізотонічними й отриманими в умовах GMP.

5 [0076] Ефективна кількість терапевтичної композиції для введення конкретному пацієнтові буде залежати від множини факторів, деякі з яких будуть різнитися від пацієнта до пацієнта. Компетентний лікар зможе визначити ефективну кількість терапевтичного агента для введення пацієнтові для стимуляції загоєння хронічної перфорації БП. Використовуючи дані ED50, отримані у тварин, і іншу доступну інформацію, лікар може визначити безпечну дозу для

10 індивідуума, залежно від шляху введення. Для підтримки терапевтичної концентрації, композиції, які швидко виводяться з організму, можна вводити у вищих дозах або в повторних дозах. Використовуючи звичайну кваліфікацію, компетентний лікар зможе оптимізувати дозу конкретної терапевтичної або візуалізуючої композиції в ході звичайних клінічних випробувань. Звичайно доза становить від 0,001 до 100 мг агента на кілограм маси тіла суб'єкта.

15 [0077] Композиція, тобто рідкі краплі, гель з уповільненим вивільненням тощо, може містити HB-EGF або агент із еквівалентною активністю, що забезпечує активність HB-EGF, у концентрації, що становить щонайменше приблизно 1 мкг/мл, щонайменше приблизно 10 мкг/мл, щонайменше приблизно 100 мкг/мл, щонайменше приблизно 200 мкг/мл, щонайменше приблизно 500 мкг/мл, щонайменше приблизно 750 мкг/мл, щонайменше приблизно 1 мг/мл, щонайменше приблизно 5 мг/мл, щонайменше приблизно 10 мг/мл, щонайменше приблизно 50

20 мг/мл, щонайменше приблизно 100 мг/мл і аж до приблизно 10 мг/мл, аж до приблизно 25 мг/мл, аж до приблизно 50 мг/мл, аж до приблизно 100 мг/мл, аж до приблизно 500 мг/мл. Композиція, призначена для уповільненого вивільнення, може бути надана з вищою вихідною концентрацією порівняно з композицією для повторного введення. Терапевтично активна кількість може варіюватися залежно від таких факторів, як стан захворювання, вік, стать і маса тіла індивідуума. Для забезпечення оптимальної терапевтичної відповіді схема дозування може бути скоригована. Наприклад, щодня можна вводити більше однієї окремої дози, або доза може бути пропорційно зменшена відповідно до показань і необхідності терапевтичної ситуації.

[0078] Може бути забезпечений об'єм від приблизно 1 до 3 крапель або, при введенні у твердій або напівтвердій формі, можуть бути приготовлені композиції заданого об'єму, наприклад, з об'ємом від аж до приблизно 5 мкл до аж до приблизно 500 мкл. Пристрій може бути сформований у будь-якій формі або конформації, яка полегшить його застосування в цільовій ділянці для стимуляції або інгібування загоєння. Геометрична форма твердої або напівтвердої лікарської форми являє собою будь-яку придатну для доставки до барабанної перетинки, наприклад сфера, сплюснена сфера, плівка, пластир, диск рівномірної або нерівномірної товщини тощо.

30

[0079] Композицію можна вводити суб'єктові у вигляді серії з більш ніж одного введення. Для терапевтичних композицій іноді необхідне регулярне періодичне введення (наприклад, кожні 4 години, кожні 6 годин, кожні 12 годин, кожні 24 години тощо), наприклад якщо композиція надана у вигляді рідини для місцевого застосування.

40

[0080] Композиції, придатні для місцевого, черезшкірного й трансдермального введення, можуть бути отримані шляхом використання відповідних суспендуючих агентів, солюбілізаторів, загущувачів, стабілізаторів і консервантів. Композиції для місцевого застосування можуть бути використані також із засобами для забезпечення безперервного введення, наприклад, включені в гранули з повільним вивільненням або пластири з контрольованим вивільненням.

45

[0081] Активний агент може також бути введений до складу композиції у вигляді біологічно сумісного гелю, причому цей гель можна наносити місцево або імплантувати (наприклад, для забезпечення уповільненого вивільнення в місці лікування). Відповідні гелі й способи складання рецептури бажаної сполуки для доставки за допомогою гелю добре відомі в цій галузі (див., наприклад, патенти США під номерами 5801033; 5827937; 5700848; і MATRIGEL™). Прикладом цього варіанта реалізації винаходу є доставка HB-EGF або інгібітора HB-EGF через слуховий канал за допомогою біосумісної рідини або пристрою, яке твердне усередині слухового каналу поблизу барабанної перетинки й доставляє HB-EGF або інгібітор HB-EGF під час того, як засіб доставки згодом розчиняється. Засіб доставки можна розміщати в каналі, у барабанній перетинці або всередині середнього вуха.

50

55

[0082] Композиції можуть бути надані в одиничній дозованій формі, причому термін «одинична дозована форма» відноситься до фізично дискретних одиниць, що підходять як одиничні дози для суб'єктів-людей, де кожна одиниця містить попередньо задану кількість протеази, розраховану як достатня кількість для забезпечення заданого ефекту, у комбінації з фармацевтично прийнятним розріджувачем, носієм або засобом доставки. Характеристики

60

одиничних дозованих форм цього винаходу залежать від конкретного використовуваного комплексу й ефекту, який необхідно досягти, а також від фармакодинаміки, пов'язаної з кожним комплексом, в організмі-хазяїні.

[0083] Аспекти цього винаходу включають у себе гідрогелеві композиції на основі зшитих співполімерів, що містять ефективну дозу абсорбованого HB-EGF, як описано вище. Гідрогелеві композиції на основі зшитих співполімерів згідно з цим винаходом відповідно до конкретних варіантів реалізації включають співполімер хітозану й поліестеру і зшиваючий агент, що піддається гідролізу. У деяких варіантах реалізації цього винаходу зшиті гідрогелі додатково містять фібриноген. У деяких таких варіантах реалізації цього винаходу гідрогелі на основі зшитих співполімерів включають співполімер хітозану й поліестеру й зшиваючий агент, що піддається гідролізу, наприклад, полілактид. Зшиті гідрогелі хітозану й полілактиду можуть мати співвідношення хітозану до полілактиду в діапазоні від 1:1 до 10:1, наприклад, від 1:1 до 8:1, причому в деяких випадках, зшиті гідрогелі хітозану й полілактиду мають співвідношення хітозану до полілактиду 8:1. Масовий відсоток хітозану в гідрогелях на основі зшитого співполімеру, що представляють інтерес, може варіюватися в діапазоні від 1% до 99%, а масовий відсоток поліестеру може варіюватися в діапазоні від 1% до 99%. У деяких варіантах реалізації цього винаходу гідрогелі на основі співполімеру містять один або більше естерних або амідних зв'язків між хітозаном і компонентами поліестеру. Гідрогелі на основі зшитих співполімерів, що представляють інтерес, також включають зшиваючий агент. У деяких варіантах реалізації цього винаходу зшиваючий агент призначено для гідролізу у фізіологічних умовах. У деяких варіантах реалізації цього винаходу зшиваючий агент, може бути акрилатним зшиваючим агентом, наприклад, метакрилатним зшиваючим агентом. Зшиваючий агент, що піддається гідролізу може бути присутнім у гідрогелі на основі зшитого співполімеру в кількості в діапазоні від 0,05% до 10% мас./мас. зшиваючого агента, наприклад від 0,1% до 9% мас./мас., наприклад від 0,5% до 8% мас./мас., наприклад від 0,75% до 7% мас./мас. і включно від 1% до 5% мас./мас. Залежно від протоколу, використовуваного для зшивання обговорюваних гідрогелів, щільність зшивки може варіюватися. У деяких випадках гідрогель зшито хімічною зшивкою. Таким чином, щільність зшивки може варіюватися залежно від типу й концентрації використовуваного хімічного зшиваючого агента. Альтернативно, гідрогель можна піддавати фотозшивці й щільність зшивки може варіюватися залежно від інтенсивності електромагнітного випромінювання, що контактує з гідрогелевою композицією, а також від тривалості опромінення. У деяких варіантах реалізації цього винаходу щільність зшивки обговорюваних гідрогелів на основі зшитих співполімерів може бути, наприклад, у діапазоні від  $1 \times 10^{-15}$  моль/см<sup>3</sup> до  $1 \times 10^{-3}$  моль/см<sup>3</sup>. Альтернативно, залежно від кількості зшиваючого агента, коефіцієнт набрякання обговорюваних гідрогелів може змінюватися в межах, наприклад, від 1 до 35. Аналогічно, модуль стиснення гідрогелів може змінюватися, наприклад, у діапазоні від 1 кПа до 35 кПа. Дивіться, наприклад, міжнародну патентну заявку PCT/US2014/033512, що одночасно розглядається, включену в цей документ шляхом посилання.

[0084] Гідрогелеві композиції необов'язково містять фібриноген. Фібриноген може бути введений у гідрогелеву композицію перед або після зшивки гідрогелю. Наприклад, у деяких випадках фібриноген додають до попередника гідрогелевої композиції. Фібриноген може бути присутнім у гідрогелі на основі зшитого співполімеру в кількості в діапазоні від 0,05% до 50% мас./мас. фібриногену, наприклад від 0,1% до 45% мас./мас., наприклад від 0,5% до 40% мас./мас., наприклад від 0,75% до 35% мас./мас., наприклад від 1% до 30%, наприклад від 2% до 20%, наприклад від 5% до 15% і включаючи 10% мас./мас.

[0085] Гідрогелі можуть бути синтезовані для досягнення певного профілю вивільнення. У деяких варіантах реалізації цього винаходу гідрогелі на основі зшитих співполімерів, запропоновані в цьому винаході, призначені для вивільнення HB-EGF або агента HB-EGF у фізіологічних умовах по суті зі швидкістю вивільнення нульового порядку. В інших варіантах реалізації цього винаходу обговорювані гідрогелі на основі зшитих співполімерів призначені для вивільнення HB-EGF або агента HB-EGF у фізіологічних умовах по суті зі швидкістю вивільнення першого порядку. В інших варіантах реалізації цього винаходу обговорювані гідрогелі на основі зшитих співполімерів призначені для вивільнення HB-EGF або агента HB-EGF у фізіологічних умовах по суті зі швидкістю вивільнення другого порядку. У деяких варіантах реалізації цього винаходу обговорювані гідрогелі на основі зшитих співполімерів призначені для профілю вивільнення, який включає: 1) перший період, під час якого HB-EGF або агент HB-EGF вивільняється з гідрогелю з першою попередньо заданою швидкістю; і 2) другий період, під час якого HB-EGF або агент HB-EGF вивільняється з гідрогелю із другою попередньо заданою швидкістю.

[0086] У деяких варіантах реалізації цього винаходу співвідношення хітозану й поліестеру в гідрогелі може варіювати, у деяких варіантах реалізації цього винаходу в діапазоні від 10:1 до 9,5:1; від 9,5:1 до 9:1; від 9:1 до 8,5:1; від 8,5:1 до 8:1; від 8:1 до 7,5:1; від 7,5:1 до 7:1; від 7:1 до 6,5:1; від 6,5:1 до 6:1; від 6:1 до 5,5:1; від 5,5:1 до 5:1; від 5:1 до 4,5:1; від 4,5:1 до 4:1; від 4:1 до 3,5:1; від 3,5:1 до 3:1; від 3:1 до 2,5:1; від 2,5:1 до 2:1; від 2:1 до 1,5:1; від 1,5:1 до 1:1. Наприклад, масове співвідношення компонента хітозану й компонента поліестеру може перебувати в діапазоні від 10:1 до 1:1, наприклад від 8:1 до 1:1, наприклад від 5:1 до 1:1, наприклад від 4:1 до 1:1, включаючи від 2:1 до 1:1. У деяких випадках співвідношення хітозану й поліестеру становить 1:1. В інших варіантах реалізації цього винаходу співвідношення хітозану й поліестеру може варіюватися, у деяких варіантах реалізації цього винаходу в діапазоні від 1:1 до 1:1,5; від 1:1,5 до 1:2; від 1:2 до 1:2,5; від 1:2,5 до 1:3; від 1:3 до 1:3,5; від 1:3,5 до 1:4; від 1:4 до 1:4,5; від 1:4,5 до 1:5; від 1:5 до 1:5,5; від 1:5,5 до 1:6; від 1:6 до 1:6,5; від 1:6,5 до 1:7; від 1:7 до 1:7,5; від 1:7,5 до 1:8; від 1:8 до 1:8,5; від 1:8,5 до 1:9; від 1:9 до 1:9,5; від 1:9,5 до 1:10. Наприклад, співвідношення хітозану й поліестеру може перебувати в діапазоні від 1:1 до 1:10, наприклад від 1:1 до 1:8, наприклад від 1:1 до 1:5, наприклад від 1:1 до 1:4, включаючи від 1:1 до 1:2.

[0087] Гідрогелі на основі зшитих співполімерів можуть мати масу 1 кДа або більше, наприклад 2 кДа або більше, наприклад 3 кДа або більше, наприклад 5 кДа або більше, наприклад 10 кДа або більше, наприклад 15 кДа або більше, наприклад 20 кДа або більше, наприклад 25 кДа або більше, наприклад 30 кДа або більше, наприклад 40 кДа або більше, наприклад 50 кДа або більше, наприклад 60 кДа або більше й включаючи 75 кДа або більше.

[0088] Після приготування фармацевтичні композиції можуть бути поміщені у відповідний контейнер і промарковані для лікування зазначеного патологічного стану. Для введення композиції згідно з цим винаходом, таке маркування буде включати кількість, частоту й спосіб введення.

#### Комбіновані композиції

[0089] Склади згідно з цим винаходом можуть містити ефективну дозу HB-EGF у комбінації з другим активним агентом, зокрема, іншим антимікробним агентом. Наприклад, інші агенти, що представляють інтерес, включають широкую різноманітність антибіотиків, як відомо в цій галузі техніки. Класи антибіотиків включають в себе пеніциліни, наприклад пеніцилін G, пеніцилін V, метицилін, оксацилін, карбеніцилін, нафцилін, ампіцилін тощо; пеніциліни в комбінації з  $\beta$ -інгібіторами лактамаз, цефалоспоринони, наприклад цефаклор, цефазолін, цефуоксим, моксалактам тощо; карбапенеми; монобактами; аміноглікозиди; тетрацикліни; макроліди; лінкоміцини; поліміксини; сульфаніламідів; хінолони; хлорамфенікол; метронідазол; спектиноміцин; триметоприм; ванкоміцин тощо; противірусні агенти, наприклад ацикловір, ганцикловір тощо можуть бути включені.

[0090] Цитокіни й фактори росту також знаходять застосування в комбінації з HB-EGF, наприклад такі фактори росту як трансформуючий фактор росту (TGF)- $\beta$ , тромбоцитарний фактор росту (PDGF), фібробластний фактор росту (FGF) і епідермальний фактор росту (EGF), VEGF, фактор некрозу пухлини- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), ендотелін-1, кератиноцитарний фактор росту тощо. Див., наприклад, Steed, D. et al., J. Am. Coll. Surg. 183:61–64 (1996); Richard, J. et al., Diabetes Care 18: 64–69 (1995); Steed, D., J. Vasc. Surg. 21:71–78 (1995); Kelley, S. et al., Proc. Soc. Exp. Biol. 194:320–326 (1990).

#### Способи застосування

[0091] Відповідно до цього винаходу загоєння рани при хронічній перфорації барабанної перетинки покращується при забезпеченні підвищених рівнів HB-EGF. Це може бути досягнуто декількома різними способами. Наприклад, пацієнта можна лікувати ефективною кількістю активного агента, такого як, наприклад, лікарський засіб, гормон, цитокін, антитіло або інша сполука, яка стимулює експресію HB-EGF; зменшує деградацію HB-EGF; або збільшує місцеві або системні рівні HB-EGF або гомолога або похідного HB-EGF. У терапевтичних цілях можна також вводити нуклеїнові кислоти, що кодують HB-EGF.

[0092] Звичайно композицію, що містить білок HB-EGF, наприклад розчинну форму HB-EGF людини, місцево вводять індивідуумові, що страждає хронічною перфорацією БП, через зовнішній слуховий канал, протягом періоду часу, по суті достатнього для закриття перфорації. Суб'єкт, що є людиною або, що не є людиною, може страждати від патологічного стану, який перешкоджає або сповільнює загоєння перфорації барабанної перетинки або може не страждати від такого стану.

[0093] У цьому винаході запропоновані композиції HB-EGF або інгібітора HB-EGF, які при введенні в ефективній кількості призведуть до збільшення або зниження рівня HB-EGF в ділянці рани суб'єкта. Наприклад, для прискорення загоєння барабанної перетинки, композиція, що

містить HB-EGF, може бути нанесена на ділянку, що оточує перфорацію барабанної перетинки. Інгібітор HB-EGF можна також наносити для інгібування нормального або надмірного загоєння рани. У випадку композицій HB-EGF для прискорення загоєння барабанної перетинки, композиція може бути нанесена на ділянку, що прилягає або перебуває по сусідству з перфорацією барабанної перетинки. Їх можна наносити за допомогою будь-якого біорозкладного або біонерозкладного джерела або структури.

[0094] В іншому варіанті реалізації цього винаходу спосіб згідно з цим винаходом застосовують для інгібування загоєння перфорованої барабанної перетинки у суб'єкта. Суб'єкт, що є людиною або не є людиною, може страждати від патологічного стану, який перешкоджає або сповільнює загоєння перфорації барабанної перетинки або не страждати від такого стану. Наприклад, такі способи можна застосовувати як заміну міринготомії й введенню тимпаностомічних трубок, які звичайно призначають при хронічному середньому отиті, ваді розвитку барабанної перетинки вуха або євстахієвої труби, синдромі Дауна, розщепленні неба (вовча паща) і баротравмах (травма середнього вуха, викликана зниженням тиску повітря) тощо. Звичайно тимпаностомічну трубку вводять у БП і утримують протягом тривалого періоду часу, наприклад протягом періоду аж до одного місяця, аж до 2 місяців, аж до 3 місяців, аж до 4 місяців, аж до 6 місяців або більше.

[0095] Способи також знаходять застосування в групі тваринних моделей, яка забезпечує клінічно значущу модель патологічних станів перфорованої барабанної перетинки людини. У таких моделях тварина може бути будь-якою зручною експериментальною твариною, наприклад гризунами, зайцеподібними тощо, і включаючи, але не обмежуючись перерахунком, мишей, щурів, морських свинок, кроликів, котів, собак, приматів, що не відносяться до людського роду тощо.

[0096] У таких варіантах реалізації цього винаходу для створення перфорації БП вводять ефективну дозу інгібітора шедінгу ліганда EGFR, звичайно за допомогою місцевого контактування з барабанною перетинкою. У деяких таких варіантах реалізації цього винаходу спочатку можна виконати невелику перфорацію, наприклад площею від приблизно 0,1 до 10 мм<sup>2</sup>, від приблизно 0,1 до приблизно 5 мм<sup>2</sup>, від приблизно 0,1 до 2,5 мм<sup>2</sup>, від приблизно 0,1 до приблизно 1 мм<sup>2</sup>. Після початкової перфорації рана контактує з ефективною дозою інгібітора HB-EGF, що перебуває в композиції, і протягом періоду часу, як запропоновано в цьому документі. Активна доза інгібітора може підтримуватися протягом періоду часу, необхідного для наявності перфорації.

#### Набори

[0097] В іншому аспекті цього винаходу пропонується набір для лікування хронічної перфорації БП. Набір містить у собі композицію, яка забезпечує ефективну дозу HB-EGF, наприклад, у формі крапель, пристроїв, композицій тощо. Набір також може включати в себе пристрій для доставки, наприклад, дозатор для вушних крапель, шприц для доставки композиції, двоствольний шприц для доставки двокомпонентної композиції тощо. Набір може також містити інструкції із застосування.

[0098] Альтернативно може бути запропонований набір для створення хронічної перфорації БП. Набір містить композицію, яка забезпечує ефективну дозу HB-EGF, наприклад, у формі крапель, пристроїв, композицій тощо. Набір також може містити пристрій для доставки, наприклад, дозатор для вушних крапель, шприц для доставки композиції, двоствольний шприц для доставки двокомпонентної композиції тощо. Набір може також містити інструкції з застосування. Набір може додатково містити стерильну голку або скальпель для створення початкової перфорації в БП.

#### Приклад 1

##### Інгібування HB-EGF

[0099] HB-EGF є критично важливим для загоєння рани в моделі барабанної перетинки. Нормалізована інтенсивність сигналу HB-EGF-подібного фактора росту після перфорації барабанної перетинки у щурів показує 8,5-кратне стимулювання HB-EGF-подібного фактора росту. У цьому описі показано, що експериментальне інгібування активності HB-EGF запобігає загоєнню барабанної перетинки.

[00100] Для створення моделі хронічної перфорації барабанної перетинки можна інгібувати шедінг ліганда EGFR. Проміжні перфорації були створені в натягнутій частині БП із використанням вигнутої голки у 20 мишей. OSU8.1 (10 мМ), селективний інгібітор HB-EGF (див. Tokumaru et al. (2000) J. Cell Biol.), вводили ін'єкцією в гелеву піну (розміщену через перфорацію й на ній) протягом семи днів. Мишей умертвляли в моменти часу (день 2, 7, 14, 30, 44, 60 і 90), щоб спостерігати ефекти міграції кератиноцитів. Протилежне вухо використовували як контроль, у нього на гелеву піну поміщали фізіологічний розчин. Всі з цих перфорацій

закривалися в межах 2 тижнів. П'ять із семи (71%) перфорацій у оброблених вухах були відкритими через три місяці. Репрезентативні зображення хронічної перфорації БП показані на Фігурі 5. Розмір перфорації був стабільним протягом трьох місяців (з використанням програмного забезпечення ImageJ для розрахунків площі перфорації у вигляді відсотка від площі натягнутої частини). У більшій когорти, 87,9% (n = 58), була наявність через 3 місяця хронічних перфорацій. У попередньому дослідженні, проведеному авторами цього винаходу, була встановлена відтворена тваринна модель на основі застосування фактора росту при хронічній перфорації БП.

[00101] У таблиці 1 показані результати застосування інгібітора HB-EGF (OSU8-1) для створення гострої перфорації барабанної перетинки у мишей. 100% перфорацій, пролікованих інгібітором HB-EGF, були присутні через два місяці порівняно з 5% у контрольній групі, і 71% були присутні через три місяці порівняно з 5% у контрольній групі.

Таблиця 1

Когорта	Відкриті перфорації через 2 місяці	Відкриті перфорації через 3 місяці
Контроль	5% (n = 21)	5% (n = 19)
Інгібітор HB-EGF	100% (n = 9)	71% (n = 7)

[00102] Створення тваринної моделі хронічного гнійного середнього отиту. Після створення моделі хронічної перфорації з оклюзією ЄТ, через існуючі хронічні перфорації в середнє вухо інокулювали два типи бактерій. Через 2 тижні відібрали рідину з вуха й відправили для проведення дослідження на наявність бактерій за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Вибрані бактерії являли собою дві з найчастіше залучених у хронічне захворювання вуха, *Streptococcus pneumoniae* типу 3 (доза 6x10<sup>6</sup> колонієутворюючих одиниць на мл) і *Pseudomonas aeruginosa* (доза 6x10<sup>9</sup> колонієутворюючих одиниць на мл).

#### Приклад 2

##### Лікування хронічної перфорації барабанної перетинки

[00103] Була продемонстрована ефективність лікування хронічних перфорацій БП за допомогою HB-EGF.

[00104] Біосумісний розсмоктуваний полімер для ін'єкцій для доставки фактора росту у вушний канал. Для лікування хронічної перфорації БП бажано мати рідину, яку можна закрapati у вухо, і яка потім твердне й повільно розсмоктується протягом призначеного періоду часу, з елюванням лікарського засобу. Швидкість розсмоктування полімеру й швидкість елювання лікарського засобу легко регулюється відповідно до мети, що представляє інтерес.

[00105] Був розроблений біорозкладний гідрогель на основі хітозану для доставки факторів росту, щоб забезпечити біосумісний, біорозсмоктуваний ін'єкційний полімер, який може нести лікарський засіб вибору, а потім може бути інстильований у вушний канал. Гель має два рідкі компоненти й може тверднути протягом декількох хвилин після змішування двох компонентів. Його можна легко вводити двоствольним шприцом. Альтернативно, розчини можна змішувати з зшиваючим агентом перед доставкою й інстилювати за допомогою шприца з одним випускним отвором.

[00106] Нещодавно розроблений гідрогель на основі хітозану містить гідрофільні молекули кістяка хітозану й гідрофобні полілактидні бічні ланцюги. У мережі співполімерів для покращення афінності зв'язування, підвищення прикріплення клітин і забезпечення сайтів, що піддаються протеолітичному розкладанню, може бути включений фібриноген. Вивільнення лікарського засобу з полімерного гідрогелю змінюється відповідно до характеристик, таких як гідрофільна афінність, особливості набрякання, розсмоктуваність і щільність зшивки полімеру. Вимірювали профілі лікарського вивільнення rhBMP-2 з гідрогелів на основі хітозану й особливості деградації полімерного гідрогелю в різних умовах.

[00107] Конкретне співвідношення хітозану до полілактиду для гелю, використовуваного в цих прикладах, становить 8:1. Крім того, у полімерний розчин вводять 10% мас./мас. фібриногену. Композиція гідрогелю може тверднути протягом декількох хвилин після змішування з каталізатором хімічної зшивки. Його можна легко вводити двоствольним шприцом або шприцом з одним випускним отвором.

[00108] Гідрогелі не є ототоксичними. Гідрогелі вводили в барабанні перетинки мишей після перфорацій. Однє вухо заповнювали полімером, у той час як у протилежне вухо ін'єкцію не вводили (контроль). Граничні значення тесту-відповіді слухового відділу стовбура мозку (ABR) і отоакустичних виділень продуктів викривлення (DPOAE) визначали у 9 мишей через 60 днів



після хірургічної перфорації обох барабанних перетінок. До часу спонтанного загоєння барабанних перетінок не було ніяких відмінностей порогів чутності між двома сторонами (Фігура 2). Ці дані демонструють, що гідрогелі не є ототоксичними.

[00109] HB-EGF загоєє хронічні перфорації барабанної перетинки. При лікуванні когорти мишей із хронічними перфораціями у вухах за допомогою 40 мкл гелю, що містить рекомбінантний HB-EGF у концентрації 5 мкг/мл (уповільнене вивільнення дози через біорозкладний полімер на основі хітозану), загоєння відбувалося у 92% (22 з 24) у порівнянні з 38% (10 з 26) контрольних тварин (тільки полімер) за 4 тижні ( $p < 0,01$ ). Можливість подолати цей критичний етап хронічного загоєння рани БП за допомогою GF, щоб активувати шедінг ліганда ектодомену GFR, демонструє придатність для втручання з використанням біотерапевтичних засобів. Це дослідження є першим дослідженням лікування фактором росту у тваринній моделі хронічної перфорації, яке показало значну перевагу порівняно з контролем.

[00110] HB-EGF загоєє хронічні перфорації барабанної перетинки з оклюзією євстахієвої труби. Була створена тваринна модель хронічної перфорації БП і оклюзії ЄТ, як показано на Фігурі 3. Існуючу щурячу модель оклюзії ЄТ (див. Herda et al. (2002) *Laryngoscope* 112:1657-62) адаптували для мишей, і відтоді успішно реалізували у 80 живих мишей. Оклюзію ЄТ виконували в моделі хронічної перфорації, описаній вище. Це за 3 місяці створило вологу стерильну перфорацію з виділеннями. Ця модель імітує патологічний стан хронічної перфорації в комбінації з дисфункцією ЄТ у людини.

[00111] При лікуванні когорти мишей у цій моделі (хронічні перфорації й оклюзія ЄТ) рекомбінантним HB-EGF, в об'ємі 40 мкл із концентрацією 5 мкг/мл (уповільнене вивільнення дози через біорозкладний полімер на основі хітозану), загоєння відбувалося у 94% (18 з 19) у порівнянні з 9% (2 з 23) контрольних тварин (тільки полімер) за 6 тижнів ( $p < 0,01$ ). Репрезентативні зображення хронічних перфорацій БП, які зажили і які не зажили показано на Фігурі 4. Гістологічно перфорації закриваються товстим шаром кератиноцитів, у порівнянні з контрольними тваринами з відсутністю шару кератиноцитів навіть у тих деяких випадках, коли відбулося закриття. Можливість подолати цей критичний етап хронічного загоєння рани БП за допомогою HB-EGF, щоб активувати шедінг ліганда ектодомену EGFR за наявності виділень із середнього вуха й оклюзії ЄТ, є корисною для лікуванні пацієнтів із хронічною перфорацією барабанної перетинки.

[00112] Дослідження у тваринній моделі хронічного гнійного середнього отиту. Після створення моделі хронічної перфорації з оклюзією ЄТ, проводили інокуляцію в середнє вухо *Pseudomonas aeruginosa* (доза 6x10<sup>9</sup> колонієутворюючих одиниць на мл) через існуючі хронічні перфорації. Через 2 тижні відбирали рідину з вуха й відправляли для проведення дослідження для підтвердження наявності бактерій за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Цей позитивний результат ПЛР підтверджував модель CSOM.

[00113] Потім мишей розділяли на дві когорти. Одна отримувала тільки полімер. Інша отримувала HB-EGF у дозі 5 мкг/мл (та сама доза, що в описаних вище моделях). Загоєння в групі HB-EGF становило 100% (16 із 16) у порівнянні з 41% (7/17) у контрольній групі ( $p < 0,01$ ). У контрольній групі за наявності загоєння воно також мало відмінності. Часто БП була дуже тонкою й напівпрозорою порівняно з майже непрозорою нормальною БП. Загоєння в групі HB-EGF виявилось нормальним. Можливість усе ще подолати цей критичний етап хронічного загоєння рани БП за допомогою HB-EGF, щоб активувати ліганд ектодомену EGFR у найближчій моделі CSOM, підтверджує цей спосіб лікування.

#### Приклад 3

[00114] Транстимпанальний спосіб доставки (Фігури 5, 6 і 7). Засіб доставки для доставки HB-EGF або HB-EGF розміщують впритул до барабанної перетинки або вводять через канал або через євстахієву трубу. Через деякий період часу його можна дістати або він піддається біорозкладенню. Засіб доставки може мати конфігурацію для утримання його всередині барабанної перетинки. Він може являти собою кільце, манжету, мати виступи, канавки або будь-які зміни за шириною або висотою. Засіб доставки може мати більше ніж один із перерахованих вище елементів для утримання його на місці. Засіб доставки може бути перфорований або мати просвіт будь-якого відповідного розміру. У ньому може бути будь-яка кількість виступів будь-якої ширини й розмірів, які вважаються достатніми або надлишковими порівняно з необхідним засобом, щоб утримуватися в барабанній перетинці.

[00115] На Фігурі 5 зображений вушний канал 100; зовнішнє вухо 110; і барабанна перетинка 120. Також зображено пристрій 125 для трансмембранної доставки лікарського засобу, що має ширину 130 і довжину 140.

[00116] На Фігурі 6 зображено альтернативний варіант реалізації пристрою 126 для трансмембранної доставки. Пристрій має ширину 131 і довжину 141. Пристрій 126 містить один

або обидва з зовнішнього обмежника 150 і внутрішнього обмежника 155, причому обмежник має ширину 160.

[00117] На Фігурах 7А–7В зображено альтернативний варіант реалізації пристрою 127 для трансмембранної доставки. На Фігурі 7А представлено вид зверху, що демонструє вушний канал 100 і барабанну перетинку 120. Пристрій 127 для доставки має ширину 132 і довжину 142. Пристрій містить множину виступів 170, розташованих у поздовжньому напрямку вздовж пристрою, причому ці виступи мають довжину 171 і ширину 172. На Фігурі 7В зображено пристрій у поперечному перерізі.

Приклад 4

Пристрій для інтратимпанальної доставки

[00118] Пристрій для доставки фактора росту можна розмістити між шарами барабанної перетинки. Якщо засіб доставки є цільним, його можна розміщати, піднімаючи один або більше шарів як клапоть, а потім замінити клапоть після розміщення. Якщо засіб є рідким, його можна ввести за допомогою ін'єкції.

[00119] На Фігурі 8 показано пристрій 128 для доставки всередині барабанної перетинки. Пристрій введено в барабанну перетинку 120. Пристрій має ширину 133 і довжину 143.

Приклад 5

[00120] Розміщення засобу доставки у вигляді цільного об'єкта суміжно з барабанною перетинкою (Фігура 9). Засіб доставки можна розміщати впритул до барабанної перетинки й забезпечувати місцеве джерело HB-EGF або інгібітора HB-EGF. Засіб доставки можна розміщати медіально або латерально, частково або повністю через барабанну перетинку. Частина, що проходить через барабанну перетинку, може бути менше, більше або відповідати за розміром перфорації, за її наявності.

[00121] На фігурі 9 зображено пристрій 128 для доставки фактора росту, розміщений суміжно з барабанною перетинкою 120. Пристрій має ширину 134 і довжину 144.

Приклад 6

[00122] Спосіб застосування фактора росту з використанням ін'єкції показано на Фігурі 10. Композицію, що містить фактор росту 200, можна доставити у вушний канал 100 для створення контакту з барабанною перетинкою 120 на її латеральній і/або медіальній поверхні, і вона може далі протікати в ділянку перфорації 121 барабанної перетинки. Композицію можна розподіляти зі шприца 210 через трубку 220 для доставки. Композицію можна надавати у вигляді одного розчину або у вигляді двох розчинів, які змішуються в момент доставки.

[00123] Двокамерні шприци відомі в цій галузі техніки й легко доступні, наприклад, дивися серед іншого: Lyo-Ject® двокамерний шприц; або будь-який з описаних у патенті США № 5971953; заявці на патент США US20030040701; US20140012196; US 20130060232; міжнародній заявці WO1999017820A1; тощо.

[00124] Такі композиції включають композиції, які за змішування змінюють стан на в'язкий або твердий. Агенти, що збільшують в'язкість, включають, не обмежуючись перерахунком, гелан, N-ізопропілакриламід з акрилатом натрію й n-N-алкілакриламідом, поліакрилову кислоту з поліетиленгліколем, поліметакрилову кислоту з поліетиленгліколем, CARBOPOL® з гідроксипропілметилцелюлозою, латекс із ацетату гідрофталату целюлози, альгінат натрію або гель, що піддається зворотному термозатвердінню, такий як полоксамер або полоксамін.

[00125] Такі композиції можуть бути доставлені до зовнішньої, епідермальної поверхні барабанної перетинки в стані, подібному рідкому тобто в текучій формі. Однак після введення композиція приймає твердий стан, так що композиція залишається в контакт з барабанною перетинкою. У результаті композиція залишається локалізованою впритул до барабанної перетинки, і фармакологічний агент може передаватися на барабанну перетинку. В'язка або тверда композиція може бути біорозкладною або біонерозкладною.

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Застосування гепаринзв'язувального епідермального фактора росту білка (HB-EGF), для лікування хронічної перфорації барабанної перетинки.

2. Застосування за п. 1, яке **відрізняється** тим, що білок HB-EGF являє собою білок HB-EGF людини.

3. Застосування за п. 2, яке **відрізняється** тим, що білок HB-EGF являє собою розчинну форму білка HB-EGF.

4. Застосування за будь-яким із пп. 1-3, яке **відрізняється** тим, що лікування включає контактування місця хронічної перфорації барабанної перетинки з фармацевтичною

композицією, що містить ефективну дозу HB-EGF, протягом періоду часу, достатнього для значущого закриття перфорації.

5. Застосування за будь-яким із пп. 1-4, яке **відрізняється** тим, що композиція контактує з місцем хронічної перфорації барабанної перетинки протягом періоду, що становить щонайменше 7 діб.

6. Застосування за п. 4, яке **відрізняється** тим, що композиція контактує з місцем хронічної перфорації барабанної перетинки протягом періоду, що становить щонайменше 2 тижні.

7. Застосування за п. 4, яке **відрізняється** тим, що композицію вводять щонайменше щодня.

8. Застосування за п. 4, яке **відрізняється** тим, що композиція забезпечує уповільнене вивільнення HB-EGF.

9. Застосування за п. 4, яке **відрізняється** тим, що композиція представлена у вигляді водного розчину, гелю, лосьйону, бальзаму, пасти або іншого середовища-носія.

10. Застосування за п. 4, яке **відрізняється** тим, що композицію вводять за допомогою розпилення.

11. Застосування за п. 4, яке **відрізняється** тим, що композицію вводять у вигляді рідини, яка згодом твердне, щоб залишатися прилягаючою до барабанної перетинки.

12. Застосування за п. 4, яке **відрізняється** тим, що композиція являє собою гель із уповільненим вивільненням, що містить зшитий співполімер хітозану та полілактиду.

13. Застосування за п. 12, яке **відрізняється** тим, що гель з уповільненим вивільненням додатково містить фібриноген.

14. Застосування за п. 4, яке **відрізняється** тим, що композицію доставляють за допомогою пристрою, який забезпечує уповільнене вивільнення HB-EGF.

15. Застосування за п. 4, яке **відрізняється** тим, що композиція додатково містить щонайменше один додатковий активний агент.

16. Фармацевтична композиція для лікування хронічної перфорації барабанної перетинки, яка містить ефективну дозу гепаринзв'язувального епідермального фактора росту білка (HB-EGF).

17. Фармацевтична композиція за п. 16, яка **відрізняється** тим, що білок HB-EGF являє собою білок HB-EGF людини.

18. Фармацевтична композиція за п. 16, яка **відрізняється** тим, що білок HB-EGF являє собою розчинну форму білка HB-EGF.

19. Фармацевтична композиція за будь-яким із пп. 16-18, яка **відрізняється** тим, що вона контактує з місцем хронічної перфорації барабанної перетинки протягом періоду часу, достатнього для значущого закриття перфорації.

20. Фармацевтична композиція за п. 19, яка **відрізняється** тим, що вона контактує з місцем хронічної перфорації барабанної перетинки протягом періоду, що становить щонайменше 7 діб.

21. Фармацевтична композиція за п. 19, яка **відрізняється** тим, що вона контактує з місцем хронічної перфорації барабанної перетинки протягом періоду, що становить щонайменше 2 тижні.

22. Фармацевтична композиція за п. 19, яка **відрізняється** тим, що її вводять щонайменше щодня.

23. Фармацевтична композиція за п. 19, яка **відрізняється** тим, що вона забезпечує уповільнене вивільнення HB-EGF.

24. Фармацевтична композиція за п. 16, яка **відрізняється** тим, що вона представлена у вигляді водного розчину, гелю, лосьйону, бальзаму, пасти або іншого середовища-носія.

25. Фармацевтична композиція за п. 16, яка **відрізняється** тим, що її вводять за допомогою розпилення.

26. Фармацевтична композиція за п. 16, яка **відрізняється** тим, що її вводять у вигляді рідини, яка згодом твердне, щоб залишатися прилягаючою до барабанної перетинки.

27. Фармацевтична композиція за п. 16, яка **відрізняється** тим, що вона являє собою гель із уповільненим вивільненням, що містить зшитий співполімер хітозану та полілактиду.

28. Фармацевтична композиція за п. 27, яка **відрізняється** тим, що гель з уповільненим вивільненням додатково містить фібриноген.

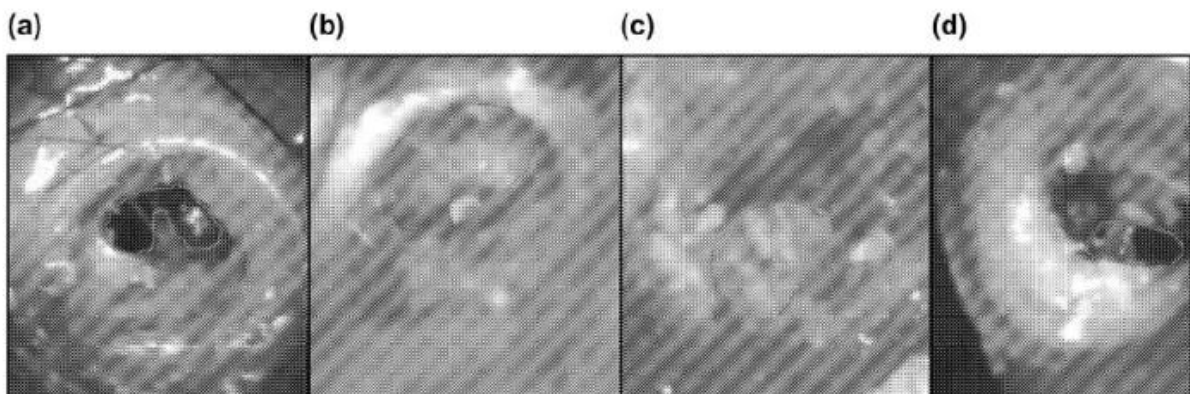
29. Фармацевтична композиція за п. 16, яка **відрізняється** тим, що її доставляють за допомогою пристрою, який забезпечує уповільнене вивільнення HB-EGF.

30. Фармацевтична композиція за п. 16, яка **відрізняється** тим, що вона додатково містить щонайменше один додатковий активний агент.

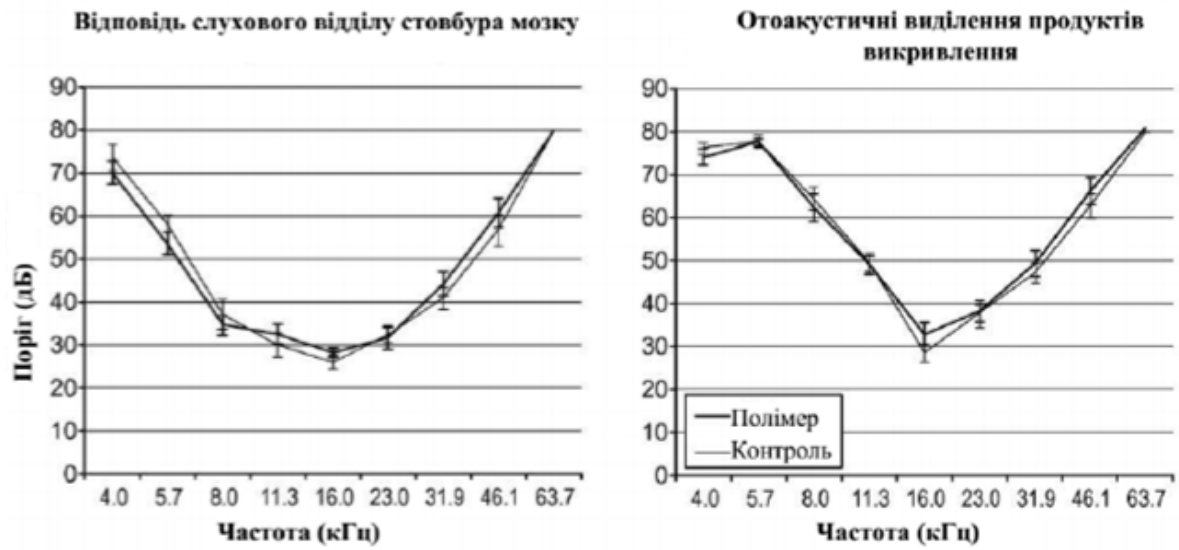
31. Застосування гепаринзв'язувального епідермального фактора росту білка (HB-EGF), у виробництві лікарського засобу для лікування хронічної перфорації барабанної перетинки.

32. Застосування за п. 31, яке **відрізняється** тим, що білок HB-EGF являє собою білок HB-EGF людини.

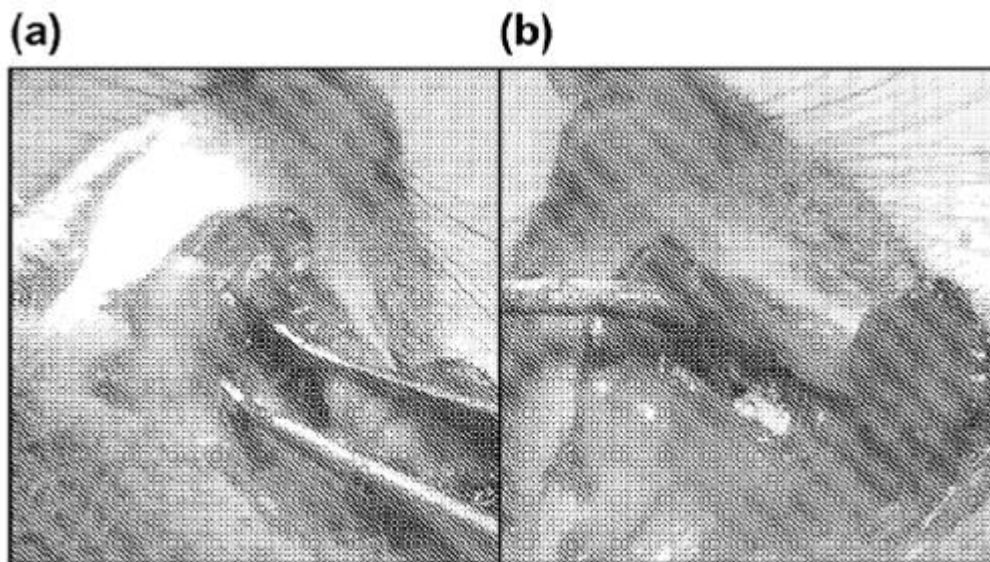
33. Застосування за п. 31, яке **відрізняється** тим, що білок HB-EGF являє собою розчинну форму білка HB-EGF.
34. Застосування за будь-яким із пп. 31-33, яке **відрізняється** тим, що лікарський засіб контактує з місцем хронічної перфорації барабанної перетинки протягом періоду часу, достатнього для значущого закриття перфорації.
35. Застосування за п. 34, яке **відрізняється** тим, що лікарський засіб контактує з місцем хронічної перфорації барабанної перетинки протягом періоду, що становить щонайменше 7 діб.
36. Застосування за п. 34, яке **відрізняється** тим, що лікарський засіб контактує з місцем хронічної перфорації барабанної перетинки протягом періоду, що становить щонайменше 2 тижні.
37. Застосування за п. 34, яке **відрізняється** тим, що лікарський засіб вводять щонайменше щодня.
38. Застосування за п. 34, яке **відрізняється** тим, що лікарський засіб забезпечує уповільнене вивільнення HB-EGF.
39. Застосування за п. 31, яке **відрізняється** тим, що лікарський засіб представлений у вигляді водного розчину, гелю, лосьйону, бальзаму, пасти або іншого середовища-носія.
40. Застосування за п. 31, яке **відрізняється** тим, що лікарський засіб вводять за допомогою розпилення.
41. Застосування за п. 31, яке **відрізняється** тим, що лікарський засіб вводять у вигляді рідини, яка згодом твердне, щоб залишатися прилягаючою до барабанної перетинки.
42. Застосування за п. 31, яке **відрізняється** тим, що лікарський засіб являє собою гель із уповільненим вивільненням, що містить зшитий співполімер хітозану та полілактиду.
43. Застосування за п. 42, яке **відрізняється** тим, що гель з уповільненим вивільненням додатково містить фібриноген.
44. Застосування за п. 31, яке **відрізняється** тим, що лікарський засіб доставляють за допомогою пристрою, який забезпечує уповільнене вивільнення HB-EGF.
45. Застосування за п. 31, яке **відрізняється** тим, що лікарський засіб додатково містить щонайменше один додатковий активний агент.



ФІГ. 1

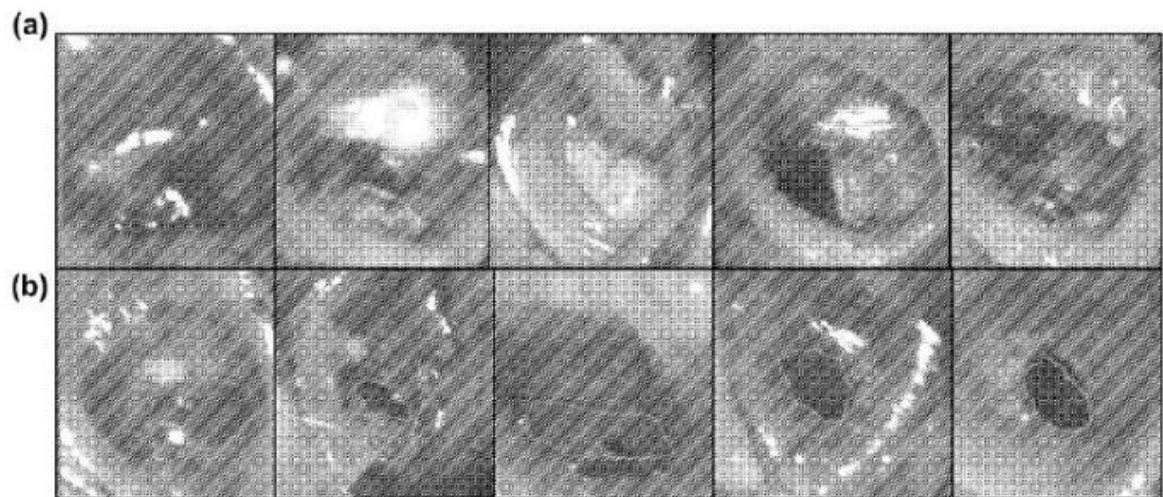


ФІГ. 2

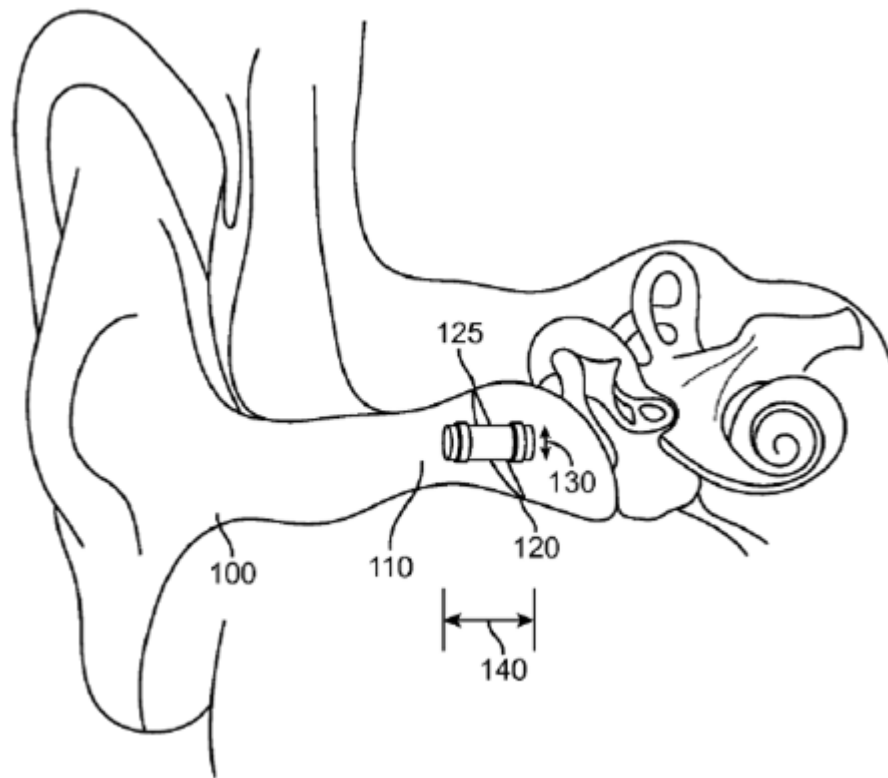


ФІГ. 3

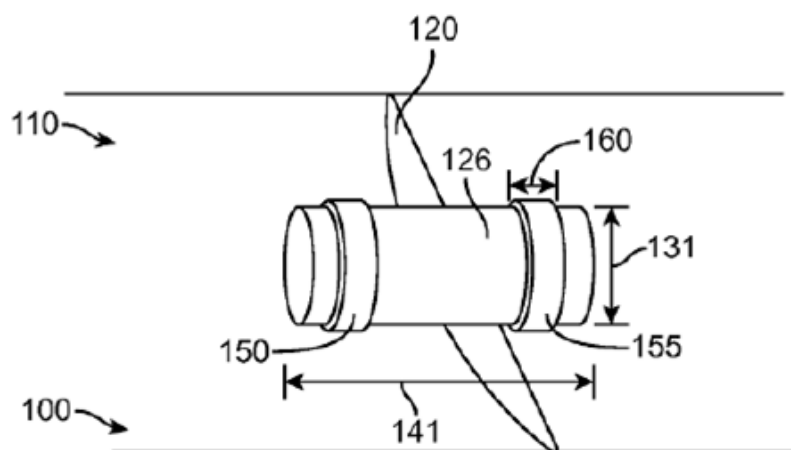




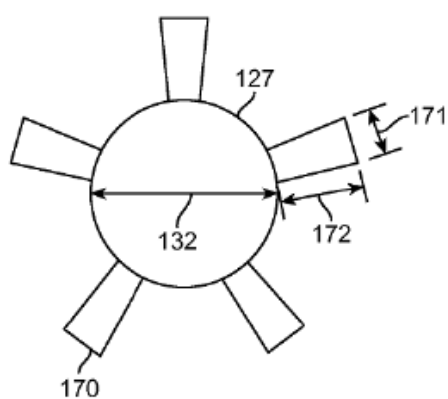
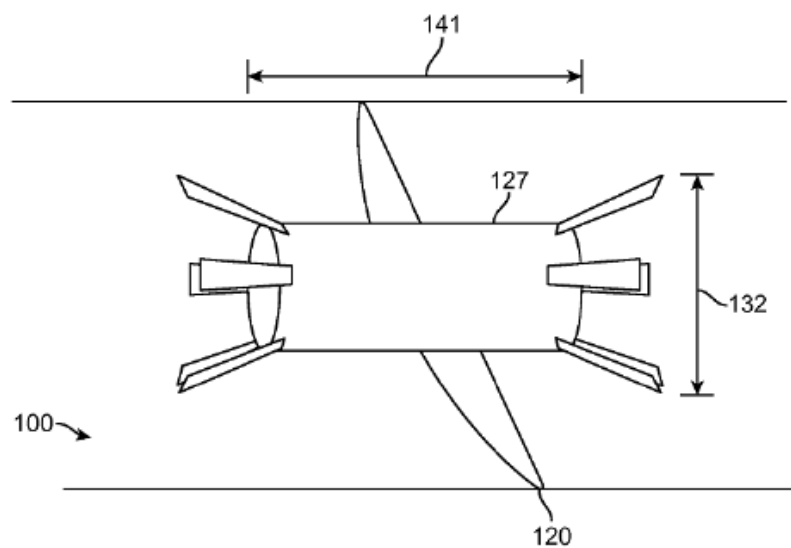
ΦΙΓ. 4



ΦΙΓ. 5



ФІГ. 6



ФІГ. 7

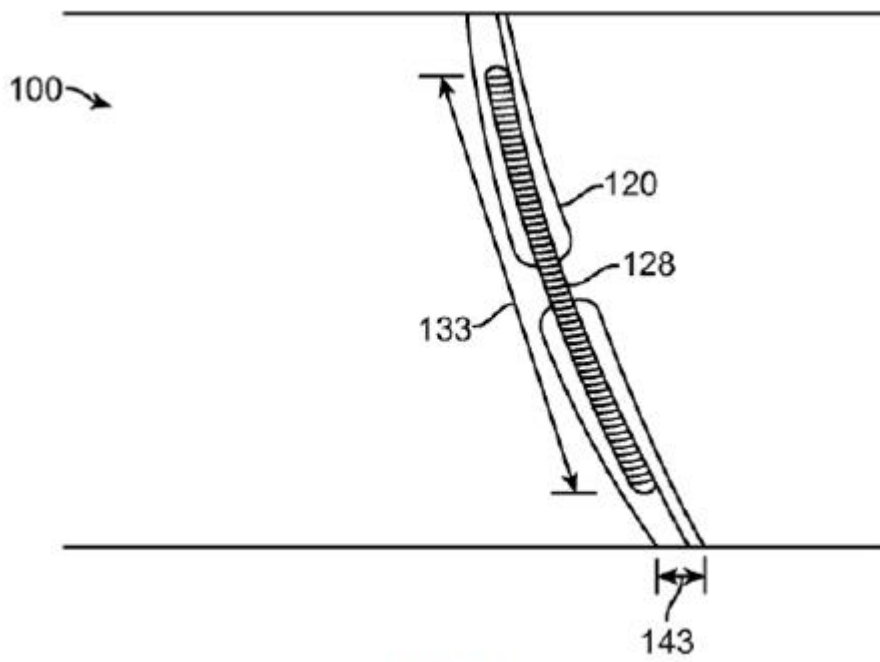


FIG. 8

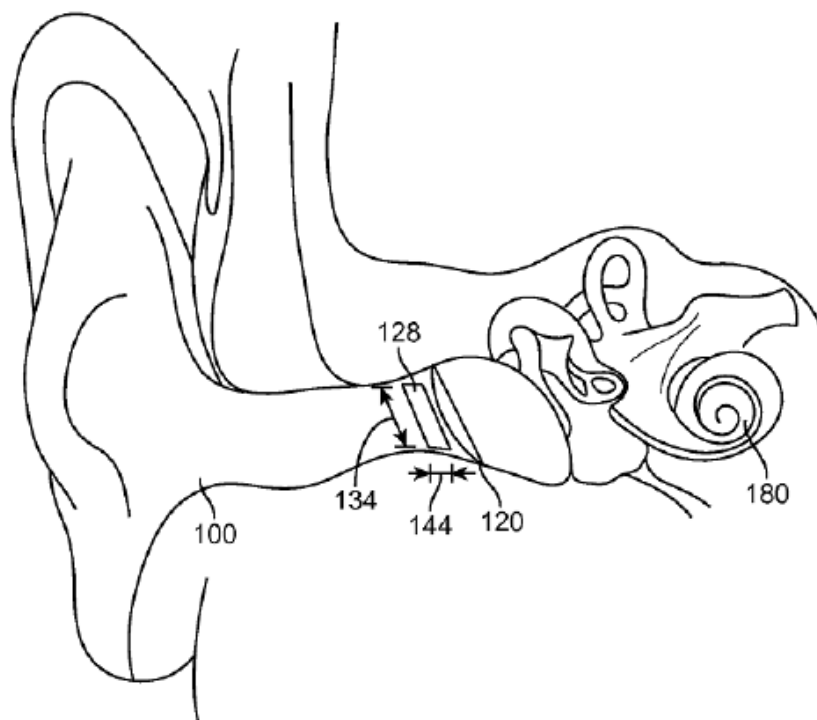
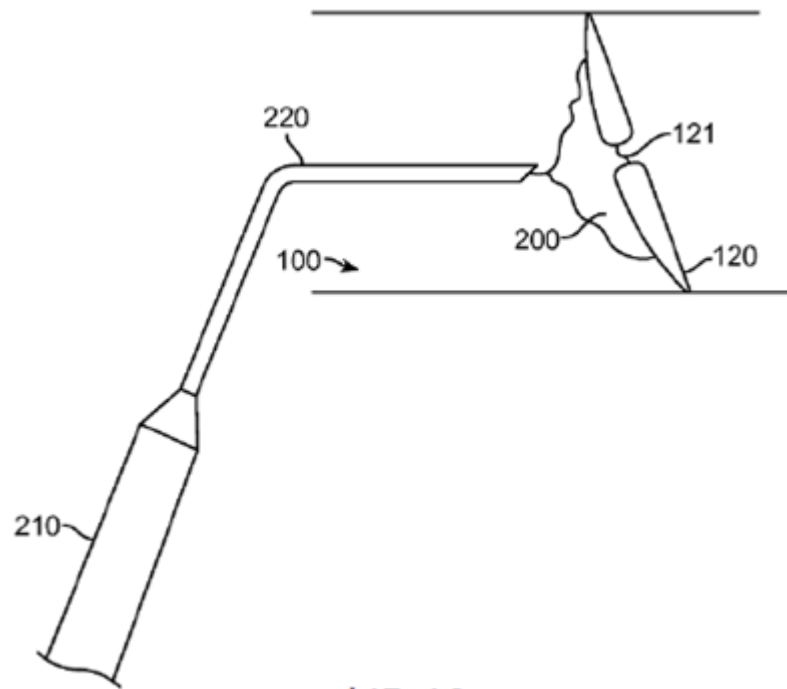


FIG. 9





ФІГ. 10

---

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

---

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,  
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601