



УКРАЇНА

(19) UA (11) 47002 (13) U
(51) МПК (2009)
A61K 9/02
A61K 35/66
A61P 5/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ЛІКУВАЛЬНО-ПРОФІЛАКТИЧНИЙ ЗАСІБ У ФОРМІ СУПОЗИТОРІЇВ ДЛЯ ФАРМАКОКОРЕКЦІЇ ВАГІНАЛЬНИХ ДИСБІОЗІВ

1

(21) u200908191
(22) 03.08.2009
(24) 11.01.2010
(46) 11.01.2010, Бюл.№ 1, 2010 р.
(72) КАЛЮЖНАЯ ОЛЬГА СЕРГІЇВНА, СТРЕЛЬНИКОВ ЛЕОНІД СЕМЕНОВИЧ, СТІЛЕЦЬ ОКСАНА ПЕТРІВНА, КАБАЧНИЙ ГЕННАДІЙ ІВАНОВИЧ
(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
(57) 1. Лікувально-профілактичний засіб у формі супозиторіїв для фармакокорекції вагінальних дисбіозів, виконаний на жировій основі, що містить ліофілізовану мікробну біомасу живих біфідобактерій та лактобактерій у співвідношенні 1:1, який **відрізняється** тим, що загальний вміст лактобактерій та біфідобактерій становить не менше $2 \cdot 10^7$ КУО на одну дозу, а засіб додатково містить розчин кислоти молочної та твін-80 при наступному співвідношенні компонентів у г на один супозиторій:

2

ліофілізована біомаса	
біфідо- та лактобактерій (1:1)	0,050-0,070
розчин кислоти молочної	0,005-0,015
твін-80	0,029-0,031
жирова основа	до 3,0.

2. Засіб за п. 1, що містить біфідобактерії переважно штаму *Bifidobacterium bifidum* №1, №791 або ЛВА-3, який **відрізняється** тим, що містить лактобактерії переважно штаму *Lactobacillus plantarum* 8R-A3 або *Lactobacillus fermenti* 90T-C4, молочну кислоту у формі 80% водного розчину та твердий жир як жирову основу при наступному співвідношенні компонентів у г на один супозиторій:

ліофілізована біомаса	
біфідо- та лактобактерій (1:1)	0,0603
розчин кислоти молочної	0,01
твін-80	0,03
твердий жир	до 3,0.

Корисна модель відноситься до фармації, медицини та біотехнології, а саме до препаратів у формі супозиторіїв із вмістом мікробної маси живих бактерій для профілактики та лікування вагінальних дисбіозів і може бути використана в акушерсько-гінекологічній практиці.

В останні роки багато уваги приділяється мікроекології урогенітального тракту, що містить близько 10% всієї мікрофлори здорової жінки. Підвищений інтерес до даної мікроекосистеми в значній мірі пояснюється тим, що роль еволюційно сформованих популяцій піхвового біотопу полягає не тільки у підтримці колонізаційної резистентності сечостатевої системи, але й у формуванні мікрое-

кологічного здоров'я немовлят, людської популяції в цілому.

На сьогодні основне місце серед всіх гінекологічних патологій займають запальні захворювання репродуктивної системи жінок, які пов'язані з розвитком полімікробного інфекційного процесу та можуть бути викликані як специфічними патогенами, так і представниками умовно-патогенної мікрофлори. До цих пір основними терапевтичними засобами у боротьбі з урогенітальними інфекціями є антибіотики. У той же час, широке використання антибіотиків та сульфаніламідних препаратів призвело до виникнення ряду небажаних наслідків, головними з яких є формування у мікроорганізмів

(13) U

(11) 47002

(19) UA

стійкості до ці: препаратів, поява перехресної антибіотико-резистентності, а також якісні та кількісні зміни мікрофлори урогенітального тракту, які є характерними для розвитку дисбактеріозів.

У зв'язку з вищевикладеним, особливого значення набуває створення нових безпечних препаратів, що не мають протипоказань, для відновлення мікробіоценозу організму та одночасного запобігання або лікування урогенітальних інфекцій.

Відома фармацевтична композиція [1], що містить в якості активних компонентів мікробну масу живих ацидофільних лактобактерій та протимікробний агент, а також живильне середовище та фактори росту лактобактерій для попередження урогенітальних інфекцій. Препарат містить фармацевтично допущені наповнювачі та являє собою вагінальні супозиторії, мазь, крем, пасту або гель. Відмітною особливістю композиції є використання облігатних компонентів нормальної урогенітальної мікрофлори організму.

Недоліками композиції є: по-перше, препарат містить антибіотик, що знижує лікувально-профілактичну дію лактобактерій та потребує їх високої концентрації (більш $1 \cdot 10^9$ клітин на дозу), що, в свою чергу, нераціонально з економічної точки зору; по-друге: застосування лактовмістних препаратів обмежене при наявності мікозів.

Відомий також препарат [2], що містить в якості активного компонента мікробну масу живих біфідобактерій (переважно він містить 10^3 - 10^6 живих клітин *Bifidobacterium bifidum* №1, №791 або ЛВА-3 на одну дозу) та в якості інгредієнтів імуномодуючої, регенеруючої, протекторної дії - лізоцим, інтерферони, імуноглобуліни, гіалуронову кислоту, біологічно активні пептиди, а також протимікробні, протівірусні або протимікотичні агенти. Препарат може містити фармацевтичні цільові добавки та застосовуватись в вигляді супозиторіїв, мазі, крему, пасти або гелю.

Недоліком відомої композиції є використання одного виду пробіотичного мікроорганізму, який, до того ж, невластивий мікрофлорі урогенітального тракту жінки, що знижує його шанси на адгезію до епітеліальних клітин піхви, а отже й на повноцінну дію в урогенітальному тракті жінки. Крім цього, наявність протимікробних компонентів у складі препарату знижує його терапевтичну ефективність.

За найближчий аналог обрано лікувально-профілактичний препарат [3] у формі супозиторіїв із вмістом мікробної маси живих біфідобактерій (штам *Bifidobacterium bifidum* №791 або ЛВА-3) та лактобактерій (штам *Lactobacillus acidophilus* 317/402) при співвідношенні 1:1 та загальній кількості не менше 10^7 КУО на дозу. Засіб містить додаткові біологічно активні інгредієнти та вітаміни, а в якості основи - парафін, жир кондитерський або масло какао. Вміст компонентів на дозу становить, мг:

суха мікробна маса бактерій	10,0-100,0
біологічно активні інгредієнти	0,01-100,0
вітамін Є	6,0-10,0
вітамін С	1,0-2,0
основа	до 2000.

До недоліків відомого засобу можна віднести обмеженість застосування лактовмістних препаратів при наявності мікозів та недостатній рівень пробіотичної активності через нераціональний вибір основи.

Завданням корисної моделі є створення нового засобу у формі супозиторіїв із вмістом ліофілізату живих біфідо- та лактобактерій для профілактики та лікування вагінальних дисбіозів різної етіології шляхом оптимальної комбінації інгредієнтів, в результаті досягаються висока життєздатність клітин мікроорганізмів та підвищення пробіотичної активності препарату, наслідком чого є підвищення лікувальної ефективності засобу.

Поставлене завдання вирішується таким чином, що у лікувально-профілактичному засобі у формі супозиторіїв для фармакокорекції вагінальних дисбіозів, виконаному на жировій основі, який містить ліофілізовану мікробну біомасу живих біфідобактерій та лактобактерій у співвідношенні 1:1 згідно з корисною моделлю шредбачено, що засіб має загальний вміст біфідобактерій та лактобактерій не менше $2 \cdot 10^7$ КУО на дозу та додатково містить кислоту молочну та твін-80 при наступному співвідношенні компонентів у г на один супозиторій:

ліофілізована біомаса	
біфідо- та лактобактерій (1:1)	0,050-0,070
розчин кислоти молочної	0,005-0,015
твін-80	0,029-0,031
жирова основа	до 3,0.

Корисною моделлю також передбачено, що засіб, який містить біфідобактерії переважно штаму *Bifidobacterium bifidum* №1, №791 або ЛВА-3 у відповідності з корисною моделлю містить лактобактерії переважно штаму *Lactobacillus plantarum* 8R-A3 або *Lactobacillus fermenti* 90T-C4, молочну кислоту у формі 80% водного розчину та твердий жир в якості жирової основи при наступному співвідношенні компонентів у г на один супозиторій:

ліофілізована біомаса	
біфідо- та лактобактерій (1:1)	0,0603
розчин кислоти молочної	0,01
твін-80	0,03
твердий жир	до 3,0.

Запропоновані авторами мікроорганізми, що входять до складу заявленого препарату, є представниками нормофлори людського організму та охоплюють спектр бактерій, при порушенні кількості яких виникають певні патології, зокрема бактеріальні вагінози. Лактобактерії - основний вид мікроорганізмів, що складають основу мікрофлори урогенітального тракту жінки, тому їх наявність є обов'язковою. Наявність біфідобактерій сприяє підвищенню біологічної активності лактобактерій.

Вибір штамів біфідо- та лактобактерій було здійснено експериментальним шляхом, виходячи з умов забезпечення максимальної ефективності, біодоступності заявленого засобу та можливостей використання ліофілізатів сухих бактерій на вітчизняних фармпідприємствах.

Для посилення антимікробних та антигрибкових властивостей лікарської форми до складу препарату вводили кислоту молочну, яка являє собою біологічно безпечний продукт для макроорганізму

та не впливає на життєздатність клітин пробіотичних мікроорганізмів. Введення цього компоненту дозволяє зменшити лужність, що характерно для вагінальних дисбіозів, додатково посилити пробіотичну активність лакто- та біфідобактерій, знизити ризик росту дріжджеподібних грибів, що активізуються при місцевому застосуванні лактовмісних препаратів.

Експериментальним шляхом визначено, що використання в якості супозиторної основи твердого жиру з додаванням емульгатору твіну-80 забезпечує життєздатність клітин пробіотичних культур та повноту вивільнення кислоти молочної.

Механізм дії заявленого засобу полягає у знищенні частини патогенної урогенітальної мікрофлори, зокрема грибів роду кандиди, за допомогою кислоти молочної; блокуванні розмноження та розвитку патогенної та умовно-патогенної флори, що залишилася, за рахунок антагоністичної дії та адгезії мікробного компоненту препарату - пробіотичних культур; інтенсивному росту та розвитку лакто- та біфідобактерій за рахунок залишків компонентів живильного середовища та кислоти молочної, що створює сприятливе пробіотичним культурам кисле середовище; створенні в результаті нормальної урогенітальної мікрофлори, що забезпечує природний гомеостаз піхви, що, в свою чергу, є бар'єром для інфікування патогенною та умовно-патогенною мікрофлорою.

Кількісний вміст всіх компонентів заявленої корисної моделі визначений експериментальним шляхом, невідомий з джерел інформації і є найбільш прийнятним для досягнення ефективної фармакологічної дії, а також забезпечення високих властивостей супозиторіїв як лікарської форми.

Корисна модель ілюструється прикладами:

Приклад 1

Для отримання 100 супозиторіїв подрібнювали необхідну кількість сухої маси бактерій (6,03г), розплавляли твердий жир при температурі 50-55°C (289,97г). Далі твердий жир охолоджували до температури 36-38°C.

В ємність з твіном-80 (3г) додавали розчин кислоти молочної (1г) та нагрівали на водяній бані до 36-38°C при постійному перемішуванні до утворення гомогенної маси. Отриману суміш перемішували з частиною розплавленого твердого жиру, отримуючи концентрат №1. До залишку твердого жиру додавали суміш мікроорганізмів та диспергували при температурі 36-38°C протягом 30±5хв, отримуючи концентрат №2. Після чого проводили перемішування концентратів протягом 120хв при температурі 36-38°C.

Супозиторну масу дозували шляхом виливання у форми по 3г, які попередньо охолодили та змастили мильним спиртом. Супозиторії охолодили до повного застигання, після чого вилучили з форми та упаковували. Таким чином отримували 100 супозиторіїв наступного складу у г на один супозиторій масою 3,0г:

ліофілізована біомаса	
біфідо- та лактобактерій (1:1)	0,0603
розчин кислоти молочної	0,01
твін-80	0,03
твердий жир	до 3,0.

Приклад 2

Специфічну активність пробіотичних препаратів визначали *in vitro* за показниками антагоністичної активності, яку вивчали за декількома загальноприйнятими у мікробіологічній практиці методиками: спільного культивування та перпендикулярних штрихів, та за адгезійними властивостями. В якості порівняння використовували профілактично-гігієнічні засоби "Лактоваг" (ТУ У 24.4-22676945-001-2003) та "Біфолак" (ТУ У 24.4-22676945-002-2004), що містять пробіотичні штами *Lactobacillus acidophilus* Probio Tec LA-5 та *Bifidobacterium bifidum* Probio Tec BB-12, відповідно. Метод перпендикулярних штрихів полягає у визначенні зон затримки росту тест-штамів. За методом спільного культивування культури та досліджуваного штаму визначають титр - найбільше розведення посівного матеріалу, з якого висівается тест-культура.

Результати антагоністичної активності заявленого засобу за методом відстроченого антагонізму у порівнянні з референс-засобами наведені в табл.1, відповідно.

Таблиця 1

Антагоністична активність заявленого засобу за методом спільного культивування у порівнянні з референс-засобами

Об'єкт дослідження	Титр тест-мікроорганізмів		
	E.coli 25922	S.aureus 25923	C.albicans 885-653
Заявлений засіб	1	1	1
"Лактоваг"	4	3	4
"Біфолак"	6	4	7

Примітка: n=5.

При спільному культивуванні тест-культур з пробіотичними культурами, що складають основу заявленого препарату, встановлено, що антагоністичний індекс (титр) в досліді з *E.coli* ATCC 25922, *S.aureus* 25923 та *C.albicans* ATCC 885-653 дорівнює - 1, мікроорганізми, що складають основу препаратів "Лактоваг" та "Біфолак" характеризувалися меншою активністю, про що свідчать нижчі значення антагоністичного титру -4, -3, -4 та -6, -4, -7, відповідно.

Результати дослідження антагоністичної активності заявленого засобу за методом перпендикулярних штрихів у порівнянні з референс-засобами наведені в табл.2.

Таблиця 2

Антагоністична активність заявленого засобу за методом перпендикулярних штрихів у порівнянні з референс-засобами

Тест-штам	Заявлений засіб	"Біфолак"	"Лактоваг"
	Зона затримки росту тест-штамів, (M±m) мм		
E.coli ATCC 25922	22,2±0,5	19,3±0,2	20,1±0,3
S.aureus ATCC 25923	25,6±0,6	21,2±0,2	21,2±0,2
B.subtilis ATCC 6633	17,8±0,5	16,1±0,3	15,9±0,3
Pr.vulgaris ATCC 6896	16,4±0,8	14,6±0,2	14,5±0,7
Ps.aeruginosa ATCC 7853	20,8±0,5	17,9±0,8	18,3±0,2
C.albicans ATCC 885-653	36,4±0,6	29,5±0,1	29,3±0,4

Примітка: n=5, P=95%, M±m - довірчий інтервал.

За даними, що наведені в табл.2, бачимо, що антагоністичні властивості лакто- та біфідобактерій, що складають основу заявленого засобу, по відношенню до тест-штамів, що є представниками різних видів грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів та грибів, вищі ніж мікроорганізмів, що складають основу) препаратів порівняння "Біфолак" та "Лактоваг".

Дослідження адгезивного процесу мікроорганізмів проводили за експрес-методом на еритроцитах людини, які використовували в якості універсальної моделі клітин макроорганізму.

Адгезивні властивості мікроорганізмів оцінювали за такими показниками як СПА - (середній показник адгезії - середня кількість мікроорганізмів, що прикріпилася до одного еритроцита при

підрахунку не менш ніж 25 еритроцитів враховуючи не більше 5 еритроцитів в одному полі зору), К (коефіцієнт участі еритроцитів в адгезивному процесі - відсоток еритроцитів, що мають на своїй поверхні адгезовані мікроорганізми) та ІАМ (індекс адгезивності мікроорганізма - середня кількості мікробних клітин на одному еритроциті), що наведені в табл.3.

Адгезивність вважали нульовою при СПА від 0 до 1,0, низькою - від 1,01 до 2,0, середньою - від 2,01 до 4,0 та високою при СПА понад 4,0. Мікроорганізм вважали неадгезивним при ІАМ≤1,75, низькоадгезивним - від 1,76 до 2,5, середньоадгезивним - від 2,51 до 4,0 та високоадгезивним при ІАМ понад 4,0.

Таблиця 3

Показники адгезивних властивостей штамів біфідо- та лактобактерій заявленого засобу у порівнянні зі штамми референс-засобів

Об'єкт дослідження	Показники адгезії		
	СПА, (M±m) клітин	К, (M±m) еритроцитів	ІАМ, (M±m) кл./ер.
Мікроорганізми, що складають основу заявленого засобу	2,78±0,05	72,78±0,85	3,82±0,18
Мікроорганізми, що складають основу "Біфолак"	2,65±0,20	71,51±0,21	3,71±0,07
Мікроорганізми, що складають основу "Лактоваг"	2,71±0,12	72,03±0,31	3,76±0,31

Примітка: n=5, P=95%, M±m - довірчий інтервал.

Отже, всі пробіотичні штами відносяться до середньоадгезивних, так як СПА>2, ІАМ>2,5, але показники адгезивних властивостей мікроорганізмів, що складають основу заявленого засобу, значуще вищі ніж для мікроорганізмів, що складають основу препаратів порівняння.

Приклад 3

Специфічну активність заявленого засобу у формі супозиторіїв вивчали у дослідях in vitro за стандартним методом дифузії в агар (метод "ко-

лодязів") на референтних штаммах тест-культур УКМ (для виключення росту лакто- та біфідобактерій використовували селективні для тест-штамів середовища). В якості контролю використовували розчин кислоти молочної, що використовується в акушерсько-гінекологічній практиці для зрощування піхви при місцевому лікуванні бактеріальних вагінозів. Результати експерименту наведені в табл.4.

Таблиця 4

Антибактеріальна активність заявленого засобу у порівнянні з розчином кислоти молочної

Тест-штам	Діаметри зон затримки росту, мм*	
	Заявлений засіб	Розчин кислоти молочної
E.coli ATCC 25922	14,3±0,1	15,3±0,1
S.aureus ATCC 25923	15,8±0,1	16,9±0,1
B.subtilis ATCC 6633	15,6±0,2	17,0±0,1
Pr.vulgaris ATCC 6896	14,0±0,1	15,1±0,1
Ps.aeruginosa ATCC 7853	13,1±0,1	14,5±0,1
C.albicans ATCC 885-653	11,0±0,2	11,0±0,1

Примітки: n=5, p<0,05 - відхилення показника достовірне у порівнянні з контролем.

Аналіз зон затримки росту тест-штамів свідчить про достатньо високий рівень антибактеріальної та антимікотичної активності заявленого засобу. Проте використання супозиторіїв, як лікарського засобу, значно зручніше, ніж розчину кислоти молочної, забезпечує тривалість контакту лікувального засобу зі слизовою оболонкою піхви та точність дозування діючих компонентів. Саме тому використання заявленого засобу більш оптимальне.

Таким чином, заявлено лікувально-профілактичний засіб у формі супозиторіїв із вмістом ліофілізату біфідо- та лактобактерій для фармакокорекції вагінальних дисбіозів, який є високоактивним у відношенні до штамів тест-культур, що є основними збудниками неспецифічних інфекційних захворювань урогенітального тракту жінки. Новий засіб має високий рівень антагоністичної дії

та адгезивні властивості, що дозволяють використовувати його для ефективної профілактики та лікування вагінальних дисбіозів різної етіології. Використання заявленого засобу у формі супозиторіїв забезпечує зручність використання для вагінального застосування, точність дозування діючих компонентів, тривалість контакту зі слизовою оболонкою піхви. Заявлений засіб може бути одержаний на будь-якому фармацевтичному підприємстві, яке виробляє супозиторіїв згідно вимогам GMP.

Джерела інформації:

1. Заявка РСТ (WO) 93/09797, МПК А61К35/74, опубл. 1993г.
2. Патент 2073520, РФ, МПК А61К35/74, опубл. 20.02.1997.
3. Патент 2146526, РФ, МПК А61К35/74, опубл. 20.03.2000.