

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **029076**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2018.02.28

(21) Номер заявки
201700192

(22) Дата подачи заявки
2017.03.22

(51) Int. Cl. *A61K 31/192* (2006.01)
A61K 31/79 (2006.01)
A61K 33/38 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(54) АНТИМИКРОБНОЕ СРЕДСТВО

(43) **2018.01.31**

(96) **2017/EA/0011 (BY) 2017.03.22**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**УЧРЕЖДЕНИЕ БЕЛОРУССКОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО
УНИВЕРСИТЕТА "НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ФИЗИКО-
ХИМИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ" (НИИ
ФХП БГУ); БЕЛОРУССКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ (BY)**

(56) BY-C1-15481

RU-C1-2532328

RU-C1-2562113

WO-A1-2000027390

ЧЕРНЯВСКАЯ А.А. и др. Синтез и антимикробная активность комплексов серебра(I) и меди(II) с 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксибензилсульфанил)уксусной кислотой. Химико-фармацевтический журнал. Том 40, № 8, 2006

(72) Изобретатель:

**Стахевич Сергей Игоревич,
Горбачевич Глеб Иванович, Логинова
Наталья Васильевна, Осипович
Николай Павлович, Слабко Ирина
Николаевна (BY)**

(57) Изобретение относится к фармации, в частности к лекарственным средствам на основе комплексов серебра(I) в виде гидрогелей, которые могут быть использованы для лечения инфицированных поверхностных ран и ожогов со слабой экссудацией, пролежней, длительно незаживающих язв, ссадин. Задачей изобретения является получение нового эффективного антимикробного средства широкого спектра действия для наружного применения, отличающегося высокой стабильностью при хранении. Поставленная задача достигается тем, что антимикробное средство, включающее серебросодержащую субстанцию (комплекс серебра(I) с 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксибензилсульфанил)уксусной кислотой), поливинилпирролидон, метилцеллюлозу и воду для инъекций, дополнительно содержит 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксибензилсульфанил)уксусную кислоту и пропиленгликоль при следующем соотношении компонентов, мас. %: комплекс серебра(I) с 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксибензилсульфанил)уксусной кислотой: 0,25-1,00; 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксибензилсульфанил)уксусная кислота: 0,03-0,10; пропиленгликоль: 5,0-20,0; поливинилпирролидон: 1,5-2,5; метилцеллюлоза: 3,0-4,0; вода для инъекций: остальное.

B1**029076****029076****B1**

Изобретение относится к фармации, в частности к лекарственным средствам на основе комплексов серебра(I) в виде гидрогелей, которые могут быть использованы для лечения инфицированных поверхностных ран и ожогов со слабой экссудацией, пролежней, длительно незаживающих язв, ссадин.

Известно, что соединения серебра проявляют антимикробную активность [1]. Среди субстанций, используемых в медицине, следует выделить соли серебра (нитрат серебра), комплексные соединения серебра (сульфадиазин серебра, сульфатиазол серебра) и коллоидное серебро (колларгол, протаргол) [2]. На их основе изготавливаются кремы (Аргосульфам, Сульфаргин, Силвадерм, Дермазин, Фламазин), растворы (Повиаргол, Колларгол, Протаргол, Арговит, Аргоника) и аэрозоли (Сильведерм и др.) [2, 3]. В настоящее время для лечения инфицированных ран широко используются 1-2% мази, содержащие комплекс серебра(I) с сульфаниламидами - сульфадиазином и сульфатиазолом. При контакте с раневыми экссудатами происходит медленная диссоциация комплекса серебра(I) с образованием ионов серебра и сульфаниламида. Средства этого класса активны в отношении грамположительных, грамотрицательных бактерий (в том числе *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Klebsiella spp.*), а также патогенных и условно-патогенных грибов (в том числе *Candida spp.* и дерматофитов). Основными побочными эффектами этих средств связаны с системным действием сульфаниламидов: нарушением кроветворения (агранулоцитоз, апластическая и гемолитическая анемия, тромбоцитопения, лейкопения), кожными и аллергическими реакциями, диспептическими явлениями, гепатитом, гепатоцеллюлярным некрозом, нарушением функций ЦНС, токсическим нефрозом [4].

Создание новой серебросодержащей субстанции - комплекса серебра(I) с 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил)уксусной кислотой - позволило устранить вышеперечисленные побочные эффекты и расширить спектр фармакологической активности комплексов серебра [5, 6].

Наиболее близким к заявляемому средству техническим решением, выбранным в качестве прототипа изобретения, является мазь (гидрогель), содержащая комплекс серебра(I) с 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил)уксусной кислотой, поливинилпирролидон и в качестве мазевой основы - эфир целлюлозы, выбранный из группы, включающей метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу и карбоксиметилцеллюлозу, а также воду для инъекций [7]. Мазь обладает высокой антибактериальной и антифунгальной активностью (1,06-12,5 мкг/мл в пересчете на активный ингредиент). Гидрофильная мазевая основа - гель эфира целлюлозы - обеспечивает высокий уровень высвобождения серебросодержащей субстанции из мази.

Однако существенным недостатком этого средства, ограничивающим в значительной степени возможность его масштабного производства и применения в медицинской практике, является низкая стабильность серебросодержащего компонента в его составе. При хранении мази происходит разложение активного ингредиента, ведущее к образованию наночастиц серебра, которые со временем агрегируют и образуют грубодисперсное серебро, что обуславливает неконтролируемое изменение нормируемых показателей качества лекарственного средства (уменьшение фармакологической активности, появление фазовой неоднородности и изменение внешнего вида).

Задачей изобретения является получение нового эффективного антимикробного средства широкого спектра действия для наружного применения, отличающегося высокой стабильностью при хранении.

Поставленная задача достигается тем, что антимикробное средство, включающее серебросодержащую субстанцию (комплекс серебра(I) с 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил)уксусной кислотой), поли-винилпирролидон, метилцеллюлозу и воду для инъекций, дополнительно содержит 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил)уксусную кислоту и пропиленгликоль при следующем соотношении компонентов, мас. %:

комплекс серебра(I) с 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил)уксусной кислотой	0,25–1,00
2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил)уксусная кислота	0,03–0,10
пропиленгликоль	5,0–20,0
поливинилпирролидон	1,5–2,5
метилцеллюлоза	3,0–4,0
вода для инъекций	остальное

Сущность изобретения поясняется фиг. 1 и 2, где на фиг. 1 приведен кинетический профиль разложения AgL_2 в различных средах (1 - ДМСО; 2 - пропиленгликоль; 3 - пропиленгликоль с добавлением L), а на фиг. 2 - зависимость оптической плотности модельного раствора AgL_2 в пропиленгликоле спустя 60 мин от массы стабилизатора L, добавленного в систему (из расчета на 1,0 мг AgL_2).

Синтез комплекса серебра(I) (AgL_2) проводят согласно методике, описанной в работе [8]. В качестве мазевой основы используют метилцеллюлозу (МЦ) (ТУ2231-107-57684455-2003), обладающую высокой биосовместимостью и адсорбирующей способностью и широко используемую при производстве гелей. С целью стабилизации активного серебросодержащего компонента мази в ее состав вводят 2-(4,6-

ди-трет-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил)уксусную кислоту (L), получение которой описано в [9], а пропиленгликоль (ПГ) (99,9%, USP/EP) применяют в качестве растворителя для AgL_2 и L. Для подавления агрегации наночастиц серебра, которые могут формироваться при применении мази на раневой поверхности, традиционно используют поливинилпирролидон (ПВП) (молекулярная масса 25-350 кДа).

Производство заявляемого средства осуществляют в асептических условиях путем выполнения следующих операций (из расчета на 100 г мази, табл. 1):

- 1) набухание МЦ в воде: 3,0-4,0 г МЦ заливают 66,5 г горячей воды для инъекций (80°C), охлаждают до 20°C и перемешивают до полного растворения полимера;
- 2) растворение ПВП: 1,5-2,5 г ПВП растворяют в 20,0 г воды для инъекций при температуре 20°C при перемешивании; полученную смесь соединяют с гелем МЦ и равномерно перемешивают;
- 3) растворение соединений AgL_2 и L: 0,03-0,10 г стабилизатора L и 0,25-1,00 г комплекса AgL_2 растворяют в 5,0-20,0 г пропиленгликоля при 20°C в защищенном от света месте, при необходимости используя диспергирование ультразвуком;
- 4) введение раствора AgL_2 и L в мазевую основу: раствор, полученный согласно п.3, при перемешивании постепенно добавляют к смеси, полученной согласно п.2;
- 5) упаковка и хранение: мазь расфасовывают в темные пластиковые контейнеры, герметично укупоривают и хранят в холодильнике при температуре 4-6°C.

Таблица 1

Заявляемое средство	Составы заявляемого средства				
	Состав мази, мас. %				
	AgL_2	L	МЦ	ПВП	ПГ
Состав 1	1,00	0,10	3,0	2,5	20,0
Состав 2	0,50	0,05	3,5	2,0	10,0
Состав 3	0,25	0,03	4,0	1,5	5,0

Отличие заявляемого средства от ранее известных серебросодержащих мазей иллюстрируется ниже приведенными примерами, в которых представлены сравнительные данные об антимикробной активности и стабильности образцов мазей различного состава.

Пример 1.

Антимикробную активность образцов мазей определяли методом диффузии вещества в плотной питательной среде. Взвеси суточных агаровых культур тест-микробов в физиологическом растворе стандартизировали до 10^5 КОЕ/мл и засеивали газоном на плотную питательную среду; лунки в агаре создавали стерильным пробойником диаметром 5 мм и заполняли их образцом (в контрольные лунки добавляли стерильную водопроводную воду). Посевы выдерживали в термостате в течение 24 ч (для грибов - 48 ч) и после термостатирования измеряли диаметр (мм) зон задержки роста вокруг лунок с образцами (отсутствия зоны задержки роста и наличия роста внутри лунки учитывали как 0,0 мм) [10]. Результаты исследования антимикробной активности заявляемого средства и прототипа представлены в табл. 2.

Таблица 2

Образец	Антимикробная активность заявляемого средства и прототипа				
	Диаметр зон задержки роста, мм				
	<i>E. coli</i> ATCC 11229	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>Asp. niger</i> ATCC 16404
Прототип	22	23	19	15	16
Состав 1	22	22	18	18	24
Состав 2	22	22	18	17	22
Состав 3	21	20	17	16	19

* Погрешность в измерении диаметра зон задержки составляла 1 мм.

Из табл. 2 следует, что антибактериальная активность мазей различного состава в отношении грамположительных (*Staphylococcus aureus*) и грамотрицательных (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) бактерий сопоставима, однако заявляемое средство, эффективнее прототипа, подавляло рост дрожжевых (*Candida albicans*) и плесневых грибов (*Aspergillus niger*).

Пример 2.

Навеску соединения AgL_2 массой 1,0 мг растворяли в 4,9 мл ДМСО или пропиленгликоля с добавлением 0,1 мл воды. Стабилизирующее действие соединения L изучали путем растворения его навески вместе с комплексом в пропиленгликоле. После полного растворения образцы помещали в термостатируемую кювету (37,0°C) и регистрировали изменение оптической плотности раствора во времени при

длине волны 500 нм (прибор Solar PB2201). В процессе разложения комплекса AgL_2 образуется окрашенный продукт окисления лиганда L и наночастицы серебра, которое со временем коагулирует и вызывает заметное помутнение раствора. Как видно из фиг. 1, процесс разложения комплекса AgL_2 протекает медленнее при использовании пропиленгликоля в качестве растворителя (вследствие меньшей по сравнению с ДМСО сольватирующей способности). Введение в систему соединения L резко снижает скорость разложения комплекса AgL_2 (фиг. 1, кривая 4), причем оптимальное содержание стабилизатора составляет 0,1 мг на каждый миллиграмм комплекса (фиг. 2).

Для сравнения устойчивости образцов мазей различного состава проводили стресс-тест [11], в котором навески мазей массой 1 г помещали в термостат (50°C). Разложение образцов мазей фиксировали по появлению розовой окраски продукта окисления катехольного лиганда и черным частицам серебра. Образец прототипа разлагали в таких же условиях спустя 10 мин. Средство заявляемого состава не изменяло своего внешнего вида в течение 120 мин. Полное разложение (резкое почернение) образца прототипа и заявляемого состава наблюдали через 25 и 240 мин соответственно.

При хранении в защищенном от света месте при температуре 2-8°C мазь сохраняет стабильность в течение срока наблюдения (более 1 года).

Примеры 3-7.

Спустя 1, 3, 6, 9 и 12 месяцев после приготовления мазей контролировалась их антимикробная активность (ингибирование роста бактерии *E.coli*, табл. 3), фазовая неоднородность (средний размер частиц, табл. 4) и внешний вид (окраска мази, табл. 5). Антимикробная активность устанавливалась по методике, описанной в примере 1. Окраска мази определялась при рассеянном свете на белом фоне, а размер частиц - с использованием светового микроскопа.

Таблица 3

Изменение антимикробной активности (диаметра задержки роста *E.coli*, мм) заявляемого средства и прототипа с течением времени

Образец	Время хранения образца, месяцев				
	1	3	6	9	12
Прототип	20	18	17	15	15
Состав 1	22	20	22	21	21
Состав 2	22	22	22	21	20
Состав 3	20	20	21	20	20

Таблица 4

Изменение среднего размера частиц (мкм) заявляемого средства и прототипа с течением времени

Образец	Время хранения образца, месяцев				
	1	3	6	9	12
Прототип	20,5	40,2	49,1	52,0	50,0
Состав 1	1,8	2,0	1,8	2,4	2,2
Состав 2	1,5	1,6	1,6	1,8	1,9
Состав 3	1,2	1,5	1,4	1,6	1,8

Таблица 5

Изменение внешнего вида заявляемого средства и прототипа с течением времени

Образец	Время хранения образца, месяцев				
	1	3	6	9	12
Прототип	светло-серый	серый	темно-серый	черный	черный
Состав 1	белый	белый	белый	белый	белый
Состав 2	белый	белый	белый	белый	белый
Состав 3	белый	белый	белый	белый	белый

Как следует из таблиц, с течением времени прототип изменяет свою окраску (табл. 5) - происходит образование грубодисперсного серебра, что влечет за собой увеличение среднего размера частиц (табл. 4) и снижение антимикробной активности (табл. 3). Заявляемое средство сохраняет стабильность на протяжении срока наблюдения (12 месяцев): не происходит существенного изменения антимикробного эффекта, размеров частиц и внешнего вида.

Соединение L способно стабилизировать комплекс AgL_2 в составе мази благодаря следующим факторам: 1) наличие у него восстановительных свойств [12], которые препятствуют окислению лиганда,

входящего в состав комплекса AgL_2 , под действием кислорода воздуха при хранении и подавляют разложение комплекса; 2) создание в результате диссоциации L ($pK_a = 4,1$) кислой среды, в которой сильно замедляется окисление катехолов [13]; 3) смещение равновесия в сторону исходных веществ (AgL_2) в мазевой среде в соответствии с принципом Ле Шателье, поскольку анион L^- образуется при диссоциации самого комплекса AgL_2 .

Мазь представляет собой однородный белый эластичный гидрогель, который легко распределяется и удаляется с поверхности кожи. Величина pH водной вытяжки мази находится в пределах 5,3-5,5, что соответствует уровню кислотности кожи человека в норме. Средство заявляемого состава удовлетворяет требованиям, предъявляемым к мягким лекарственным формам для наружного применения (стабильность, размер частиц, pH, микробиологическая чистота) и может быть произведено в условиях фармацевтических предприятий.

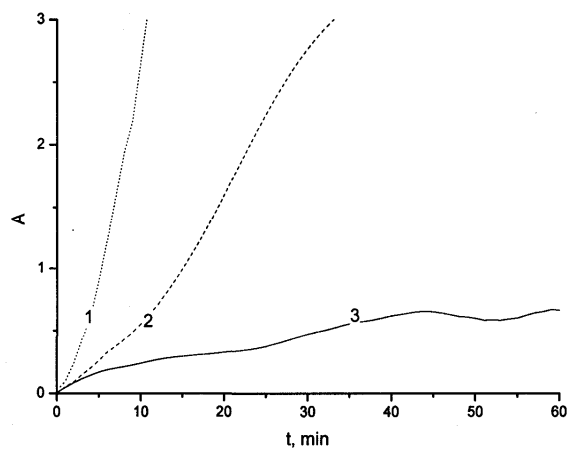
Таким образом, стабильность активного компонента AgL_2 в составе мази в отличие от прототипа обеспечивали за счет введения в препарат 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил)уксусной кислоты и пропиленгликоля при определенном соотношении компонентов мази, при этом заявляемое средство показало высокий уровень антимикробной активности широкого спектра действия.

Источники информации.

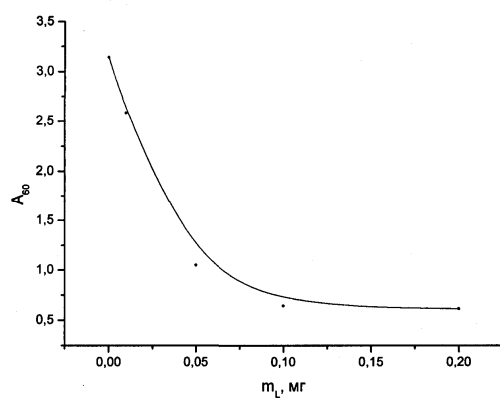
1. Харкевич Д.А. Фармакология/Д.А. Харкевич. - М.: ГЭОТАР - Медиа, 2008, с. 538-547.
2. Реестр лекарственных средств Республики Беларусь [Электронный ресурс]/Министерство здравоохранения Республики Беларусь. Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении. - Минск, 2016. - Режим доступа: <http://www.rceth.by/gefbank>. - Дата доступа: 20.10.2016.
3. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]/Министерство здравоохранения Российской Федерации. - Москва, 2016. - Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx>. - Дата доступа: 20.10.2016.
4. Справочник Видаль "Лекарственные препараты в России" [Электронный ресурс]/Видаль Рус. - Москва, 2016. - Режим доступа: <http://www.vidal.ru>. - Дата доступа: 20.10.2016.
5. Патент ВУ 15000, МПК А61К 31/192, А61К 31/28, А61Р 31/04, А61Р 31/10, А61Р 31/22, опубл. 28.02.11.
6. Патент ВУ 17021, МПК А61К 31/192, А61К 31/28, А61Р 31/10, опубл. 30.12.12.
7. Патент ВУ 15481, МПК А61К 31/192, А61К 31/28, А61Р 31/04, А61Р 31/22, опубл. 30.12.11.
8. Синтез и антимикробная активность комплексов серебра(I) и меди(II) с 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил)уксусной кислотой/А.А. Чернявская [и др.]/Хим. - фарм. журн. - 2006. - Т. 40, № 8, с. 7-9.
9. Синтез и антиокислительные свойства некоторых производных алкилированного пирокатехина/Масловская Л.А. [и др.]/Журнал общей химии. - 1996. - № 11, с. 1893-1898.
10. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам//Методические указания МУК 4.2.1890 - 04. - М. Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России. - 2004, с. 314-315.
11. Производство лекарственных средств. Испытания стабильности = Вытворчасць лекавых сродкаў. Выпрабаванне стабільнасці: ТКП 431 - 2012 (02041). - Введ. 01.03.12. - Минск: Белорус. гос. ин-т стандартизации и сертификации, 2012. - С. 5-15.
12. Silver (I) interaction and complexation with sterically hindered sulfur - containing diphenol derivatives/N.V. Loginova [et al.]/Polyhedron. - 2005. - Vol. 24. - P. 611-618.
13. Чернявская, А. А. Комплексообразование и редокс - взаимодействие $Ag(I)$ с производными пространственно экранированных дифенолов и аминофенолов/А.А. Чернявская, В.Н. Повалишев//Вес. Нац. акад. наук Беларусі Сер. хім. навук. - 2005. - № 5, С. 132-134.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Антимикробное средство для наружного применения, включающее серебросодержащую субстанцию (комплекс серебра(I) с 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил)уксусной кислотой), поливинилпирролидон, метилцеллюлозу и воду для инъекций, отличающееся тем, что дополнительно содержит 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил)уксусную кислоту и пропиленгликоль при следующем соотношении компонентов, мас. %: комплекс серебра(I) с 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил)уксусной кислотой: 0,25-1,00; 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил)уксусная кислота: 0,03-0,10; пропиленгликоль: 5,0-20,0; поливинилпирролидон: 1,5-2,5; метилцеллюлоза: 3,0-4,0; вода для инъекций: остальное.



Фиг. 1



Фиг. 2

