



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

A61K 35/60 (2006.01)
A61K 9/06 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61K 31/722 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014119104/15, 12.05.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
12.05.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 12.05.2014

(45) Опубликовано: 27.04.2015 Бюл. № 12

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2366408 C1, 10.08.2009. RU
2055482 C1, 10.03.1996. RU 2483110 C1,
27.05.2013. WO 2004037180 A2, 06.05.2004

Адрес для переписки:

690022, г.Владивосток, пр-кт 100 лет
Владивостоку, 159, ФГБУН Тихоокеанский
институт биоорганической химии им. Г.Б.
Елякова Дальневосточного отделения РАН, зав.
пат. отд. Стадниченко Н.И.

(72) Автор(ы):

Попов Александр Михайлович (RU),
 Гафуров Юрий Михайлович (RU),
 Кривошапко Ольга Николаевна (RU),
 Штода Юлия Николаевна (RU),
 Цыбульский Александр Васильевич (RU),
 Недашковская Ольга Ильинична (RU),
 Московкина Таисия Васильевна (RU),
 Стоник Валентин Аронович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Тихоокеанский институт
биоорганической химии им. Г.Б. Елякова
Дальневосточного отделения Российской
академии наук (ТИБОХ ДВО РАН) (RU)

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, ОБЛАДАЮЩАЯ ЛЕЧЕБНЫМ ДЕЙСТВИЕМ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ КОЖНЫХ ПАТОЛОГИЯХ

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической промышленности, а именно к фармацевтической композиции, обладающей лечебным действием при различных кожных патологиях. Фармацевтическая композиция, обладающая лечебным действием при различных кожных патологиях, включает триптантрин, хитозан и дистиллированную воду, ланолин-вазелиновую

смесь и белково-нуклеиновый гидролизат молок лососевых рыб при определенном соотношении компонентов. Вышеописанная композиция позволяет повысить эффективность лечения кожных патологий разной этиологии и расширить арсенал фармацевтических композиций, обладающих лечебным действием при различных кожных патологиях. 3 табл., 4 ил., 7 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 549 475** (13) **C1**

(51) Int. Cl.

A61K 35/60 (2006.01)

A61K 9/06 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 31/722 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2014119104/15, 12.05.2014

(24) Effective date for property rights:
12.05.2014

Priority:

(22) Date of filing: 12.05.2014

(45) Date of publication: 27.04.2015 Bull. № 12

Mail address:

690022, g. Vladivostok, pr-kt 100 let Vladivostoku,
159, FGBUN Tikhookeanskij institut
bioorganicheskoy khimii im. G.B. Eljakova
Dal'nevostochnogo otdeleniya RAN, zav. pat. otd.
Stadnichenko N.I.

(72) Inventor(s):

Popov Aleksandr Mikhajlovich (RU),
Gafurov Jurij Mikhajlovich (RU),
Krivoshapko Ol'ga Nikolaevna (RU),
Shtoda Julija Nikolaevna (RU),
Tsybul'skij Aleksandr Vasil'evich (RU),
Nedashkovskaja Ol'ga Il'ichna (RU),
Moskovkina Taisija Vasil'evna (RU),
Stonik Valentin Aronovich (RU)

(73) Proprietor(s):

Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe
uchrezhdenie nauki Tikhookeanskij institut
bioorganicheskoy khimii im. G.B. Eljakova
Dal'nevostochnogo otdeleniya Rossijskoj
akademii nauk (TIBOKh DVO RAN) (RU)

(54) PHARMACEUTICAL COMPOSITION POSSESSING THERAPEUTIC ACTION ON VARIOUS SKIN PATHOLOGIES

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: pharmaceutical composition possessing a therapeutic action on various skin pathologies contains triptantrine, chitosan and distilled water, a lanoline and Vaseline mixture and protein-nucleic hydrolyzate of the salmonid fishes milt in a certain mixture ratio.

EFFECT: composition enables increasing the clinical effectiveness in the skin pathologies of various origins and extending the range of pharmaceutical compositions having the therapeutic effect on the various skin pathologies.

3 tbl, 4 dwg, 7 ex

Изобретение относится к медицине и ветеринарии и касается создания на основе алкалоида триптантрина (коуропитина) фармацевтических композиций, обладающих широким спектром действия, которые могут найти применение для лечения различных кожных патологий человека и животных.

Проблема использования универсальных средств наружного применения, сочетающих различные виды фармакологической активности, постоянно привлекает внимание исследователей, разрабатывающих новые лекарственные препараты. В настоящее время наблюдается нарастающая потребность в комплексных средствах широкого спектра действия, которая определяется, прежде всего, резким возрастанием количества воспалительных заболеваний кожи разной этиологии. Эти заболевания связаны с интенсивным загрязнением окружающей среды, ухудшением функциональной активности иммунной системы и аллергизацией населения, а также формированием штаммов лекарственноустойчивых микроорганизмов, что ограничивает использование существующих препаратов из-за их малой эффективности.

Для лечения кожных повреждений разной этиологии традиционно применяется широкий спектр лекарственных средств - антибиотики, сульфаниламиды, нитрофураны и другие антисептики. Однако повсеместное использование антибиотиков привело к быстрому возникновению и распространению устойчивых штаммов.

Из огромного числа лекарственных средств можно выделить несколько групп по их определенному действию на рану: противовоспалительное, противомикробное, противоаллергическое, ранозаживляющее, противоопухолевое и другие, но имеются и полифункциональные вещества, которые одновременно сочетают указанные выше активности. Последние представляют собой наиболее перспективные и ценные лекарственные средства.

Триптантрин был выделен в качестве природного антибиотика из целого ряда высших растений, таких как *Isatis tinctoria* L., *Polygonum tinctorium* (P. tinctorium), дрожжевидных грибов *Candida lipolytica* [Jahng Y. Progress in the studies on tryptanthrin, an alkaloid of history // Arch. Pharm. Res. 2013. V. 36(5). P. 517-535], морских микроорганизмов *Oceanibulbus indolifex* [Wagner-Dobler I. et al. *Oceanibulbus indolifex* gen. nov., sp. nov., a North Sea alphaproteobacterium that produces bioactive metabolites // Int. J. System. Evol. Microbial. 2004. V. 54. P. 1177-1184], а сравнительно недавно был найден в дрожжевых грибах рода *Malassezia*, которые являются частью естественного микробиома кожи человека [Vlachos C. et al. *Malassezia*-derived indoles activate the aryl hydrocarbon receptor and inhibit Toll-like receptor-induced maturation in monocyte-derived dendritic cells // Br. Assoc. Dermatol. 2012. V. 167. P. 496-505].

Важное патобиологическое значение триптантрина как вторичного метаболита этих дрожжей, возможно, состоит в том, что он, как и естественные компоненты иммунной системы кожи человека, принимает участие в ингибировании патологических воспалительных процессов, например, при разноцветном лишае и себорейном дерматите [Gaitanis G. et al. The *Malassezia* genus in skin and systemic diseases // Clin. Microbiol. Rev. 2012. V. 25. P. 106-141; Hay R.J. *Malassezia*, dandruff and seborrhoeic dermatitis: an overview // Br. J. Dermatol. 2011. V. 165 (Suppl. 2). P. 2-8].

Триптантрин обладает качествами сильного противовоспалительного агента, являясь специфическим ингибитором циклоксигеназы COX-2 (в дозе 1.5 мкМ подавляет ее активность на 50%) и 5-липоксигеназы (5-LOX) - ферментов, экспрессия которых резко возрастает в период резкого развития воспалительных процессов. В низких дозах триптантрин ингибирует продукцию макрофагами как NO, так и простагландина E₂ и имеет двойной ингибирующий эффект на провоспалительные ферменты активированных

макрофагов [Pergola C. et al. On the inhibition of 5-lipoxygenase product formation by tryptanthrin: mechanistic studies and efficacy in vivo // Brit. J. Pharm. 2012. V. 165. P. 765-776].

Известна иммуностимулирующая композиция, которая включает, триптантрин или его производные, а также вещества или экстракты из шишек хмеля и розмарина, в том числе разнообразные тритерпены, дитерпеновые лактоны и их конъюгированные производные [WO 2004037180, 2004.05.06].

В патенте [US 2007184133, 2007.08.09] указывается на механизм иммуностимулирующего эффекта такой синергетической композиции, связанной с ингибированием COX-2 и синтеза простагландинов, в частности простагландина E₂.

Триптантрин может тормозить каскад арахидоновой кислоты, а также синтез NO, провоспалительных простагландинов и лейкотриенов [Ishihara T. et al. Tryptanthrin inhibits nitric oxide and prostaglandin E(2) synthesis by murine macrophages // Eur. J. Pharmacol., 2000; 407, 197-204]. По своей противовоспалительной активности триптантрин близок к современному коммерческому препарату zileутону, который является специфическим хелатором ионов железа в активном центре фермента 5-LOX [Pergola C. et al. On the inhibition of 5-lipoxygenase product formation by tryptanthrin: mechanistic studies and efficacy in vivo // Brit. J. Pharm. 2012. V. 165. P. 765-776].

Следует отметить, что триптантрин обладает высоким противовоспалительным потенциалом при дерматологических заболеваниях, ингибируя активность тимического стромального лимфопоэтина и других цитокинов, которые играют решающую роль в развитии кожных воспалительных заболеваний [Han N.R. et al. Tryptanthrin ameliorates atopic dermatitis through down-regulation of TSLP. Arch Biochem Biophys. 2014. V. 542. P. 14-20]. В составе комплекса индольных соединений (индирубин, индиго, изатин и др.) или экстрактов, выделенных из различных растений, триптантрин применяется в Восточной медицине для лечения дерматозов различной этиологии и повреждений кожи, вызванных псориазом [Lin Y.K. et al. Indigo naturalis upregulates claudin-1 expression in human keratinocytes and psoriatic lesions. J. Ethnopharmacol. 2013. V. 145(2). P. 614-620]. Характерно, что экстракт из растения *Indigo naturalis*, содержащий в качестве главных компонентов триптантрин, индирубин и индиго, обладает выраженными лечебными свойствами при кожных заболеваниях, в частности псориазе, повышая синтез важного функционального белка кожи клаудина-1 и восстанавливая функцию плотных контактов у кератиноцитов [Lin Y.K. et al. Indigo naturalis upregulates claudin-1 expression in human keratinocytes and psoriatic lesions // J. Ethnopharmacol. 2013. V. 30, №145(2). P. 614-620].

Важным является и то, что триптантрин проявляет выраженное противомикробное действие в отношении различных видов стафилококков (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermis* и метициллин-резистентного штамма *S. aureus*). По своей эффективности противомикробного действия триптантрин сравним с Р-лактамами антибиотиками [Chiang Y.R. et al. An in vitro study of the antimicrobial effects of indigo naturalis prepared from *Strobilanthes formosanus* Moore // Molecules. 2013. V. 18(11). P. 14381-14396]. В дозах, близких к 1 мкг/мл, триптантрин ингибирует на 50% также рост таких патогенных микроорганизмов, как *B. subtilis* [Schindler F., Zahner H. Metabolic products of microorganisms. 91. Tryptanthrin, a tryptophan derived antibiotic from *Candida lipolytica* // Arch. Microbiol. 1971. V. 79. P. 187-203] и микобактерии туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* [Hwang J.M. et al. Design, synthesis, and structure-activity relationship studies of tryptanthrins as antitubercular agents // J. Nat. Prod. 2013. V. 76(3). P. 354-367]. Недавно было высказано предположение, что он ингибирует рост патогенных микроорганизмов путем интеркалирования в микробную ДНК [Bandekar P.P. et al. Antimicrobial activity of tryptanthrins in *Escherichia coli* // J. Med. Chem. 2010. V. 53. P. 3558-3565].

В дозах, сравнимых с дозами гризеофульвина, триптантрин также является высокоспецифическим антифунгальным агентом, проявляя активность против дерматофитов, в особенности в отношении *Trichophyton mentagrophytes*, вызывающих стригущий лишай [Honda G. et al. The antimicrobial specificity of tryptanthrin // *Planta Med.* 1979. V. 37. P. 172-174]. Триптантрин обладает высокой специфичностью действия на возбудителей других заболеваний, включая *Helicobacter pylori* - основной микробный фактор, ответственный за развитие язвы желудка, и протозойные инфекции [Scovill J. et al. // *Antimicrob Agents Chemother.* 2002. V. 46(3). P. 882-883].

Показано также, что триптантрин обладает антиканцерогенной активностью. При пероральном введении в дозе 50 мг/кг, триптантрин уменьшает количество случаев рака кишечника у крыс, индуцированного азоксиметаном [Koya-Miyata S. et al. Prevention of azoxymethane-induced intestinal tumors by a crude ethyl acetate-extract and tryptanthrin extracted from *Polygonum tinctorium* Lour // *Anticancer Res.* 2001. V. 21. P. 3295-3300]. Кроме этого триптантрин супрессирует колиты, индуцируемые декстран сульфатом у мышей, вероятно путем ингибирования продукции интерлейкина-2 активированными клетками селезенки [Micallef M.J. et al. The natural plant product tryptanthrin ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice // *Int. Immunopharmacol.* 2002. V. 2. P. 565-578].

Триптантрин оказывает выраженное цитотоксическое действие *in vitro* в отношении различных линий опухолевых клеток человека и животных [Jao C.W. et al. Isolation, Structure Elucidation, and Synthesis of Cytotoxic Tryptanthrin Analogues from *Phaius mishmensis* // *J. Nat. Prod.* 2008. V. 71. P. 1275-1279]. Интересно, что в низких концентрациях этот алкалоид увеличивает экспрессию маркеров клеточной дифференцировки в человеческих моноцитарных (U-937) и промиелоцитарных (HL-60) лейкоэмических клетках, что является показателем их дифференцировки в моноциты/макрофаги. После действия высоких концентраций триптантрина в течение 24 ч наблюдается вакуолизация цитоплазмы и деструкция митохондрий. Лейкемические клетки гибнут по пути апоптоза в течение 48 ч после их обработки. Действие триптантрина усиливает Fas-индуцируемый апоптоз и увеличивает активность каспазы 3. Эти данные указывают на то, что низкие дозы триптантрина могут индуцировать дифференцировку лейкоэмических клеток, а высокие концентрации приводят к их апоптотической гибели [Kimoto T. et. al. Cell differentiation and apoptosis of monocytic and promyelocytic leukemia cells (U-937 and HL-60) by tryptanthrin, an active ingredient of *Polygonum tinctorium* Lour//*Pathol. Int.* 2001. V. 51. P. 315-325].

Триптантрин очень эффективно блокирует действие и подавляет экспрессию различных цитокинов, в частности фактора роста гепатоцитов (HGF), который принимает участие в злокачественной трансформации нормальных клеток, а также в росте, инвазии и метастазировании опухолевых клеток [Motoki T. et al. Inhibition of hepatocyte growth factor induction in human dermal fibroblasts by tryptanthrin // *Biol Pharm Bull.* 2005. V. 28(2). P. 260-266].

Известно о проявлении триптантрином противоаллергических свойств [JP 2006241080, 2006.09.14].

Таким образом, триптантрин обладает широким спектром фармакологического действия, а именно: противовоспалительным, противомикробным, антиканцерогенным, противоопухолевым и дерматозащитным действием, что позволяет создавать на его основе лекарственные средства, которые можно успешно использовать при кожных патологиях различной этиологии.

Важным преимуществом триптантрина перед другими природными соединениями является то, что его получают одностадийным синтезом - окислением изатина [Московкина Т.В. и др. Синтез соединений ряда триптантрина путем окисления изатина

// Журн. орган. химии. 2013. Т. 49. С. 1760-1763].

Недостатком триптантрина является его плохая биодоступность, связанная с низкой растворимостью в биологических жидкостях.

В результате решения задачи по созданию биодоступной композиции на основе триптантрина нами ранее была создана гелевая композиция, обладающая ранозаживляющим, противоожоговым, противовоспалительным, гепатопротекторным, противодиабетическим и противоопухолевым действием. Гелевая композиция содержит триптантрин, хитозан и дистиллированную воду при следующем соотношении ингредиентов, г/л геля: триптантрин 1,5-2,5; хитозан 15,0-25,0; дистиллированная вода - остальное [RU 2366408 C1, 10.2009].

Однако в процессе работы с гелевой композицией были выявлены ее существенные недостатки:

1. наблюдающееся расслоение гелевой формы препарата при хранении создает серьезные трудности при его фармакологическом наружном применении;
 2. из-за высокой фармакологической активности триптантрина его концентрация в геле неоправданно высока и не отвечает оптимальной дозе при его наружном применении для лечения раневых повреждений кожи;
 3. отмечено снижение эффективности процесса эпителизации и регенерации раневого повреждения, что связано с двумя вышеназванными недостатками.
- Все эти факторы уменьшают эффективность фармакологического применения известной гелевой композиции при различных кожных патологиях.

Технический результат, обеспечиваемый предлагаемым изобретением, заключается в устранении недостатков, присущих известной гелевой композиции на основе триптантрина, и, как следствие, повышении эффективности лечения кожных патологий разной этиологии. Изобретение расширяет арсенал фармацевтических композиций, обладающих лечебным действием при различных кожных патологиях.

Технический результат достигается тем, что фармацевтическая композиция, обладающая лечебным действием при различных кожных патологиях, включающая триптантрин, хитозан и дистиллированную воду, согласно изобретению дополнительно содержит ланолин-вазелиновую смесь и белково-нуклеиновый гидролизат молока лососевых рыб при следующем соотношении компонентов, мас. %:

Триптантрин	0,005-0,015
Хитозан	1,0-1,2
Ланолин-вазелиновая смесь	40,0-50,0
Белково-нуклеиновый гидролизат	1,0-2,0
Дистиллированная вода	остальное

Совместное применение компонентов в заявляемой композиции обеспечивает синергетический эффект композиции, заключающийся в том, что каждый компонент проявляет характерные для него фармакологические свойства при действии на раневые повреждения и патологические воспалительные процессы кожи с большей эффективностью, при этом концентрация действующего начала - триптантрина в 5-10 раз ниже, чем в известной гелевой композиции.

В заявляемой композиции триптантрин используют в оптимальном в количественном соотношении 0,005-0,015 мас. % для проявления им максимального фармакологического действия. Повышение содержания триптантрина (более 0,015 мас. %) может привести к угнетению метаболических процессов в нормальных клетках и, тем самым, к нарушению эффективности его действия на стадии грануляции и эпителизации раневых повреждений. Снижение концентрации триптантрина (менее 0,005 мас. %) также не

соответствует оптимальным дозам его фармакологической активности, а следовательно, не позволяет достичь нужного фармакологического эффекта у заявляемой композиции.

Для приготовления заявляемой композиции используют триптантрин, полученный окислением изатина, коммерческий препарат хитозана с 80%-ной степенью
 5 дезацетилирования и молекулярной массой 100000 Да, ланолин-вазелиновую смесь и белково-нуклеиновый гидролизат молок лососевых рыб, полученный известным способом [RU 2055482, 10.03.1996].

Хитозан широко используется для приготовления средств наружного применения в форме гелей, пленок, губок, коллоидных растворов, так как он обладает
 10 антибактериальными, противогрибковыми, противовирусными, ранозаживляющими и иммуномодулирующими свойствами (LD_{50} для организма человека составляет 1,33 г/день/1 кг/веса) [Li Q. et al. Application and properties of chitosan. In: Applications of chitin and chitosan, M.F.A. Goosen, Ph.D. ed. Technomic publishing CO., Inc., Lancaster. Basel. 1997. pp. 3-29].

Выбранный интервал концентраций хитозана в заявляемой композиции является оптимальным для проявления максимальной фармакологической активности. При
 15 концентрации хитозана более 1,2 мас.% происходит усиленное образование покрытия раны в виде пленки и нарушение оттока раневого содержимого. При концентрации менее 1,0 мас.% хитозан уже не оказывает оптимального фармакологического действия.

Гидролизат молок лососевых рыб содержит такие ценные биологически активные
 20 продукты, как дезоксинуклеозиды, олигонуклеотиды различной величины, аминокислоты, среди которых преобладают аргенин и лизин. Данные метаболические предшественники принимают участие в грануляции, эпителизации раневого повреждения. Экспериментально установлено, что концентрация гидролизата, используемая в
 25 заявляемой композиции, оптимальна с точки зрения эффективности лечебного действия и ускорения процесса заживления ран.

Способ получения заявляемой композиции включает следующие стадии:

1. Получают гель хитозана известным способом [RU 2366408].

2. Ланолин-вазелиновую смесь в весовом соотношении компонентов 3:1 расплавляют
 30 на водяной бане при 80°C и добавляют триптантрин, растворенный в хлороформе, перемешивают и выдерживают при этой температуре около 20 мин до испарения хлороформа.

3. К ланолин-вазелиновой смеси с триптантрином добавляют гель хитозана в весовом
 35 соотношении компонентов 1:1 и белково-нуклеиновый гидролизат молок лососевых рыб согласно рецептуре. Смесь перемешивают до однородной массы и готовую мазь хранят при комнатной температуре.

Подобранные нами экспериментальным путем количественное соотношение геля и мази (1:1) позволяет исключить их расслоение при хранении. Известно, что ланолин-вазелиновая мазь, особенно в первой фазе раневого процесса, не смешивается с раневым
 40 экссудатом и не поглощает раневое отделяемое, что ухудшает возможности очищения раны от гноя и некротических масс, а следовательно, задерживает процессы регенерации кожных повреждений [Доценко Б.М. и др. Методические рекомендации по экспериментальному (доклиническому) изучению лекарственных препаратов для
 45 местного лечения гнойных ран (МЗ СССР Фармакологический Комитет). М.: 1989. 46 с.]. Авторами установлено, что ланолин-вазелиновая мазь с добавлением геля хитозана в равном соотношении позволяет устранить вышеперечисленные недостатки, т.к. улучшается адсорбция раневого экссудата хитозаном.

Заявляемая композиция представляет собой сбалансированную, стабильную

гидрофильно-гидрофобную мазь, обеспечивающую достаточное высвобождение фармакологически активного триптантрина для оказания им лечебного действия.

Повышение эффективности использования заявляемой композиции для лечения кожных патологий разной этиологии в сравнении с прототипом и базовыми коммерческими препаратами доказана экспериментами *in vivo*.

Все эксперименты выполнены на животных, которые были получены из питомника «Пушино» и разведены в виварии ТИБОХ ДВО РАН (сертификат имеется). Животных содержали в соответствии с международными правилами, утвержденными приказом №267 МЗСР РФ от 19.06.2003, а также «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (2005).

Коммерческие препараты для наружного применения «Синафлан», «Фуцидин» и «Метилурацил» применяли как базовые препараты сравнения.

Препарат «Синафлан» представляет собой 0,025%-ную мазь синтетического глюкокортикоидного гормона - флуоцинолона ацетонида, обладающую противовоспалительным, противоаллергическим и противозудным действием.

Применяют в комплексной терапии воспалительных и аллергических заболеваний кожи немикробной этиологии. Мазь назначают больным экземой, нейродермитом, кожным зудом, псориазом и другими хроническими сухими формами воспалительных и аллергических заболеваний кожи [Машковский М.Д. Лекарственные средства. ч. 1 // М.Д. Машковский. - М.: Медицина, 1993. С. 675-676].

Препарат «Метилурацил» представляет собой 5%-ную метилурациловую мазь на ланолин-вазелиновой основе - пиримидиновое производное, широко используемое для профилактики и лечения нарушений репаративных процессов в организме и нормализации его защитно-приспособительных реакций. Препарат дает местный противовоспалительный эффект, нормализует обменные процессы в тканях, способен активировать местный фагоцитоз и поэтому стимулирует процессы заживления ран. Мазь не обладает прямой антимикробной активностью, в связи с чем подавление вегетирующей в ране вторичной инфекции обеспечивается косвенно - за счет местных реакций иммунитета [Машковский М.Д. Лекарственные средства. ч. II // М.Д. Машковский. - М.: Медицина, 1993. С. 161-162].

Препарат «Фуцидин» представляет собой 2%-ную мазь бактериостатического антибиотика фузидовой кислоты. Она относится к группе фузидинов, противомикробным соединениям, механизм действия которых связан с нарушением синтеза белка в бактериальной клетке. К фузидовой кислоте чувствительны грамположительные бактерии и грамотрицательные кокки [Машковский М.Д. Лекарственные средства. ч. II // М.Д. Машковский. - М.: Медицина, 1993. С. 306-308].

Недостатками каждого из трех указанных выше коммерческих препаратов наружного применения для лечения кожных патологий являются отсутствие универсальности и узкая направленность действия.

На фиг. 1 представлена сравнительная оценка эффективности лечебного действия заявляемой композиции, гелевого средства (прототип) и других препаратов сравнения на эритему ушей на экспериментальной модели аллергического контактного дерматита (ось ординат - уровень повреждения кожи (эритемы), выраженный в условных единицах; ось абсцисс - количество проведенных лечебных аппликаций).

На фиг. 2 представлен гистопатологический анализ лечебного действия заявляемой композиции, гелевого средства и коммерческого препарата «Синафлан» при моделировании аллергического контактного дерматита, индуцированного динитрофторбензолом (ДНФБ) у экспериментальных животных.

а) отрицательный контроль, без лечения; б) лечение препаратом «Синафлан», в) лечение гелевой композицией, г) лечение заявляемой композицией. Срезы окрашены гематоксилином-эозином; 100-кратное увеличение.

На фиг. 3 представлено действие заявляемой композиции на экспрессию цитокиновых белков в сыворотке крови, индуцированную ДНФБ. (-) контроль - ДНФБ (без лечения), (+) - контроль - гелевая композиция.

Обозначения: ИЛ-1 - интерлейкин 1, ИЛ-2 - интерлейкин 2, ИЛ-4 - интерлейкин 4, ИЛ-10 - интерлейкин 10, ГМ-КСФ - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, ИНФ - интерферон- γ , ТРФ - трансформирующий фактор роста- β 1, ФНО - фактор некроза опухоли- α .

На фиг. 4 представлена цитотоксическая активность триптантрина *in vitro* в отношении различных линий опухолевых клеток: (а) мышьяная асцитная линия опухолевых клеток Эрлиха; (б) лейкоэмическая линия опухолевых клеток человека ТНР-1; лейкоэмическая линия опухолевых клеток человека HL-60.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами конкретного выполнения.

Пример 1. Состав фармацевтической композиции, мас. %: триптантрин - 0,005; хитозан - 1,0; ланолин-вазелиновая смесь - 40,0; белково-нуклеиновый гидролизат - 1,0; дистиллированная вода - остальное.

Хитозан (4 г) растворяют при перемешивании в 100 мл 3%-ной уксусной кислоты, добавляют 2 объема 0,3 N NaOH (200 мл) и перемешивают. Гель хитозана промывают дистиллированной водой до pH 5,5-6,0. В полученный гель добавляют дистиллированную воду при объемном соотношении 1:(1-2) и гомогенизируют его с использованием блендера при 20000 об/мин в течение 1-3 мин. Избыток жидкости удаляют декантацией. Получают гель белого цвета, содержащий хитозан и дистиллированную воду.

Ланолин-вазелиновую мазь (200 г) расплавляют на водяной бане (80°C) и добавляют 20 мг триптантрина, растворенного в 10 мл хлороформа. Смесь перемешивают, выдерживают при 80°C 15 мин до испарения хлороформа. Затем к полученной смеси добавляют 200 мл геля хитозана и 1,0 г белково-нуклеинового гидролизата молока лососевых рыб. Смесь перемешивают до однородной массы и хранят при комнатной температуре.

Пример 2. Состав фармацевтической композиции, мас. %: триптантрин - 0,015; хитозан - 1,2; ланолин-вазелиновая смесь - 50,0; белково-нуклеиновый гидролизат - 2,0; дистиллированная вода - остальное.

Изготавливают композицию аналогичным образом.

Физико-химические характеристики фармацевтической композиции, полученной по примерам 1 и 2:

консистенция - мягкая мазь (крем);

тип - гидрофобно-гидрофильная;

pH - 5,5-6,0;

цвет - светло-желтый;

стабильность - расслоение отсутствует;

абсорбция - полная;

срок годности - 18 месяцев;

условия хранения - хранить при 4-6°C в закрытой таре без доступа воздуха.

Пример 3. Фармакологическая оценка ранозаживляющего действия заявляемой композиции в отношении ожоговых ран.

Экспериментальная работа была проведена на беспатогенных мышах линии CD1, которым наносили термические раны. Перед нанесением термических ран глазами

ножницами тщательно выстригали шерсть на боковой стороне между позвоночником и бедром. Затем выстриженный участок дополнительно выбривали с помощью одноразового станка. Медный стержень с плоским торцом диаметром около 6 мм нагревали на кипящей водяной бане и на 5-6 сек прижимали торцом к выбритому участку кожи животного. Для нанесения следующей раны остывший стержень повторно нагревали на водяной бане в течение 15 сек. Для измерения времени контакта стержня с кожей пользовались секундомером. Нанесение мазей начинали на 2 день, предварительно измеряя размер раны. Для определения ее размеров к ране прикладывали покровное стекло и переносили (срисовывали) на него контуры раны. Стекла с нанесенными контурами оцифровывали с помощью сканера в графический файл формата «BMP». Площади ран определяли с помощью программы Adobe Photoshop CS (version 8.0): устанавливали экранную решетку со стороной квадрата 0.25 мм^2 , а затем подсчитывали количество квадратов, охватываемых контуром раны.

Исследуемые препараты наносили на раны с помощью металлического шпателя в количестве, достаточном для полного покрытия раны. Курс лечения - 5 дней. В процессе эксперимента проводили ежедневную оценку состояния раны: формирование струпа, состояние струпа, наличие периферической эпителизации, отечность и гиперемия краев раны, заживление и степень восстановления кожного покрова. Оценка состояния ран проводили индивидуально для каждого животного.

При оценке течения раневого процесса большое значение имеет объективная классификация как стадии заживления, так и характера самой раны. При анализе раневого процесса мы придерживались классификации, предложенной Кузиным М.И. [Раны и раневая инфекция. Руководство для врачей // под ред. Кузина М.И., Костюченко Б.М. - М.: Медицина, 1990. - 592 с.], согласно которой этот процесс можно разделить на три фазы: I - фаза воспаления, которая делится на период сосудистых изменений и период очищения раны от некротических (погибших) тканей; II фаза - регенерации, образования и созревания грануляционной ткани; III фаза - реорганизация рубца и эпителизация.

Экспериментальные данные, полученные нами на модели ожоговых ран, индуцированных у лабораторных мышей, свидетельствуют о высокой лечебной активности заявляемой композиции. Эффективность ее ранозаживляющего действия оставалась выше, чем у остальных исследованных препаратов, в течение всего эксперимента и достигала максимальной 100%-ной величины на 12 день после индукции раневого процесса. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Сравнительная оценка действия заявляемой композиции на процесс заживления ожоговых ран в сравнении с прототипом и коммерческими препаратами наружного применения

№ п/п	Экспериментальные группы животных	Кол-во животных в группе	Режим применения	7 день	12 день
				Заживление, % ($m \pm \omega$)	Заживление, % ($m \pm \omega$)
1	Интактный контроль	6	-	61,2 $\pm$ 5,6	91,5 $\pm$ 4,2
2	Заявляемая композиция	6	5 дней	79,2 $\pm$ 6,7	100 $\pm$ 0
3	Гелевая композиция	6	5 дней	75,4 $\pm$ 5,8	92 $\pm$ 5,2
4	«Синафлан»	6	5 дней	74,6 $\pm$ 7,3	95 $\pm$ 4,4
5	«Фуцидин»	6	5 дней	78,2 $\pm$ 6,2	93 $\pm$ 5,0
6	«Метилурацил»	6	5 дней	71,6 $\pm$ 6,4	97 $\pm$ 4,6

Таким образом, заявляемая композиция обладает выраженным лечебным действием на процесс заживления ожоговых ран. Она проявляет большую эффективность, чем гелевая композиция (прототип), а также базовые коммерческие препараты сравнения.

Пример 4. Фармакологическая оценка ранозаживляющего действия заявляемой композиции в отношении лоскутных ран.

Экспериментальная работа была проведена на беспатогенных мышах линии CD1, которым наносили лоскутные раны. Для получения экспериментальных лоскутных ран волосяной покров удаляли так же, как при нанесении термических ран. Затем маленьким анатомическим пинцетом оттягивали кожную складку, зажимая в пинцет около 1 мм кожи, после чего срезали кожу непосредственно под концами пинцета с помощью глазных ножниц. Нанесение мазей начинали на 2 день, предварительно измеряя размер раны. Определение размеров лоскутных ран проводили, как описано выше для ожоговых ран. Курс лечения проводился в течение 5 дней. Оценка состояния ран проводили индивидуально для каждого животного.

Экспериментальные данные, полученные нами на модели лоскутных ран, индуцированных у лабораторных мышей, свидетельствуют о высокой лечебной активности заявляемого препарата. Эффективность ранозаживляющего действия заявляемой композиции, которая на 12 день после индукции раневого процесса вызывает 100%-ное заживление лоскутных ран, оказалась выше, чем у гелевой композиции и ряда коммерческих препаратов местного применения. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

Сравнительная оценка действия заявляемой композиции на процесс заживления лоскутных ран в сравнении с гелевой композицией и коммерческими препаратами наружного применения

№ п/п	Экспериментальные группы животных	Кол-во животных в группе	Режим применения	7 день	12 день
				Заживление, % ($m \pm \omega$)	Заживление, % ($m \pm \omega$)
1	Интактный контроль	7	-	$66,8 \pm 5,6$	$90,3 \pm 3,7$
2	Заявляемая композиция	6	5 дней	$80,3 \pm 4,5$	100 ± 0
3	Гелевая композиция	7	5 дней	$76,6 \pm 5,6$	$97,2 \pm 4,0$
4	«Синафлан»	6	5 дней	$78,2 \pm 7,8$	$96,4 \pm 3,5$
5	«Фуцидин»	6	5 дней	$77,5 \pm 7,2$	$98,5 \pm 4,2$
6	«Метилурацил»	6	5 дней	$78,6 \pm 7,3$	$94,8 \pm 4,0$

Таким образом, заявляемая композиция обладает выраженным стимулирующим действием на процесс заживления лоскутных ран. Как и в случае ожоговых ран, она проявляет большую эффективность, чем гелевая композиция и ряд известных коммерческих препаратов, предназначенных для наружного применения при различных заболеваниях кожи.

Пример 5. Фармакологическая активность заявляемой композиции на модели аллергического контактного дерматита (АКД).

АКД - это кожное воспалительное заболевание, которое опосредуется Т-клетками и вызывается повторным воздействием на кожу контактных аллергенов. Патогенез АКД связан поляризацией субпопуляций клеток в сторону Т-хелперного 2 пути и с соответствующим изменением цитокинового профиля. Во время развития АКД основная роль отводится антиген-презентирующим клеткам. При раздражении антигеном функционирование иммунной системы находится под контролем многочисленных молекулярных и клеточных механизмов. При этом существуют крайне сложные взаимодействия различных видов клеток иммунной системы: антиген-презентирующих дендритных клеток, или клеток Лангерганса, Т- и В-клеток, естественных киллерных лимфоцитов, кератиноцитов, клеток эндотелия, тучных клеток и тромбоцитов. Следует отметить, что эти комплексные взаимодействия происходят под управлением многочисленных цитокинов и хемокинов [Watanabe H. et al. Contact hypersensitivity: The mechanism of immune responses and T cell balance. / J. Interferon. Cytokine Res. 2002. V. 22. P. 407-412].

Аллергические реакции кожи регулируют комплексные препараты, содержащие глюкокортикоиды, антигистаминные препараты, стабилизаторы тучных клеток и иммуносупрессоры. Эти лекарственные средства оказывают сильное противоаллергическое действие, но их длительное использование представляет большую проблему из-за выявленных сильных побочных эффектов [Martin S.F. Contact dermatitis: from pathomechanisms to immunotoxicology // Exp.Dermatol. 2012. V. 21(5). P. 382-389].

Поэтому неслучайно, что в настоящее время все большее внимание привлекают универсальные соединения, которые обладают высокой противовоспалительной, ранозаживляющей, противомикробной и другими фармакологическими активностями. В серии фармакологических экспериментов нами определена эффективность лечебного действия заявляемой композиции на экспериментальной модели АКД.

5.1 Действие заявляемой композиции на эритему кожи ушей, вызванной

динитрофторбензолом.

АКД ушей, индуцированный ДНФБ, представляет собой признанную во всем мире экспериментальную модель данного заболевания [Yuan X.Y. et al. Effects and mechanisms of alopentine on 2, 4-dinitrofluorobenzene-induced allergic contact dermatitis in BALB/c mice // Eur. J. Pharm. 2010. V. 629, №1-3, P. 147-152]. ДНФБ (Sigma, США) растворяли в смеси (ацетон:оливковое масло=4:1) и использовали в качестве индуктора АКД. Шерсть выбривали в области брюшины. Для активной сенсибилизации 100 мкл 0,5%-ного ДНФБ наносили однократно на выбритый участок. Через пять дней на внутреннюю и внешнюю поверхность ушей наносили по 20 мкл 0,2%-ного раствора ДНФБ. Через два дня животным повторно наносили аллерген на оба уха для индукции обширной воспалительной реакции. Лечение начинали на следующий день после последнего нанесения аллергена. В качестве положительного контроля использовали гелевую композицию и коммерческие препараты местного применения «Синаflan», «Фуцидин» и «Метилурацил». Мази наносили на оба уха один раз в день, в течение 4-х дней. Дерматит оценивали в баллах по следующей шкале: 1 - незначительное шелушение; 2 - шелушение, инфильтрация, гиперемия; 3 - серозные корочки; 4 - язвы.

Как видно из данных, приведенных на фиг. 1, местное применение заявляемой композиции в течение 4 раз приводит к гораздо более значительному лечебному эффекту, чем при использовании гелевой композиции и коммерческих препаратов сравнения.

5.2 Действие заявляемой композиции на гистопатологические изменения кожи ушей при дерматите.

Для оценки гистопатологических изменений тканей брали биопсийные пробы ушей размером 5 мм и фиксировали в 10%-ном растворе формальдегида, а затем заливали в парафин и производили тонкие срезы с использованием микротомы. После этого срезы кожи окрашивали гематоксилином и эозином и полученные образцы анализировали с помощью микроскопа.

Проведенный нами гистологический анализ позволил продемонстрировать, что увеличение толщины ушей, индуцированное ДНФБ, и инфильтрация лейкоцитов в эпидермисе и дермисе наиболее эффективно нормализуется последовательным лечением в течение 4 дней заявляемой композицией. При этом гелевая композиция, содержащая трипантин в высокой дозе (в 5-10 раз выше, чем в составе заявляемой композиции), и препарат «Синаflan», содержащий кортикостероид, по своей эффективности лечебного действия при АКД уступают заявляемой композиции (фиг. 2 а-г).

5.3 Действие заявляемого препарата на уровень содержания цитокинов в плазме крови экспериментальных животных при АКД.

Изменения в уровне продукции цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10, ИНФ- γ , ГМ-КСФ, ТРФ β -1, ФНО- α и др.) рассматриваются в качестве важного патогенетического механизма иммунозависимых заболеваний, одним из которых является АКД. В контексте современных тенденций иммунотерапии цитокины являются маркерами прогноза и течения этого заболевания, а также потенциальными терапевтическими мишенями. Исследование цитокинового профиля при АКД позволяет оценить характер воспаления, а также назначить соответствующую противовоспалительную терапию.

Уровни цитокинов определяли с использованием иммуноферментного анализа в образцах плазмы крови. Пробы сыворотки крови были взяты через 24 ч после последнего лечения. Сравнительную оценку уровней содержания цитокиновых белков проводили с использованием наборов BD ELISA Set Mouse (BD Biosciense, США) для интерлейкинов ИЛ-1, 2, 4, 10, а также для интерферона гамма (ИНФ- γ), фактора некроза опухоли (ФНО- α), трансформирующего фактора роста (ТРФ β -1) и гранулоцитарно-

моноцитарного колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) в соответствии с инструкциями. В каждой экспериментальной группе определяли относительное содержание цитокинов, выраженное в средних показателях оптической плотности при длине волны 450 нм.

Как видно из данных, приведенных на фиг. 3, местное применение заявляемой композиции приводит к выраженному уменьшению локальной секреции исследованных цитокинов, но не в одинаковой степени. Можно видеть, что заявляемая композиция по уровню ингибирования цитокинов заметно превосходит гелевую композицию (прототип), что указывает на эффективность ее противовоспалительного и нормализующего действия при АКД, индуцированном ДНФБ.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что заявляемая композиция может успешно заменить многие известные коммерческие мазевые препараты при лечении АКД и других воспалительных кожных заболеваний.

Пример 6. Противомикробная активность заявляемой композиции.

При исследовании противомикробных свойств заявляемой композиции сравнили ее эффективность с гелевой композицией. Оценка эффективности противомикробного действия произведена по образованию зон ингибирования роста микробных культур на поверхности агар-агара вокруг образца. Образец (в объеме 100 мкл) наносили непосредственно на агаровую пластинку, засеянную соответствующими тест-культурами. Учет результатов тестирования проводили через 24 ч (для заявляемой и гелевой композиций) и 48 ч (для заявляемой композиции).

Данные по антимикробной активности представлены в таблице 3.

Таблица 3				
Противомикробная активность				
Концентрация триптантрина, в мкг на 100 мкл	Зона ингибирования тест культуры, в мм			
	Staphylococcus aureus ATCC 21027 ^T	Candida albicans KMM 455	Bacillus subtilis ATCC 6633 ^T	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 ^T
Заявляемая композиция				
20	14 мм через 24 ч 25 мм через 48 ч	12 мм через 24 ч	12 мм через 24 ч	10 мм через 24 ч
10	10 мм через 24 ч 20 мм через 48 ч	-	-	-
Гелевая композиция (прототип)				
20	27 мм через 24 ч	16 мм через 24 ч	12 мм через 24 ч	-
10	27 мм через 24 ч	16 мм через 24 ч	12 мм через 24 ч	-

Анализ противомикробной активности показывает, что все тестируемые культуры микроорганизмов проявляют чувствительность к заявляемой композиции в дозе 20 мкг в 100 мкл. При этом нами зарегистрирована наибольшая активность в отношении Staphylococcus aureus - опасного патогена, вызывающего тяжелые гнойные инфекции.

Действие композиции против этого штамма стафилококка носит дозозависимый характер. В дозе 10 мкг на 100 мкл заявляемый препарат сохраняет активность в отношении *Staphylococcus aureus*, но не проявляет активности в отношении остальных исследованных штаммов микроорганизмов. Следует отметить, что с увеличением
 5 времени экспозиции с 24 до 48 ч активность заявляемой композиции возрастает, что может быть связано с постепенной диффузией триптантрина из гидрофобно-гидрофильной основы.

Пример 7. Определение цитотоксической активности триптантрина *in vitro* в отношении различных линий опухолевых клеток.

10 Для определения цитотоксической активности в отношении опухолевых клеток триптантрина как основного активного компонента заявляемой композиции использовали стандартный MTS-метод (усовершенствованная модификация МТТ-метода) [Barltrop J. et. al. // J. Bioorg. Med. Chem. Lett. 1991. V. 11. P. 611-614].

Опухолевые клетки высевали в 96-луночные планшеты из расчета 60000 клеток в 50
 15 мкл клеточной суспензии на 1 лунку. Планшеты инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 1 суток. К 50 мкл уже имеющейся в каждой лунке клеточной суспензии добавляли еще 50 мкл раствора исследуемых веществ в соответствующей среде. По завершении инкубирования в каждую лунку добавляли по 20 мкл MTS-реагента. Затем
 20 планшеты инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ еще в течение 2 часов. После чего оптическую плотность среды в каждой лунке регистрировали с помощью спектрофотометрического планшетного ридера при 492 нм. Количество живых клеток (N, в %) оценивали по сравнению с контролем по формуле:

$$N = (I_{\Sigma} / I_K) \times 100\%, \quad (3)$$

25 где I_{Σ} - это интенсивность поглощения среды в каждой экспериментальной лунке;

I_K - среднее значение полученных результатов для лунок со 100%-ным контролем.

Определение цитотоксической активности триптантрина в отношении опухолевых клеток *in vitro* проводили с использованием асцитной опухоли Эрлиха, а также
 30 лейкоэмических клеток линий ТНР-1 и HL-60. Как видно из данных, приведенных на фиг. 4а-с, триптантрин обладает выраженной дозозависимой ингибирующей активностью в отношении исследованных линий опухолевых клеток. При этом ингибирующие концентрации триптантрина, вызывающие 50%-ное ингибирование
 35 роста опухолевых клеток (IC₅₀), составляют следующие величины: для человеческих лейкоэмических опухолевых клеток HL-60 IC₅₀=5,8 мкг/мл; для мышинных асцитных опухолевых клеток Эрлиха IC₅₀=6,68 мкг/мл. Значение IC₅₀ для человеческих лейкоэмических опухолевых клеток ТНР-1 составляет около 10 мкг/мл (фиг. 4а-с).

Таким образом, хиназолиновый алкалоид триптантрин обладает высокой ингибирующей активностью в отношении исследованных линий опухолевых клеток.
 40 Поскольку концентрация триптантрина в заявляемой композиции как минимум на порядок выше (в среднем 100 мкг на 1 г мазевой основы), чем необходима для ингибирования роста опухолевых клеток *in vitro*, то можно предположить, что она будет эффективна при лечении кожных опухолевых образований разной этиологии. В
 45 связи с этим заявляемая композиция может быть рекомендована для исследований ее противоопухолевой активности *in vivo* в отношении различных злокачественных новообразований кожи.

Формула изобретения

Фармацевтическая композиция, обладающая лечебным действием при различных

кожных патологиях, включающая триптантрин, хитозан и дистиллированную воду, отличающаяся тем, что она дополнительно содержит ланолин-вазелиновую смесь и белково-нуклеиновый гидролизат молока лососевых рыб при следующем соотношении компонентов, мас. %:

5	Триптантрин	0,005-0,015
	Хитозан	1,0-1,2
	Ланолин-вазелиновая смесь	40,0-50,0
	Белково-нуклеиновый гидролизат	1,0-2,0
	Дистиллированная вода	остальное

10

15

20

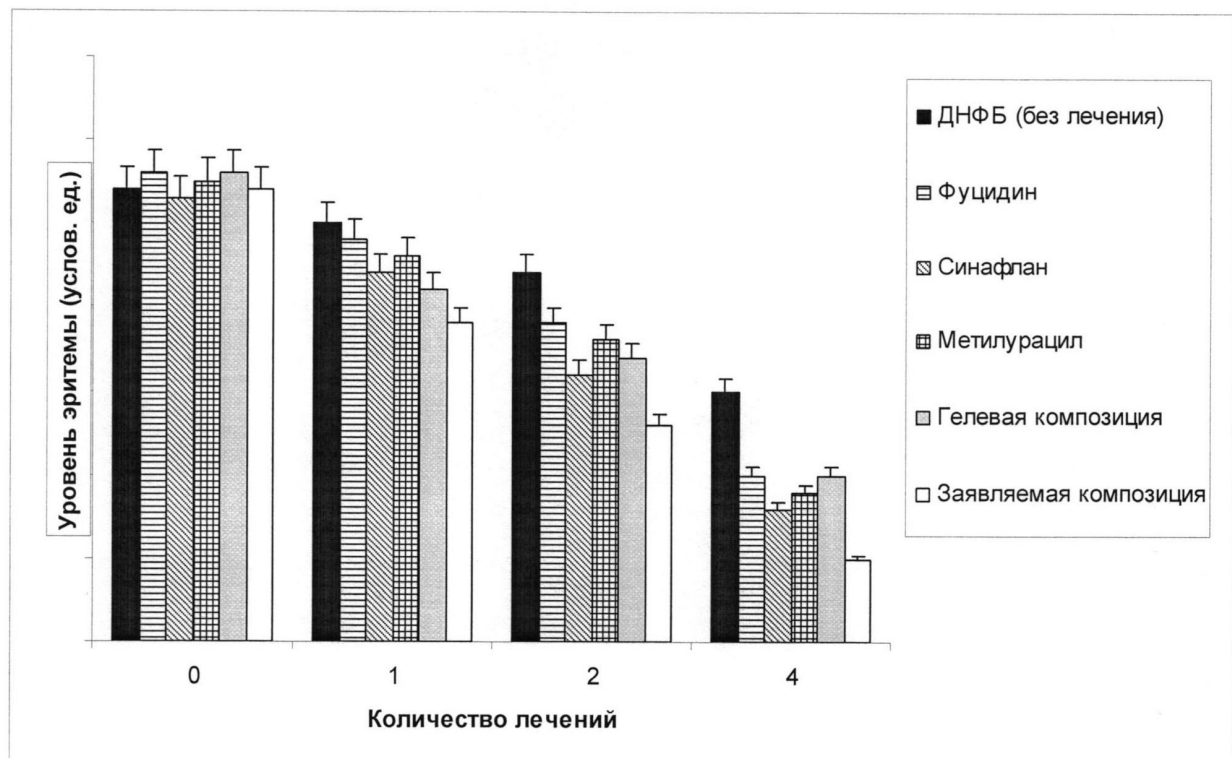
25

30

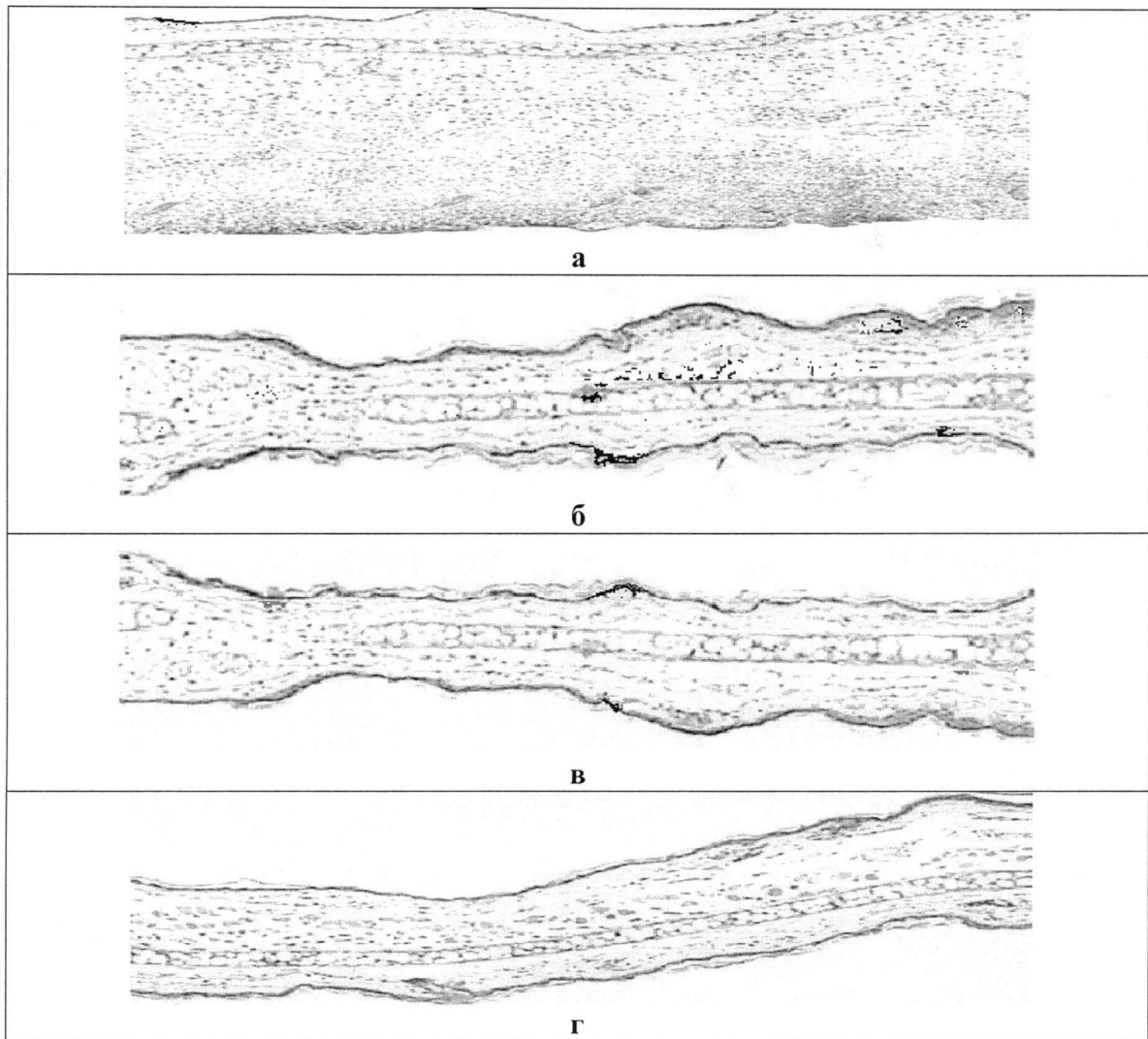
35

40

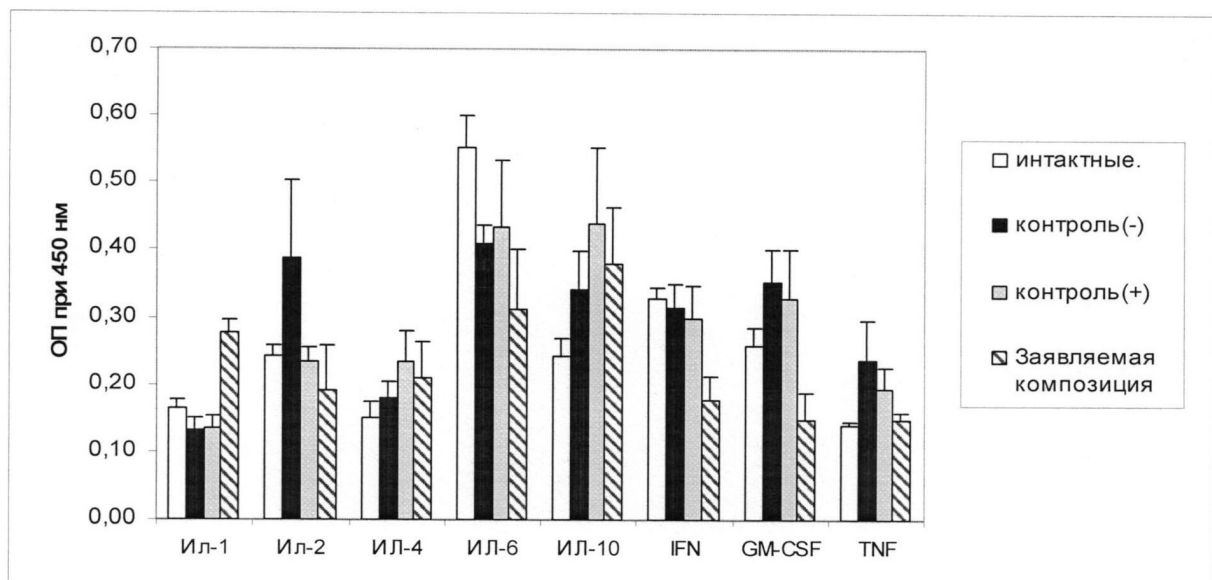
45



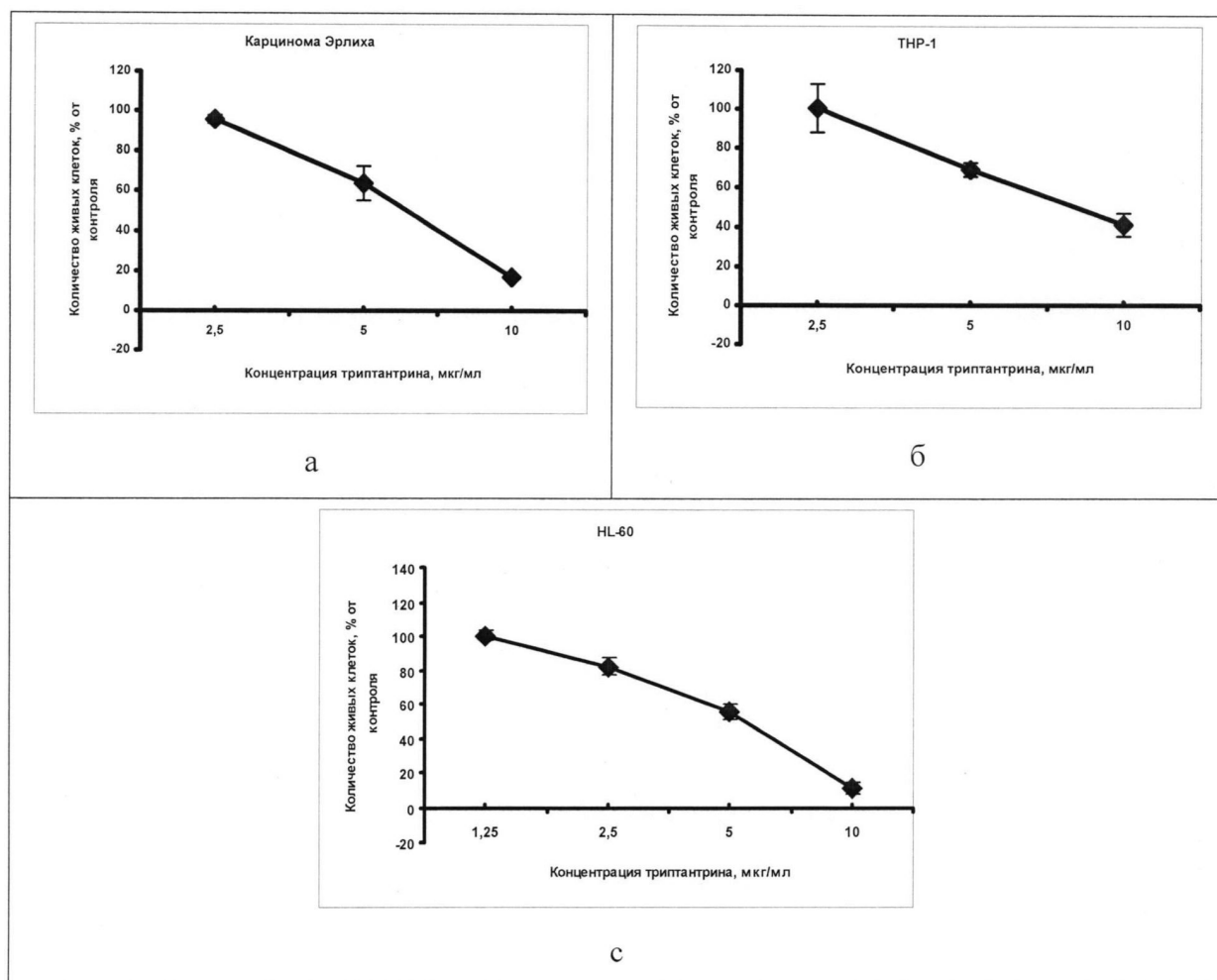
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4