

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035748**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.08.05

(21) Номер заявки
201791483

(22) Дата подачи заявки
2016.01.08

(51) Int. Cl. **A61K 31/416** (2006.01)
A61K 31/4174 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)

(54) **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МИКОЗА**(31) **15150904.9**(32) **2015.01.13**(33) **EP**(43) **2017.11.30**(86) **PCT/EP2016/050272**(87) **WO 2016/113194 2016.07.21**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АЦЪЕНДЕ КИМИКЕ РЪЮНИТЕ
АНДЖЕЛИНИ ФРАНЧЕСКО
А.К.Р.А.Ф. С.П.А. (IT)**

(72) Изобретатель:
**Миланесе Клаудио, Капеccione Де
Йоаннон Алессандра, Тоньяни
Серена, Донати Лука (IT)**

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

(56) RANI N. ET AL.: "Imidazoles as potential antifungal agents: A review", MINI-REVIEWS IN MEDICINAL CHEMISTRY, 2013, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS B.V. NLD, vol. 13, no. 11, 2013, pages 1626-1655, XP009183599, ISSN: 1389-5575, abstract, page 1627, column 2, paragraph 2; figure 3, table 1, page 1630, column 2, paragraph 2; figure 7

US-A1-2004180965

MOODY M.R. ET AL.: "In vitro activities of miconazole, miconazole nitrate, and ketoconazole alone and combined with rifampin against Candida spp. And Torulopsis glabrata recovered from cancer patients", ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, MAY 1980, vol. 17, no. 5, May 1980 (1980-05), pages 871-875, XP055180997, ISSN: 0066-4804, DOI: 10.1128/AAC.17.5.871, abstract

STELMACHOW J. ET AL.: "Efficacy and tolerance of benzydamine in the treatment of vaginal infections", MEDICAL SCIENCE MONITOR, 1998 PL, vol. 4, no. 6, 1998, pages 1040-1042, XP009183593, ISSN: 1234-1010, abstract, page 1040, column 1, paragraph 1, page 1041, column 1, table 1

YUCESOY M. ET AL.: "In-vitro synergistic effect of fluconazole with nonsteroidal anti-inflammatory agents against Candida albicans strains", JOURNAL OF CHEMOTHERAPY, SCRIT, IT, vol. 12, no. 5, October 2000 (2000-10), pages 385-389, XP002429141, ISSN: 1120-009X, abstract, tables 2-3

BOSELLI F. ET AL.: "Efficacy and Tolerability of Fitostimoline (Vaginal Cream, Ovules, and Vaginal Washing) and of Benzydamine Hydrochloride (Tantum Rosa Vaginal Cream and Vaginal Washing) in the Topical Treatment of Symptoms of Bacterial Vaginosis", ISRN OBSTETRICS AND GYNECOLOGY, vol. 2012, 2012, pages 1-5, XP055181404, DOI: 10.1086/503780, abstract, page 2, column 2, paragraph 2, page 4, column 2, paragraph 1

(57) Изобретение относится к фармацевтическому составу, содержащему комбинацию бензидамина и противогрибкового активного ингредиента, указанная комбинация имеет синергический эффект в лечении микоза.

B1**035748****035748 B1**

Область техники изобретения

Изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей комбинацию бензидамина и противогрибкового активного ингредиента, указанная комбинация имеет синергический эффект в лечении микоза.

Уровень техники

Грибки, относящиеся к роду *Candida*, являются одной из наиболее частых причин грибковых инфекций в мире.

Многие разновидности *Candida* являются безопасными симбионтами или эндосимбионтами своих организмов-носителей, таких, как, например, человек.

Грибки, относящиеся к разновидностям *Candida albicans* и *Candida tropicalis*, в норме присутствуют на слизистой оболочке полости рта, желудочно-кишечного тракта и влагалища. Вместе с тем, когда микрофлора слизистой оболочки изменяется, например вследствие продолжительного лечения антибиотиками или гормональных изменений, грибки могут чрезмерно размножиться и вызвать поверхностные инфекции, например в полости рта или во влагалище, известные как кандидоз. У людей с ослабленным иммунитетом грибки могут даже вызвать тяжелые системные инфекции, известные как кандидемия, которые иногда смертельны.

Вульвовагинит, вызванный грибом, представляет в настоящее время около 30-35% вагинальных инфекций и чаще всего вызван грибом *Candida albicans*.

Вульвовагинит сопровождается изменением вагинального показателя pH, и основными симптомами являются сильный вагинальный и/или вульварный зуд, выделения, воспаление и боль.

В общем, лечение состоит в введении местнодействующих противогрибковых препаратов в виде кремов, вагинальных суппозиторий и растворов для наружного применения. В случае тяжелых и/или рецидивирующих инфекций противогрибковые препараты вводят перорально.

Revaryl™ является имеющимся в продаже кремом для лечения вульвовагинального микоза, содержащим 1% мас./мас. эконазола нитрата.

Эконазол является производным имидазола, обладающим широким спектром противогрибкового действия и широко применяемым для лечения микоза, вызванного *Candida albicans*.

Несколько патентных заявок раскрывают комбинации активных ингредиентов, пригодных для лечения микоза полости рта и вульвовагинального микоза.

Публикация WO 96/26724 раскрывает фармацевтическую композицию, содержащую противовоспалительное количество бензидамина или его соли, антибактериально эффективное количество антибактериального средства и фармацевтически приемлемого носителя или эксципиента.

US 2009/0208558 относится к применению противогрибкового средства и ингибитора адгезии эпителиальных клеток или эндотелиальных клеток для производства комбинированного препарата для местного лечения микоза, вызванного *Candida*.

Большинство лекарственных комбинаций показывают аддитивный эффект. В некоторых случаях, вместе с тем, комбинации показывают менее чем или более чем аддитивный эффект. Комбинации называют антагонистическими или синергическими соответственно.

Антагонистический или синергический эффекты непредсказуемы и являются неожиданными экспериментальными данными. Вместе с тем, актуален поиск высокоэффективных комбинаций, например синергических смесей активных ингредиентов. Способность делать случайные открытия не является подходящим путем, так как число потенциальных комбинаций средств необычайно велико. Другая нормальная стратегия открытия, заключающаяся в анализе и поиске возможных потенциальных комбинаций на основе знания механизма, также имеет ограниченные возможности, поскольку многие биологические конечные точки живых организмов подвержены воздействию по многочисленным направлениям. Данные пути часто неизвестны, и даже при их существовании механизмы взаимодействия путей для создания биологического конечного эффекта часто неизвестны.

Сущность изобретения

Заявитель столкнулся с проблемой создания фармацевтической композиции для лечения микоза, имеющего улучшенное действие по сравнению с композициями, известными в данной области техники.

Заявитель обнаружил, что бензидамин можно применять совместно с противогрибковыми активными ингредиентами, полученными из имидазола.

В частности, заявитель неожиданно обнаружил, что комбинация бензидамина с противогрибковым активным ингредиентом, полученным из имидазола, имеет синергический эффект в ингибировании роста грибов, относящихся к роду *Candida*.

Таким образом, в первом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей комбинацию бензидамина и имидазола-антимикотика или их соли, и по меньшей мере одного фармацевтически приемлемого эксципиента для применения в лечении микоза, вызванного *Candida*.

Предпочтительно, бензидамин в композиции согласно настоящему изобретению приносит облегчение при вульвовагинальном зуде и боли.

Предпочтительно, имидазол-антимикотик выбран из группы, содержащей бифоназол, бутконазол, хлормидазол, клотримазол, кроконазол, эконазол, фентиконазол, кетоназол, изоконазол, миконазол,

нетиконазол, омоконазол, оксиконазол, сертаконазол, сулкоконазол, тиоконазол или их соли.

Более предпочтительно, имидазол-антимикотик выбран из группы, содержащей бифоназол, бутконазол, клотримазол, эконазол, фентиконазол, кетокконазол, изокконазол, миконазол, омоконазол, сертаконазол, сулкоконазол, тиокконазол или их соли.

Еще более предпочтительно имидазол-антимикотик выбран из группы, содержащей бутконазол, эконазол, фентиконазол, изокконазол, миконазол, сулкоконазол или их соли.

Предпочтительно, имидазол-антимикотик является эконазолом, миконазолом или их солью.

Предпочтительно, микоз, вызываемый *Candida*, вызван *Candida Albicans*, *Candida lusitanae*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida rugosa*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* или *Candida dubliniensis*. Более предпочтительно, микоз, вызываемый *Candida*, вызван *Candida Albicans*, *Candida lusitanae* или *Candida tropicalis*.

Более предпочтительно, микоз, вызываемый *Candida*, является кандидозом слизистых оболочек, кандидозом кожи, онихомикозом, системным кандидозом, ятрогенным кандидозом, пеленочным кандидозом, кандидозом желудочно-кишечного тракта или кандидозным баланитом.

Еще более предпочтительно, кандидоз слизистых оболочек является кандидозом полости рта или вульвовагинальным.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 визуально показаны результаты действия кремов от А до С примера 7, протестированных на чашке Петри, содержащей *Candida albicans*, штамм ATCC 10231, способом разведения в агаре, применяя от 1 до 0,03% мас./об. крема;

на фиг. 2 графически показаны результаты денситометрического анализа, выполненного на чашке Петри фиг. 1.

Подробное описание изобретения

В настоящем описании выражение "синергический эффект" означает, что комбинация бензидамина и имидазола-антимикотика ингибирует рост штамма грибов, относящихся к роду *Candida* в концентрации ниже, чем сумма концентраций бензидамина и антимикотика-имидазола, применяемого отдельно для того же штамма для получения аналогичного ингибирования. Другими словами, синергический эффект означает, что комбинация бензидамина и имидазола-антимикотика является эффективной в оказании более чем аддитивного эффекта каждого компонента одного и того же штамма.

Синергизм определен в данном документе в форме индекса фракционной ингибирующей концентрации (FIC), которая является суммой FIC отдельных препаратов, применяемых в каждой комбинации, как описано в Meletiadi J. et al., *Antibacterial Agents and Chemotherapy*, Feb. 2010, p. 602-609. В строго научном и предпочтительном определении, термин синергизм определяется индексом FIC меньше 0,5, например, когда 50% ингибирование получают от комбинации одной четвертой или меньше концентрации каждого препарата, необходимой для достижения того же эффекта, что при отдельном применении (например, минимальной ингибирующей концентрации (MIC) каждого препарата). Индекс FIC, равный 0,5, в данном узком смысле, означает аддитивную реакцию. В более широком смысле применяемые цели, определенных в данном документе, синергически эффективные количества определены индексом FIC меньше 1,0, например, когда 50% ингибирование получается от комбинации половины или меньше MIC каждого препарата. Индекс FIC, равный 1,0, в данном узком смысле, означает аддитивную реакцию. В рамках данного теста можно составить изоболограммы из кривых зависимости доза-эффект для различных комбинаций бензидамина и антимикотика-имидазола в каждом штамме, с синергизмом, отмеченным точками ниже линии, где линия соединяет индекс FIC, равный 1 для бензидамина с индексом FIC, равным 1 для антимикотика-имидазола. Данный стандарт позволяет определить MIC для тестируемых комбинаций, чтобы определить MIC каждого компонента, которому необходимо получить синергическую смесь. Точное количество зависит, например, от конкретного штамма.

В настоящем описании и в следующей формуле изобретения определение "имидазол-антимикотик" означает противогрибковые активные ингредиенты, содержащие кольцо имидазола в их химической структуре.

Предпочтительно, фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению содержит бензидамин в количестве по массе от 0,001 до 1 мас.%, более предпочтительно от 0,05 до 0,5 мас.% и еще более предпочтительно от 0,08 до 0,2 мас.%.

Предпочтительно, фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению содержит имидазол-антимикотик или его соль в количестве от 0,01 до 4 мас.%, более предпочтительно от 0,1 до 2 мас.% и еще более предпочтительно от 0,5 до 1,5 мас.%.

Предпочтительно, фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению предназначена для местного применения.

Предпочтительно, фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению приготовлена в виде подходящих дозированных форм, таких как кремы, мази, лосьоны, гели, пены, суппозитории, суппозитории пролонгированного высвобождения, препараты для вагинального спринцевания или растворы для наружного применения.

Более предпочтительно, указанной дозированной формой является крем, мазь, лосьон, препарат для

вагинального спринцевания или раствор для наружного применения.

Еще более предпочтительно, указанной дозированной формой является крем или препарат для вагинального спринцевания.

Фармацевтически приемлемый эксципиент может быть выбран их группы, содержащей смягчающие средства, загустители, консерванты, стабилизаторы, поверхностно-активные вещества, буферные растворы, соли для регулирования осмотического давления, эмульгаторы и т.п.

Предпочтительно, фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению содержит один или несколько эмульгаторов, имеющих показатель HLB в диапазоне от 6 до 9 и один или несколько эмульгаторов, имеющих показатель HLB в диапазоне от больше 9 до 12.

Эмульгаторами, имеющими показатель HLB в диапазоне от 6 до 9, пригодными для настоящего изобретения, являются, например, цетеариловый спирт, цетеарет-20, полиглицерил-3-диизостеарат, смесь сорбитана стеарата и кокоата сахарозы, ПЭГ-4 дилаурат, метилглюкозы сесквистеарат, лаурил-2, лаурил-3, ПЭГ-8 диолеат, полиглицерил-5-диолеат, натрия стеарилактат, сорбитана лаурат, лауроил макрогол-6 глицериды, ПЭГ-40 сорбитана перолеат, полиглицерил-3 стеарат, полиглицерил-2 лаурат.

Эмульгаторами, имеющими показатель HLB в диапазоне от больше 9 до 12, пригодными для настоящего изобретения, являются, например, лаурил-4, ПЭГ-7 глицерилкокоат, ПЭГ-20 миндальные глицериды, полиглицерил-3 пальмитат, ПЭГ-25 гидрогенизированное касторовое масло, стеарамид, смесь глицерилстеарата и ПЭГ-100 стеарата, полисорбат 85, ПЭГ-7 оливат, цетеарилгликозид, цетеарилоливат, глицерилмоностеарат, полиглицерил-10 диизостеарат, полисорбат 85, полиглицерил-5 олеат, ПЭГ-8 олеат, глицерилстеарата цитрат, ПЭГ-7 глицерилкокоат, полиглицерил-3 метилглюкозы дистеарат.

Конкретно, предпочтительными эмульгаторами, имеющими показатель HLB в диапазоне от больше 9 до 12, являются Tefose 63, смесь ПЭГ-6 и ПЭГ-32 пальмитостеарата и гликоля стеарата, и Gelot 64, смесь глицеролмоностеарата и ПЭГ-75 стеарата, оба производства Gattefossé SAS, France.

Конкретно, предпочтительными эмульгаторами, имеющими показатель HLB в диапазоне от 6 до 9, являются Labrafil M2130CS, смесь лауроил макрогол-6 глицеридов, и Labrafil M1944CS, смесь олеил полиоксил-6 глицеридов, оба производства Gattefossé SAS, France.

Приведенные далее примеры предназначены для дополнительной иллюстрации настоящего изобретения, в то же время не ограничивают его.

Примеры

Целью тестов, описанных в примерах 1-5, является оценка фунгицидной активности *in vitro* комбинации бензидамина и имидазола-антимикотика против штаммов грибов, относящихся к роду *Candida*.

Пример 1.

1.1. Приготовление грибковых штаммов.

Штаммы *Candida*, хранящиеся при температуре -80°C, разморозили и посеяли на питательную среду СДА и далее использовали вторую субкультуру. Затем приготовили суспензии штаммов *Candida* следующим образом.

10 мл раствора хлорида натрия поместили в 50 мл пробирку фирмы Falcon с 5 г стеклянных шариков. Петлю для посева клеток колоний второй субкультуры переместили в раствор хлорида натрия и суспендировали растиранием петли о влажную стенку пробирки для отделения клеток. Пробирку затем встряхивали в течение 3 мин, применяя механический встряхиватель.

Число клеток в суспензии довели с $1,5 \times 10^6$ до $5,0 \times 10^6$ колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл, применяя раствор хлорида натрия, согласно стандарту Mc Farland standard No.0.5 и считывая оптическую плотность при 550 нм.

Для подсчета приготовили серию разведений 1:10, применяя раствор хлорида натрия для получения 10^{-4} и 10^{-5} разведений суспензии. Образец в 100 мкл каждого разведения посеяли поверхностным методом и инкубировали при 37°C в течение 48 ч. Число колоний подсчитали при визуальном осмотре и установили, что плотность клеток соответствует необходимому диапазону.

1.2. Способ разведения в агаре.

Методика была та же, что в R. Moody et al., "In Vitro Activities of Miconazole, Miconazole Nitrate, and Ketokonazole Alone and Combined with Rifampin against *Candida* spp. and *Torulopsis glabrata* Recovered from Cancer Patients", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*: 1980, 17, 871-875.

1.2.1. Приготовление растворов активных ингредиентов.

Были применены стандартные чашки Петри (диаметр 92 мм × высота 16 мм). После налива агара чашкам дали остыть и затем сразу применили.

(А) Растворы, примененные для вычисления МИС активных ингредиентов, приготовили, как описано далее в документе.

Эконазола нитрат и миконазола нитрат каждый растворили в 100% диметилсульфоксиде (DMSO) до концентраций в 5,0 активного препарата на мл. Затем, приготовили серию разведений 1:2 в DMSO до концентраций от 5,0 до 0,078 мг/мл. 0,250 мл каждого раствора эконазола или миконазола нитрата добавили к 24,75 мл (1:100 разведение) жидкого агара Сабуро (Difco Laboratoires, Detroit, Mich), перемешали и налили в стандартные чашки Петри, до окончательной концентрации от 50 до 0,78 мкг/мл.

Бензидамин растворили в воде до концентрации 12,5 мг/мл. Затем, приготовили серию разведений 1:2 в воде, до концентраций от 12,5 до 1,56 мг/мл. 1 мл каждого раствора бензидамина добавили к 24 мл (1:25 разведение) жидкого агара Сабуро, перемешали, и налили в стандартные чашки Петри, до окончательной концентрации от 0,5 до 0,0625 мг/мл.

В качестве положительной контрольной пробы, Амфотерицин В из базового раствора в 1600 мкг/мл развели в DMSO до растворов, имеющих концентрации от 50 до 6,25 мкг/мл. Данные растворы развели в пропорции 1:100 в агаре Сабуро, перемешали и налили в стандартную чашку Петри до окончательной концентрации от 0,5 до 0,0625 мкг/мл.

Отрицательные контрольные пробы воды, DMSO и воды+DMSO включили в эксперимент.

(В) Для изучения синергизма, дополнительные растворы эконазола и миконазола нитрата, имеющие концентрации от 2,5 до 0,098 мг/мл приготовили в DMSO, с серией разведений 1:2, как раскрыто в параграфе 1.2.1(A).

Также, дополнительные растворы бензидамина, имеющие концентрации от 6,25 до 1,56 мг/мл приготовили в воде, с серией разведений 1:2, как раскрыто в параграфе 1.2.1(A). Кроме того, раствор бензидамина с концентрацией 6,25 мг/мл развели в пропорции 1:1,43 в воде, чтобы придать раствору бензидамина значение концентрации 4,37 мг/мл.

Затем, 0,250 мл каждого раствора эконазола или миконазола нитрата и 1 мл каждого раствора бензидамина добавили к 23,750 мл жидкого агара Сабуро (Difco Laboratoires, Detroit, Mich), перемешали и налили в стандартную чашку Петри, тем самым получив в результате концентрации эконазола или миконазола от 25 до 0,098 мкг/мл и бензидамина от 0,25 до 0,0625 мг/мл и 0,175 мг/мл.

1.2.2. Тест на чувствительность.

(А) Для вычисления MIC поверхность каждой стандартной чашки Петри, приготовленной, как описано в параграфе 1.2.1(A), засеяли четырьмя пятнами (20 мкл объема посевного материала) суспензий штаммов *Candida*, приготовленными, как описано в параграфе 1.1.

Тестируемые суспензии, посеянные в стандартную чашку Петри с амфотерицином В, применили в качестве положительной контрольной пробы.

Тестируемые суспензии, посеянные в стандартную чашку Петри без препаратов, но содержащую воду, DMSO и воду+DMSO, применили в качестве отрицательных контрольных проб.

Все чашки Петри инкубировали при 35°C в течение 48 ч.

(В) Для изучения синергизма поверхность каждой чашки Петри, приготовленную, как описано в параграфе 1.2.1(B), засеяли четырьмя пятнами (20 мкл объема посевного материала) суспензий штаммов *Candida*, приготовленными, как описано в параграфе 1.1, и инкубировали при 35°C в течение 48 ч.

1.3. Способ разведения в жидкой питательной среде.

Методика, применяемая для способа разведения в жидкой питательной среде, была похожа на раскрытую в "EUCAST Definitive Document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts" (Clin. Microbiol. Infect., 2008; 14: 398-408).

1.3.1. Приготовление растворов активных ингредиентов.

(А) Растворы, примененные для вычисления MIC активных ингредиентов, приготовили, как описано далее в документе.

Эконазола нитрат и миконазола нитрат, каждый растворили в 100% диметилсульфоксиде(DMSO) до концентраций 10,0 мг активного препарата на мл. Затем, приготовили серию разведений 1:2 в DMSO, до концентраций от 10,0 до 0,078 мг/мл. Данные растворы дополнительно развели в пропорции 1:100 в RPMI-1640 (GiBCO®, Life Technologies), содержащем 2% глюкозу, 3-(N-морфолино) пропансульфоновую кислоту (MOPS, SIGMA) без NaHCO₃, до окончательной концентрации от 100 до 0,78 мкг/мл.

Клотримазола нитрат растворили в 100% диметилсульфоксиде (DMSO) до концентраций 1,250 мг активного препарата на мл. Затем приготовили серию разведений 1:2 в DMSO, до концентраций от 1,250 до 0,0196 мг/мл. Данные растворы дополнительно развели в пропорции 1:100 в RPMI-1640 (GiBCO®, Life Technologies), содержащем 2% глюкозу, 3-(N-морфолино) пропансульфоновую кислоту (MOPS, SIGMA) без NaHCO₃, до окончательной концентрации от 12,50 до 0,196 мкг/мл.

Флуконазола нитрат растворили в 100% диметилсульфоксиде (DMSO) до концентраций 5,0 мг активного препарата на мл. Затем приготовили серию разведений 1:2 в DMSO, до концентраций от 5,0 до 0,3125 мг/мл. Данные растворы дополнительно развели в пропорции 1:100 в RPMI-1640 (GiBCO®, Life Technologies), содержащем 2% глюкозу, 3-(N-морфолино) пропансульфоновую кислоту (MOPS, SIGMA) без NaHCO₃, до окончательной концентрации от 50 до 3,125 мкг/мл.

Бензидамин растворили в воде до концентрации 25 мг/мл. Затем приготовили серию разведений 1:2 в воде, до концентраций от 25 до 3,125 мг/мл. 1 мл каждого раствора добавили к 24 мл (1:25 разведение) RPMI-1640 (GiBCO®, Life Technologies) содержащего 2% глюкозу, 3-(N-морфолино) пропансульфоновую кислоту (MOPS, SIGMA) без NaHCO₃, до окончательной концентрации от 1 до 0,125 мг/мл.

В качестве положительной контрольной пробы Амфотерицин В из базового раствора в 1600 мкг/мл развели в DMSO до растворов, имеющих концентрации от 200 до 50 мкг/мл. Данные растворы развели в пропорции 1:100 в RPMI-1640 (GiBCO®, Life Technology), содержащем 2% глюкозу, 3-(N-морфолино)

пропансульфоновую кислоту (MOPS, SIGMA) без NaHCO_3 , до концентраций от 2 до 0,5 мкг/мл.

Отрицательные контрольные пробы воды, DMSO и воды+DMSO включили в эксперимент.

(В) Для изучения синергизма дополнительные растворы эконазола, миконазола, клотримазола и флуконазола нитрата, имеющие концентрации от 100 до 0,049 мкг/мл, приготовили в RPMI-1640, как раскрыто в параграфе 1.3.1(А).

Также, дополнительные растворы бензидамина, имеющие концентрации от 1 до 0,25 мг/мл приготовили в RPMI-1640, как раскрыто в параграфе 1.3.1 (А). Кроме того, раствор бензидамина с концентрацией 1 мг/мл дополнительно развели в пропорции 1:1,43 с RPMI-1640 до концентрации 0,7 мг/мл.

1.3.2. Тест на чувствительность.

Были применены чашки с микроразведением, содержащие лунки с номинальной емкостью около 300 мкл/лунку.

Суспензии штаммов *Candida*, приготовленные, как описано в параграфе 1.1, вырастили на агаровой среде Сабуро SDA (Oxoid). Колонии развели в фосфатном буфере раствора хлорида натрия (PBS) и суспензии довели до приблизительно $1-5 \times 10^5$ КОЕ/мл, применяя Mc Farland 0.5 стандарт и считывая оптическую плотность при 550 нм.

Стандартный посевной материал приготовили суспендированием отдельных колоний из второй субкультуры штаммов *Candida*, чтобы получить оптическую плотность, сходную со стандартом Мак-Фарланда 0,5 (около $1-5 \times 10^5$ КОЕ/мл).

(А) Для вычисления МИС приготовили чашки с микроразведением, содержащим в каждой лунке 100 мкл каждого раствора активных ингредиентов, полученных как описано в параграфе 1.3.1(А). Лунки затем засеяли 100 мкл суспензии штамма *Candida*, полученной как раскрыто выше, содержащей $1-5 \times 10^5$ КОЕ/мл.

В каждой лунке окончательная плотность посевного материала и окончательная концентрация активных ингредиентов была половиной примененной (например, окончательная плотность посевного материала была $0,5-2,5 \times 10^5$ КОЕ/мл, концентрация эконазола и миконазола была от 50 до 0,39 мкг/мл, концентрация клотримазола была от 6,25 до 0,098 мкг/мл, концентрация флуконазола была от 50 до 3,125 мкг/мл и концентрация бензидамина была от 0,5 до 0,0625 мг/мл).

Лунки, содержащие 100 мкл амфотерицина В, засеянного с 100 мкл той же суспензии *Candida*, применили в качестве положительной контрольной пробы.

Лунки, содержащие 100 мкл воды, DMSO и воды+DMSO и стерильной, не содержащей лекарственных препаратов среды, засеяли с 100 мкл той же суспензии *Candida*, применили в качестве отрицательной контрольной пробы.

Чашки с микроразведением инкубировали в течение 48 ч при 35°C.

(В) Для изучения синергизма приготовили чашки с микроразведением, содержащие в каждой лунке 50 мкл каждого раствора эконазола и миконазола и 50 мкл каждого раствора бензидамина, полученного как раскрыто в параграфе 1.3.1(В). Затем, лунки засеяли с 100 мкл $1-5 \times 10^5$ КОЕ/мл суспензии *Candida*. В каждой лунке окончательная плотность посевного материала была половиной использованной (например, $0,5-2,5 \times 10^5$ КОЕ/мл) и окончательная концентрация активных ингредиентов была четвертой частью примененной (например, концентрация эконазола и миконазола была от 25 до 0,098 мкг/мл, концентрация клотримазола была от 0,78 до 0,049 мкг/мл, концентрация флуконазола была от 25 до 3,125 мкг/мл и концентрация бензидамина была от 0,25 до 0,0625 мг/мл и 0,175 мг/мл).

Чашки с микроразведением инкубировали в течение 48 ч при 35°C.

1.4. Вычисление МИС.

Самая низкая концентрация препарата, производящая полное ингибирование роста для определенных штаммов *Candida*, считается минимальной ингибирующей концентрации (МИС) для штамма.

Значение МИС для *C.lusitanae* ATCC® 34449 получили способом разведения в агаре, раскрытым в параграфе 1.2.

Значения МИС для *C.albicans* ATCC® MYA-427, *C.tropicalis* ATCC® 750, *C.albicans* ATCC® 10231, и *C.albicans* ATCC® MYA-574 флуконазол резистентных, были получены способом разведения в жидкой питательной среде, раскрытым в параграфе 1.3.

Значения МИС эконазола нитрата, миконазола нитрата, клотримазола нитрата, флуконазола нитрата и бензидамина для тестируемых штаммов *Candida* приведены в следующей табл.1.

Таблица 1

Активный ингредиент	Штаммы <i>Candida</i>				
	<i>C. lusitaniae</i> ATCC® 34449	<i>C. albicans</i> ATCC® MYA-427	<i>C. tropicalis</i> ATCC® 750	<i>C. albicans</i> ATCC® 10231	<i>C. albicans</i> ATCC® MYA-574 Флуконазол резистентный
Эконазола нитрат (мкг/мл)	1,56	25	12,5	25	25
Миконазола нитрат (мкг/мл)	-	25	6,25	6,25	50
Клотримазола нитрат (мкг/мл)	-	-	6,25	0,025	-
Флуконазола нитрат (мкг/мл)	-	-	50	3,125	-
Бензидамин (мг/мл)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Амфотерицин В (мкг/мл)	-	-	-	0,5	-
Вода	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
DMSO	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
Вода+DMSO	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о

Вода, DMSO и вода+DMSO, примененные в качестве отрицательных контрольных проб, показали отсутствие ингибирующего эффекта (не обнаружен (н/о)).

1.5. Синергический эффект.

Фунгицидную активность комбинации бензидамина и эконазола нитрата оценили, противопоставив *C. lusitaniae* ATCC® 34449 на агаре Сабуро, способом разведения в агаре, раскрытым в параграфе 1.2.

Синергический эффект комбинаций, содержащих бензидамин и эконазола нитрат оценили вычислением фракционной ингибирующей концентрации (FIC), согласно Meletiadis J. et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Feb. 2010, p. 602-609.

Значения FIC сравнили противогрибковую активность комбинации, содержащей бензидамин и эконазола нитрат с противогрибковой активностью каждого из активных ингредиентов, протестированных отдельно.

Значения FIC для комбинаций, содержащих бензидамин и эконазола нитрат ($FIC_{[комбинация\ b+e]}$), вычислили для каждого штамма *Candida*, применив следующее уравнение:

$$FIC_{[комбинация\ b+e]} = FIC_{[b]} + FIC_{[e]}$$

где $FIC_{[b]}$ является фракционной ингибирующей концентрацией бензидамина относительно конкретного штамма *Candida*, вычисленной как отношение MIC бензидамина в присутствии суб-MIC количества эконазола ($MIC_{(b+e)}$) и отдельно MIC бензидамина ($MIC_{(b)}$), следующим образом:

$$FIC_{(b)} = \frac{MIC(b+e)}{MIC(b)}$$

$FIC_{[e]}$ является фракционной ингибирующей концентрацией эконазола в отношении конкретного штамма *Candida*, вычисленной как отношение между MIC эконазола в присутствии суб-MIC количества бензидамина ($MIC_{(e+b)}$) и отдельно MIC эконазола ($MIC_{(e)}$), следующим образом:

$$FIC_{(e)} = \frac{MIC(e+b)}{MIC(e)}$$

Синергизм определили как FIC ниже 0,5 согласно Meletiadis J. et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Feb. 2010, p. 602-609.

Таблица 2

		концентрация бензидамина (мг/мл)			
		0,25	0,175	0,125	0,0625
концентрация эконазола нитрата (мкг/мл)	0,78	нет роста	нет роста	нет роста	Р
	0,39	нет роста	нет роста	нет роста	-
	0,195	нет роста	нет роста	нет роста	-
	0,098	нет роста	Р	Р	-

В приведенной выше таблице буква "Р" обозначает обнаруженный рост *S.lusitaniae* ATCC® 34449. FIC комбинации бензидамина и эконазола нитрата ($FIC_{\text{комбинация b+c}}$) вычислили с помощью уравнения, раскрытого выше:

$$FIC_{[b]} = 0,125/0,5=0,25;$$

$$FIC_{[c]} = 0,098/1,56=0,0628;$$

$$FIC_{\text{комбинация b+c}} = 0,0628 + 0,25=0,3128.$$

Приведенные выше результаты показали, что, когда активные ингредиенты бензидамина и эконазола нитрата были связаны с суб-MIC концентрациями, наблюдалась синергическая фунгицидная активность, противопоставленная *S.lusitaniae* ATCC® 34449.

Следующие примеры от 2 до 5 суммируют результаты, полученные для других штаммов *Candida*.

Пример 2.

Фунгицидная активность бензидамина и эконазола или миконазола нитрата были определены относительно *S.Albicans* ATCC® MYA-427 в RPMI-1640 способом разведения в питательной среде, раскрытым в параграфе 1.3.

Результаты приведены в табл.3.

Таблица 3

		концентрация бензидамина (мг/мл)	
		0,125	
концентрация эконазола нитрата (мкг/мл)	3,12	нет роста	
	5	нет роста	
	1,56	нет роста	
	0,78	Р	
концентрация миконазола нитрата (мкг/мл)	3,12	нет роста	
	5	нет роста	
	1,56	нет роста	
	0,78	нет роста	
	0,39	Р	

Р - обнаружен рост.

Приведенные выше данные ясно показывают, что комбинация с бензидамином позволила уменьшить MIC эконазола нитрата с 25 мкг/мл, как показано в табл.1, до 1,56 мкг/мл и MIC миконазола нитрата с 25 мкг/мл, как показано в табл.1, до 0,78 мкг/мл.

Пример 3.

Фунгицидная активность бензидамина и эконазола или миконазола нитрата определили относительно *S.Tropicalis* ATCC® 750 в RPMI-1640 способом разведения в питательной среде, раскрытым в параграфе 1.3.

Результаты приведены в табл.4.

Таблица 4

		концентрация бензидамина (мг/мл)
		0,175
концентрация эконазола нитрата (мкг/мл)	1,56	нет роста
	0,78	Р
	0,39	Р
концентрация миконазола нитрата (мкг/мл)	0,78	нет роста
	0,39	Р
	0,19 5	Р

Р - обнаружен рост.

Приведенные выше данные ясно показывают, что комбинация с бензидамином позволила уменьшить МІС эконазола нитрата с 12,5 мкг/мл, как показано в табл.1, до 1,56 мкг/мл и МІС миконазола нитрата с 6,25 мкг/мл, как показано в табл.1, до 0,78 мкг/мл.

Пример 3а.

Фунгицидная активность бензидамина и клотримазола или флуконазола нитрата была определена относительно *S.Tropicalis* ATCC® 750 в RPMI-1640 способом разведения в питательной среде, раскрытым в параграфе 1.3.

Результаты приведены в табл.4а.

Таблица 4а

		концентрация бензидамина (мг/мл)
		0,175
концентрация	0,390	нет роста
	0,195	нет роста
клотримазол а нитрата (мкг/мл)	0,098	нет роста
	0,049	Р
концентрация флуконазола нитрата (мкг/мл)	25	нет роста
	12,5	нет роста
	6,25	нет роста
	3,13	Р

Р - обнаружен рост.

Приведенные выше данные ясно показывают, что комбинация бензидамина позволила уменьшить МІС клотримазола нитрата от 6,25 мкг/мл, как показано табл.1, до 0,098 мкг/мл и МІС флуконазола нитрата от 50 мкг/мл, как показано в табл.1, до 6,25 мкг/мл.

Значение FIC для комбинации бензидамина и клотримазола нитрата ($FIC_{[комбинация\ b+c]}$), вычисленное с помощью уравнения, раскрытого выше, составило 0,37.

Значение FIC для комбинации бензидамина и флуконазола нитрата ($FIC_{[комбинация\ b+f]}$), вычисленное с помощью уравнения, раскрытого выше, составило 0,48.

Пример 4.

Фунгицидная активность бензидамина и эконазола или миконазола нитрата, вычисленная относительно *S.Albicans* ATCC® 10231 в RPMI-1640, способом разведения в питательной среде, раскрыта в

параграфе 1.3.

Результаты приведены в табл.5.

Таблица 5

		концентрация бензидамина (мг/мл)	
		0,125	
концентрация	6,25	нет роста	
эконазола нитрата (мкг/мл)	3,12	нет роста	
	5	Р	
концентрация	3,12	нет роста	
	5	нет роста	
миконазола нитрата (мкг/мл)	1,56	нет роста	
	0,78	Р	

Р - обнаружен рост.

Приведенные выше данные ясно показывают, что комбинация с бензидамином позволила уменьшить МИС эконазола нитрата с 25 мкг/мл, как показано в табл.1, до 3,125 мкг/мл и МИС миконазола нитрата с 6,25 мкг/мл, как показано в табл.1, до 1,56 мкг/мл.

Пример 5.

Фунгицидная активность бензидамина и эконазола или миконазола нитрата была определена относительно флуконазол-резистентного *S.Albicans* ATCC® MYA-574 в RPMI-1640 способом разведения в питательной среде, раскрытым в параграфе 1.3.

Результаты приведены в табл.6.

Таблица 6

		концентрация бензидамина (мг/мл)		
		0,25	0,125	0,0625
концентрация эконазола нитрата (мкг/мл)	12,5	нет роста	нет роста	-
концентрация миконазола нитрата (мкг/мл)	25	нет роста	нет роста	нет роста
	12,5	нет роста	нет роста	-

Р - обнаружен рост.

Приведенные выше данные ясно показывают, что комбинация с бензидамином позволила уменьшить МИС эконазола нитрата с 25 мкг/мл, как показано в табл.1, до 12,5 мкг/мл и МИС миконазола нитрата от 50 мкг/мл, как показано в табл.1, до 12,5 мкг/мл.

Также МИС бензидамина был уменьшен с 0,5 мг/мл, как показано в табл.1, до 0,125 мг/мл в случае комбинации с эконазолом и до 0,0625 мг/мл в случае комбинации с миконазолом.

Пример 6.

Следующая табл.7 показывает состав из трех фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению в форме крема для местного нанесения. Все значения были выражены в процентах по массе относительно общего содержания препарата.

Таблица 7

Ингредиенты	Количество (% масс/масс)		
	F1	F2	F3
Пропилгаллат	0,1	-	0,1
ЭДТА	0,1	-	0,1
Miglyol 812	3	3	-
Парафиновое масло	-	-	3
Compritol 888 АТО	-	2	-
Gelot 64	-	12	-
Tefose 63	18	-	18
Labrafil M1944CS	-	-	3
Labrafil M2130CS	3	3	-
Бензидамина гидрохлорид	0,12	0,12	0,12
Эконазола нитрат	1	1	1
Вода дост. кол-во	100	100	100

Miglyol 812: каприловый/каприевый триглицерид (Sasol Olefin & Surfactants GmbH, Germany).

Compritol 888АТО: глицерила бегенат (Gattefossé SAS, France).

Gelot 64: смесь глицеролмоностеарата и ПЭГ-75 стеарата HLB 10 (Gattefossé SAS, France).

Tefose 63: ПЭГ-6 и ПЭГ-32 пальмитостеарата/гликоля стеарат - HLB 10 (Gattefosse SAS, France).

Labrafil M1944CS: олеилполиоксил-6 глицериды - HLB 9 (Gattefosse SAS, France).

Labrafil M2130CS: лаурилмакрогол-6 глицериды - HLB 9(Gattefosse SAS, France).

Состав крема F1 протестировали на определение высвобождения активных веществ через восемь часов после нанесения.

Эксперименты на диффузионных ячейках Франца были применены для анализа *in vitro* величин трансдермального поступления бензидамина гидрохлорида через мембрану субстрата. Диффузионные ячейки Франца являются стандартным и хорошо известным способом измерения величин трансдермального поступления. Основная методика с ячейками Франца описана в Franz T.J., Percutaneous absorption: on the relevance of *in vitro* data. J. Invest. Derm., 64:190-195 (1975). Приведенное ниже является методологией, примененной в настоящем примере.

Применили Мембрану регенерированной целлюлозы с пористостью 0,45 мкм. Перед применением мембрану обработали с NaCl 0,9% мас./об. раствора с целью удаления воздуха из пор.

Контактная поверхность мембраны с продуктом составила 0,6 см². Полученную камеру термостатировали при 37°C. Один грамм состава крема 1 нанесли на мембрану донорской камеры. Каждый час в течение 8 ч 0,3 мл NaCl 0,9% мас./об. полученного раствора извлекали и заменяли свежим раствором.

Отобранные образцы протестировали с применением ВЭЖХ способа.

О результатах сообщили, как только накопилось количество активного ингредиента высвободилось на единицу площади в зависимости от времени. Результаты теста приведены в следующей табл.8.

Таблица 8

Время (час)	Высвобождение активного ингредиента (мкг/см ²)
0	0
1	5,40
2	8,00
3	10,13
4	12,04
5	13,41
6	14,90
7	16,50
8	17,40

Пример 7.

Анти-Candida активность состава крема настоящего изобретения, содержащего те же ингредиенты крема F1 табл.7 (крем А), протестировали по сравнению с активностью Revaryl® крема, имеющегося на рынке, содержащего 1% только эконазола нитрата (крем В) и плацебо (крем С).

Штамм *Candida albicans* ATCC 10231 применили для изучения противогрибковых свойств кремов от А до С и, в частности, чтобы дополнительно подтвердить, что присутствие бензидамина влияет на фунгицидную активность эконазола.

По этой причине способ разведения в агаре составили согласно Asterholm et al. (*Acta Derm. Venereol.*, 2010; 90: 239-245), таким образом, что состав крема можно протестировать. Вследствие технической необходимости крема развели в агаре таким образом, что окончательные концентрации кремов были в диапазоне от 0,03 до 1% (мас./об.).

Как сообщается на фиг. 1 и 2, визуальное изучение и денситометрический анализ чашек подтвердил, что присутствие бензидамина увеличило фунгицидную активность эконазола.

Фактически, данные денситометрического анализа показали, что данная четырехкратная концентрация крема А была достаточна для получения снижения роста такого же, как для крема В.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая синергическую комбинацию бензидамина и имидазола-антимикотика, выбранного из группы, содержащей бутоконазол, клотримазол, эконазол, кетоконазол, миконазол, сертаконазол или их соли, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент для применения в лечении микоза, вызванного *Candida*.

2. Фармацевтическая композиция для применения по п.1, где имидазол-антимикотик является эконазолом, миконазолом или их солью.

3. Фармацевтическая композиция для применения по п.1, где микоз, вызванный *Candida*, вызван видами *Candida*, выбранными из группы, состоящей из *Candida Albicans*, *Candida lusitaniae*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida rugosa*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* и *Candida dubliniensis*.

4. Фармацевтическая композиция для применения по п.3, где микоз, вызванный *Candida*, является кандидозом слизистых оболочек, кандидозом кожи, онихомикозом, системным кандидозом, ятрогенным кандидозом, пеленочным кандидозом, кандидозом желудочно-кишечного тракта или кандидозным баланитом.

5. Фармацевтическая композиция для применения по п.4, где кандидоз слизистых оболочек является кандидозом полости рта или вульвовагинальным.

6. Фармацевтическая композиция для применения по любому из пп.1-5, предназначенная для наружного применения.

7. Фармацевтическая композиция для применения по любому из пп.1-6, представленная в форме крема, мази, лосьона, геля, пены, суппозитория, суппозитория с замедленным высвобождением, препарата для вагинального спринцевания или раствора для наружного применения.

8. Фармацевтическая композиция для применения по п.7, представленная в форме крема, мази, лосьона, препарата для вагинального спринцевания или раствора для наружного применения.

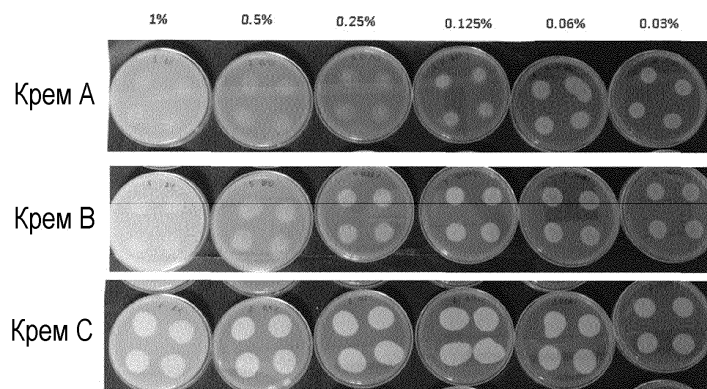
9. Фармацевтическая композиция для применения по п.8, представленная в форме крема или препарата для вагинального спринцевания.

10. Фармацевтическая композиция для применения по любому из пп.1-9, где бензидамин присутствует в количестве по массе от 0,001 до 1 мас.%, предпочтительно от 0,05 до 0,5 мас.% и более предпоч-

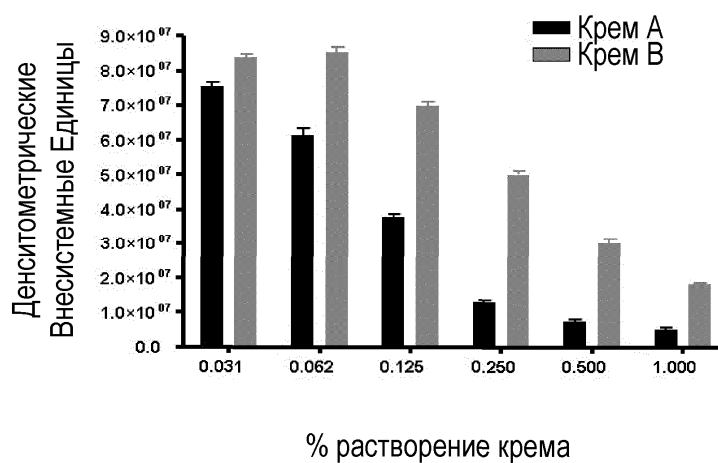
тительно от 0,08 до 0,2 мас. %.

11. Фармацевтическая композиция для применения по любому из пп.1-9, где имидазол-антимикотик или его соль присутствует в количестве от 0,01 до 4 мас.%, предпочтительно от 0,1 до 2 мас.% и более предпочтительно от 0,5 до 1,5 мас. %.

12. Фармацевтическая композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, представленная в форме крема, содержащего один или несколько эмульгаторов, имеющих показатель HLB в диапазоне от 6 до 9, и один или несколько эмульгаторов, имеющих показатель HLB в диапазоне от больше 9 до 12.



Фиг. 1



Фиг. 2