

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039000**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.11.19

(21) Номер заявки
201890653

(22) Дата подачи заявки
2016.09.16

(51) Int. Cl. *A61K 31/14* (2006.01)
A61K 31/245 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИЯ С ПРОТИВОВИРУСНЫМ ЭФФЕКТОМ

(31) 15185764.6

(32) 2015.09.17

(33) EP

(43) 2018.08.31

(86) PCT/EP2016/071944

(87) WO 2017/046312 2017.03.23

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**МЕДИЦЕ АРЦНАЙМИТТЕЛЬ
ПЮТТЕР ГМБХ УНД КО. КГ. (DE)**

(72) Изобретатель:
Аммер Рихард (DE)

(74) Представитель:
**Ловцов С.В., Левчук Д.В., Коптева
Т.В., Вилесов А.С., Ясинский С.Я.
(RU)**

(56) Michael Schmidbauer: "Pharmazeutische Zeitung online: In-vitro-Untersuchung: Dorithricin wirkt antiviral", 16 September 2015 (2015-09-16), pages 1-4, XP055317657, Retrieved from the Internet: URL: <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=59741> [retrieved on 2016-11-09] the whole document

DE-A1-19823318

DE-A1-19823319

HARTMANN ET AL: "Protective test with tyrothricin on herpes simplex virus infected mice", ARZNEIMITTEL FORSCHUNG. DRUG RESEARCH, ECV EDITIO CANTOR VERLAG, AULENDORF, DE, vol. 29, no. 1, 1 January 1979 (1979-01-01), pages 50-54, XP002121350, ISSN: 0004-4172 Diskussion; page 53

(57) Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей тиротрицин, хлорид бензалкония и/или бензокаин, для применения в противовирусной терапии или в лечении вирусной инфекции.

B1

039000

**039000
B1**

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей тиротрицин, хлорид бензалкония и/или бензокаин, для применения в противовирусной терапии или в лечении вирусной инфекции.

Уровень техники настоящего изобретения

Вирусы и бактерии представляют собой патогены широко распространенного острого фарингита. Лекарственные средства для лечения этих заболеваний были доступны на рынке в течение десятилетий, как например леденцы от боли в горле доритрицин® Classic. Их обычно применяют с антисептическими и антибактериальными средствами, содержащимися в них, для клинически эффективного облегчения типичных симптомов фарингита, таких как боль при глотании и покраснение при фарингите.

Тиротрицин представляет собой смесь различных эффективных против бактерий линейных и циклических полипептидов из групп грамицидинов и тироцидинов. Они образуются как эндотоксиноподобные молекулы анаэробной спорообразующей бактерией *Bacillus aneurinolyticus* (синоним *Bacillus brevis*). Спектр активности включает в основном грамположительные бактерии, но также некоторые грамотрицательные бактерии и различные типы грибов, такие как *Candida albicans*. Тиротрицин содержит 50-70% тироцидинов и 25-50% грамицидинов, которые вместе составляют по меньшей мере 85% активного ингредиента. Кроме того, встречаются небольшие количества других структурно родственных полипептидов.

Хлорид бензалкония представляет собой смесь хлоридов алкилбензилдиметиламмония, алкильный фрагмент в которых состоит из C₈-C₁₈ цепей. Он оказывает общий дезинфицирующий и консервирующий эффект и является эффективным против бактерий, грибов, дрожжей и водорослей (даже против вирусов, но в меньшей степени).

Бензокаин (этиловый эфир 4-аминобензойной кислоты) представляет собой местный анестетик, и его в основном применяют для терапии локальной болезненности кожи и слизистой оболочки, как например, в ротовой полости и горле, а также в лекарственных препаратах против простудных заболеваний, противокашлевых препаратах, обезболивающих средствах, таких как растворы или леденцы от проблем с горлом, желудком и зубами, вяжущих средствах.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей тиротрицин, хлорид бензалкония и/или бензокаин, для применения в противовирусной терапии или в лечении вирусной инфекции. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления композиция содержит все три активных ингредиента в комбинации.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1-4 - выраженное в процентах ингибирование активности вирусов HR14, H1N1 и RSV растворами доритрицина® с разной степенью разведения.

Фиг. 1 - синергичный противовирусный эффект всех 3 активных ингредиентов - тиротрицина, хлорида бензалкония и бензокаина в комбинации при возрастающей степени разведения. Синергичный эффект подтверждается при сравнении с фиг. 2-4.

Фиг. 2 - слабый противовирусный эффект тиротрицина отдельно при возрастающей степени разведения.

Фиг. 3 - очень слабый противовирусный эффект хлорида бензалкония отдельно при возрастающей степени разведения.

Фиг. 4 - очень слабый противовирусный эффект бензокаина отдельно при возрастающей степени разведения.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

В исследовании *in vitro* изучали дозозависимый противовирусный эффект вышеупомянутых активных веществ в отношении патогенных для человека вирусов RSV, HRV14 и H1N1. Данные этого исследования демонстрируют, что раствор, приготовленный из активных ингредиентов и доведенный до высокой физиологической концентрации активных ингредиентов, снижает вирусную активность на 68,4% (HRV14), 52,7% (H1N1) и 74,3% (RSV). Противовирусный эффект больше не мог выявляться только при очень высокой степени разведения активного ингредиента. Таким образом, фармацевтическая композиция, содержащая тиротрицин, хлорид бензалкония и бензокаин, характеризуется ярко выраженными, дозозависимыми и синергичными противовирусными свойствами в отношении вирусов RSV, HRV14 и H1N1.

Это наблюдение является новым и неожиданным из-за активных ингредиентов: Тиротрицин относится к антибиотикам, действующим против бактерий, хлорид бензалкония и бензокаин относятся к анальгетикам, эффективным против боли (1-4).

Таким образом, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей тиротрицин, хлорид бензалкония и/или бензокаин, для применения в противовирусной терапии или в лечении вирусной инфекции.

Композиция согласно настоящему изобретению может включать в себя, состоять из или, по существу, содержать вышеупомянутые активные вещества. Выражение "состоит, по сути, из" означает, что

фармацевтическая композиция содержит эти компоненты в качестве действующих ингредиентов. Тем не менее, она при этом может содержать один или несколько растворителей, вспомогательных веществ и т.д., которые являются необходимыми для производства фармацевтической композиции, но не вносят вклад или не вносят значительный вклад в фармакологическую эффективность.

Термин "фармацевтическая композиция", который используется в данном документе, включает в себя, в частности, пероральные лекарственные формы, такие как твердые, полужидкие или жидкие композиции для перорального введения. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления композиция имеет форму таблетки, в частности, леденца или таблетки от боли в горле.

Тем не менее, в качестве альтернативы, также возможны другие лекарственные формы, такие как твердые пероральные лекарственные формы, как например, порошки или капсулы. В этом случае ограниченные добавки стеарата магния или бегената кальция можно применять в качестве смазывающих средств, и крахмал можно применять в качестве ускорителей распада (разрыхлителя). В случае гранулирования можно применять водный раствор лактозы, этанол и подходящие концентрации крахмальных паст.

Общепринятые вспомогательные средства, применяемые в производстве леденцов от боли в горле, включают в себя сорбит (E 420), тальк, сложные эфиры жирных кислоты и сахарозы, дигидрат сахарината натрия, мятное масло, повидон 25 и кармеллозу натрия.

В дополнение к пероральным лекарственным формам фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может включать в себя парентеральные формы, т.е. жидкие разбавленные растворы для инъекции и жидкие растворы для втирания, а также мази, суппозитории, глазные капли и назальные капли.

В предпочтительной форме композицию применяют для лечения инфекции, вызванной риновирусами, вирусами гриппа и/или пневмовирусами.

В соответствии с вариантом осуществления фармацевтическую композицию применяют в способе лечения вирусной инфекции, причем вирусная инфекция вызвана HRV14 (риновирус человека типа 14), RSV (респираторно-синцитиальный вирус человека) и/или H1N1 (вирус гриппа А H1N1).

Одна доза фармацевтической композиции предпочтительно содержит приблизительно 0,5 мг тиротрицина, приблизительно 1,0 мг хлорида бензалкония и/или приблизительно 1,5 мг бензокаина и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. В этом контексте термин "приблизительно" означает диапазон отклонений, составляющий $\pm 50\%$, предпочтительно $\pm 20\%$, наиболее предпочтительно $\pm 10\%$ относительно массы активного вещества, приведенной выше.

Фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят в суточной дозе, составляющей примерно 2-4 мг тиротрицина, 4-8 мг хлорида бензалкония и 6-12 мг бензокаина.

Настоящее изобретение далее будет объяснено с учетом следующих рабочих примеров, в которых объясняются эффекты композиции согласно настоящему изобретению.

Рабочие примеры

1) Введение/

Вирусы и бактерии представляют собой патогены широко распространенного острого фарингита. Это заболевание, также известное как катаральный фарингит, представляет собой воспаление слизистой оболочки глотки и нижележащих глоточных структур, которое сопровождается типичными симптомами, представляющими собой боль при глотании, царапанье, жжение, сухость в горле и покраснение слизистой оболочки глотки (1).

Острый фарингит требует преимущественно симптоматического лечения для облегчения боли. Терапию антибиотиками назначают реже, и ее следует использовать только у 10-15% пациентов, пораженных стрептококковым фарингитом (1-3), или в случаях, когда нужно предупредить отдаленное последствие, такое как геморрагическая лихорадка. Таблетки от боли в горле, такие как доритрицин®, как уже неоднократно было доказано, являются успешными с клинической точки зрения при симптоматическом лечении (4). Комбинация антибактериальных и анальгезирующих средств: тиротрицина, хлорида бензалкония и бензокаина, содержащихся в нем, эффективно ослабляет типичные симптомы фарингита (4).

Интересно, что отдельные компоненты этой комбинации не только действуют против бактерий, но, как описано авторами настоящего изобретения в данном документе, они также активны против вирусов. Находится под вопросом, обладает ли комбинация содержащихся в доритрицине® активных ингредиентов противовирусным эффектом в совокупности. С учетом этого, исследование, представленное ниже, проводили с целью изучения дозозависимого противовирусного эффекта таблеток от боли в горле доритрицин® Classic в отношении патогенных для человека вирусов *in vitro*.

2) Материалы и способы.

Таблетки доритрицин® (MEDICE, Изерлон, Германия) в растворе исследовали в разных степенях разведения в отношении вирусов, которые вызывают инфекции дыхательных путей у людей. Одна таблетка содержит 0,5 мг тиротрицина, 1,0 мг хлорида бензалкония и 1,5 мг бензокаина. Оценивали следующие вирусы: риновирус человека типа 14 (HRV14, РНК-вирус без оболочки), респираторно-синцитиальный вирус (RSV, парамиксовирус, РНК-вирус без оболочки) и вирус гриппа А H1N1 (FluA,

H1N1, ортомиксовирус, РНК-вирус с оболочкой).

Для получения исследуемого раствора таблетку доритрицина® сначала измельчали, а затем растворяли в 1 мл диметилсульфоксида (DMSO), разводили дистиллированной водой 1:100 и стерилизовали (с помощью фильтра с размером ячеек 0,45 мкм). Серию разведений фильтрата с рН, доведенным до 7,4, готовили поэтапно с кратностью разведения \log_2 или \log_{10} с использованием полной питательной среды. Растворитель, приготовленный в соответствии с описанной процедурой (DMSO), использовали в качестве контроля с растворителем.

С целью исключения артефактов, обусловленных эффектами исследуемых растворов в отношении клеток для исследования противовирусной активности, которые снижают жизнеспособность и метаболизм, исследуемые растворы вначале подвергали исследованию жизнеспособности в клеточной культуре. В параллельных подходах исследуемые растворы на всех этапах разведения, также как и контроль с растворителем добавляли к растущим чувствительным к вирусам HeLa, MDCK и HEp-2 клеткам и культивировали в общей сложности в течение 3 суток (HeLa, MDCK) или 6 суток (HEp-2) при 37°C и 5% CO₂. В качестве дополнительного контроля только клетки, культивируемые со средой для культивирования клеток, включали в клеточную культуру.

Оценку возможных эффектов в отношении снижения жизнеспособности осуществляли на 1, 2, 3 и 6 сутки после введения вещества с использованием МТТ-теста. Обработанные клетки инкубировали с раствором МТТ в течение 45 мин (HEp-2, HeLa) и 60 мин, соответственно. Восстановление желтого красителя 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолия бромида (МТТ), содержащегося в растворе, до голубовато-фиолетового формазана может осуществляться только интактными живыми клетками, и оно является доказательством жизнеспособности клеток. После солюбилизации кристаллов формазана в 1% DMSO оптическую плотность супернатантов из клеточной культуры определяли фотометрически при длине волны 570 нм. Более высокая оптическая плотность указывает на большее количество жизнеспособных клеток. Более того, возможное изменение морфологии клеток оценивали с помощью микроскопии на 3 сутки (HeLa, MDCK) и сутки 6 (HEp-2) после добавления вещества. Значения OD исследуемых образцов для каждого подхода нормализовали к значениям OD у необработанных контролей, которое определяли как 100% жизнеспособность, и соответствующим образом выражали в виде процентов. Таким образом, можно определить среднюю ингибирующую концентрацию (IC₅₀) для образцов из нескольких параллелей в виде кривых зависимости "доза-эффект" для исследуемых образцов до концентрации, которая не показывала какого-либо ухудшения жизнеспособности клеток, вызванного исследуемым веществом и, следовательно, была подходящей для применения в исследованиях противовирусной активности.

После исследований жизнеспособности исследовали противовирусную активность в отношении HRV14, FluA и RSV. Чувствительные к вирусам клетки инфицировали соответствующими вирусами в средней инфицирующей дозе (MOI) от 0,0004 до 0,0008 (HeLa инфицировали HRV14; MDCK инфицировали FluA; HEp-2 инфицировали RSV). Инфицированные вирусом клетки обрабатывали спустя 1 ч после инфицирования исследуемыми растворами в физиологических концентрациях веществ в полупроницаемом агарозном супернатанте. На 2 сутки (FluA), 3 сутки (HRV14) и 5 сутки (RSV) в соответствии с подходом исследования вирусные бляшки (бляшкообразующие единицы/мл; PFU/мл), образованные в слое клеток, подсчитывали с использованием считывающей системы AID EliSpot (Autoimmun Diagnostika GmbH, Штрасберг, Германия) и оценивали в виде процента ингибирования относительно количества бляшек, определенного как полное инфицирование вирусом в контрольном подходе, который не предусматривает добавление какого-либо активного ингредиента.

В дополнение к контролю с вирусом и отрицательному контролю противовирусный активный ингредиент виразола® рибавирин, который представляет собой противовирусное средство против РНК-вирусов, использовали в качестве внутреннего лабораторного контроля для проверки процедуры исследования, описанной выше. Эффективность эталонных веществ подтверждали в тестовой системе. Все контроли подвергали воздействию всех условий культивирования для анализов противовирусной активности.

3) Результаты.

Для исследования противовирусной активности использовали исследуемые растворы с концентрациями активных ингредиентов, соответствующими степени разведения таблетки доритрицина®, составляющей 1:400 или выше (см. таблицу). С этими концентрациями активных средств не было выявлено эффектов в отношении снижения жизнеспособности на используемых HeLa, MDCK и HEp2 клетках в исследовании жизнеспособности.

В результате комбинация активных ингредиентов доритрицина® в разведении 1:100 и 1:400, показывала сравнимый противовирусный эффект и значительно уменьшала количество бляшек РНК-вирусов HRV14, H1N1 и RSV на 97 и 68, 53 и 74%, соответственно. Этот эффект в отношении образования бляшек снижался с повышением степени разведения. Только при высоких степенях разведения эффект уже не выявлялся: для HRV14 от 1:3200, для RSV от 1:6400 и для H1N1 от 1:64000. Относительный ингибирующий эффект, зависящий от степени разведения доритрицина®, показан на фиг. 1.

Синергичный эффект 3 активных веществ доказывается такой же серией экспериментов с отдельными веществами, которые показывают лишь очень слабую противовирусную активность при разведении 1:100 (фиг. 2, 3, 4).

Рибавирин (RIBA), используемый для контроля, показывал уменьшение количества вирусных бляшек, составляющее 53% у HRV14 (RIBA 10 мкг/мл), 96% у FluA (RIBA 3 мкг/мл) и 97% у RSV (RIBA 1 мкг/мл).

Лежащий в основе механизм действия изучался в дополнительных экспериментах. Оценивали, основывается ли он на синергичном эффекте, и какой из трех компонентов оказывает главное воздействие на какие вирусы.

Концентрации в мкг/мл активных ингредиентов, используемых в исследовании противовирусной активности и относящихся к составляющим доритрицина®

	Концентрации активного средства [мкг/мл]					
	Степень разведения доритрицина®					
	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:64000
Ингредиенты доритрицина®						
Тиротрицин	1,25	0,62	0,31	0,16	0,08	0,008
Хлорид бензалкония	2,5	1,25	0,62	0,31	0,16	0,016
Бензокаин	3,8	1,9	0,95	0,48	0,24	0,024

4) Вывод.

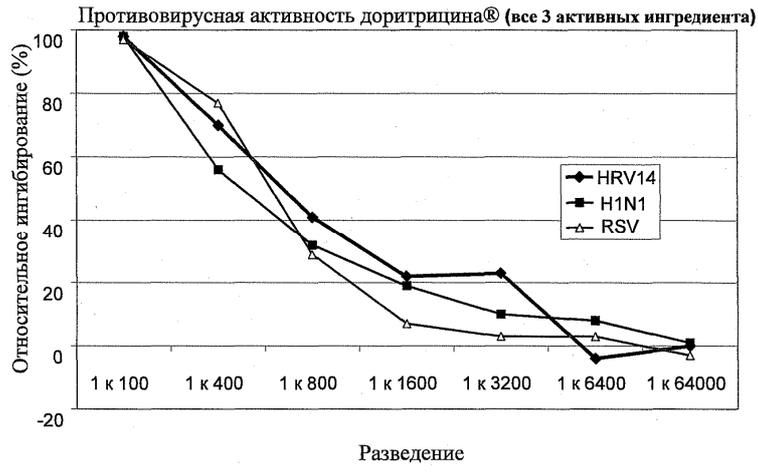
В дополнение к известным антибактериальным и обезболивающим эффектам фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению также характеризуется ярко выраженными, дозозависимыми и синергичными противовирусными свойствами в отношении вирусов RSV, HRV14 и H1N1.

5) Литература.

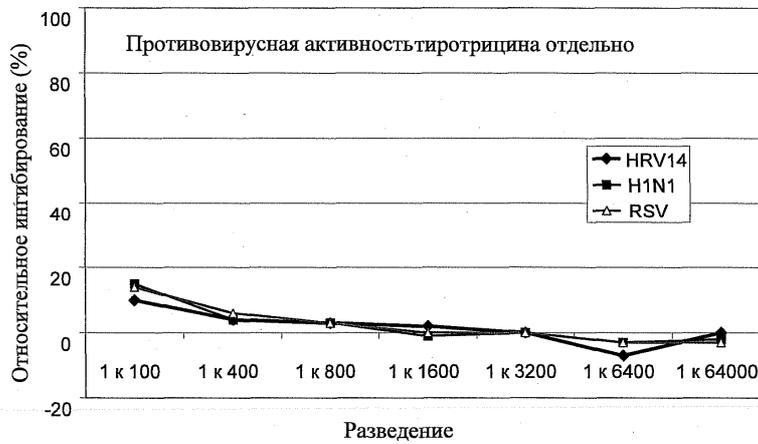
- (1) Posfay-Barbe KM. Infections in pediatrics: old and new diseases. Swiss Med Wkly 2012;142:w13654.
- (2) Bisno AL, Gerber MA, Gwaltney JM, Jr., Kaplan EL, Schwartz RH. Practice guidelines for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis. Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2002 Jul 15;35(2):113-25.
- (3) Shulman ST, Bisno AL, Clegg HW, Gerber MA, Kaplan EL, Lee G, et al. Clinical practice guideline for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis: 2012 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2012 Nov 15;55(10):1279-82.
- (4) Scholten T, Pautler M, Kober G. Dorithricin bei akuter Pharyngitis. Deutsche Apothekerzeitung 2005;145(1):93-4.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

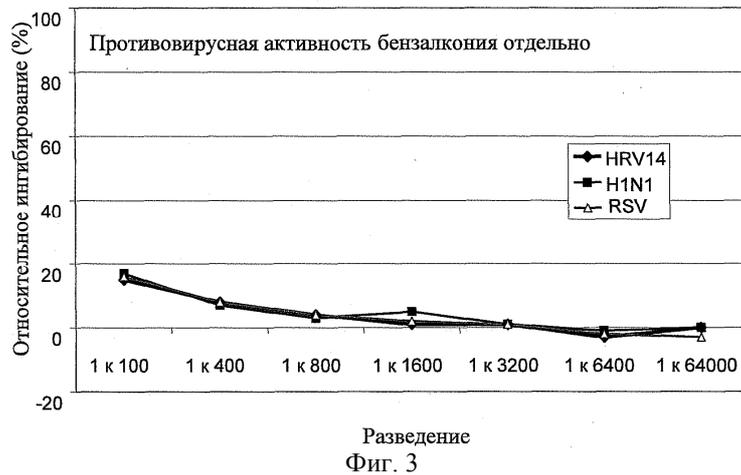
1. Применение фармацевтической композиции, содержащей тиротрицин, хлорид бензалкония и бензокаин, в противовирусной терапии или в лечении вирусной инфекции.
2. Применение фармацевтической композиции по п.1 для лечения вирусной инфекции, причем вирусная инфекция вызвана риновирусами, вирусами гриппа и/или пневмовирусами.
3. Применение фармацевтической композиции по п.1 или 2 для лечения вирусной инфекции, причем вирусная инфекция вызвана HRV14 (риновирус человека типа 14), RSV (респираторно-синцитиальный вирус человека) и/или H1N1 (вирус гриппа А H1N1).
4. Применение фармацевтической композиции по одному или нескольким из предыдущих пунктов, причем фармацевтическая композиция содержит приблизительно 0,5 мг тиротрицина, приблизительно 1,0 мг хлорида бензалкония, приблизительно 1,5 мг бензокаина в виде одной дозы и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, для лечения вирусной инфекции.
5. Применение фармацевтической композиции по одному или нескольким из предыдущих пунктов, причем фармацевтическая композиция представляет собой таблетку от боли в горле.
6. Применение фармацевтической композиции по одному или нескольким из предыдущих пунктов для лечения вирусной инфекции, причем указанная композиция вводится в суточной дозе, составляющей приблизительно 2-4 мг тиротрицина, 4-8 мг хлорида бензалкония и 6-12 мг бензокаина.



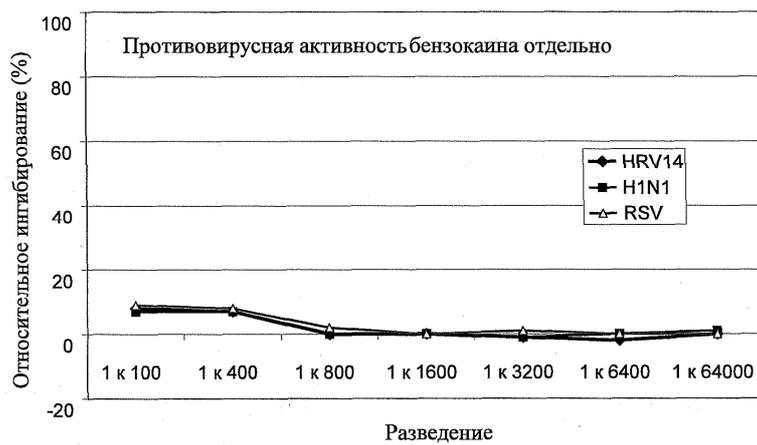
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

