



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 108 092** <sup>(13)</sup> **C1**  
(51) МПК<sup>6</sup> **A 61 K 31/015, 31/12**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 95113501/14, 25.11.1993  
(30) Приоритет: 26.11.1992 GB 9224739.4  
(46) Дата публикации: 10.04.1998  
(56) Ссылки: 1. EP, патент N 123238 (The Wellcome Foundation Limited), кл. C 07 C 50/32, 1984.  
2. "Человек и лекарство". Труды Первого Российского национального конгресса. -М., 1992, с.313.  
(86) Заявка PCT:  
GB 93/02425 (25.11.93)

(71) Заявитель:  
Дзе Веллкам Фаундейшн Лимитед (GB)  
(72) Изобретатель: Уинстон Эдвард Гаттеридж[GB],  
Дэвид Брайан Эштон Хатчинсон[GB], Виктория  
Сьюэн Лэттер[GB], Мэри Падни[GB]  
(73) Патентообладатель:  
Дзе Веллкам Фаундейшн Лимитед (GB)

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ И(ИЛИ) ПРОФИЛАКТИКИ ПРОТОЗОЙНОЙ ПАРАЗИТАРНОЙ ИНФЕКЦИИ, ПРИМЕНЕНИЕ АТОВАКУОНА И ПРОГУАНИЛА ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПРОТОЗОЙНЫХ ИНФЕКЦИЙ, КОМБИНАЦИЯ АТОВАКУОНА С ПРОГУАНИЛОМ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПРОТОЗОЙНЫХ ИНФЕКЦИЙ, ПРИМЕНЕНИЕ КОМБИНАЦИИ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ

(57) Реферат:  
Изобретение касается комбинаций атовакуона и прогуанила, их применения в лечении и профилактике паразитных инфекций, таких, как протозойные паразитарные инфекции, например малярия и токсоплазмоз, и инфекций, вызываемых *P. carinii*, и их применения в изготовлении

лекарственных препаратов для лечения и(или) профилактики таких инфекций. Эти комбинации можно вводить в виде одного фармацевтического препарата. Предпочтительно вводить атовакуон и прогуанил в потенцирующем соотношении так, чтобы они действовали синергически. 4 с. и 9 з.п. ф-лы, 7 табл.

RU 2 108 092 C 1

RU 2 108 092 C 1



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 108 092** <sup>(13)</sup> **C1**  
(51) Int. Cl.<sup>6</sup> **A 61 K 31/015, 31/12**

RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 95113501/14, 25.11.1993

(30) Priority: 26.11.1992 GB 9224739.4

(46) Date of publication: 10.04.1998

(86) PCT application:  
GB 93/02425 (25.11.93)

(71) Applicant:  
Dze Vellkam Faundejshn Limited (GB)

(72) Inventor: Uinston Ehdvard Gatteridzh[GB],  
Dehvid Brajan Ehshton  
Khatchinson[GB], Viktorija S'juzn  
Lehtter[GB], Mehri Padni[GB]

(73) Proprietor:  
Dze Vellkam Faundejshn Limited (GB)

(54) METHOD FOR TREATING AND/OR PROPHYLAXIS OF PROTOZOAN PARASITARY INFECTION, USE OF ATOVACUON AND PROGUANYL FOR PRODUCING MEDICINAL PREPARATION FOR TREATING PROTOZOAN INFECTIONS, COMBINATION OF ATOVACUON WITH PROGUANYL FOR TREATING PROTOZOAN INFECTIONS, USE OF SAID COMBINATION AND PHARMACEUTICAL PREPARATION

(57) Abstract:

FIELD: medicine; treatment and prophylaxis of protozoan parasitary infections, such as malaria, toxoplasmosis and infections caused by microorganisms P. carinii. SUBSTANCE: method involves

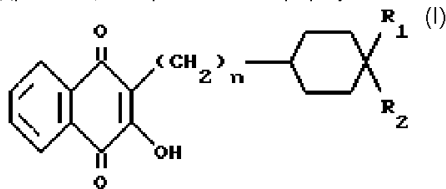
introduction of these combinations in the form of single pharmaceutical preparation. Atovacuon and proguanyl are preferably introduced in potentiating ratio so that they act synergistically. EFFECT: higher efficiency. 13 cl, 6 tbl

RU 2 108 092 C 1

RU 2 108 092 C 1

Изобретение касается синергических комбинаций 2-[4-(4-хлорфенил)циклогексил]-3-гидрокси-1,4-нафтохинона (атовакуона) и прогуанила, которые имеют противопаразитарную активность, а более конкретно фармацевтических композиций, содержащих такие комбинации, их применения в лечении инфекций, вызываемых протозойными паразитами, таких, как малярия и токсоплазмоз, и их применения в лечении инфекций, вызываемых *Pneumocystis carinii*.

Известно соединение 2-[4-(4-хлорфенил)циклогексил]-3-гидрокси-1,4-нафтохинон (атовакуон) (EP, патент N 123238, кл. C 07 C 50/32, 1984) где описаны 2-замещенные 3-гидрокси-1,4-нафтохиноны формулы I:



где R<sub>1</sub> каждый - водород;

R<sub>2</sub> - выбран из C<sub>1-6</sub> -алкокси, аралкокси, C<sub>1-6</sub>-алкил-C<sub>1-6</sub>-алкокси, фенила, замещенного одной или двумя группами, выбранными из галогена и C<sub>1-6</sub>-алкила, галогена и пергалло-C<sub>1-6</sub>-алкила, или

R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> -оба C<sub>1-6</sub> -алкил или фенил:

n - 0 или 1,

или их физиологически приемлемых солей.

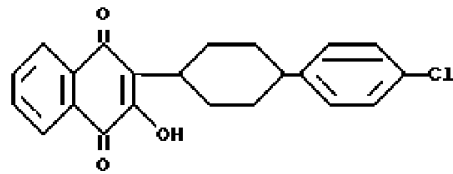
Известно, что эти соединения обладают противопротозойной активностью. В частности считают, что соединения формулы (I), в которых n представляет собой 0, активны против малярийного паразита человека *Plasmodium falciparum* и также против видов *Eimeria*, таких, как *E.tenella* и *E.acervulina*, которые являются организмами, вызывающими кокцидиоз, а соединения формулы (I), в которых n представляет собой 1, активны против простейших рода *Theileria*, в частности *T. annulata* или *T.parva*. Среди соединений, названных конкретно и приведенных в качестве примера, находится соединение формулы (I), в которой n представляет собой 0, R<sub>1</sub> -водород и R<sub>2</sub> - 4-хлорфенил, т.е. атовакуон.

Прогуанил представляет собой хорошо известное лекарственное средство для профилактики, но не для лечения малярии. Он является одним из самых безопасных противопаразитарных лекарственных средств и его можно давать маленьким детям и беременным женщинам. Однако появилась устойчивость *P.falciparum* к прогуанилу, в частности в Юго-Западной Азии, и эта устойчивость к прогуанилу представляет собой все увеличивающуюся проблему.

Для преодоления устойчивости к лекарственным средствам стандартной практикой становится применение комбинаций более чем одного противопаразитарного средства, одновременно или последовательно. Однако многие такие комбинации являются антагонистическими, что приводит к менее эффективному лечению, и схемы приема лекарственных средств часто усложняются, увеличивая вероятность того, что больные не смогут завершить лечение.

Целью изобретения является обеспечение комбинации противопаразитарных лекарственных средств, не антагонистичной и не требующей сложной схемы приема лекарственных доз.

Было обнаружено, что путем комбинирования, одновременного либо последовательного, атовакуона, представленного в данной спецификации формулой II:



(II) и прогуанила достигается усиление противопаразитарной, в частности противопаразитарной, активности. Кроме того, комбинация соединения формулы (II) и прогуанила может быть легко представлена в виде одного фармацевтического препарата.

В первом аспекте изобретение обеспечивает способ лечения и (или) профилактики инфекции, вызываемой протозойными паразитами, например малярии или токсоплазмоза, или инфекции, вызываемой *P.Carinii* у млекопитающих, в том числе у человека, предусматривающий введение эффективного количества атовакуона или его физиологически приемлемой соли и сопутствующее или последовательное введение эффективного количества прогуанила.

Во втором аспекте изобретение обеспечивает применение атовакуона при изготовлении лекарственного препарата для введения вместе либо последовательно с прогуанилом для лечения и (или) профилактики инфекций протозойных паразитов, например малярии или токсоплазмоза, или инфекции, вызываемой *P. Carinii*, у млекопитающих, в том числе у человека.

Предпочтительно соединение формулы (II) и прогуанил вводят вместе.

Более предпочтительно соединение формулы (II) и прогуанил вводят в потенцирующем соотношении.

Согласно предлагаемому аспекту изобретения обеспечивается комбинация атовакуона или его физиологически приемлемой соли и прогуанила, где атовакуон или его соль и прогуанил присутствуют в потенцирующем соотношении.

Термин "потенцирующее соотношение" применяют для указания, что атовакуон и прогуанил присутствуют в таком соотношении, что противопаразитарная активность этой комбинации выше, чем активность одного атовакуона или одного прогуанила, или аддитивной активности, которая могла бы быть прогнозирована для этой комбинации на основе активностей отдельных компонентов. Отдельные компоненты действуют синергически в комбинации при условии, что они присутствуют в потенцирующем соотношении.

Потенцирующее соотношение, которое можно успешно применять для лечения малярии, в том числе для действия на устойчивые к гидроксинафтохинону штаммы малярии, находится в диапазоне 1:0,1 - 1:100

(прогуанил : атовакуон).

Удобно, чтобы потенцирующее соотношение находилось в диапазоне 1:0,2 - 1:10.

Особенно предпочтительное потенцирующее соотношение находится в диапазоне 1:1 - 1:3.

Изобретение обеспечивает также в другом аспекте способ лечения и(или) профилактики малярии у млекопитающих, в том числе у человека, предусматривающий введение эффективного количества комбинации атовакуона или его физиологически приемлемой соли и прогуанила.

Гидроксильная группа атовакуона может образовать соли с подходящими основаниями и физиологически приемлемыми солями атовакуона являются соли неорганического основания, такие, как соли щелочных металлов (например, натрия и калия) и щелочноземельных металлов (например, соли кальция), соли органических оснований, например фенилэтилбензиламина, дибензилэтиленамина, этаноламина и диэтанолламина; и соли аминокислот, например лизина и аргинина.

Соединение формулы (II) может существовать в виде цис- или транс-изомера, т.е. кольцо циклогексина может быть цис- или транс-замещенным нафтохиноновым ядром и карбофенильной группой. В соответствии с изобретением можно использовать как цис-, так и транс-изомеры и их смеси.

При использовании этого соединения в виде смеси изомеров транс-изомер будет присутствовать в количестве приблизительно 50% или будет преобладающим изомером, но использование смесей, в которых преобладает цис-изомер, также включено в сферу действия изобретения. Конкретное соотношение изомеров можно варьировать, если требуется. Типичными являются смеси, в которых отношение цис/транс изомеров составляет приблизительно 1:1, 40:60 и 5:95. Для применения по изобретению предпочтительны транс-изомер соединения формулы (II) или смесь его цис- и транс-изомеров, содержащая по меньшей мере 95%, например 99%, транс-изомера.

Соединение формулы (II) может также существовать в его таутомерной форме, где гидроксильная группа отдает ее протон одной из оксогрупп, и применение таких таутомерных форм включено в сферу действия предлагаемого способа. Однако считают, что стабильной формой является форма, представленная в формуле (II).

Количество ингредиентов комбинации атовакуона и прогуанила, необходимое для эффективного действия в качестве противопаразитарного агента, будет меняться и в конечном итоге определяется по усмотрению ветеринарного врача или медицинского работника. Факторами, которые должны учитываться, являются путь введения и природа препарата, масса тела млекопитающего, возраст, общее состояние и природа, а также тяжесть заболевания. Подходящая эффективная доза для введения человеку при лечении малярии находится в диапазоне 2,0 - 30 мг прогуанила на 1 кг массы тела в день и 0,5 - 30 мг атовакуона на 1 кг массы тела в день, например 3 - 20 мг/кг/день прогуанила и 1 - 20 мг/кг/день атовакуона, в частности 5 - 15 мг/кг/день

прогуанила и 3 - 15 мг/кг/день атовакуона.

Подходящая эффективная доза для введения человеку для профилактики малярии находится в диапазоне 3 - 20 мг на 1 кг массы тела в 1нед для прогуанила и атовакуона, например 6 - 10 мг/кг в 1нед для прогуанила и атовакуона.

Названные дозы рассчитаны для лекарственных средств per se.

Для применения по изобретению комбинация атовакуона и прогуанила представлена предпочтительно в виде фармацевтического препарата.

Фармацевтические препараты содержат эти активные ингредиенты (комбинацию атовакуона и прогуанила) вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями и иногда другими терапевтическими и(или) профилактическими ингредиентами. Носитель или носители должны быть приемлемыми в смысле их совместимости с другими ингредиентами этой формулы и безвредными для реципиента.

Данное изобретение обеспечивает фармацевтический препарат, содержащий комбинацию атовакуона и прогуанила в ассоциации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями. Кроме того, изобретение обеспечивает способ получения фармацевтического препарата, предусматривающий соединение комбинации атовакуона и прогуанила с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями.

Комбинация атовакуона и прогуанила может быть для удобства представлена в виде фармацевтического препарата в форме стандартных (унифицированных) доз. Удобный препарат в виде стандартной дозы содержит активные ингредиенты в количествах 10 мг - 3 г каждого. Типично стандартные дозы могут содержать, например, 500 мг атовакуона и 200 мг прогуанила или 500 мг атовакуона и 500 мг прогуанила.

Фармацевтические препараты включают препараты, пригодные для перорального, топического ( в том числе дермального, трансбуккального и подъязычного), ректального и парентерального (в том числе подкожного, чрескожного, внутримышечного и внутривенного) введения, а также для введения при помощи назогастрального зонда. Препарат может при необходимости, представлен в виде отдельных дозированных единиц и приготовлен любым способом, известным в фармацевции. Все способы предусматривают стадию соединения активных ингредиентов с жидкими носителями или мелко измельченными твердыми носителями или теми и другими с последующим приданием формы полученному продукту при желании.

Наиболее предпочтительны фармацевтические композиции для перорального введения, где носитель является твердым, представлять в виде препаратов со стандартной, рассчитанной на 1 прием дозой, таких, как болюсы, капсулы или таблетки, содержащая каждая заданное количество активных ингредиентов.

Таблетка может быть приготовлена прессованием или формованием по шаблону (форме), иногда с одним или несколькими вспомогательными ингредиентами.

Прессованные таблетки могут быть приготовлены прессованием в пригодной для этого машине активных соединений в свободной текучей форме, такой, как порошок или гранулы, иногда смешанные со связывающим или смазывающим веществом, инертным разбавителем, смягчающим агентом, поверхностно-активным веществом или диспергирующим агентом. Формованные таблетки могут быть приготовлены отливкой в форме инертного жидкого разбавителя.

Иногда таблетки могут иметь покрытие. Если они не покрыты, то могут иметь отметки на своей поверхности.

Капсулы могут быть приготовлены с помещением активных ингредиентов - либо одних, либо в смеси - с одним или несколькими вспомогательными ингредиентами в капсульные оболочки с последующим загерметизированием их обычным способом.

Крахмальные облатки аналогичны капсулам, в которых активные ингредиенты вместе с любым вспомогательным ингредиентом (ингредиентами) загерметизированы в оболочку из рисовой бумаги.

Комбинация соединения формулы (II) и прогуанила может быть также сформована в виде диспергируемых гранул, которые могут быть например, суспендированы в воде перед введением или насыпаны на пищевой продукт.

Гранулы могут быть упакованы, например, в небольшой пакет.

Препараты, пригодные для перорального введения, в которых носитель представляет собой жидкость, могут быть представлены в виде раствора или суспензии в водной или неводной жидкости или в виде жидкой эмульсии типа масло в воде.

Препараты для перорального введения могут представлять собой лекарственные формы с контролируемым высвобождением активных ингредиентов (продолжительного действия), например таблетки, в которых активные ингредиенты готовят в подходящем контролирующем высвобождение матриксе, или активные ингредиенты покрыты пленкой, контролирующей выделение. Такие препараты могут быть пригодны особенно для профилактического применения.

Активные ингредиенты могут быть также приготовлены в виде раствора или суспензии, пригодных для введения через назогастральный зонд.

Фармацевтические препараты для ректального введения, в которых твердый носитель, готовят в виде суппозитория, содержащих лекарственное средство для одного введения. Пригодными носителями являются какао-масло и другие материалы, обычно применяемые для суппозитория в фармацевции. Суппозитории могут быть приготовлены смешиванием активной комбинации с размягченным или расплавленным носителем (носителями) с последующим охлаждением и формованием в шаблонах.

Фармацевтическими препаратами, пригодными для парентерального введения являются стерильные растворы или суспензии активной комбинации в водных или маслянистых носителях.

Инъекционные препараты могут быть

приспособлены для инъекции ударной дозы или для непрерывного вливания. Для удобства такие препараты помещают в контейнеры с упаковками на один прием и многократные приемы, герметизируемые после введения препарата и хранящиеся до момента использования.

Альтернативно активные ингредиенты могут быть выполнены в виде порошка, который находится перед применением в подходящем носителе, таком, как стерильная апиrogenная вода.

Комбинация атовакуона и прогуанила может быть приготовлена в виде депо-препарата пролонгированного действия, который можно вводить в виде внутримышечной инъекции или имплантации, например подкожной или внутримышечной. Депо-препараты могут содержать, например, пригодные полимерные или гидрофобные материалы или ионообменные смолы. Такие препараты пролонгированного действия особенно удобны для профилактического применения.

Кроме указанных компонентов-носителей фармацевтические препараты для различных способов введения могут содержать при необходимости один или несколько дополнительных компонентов-носителей, таких, как растворители, буферы, вкусовые вещества, связывающие вещества, поверхностно-активные агенты, загустители, смазывающие вещества, консерванты (в том числе антиоксиданты) и др., и вещества, включаемые с целью изотоничности препарата с кровью будущего реципиента.

Для применения в ветеринарии могут быть использованы композиции для перорального, парентерального и интратрубуцового введения (через рубец).

Способы получения атовакуона известны (EP, патент N 123238). Конкретный способ получения этого вещества описан в примере 1.

Пример 1.

2-[транс-4-(4-хлорфенил)циклогексил]-3-гидрокси-1,4-нафтохинон

1.1.

4-(4-хлорфенил)циклогексан-1-карбоновая кислота

Ацетилхлорид (30 г) и 60 г мелкорастертого в порошок хлорида алюминия перемешивают вместе в 120 мл дисульфида серы и затем охлаждают до -50 °C на бане с CO<sub>2</sub>/окситолом.

Предварительно охлажденный до -50 °C циклогексен (30 г) добавляют по каплям в течение 10 мин, поддерживая температуру реакционной смеси ниже -20 °C. Смесь перемешивают при -50 °C еще 60 мин и затем растворитель декантируют, оставляя клейкий оранжевый комплекс. Добавляют немного хлорбензола при нагревании до температуры окружающей среды. Затем добавляют остаток хлорбензола (всего 300 мл). Полученный раствор нагревают при 40 °C в течение 3 ч при перемешивании, выливают в смесь льда и концентрированной соляной кислоты и отделяют органический слой. Этот слой промывают 2 М соляной кислотой, 2 М гидроксидом натрия и водой, высушивают над безводным сульфатом натрия и выпаривают досуха. Продукт перегоняют в вакууме. Фракцию, кипящую при 140-154 °C (0,1 мм

Hg) собирают, растворяют в равном объеме петролейного эфира (40-60 мл), охлаждают до 6°C и пробулькивают через раствор азота непрерывным потоком, после чего извлекают отделенное бесцветное твердое вещество.

К раствору гидроксида натрия (6,2 г) в воде (42 мл) при 0°C добавляют бром (2,8 мл). Полученный замещенный гексагидроацетофенон (3,1 г) растворяют в 15 мл диоксана и затем добавляют холодный раствор гипобромита, поддерживая реакционную смесь ниже 20°C. Реакционную смесь перемешивают при температуре окружающей среды в течение 6 ч. Оставляют настаиваться в течение ночи. Для разрушения избытка гипобромита добавляют метабисульфит натрия, смесь охлаждают, подкисляют. Получают бесцветное твердое вещество, которое отфильтровывают, промывают водой, высушивают и перекристаллизовывают из этанола. Получают 4-(4-хлорфенил)циклогексан-1-карбоновую кислоту; т. пл. 254-256°C.

1.2.

2-[4-(4-хлорфенил)циклогексил]-3-хлор-1,4-нафтохинон

Смесь 2-хлор-1,4-нафтохинона (3,95 г; 0,02 моль), 4-(4-хлорфенил)циклогексан-1-карбоновой кислоты (4,9 г; 0,02 моль) и порошкообразного нитрата серебра (1,05 г; 0,0062 моль) нагревают с обратным холодильником при сильном перемешивании в 40 мл ацетонитрила. Раствор персульфата аммония (12,0 г; 0,0525 моль) в 50 мл воды добавляют по каплям в течение 1 ч. Смесь нагревают с обратным холодильником в течение 3 ч, затем охлаждают на льду в течение 30 мин. Отфильтровывают и оставшееся липкое твердое вещество экстрагируют дважды кипящим хлороформом для удаления неорганического материала. Хлороформ удаляют выпариванием, получая в остатке желто-коричневое твердое вещество ( $\approx$  2,7 г). Его растворяют в 40 мл кипящего ацетонитрила. Небольшое количество нерастворимого материала удаляют фильтрованием. После охлаждения названное соединение отделяют в виде желтых кристаллов (550 мг); т. пл. 172-175°C.

ЯМР  $dH(\delta$  -DMSO) 8,05 (2H, мультиплет,  $\beta$  - нафт.), 7,85 (2H, мультиплет,  $\alpha$  - нафт.), 7,30 (4H, с, PhH), 3,30 (1H, шир.т., CH), 2,67 (1H, шир.т., CH), 1,2-2,4 (8H, мультиплет, 4xCH<sub>2</sub>).

2-[4-(4-хлорфенил)циклогексил]-3-гидрокси-1,4-нафтохинон

Полученный продукт (1.2) суспендируют в 10 мл кипящего метанола и добавляют по каплям 0,55 г гидроксида калия в 5,5 мл воды в течение 15 мин. Смесь кипятят с обратным холодильником, пока не образуется темно-красный раствор (после  $\approx$  6 ч). Затем осторожно добавляют по каплям 2 мл концентрированной соляной кислоты. Смесь охлаждают и отфильтровывают и твердый остаток тщательно промывают водой. Водные промывки снова подкисляют и фильтруют. Объединенные твердые остатки (500 мг); т. пл. 200-209°C) перекристаллизовывают из ацетонитрила. Получают 300 мг продукта в виде транс-изомера; т. пл. 216-219°C.

Пример 2. Обычные фармацевтические

препараты, которые могут применяться в соответствии с изобретением.

2.1. Покрытая пленкой таблетка, мг

Кор (центральная часть)

Соединение по примеру 1 - 500

Гидрохлорид прогуанила - 200

Микрокристаллическая целлюлоза (Avicel PH101) - 130

Гидроксипропил-целлюлоза, Lo-sub(LHПС, LHII) - 99

Натрий-гликолат крахмала (Explotab) - 30

Повидон К30 - 36

Стеарат магния - 5

Масса (в прессованном виде) - 1000

Покрытие

Дисперсия полимера

(гидроксипропилметилцеллюлоза и диоксид титана и полиэтиленгликоль 400 и краситель) - 20

Глянцевание

Полиэтиленгликоль-8000 - 2

Общая масса - 1022

2.2. Диспергируемая покрытая пленкой таблетка, мг

Ядро

Соединение по примеру 1 - 500

Гидрохлорид прогуанила - 200

Микрокристаллическая целлюлоза (Avicel PH101) - 100

Гидроксипропилцеллюлоза, Lo-sub (LHПС, LHII) - 83

Натрий-гликолат крахмала (Explotab) - 40

Повидон К30 - 20

Стеарат магния - 5

Докузат натрия - 1

Силикат магния-алюминия (Veegum F) - 50

Натрия сахарин - 1

Масса (в прессованном виде) - 1000

Покрытие

Дисперсия полимера

(гидроксипропилметилцеллюлоза и диоксид титана и полиэтиленгликоль 400 и краситель) - 10

Глянцевание

Полиэтиленгликоль 8000 - 2

Общая масса - 1012

Пример 3 (результаты биологического испытания). Сравнение взаимодействия лекарственных средств в комбинациях соединения по примеру 1 с другими противомаларийными препаратами

Исследования *in vitro* чувствительности к лекарственным средствам проводят полуавтоматизированным способом Desjardins (Desjardins et al. Antimalariae Agents and Chemotherapy 1979; 16(6):710-718). Противомаларийную активность в этой системе оценивают по ингибированию включения радиоактивного меченого гипоксантина в паразитах градиционными концентрациями лекарственных средств.

Противомаларийные лекарственные средства для испытания растворяют в воде, 95%-ном этаноле или диметилсульфоксиде (DMSO). Лекарственные средства, растворенные в воде, разводят в соотношении 1:1 95%-ным этанолом, а лекарственные средства, растворенные в 95%-ном этаноле, разводят в соотношении 1:1 водой. Затем растворы разводят культуральной средой, содержащей 10%-ную сыворотку человека, до исходных концентраций, превышающих в 20-50 раз IC<sub>50</sub>. Испытаниям подвергают лекарственные

средства и их растворители (см. табл. А).

Для исследования комбинаций лекарственных средств их растворы в исходных концентрациях комбинируют в различных соотношениях (1:5б 1:2, 2:1 и 5:1). Затем растворы лекарственных средств и комбинации вносят в 96-луночный микротитрационный планшет. Получают двойные ряды соединения по примеру 1, лекарственного средства, комбинируемого с ним, и четыре комбинации двух лекарственных средств. Серийные разведения 1:3 лекарственных средств средой выполняют для заполнения 96-луночного микротитрационного планшета 12-канальным пипеттором. Для оценки лекарственных средств, классифицируемых как ингибиторы редуктазы дигидрофолиевой кислоты (DHFR), применяют модифицированную культуральную среду, содержащую только физиологические концентрации фолиевой кислоты и ПАВА.

Остальные биологические процедуры производят согласно способу Desjardins, за исключением использования трех штаммов *P. falciparum* (устойчивого к множеству лекарственных средств W - 2 клон, чувствительного к лекарствам, но устойчивого к мефлохину D - 6 клон и C2B изолят, устойчивого к соединению по примеру 1), и инкубацию удлиняют до 72 часов.

Отдельные IC<sub>50</sub> рассчитывают по программе "MINSQ" из Micromath Scientific Software. Каждая серия парных данных соответствует функции гиперболического тангенса, примененной Desjardins.

IC<sub>50</sub> нормализуют, принимая за I величины IC<sub>50</sub> для соединения по примеру 1 и для других находящихся в комбинациях лекарственных средств с пропорциональными нормализованными величинами для каждого соотношения из двух лекарственных средств. Подставляя эти данные в уравнение III.

$$Y_i = 1 - [X_i / (X_i + e^{I \cdot (1 - X_i)})],$$

где Y<sub>i</sub> - IC<sub>50</sub> для соединения по примеру 1 при комбинировании его с другим лекарственным средством;

X<sub>i</sub> - IC<sub>50</sub> для другого лекарственного средства при комбинировании его с соединением по примеру 1;

I - параметр взаимодействия, свидетельствующий о степени обратимости, была построена изоболограмма.

Величины I рассчитывают для каждой комбинации. Положительные величины I свидетельствуют о синергической комбинации, отрицательные - об антагонизме, I = 0 указывает на аддитивное взаимодействие.

Результаты расчетов приведены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что комбинации 2 - [4-(4-хлорфенил)циклогексил]-3-гидрокси-1,4-нафтохинона и прогуанила обнаруживают наиболее стойкое потенцирование по сравнению с другими испытанными комбинациями лекарственных средств, в частности по отношению к устойчивому к гидроксинафтохинону штамму C2B.

Оптимальное соотношение комбинации с прогуанилом определяют для каждого из трех штаммов малярийного паразита, определяя отношение IC<sub>50</sub> прогуанила к IC<sub>50</sub> соединения по формуле II. Результаты представлены в табл. 2.

Пример 4. Сравнение активностей против *Toxoplasma in vivo* соединения по примеру 1, прогуанила и их комбинаций

Активность соединений и комбинаций испытывают в мышинной модели *T. gondii*, при этом увеличивают время до смерти и принимают процент выживания мышей за меру активности лекарственного средства.

Группы 10, 20 г СВА/СА мышей инфицируют перорально, вводя через желудочный зонд 6 цист штамма C<sub>56</sub> *T. gondii*. Лечение лекарственным средством начинают спустя 3 дня и продолжают в течение 10 дней. Лекарственные средства вводят перорально через желудочный зонд. Исследовали следующие группы (мг/кг):

Контроль

Атовакуон @ 10

Атовакуон @ 25

Прогуанил @ 25

Атовакуон @ 10 + прогуанил @ 25

Атовакуон @ 25 + прогуанил @ 25

Животных (мышей) обследовали 2 раза в день в течение 30 дней, все случаи смерти регистрировали.

Результаты испытания даны в табл. 3 и 4.

Среднее время до смерти контрольных мышей составляет 14 дн, и выжило только одно животное (10%). Это животное, возможно, не было инфицировано вследствие низкого количества инокулята. Один атовакуон увеличивает время до смерти до 20,1 дней при 10 мг/кг и до 24,1 дней при 25 мг/кг. В обоих случаях с 10% выживания (одно животное). Прогуанил вопреки его безопасности для человека (надежности) является токсичным для мышей. Прогуанил в количестве 25 мг/кг обнаруживает признаки токсичности, среднее время до смерти снижается до 9 дн, животные не выживают. При применении комбинации из 25 мг/кг атовакуона и 25 мг/кг прогуанила дала увеличивается время до смерти несмотря на токсичность прогуанила, причем выживает 80% мышей по сравнению со случаями, когда применяли только атовакуон (выжило 10% мышей).

Пример 5. Сравнение активности против *Toxoplasma in vitro* соединения по примеру 1, прогуанила и их комбинаций.

Исследования чувствительности к лекарственным средствам *in vitro* проводят полуавтоматическим способом, основанным на способе, применяемом при малярии (Desjardins et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1979 16 (6) 710-718), но с избирательным включением <sup>3</sup>[H]-урацила *T. gondii*. Активность против *Toxoplasma* в этой системе оценивают по ингибированию поглощения радиоактивно меченого урацила в паразитов традиционными концентрациями лекарственных средств.

Лекарственные средства растворяют в DMSO, разведения приготавливают культуральной средой, содержащей 3%-ную сыворотку плода теленка. Для исследования комбинаций лекарственных средств их растворы при исходных концентрациях комбинируют в соотношениях: 1:1, 1:3, 3:1. Серийные разведения 1:2 растворов лекарственных средств и комбинаций приготавливают и используют в парных лунках 96-луночного планшета, предварительно засеянного клетками HeLa и штамма RH *T. gondii*. Лекарственные средства

добавляют через 2 ч после добавления паразита и планшет инкубируют при 37°C в течение 24 ч, после чего добавляют <sup>3</sup>[H]-урацил и инкубирование продолжают еще 8 ч. Затем удаляют супернатантную жидкость, разрушают содержащие *T.gondii* клетки в додецилсульфате натрия и осаждают меченые белки ТХУ на фильтровальных подложках. Включение метки измеряют в Beta plate сцинтилляционном счетчике. Процент ингибирования включения урацила рассчитывают для этих соединений и комбинаций и IC<sub>50</sub> рассчитывают по программе GSI. IC<sub>50</sub> нормализуют, принимая за IC<sub>50</sub> для соединения по примеру 1 и прогуанила с нормализованными величинами для каждого отношения двух исследуемых лекарственных средств. Изоболограммы строят, нанеся на график нормализованные значения IC<sub>50</sub> друг против друга. Потенцирование отмечают в случае, когда эти величины находятся ниже линии изоболограммы. Величины на линии свидетельствуют об аддитивном действии, величины выше линии - об антагонизме.

Планшеты применяют в трех повторностях, для построения изоболограммы используют все величины. Результаты исследования даны в табл. 5.

Из табл. 5 видно, что комбинации атовакуона и прогуанила проявляют потенцирование in vitro против *T.gondii*.

Пример 6. Сравнение активностей против *Pneumocystis in vivo* соединения по примеру 1, прогуанила и их комбинаций.

Активность этих соединений и их комбинаций испытывают в модели *Soid mouse Pneumocystis* пневмонии.

Уровень инфекции мышей в каждой группе измеряют посредством стандартных легочных мазков-отпечатков и иммунофлуоресцентных тестов. Для подсчета баллов по каждому животному (мышь) условливаются, что 0 обозначает, что инфекции нет, а +4 - очень тяжелая инфекция. Данные приведены в табл. 6.

Применение только атовакуона уменьшает инфицированность, назначение прогуанила только при дозировке 25 мг/кг в день неэффективно в профилактике РСР у мышей (*scid mouse*), а использование прогуанила в комбинации с атовакуоном обнаруживает синергию.

#### Формула изобретения:

1. Способ лечения и(или) профилактики протозойной паразитарной инфекции или инфекции, вызываемой *P. carinii* у млекопитающих, отличающийся тем, что включает введение 2-[4-(4-хлорфенил)циклогексил]-3-гидрокси-1,

4-нафтохинона и прогуанила в потенцирующем соотношении.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что протозойная паразитарная инфекция представляет собой малярию.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что протозойная паразитарная инфекция представляет собой токсоплазмоз.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что он предназначен для лечения и(или) профилактики инфекции, вызываемой *P. carinii*.

5. Способ по любому из пп.1 - 4, отличающийся тем, что 2-[4-(4-хлорфенил)циклогексил]-3-гидрокси-1, 4-нафтохинон находится в форме транс-изомера или смеси цис- и транс-изомеров, в которой преобладает транс-изомер.

6. Комбинация 2-[4-(4-хлорфенил)циклогексил]-3-гидрокси-1, 4-нафтохинона и прогуанила, отличающаяся тем, что 2-[4-(4-хлорфенил)циклогексил]-3-гидрокси-1, 4-нафтохинон и прогуанил присутствуют в ней в потенцирующем соотношении.

7. Комбинация по п.6, отличающаяся тем, что отношение прогуанил 2-[4-(4-хлорфенил)циклогексил]-3-гидрокси-1,4-нафтохинон находится в интервале 1 : 1 - 1 : 3.

8. Комбинация по п. 6 или 7, отличающаяся тем, что 2-[4-(4-хлорфенил)циклогексил]-3-гидрокси-1,4-нафтохинон находится в форме транс-изомера или смеси цис- и транс-изомеров, в которой преобладает транс-изомер.

9. Комбинация по любому из пп.6 - 8, отличающаяся тем, что ее применяют для лечения и(или) профилактики протозойной паразитарной инфекции или инфекции, вызываемой *P. carinii*, у млекопитающих.

10. Способ лечения и(или) профилактики протозойной паразитарной инфекции, вызываемой *P. carinii*, у млекопитающих, отличающийся тем, что включает введение эффективного количества комбинаций любого из пп.6 - 8.

11. Фармацевтический препарат, содержащий комбинацию по любому из пп.6 - 9 вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями.

12. Фармацевтический препарат по п.11 в виде стандартной дозы, отличающийся тем, что содержит 50 мг - 3 г каждого из 2-[4-(4-хлорфенил)циклогексил]-3-гидрокси-1, 4-нафтохинона и прогуанила.

13. Препарат в виде стандартной дозы по п.12, отличающийся тем, что он содержит 500 мг 2-[4-(4-хлорфенил)циклогексил]-3-гидрокси-1, 4-нафтохинона и 200 мг прогуанила.



Таблица А

Лекарственное средство	Исходный растворитель	Среда
Соединение по примеру 1	DMSO	1640
Хенин	Этанол - вода	1640
Хлорохин	Вода - этанол	1640
Мефлохин	Этанол - вода	1640
Примахин	Этанол - вода	1640
Артесунат	Этанол - вода	1640
PM443	DMSO	1640
Тетрациклин	DMSO	1640
Норфлоксацин	DMSO	1640
Ципрофлоксацин	DMSO	1640
Прогуанил	Этанол - вода	Lo - фолат
Циклогуанил	Этанол - вода	Lo - фолат
Пириметамин	DMSO	Lo - фолат
Триметоприм	DMSO	Lo - фолат
Сульфаметоксазол	DMSO	Lo - фолат
Дапсон	DMSO	Lo - фолат
Клопидок	DMSO	Lo - фолат
Аллопуринол	Этанол - вода	Lo - фолат
PS - 15	DMSO	Lo - фолат
WR 99210	DMSO	Lo - фолат

Таблица 1

Лекарственное средство, комбинированное с соединением по примеру 1	I		
	W - 2	D - 6	C2B
Хинин	-1,36		
Хлорохин	-1,84	-1,40	
Мефлохин	-1,19		
Тетрациклин	1,27	1,11	0,02 - 0,08
Примахин	-0,79		
Артесуновая кислота		-0,18	
PM 443		-1,28	
Норфлоксацин	1,02		
Ципрофлоксацин	-1,22		
Пириметамин	0,36		-0,48
Триметоприм	1,27		0,58
Прогуанил	2,43, 2,88	2,56	2,56
Циклогуанил	2,21	1,66	0,13 - 0,73
Аллопуринол	1,14	0,43	
PS - 15	1,77, 0,65, 1,97	-0,74	
WR 99210	0,02		
Сульфаметоксазол	2,75		
Дапсон	-0,39		
Клопидол	2,38, 2,65	0,73	

Таблица 2

Лекарственное средство	1		
	W - 2	D - 6	C2B
Прогуанил: соединение по формуле (1)	920 : 1 2473 : 1	4038 : 1	0,2 : 1

Таблица 3

Среднее время до смерти, дни

		Атовакуон		
		0	10 мг/кг	25 мг/кг
Прогуанил	0	140	20,1	24,1
	25	9,0	18,4	29,3

Таблица 4

Процент выживания

		Атовакуон		
		0	10 мг/кг	25 мг/кг
Прогуанил	0	10,0	10,1	10,0
	25	0,0	0,0	80,0

Таблица 5

Нормализованные $1C_{50}$		Потенцирование
Атовакуон	Прогуанил	
0,559278	0,583893	Нет
0,196689	0,614094	Да
0,729381	0,253691	Да
0,345238	0,527273	Да
0,130952	0,6	Да
0,233333	0,118182	Да
0,404959	0,451538	Да
0,229201	0,768462	Да
0,244904	0,091538	Да

Таблица 6

Лекарственное средство	Дозировка в день, мг/кг	Балл					Инфицировано/испытано, количество	Средний балл $\pm$ SE	От контроля, %
		0	+1	+3	+4	+4			
Контроль	(Необработанные)	0	0	0	3	7	10/10	3,70 $\pm$ 0,14	100
Атовакуон	50	0	0	5	5	0	10/10	2,50 $\pm$ 0,16	68
Атовакуон	25	0	0	1	7	2	10/10	3,10 $\pm$ 0,17	84
Прогуанил	25	0	0	0	2	8	10/10	3,80 $\pm$ 0,19	85
Атовакуон и прогуанил	50 + 25	5	4	1	0	0	5/10	0,50 $\pm$ 0,21	14
Атовакуон и прогуанил	25 + 25	1	0	4	4	0	8/9	2,22 $\pm$ 0,31	60

RU 2108092 C1

RU 2108092 C1