

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036853**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.12.28

(21) Номер заявки
201700466

(22) Дата подачи заявки
2017.05.25

(51) Int. Cl. *A61K 31/409* (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01)
A61K 47/32 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ

(43) 2018.11.30

(96) 2017/EA/0033 (BY) 2017.05.25

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ФЕДОРУК СЕРГЕЙ ЛЕОНИДОВИЧ
(BY)

(72) Изобретатель:
Федорук Сергей Леонидович,
Трухачева Татьяна Викторовна,
Фроленков Константин
Александрович (BY)

(56) ФЕДОРУК С.Л. и др.
Сравнение устойчивости в стрессовых условиях
лекарственных средств на основе хлоринов.
Международный научно-практический журнал
для фармацевтов и врачей, 24.10.2016, т. 19, № 5,
сс. 576-591, сс. 577-580, "Материалы и методы"
RU-A-2005140680

(57) Фармацевтическая композиция для фотодинамической терапии состоит из диметилового эфира хлорина е6, поливинилпирролидона и этаноламина при следующем соотношении компонентов: диметиловый эфир хлорина е6 : поливинилпирролидон : этаноламин в массовых частях 1: (1-10): (0,1-1). Новизной изобретения является наличие признаков того, что в качестве производного хлорина е6 содержит диметиловый эфир хлорина е6 с поливинилпирролидоном и этаноламином и их соотношение.

B1

036853

036853

B1

Фармацевтическая композиция

Изобретение относится к фармацевтической промышленности и касается новых фармацевтических композиций, содержащих хлорины и их производные и предназначенных для использования в медицине для фотодинамической терапии и/или флуоресцентной диагностики, а также фотохимического потенцирования накопления веществ.

Изобретение представляет собой фармацевтическую композицию, включающую диметиловый эфир хлорина е6, моно- или ди- или триэтаноламин и поливинилпирролидон (ПВП). Более точно, изобретение касается новой композиции диметилового эфира хлорина е6, низкомолекулярного поливинилпирролидона и моноэтаноламина.

Фотодинамическая терапия предполагает системное или местное введение фотосенсибилизатора, который должен селективно накапливаться в патологической ткани человека или животного. При облучении светом определенной длины волны этих участков тканей фотосенсибилизатор (ФС) генерирует образование цитотоксических частиц, разрушающих патологические ткани. Повреждение и гибель клеток под воздействием цитотоксических частиц по механизму некроза или апоптоза приводит к нарушению функциональных систем патологической ткани и ее разрушению. В то же время, индуцированная излучением флуоресценция ФС используется в качестве чувствительного метода обнаружения участков тела, аномальных по структурно-функциональному состоянию или процессам жизнедеятельности, среди которых доброкачественные и злокачественные новообразования, ткани с воспалительными процессами и т.д.

В настоящее время известен ряд фотосенсибилизаторов на основе хлоринов, например, хлорин е6 (1) и его производные(2).

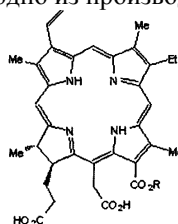
ФС данной группы имеют ряд преимуществ:

большую глубину проникновения возбуждающего излучения в ткани, поскольку максимум поглощения хлоринов лежит вблизи окна прозрачности биологической ткани (650-680 нм);

более высокий уровень накопления ФС в опухолевых тканях; более оптимальные фармакокинетические характеристики препарата в организме - хлорин е6 быстро накапливается в опухоли и практически полностью выводится из организма в течение нескольких дней, т.е. фототоксичность проявляется в значительно меньшей степени, чем для гематопорфиринов;

препараты на основе хлоринов обладают выраженной фотодинамической активностью.

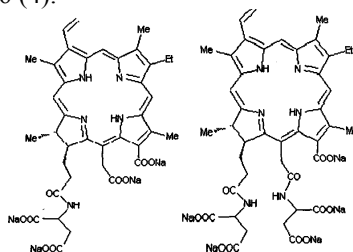
Известны ФС [2] представляющие собой одно из производных хлорина е6(2)



где R может быть остатком иминодиуксусной, N-метил-глутаминовой, N-метил-(D,L)-аспарагиновой, иминодипропионовой кислот; транс-4-гидрокси-L-пролина, α-сульфо-β-аланина, N-метил-L-серина, N-метил-L-треонина и др.

Недостатком данного ФС является трудоемкость получения хлорина Е6 с селективно присоединенным остатком аминокислоты по одной из карбоксильных групп, которое вынуждает использовать трудоемкие и дорогие методы для удаления сопутствующих примесей.

Известен ФС [3] представляющий собой натриевую соль моно-L-аспартил хлорина Е6 (3) либо натриевую соль ди-L-аспартил хлорина Е6 (4).



Недостатком данных ФС является их слабая стабильность при хранении.

За прототип заявляемой фармацевтической композиции взято лекарственное средство Фотолон, которое представляет собой хлорин е6 в виде натриевой соли в комплексе с низкомолекулярным поливинилпирролидоном. Прототип обладает рядом преимуществ: быстрое и избирательное накопление в опухолевой ткани, высокая терапевтическая эффективность, практически полное выведение препарата в течение суток из крови, короткий период повышенной кожной фототоксичности. Однако применение прототипа ограничивается его ограниченными возможностями в фотодинамической терапии и слабой стабильностью при воздействиях повышенной температуры, света, что влечет за собой более сложные усло-

вия хранения.

Целью данного изобретения является создание фармацевтической композиции, обладающей высокой фото- и термостабильностью, хорошей растворимостью в воде и биологических средах, способностью эффективно продуцировать активные частицы, вызывающие разрушение патологической ткани, низкой фототоксичностью.

Поставленная задача решается путем включения в состав фармацевтической композиции производного хлорина еб диметилового эфира хлорина еб, а в качестве вспомогательных веществ, наряду с поливинилпирролидоном, дополнительно этаноламин. Компоненты включают при следующем соотношении в массовых частях (мас.ч.): диметиловый эфир хлорина еб : поливинилпирролидон : этаноламин - 1 : (1-10) : (0,1-1). Включение в фармацевтическую композицию фотосенсибилизатора диметилового эфира хлорина еб, поливинилпирролидона и этаноламина осуществляется впервые.

Проведено сравнительное исследование растворимости диметилового эфира хлорина еб и хлорина еб. Условия эксперимента соответствовали требованиям ГФ РБ. В результате получили данные, которые показывают большую гидрофобность диметилового эфира хлорина еб по сравнению с хлорином еб. Введение ПВП в качестве вспомогательного вещества несколько повышает растворимость, но этого не достаточно. В процессе исследований авторами неожиданно выявлено, что включение этаноламина приводит к существенному повышению растворимости и, кроме того, способствует повышению стабильности композиции.

Фармацевтическую композицию получают следующим образом.

Пример 1.

Навески диметилового эфира хлорина еб массой 1.0 г (1 мас.ч.), поливинилпирролидона (10000 Да) массой 1.0 г (1 мас.ч.), моноэтаноламина массой 0.1 г (0.1 мас.ч.) растворяют при перемешивании в 0.5 л спирта этилового при перемешивании в течение 20 мин. Упаривают из раствора спирт этиловый на ротторной испарителе под вакуумом на водяной бане при 37°C. После полного выпаривания спирта этилового, восстанавливают раствором водой объемом 0.5 л. В результате образуется раствор промежуточной субстанции, содержащей диметиловый эфир хлорина еб, поливинилпирролидон и моноэтаноламин. Затем полученный раствор подвергают стерилизующей фильтрации, замораживанию и лиофильно высушивают. ФС с массовым соотношением диметилового эфира хлорина еб, поливинилпирролидона и моноэтаноламина 1:1:0.1 готов к применению.

Пример 2.

Навески диметилового эфира хлорина еб массой 1.0 г (1 мас.ч.), поливинилпирролидона (10000 Да) массой 10.0 г (10 мас.ч.), этаноламина массой 0.1 г (0.1 мас.ч.) растворяют при перемешивании в 0.5 л спирта этилового при перемешивании в течение 30 мин. Упаривают из раствора спирт этиловый на ротторной испарителе под вакуумом на водяной бане при 37°C. После полного выпаривания спирта этилового восстанавливают раствор водой объемом 0.5 л. В результате образуется раствор промежуточной субстанции, содержащей диметиловый эфир хлорина еб, поливинилпирролидон и моноэтаноламин. Затем полученный раствор подвергают стерилизующей фильтрации, замораживанию и лиофильно высушивают. ФС с массовым соотношением диметилового эфира хлорина еб, поливинилпирролидона и моноэтаноламина 1:10:0.1 готов к применению.

Пример 3.

Навески диметилового эфира хлорина еб массой 1.0 г (1 мас.ч.), поливинилпирролидона (10000 Да) массой 1.0 г (1 мас.ч.), моноэтаноламина массой 1.0 г (1 мас.ч.) растворяют при перемешивании в 0.5 л спирта этилового при перемешивании в течение 20 мин. Упаривают из раствора спирт этиловый на ротторной испарителе под вакуумом на водяной бане при 37°C. После полного выпаривания спирта этилового восстанавливают раствор водой объемом 0.5 л. В результате образуется раствор промежуточной субстанции, содержащей диметиловый эфир хлорина еб, поливинилпирролидон и моноэтаноламин. Затем полученный раствор подвергают стерилизующей фильтрации, замораживанию и лиофильно высушивают. ФС с массовым соотношением диметилового эфира хлорина еб, поливинилпирролидона и моноэтаноламина 1:1:1 готов к применению.

Заявляемая фармацевтическая композиция сравнивается с прототипом по таким показателям, как спектральные свойства, фото- и термостабильность, противоопухолевая активность.

Исследование спектральных свойств заявляемой фармацевтической композиции проводилось методом УФ-вид спектрофотометрии в буферном растворе Трис 7,4 с получением конечной концентрации диметилового эфира 0,01 мг/мл в массовых частях: диметиловый эфир хлорина еб : поливинилпирролидон 1:0 и 1:1.

На чертеже показаны спектры поглощения в Трис-буферном растворе (рН 7.4) заявленной фармацевтической композиции и диметилового эфира хлорина еб при соотношениях массовых частей диметиловый эфир хлорина еб : поливинилпирролидон : этаноламин 1:0; 0, 1 : 1 : 0,1, в том числе, полученного по примеру 1. Данная фармацевтическая композиция может обладать фотодинамической активностью, как и прототип, в спектре поглощения которого также имеются максимумы при 402 ± 3 нм и 662 ± 3 нм.

Диметиловый эфир хлорина еб в составе полученной лекарственной формы обладает максимумом

поглощения в длинноволновой спектральной области, который примерно на 1 нм смещен в длинноволновую область по сравнению с диметиловым эфиром хлорина еб в чистом виде.

Проведено изучение стабильности заявляемой фармацевтической композиции в сравнении с прототипом (Фотолон). Для этого на метанольные растворы образцов с концентрацией действующих веществ - 50 мкг/мл оказывали стрессовое воздействие излучением УФ- и красного оптического диапазона, а также температуры 80°C. Процессы деструкции контролировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Хроматографический анализ осуществлен на жидкостных хроматографах фирм Waters (США) и Shimadzu (Япония) с применением градиентного элюирования и хроматографических колонок, заполненным силикагелем октадецилсилильным. В качестве детектора использованы фотодиодноматричные детекторы. Результаты эксперимента описаны в табл. 1-3.

В табл. 1 приведены данные содержания основного вещества в заявляемой фармацевтической композиции и прототипе. Заявляемая фармацевтическая композиция содержит 99,6% основного вещества (табл. 1). Данный факт подтверждает стабильность и сохранение высокой чистоты основного вещества - диметилового эфира хлорина еб -при получении заявляемой фармацевтической композиции. В то же время хлорин еб в составе прототипа (Фотолон) по истечении 60 мин воздействия УФ-излучения разлагается, его содержание снижается с 94,9 до 5,3%.

Таблица 1. Изменение содержания основного вещества в прототипе и заявляемой фармацевтической композиции в результате воздействия УФ-излучения. Содержание основного вещества и примесей представлено в %

Время воздействия УФ-излучения, мин	Содержание основного вещества, %	
	Прототип	Заявляемая фармацевтическая композиция
0	94,9	99,6
10	82,6	99,6
20	57,1	99,2
40	7,8	99,3
60	5,3	99,3

В табл. 2 приведены данные об изменении содержания основного вещества в исследуемых прототипе и заявляемой фармацевтической композиции под воздействием излучения красного оптического диапазона, которые являются подтверждением существенного разложения хлорина еб в условиях исследований - его содержание снизилось с 94,4 до 13,2%; и подтверждением высокой стабильности диметилового эфира хлорина еб -количественное содержание которого практически не изменилось - с 99,6 до 99,4%.

Таблица 2. Изменение содержания основного вещества в прототипе и заявляемой фармацевтической композиции в результате воздействия излучения красного оптического диапазона (мощность 130 мВт)

Время воздействия излучения красного диапазона, мин	Содержание основного вещества, %	
	Прототип	Заявляемая фармацевтическая композиция
0	94,4	99,6
5	93,3	99,4
10	67,3	99,5
20	13,2	99,4

В табл. 3 приведены результаты изучения термодеструкции прототипа и заявляемой фармацевтической композиции. Заявляемая фармацевтическая композиция проявляет такую же высокую устойчивость при воздействии высокой температуры как и при других воздействиях. Прототип (Фотолон) при воздействии высокой температуры так же неустойчив, как при других стрессовых воздействиях. Содержание активного вещества в прототипе после 60 минут термического воздействия уменьшилось всего с 92,9 до 87,6%, а в заявляемой фармацевтической композиции остается на первоначальном уровне.

Таблица 3. Изменение содержания основного вещества в прототипе (Фотолон) и заявляемой фармацевтической композиции в результате воздействия повышенной температуры 80°C

Время воздействия температуры 80°C, мин	Содержание основного вещества, %	
	Прототип	Заявляемая фармацевтическая композиция
0	92,9	99,6
10	89,9	99,5
20	89,6	99,5
40	88,1	99,6
60	87,6	99,3

Таким образом, проведенные исследования подтверждают более высокую стабильность ДМЭ Хеб в составе заявленной фармацевтической композиции. Хлорин еб в составе прототипа (Фотолон) при проведении данного исследования продемонстрировал неустойчивость при воздействиях оптических излучений и повышенной температуры. Следовательно, заявляемая фармацевтическая композиция обладает высокой стабильностью, что позволяет для нее упростить условия хранения и увеличить сроки годности.

Противоопухолевая активность заявляемой фармацевтической композиции изучена в экспериментах на модели перевивной опухоли в сравнении с прототипом. Исследования выполнены на белых беспородных лабораторных крысах, которым прививали экспериментальную модель Российской коллекции опухолей - саркоме М-1. Фотосенсибилизаторы вводили животным внутривенно в дозе 5 мг/кг массы тела животного, а фотооблучение опухолей проводили на лазерной медицинской установке "ИМАФ АХИ-СОН" (Республика Беларусь) с длиной волны излучения 661 нм в дозе 100 Дж/см² помощью световода с микролинзой. Сравнительную оценку противоопухолевой эффективности ФДТ по площади некрозов осуществляли спустя 24 ч после фотооблучения путем количественного расчета площадей некрозов, образовавшихся в опухолях при витальном окрашивании животных-опухоленосителей синькой Эванса.

В табл. 4 приведены площади некрозов в Са М-1 после введения заявляемой фармацевтической композиции и прототипа (Фотолон) и фотооблучения в дозе 100 Дж/см². После фотооблучения в дозе 100 Дж/см² больший по площади некроз образовался после внутривенного облучения заявляемой фармацевтической композиции, что показывает ее высокие возможности в фотодинамической терапии (табл. 4). Применение заявляемой фармацевтической композиции позволяет достичь более высокой эффективности фотодинамической терапии за счет увеличения степени некроза опухоли по сравнению с прототипом (Фотолон). Это подтверждают экспериментальные данные по исследованию некроза опухолей (саркома М-1) после фотодинамической терапии.

Таблица 4. Площадь некрозов в Са М-1 после фотооблучения в дозе 100 Дж/см²

№ п/п	Фотосенсибилизатор	Число срезов	Площадь среза опухоли, см ²	Площадь некроза к исходной площади	
				см ²	%
1	Прототип	35	2,99±0,08	2,04±0,05	69,8±1,91
2	Заявляемая фармацевтическая композиция	35	2,92±0,07	2,43±0,05	83,3±0,88

Процент торможения роста опухоли при проведении фотодинамической терапии с применением заявляемой фармацевтической композиции по прошествии 21 дня исследования достигал 88,1 в сравнении с прототипом (Фотолон) (70,5) (табл. 5). При этом рост процента торможения Са М-1 для нового ФС происходил последовательно в отличие от ЛС Фотолон.

Таблица 5. Процент торможения роста Са М-1 крыс по объему по отношению к контролю после введения заявляемой фармацевтической композиции и прототипа в дозе 5.0 мг/кг и фотооблучения в дозе 100 Дж/см²

ФС	Процент торможения роста Са М-1 по объему на						
	7	9	11	14	16	18	21
Прототип	53,8	39,5	64,6	67,8	63,4	57,6	70,5
Заявляемая фармацевтическая композиция	50,9	59,3	79,7	87,4	86,4	79,8	88,1

После проведения ФДТ при дозе фотооблучения 100 Дж/см² наибольший процент излеченных животных вновь был достигнут для заявляемой фармацевтической композиции (50%), а значение средней продолжительности жизни для этого него (27,2 дня) также превысило среднюю продолжительность жизни для прототипа (Фотолон) (19,37 дней) (табл. 6).

Таблица 6. Средняя продолжительность жизни крыс (сутки) с Са М-1 после введения заявляемой фармацевтической композиции и прототипа в дозе 5,0 мг/кг и фотооблучения в дозе 100 Дж/см²

№ п/п	Контроль	Прототип	Заявляемая фармацевтическая композиция
1	24	24	27
2	18	11	излечена
3	24	20	излечена
4	26	25	26
5	20	18	излечена
6	15	излечена	излечена
7	23	излечена	32
8	16	11	излечена
9	27	19	16
10	16	27	35
X±	20,70	19,37	27,2
Sx	0,95	2,12	3,24

В целом, анализ полученных результатов позволяет сделать выводы о том, что заявляемая фармацевтическая композиция проявляет более высокую противоопухолевую активность в сравнении с прототипом. Она существенно превосходит прототип (Фотолон) по степени некроза перевивных опухолей, торможению их роста, средней продолжительности жизни экспериментальных животных и их излеченности при фотооблучении в дозе 100 Дж/см².

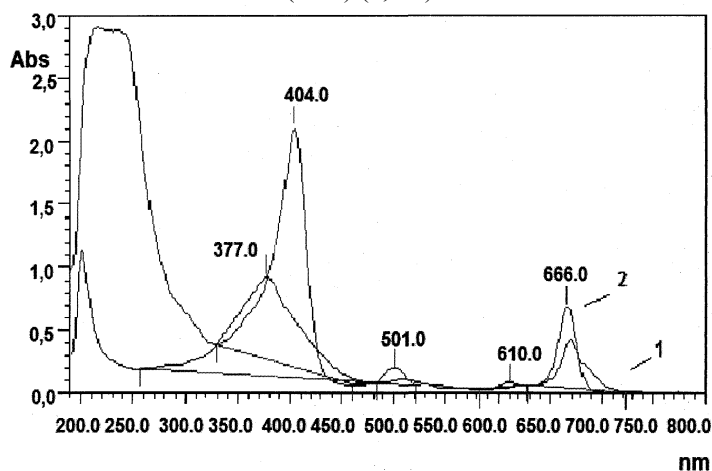
Таким образом, показано, что заявляемая фармацевтическая композиция обладает более высокой стабильностью, и лучше проявляет противоопухолевую активность, которая выражается в более обширном поражении ткани и некрозе опухоли после проведения фотодинамической терапии.

Литература

1. Патент RU 2003 120 368. Средство для фотодинамической диагностики и терапии онкологических заболеваний.
2. Патент US 5004811. Tetrapyrrole aminocarboxylic acid.
3. Патент US 5330741. Long-wave water soluble chlorin photosensitizers useful for photodynamic therapy and diagnosis of tumors.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Фармацевтическая композиция для фотодинамической терапии на основе производных хлорина е6 и поливинилпирролидона, отличающаяся тем, что в ее состав входят диметиловый эфир хлорина е6, поливинилпирролидон и этаноламин в следующем соотношении: диметиловый эфир хлорина е6:поливинилпирролидон:этанолламин в массовых частях 1:(1-10):(0,1-1).



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2