

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202200102** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.08.31

(51) Int. Cl. *A61K 31/198* (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61P 5/14 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.02.22

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МОДИФИЦИРОВАННОГО КОМПЛЕКСА ХИТОЗАН С ЛЕВОТИРОКСИНОМ**

(96) **2022/005 (AZ) 2022.02.22**

(71) Заявитель:
**ГУММАТОВ АЗЕР ФАРАХИМ ОГЛЫ
(AZ)**

(72) Изобретатель:
**Гумматов Азер Фарахим оглы,
Зейналов Низами Аллахверди
оглы, Тагиев Дильгам Бабир оглы,
Ширинова Сафарова Хатира
Новрузали кызы, Тапдыгов Шамо
Зохраб оглы, Сафаралиева Самира
Фаиг кызы, Балаева Эмилья Закир
кызы (AZ)**

(74) Представитель:
Рамазанов Г.Ч. (AZ)

(57) Изобретение относится к области медицины, а именно к созданию нового комплекса хитозана и левотироксина. Синтезированная новая полимер-левотироксиновая смесь, содержащая хитозан/арабиногалактан, может быть использована в медицине для удовлетворения суточной потребности организма в гормоне L-тироксине при гипотиреозе. Комплекс содержит низкомолекулярный хитозан 95-99%, природный полисахарид арабиногалактан 1-5% (по массе) и 5-100 мкг левотироксина-На пентагидрата. Тироксин, гормон щитовидной железы, стимулирует рост и развитие, увеличивает потребность тканей в кислороде, регулирует метаболизм белков, жиров и углеводов, регулирует работу сердечно-сосудистой и центральной нервной системы. Полимерные носители усиливают терапевтический эффект за счет способности контролировать кинетику препарата в организме, его постепенное увеличение в плазме и длительное поддержание его концентрации. В результате за счет биополимерных носителей уменьшаются дозы и кратность введения лекарств, улучшается всасывание лекарств. Целью изобретения является получение данной композиции как минимум из двух полимеров, в частности низкомолекулярного хитозана, и арабиногалактана, обладающих высокой биосовместимостью, иммуномодулирующими и гастропротекторными свойствами.

A1

202200102

202200102

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

(СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПЛЕКСА МОДИФИЦИРОВАННОГО ХИТОЗАНА С ЛЕВОТИРОКСИНОМ)

Изобретение относится к области медицины, а именно к созданию нового комплекса хитозана и левотироксина. Синтезированная новая полимер-левотироксиновая смесь, содержащая хитозан/арабиногалактан, может быть использована в медицине для удовлетворения суточной потребности организма в гормоне L-тироксине при гипотиреозе.

Комплекс содержит низкомолекулярный хитозан 95-99%, природный полисахарид арабиногалактан 1-5% (по массе) и левотироксин-Na пентагидрат 5-100 мкг (табл. 1).

Таблица 1.

| № | Хитозан (масса), % | Арабиногалактан (масса), % | Левотироксин-Na пентагидрат, мкг. |
|----|--------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| 1. | 95 | 5 | 5; 25; 50; 75; 100. |
| 2. | 96 | 4 | 5; 25; 50; 75; 100. |
| 3. | 97 | 3 | 5; 25; 50; 75; 100. |
| 4. | 98 | 2 | 5; 25; 50; 75; 100. |
| 5. | 99 | 1 | 5; 25; 50; 75; 100. |

Известно, что тироксин, гормон щитовидной железы, стимулирует рост и развитие, повышает потребность тканей в кислороде, обеспечивает обмен белков, жиров и углеводов, регулирует деятельность сердечно-сосудистой и центральной нервной систем. В связи с гипотиреозом, вызванным удалением части или полностью желез при дисфункции, больные получают в течение всей жизни солевую форму гормонозаменивателя L-тироксина - левотироксин-Na пентагидрат. При длительном применении препарата, наблюдаются такие побочные действия, как прибавка в весе вследствие повышенного аппетита, выпадение волос, нарушение функции почек, тахикардия, аритмия, нарушение сна, необъяснимая тревожность и др[1].

В последние годы, для избежания передозировки, как в антибиотиках и белках, левотироксин иммобилизуется на природных и синтетических полимерных носителях. В результате увеличивается период активности препарата в плане выполнения им своей функции за счет продления его циркуляции в кровотоке. Среди таких полимерных носителей особое значение имеет хитозан, природный полиаминосахарид, который считается более благоприятной матрицей с точки зрения биосовместимости [2].

Анализы показывают, что исследования процесса выделения левотироксина путем его загрузки в матрицы на основе хитозана ограничены. Только в небольших количествах исследований можно встретить, что биологическую активность

левотироксина можно исследовать *in vitro* или *in vivo* путем иммобилизации его в гидрогели на основе хитозана.

Готовили смесь хитозана и коллагена в разных массовых количествах:

Хитозан (87 кДа) - 0,4 г

Коллаген - 0,4 г.

Левотироксин – 1 мкг и 10 мкг

Левотироксин загружали в смарт-гидрогель и изучали его высвобождение в средах фосфатно-солевого буфера, перекиси водорода и лизоцима. Ангиогенный потенциал комплекса гидрогель-лекарство, содержащего 1-10 мкг левотироксина, оказался высоким в течение 8-14 дней. Однако использование в исследованиях высокомолекулярного хитозана затрудняет его оптимальное усвоение [3].

В связи с высоким значением вязкости высокомолекулярного хитозана была разработана новая композиция с использованием относительно низкомолекулярного хитозана [4]:

Хитозан - 2% (по массе), степень деацетилирования 83%, вязкость 30,85 мл/г.

Гидроксиапатит - 1% (по массе)

Карбоксиметилцеллюлоза - 2% (по массе)

Левотироксин-Na - 0,1; 0,5 и 1,0 мкг/мл

Гидрогель хитозан/карбоксиметилцеллюлоза/гидроксиапатит загружали левотироксином, и эксперименты по ангиогенезу изучали *ex-ovo*. Гидрогель, содержащий 0,1 мкг левотироксина, был нетоксичен и обладал максимальным потенциалом неоваскуляризации, с хорошими свойствами изгиба, складывания, растекания и растяжения. Однако, наличие трех компонентов и наличие гидроксиапатита не обеспечивают однородного распределения препарата.

Целью изобретения является создание композиции как минимум из двух полимеров, особенно низкомолекулярных полисахаридов, и использование второго компонента - арабиногалактана, обладающего высокой биосовместимостью, иммуномодулирующими и гастропротекторными свойствами.

Близкий к предлагаемому составу прототип был разработан Э. Обинной и изучено кумулятивное выделение левотироксина. Так, автором были получены комплексы левотироксина отдельно с карбопол-, поликарбофил-, гидроксипропил метилцеллюлозой и хитозаном. Состав каждой матрицы был дифференцирован различными количествами левотироксина, и были проведены *in vitro* и *in vivo* исследования высвобождения.

В патенте описан синтез комплекса левотироксина с новыми бинарными полимерами, основным компонентом которых является низкомолекулярный хитозан и другой природный полисахарид арабиногалактан в количестве до 1-5%.

Вещества

Хитозан со средней молекулярной массой 35 кДа (степень деацетилирования 85-87%), ледяная (безводная) уксусная кислота, этанол (95%), арабиногалактан

(≥99,9%), этанол и NaOH от Sigma-Aldrich. Пентагидрат левотироксина-натрия (CAS 6106-07-6) также был приобретен от Sigma Aldrich.

Способ получения комплекса

Изобретение представлено следующими примерами:

Пример 1.

Хитозан - 4,75 г.

Арабиногалактан - 0,25 г.

Уксусная кислота CH_3COOH - 20 мл 0,5 М

Левотироксин-Na пентагидрат - 5 мкг

4,75 г хитозана диспергируют в 20 мл 0,5 М уксусной кислоты и 0,25 г арабиногалактана в деионизированной воде и непрерывно перемешивают в течение 24 часов до полного растворения. Раствор выливают в чашку Петри и замораживают при -20°C в течение 15 часов. Затем образец погружают в 3М холодный раствор NaOH в этаноле и снова выдерживают при -20°C в течение 24 часов. Гидрогель промывают сначала 50%-ным раствором этанола, а затем бидистиллированной водой до получения нейтральной среды ($\text{pH} = 6,5-7$). Затем, после промывания 95%-ым раствором этанола сушится при комнатной температуре. Для получения комплекса с левотироксином бинарную пробу Xz / AQ диаметром 15-20 мм добавляют к 5 мл раствора левотироксина с концентрацией 1 мкг/мл и выдерживают в течение 24 часов для иммобилизации. После абсорбции препарата комплекс Xz/AQ-левотироксин промывают раствором щелочи в этаноле, высушивается методом вакуумирования при -40°C . После высушивания комплекс доводят до постоянной массы выдерживанием при 30°C в течение 48 часов.

Пример 2.

Хитозан - 4,80 г.

Арабиногалактан - 0,20 г.

Уксусная кислота CH_3COOH - 20 мл 0,5 М

Левотироксин-Na пентагидрат - 50 мкг

4,80 г хитозана растворяют в 20 мл 0,5 М уксусной кислоты и 0,02 г арабиногалактана в 10 мл воды. Раствор замораживают при -20°C и повторно хранят в этанольном растворе NaOH при -20°C в течение 24 часов. Для получения комплекса с левотироксином образец Xz / AQ добавляют к 10 мл лекарственного раствора с концентрацией 5 мкг/мл и сохраняют для иммобилизации. После абсорбции препарата комплекс Xz/AQ-левотироксин промывают раствором щелочи в этаноле, высушивается методом вакуумирования при -40°C . Комплекс доводят до постоянной массы выдерживанием при 30°C в течение 2 суток.

Пример 3.

Хитозан - 4,95 г.

Арабиногалактан - 0,05 г.

Уксусная кислота CH_3COOH - 20 мл 0,5 М

Левотироксин-На пентагидрат - 100 мкг

4,95 г хитозана полностью растворяют в 20 мл 0,5 М уксусной кислоты и 0,05 г арабиногалактана в небольшом количестве воды. Для получения комплекса препарата используется 10 мл раствора левотирокина с концентрацией 10 мкг/мл. После абсорбции препарата комплекс *Xz/AQ-левотироксин* промывают раствором щелочи в этаноле, сушат при -40°C и доводят до постоянной массы.

FTIR и UV-Vis спектроскопические исследования показали, что левотироксин химически связан со структурой *Xz/AQ*, и было доказано, что он иммобилизован в матрицу, в основном, за счет водородных связей, а также ориентационных и электростатических сил.

Для исследования *in vivo* комплексы *Xz/AQ-левотирокина* с различным содержанием действующего вещества растворяли в слабой уксусной кислоте и желудочном соке и изучали процессы всасывания на кроликах.

По сравнению с прототипом изобретение описывает содержание в комплексе до 5-100 мкг активного препарата левотирокина-пентагидрата натрия, который согласно экспериментальным испытаниям на кроликах имеет более длительный период всасывания и циркуляции в кровотоке. Кроме того, нежелательно тратить много времени на создание комплексов левотирокина с матрицами и использовать в процессе токсическое вещество- метанол. Использование в процессе D-маннитола в качестве связующего и высушивание при -80°C также могут рассматриваться как сложная процедура. Однако, предлагаемый нами метод отличается тем, что он более прост и эффективен.

Литература:

1. Jayeon S., Hansol K., Chang Y.L., Junhyeok Y., Won S.Y., Hyun G.P. Identification of thyroid hormone/thyroid hormone receptor interaction based on aptamer-assisted protein-induced fluorescence enhancement // *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 191, p.113444.
2. Islam K.N., Ihara M., Dong J.H., Kasagi N., Mori T., Ueda H. Direct Construction of an Open-Sandwich Enzyme Immunoassay for One-Step Noncompetitive Detection of Thyroid Hormone T4 // *Analytical Chemistry*, 2011, 83, p.1008–1014.
3. Aleem A.R., Shahzadi L., Alvi F., Khan A.F., Chaudhry A.A., Rehman I.Ur., Yar M. Thyroxin releasing chitosan/collagen based smart hydrogels to stimulate neovascularization // *Materials and Design*, 2017, 133, p.416-425.
4. Muhammad H.M., Lubna Sh., Razia B., Sher Z.S., Abdul S.K., Ather F.K., Aqif A.C., Ihtesham Ur.R., Muhammad Y. Thyroxine-loaded chitosan/carboxymethyl

cellulose/hydroxyapatite hydrogels enhance angiogenesis in in-ovo experiments // International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 145, p.1162-1170.

5. E.Vin-Boris Obinna. Development and *in vitro* characterization of polymer-based nasal formulations of levothyroxine. Submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of masters of science at Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, 2020.

Авторы:

1) Гумматов Азер Фарахим оглы



2) Ширинова Сафарова Хатира Новрузали кызы



3) Тагиев Дильгам Бабир оглы



4) Зейналов Низами Аллахверди оглы



5) Тапдыгов Шамо Зохраб оглы



6) Сафаралиева Самира Фаиг кызы



ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

(СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МОДИФИЦИРОВАННОГО ХИТОЗАНОВОГО КОМПЛЕКСА С ЛЕВОТИРОКСИНОМ)

Комплекс нового полисахарида на основе хитозана с пентагидратом левотироксина-Na состоит из смеси двух полимеров и действующего вещества, который отличается тем, что содержит разные массы (%) арабиногалактана и лекарственного средства с биологической активностью:

| | |
|-------------------------------------------------|-----------|
| Хитозан, растворенный в слабом растворе кислоты | 95-99 % |
| Водорастворимый арабиногалактан | 1-5 % |
| Левотироксин-Na пентагидрат | 5-100 мкг |

Авторы:

1) Гумматов Азер Фарахим оглы



2) Широнова Сафарова Хатира Новрузали кызы



3) Тагиев Дильгам Бабир оглы



4) Зейналов Низами Аллахверди оглы



5) Тапдыгов Шамо Зохраб оглы



6) Сафаралиева Самира Фаиг кызы



ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202200102**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:***A61K 31/198 (2006.01)**A61K 47/36 (2006.01)**A61P 5/14 (2006.01)*

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

A61K 31/198, 47/36, A61P 5/14

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
EAPATIS, Espacenet, Patentscope, PubMed, elibrary.ru, Google, Яндекс**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

| Категория* | Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей | Относится к пункту № |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Y, D | OBINNA E. Development and in vitro characterization of polymer-based nasal formulations of levothyroxine. Dalhousie University Halifax, Nova Scotia, 2020 [онлайн] [найдено 2023-02-09] Найдено в: < https://dalspace.library.dal.ca/handle/10222/79676 > раздел 3.5 на с. 21-22, табл. 6 | 1 |
| Y | KAUR N et al. Levothyroxine Sodium Pentahydrate Tablets – Formulation Considerations. JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES. 2021, Vol. 110, P. 3743-3756 doi: 10.1016/j.xphs.2021.08.006 с. 3744, правая колонка, последний абзац | 1 |
| Y | SLYUSARENKO N et al. Synthesis and Properties of Interpolymer Complexes Based on Chitosan and Sulfated Arabinogalactan. POLYMER SCIENCE, SERIES B. 2020, Vol. 62, No. 3, P. 272-278 doi: 10.1134/S1560090420020050 реферат, с. 2020, правая колонка, первый полный абзац | 1 |
| Y | EHRENFREUND-KLEINMAN T et al. Synthesis and biodegradation of arabinogalactan sponges prepared by reductive amination. BIOMATERIALS. 2002, Vol. 23, P. 4621-4631 doi: 10.1016/S0142-9612(02)00209-0 реферат, разделы 3.2.3 и 3.2.4 на с. 4627-4630 | 1 |
| A | RU 2698455 C1 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР АГРОБИОТЕХНОЛОГИЙ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК) 2019-08-27 формула | 1 |
| A | US 2002012705 A1 (CHONDROS, INC.) 2002-01-31 формула | 1 |

 последующие документы указаны в продолжении*** Особые категории ссылочных документов:**

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **09/02/2023**

Уполномоченное лицо:

Заместитель начальника Управления экспертизы

Начальник отдела химии и медицины



A.V. Чебан