

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **044513**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.08.31**

(21) Номер заявки  
**202291738**

(22) Дата подачи заявки  
**2021.01.22**

(51) Int. Cl. *A61K 9/00* (2006.01)  
*A61K 9/14* (2006.01)  
*A61K 9/16* (2006.01)  
*A61K 31/352* (2006.01)  
*A61K 9/08* (2006.01)  
*A61K 47/32* (2006.01)

---

(54) **КОМПЛЕКС 7-ДЕЗАЦЕТИЛ-ФОРСКОЛИНА И ПВП**

---

(31) **20153429.4**

(32) **2020.01.23**

(33) **EP**

(43) **2022.10.27**

(86) **PCT/EP2021/051499**

(87) **WO 2021/148633 2021.07.29**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**СИФАРМ С.А Р.Л. (LU)**

(72) Изобретатель:  
**Кубин Андреас (AT)**

(74) Представитель:  
**Фелицына С.Б. (RU)**

(56) **WO-A2-2005025500**

**US-B1-6346273**

**K. Kolter ET AL. "Hot-Melt Extrusion with BASF Pharma Polymers" In: Hot-Melt Extrusion with BASF Pharma Polymers, 01 October 2012 (2012-10-01), ISBN: 978-3-00-039415-7. XP055242593, cited in the application, the whole document, page 88 - page 91**  
**WO-A1-2017103840**

---

(57) Объектом изобретения является комплекс 7-дезацетил-форсколина (7-ДАФСК) и поливинилпирролидона (ПВП). Кроме того, изобретение относится к способу получения такого комплекса 7-ДАФСК-ПВП и к фармацевтической композиции, содержащей такой комплекс.

---

**B1**

**044513**

**044513**

**B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к комплексу 7-дезацетил-форсколина (7-ДАФСК) и поливинилпирролидона (ПВП) и к способу получения такого комплекса.

#### Предшествующий уровень техники

Дитерпен форсколин представляет собой практически нерастворимое в воде растительное соединение из *Plectranthus barbatus* (*Coleus forskohlii*). Форсколин находится в центре внимания для универсального медицинского применения, включая сердечнососудистые заболевания, бронхиальную астму, ожирение, лечение глаукомы, легочных заболеваний, воспалений суставов и остеоартрита/артрита. Форсколин способствует образованию хрящей в суставах и в то же время предотвращает оссификацию и минерализацию. Кроме того, форсколин изучается в исследованиях стволовых клеток в отношении дифференцировки и регрессии к плюрипотентности.

Форсколин активирует аденилатциклазу, мембраносвязанный фермент. Аденилатциклаза превращает аденозин трифосфат (АТФ) в циклический аденозин монофосфат (цАМФ) и высвобождает цАМФ в цитозоль, повышая внутриклеточную концентрацию цАМФ в большинстве клеток и тканей (Metzger H. et al., 1981, Drug Research, 1248-50). цАМФ действует как вторичный мессенджер в передаче клеточных сигналов и служит для активации многих пептидных гормонов (протеинкиназ).

Форсколин представляет собой дитерпен с двумя  $\alpha$ -гидроксигруппами в положениях 1 и 9,  $\beta$ -гидроксигруппой в положении 6 и  $\beta$ -ацетоксигруппой в положении 7. Две  $\alpha$ -гидроксигруппы в положениях 1 и 9 необходимы для связывания с аденилатциклазой. Форсколин из-за его низкой растворимости в воде (0,01 мг/мл, WO 2005025500 A2) требует различных составов для использования в качестве диагностического или терапевтического средства. Такие составы содержат различные растворители, такие как спирты или ДМСО, которые часто плохо переносятся и приводят к побочным эффектам.

В документе US 6346273 B1 обсуждается способ повышения растворимости в воде плохо растворимых в воде фармацевтически активных веществ, таких как форсколин, путем образования комплекса с неионным полимером, таким как поливинилпирролидон (ПВП). В этом документе описано увеличение растворимости форсколина в воде.

Повышенная растворимость форсколина в воде достигается за счет образования комплексов форсколина с циклодекстринами. WO 2005025500 A2 описывает способ образования комплекса форсколина с циклодекстрином в водной среде.

WO 2017103840 A1 описывает водорастворимые композиции форсколина, полученные путем образования комплексов с водорастворимыми полимерами, такими как, среди прочих, ПВП. После смешивания форсколина с полимером добавляют раствор крахмала, и смесь нагревают, затем охлаждают и сушат распылением.

WO 2018127600 A1 раскрывает способ получения комплексов форсколин-циклодекстрин, который основан на процессе спекания и обеспечивает повышенное содержание форсколина в комплексе, а также повышенную растворимость в воде.

Другим подходом к увеличению растворимости форсколина в воде является химическая дериватизация. Производным форсколина с более высокой растворимостью в воде по сравнению с форсколином является 7-дезацетил-форсколин, который проявляет такой же эффект в отношении аденилатциклазы, как и форсколин (Laurenza A. et al., Molecular Pharmacology 1987, 32(1), 133-139, Pinto C. et al., Biochemical Pharmacology 2009, 78(1), 62-69). Однако дезацетилирование форсколина в положении 7 позволяет увеличить растворимость в воде лишь в ограниченной степени (до 1 мг/мл).

Следовательно, существует потребность в усовершенствованной водорастворимой форме производного форсколина, которая характеризуется как высокой растворимостью в воде и, таким образом, улучшенной биодоступностью, так и высоким содержанием производного форсколина.

Таким образом, целью настоящего изобретения является обеспечение формы 7-дезацетил-форсколина, имеющей повышенную растворимость в воде и в то же время высокое содержание 7-дезацетил-форсколина.

#### Изложение сущности изобретения

Задачу решают с помощью комплекса 7-дезацетил-форсколина (7-ДАФСК) и поливинилпирролидона (ПВП), как описано в формуле изобретения и вариантах осуществления настоящего изобретения.

Настоящее изобретение раскрывает комплекс 7-дезацетил-форсколина (7-ДАФСК) и поливинилпирролидона (ПВП).

В одном варианте осуществления комплекс по изобретению отличается тем, что средняя массовая доля 7-ДАФСК в общем комплексе находится в пределах от 1 до 50 мас.%, предпочтительно 5, 10, 15, 20 или 25 мас.%, более предпочтительно 30, 35, 40, 45 мас.% или выше.

В одном варианте осуществления среднее молярное отношение 7-ДАФСК к ПВП в комплексе составляет 0,1 или выше, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60 или выше, более предпочтительно 3 или выше.

В одном варианте осуществления комплекс по изобретению отличается тем, что ПВП имеет среднюю молекулярную массу от 1 до 40 кДа. Предпочтительно ПВП имеет среднюю молекулярную массу

от 1 до 25, более предпочтительно примерно от 2 до 3, наиболее предпочтительно примерно 2,5 кДа.

В другом варианте осуществления комплекс по изобретению отличается тем, что 7-ДАФСК получен из синтетического форсколина.

В одном варианте осуществления 7-ДАФСК присутствует с чистотой по меньшей мере 98,5%.

Неожиданно было обнаружено, что особенно высокая массовая доля 7-ДАФСК в комплексе 7-ДАФСК-ПВП может быть получена путем нагревания смеси 7-ДАФСК и ПВП до температуры, превышающей температуру стеклования используемого ПВП. В частности, смесь нагревают до температуры, которая по меньшей мере на 20°C, предпочтительно по меньшей мере на 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100°C выше температуры стеклования ПВП. В частности, температуру доводят до диапазона примерно на 25-50°C выше температуры стеклования ПВП.

Таким образом, в настоящем изобретении также предложен способ получения комплекса 7-ДАФСК-ПВП по изобретению, отличающийся тем, что смесь 7-ДАФСК и ПВП нагревают до температуры, превышающей температуру стеклования используемого ПВП.

В одном варианте осуществления способ по изобретению характеризуется тем, что растворитель, предпочтительно воду, этанол, метанол, ацетон, этилметилкетон, дихлорметан и/или этилацетат, еще более предпочтительно воду, этанол, метанол, пропанол и/или дихлорметан, добавляют к смеси 7-ДАФСК и ПВП. Особо предпочтительно к смеси 7-ДАФСК и ПВП добавляют воду и/или этанол или их смесь.

В конкретном варианте осуществления смесь по изобретению выдерживают при температуре, превышающей температуру стеклования используемого ПВП, в течение по меньшей мере 5 мин.

В одном варианте осуществления способ по изобретению включает следующие этапы:

(a) приготовление смеси 7-ДАФСК и ПВП и добавление к смеси растворителя, предпочтительно спирта, предпочтительно этанола;

(b) добавление воды;

(c) нагревание смеси выше температуры стеклования ПВП в течение по меньшей мере 5 мин;

(d) охлаждение смеси и растворение в воде;

(e) удаление нерастворенных компонентов, при необходимости путем фильтрации. В одной конкретной форме применения смесь нагревают по меньшей мере на 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100°C выше температуры стеклования ПВП.

Применение способа по изобретению позволяет эффективно и просто получать комплексы 7-ДАФСК-ПВП, которые значительно повышают растворимость 7-ДАФСК в воде, а также могут содержать высокую массовую долю 7-ДАФСК, что делает возможным полезное применение 7-ДАФСК в диагностике и/или терапии.

С помощью комплексов 7-ДАФСК с ПВП по изобретению можно повысить растворимость 7-ДАФСК в воде. Используя высокую массовую долю 7-ДАФСК в комплексе по изобретению, можно повысить растворимость 7-ДАФСК в воде, не требуя, таким образом, нежелательно большого количества ПВП. Таким образом, составы с производными форсколина также могут быть получены более экономичным способом, чем раньше. Избегая больших количеств ПВП и связанных с этим побочных эффектов, настоящее изобретение облегчает и улучшает использование 7-ДАФСК в диагностике и/или терапии.

Таким образом, настоящее изобретение также обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую комплекс 7-ДАФСК-ПВП по изобретению.

В одном варианте осуществления указанная фармацевтическая композиция отличается тем, что содержит 7-ДАФСК в концентрации по меньшей мере 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 800, 1000, 2000, 3000 или 4000 мг/л, предпочтительно 4000 мг/л.

Один аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции для перорального, внутривенного или ингаляционного введения.

В конкретном варианте осуществления фармацевтическую композицию по изобретению применяют в терапевтическом способе.

В другом конкретном варианте осуществления фармацевтическую композицию по изобретению используют для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, бронхиальной астмы, ожирения, глаукомы, легочных заболеваний, воспалений суставов или остеоартрита/артрита.

Один аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции по изобретению для применения в качестве лекарственного средства.

#### Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - схема реакции дезацетилирования форсколина до 7-ДАФСК карбонатом натрия ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).

Фиг. 2 - сравнение массовой доли 7-ДАФСК в комплексах 7-ДАФСК-ПВП K12 и 7-ДАФСК-ПВП K25 в образцах, приготовленных методом нагревания и методом растворения.

Фиг. 3 - доля преобразованного 7-ДАФСК при различных массовых соотношениях ДАФСК и используемого ПВП K12.

Фиг. 4 - сравнение массовой доли 7-ДАФСК в комплексах 7-ДАФСК-ПВП K12 при различных мас-

совых соотношениях 7-ДАФСК и ПВП К12.

Фиг. 5 - зависимость между растворимостью в воде и массовой долей 7-ДАФСК в комплексе 7-ДАФСК-ПВП К12.

Фиг. 6 - анализ цАМФ с использованием клеток НЕК293, содержащих рецепторы EP2, EP4 и IP. Клетки стимулировали контрольным образцом (трепростинил), 30 мкМ форсколина в ДМСО, 100 мкМ 7-ДАФСК в воде и 100 мкМ 7-ДАФСК в комплексе 7-ДАФСК-ПВП К12 в воде.

#### **Подробное описание изобретения**

7-Дезацетил-форсколин (7-ДАФСК) может быть представлен структурной формулой, показанной на фиг. 1. 7-ДАФСК может также существовать в других формах, помимо молекулярной формы, таких как в форме солей, например, солей щелочных металлов, таких как соли натрия или калия. В контексте настоящего изобретения термин "7-дезацетил-форсколин (7-ДАФСК)" относится как к молекулярной форме, как показано в структурной формуле на фиг. 1, так и ко всем другим возможным формам, таким как соли 7-ДАФСК, предпочтительно соли щелочных металлов, особо предпочтительно соли натрия или калия.

Поливинилпирролидон (ПВП), также известный как поливидон или повидон, представляет собой полимер соединения винилпирролидона. ПВП коммерчески доступен в различных степенях полимеризации. Степень полимеризации определяет среднюю молекулярную массу полимера. Термин "средняя молекулярная масса", используемый в настоящем изобретении, относится к средневесовой молекулярной массе.

В контексте настоящего изобретения предпочтительным является ПВП со средней молекулярной массой от 1 до 40 кДа, поскольку полимеры такого размера все еще могут хорошо экскретироваться и не метаболизироваться почками.

В одном варианте осуществления комплекс 7-ДАФСК-ПВП отличается тем, что ПВП имеет среднюю молекулярную массу от 1 до 60 кДа, в частности от 1 до 40 кДа. Предпочтительно ПВП имеет среднюю молекулярную массу от 1 до 25 кДа, предпочтительно, примерно от 2 до 9, от 2 до 8, от 2 до 7, от 2 до 6, от 2 до 5, от 2 до 4, более предпочтительно от 2 до 3, наиболее предпочтительно примерно от 2,5 кДа.

Термин "примерно" в настоящем изобретении относится к указанному значению или значению, которое отклоняется от указанного значения на  $\pm 10\%$ .

Молекулярная масса ПВП также может быть определена значением К, которое получают путем измерения вязкости, и зависит от средневязкостной молекулярной массы вместо указания средневесовой молекулярной массы. ПВП со средневесовой молекулярной массой примерно 2,5 кДа соответствует ПВП со значением К примерно 12, называемому в настоящем изобретении "ПВП К12" (К. Kolter et al. "Hot-Meld Extrusion with BASF Pharma Polymers", ISBN 978-3-00-039415-7, 2012). ПВП со средневесовой молекулярной массой примерно 24 кДа соответствует ПВП со значением К примерно 25, обозначаемому в настоящем изобретении как "ПВП К25".

В контексте настоящего изобретения термин "комплекс 7-ДАФСК-ПВП" относится к химическому продукту, содержащему 7-ДАФСК и ПВП, и характеризующемуся тем фактом, что между 7-ДАФСК и ПВП существует связь. Термин "комплекс" никоим образом не ограничивает природу соединения, а просто означает наличие связи между одной или несколькими молекулами 7-ДАФСК и одной или несколькими молекулами ПВП. Связь может представлять собой, например, ковалентную связь или, предпочтительно, нековалентное присоединение 7-ДАФСК к ПВП, например, через связи Ван-дер-Ваальса или водородные связи. Термин "7-ДАФСК-ПВП" или "комплекс 7-ДАФСК-ПВП" следует понимать, как включающий химический продукт в целом, а не отдельный комплекс 7-ДАФСК-ПВП на молекулярном уровне.

Термины "массовая доля" и "молярное отношение" всегда следует понимать здесь как средние значения. Они относятся не к каждому отдельному комплексу на молекулярном уровне, а к среднему значению всего химического продукта.

Проценты (%) в настоящем изобретении относятся в каждом случае к массовым процентам (мас.%), если не указано иное.

В одном варианте осуществления средняя массовая доля 7-ДАФСК в общем комплексе составляет от 1 до 50 мас.%, предпочтительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 25 мас.%, более предпочтительно 30, 35, 40, 45 мас.% или выше. Массовая доля здесь отражает относительную долю массы 7-ДАФСК от массы всего комплекса (7-ДАФСК-ПВП).

Доля 7-ДАФСК в комплексе 7-ДАФСК-ПВП также может быть выражена в виде молярного отношения. Например, для комплекса 7-ДАФСК-ПВП, который состоит из молекулярного 7-ДАФСК (молярная масса: 368,5 г/моль) и ПВП, имеющего среднюю молекулярную массу примерно 2,5 кДа ("ПВП К12"), и имеет среднюю массовую долю 7-ДАФСК в общем комплексе 30 мас.%, среднее молярное отношение 7-ДАФСК к ПВП в комплексе составляет примерно 3. Среднее молярное отношение здесь отражает отношение молярного количества 7-ДАФСК к молярному количеству ПВП.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения среднее молярное отношение 7-ДАФСК к ПВП в комплексе составляет 0,1 или выше, предпочтительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40,

45, 50, 55, 60 или выше, более предпочтительно 3 или выше.

Доля (массовая доля, а также молярное отношение) 7-ДАФСК в общем комплексе всегда следует понимать в настоящем изобретении как среднюю долю. Подходящим методом определения средней доли 7-ДАФСК в общем комплексе является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Специалист в данной области техники знаком с выполнением такого определения.

7-ДАФСК можно получить из форсколина с помощью реакции дезацетилирования, например, карбонатного омыления, как описано в конкретных примерах настоящего изобретения. В качестве реагента можно использовать как натуральный, так и синтетический форсколин. Натуральный форсколин обычно присутствует в виде обогащенного экстракта, который очищают перед использованием. В контексте настоящего изобретения предпочтительным является синтетический форсколин, коммерчески доступный в высокой чистоте, в качестве реагента для синтеза 7-ДАФСК.

Таким образом, в одном варианте осуществления комплекс согласно изобретению характеризуется тем, что 7-ДАФСК получен из синтетического форсколина. В предпочтительном варианте осуществления 7-ДАФСК имеет чистоту по меньшей мере 98,5%.

Комплекс 7-ДАФСК-ПВП по изобретению характеризуется повышенной растворимостью в воде по сравнению с 7-ДАФСК-ПВП, не образующим комплексов, что выгодно для фармацевтических применений.

Неожиданно было обнаружено, что комплексы 7-ДАФСК-ПВП легко доступны синтетически путем нагревания 7-ДАФСК и ПВП до температуры, превышающей температуру стеклования используемого ПВП. Удивительно, но эта процедура также приводит к высокой массовой доле 7-ДАФСК в общем комплексе.

Таким образом, настоящее изобретение включает способ получения комплекса 7-ДАФСК-ПВП согласно изобретению, где смесь 7-ДАФСК и ПВП нагревают до температуры, превышающей температуру стеклования используемого ПВП.

Как аморфное вещество, ПВП не имеет точки плавления, но имеет так называемую температуру стеклования. Температура стеклования зависит, в том числе, от степени полимеризации, т.е. от средней молекулярной массы ПВП (см. табл. 1).

Таблица 1

Примеры зависимости температуры стеклования ПВП от молекулярной массы

Средняя молекулярная масса ПВП	Температура стеклования
Примерно 2,5 кДа («ПВП К12»)	93°C
Примерно 9 кДа («ПВП К17»)	130°C
Примерно 24 кДа («ПВП К25»)	155°C
Примерно 40 кДа («ПВП К30»)	175°C

В этом контексте "температуру стеклования используемого ПВП" следует понимать как температуру, при которой происходит стеклование ПВП в настоящей смеси с 7-ДАФСК. На температуру стеклования используемого ПВП может влиять состав смеси, например, если к смеси добавляют растворители или воду. Способы определения температуры стеклования известны специалистам в данной области техники. Предпочтительную температуру стеклования можно определить в соответствии с процедурой соответствующего стандарта DIN (Wampfler B., et al., Messunsicherheit in der Kunststoffanalytik - Ermittlung mit Ringversuchsdaten. Carl Hanser Verlag, Munich 2017, ISBN-10: 3446452869).

Особо предпочтительный вариант осуществления способа по изобретению для получения комплекса 7-ДАФСК-ПВП отличается тем, что средняя молекулярная масса используемого ПВП составляет примерно 2,5 кДа ("ПВП К12"), и смесь нагревают до температуры выше 93°C. В частности, нагревание осуществляют до температуры, которая по меньшей мере на 25°C, в частности, на 30, 40, 45°C или более превышает температуру стеклования ПВП К12.

Другой предпочтительный вариант осуществления характеризуется тем, что средняя молекулярная масса используемого ПВП составляет примерно 9 кДа ("ПВП К17"), и смесь нагревают до температуры выше 130°C. Более конкретно, смесь нагревают до температуры, которая по меньшей мере на 25°C, в частности, на 30, 40, 45 или более превышает температуру стеклования ПВП К17.

Другой предпочтительный вариант осуществления характеризуется тем, что средняя молекулярная масса используемого ПВП составляет примерно 24 кДа ("ПВП К25"), и смесь нагревают до температуры выше 155°C. Более конкретно, её нагревают до температуры, которая по меньшей мере на 25°C, в частности на 30, 40, 45°C или более превышает температуру стеклования ПВП К25.

Другой предпочтительный вариант осуществления характеризуется тем, что средняя молекулярная масса используемого ПВП составляет примерно 40 кДа ("ПВП К30"), и смесь нагревают до температуры выше 175°C. Более конкретно, её нагревают до температуры, которая по меньшей мере на 25°C, в частности на 30, 40, 45 или более превышает температуру стеклования ПВП К30.

Было обнаружено, что предпочтительно добавлять растворитель или смесь растворителей к смеси 7-ДАФСК и ПВП по изобретению. Предпочтительно смесь 7-ДАФСК и ПВП перемешивают в виде пасты в небольшом количестве растворителя. Добавление растворителя может способствовать однородному

распределению 7-ДАФСК и ПВП и позволить большему количеству 7-ДАФСК присоединяться к ПВП. Подходящими растворителями являются водные, спиртовые или другие органические растворители, такие как вода, этанол, метанол, пропанол, ацетон, этилметилкетон, дихлорметан и/или этилацетат.

В одном варианте осуществления способ получения комплекса 7-ДАФСК-ПВП по изобретению отличается тем, что растворитель, предпочтительно воду, этанол, метанол, пропанол, ацетон, этилметилкетон, дихлорметан и/или этилацетат, еще более предпочтительно воду, этанол, метанол, пропанол, дихлорметан и/или пиридин, добавляют к смеси 7-ДАФСК и ПВП. Особо предпочтительно к смеси 7-ДАФСК и ПВП добавляют воду и/или этанол или их смесь. Добавление воды и/или этанола может быть одновременным или последовательным.

Было обнаружено, что в производственном процессе полезно поддерживать смесь 7-ДАФСК и ПВП при температуре, превышающей температуру стеклования используемого ПВП, в течение определенного периода времени. Хорошие результаты были получены, когда смесь выдерживали при температуре выше температуры стеклования не менее 5 мин.

Поэтому в конкретном варианте осуществления способа по изобретению смесь 7-ДАФСК и ПВП выдерживают при температуре, превышающей температуру стеклования используемого ПВП, по меньшей мере 5 мин.

В конкретном варианте осуществления способ по изобретению включает следующие этапы, которые выполняют последовательно:

- (a) приготовление смеси 7-ДАФСК и ПВП и добавление к смеси растворителя, предпочтительно спирта, предпочтительно этанола;
- (b) добавление воды;
- (c) нагревание смеси выше температуры стеклования ПВП в течение по меньшей мере 5 мин;
- (d) охлаждение смеси и растворение в воде;
- (e) удаление нерастворенных компонентов, при необходимости путем фильтрации. В одном варианте осуществления смесь 7-ДАФСК и ПВП готовят в массовом отношении от 2:1 до 1:4, предпочтительно 2:1, 2:1,5, 1:1, 2:3, 1:2, 1:3 и 1:4, наиболее предпочтительно 1:1 или 1:2.

Применение способа по изобретению позволяет эффективно и просто получать комплексы 7-ДАФСК-ПВП.

Способ по изобретению позволяет получать комплексы 7-ДАФСК-ПВП с высокой массовой долей 7-ДАФСК. Обычные способы получения комплексов ПВП включают растворение компонентов в растворителе или смеси растворителей, причем смесь не нагревают выше температуры стеклования ПВП. В конкретном примере, поясняемом в настоящем изобретении, способ по изобретению позволил достичь на 8-9% более высоких средних массовых долей 7-ДАФСК в комплексах 7-ДАФСК-ПВП по сравнению с обычными процессами образования комплексов.

Высокая массовая доля 7-ДАФСК в комплексах 7-ДАФСК-ПВП особенно выгодна для фармацевтических применений в диагностике и/или терапии. При использовании высокой массовой доли 7-ДАФСК в комплексе по изобретению растворимости 7-ДАФСК в воде может быть увеличена без необходимости неблагоприятно большого количества ПВП. Таким образом, составы с производными форсколина также могут быть получены более экономичным способом, чем раньше. Избегая больших количеств адъювантов (ПВП) и связанных с ними побочных эффектов, настоящее изобретение облегчает и улучшает использование 7-ДАФСК в диагностике и/или терапии.

Комплекс 7-ДАФСК-ПВП по изобретению можно использовать для любых диетических или медицинских целей, в которых применимы форсколин и/или 7-ДАФСК.

Следовательно, настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей комплекс 7-ДАФСК-ПВП по изобретению с 7-ДАФСК в качестве активного ингредиента.

Термин "фармацевтическая композиция" используется в настоящем изобретении в отношении комплекса 7-ДАФСК-ПВП по изобретению с 7-ДАФСК в качестве активного ингредиента, при необходимости в комбинации с дополнительными ингредиентами и/или активными ингредиентами.

Фармацевтическая композиция по изобретению может быть представлена в различных составах для системного и местного применения. Неограничивающие примеры препаратов для системного или местного применения, содержащих комплекс 7-ДАФСК-ПВП по изобретению, включают составы для перорального, интрабуккального, внутрилегочного, ректального, внутриматочного, интрадермального, местного, дермального, парентерального, внутриопухолевого, интракраниального, буккального, сублингвального, интраназального, подкожного, внутрисосудистого, интратекального, ингаляционного, респираторного, внутрисуставного, внутриполостного, имплантационного, трансдермального, ионтофоретического, интраокулярного, вагинального, оптического, внутривенного, внутримышечного, внутрижелудочного, внутриорганного, внутрилимфатического введения, составы с энтеросолюбильными покрытиями или составы с медленным высвобождением.

Композицию можно вводить один или несколько раз в сутки. Предпочтительный вариант осуществления относится к фармацевтической композиции по изобретению для перорального, внутривенного или ингаляционного введения.

Составы для перорального введения могут быть предоставлены в виде отдельных единиц, таких как

капсулы, таблетки или пастилки, содержащие состав в виде порошка или гранул. Составы для перорального введения также могут быть представлены в виде раствора или суспензии в водной или неводной среде, или в виде эмульсии.

Составы для внутривенного введения могут быть представлены в виде раствора или суспензии в водной среде, например, в виде солевого раствора.

Специфическая доза комплекса 7-ДАФСК-ПВП для достижения терапевтического или профилактического эффекта зависит от конкретного применения, например, пути введения, возраста, массы тела и состояния конкретного пациента, заболевания, которое лечат, и тяжести симптомов.

Доза 7-ДАФСК-ПВП в композиции по изобретению предпочтительно представляет собой эффективную дозу, при которой достигается терапевтический или профилактический эффект, не вызывая нежелательных побочных эффектов, и композицию можно вводить в виде разовой дозы или в виде нескольких единиц.

В конкретном варианте осуществления композицию по изобретению обеспечивают в виде раствора или аэрозоля, содержащего 7-ДАФСК в концентрации по меньшей мере 25 мг/л, предпочтительно по меньшей мере 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 800 или 1000 мг/л. В предпочтительном варианте осуществления композиция содержит 7-ДАФСК в концентрации по меньшей мере 1, 1,5, 2, 2,5, 3 или 4, наиболее предпочтительно 4 мг/мл.

В другом конкретном варианте осуществления композиция по изобретению представлена в виде капсулы или таблетки, содержащей 7-ДАФСК в фармацевтически эффективном количестве, например, от 10 до 2000 мг, предпочтительно по меньшей мере 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000, более предпочтительно 500 мг.

В конкретном варианте осуществления фармацевтическую композицию по изобретению применяют в терапевтическом способе.

Известно, что форсколин и 7-ДАФСК являются неспецифическими стимуляторами цАМФ. Комплекс 7-ДАФСК-ПВП по изобретению можно использовать для лечения любого заболевания или расстройства, которое можно лечить форсколином и/или 7-ДАФСК. Неограничивающие примеры таких заболеваний включают нейродегенеративные заболевания, болезнь Альцгеймера, моторную дисфункцию, острые и хронические сердечно-сосудистые заболевания, легочные заболевания, такие как астма, муковисцидоз, сосудистые заболевания, связанные с муковисцидозом, бронхит, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), ожирение, глаукому, воспаление суставов, остеоартрит/артрит, фиброзные изменения, такие как идиопатический легочный фиброз, посттравматический легочный фиброз, бронхолегочная дисплазия (БЛД), заболевания печени после воздействия токсических факторов, такие как заболевания, предупреждаемые вакцинацией или цирроз, и нарушения периферического кровообращения, включая болезнь Рейно и склеродермию.

В конкретном варианте осуществления фармацевтическую композицию по изобретению используют для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, бронхиальной астмы, ожирения, глаукомы, легочных заболеваний, воспалений суставов или остеоартрита/артрита.

Другой аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции по изобретению для применения в качестве лекарственного средства.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами и фигурами, но не ограничивается ими.

### Примеры

Следующие примеры описывают синтез 7-ДАФСК и образование комплекса 7-ДАФСК с ПВП, где был выбран ПВП со средней молекулярной массой примерно 2,5 кДа ("ПВП К12") и примерно 24 кДа ("ПВП К25"), и соотношение количеств 7-ДАФСК и ПВП варьировало. В примерах далее рассматривается характеристика полученных комплексов с точки зрения содержания 7-ДАФСК, растворимости в воде и эффекта в качестве активатора цАМФ в анализах цАМФ. Примеры не включают подробное описание стандартных методов, таких как определение содержания с помощью ВЭЖХ или измерение спектров ЯМР. Такие способы хорошо известны специалистам в данной области техники.

Пример 1. Синтез 7-дезацетил-форсколина.

Синтетический форсколин Mercachem (материал GMP), серия МАМА07-024-5, использовали в качестве реагента для синтеза 7-дезацетил-форсколина (7-ДАФСК). Деацетилирование форсколина проводили классическим карбонатным омылением.

Деацетилирование проводили по схеме реакции, представленной на фиг. 1. Сначала 200 мг форсколина (синтетический форсколин, Mercachem, серия МАМА07-024-5) и 200 мг прокаленного  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  перемешивали в 10 мл метанола в круглодонной колбе вместимостью 250 мл, в течение 4 ч при комнатной температуре. Затем реакционной смеси давали отстояться в течение ночи (20 ч).

Затем метанол отгоняли (с ротормым испарителем) и растворяли примерно в 20 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  из колбы. Смесь обрабатывали ультразвуком в течение короткого периода времени (1 мин). Образовавшийся 7-ДАФСК переводили в раствор с  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , осаждая соли. Соли отделяли фильтрацией (на фильтрах со средней скоростью фильтрации). Затем фильтрат промывали в 2 н  $\text{HCl}$  в делительной воронке. Дихлорметановую фракцию удаляли, а растворитель отгоняли в ротационном испарителе. Полученный белый

порошок анализировали с помощью ВЭЖХ. Была определена чистота более 99%.

Структуру 7-ДАФСК подтверждали с помощью  $^1\text{H}$  ЯМР и  $^{13}\text{C}$  ЯМР. Измеренные спектры  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР полученного 7-ДАФСК идентичны ранее опубликованным спектрам этого соединения (J. Org. Chem. 2006, 71, 4619-4624). Это подтвердило необходимое дезацетилирование форсколина в соответствии со схемой реакции, показанной на фиг. 1.

Полученный 7-ДАФСК дополнительно характеризовали с помощью ВЭЖХ. Дезацетил-форсколин и форсколин элюировали подвижной фазой ацетонитрил/вода (55/45 по объему) при скорости потока 0,6 мл/мин (стационарная фаза: Nucleosil 120 3С18, 250×4 мм). Строили калибровочную кривую для количественного определения содержания 7-ДАФСК в комплексе с ПВП. Для калибровки использовали калибровочные растворы с концентрацией 7-ДАФСК 0,014; 0,028; 0,056 и 0,56 мг/мл.

Пример 2. Получение комплексов 7-ДАФСК-ПВП.

Поскольку сам 7-дезацетил-форсколин лишь умеренно растворим в воде, 7-ДАФСК объединяли в комплекс с ПВП для повышения его растворимости в воде. Комплексы 7-ДАФСК получали способами по изобретению, именуемыми в дальнейшем "способами нагревания", и для сравнения с обычным раствором без нагревания ("способы растворения").

1. Получение комплексов 7-ДАФСК-ПВП путем нагревания ПВП выше температуры стеклования ("способ нагревания").

Комплекс 7-ДАФСК-ПВП К12 (комплекс 7-ДАФСК с ПВП К12).

Для образования комплекса 7-дезацетил-форсколина с ПВП К12 ("Коллидон" 12 PF, Евр.Фарм., Фарм. США, Яп.Фарм.; BASF, средняя молярная масса: примерно 2,5 кДа), 20 мг 7-ДАФСК и 20 мг ПВП К12 растирали в фарфоровом тигле, добавляли 300 мкл этанола и перемешивали. Через 10 мин добавляли 100 мкл  $\text{H}_2\text{O}$ , перемешивали и снова оставляли на 10 мин. Затем раствор нагревали до 140°C в сушильном шкафу в течение 40 мин и оставляли в нем в общей сложности на 45 мин. После охлаждения добавляли 3 мл  $\text{H}_2\text{O}$  и перемешивали в течение 20-30 мин. Затем суспензию отбирали шприцем и пропускали через фильтр 0,45 мкм (гидрофильный). Тигель повторно промывали 3 мл  $\text{H}_2\text{O}$ , и промывной раствор также пропускали через фильтр. Содержание 7-ДАФСК, растворенного в 6 мл  $\text{H}_2\text{O}$ , определяли с помощью ВЭЖХ. Для определения раствор комплекса 7-ДАФСК-ПВП разбавляли 1:10 буфером для ВЭЖХ. Массовая доля 7-ДАФСК в общем комплексе при определении составила 35 мас. %.

Комплекс 7-ДАФСК-ПВП К25 (комплекс 7-ДАФСК с ПВП К25).

Для образования комплекса 7-дезацетил-форсколина с ПВП К25 (FLUKA 81399, средняя молекулярная масса: примерно 24 кДа) 20 мг 7-ДАФСК и 20 мг ПВП К25 растирали в фарфоровом тигле, и добавляли 300 мкл этанола и перемешивали. Через 10 мин добавляли 100 мкл  $\text{H}_2\text{O}$ , перемешивали и снова оставляли на 10 мин. Затем раствор нагревали до 185°C в сушильном шкафу в течение 40 мин и оставляли в нем в общей сложности на 45 мин. После охлаждения добавляли 3 мл  $\text{H}_2\text{O}$  и перемешивали в течение 20-30 мин. Затем суспензию отбирали шприцем и пропускали через фильтр 0,45 мкм (гидрофильный). Тигель повторно промывали 3 мл  $\text{H}_2\text{O}$ , и промывной раствор также пропускали через фильтр. Содержание 7-ДАФСК, растворенного в 6 мл  $\text{H}_2\text{O}$ , определяли с помощью ВЭЖХ. Для определения раствор комплекса 7-ДАФСК-ПВП 25 разбавляли буфером для ВЭЖХ в соотношении 1:10. Массовая доля 7-ДАФСК в общем комплексе при определении составила 17 мас. %.

2. Получение комплексов 7-ДАФСК-ПВП способом растворения.

Комплекс 7-ДАФСК-ПВП К12.

20 мг 7-ДАФСК и 40 мг ПВП К12 растирали в фарфоровом тигле, добавляли 300 мкл этанола и перемешивали. Через 10 мин добавляли 100 мкл  $\text{H}_2\text{O}$ , перемешивали и снова оставляли на 10 мин. Затем раствор выдерживали при комнатной температуре в течение 45 мин, добавляли 3 мл  $\text{H}_2\text{O}$  и перемешивали в течение 20-30 мин. Затем суспензию отбирали шприцем и пропускали через фильтр 0,45 мкм (гидрофильный). Тигель повторно промывали 3 мл  $\text{H}_2\text{O}$ , и промывной раствор также пропускали через фильтр. Содержание 7-ДАФСК, растворенного в 6 мл  $\text{H}_2\text{O}$ , определяли с помощью ВЭЖХ. Массовая доля 7-ДАФСК в общем комплексе при определении составила 24 мас. %.

Комплекс 7-ДАФСК-ПВП К25.

20 мг 7-ДАФСК и 40 мг ПВП 25 растирали в фарфоровом тигле, добавляли 300 мкл этанола и перемешивали. Через 10 мин добавляли 100 мкл  $\text{H}_2\text{O}$ , перемешивали и снова оставляли на 10 мин. Затем раствор выдерживали при комнатной температуре в течение 45 мин, добавляли 3 мл  $\text{H}_2\text{O}$  и перемешивали в течение 20-30 мин. Затем суспензию отбирали шприцем и пропускали через фильтр 0,45 мкм (гидрофильный). Тигель повторно промывали 3 мл  $\text{H}_2\text{O}$ , и промывной раствор также пропускали через фильтр. Содержание 7-ДАФСК, растворенного в 6 мл  $\text{H}_2\text{O}$ , определяли с помощью ВЭЖХ. Массовая доля 7-ДАФСК в общем комплексе при определении составила 8 мас. %.

Пример 3. Определение растворимости в воде.

Для испытаний на растворимость использовали соответствующий комплекс, высушенный на ротационном испарителе. Добавляли определенное количество воды, а затем добавляли комплекс до тех пор, пока не появлялся избыток 7-ДАФСК-ПВП. Перенасыщенный раствор обрабатывали ультразвуком, перемешивали и слегка нагревали (водяная баня при 40°C). Затем суспензию фильтровали (фильтр 0,45

мкм) и определяли содержание 7-ДАФСК в фильтрате с помощью ВЭЖХ.

Пример 4. Характеристика комплекса 7-ДАФСК-ПВП.

Массовая доля 7-ДАФСК в общем комплексе.

На фиг. 2 представлена диаграмма определяемого содержания 7-ДАФСК в комплексах 7-ДАФСК-ПВП К12 и 7-ДАФСК-ПВП 25, для которых было выбрано соотношение 7-ДАФСК к ПВП 20 к 20. Здесь проводится различие между способом нагревания и способом растворения. Для всех комплексов можно увидеть четкие различия в отношении солей 7-ДАФСК между двумя способами. При использовании способа нагревания в конечных комплексах можно получить на 8-9% больше солей 7-ДАФСК. Комплекс 7-ДАФСК-ПВП К12 характеризуется самым высоким содержанием 7-ДАФСК (примерно 35 мас.%).

Для оптимизации содержания 7-ДАФСК в общем комплексе изменяли массовые отношения используемых 7-ДАФСК и ПВП К12 (фиг. 3). Даже при изменении соотношения 7-ДАФСК/ПВП К12 не более 50-60% используемого материала могло формировать комплекс с 7-ДАФСК (20 мг) при этом способе, как видно из фиг. 3. Ясно, что, несмотря на увеличение количества ПВП12, конечное комплексообразующее количество 7-ДАФСК в конечном комплексе существенно не меняется. Для того чтобы выяснить, сколько не образовавшегося комплекса 7-ДАФСК переходит в раствор в процессе растворения после приготовления путем нагревания, оценивали контрольный образец (без ПВП12, только 7-ДАФСК), обработанный так же, как и комплексные образцы. Здесь могло выходить в раствор менее четверти используемого 7-ДАФСК. Таким образом, образование комплекса с ПВП увеличивает растворимость 7-ДАФСК.

Даже увеличивая количество растворителя перед нагреванием, не удалось ввести в комплекс с ПВП К12 большее количество 7-ДАФСК.

Фиг. 4 показывает, что даже при очень малых количествах ПВП могут быть получены сопоставимые результаты.

Сообщаемое содержание 7-ДАФСК в мас.% определяли с помощью ВЭЖХ. Для расчета предполагали, что все количество ПВП переходит в раствор при растворении в 6 мл H<sub>2</sub>O.

Растворимость в воде.

Из табл. 2 видно, что значительное увеличение растворимости 7-ДАФСК в воде возможно за счет образования комплекса с ПВП. Растворимость 7-ДАФСК в комплексе с ПВП до трех раз выше, чем растворимость не образовавшегося комплекса 7-ДАФСК. В отличие от 7-ДАФСК, форсколин практически не растворяется в ПВП из-за его стерической структуры и не образует комплексов с ПВП.

На фиг. 5 показано, что растворимость в воде существенно не меняется при различных соотношениях ДАФСК/ПВП. Значения варьируют от 2,5 мг/мл до 3,5 мг/мл. Это связано с тем фактом, что при каждом соотношении образует комплекс примерно одинаковая доля 7-ДАФСК (50-60%) из комплекса, что существенно не меняет растворимость комплекса в воде.

Таблица 2

Растворимость в воде различных веществ/комплексов

Вещество/комплекс	Массовая доля ПВП от общего комплекса	Растворимость в воде
ФСК	-	0,01 мг/мл
ФСК-ПВП12	-	0,001 мг/мл (не обнаруживается, не выявляется образование комплекса с форсколином)
7-ДАФСК	-	1 мг/мл
7-ДАФСК-ПВП К12	35 масс.%	3 мг/мл
7-ДАФСК-ПВП К25	17 масс.5	2 мг/мл

Пример 5. Тест на клеточной культуре: анализ цАМФ.

Анализ цАМФ проводили с использованием клеток НЕК293 (клетки эмбриональной почки человека, 1970) с рецепторами простагландина EP2 или EP4 или рецептором простаглицина IP. Клетки НЕК293 инкубировали с эмбриональной телячьей сывороткой и радиолигандом ([<sup>3</sup>H]аденин). Образование цАМФ ([<sup>3</sup>H] цАМФ) контролировали в ходе эксперимента.

Сравнивали активацию аденилатциклазы (АЦ) форсколином (растворенным в ДМСО), 7-ДАФСК и 7-ДАФСК-ПВП, оба были растворены в воде. Существуют незначительные различия между тремя производными форсколина в активации АЦ через рецепторы EP2 и EP4, и нет существенных различий в активации рецептора IP (фиг. 6).

Все три производных форсколина через указанные рецепторы активируют аденилатциклазу даже в присутствии трепростинила. Трепростинил по отдельности (контрольный образец) не вызывает активации АЦ. Повышенная активность форсколина, 7-ДАФСК и 7-ДАФСК-ПВП по сравнению с контролем ясно видна на фиг. 6. Таким образом, эти результаты показывают, что 7-ДАФСК-ПВП является подходящим стимулятором аденилатциклазы.

Анализы проводили следующим образом.

День 1: клетки НЕК293, стабильно экспрессирующие рецепторы EP2, EP4 или IP, выращивали на 6-

луночном планшете в 2 мл среды DMEM, содержащей 10% ЭТС и 2 мкКи [<sup>3</sup>H]-аденина, и инкубировали в течение 16 ч.

День 2: клетки стимулировали 30 мкМ трепростинила по отдельности или в комбинации с 30 мкМ форсколина в ДМСО, 100 мкМ 7-ДАФСК в воде или 100 мкМ 7-ДАФСК в комплексе 7-ДАФСК-ПВП К12 в воде (в свежей среде в течение 30 мин при комнатной температуре). Затем клетки лизировали 2,5% перхлорной кислотой (ПХК) в течение 30 мин на льду. Экстракт ПХК нейтрализовали КОН, и [<sup>3</sup>H]цАМФ отделяли последовательной хроматографией с использованием колонок DOWEX и оксида алюминия. Затем измеряли радиоактивность с помощью сцинтиллятора.

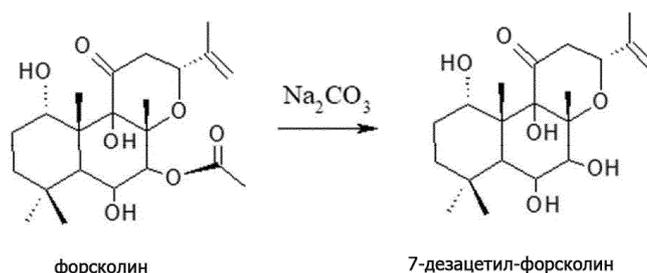
Аликвоту экстракта ПХК из каждой лунки использовали для измерения радиоактивности.

Пример 6. Попытка получения комплекса форсколин-ПВП способом растворения.

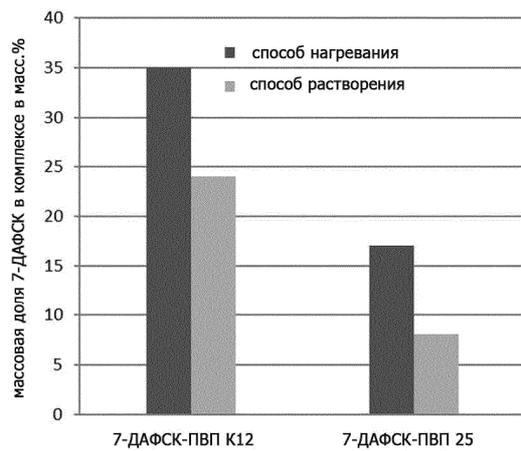
20 мг ФСК и 40 мг ПВП 25 растирали в фарфоровом тигле, добавляли 300 мкл этанола (или пропанола) и перемешивали. Через 10 мин добавляли 100 мкл Н<sub>2</sub>О, перемешивали и снова оставляли на 10 мин. Затем раствор выдерживали при комнатной температуре в течение 45 мин, добавляли 3 мл Н<sub>2</sub>О и перемешивали в течение 20-30 мин. Затем суспензию отбирали шприцем и пропускали через фильтр 0,45 мкм (гидрофильный). Тигель повторно промывали 3 мл Н<sub>2</sub>О, и промывной раствор также пропускали через фильтр. Содержание ФСК, растворенного в 6 мл Н<sub>2</sub>О, определяли с помощью ВЭЖХ. Массовая доля ФСК в общем комплексе при определении составила <0,01 мас.%. ФСК не был обнаружен в фильтрате при проведении ВЭЖХ.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

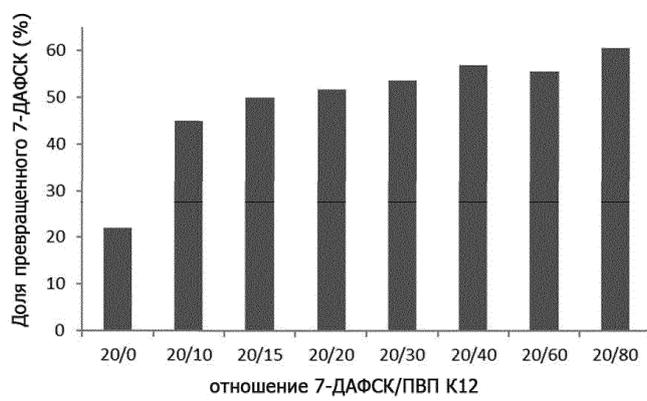
1. Комплекс 7-дезацетил-форсколина (7-ДАФСК) и поливинилпирролидона (ПВП).
2. Комплекс по п.1, где ПВП имеет среднюю молекулярную массу по отношению к средневесовой молекулярной массе от 1 до 40 кДа, предпочтительно от 2 до 25, особо предпочтительно примерно 2,5 кДа.
3. Комплекс по п.1 или 2, где 7-ДАФСК получен из синтетического форсколина.
4. Комплекс по любому из пп.1-3, где средняя массовая доля 7-ДАФСК в общем комплексе находится в пределах от 1 до 50, предпочтительно 30 мас.% или выше.
5. Способ получения комплекса по любому из пп.1-4, где смесь 7-ДАФСК и ПВП нагревают до температуры, превышающей температуру стеклования используемого ПВП.
6. Способ по п.5, где растворитель, предпочтительно воду, этанол, метанол, ацетон, этилметилкетон, дихлорметан и/или этилацетат, более предпочтительно воду, этанол, метанол, пропанол и/или дихлорметан, еще более предпочтительно воду и/или этанол, или их смесь, добавляют к смеси 7-ДАФСК и ПВП.
7. Способ по п.5 или 6, где смесь выдерживают при температуре выше температуры стеклования используемого ПВП в течение по меньшей мере 5 мин.
8. Способ по любому из пп.5-7, включающий этапы:
  - (a) приготовление смеси 7-ДАФСК и ПВП и добавление к смеси растворителя, предпочтительно спирта, предпочтительно этанола;
  - (b) добавление воды или водного раствора;
  - (c) нагревание смеси выше температуры стеклования ПВП в течение по меньшей мере 5 мин;
  - (d) охлаждение смеси и растворение в воде или водном растворе;
  - (e) удаление нерастворенных компонентов, при необходимости путем фильтрации.
9. Фармацевтическая композиция для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, бронхиальной астмы, ожирения, глаукомы, заболеваний легких, воспаления суставов или остеоартрита/артрита, содержащая комплекс по любому из пп.1-4.
10. Фармацевтическая композиция по п.9, содержащая 7-ДАФСК в концентрации по меньшей мере 25, предпочтительно по меньшей мере 100, 250, 500, 1000, 2000, 3000 или 4000 мг/мл, особо предпочтительно 4000 мг/мл.
11. Фармацевтическая композиция по п.9 или 10 для внутривенного, перорального или ингаляционного введения.



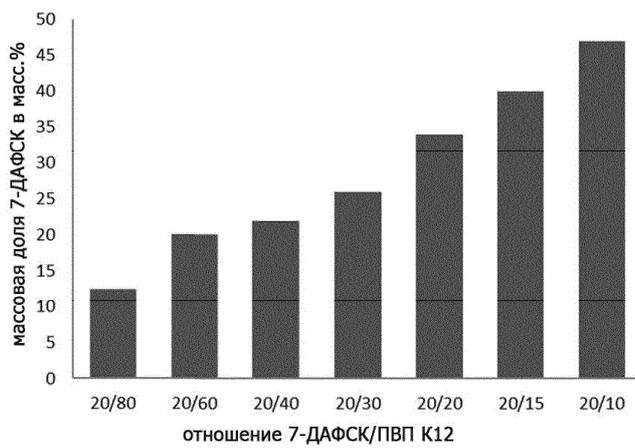
Фиг. 1



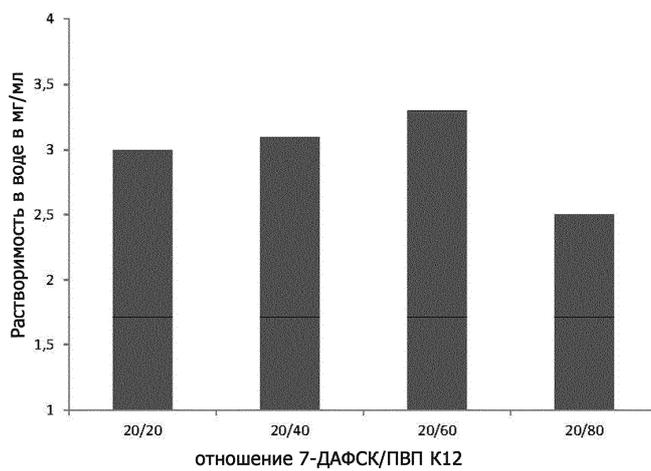
Фиг. 2



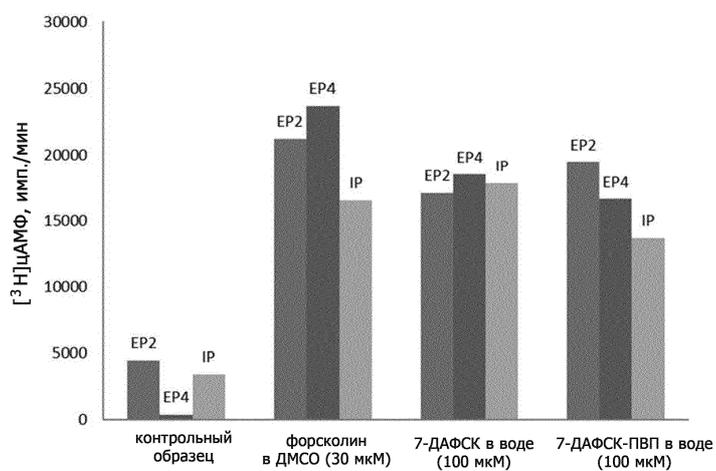
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

