

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391090 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.05

(22) Дата подачи заявки
2021.11.11

(51) Int. Cl. *A61K 31/785* (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
G02C 7/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 31/02 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
G02C 7/04 (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61K 47/10 (2017.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 47/32 (2006.01)
A61K 47/38 (2006.01)

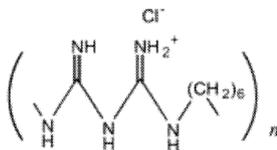
(54) КОМПОЗИЦИЯ НА ОСНОВЕ ПОЛИГЕКСАМЕТИЛЕНБИГУАНИДА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ АКАНТАМЕБНОГО КЕРАТИТА И/ИЛИ ГРИБКОВЫХ ИНФЕКЦИЙ

(31) 10202000027155
(32) 2020.11.12
(33) IT
(86) PCT/IB2021/060451
(87) WO 2022/101821 2022.05.19
(71) Заявитель:
СИФИ С.П.А. (IT)

(72) Изобретатель:
Москетти Валерия, Папа Винченцо,
Судано Роккаро Андреа, Спина
Дonato, Аббате Илениа (IT)

(74) Представитель:
Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев
А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В.
(RU)

(57) Изобретение относится к стабильной композиции на основе полигексаметиленбигуанида (PHMB), подходящей для введения на офтальмологическом уровне, к способу ее получения и соответствующей схеме приема, эффективной для лечения акантамебного кератита и, в частности, для уничтожения цист.



A1

202391090

202391090

A1

PCT/B2021/06045

МПК: *A61K 31/785* (2006.01) *A61K 47/02* (2006/01)
A61K 9/00 (2006.01) *A61K 47/36* (2006.01)
G02C 7/00 (2006.01) *A61K 47/10* (2017.01)
A61P 27/02 (2006.01) *A61K 47/12* (2006.01)
A61P 31/02 (2006.01) *A61P 47/26* (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) *A61K 47/32* (2006.01)
G02C 7/04 (2006.01) *A61K 47/38* (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01)

**КОМПОЗИЦИЯ НА ОСНОВЕ ПОЛИГЕКСАМЕТИЛЕНБИГУАНИДА
ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ АКАНТАМЕБНОГО КЕРАТИТА И/ИЛИ
ГРИБКОВЫХ ИНФЕКЦИЙ**

Настоящее изобретение относится к стабильной композиции, основанной на полигексаметиленбигуаниде (PHMB), подходящей для введения на офтальмологическом уровне, к способу ее получения и к соответствующей схеме приема, эффективной для лечения акантамебного кератита, и, в частности, для уничтожения цист.

Акантамебный кератит представляет собой инфекцию роговицы, прозрачной ткани, которая окаймляет переднюю часть глаза. Инфекцию вызывает *Acanthamoeba*, микроорганизм, обычно присутствующий как в ручьях, так и в водных бассейнах (в озерах, океанах и реках), а также в домашней водопроводной воде, в плавательных бассейнах, в гидромассажных ваннах, в почве и в воздухе.

Акантамебный кератит чаще встречаются у носителей контактных линз [1], но любой человек с повреждением роговицы может оказаться чувствительным к развитию этой серьезной инфекции глаза.

В общем случае, *Acanthamoeba* имеет две фазы жизненного цикла: активную форму (когда микроорганизм питается и реплицируется) и спящую форму (когда микроорганизм защищает себя от возможных атак, превращаясь в цисту). Цисты являются фактической мишенью при разработке эффективных противоамебных лекарственных средств.

Совместное инфицирование с видами бактерий является распространенным среди пациентов с акантамебным кератитом. В частности, *Staphylococcus* spp и *Pseudomonas aeruginosa* являются наиболее распространенными совместно

выделенными бактериальными патогенами [2,3]. В частности, для последнего микроорганизма исследование *in vivo* позволяет предположить, что присутствие бактерий является важным фактором для развития и тяжести акантамебного кератита [4].

Акантамебный кератит может быть чрезвычайно болезненным, так как роговица является одним из наиболее чувствительных органов в человеческом организме, с самой высокой плотностью болевых рецепторов, и продукты, используемые для лечения акантамебного кератита, могут быть довольно трудно переносимыми, и, в некоторых случаях, они также могут раздражать поверхность роговицы. Примерно 25% случаев лечения акантамебного кератита заканчивались даже трансплантацией роговицы. Без лечения заболевание прогрессировало до слепоты в результате васкуляризации роговицы и рубцевания или перфорации роговицы.

На сегодняшний день нет одобренных лекарственных средств для лечения акантамебного кератита. Бигуаниды и диамидины показали эффективность в отношении акантамебного кератита в ряде клинических случаев, хотя схемы лечения и концентрация этих лекарственных средств были разработаны эмпирически.

Среди различных доступных вариантов лечение полигексаметиленбигуанидом (PHMB) в офтальмологической композиции d концентрации, составляющей 0,02% его одного [5] или в комбинации с хлоргексидином 0,02%, пропамидином 0,1% или дезомидином 0,1%, является наиболее перспективным выбором в лечении пациентов, страдающих от акантамебного кератита.

Современные способы лечения акантамебного кератита являются продолжительными и сложными. Их начинают с почасовых доз в течение дня, без введения в течение ночи, на протяжении примерно 1-2 недель, с последующим сокращением в соответствии с ответом. Хотя все пациенты являются разными, но тех, кому поставили ранний диагноз и которые немедленно начали получать адекватное лечение, может, как правило, ожидать от 3 до 6 месяцев терапевтического лечения.

Кроме того, повторное и длительное использование антибиотиков и дезинфицирующих средств, таких как упомянуты выше, значительно изменяет состав конъюнктивальной флоры за счет увеличения процента патогенов, таких как *Staphylococcus epidermidis*, в ущерб нормальной комменсальной флоре, и это может иметь значительные клинические последствия, так как *Staphylococcus epidermidis* является одной из основных причин глазных заболеваний, таких как конъюнктивит,

кератит и эндофтальмит [6].

РНМВ состоит из повторяющихся (n) раз единиц бигуанида, связанных между собой гексаметиленовыми цепями, которые создают катионную и амфипатическую структуру (Фиг. 1).

Препараты, основанные на РНМВ, представляют собой смесь полимеров на основе бигуанида с молекулярной массой, которая может варьировать от 400 до 8000 а.е.м. (атомные единицы массы) и имеет переменную степень полимеризации, где n может варьировать от 2 до 40.

Механизм действия РНМВ был предметом различных исследований в экспериментальных моделях *in vitro*. Мембрана SUV представляет собой систему, которая имитирует химию клеточной мембраны эпителия роговицы человека. Когда РНМВ взаимодействует с двойным слоем мембраны SUV, увеличивается взаимодействие между фосфолипидами, вода вытесняется из двойного слоя ацильных цепей и полярных головок, область с ацильными цепями становится менее динамичной и селективной, и РНМВ поглощается поверхностью двойного слоя [7].

Катионная природа РНМВ позволяет взаимодействовать с анионными полимерами, такими как ДНК. В литературе было указано, что РНМВ взаимодействует с ДНК в водном растворе, образуя комплекс между этими двумя веществами. Взаимодействие включает электростатическое взаимодействие между катионными группами бигуанида и анионными фосфатными группами дезоксирибонуклеотидов ДНК в молярном соотношении примерно 1:1 [8].

Структура *Acanthamoeba*, характеризующаяся экспозицией сайтов связывания с ДНК, обеспечивает более легкий доступ РНМВ к ДНК простейшего, облегчая процесс конденсации хроматина и разрушение этого микроорганизма, как уже установлено для других бактерий, таких как *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* и *Staphylococcus aureus* [9]. Хотя эти исследования не являются специфическими для *Acanthamoeba*, они полезны изобретателям при определении оптимальных условий, при которых РНМВ связывается с ДНК простейшего и проявляет свою лучшую эффективность в фазе е при лечении инфекционного кератита.

В предыдущем клиническом исследовании I Para V. et al. [10] было показано, что еще более высокие концентрации РНМВ, составляющие 0,04%, 0,06%, 0,08%, являются безопасными и хорошо переносятся здоровыми добровольцами [8]. pH и осмолярность композиции, а тем более молекулярная масса и индекс полидисперсности

используемого полимера РНМВ, не описаны. Однако одной концентрация РНМВ недостаточно для максимизации взаимодействия РНМВ с ДНК *Acanthamoeba* и эффективности лечения, как будет продемонстрировано ниже.

В патентной заявке US2007/0140897 A1 [12] описаны офтальмологические композиции, основанные на активных ингредиентах, содержащих бигуанид (включая РНМВ) при рН 4-6 для лечения акантамебного кератита. Однако единственные представленные в примерах композиции основаны на алексидине, а не на РНМВ. В любом случае, значимость MW и PDI полимеров, основанных на бигуаниде, для взаимодействия с ДНК патогенов, или конкретные концентрации применяемых полимеров, основанных на бигуаниде, в комбинации с вышеупомянутыми параметрами, не описаны.

Исследование стабильности композиций, основанных на 0,02% РНМВ с рН = 4, в работе Vouattour et al. 2018 [13] выявило образование продуктов деградации (BP) уже через 90 суток. Авторы сделали вывод, что композиции, основанные на РНМВ, не могут храниться более 60 суток в бутылках EOS-LDPE (стерилизованный этиленоксидом полиэтилен низкой плотности) при 25°C. Авторы настоящего изобретения идентифицировали композицию, основанную на полигексаметиленбигуаниде для офтальмологического введения, которая сохраняет стабильность и эффективность при самых высоких концентрациях активного ингредиента в диапазоне от 0,04% (масса/объем) до 0,08%. (масса/объем), благодаря контролю за молекулярной массой (MW) и индексом полидисперсности (PDI) полимера РНМВ, вместе с рН и осмолярностью.

Исследования показали, что применение РНМВ с высокой молекулярной массой и индексом полидисперсности вместе с конкретной буферной системой, которая поддерживает рН композиции РНМВ 0,04% - 0,08% (масса/объем) в диапазоне 5 – 6,5 синергически создает оптимальные условия для стабильности в течение по меньшей мере 24 месяцев и для активности активного ингредиента.

По причинам, указанным выше, фактически молекула РНМВ должна находиться в протонированной форме, чтобы проявить свой биоцидный механизм действия наилучшим образом. В протонированной ионизированной форме, РНМВ проникает через эпителий роговицы, инфицированный амебами *Acanthamoeba*, и накапливается в строме, благодаря электростатическому взаимодействию с отрицательными зарядами протеогликанов. Именно здесь РНМВ проявляет свою биоцидную и цистицидную

активность с механизмом действия, который, согласно последним научным исследованиям, экспрессируется через связь с ДНК посредством активного взаимодействия с фосфатными группами последнего. Эта связь блокирует процесс репликации ДНК амебы, вызывая смерть патогена [11]. В этом смысле эффективность вышеупомянутого взаимодействия между РНМВ и ДНК, и, следовательно, активность самого РНМВ, в значительной степени зависит от стабильности композиции, содержащей активный ингредиент. Кроме того, введение композиции по изобретению в точном ступенчатом режиме дозирования пациентам, подвергнутым воздействию акантамебного кератита, оказалось особенно эффективным с точки зрения активности полного уничтожения цист *Acanthamoeba*.

В этом смысле, поскольку композицию по изобретению применяют в виде монотерапии, это способствует соблюдению и точному выполнению терапевтического режима пациентом, в частности благодаря тому, что нет необходимости в повторной инстилляции различных продуктов в течение суток. Кроме того, учитывая селективность и специфичность продукта в отношении целевого микроорганизма, обеспечивается более высокая скорость действия с последующим более быстрым устранением патологии, что предотвращает длительные периоды лечения в течение 3-6 месяцев.

Опять же, по сравнению с мультилекарственным терапевтическим подходом, состоящим из мощных антисептиков и используемых в настоящее время антибиотиков широкого спектра, монотерапия (высокоселективная и специфичная) с помощью 0,08% РНМВ безусловно является более безопасным вариантом для сохранения разнообразия глазной микробиоты во время лечения и, следовательно, для предупреждения появления мультирезистентных штаммов *Staphylococcus epidermidis*.

Таким образом, настоящее изобретение относится к жидкой композиции на основе полигексаметиленбигуанида или его солях в концентрации в диапазоне от 0,04% до 0,08%, содержащей буферную систему для поддержания рН в диапазоне 5-6,5 и изотонический агент для поддержания осмолярности в диапазоне 270-330 мОсм/кг, при этом молекулярная масса полигексаметиленбигуанида находится в диапазоне от 2300 до 6000 а.е.м. и индекс полидисперсности полимера находится в диапазоне от 1,5 до 1,9, предпочтительно от 1,7 до 1,8, подходящем для офтальмологического введения для применения в лечении акантамебного кератита или грибковых инфекций.

Указанные грибковые инфекции предпочтительно представляют собой кератит

или кератомикоз, опосредованный патогеном, выбранным из группы, состоящей из *Candida albicans*, *Fusarium solani*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* и *Cladosporium*.

Вышеупомянутые грибковые инфекции также могут присутствовать в сочетании с инфекцией *Acanthamoeba*, в частности инфекциями *Fusarium solani* и *Cladosporium*.

В альтернативном воплощении изобретения указанное лечение инфекционного акантамебного кератита особенно эффективно в случае коинфекции с *Pseudomonas aeruginosa* или *Staphylococcus epidermis*.

Терапевтическое применение композиции 0,08% РНМВ, которая является активной против *Pseudomonas aeruginosa* (данные не показаны, внутреннее тестовое исследование АРЕ: ORPHAN DRUG - *in vitro* assay - 1305) на самом деле оказывается высокоэффективным для быстрого и эффективного устранения патологии в случае вышеуказанной коинфекции. Полигексаметиленбигуанид может находиться в форме неорганической или органической соли, выбранной из группы, состоящей из хлорида, бромида, сульфата, фосфата, мезилата, формиата, цитрата или малеата.

В дополнение к необходимости поддержания слегка кислый рН, чтобы обеспечить максимальное протонированное состояние РНМВ, еще одна задача настоящего изобретения состоит в поддержании осмолярности композиции при значении, сопоставимом со значением физиологической слезной жидкости (которое находится в диапазоне от 290 до 320 мОсм/кг), предпочтительно путем добавления ионного изотонического агента, выбранного из группы, состоящей из хлорида натрия, хлорида калия, или неионного, такого как глицерин, маннит, сорбит; ионных буферных систем, таких как фосфат, цитрат, бикарбонатный или боратный буфер, или неионных буферов, таких как трометамол, гистидин, глицин, HEPES, которые также вносят вклад в осмотичность.

Осмотическое давление в действительности в основном зависит от ионов, присутствующих в водном слое (Na^+ , K^+ , Cl^- и HCO_3^-).

Согласно предпочтительным воплощениям настоящего изобретения, изотонический агент используют в следующих концентрациях: NaCl (0,01% -0,9%), KCl (0,01% -1,19%), глицерин (0,01 % -2,6%), маннит (0,01% -5,1%) и сорбит (0,01% -5,5%).

В конкретном воплощении жидкой композиции на основе полигексаметиленбигуанида, буферная система представляет собой ионный буфер, такой как фосфатный, цитратный, бикарбонатный или боратный буфер, или неионный

буфер, такой как трометамол, гистидин, глицин, HEPES или смешанная система.

Буферная система предпочтительно содержит додекагидрат двухосновного фосфата натрия ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) и одноосновный фосфат натрия ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Додекагидрат двухосновного фосфата натрия предпочтительно используют в концентрации в диапазоне 0,01%-4,5% и одноосновной фосфат натрия используют в концентрации в диапазоне 0,01% -3,5%.

В качестве альтернативы могут быть использованы цитратно-фосфатный буфер, содержащий додекагидрат двухосновного фосфата натрия ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) и лимонную кислоту ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), или Tris/HCl, или борная кислота/борат.

Если композиция по изобретению находится в форме офтальмологического геля или вязкого раствора, предпочтительно использовать бесфосфатный буфер, такой как, например, Tris-буфер и/или борная кислота или бораты.

Согласно предпочтительному воплощению рН жидкой композиции на основе полигексаметиленбигуанида составляет 5,8.

В предпочтительном воплощении жидкой композиции на основе полигексаметиленбигуанида по настоящему изобретению, концентрация РНМВ выбрана из группы, составляющей 0,04% (масса/объем), 0,05% (масса/объем), 0,06% (масса/объем), 0,07% (масса/объем) и 0,08% (масса/объем), предпочтительно 0,08% (масса/объем).

Жидкая композиция на основе полигексаметиленбигуанида по настоящему изобретению, подходящая для офтальмологического введения, является стерильным раствором, который может находиться в форме глазных капель.

В качестве альтернативы, в присутствии агента, повышающего вязкость (например ксантановой камеди, геллановой камеди, поливинилового спирта, гиалуроновой кислоты, гиалуроната натрия, производных целлюлозы, таких как карбоксиметилцеллюлоза или гидроксипропилцеллюлоза) композиция по настоящему изобретению на основе полигексаметиленбигуанида может находиться в форме офтальмологического геля или вязкого раствора.

Согласно дополнительному предпочтительному воплощению изобретения, жидкая композиция, основанная на полигексаметиленбигуаниде по настоящему изобретению дополнительно содержит усилитель проникновения, который может быть выбран из Tween 80 и бензалкония хлорида.

Кроме того, согласно предпочтительному воплощению, жидкая композиция на

основе полигексаметиленбигуанида для применения по изобретению может дополнительно содержать 0,02% хлоргексидина, 0,1% пропамидина, 0,1% дезомидина в комбинации с РНМВ. Когда РНМВ вводят в комбинации со вторым активным агентом, введение может осуществляться последовательно, одновременно или отдельно, то есть в той же композиции глазных капель или в отдельных композициях.

Настоящее изобретение также относится к жидкой композиции на основе полигексаметиленбигуанида по изобретению для лечения акантамебного кератита посредством введения ступенчатых дозировок из 16 капель в сутки в течение 5 суток, 8 капель в сутки в течение 7 суток, 6 капель в сутки в течение 7 суток и 4 капли в сутки вплоть до клинической нормализации. Клиническая нормализация составляла 88% в среднем за 4 месяца. Это ступенчатое дозирование отличается от интенсивного дозирования, ранее описанного в исследовании Фазы I, проведенном Pava et al. [10], поскольку оно более эффективно включается в ликвидацию цист и, следовательно, в клиническую нормализацию акантамебного кератита.

Настоящее изобретение также относится к способу получения жидкой композиции на основе полигексаметиленбигуанида по изобретению, которая включает следующие стадии:

(1) добавление буферной системы в концентрации в диапазоне от 0,01 до 4,5% (масса/объем) и изотонического агента в концентрации в диапазоне от 0,01% до 5,5% (масса/объем) в очищенную воду при легком и непрерывном перемешивании; возможно добавление увеличителя вязкости, выбранного из гиалуроната натрия, ксантановой камеди, поливинилового спирта, карбоксиметилцеллюлозы и гидроксипропилцеллюлозы;

(2) добавление полигексаметиленбигуанида, имеющего молекулярную массу в диапазоне 2300-6000 а.е.м. и индекс полидисперсности в диапазоне 1,5-1,9, предпочтительно 1,7-1,8, в концентрации в диапазоне от 0,04% до 0,08% (масса/объем) при легком перемешивании;

(3) доведение до нужного объема посредством добавления очищенной воды;

(4) стерилизация посредством фильтрации или нагрева.

В случае вязкого раствора, добавление увеличителя вязкости, выбранного из гиалуроната натрия, ксантановой камеди, поливинилового спирта, карбоксиметилцеллюлозы и гидроксипропилцеллюлозы, также должно быть выполнено после стадии (1). В этом случае, в присутствии не поддающихся

фильтрации полимеров, используют стерилизацию посредством нагрева вместо стерилизации посредством фильтрации.

Затем раствор распределяют по однодозовым контейнерам или флаконам, которые затем герметизируют. Однодозовые контейнеры могут быть изготовлены из полиэтилена низкой плотности (LDPE), каждая упаковка может содержать 5 единиц одной дозы.

В конкретном воплощении способа получения жидкой композиции на основе полигексаметиленбигуанида, буферная система для поддержания pH в диапазоне 5-6,5 представляет собой ионный буфер, такой как фосфатный, цитратный, бикарбонатный, Tris-буфер, боратный или неионный буфер, такой как триметамоловый, гистидиновый, глициновый, HEPES, или смешанную систему. Буферная система предпочтительно выбрана из группы, состоящей из двухосновного натрия фосфата додекагидрата/одноосновного фосфата натрия, двухосновного натрия фосфата додекагидрата/лимонной кислоты, Tris/HCl или борной кислоты/бората.

Согласно предпочтительному воплощению, буферная система основана на двухосновном натрия фосфата додекагидрате ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) и одноосновном фосфате натрия ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Двухосновный натрия фосфат додекагидрат предпочтительно используют в концентрации в диапазоне 0,01% -4,5% (масса/объем) и одноосновной фосфат натрия используют в концентрации в диапазоне 0,01% -3,5% (масса/объем).

Изотоническим агентом для поддержания осмолярности в диапазоне 270-330 мОсм/кг предпочтительно является хлорид натрия.

Способ получения композиции был разработан также для обеспечения того, что как исходная молекулярная масса, так и индекс полидисперсности активного ингредиента РНМВ сохраняется в конечном продукте в диапазоне 2300-6000 а.е.м. и 1,5-1,9, предпочтительно 1,7-1,8 соответственно. Эти параметры оказались ответственными за эффективность конечного продукта.

Наконец, настоящее изобретение относится к терапевтическим глазным линзам, нагруженным или дериватизированным жидкой композицией по изобретению на основе полигексаметиленбигуанида для контролируемого высвобождения активного ингредиента для лечения акантамебного кератита или коинфекции с *Pseudomonas aeruginosa*. Это воплощение обеспечивает непрерывное высвобождение композиции в течение продолжительного времени и дополнительное преимущество в плане

соблюдения и следования режиму лечения со стороны пациентов.

Настоящее изобретение ниже будет описано для иллюстративных, но неограничивающих целей, согласно предпочтительному воплощению с конкретной ссылкой на прилагаемые фигуры, где:

- На Фиг. 1 показана структура повторяющейся единицы гексаметиленбигуанида в РНМВ;

- На Фиг. 2 показана блок-схема способа получения композиций на основе РНМВ;

- На Фиг. 3 показана хроматограмма, полученная посредством гель-фильтрационной хроматографии РНМВ в АРІ.

- На Фиг. 4 показана хроматограмма, полученная посредством гель-фильтрационной хроматографии РНМВ в готовом продукте; из сравнения с хроматограммой на Фиг. 2, относящейся к сырью, очевидно, что способ получения способен сохранять неизменным распределение молекулярной массы сырья вплоть до конечного продукта.

- На Фиг. 5 показано сравнение данных по стабильности композиции на основе 0,08% РНМВ при рН 7,4 и рН 5,8.

- На Фиг. 6 показано сравнение связи РНМВ-ДНК в зависимости от молекулярной массы. Из направления графика можно видеть, что при использовании РНМВ с высокой молекулярной массой связь полимер-ДНК является более эффективной, так как вовлечены одна или более молекул нуклеиновой кислоты. Высокмолекулярный полимер способен образовывать поперечные мостиковые связи между различными молекулами нуклеиновой кислоты, образуя сеть связей (линия с кружками). Напротив, линия с квадратиками отражает установление связи линейного типа между РНМВ и ДНК, где полимер, характеризующийся низкой молекулярной массой, не проявляет способности к образованию поперечных мостиковых связей, но образует связь, в которую вовлечена только одна молекула нуклеиновой кислоты.

- На Фиг. 7(А) показаны результаты исследования стабильности 0,08% РНМВ композиций с использованием партий РНМВ с разными молекулярными массами (MW) и индексами полидисперсности (PDI), выраженные как % восстановления (масса/объем) РНМВ в T0 и через 12 месяцев (T12).

- На Фиг. 7(В) показаны результаты исследования стабильности 0,08% РНМВ композиции, с использованием партии РНМВ, характеризующейся MW = 2641 а.е.м. и

PDI = 1,6. Исследование проводили в трех разных температурных условиях: долгосрочная стабильность 25°C, RH 40%; промежуточная стабильность 30°C, RH 65%; ускоренная стабильность 40°C RH 25%. Показаны результаты по стабильности, выраженные как % извлечения (масса/объем) РНМВ в Т0 и через 3 месяца (Т3).

Для лучшей иллюстрации изобретения представлены следующие неограничивающие примеры, где тестировали и сравнивали различные композиции на основе РНМВ с оценкой влияния на стабильность некоторых параметров композиции, таких как рН, осмолярность, молекулярная масса и индекс полидисперсности активного ингредиента РНМВ.

ПРИМЕР 1: Способ получения композиций на основе РНМВ

Способ получения композиции по изобретению проиллюстрирован на схеме на Фиг. 2.

Двузамещенный натрия фосфат додекагидрат ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$), однозамещенный натрия фосфат ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) и хлорид натрия добавляют последовательно и растворяют в некотором объеме очищенной воды при непрерывном легком перемешивании.

Стадия перемешивания имеет решающее значение для сохранения исходной молекулярной массы и индекса полидисперсности РНМВ и должна быть выполнена без образования пены или завихрений в растворе. Предпочтительно используют мешалку или колесо, погружаемые в раствор для перемешивания. В заключение добавляют РНМВ (0,08%).

Раствор доводят до объема (100 мл) путем добавления достаточного количества очищенной воды и при постоянном перемешивании. Затем контролируют рН и внешний вид раствора.

Стерилизацию выполняют путем фильтрации через 0,2 мкм фильтр. Природа фильтрующей мембраны и динамика (давление, поток) выбирают таким образом, чтобы предотвратить продавливание продукта через мембрану во избежание деполимеризации или разрыва полимерной цепи.

После фильтрации целостность фильтра 0,2 мкм контролируют с помощью электронной системы управления.

Наконец, стерильный раствор используют для заполнения однодозовых контейнеров с помощью технологии выдув/заполнение/укупорка в асептических условиях.

Эта автоматизированная технология позволяет заполнять и укупоривать флакон в асептических условиях раствором объемом от 0,1 до 1000 см³.

Раствор РНМВ имеет вид прозрачной бесцветной или бледно-желтой жидкости.

В конце процесса получения проводят характеристику готового продукта по его основным компонентам, включая любые примеси, с помощью подходящих хроматографических методов.

Сравнение хроматограммы РНМВ в АРІ (Фиг.3) и хроматограммы РНМВ после процесса получения композиции (Фиг. 4) показывает, что молекулярно-массовое распределение РНМВ не меняется.

Пример 2: Сравнительные исследования стабильности композиций на основе РНМВ

Полученные композиции на основе РНМВ представляют собой стерильные растворы, релевантными физико-химическими параметрами которых являются рН и осмолярность.

Как подробно описано, выбор слегка кислого рН обусловлен необходимостью получения стабильной композиции, которую невозможно получить при рН, близком к нейтральному.

Для этого были разработаны различные композиции на основе 0,08% РНМВ при разных значениях рН (5,8; 6,2; 7.4) с последующей проверкой их стабильности при 25°C, 40°C и 60°C.

Для получения композиции на основе 0,08% РНМВ, рН 5,8, взвешивали следующие ингредиенты:

Таблица 1

Ингредиент	Функция	% (масса/объем)
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	буфер	0,827 г
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	буфер	0,240 г
NaCl	изотонический агент	0,520 г
РНМВ	активный ингредиент	0,08 г
Стерильная вода	растворитель	довести до 100 мл

В Таблице 2 ниже приведены физико-химические характеристики конечной

композиции при pH 5,8 и во время фаз процесса ее получения.

Таблица 2

	pH	Осмолярность (мОсм/кг)	УФ-спектр активного агента	Извлечение (УФ количественно)
Буферный раствор (до добавления РНМВ)	-	289	-	-
Буфер с РНМВ (до стерилизации)	5,8	290	соответствует	-
Композиция, стерилизованная посредством фильтрации	5,8	297	соответствует	100,4

Для получения композиции на основе 0,08% РНМВ, pH 6,2, были взвешены следующие ингредиенты в соответствии с тем же самым вышеописанным процессом:

Таблица 3

Ингредиент	Функция	% (масса/объем)
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	буфер	0,735 г
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	буфер	0,480 г
NaCl	изотонический агент	0,510 г
РНМВ	активный ингредиент	0,08 г
Стерильная вода	растворитель	довести до 100 мл

В Таблице 4 приведены физико-химические характеристики конечной композиции при pH 6,2 и на этапах способа ее получения.

Таблица 4

	pH	Осмолярность (мОсм/кг)	УФ-спектр активного агента	Извлечение (УФ количественно)
Буферный раствор	6,05	291	-	-

(до добавления РНМВ)				
Буфер с РНМВ (до стерилизации)	6,07	295	соответствует	-
Композиция, стерилизованная посредством фильтрации	6,20	287	соответствует	100,9

Для получения композиции на основе 0,08% РНМВ, рН 7,4, были взвешены следующие ингредиенты:

Таблица 5

Ингредиент	Функция	% (масса/объем)
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	буфер	1,91 г
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	буфер	0,19 г
NaCl	изотонический агент	0,44 г
РНМВ	активный ингредиент	0,08 г
Стерильная вода	растворитель	довести до 100 мл

В Таблице 6 приведены физико-химические характеристики конечной композиции при рН 7,4 и на этапах способа ее получения.

Таблица 6

	рН	Осмолярность (мОсм/кг)	УФ-спектр активного агента
Буферный раствор (До добавления РНМВ)	-	-	-
Буфер с РНМВ (до стерилизации)	7,45	286	соответствует
Композиция, стерилизованная посредством фильтрации	7,45	286	соответствует
Композиция, стерилизованная в автоклаве	7,33	295	соответствует

Отфильтрованная композиция через 2 недели при 25°C	7,36	293	соответствует
-------------------------------------------------------	------	-----	---------------

Затем было проведено сравнение стабильности композиции на основе 0,08% РНМВ в контейнере для одной дозы при рН 5,8 и 7,4 при 25°C (долгосрочные условия), 40°C (ускоренные условия) и 60°C (стрессовые условия). Результаты анализа стабильности приведены ниже:

• Данные стабильности:

- 0.08% РНМВ композиция, рН 5,8 при 25°C ± 2°C и относительной влажности 40% ± 5 (долгосрочные условия)

Таблица 7

Анализ	Пределы			Недели						
	Ед. измерения	Мин	Макс	0	13	26	39	52	65	104
Внешний вид	Прозрачный, без посторонних частиц			соот.*	соот.	соот.	соот.	соот.	соот.	соот.
Цвет	Бесцветный			соот.	соот.	соот.	соот.	соот.	соот.	соот.
рН		5,3	6,3	5,7	5,6	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8
Осмолярность	мОсм/кг	270	330	290	274	281	276	293	277	276
Бигуанид (HPLC)	Соответствует стандарту			соот.	соот.	соот.	соот.	соот.	соот.	соот.
Бигуанид тест (УФ)	% L.S.	90	110	97,6	97,8	99,7	96,2	98,8	92,5	94,6
Примеси А	% a.s.		5,0	0,8	1,0	1,0	1,8	0,8	1,0	0,9
Примеси В+С	% a.s.		5,0	0,9	0,9	1,2	2,4	1,1	1,4	1,1
Потеря воды	%		5,0		0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
Стерильность	Соответствует европейской фармакопее			Стерильный						Стерильный

*соот.: соответствующий

- 0,08% РНМВ композиция, рН 5,8 при 40°C ± 2° С и относительная влажность 25% (ускоренный)

Таблица 8

Анализ	Пределы			Недели		
	Ед. измерения	Мин.	Макс.	0	13	26

Внешний вид	Прозрачный, без посторонних частиц			соот.	соот.	соот.
Цвет	Бесцветный			соот.	соот.	соот.
pH		5,3	6,3	5,7	5,6	5,8
Осмолярность	мОсм/кг	270	330	290	274	276
Бигуанид (HPLC)	Соответствует стандарту			соот.		соот.
Бигуанид тест (УФ)	% L.S.	90	110	97,6	96,7	99,2
Примеси А	% a.s.		5,0	0,8	1,0	0,9
Impur. В+ С	% a.s.		5,0	0,9	1,0	1,3
Потеря воды	%		5,0		0,1	0,2
Стерильность	Соответствует европейской фармакопее			Стерильный		

*соот.: соответствует

0,08% РНМВ композиция, pH 7,4 при 60°C ± 2°C и относительная влажность 20% (стрессовые условия)

Таблица 9

Анализ	Пределы			Недели		
	Ед. измерения	Мин.	Макс.	0	1	2
Внешний вид	Прозрачный, без посторонних частиц			соот.	соот.	соот.
Цвет	Бесцветный			соот.	соот.	соот.
pH		7,0	7,8	7,3	7,2	7,3
Осмолярность	мОсм/кг	270	330	276	294	299
Бигуанид (ABS соотношение 235/220нм)				1,5	1,4	1,3
Стерильность	Соответствует европейской фармакопее			Стерильный		Стерильный

*соот.: соответствующий

0,08% РНМВ композиция, pH 5,8 при 60°C ± 2°C и относительная влажность 20% (стрессовые условия)

Таблица 10

Анализ	Пределы			Недели		
	Ед. измерения	Мин.	Макс.	0	1	2
Внешний вид	Прозрачный, без посторонних частиц			соот.	соот.	соот.
Цвет	Бесцветный			соот.	соот.	соот.
pH		5,3	6,3	5,8	5,6	5,7
Осмолярность	мОсм/кг	270	330	289	296	302
Бигуанид (ABS соотношение 235/220нм)				1,4	1,5	1,5
Стерильность	Соответствует европейской фармакопее			Стерильный		Стерильный

*соот.: соответствующий

Результаты, представленные на Фиг. 5, показывают, что стабильность композиции на основе РНМВ, полученной посредством поддержания pH в диапазоне 5-6,5, не достигается при pH, близком к нейтральному (pH 7,4).

Пример 3: Исследование связи РНМВ-ДНК

Исследование связи РНМВ-ДНК выполняли для оценки эквивалентности низкомолекулярного РНМВ и высокомолекулярного РНМВ.

Способность РНМВ связываться с ДНК можно считать независимой от конкретного типа ДНК, как указано в литературе [8], тогда как связывающая способность и эффективность связывания с ДНК зависит от молекулярной массы и индекса полидисперсности полимера РНМВ. Когда полимер имеет молекулярную массу в диапазоне от 2300 до 6000 а.е.м. и индекс полидисперсности в диапазоне 1,5-1,9, связывание с ДНК является более эффективным, вероятно потому, что длина полимера больше подходит для образования поперечных мостиковых связей с участием нескольких молекул нуклеиновых кислот в соответствии с механизмом, предложенным Allen et al. [8]. И напротив, когда полимер характеризуется низкой молекулярной массой, связь будет линейной и будет включать одну молекулу нуклеиновой кислоты.

Затем было проведено сравнительное исследование с разными образцами полимеров РНМВ для оценки способности связывания с молекулами нуклеиновых кислот. РНМВ (образец А) разлагали посредством кислотой и высокотемпературной обработки в течение 5 часов с получением низкомолекулярных полимеров РНМВ.

РНМВ (образец В) не получил никакого типа обработки и характеризовался молекулярной массой, которая попадает в заявленный диапазон.

Затем оценивали способность обоих образцов связывать молекулы нуклеиновых кислот. Предложенный здесь экспериментальный способ основан на взаимодействии между водным раствором РНМВ и водным раствором ДНК. Количество комплекса РНМВ-ДНК измеряли как разницу между начальным количеством обоих веществ в растворе и остаточным количеством после окончания реакции. Количество обоих веществ в растворе контролируют с помощью спектрофотометрических измерений при 2 разных длинах волн, 260 нм для ДНК и 235 нм для РНМВ соответственно.

В заключение, полученные данные демонстрируют повышенную способность высокомолекулярного РНМВ взаимодействовать с ДНК путем образования поперечных мостиковых связей с несколькими молекулами нуклеиновых кислот и, следовательно, более высокую эффективность в лечении инфекционного акантамебного кератита или коинфекций с *Pseudomonas aeruginosa*. Тип образующейся связи между полимером РНМВ и ДНК гораздо более эффективен, как показано на графике Фиг. 6.

Пример 4: Исследование стабильности в зависимости от молекулярной массы и индекса полидисперсности РНМВ

Сравнительное исследование выполняли на трех разных исходных партиях на основе РНМВ, характеризующихся разными молекулярными массами и индексами полидисперсности (PDI):

- партия L-17GR185627, MW = 2517 а.е.м., PDI = 1,73,
- партия F-693/LU/101, MW = 1170 а.е.м., PDI = 1,93;
- партия F-693/LU/118, MW = 440 а.е.м., PDI = 2,14.

Для каждой партии была получена 0,08% РНМВ композиция, характеризующаяся рН = 5,8, осмолярностью 0,280 мОсм/кг.

Стабильность РНМВ композиции затем оценивали в T0 и через 12 месяцев (T=12) при температуре 25°C±2°C, RH 40±5%. Оценивали следующие параметры:

- Внешний вид
- Извлечение% (масса/объем) активного ингредиента

Результаты приведены в Таблице 11 и на графике Фиг. 7А.

Таблица 11

Партия	MW (Да)	PDI	Тестирование	Месяцы	
				T= 0	T= 12
L-17GR185627	2517	1,73	Внешний вид	Приемлемый	Приемлемый
			Извлечение % РНМВ (УФ)	101,5	97,1
F-693/LU/101	1170	1,93	Внешний вид	Приемлемый	Неприемлемый
			Извлечение % РНМВ (УФ)	100	35,8
F-693/LU/118	440	2,14	Внешний вид	Приемлемый	Неприемлемый
			Извлечение % РНМВ (УФ)	100	12,2

Исследование стабильности подтверждает, что наиболее стабильной 0,08% РНМВ композицией является та, которая характеризуется РНМВ с самой высокой молекулярной массой, то есть партия L-17GR185627, MW (молекулярная масса) = 2517 а.е.м., рН = 5,8 и со значением PDI 1,73. В течение всего периода исследования стабильности не наблюдалось значительных продуктов деградации (BP).

Растворы 0,08% РНМВ, характеризуемыми низкой молекулярной массой (партия F-693/LU/101, MW = 1170 а.е.м. - партия F-693/LU/118, MW = 440 а.е.м.), указывают на сниженный % извлечения РНМВ через 12 месяцев и, следовательно, на нестабильность композиции и сниженную эффективность.

Таким образом, очевидно, что параметры молекулярной массы и индекса полидисперсности РНМВ вместе с рН раствора вносят синергетический вклад в обеспечение стабильной и эффективной композиции.

Кроме того, исследование стабильности проводили на растворах 0,08% РНМВ, при рН 5,8 и осмоляльности 0,290 мОсм/кг, характеризуемых MW = 2641 а.е.м. и PDI = 1,6. Исследование проводили при трех разных температурных условиях: Долгосрочная стабильность 25°C, RH 40%; Промежуточная стабильность 30°C, RH 65%; Ускоренная стабильность 40°C RH 25%. Результаты по стабильности указаны ниже и на Фиг. 7(В):

Таблица 12

Условия	Тест	Месяцы	
		T= 0	T= 3
25°C, RH 40%	Внешний вид	Приемлемый	Приемлемый
	Извлечение % РНМВ	103,7	103,1

	(УФ)		
30°C, RH 65%;	Внешний вид	Приемлемый	Приемлемый
	Извлечение % РНМВ (УФ)	103,7	101,7
40°C RH 25%	Внешний вид	Приемлемый	Приемлемый
	Извлечение % РНМВ (УФ)	103,7	105,3

Результаты испытаний на стабильность показывают, что продукт стабилен при всех исследованных температурных условиях, так как % восстановления РНМВ находится в установленных пределах, 90 - 110% (масса/объем). Другие исследованные химико-физические параметры (данные не показаны), такие как рН, осмоляльность и количественный анализ извлеченных примесей, остаются стабильными и находятся в установленных пределах при всех трех испытанных климатических условиях.

ПРИМЕР 5: Клиническое исследование

Ниже подробно описано рандомизированное, многоцентровое, двойное слепое, параллельно-групповое исследование фазы 3, для оценки эффективности, безопасности и переносимости 0,08% РНМВ композиции по изобретению по сравнению с традиционной комбинированной терапией 0,02% РНМВ + 0,1% пропамидин у взрослых мужчин и женщин, страдающих от акантамебного кератита.

Данное исследование задумано как исследование превосходства в соответствии с требованиями ЕМА (Европейское агентство лекарственных средств) (СРМР/ЕWP/482/99). Исследование включает скрининговый визит для включения, период лечения, включающий короткие амбулаторные визиты и визиты последующего наблюдения.

В общей сложности 130 человек с акантамебным кератитом были распределены на две следующие лечебные группы в соотношении 1:1.

Группа 1: 0,08% РНМВ + плацебо

Группа 2: 0,02% РНМВ + 0,1% комбинированная терапия.

Пациенты:

Данное исследование проводили на мужчинах и женщинах, страдающих от акантамебного кератита, в возрасте не младше 12 лет.

Цель:

Основной целью исследования является сравнение уровня клинической нормализации (CRR) через 12 месяцев после рандомизации (CRR₁₂) между композицией 0,08% РНМВ + плацебо и комбинированной терапией 0,02% РНМВ + 0,1% пропамидин, оценка разницы между CRR₁₂ в отношении степени неопределенности, и тестирование терапевтического превосходства или отсутствия превосходства монотерапии с 0,08% РНМВ.

Еще одной целью исследования является получение информации о безопасности офтальмологической композиции на основе 0,08% РНМВ по изобретению.

Гипотеза:

Основная проверяемая гипотеза заключается в том, что CRR₁₂ субъектов, получавших монотерапию 0,08% композицией РНМВ, выше или не уступает, ниже все еще приемлемого предела (Δ), относительно CRR₁₂ комбинированной терапии 0,02% РНМВ + 0,1% пропамидином, вводимым в соответствии с протоколом лечения, указанным ниже.

Вторичными гипотезами являются:

- нежелательные эффекты, связанные с токсичностью, ниже при монотерапии 0,08% РНМВ по сравнению с комбинированной терапией;

- *время излечения* ниже у субъектов, получающих монотерапию 0,08% РНМВ, по сравнению с комбинированной терапией.

Клиническая нормализация, полученная в пределах 12 месяцев после начала лечения составляет 67%, как указано в ретроспективном исследовании спонсора (Study 038/SI).

Сопутствующее и предшествующее лечение

Субъектам разрешено принимать или они принимали следующие лекарственные средства:

Антибиотики: Местное применение моксифлоксацина разрешено для лечения сопутствующих бактериальных инфекций. Однако он не разрешен в качестве профилактического антибиотика для лечения пациентов с язвами роговицы; РНМВ уже является антибактериальным средством широкого спектра действия и дополнительный антибактериальный агент не нужен. Местное применение моксифлоксацина не разрешено в качестве профилактического антибиотика у пациентов с язвами роговицы; РНМВ является хорошим антибактериальным средством широкого спектра действия, и дополнительный антибактериальный агент для этого не нужен.

Противовирусные и противогрибковые лекарственные средства: Использование этих лекарственных средств во время исследования не допускается. Любой прием этих препаратов в начале исследования должен быть прекращен.

Противовоспалительные лекарственные средства: Для субъектов, получающих стероидную терапию на начало исследования (которые уже принимают местные стероиды, например при ошибочном диагнозе HSV-кератита или в качестве вспомогательного лечения бактериального кератита) существуют следующие варианты:

а. Прерывание, поддержание или снижение дозы стероидов. Дексаметазон (0,1% или 0,15%) является единственным местным стероидом, разрешенным в данном исследовании. Пациенты, использующие другие местные стероиды на момент начала исследования, должны изменить частоту их введения. Диклофенак является единственным пероральным NSAID (нестероидный противовоспалительный препарат), разрешенным в клиническом исследовании и его добавляют в подходящих дозах (75 мг - 150 мг в сутки, разделенные на 2-3 дозы).

б. Субъекты, использующие NSAID или циклоспорин на момент начала клинического исследования, должны прекратить лечение после рандомизации.

в. Субъекты, не использующие местные стероиды на момент вступления в исследование, могут начать их прием вместе с пероральными NSAID (рекомендуется диклофенак; 75 мг - 150 мг в сутки, разделенные на 2-3 дозы) во время исследования, как указано в протоколе.

Другие разрешенные местные терапевтические обработки: лубриканты, мидриатики (циклопентолат, гоматропин или атропин) и противоглаукомные лекарственные средства.

Дозировка

Дозировка, применяемая в исследовании клинической эффективности, является следующей:

введение в ступенчатой дозировке 16 капель в сутки в течение 5 суток, 8 капель в сутки в течение 7 суток, 6 капель в сутки в течение 7 суток и 4 капли в сутки вплоть до клинической нормализации.

Присвоение вида лечения:

Протокол для двусторонней патологии: если поражены оба глаза, то только один из них (правый, если нет разницы в степени тяжести, требующей лечения более

поврежденного глаза) будут лечить в соответствии с дозировкой лечения и оценивать в исследовании. Другой глаз будут лечить в соответствии со стандартной клинической практикой.

В таблице 13 ниже представлены демографические данные и распределение пациентов, участвующих в исследовании.

Таблица 13

	PHMB 0,08% + плацебо	PHMB 0,02%+ 0,1% пропамидин	Общее количество
Прошедшие скрининг	69	66	135
Не прошедшие скрининг	0	0	0
Рандомизированные	69	66	135
Не получали исследуемый препарат ¹	0	1 (1,5%)	1 (0,7%)
Набор для анализа безопасности ¹	69 (100%)	65 (98,5%)	134 (99,3%)
Завершение исследования ²	58 (84,1%)	57 (87,7%)	115 (85,8%)
Преждевременный выход из исследования ²	11 (15,9%)	7 (10,8%)	18 (13,4%)
Не получали исследуемое лекарственное средство	0	1 (100,0%)	1 (100,0%)
Полный набор анализов ¹	66 (95,7%)	61 (92,4%)	127 (94,1%)
Завершение исследования ²	56 (84,8%)	53 (86,9%)	109 (85,8%)
Преждевременный выход из исследования ²	10 (15,2%)	7 (11,5%)	17 (13,4%)
DX не подтвержден	3 (100%)	4 (80%)	7 (87,5%)
Отсутствие первичной оценки эффективности	0	1 (20%)	1 (12,5%)
Набор протоколов анализа ¹	62 (89,9%)	57 (86,4%)	119 (88,1%)
Завершение исследования ²	54 (87,1%)	50 (87,7%)	104 (87,4%)
Преждевременный выход из исследования ²	8 (12,9%)	6 (10,5%)	14 (11,8%)

Максимальный PD	4 (57,1%)	4 (44,4%)	8 (50%)
Не FAS (полный набор анализов)	3 (42,9%)	5 (55,6%)	8 (50%)

¹ Процентные показатели, основанные на количестве рандомизированных пациентов в каждой группе лечения

² Процентные показатели, основанные на количестве субъектов, включенных в набор анализов

В Таблице 14 показан уровень 12-месячной клинической нормализации. Пациентов делят на пациентов с предшествующим лечением стероидами и без него.

Таблица 14

		PHMB		
		0,08%	PHMB	
		PHMB	+ 0.02%+	0,1% Общее
Уровень 12-месячной клинической нормализации		плацебо	Пропаמידин	Количество
		(N=66)	(N=61)	(N=127)
Пациенты* с предшествующей стероидной терапией	Без нормализации	7 (22,6%)	2 (10%)	9 (17,6%)
	Нормализация	24 (77,4%)	18 (90%)	42 (82,4%)
Пациенты без предшествующей стероидной терапией	Без нормализации	3 (8,6%)	5 (12,2%)	8 (10,5%)
	Нормализация	32 (91,4%)	36 (87,8%)	68 (89,5%)

* Использование любого из этих препаратов до терапии:

Кортикостероиды и противомикробные лекарственные средства в комбинации, кортикостероиды

Процентные показатели основаны на количестве субъектов в каждой подгруппе

и лечении

Результаты:

Первичная эффективность: уровень 12-месячной клинической нормализации

Результаты клинического исследования выявили отсутствие превосходства монотерапии 0,08% РНМВ по сравнению с комбинированной терапией 0,02% РНМВ + пропамидин 0,1% с точки зрения уровня клинической нормализации за 12 месяцев (CRR_12)

* CRR_12 для 0,08% РНМВ монотерапии равен 87,1%

* CRR_12 для 0,02% РНМВ + Пропамидин 0,1% равен 89,5%

Монотерапия всегда предпочтительнее комбинированной терапии и результаты не показывают статистически значимых различий.

Процент субъектов, ранее получавших терапию на основе кортикостероидов, указан ниже:

- 22,6% для 0,08% монотерапии РНМВ;

- 10% для 0,02% РНМВ + Пропамидин 0,1% комбинированной терапии.

Уровень клинической нормализации CRR12 для пациентов с предшествующим лечением стероидами и без него указан ниже:

* CRR_12 для монотерапии 0,08% РНМВ равен 91,4%

* CRR_12 для 0,02% РНМВ + Пропамидин 0,1% равен 87,8%

CRR_12, полученный при монотерапии, в обоих случаях является неожиданным, поскольку комбинированная терапия, применяемая в обычной клинической практике, обеспечивает CRR_12, составляющий примерно 63-67%. Таким образом, клиническое исследование не только демонстрирует, что монотерапия в условиях описанной композиции (MW, PDI и 0,04%-0,008% концентрация полимера РНМВ, рН и осмолярность) эквивалентна комбинированной терапии, но в обоих случаях полученные результаты лучше, чем описанные ранее в клинической практике (ретроспективное исследование 083/SI).

Вторичная эффективность: время лечения

Время лечения, связанное с терапией, составляет:

* 0,08% РНМВ группа: 138,3 суток* (диапазон 32-365 суток)

* 0,02% РНМВ группа + Пропамидин 0,1%: 117,1* суток

(диапазон 54-214 суток)

* среднее значение

0,08% РНМВ показывает время лечения в более широком диапазоне. Более длительное время лечения обычно ассоциировано с монотерапией по сравнению с комбинированной терапией, но неожиданно нижняя граница диапазона времени лечения для монотерапии показывает нормализацию на 32 сутки. Результаты не показывают статистической разницы.

В таблице 15 показаны результаты по времени лечения пациентов.

Таблица 15

Время лечения (сутки)	РНМВ	РНМВ 0,02% +
	0,08%+ плацебо (N=56)	Пропамидин (N=54)
Посещение в конце исследования		
n/nmiss	56/0	54/0
Среднее (DS)	138,3 (67,3)	117,1 (47)
Среднее	125	112
Q1, Q3	93, 152	85, 151
Мин., Макс.	32, 365	54, 214
р-значение для разницы между группами лечения ¹	0,0934	

n/nmiss = количество субъектов с оцененными/отсутствующими данными
 Q1 = первый квартиль, Q3 = третий квартиль, SD = стандартное отклонение
¹U-критерий Манна — Уитни.

BIBLIOGRAPHY

[1] Kilvington S, Larkin DF. Acanthamoeba adherence to contact lenses and removal by cleaning agents. Eye 1990;4:589–593.

[2] Sharma R., et al. Coinfection with Acanthamoeba and Pseudomonas in contact lens-associated keratitis. Optom Vis Sci. 2013; 90(2): e53-5

[3] Singh A., et al. Acanthamoeba Keratitis Versus Mixed Acanthamoeba and Bacterial Keratitis: Comparison of Clinical and Microbiological Profiles. Cornea. 2020;

39:1112-1116.

[4] Nakagawa H., et al. Number of Bacteria and Time of Coincubation With Bacteria Required for the Development of Acanthamoeba Keratitis. *Cornea*. 2017; 36:353-357.

[5] Larkin D. F., et al., Treatment of Acanthamoeba keratitis with polyhexamethylene biguanide, *Ophthalmology*, 99 (1992) 185.

[6] Dave S.B., Changes in ocular flora in eyes exposed to ophthalmic antibiotics. *Ophthalmology*. 2013;120:937-41.

[7] Ian J. et al., Effects of Polyhexamethylene Biguanide and Polyquaternium-1 on Phospholipid Bilayer Structure and Dynamics, *J. Phys. Chem. B* 2015, 119, 10531–10542.

[8] M. J. Allen, et al. White Cooperativity in the binding of the cationic biocide polyhexamethylene biguanide to nucleic acids. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 318 (2004) 397–404.

[9] K. Chindera, et al. The antimicrobial polymer PHMB enters cells and selectively condenses bacterial chromosomes. *Scientific Reports* 6:23121.

[10] Papa V. et al. Ocular safety and tolerability of high dose PHMB (Polyhexanide) in healthy volunteers. *ARVO*, 2017.

[11] Sowlati-Hashjin S., et al. Insights into the Polyhexamethylene Biguanide (PHMB) Mechanism of Action on Bacterial Membrane and DNA: A Molecular Dynamics Study. *J Phys Chem B*. 2020;124:4487-4497.

[12] Domanda di brevetto US2007/0140897 A1.

[13] Y. Bouattour et al. Stability of an ophthalmic formulation of polyhexamethylene biguanide in gamma-sterilized and ethylene oxide sterilized low density polypropylene multidose eyedroppers. *PEERJ*, vol. 6 pag. e4549 (2018).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Жидкая композиция на основе полигексаметиленбигуанида, содержащая полигексаметиленбигуанид в концентрации в диапазоне 0,04%-0,08% (масса/объем), буферную систему для поддержания рН в диапазоне 5-6,5, изотонический агент для поддержания осмолярности в диапазоне 270-330 мОсм/кг, характеризующаяся молекулярной массой полигексаметиленбигуанида в диапазоне 2300-6000 а.е.м. и индексом полидисперсности полимера в диапазоне 1,5-1,9, подходящая для офтальмологического введения для применения в лечении акантамебного кератита и/или грибковых инфекций.

2. Жидкая композиция на основе полигексаметиленбигуанида для применения по п. 1 для лечения коинфекций, вызванных *Acanthamoeba* и *Pseudomonas aeruginos* или *Staphylococcus epidermis*.

3. Жидкая композиция на основе полигексаметиленбигуанида для применения по пп. 1-2, где буферная система выбрана из группы, содержащей фосфатный, цитратный, бикарбонатный, боратный, Tris (трис(гидроксиметил)аминометан), глицериновый, маннитный, сорбитный, трометамоловый, гистидиновый, глициновый, HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота) буфер или смешанную систему.

4. Жидкая композиция на основе полигексаметиленбигуанида для применения по п. 3, где указанная буферная система выбрана из группы, состоящей из двухосновного натрия фосфата додекагидрата/одноосновного натрия фосфата, двухосновного натрия фосфата додекагидрата/лимонной кислоты, Tris/HCl или борной кислоты/бората.

5. Жидкая композиция на основе полигексаметиленбигуанида для применения по любому из пп. 1-4, где изотонический агент представляет собой хлорид натрия или хлорид калия.

6. Жидкая композиция на основе полигексаметиленбигуанида для применения по любому из пп. 1-5, характеризующаяся индексом полидисперсности полимера в диапазоне 1,7-1,8.

7. Жидкая композиция на основе полигексаметиленбигуанида для применения по любому из пп. 1-6, имеющая рН 5,8.

8. Жидкая композиция на основе полигексаметиленбигуанида для

применения по любому из пп. 1-7 в форме коллирия, глазных капель, офтальмологического геля или вязких растворов.

9. Жидкая композиция на основе полигексаметиленбигуанида для применения по п. 8 в форме офтальмологического геля или вязкого раствора, дополнительно включающая увеличитель вязкости, выбранный из группы, состоящей из ксантановой камеди, геллановой камеди, поливинилового спирта, гиалуроновой кислоты, гиалуроната натрия, карбоксиметилцеллюлозы и гидроксипропилцеллюлозы.

10. Жидкая композиция на основе полигексаметиленбигуанида для применения по любому из пп. 1-9, дополнительно содержащая усилитель проникновения, выбранный из Tween 80 и бензалкония хлорида.

11. Жидкая композиция на основе полигексаметиленбигуанида для применения по любому из пп. 1-10, дополнительно содержащая 0,02% хлоргексидина, 0,1% пропамидина или 0,1% дезомидина.

12. Жидкая композиция на основе полигексаметиленбигуанида для применения по любому из пп. 1-11 посредством офтальмологического введения ступенчатой дозировки, составляющей 16 капель/сутки в течение 5 суток, 8 капель/сутки в течение 7 суток, 6 капель/сутки в течение 7 суток и 4 капли/сутки вплоть до клинической нормализации.

13. Способ получения жидкой композиции на основе полигексаметиленбигуанида по любому из пп. 1-12, включающий следующие стадии:

(1) добавление буферной системы в концентрации в диапазоне от 0,01% до 4,5% (масса/объем) и изотонического агента в концентрации в диапазоне от 0,01% до 5,5% (масса/объем) в очищенную воду при легком и непрерывном перемешивании; возможно добавление увеличителя вязкости, выбранного из гиалуроната натрия, ксантановой камеди, поливинилового спирта, карбоксиметилцеллюлозы и гидроксипропилцеллюлозы;

(2) добавление полигексаметиленбигуанида, имеющего молекулярную массу в диапазоне 2300-6000 а.е.м. и индекс полидисперсности в диапазоне 1,5-1,9, предпочтительно 1,7-1,8, в концентрации в диапазоне 0,04%-0,08% (масса/объем) при легком перемешивании;

(3) доведение до нужного объема путем добавления очищенной воды;

(4) стерилизация посредством фильтрации или нагрева.

14. Способ получения жидкой композиции на основе

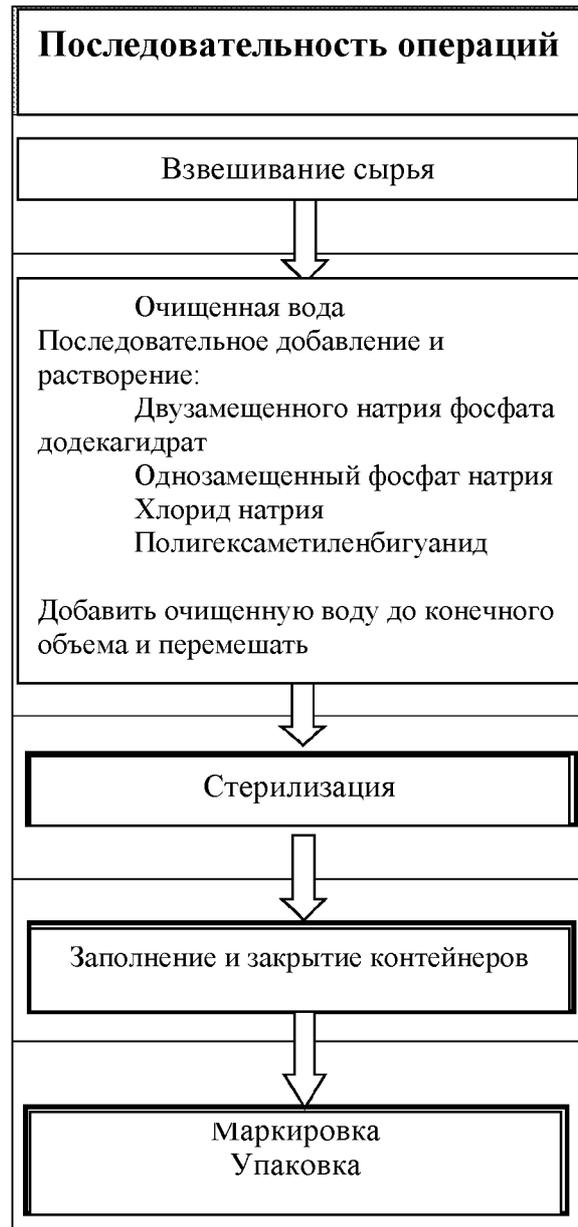
полигексаметиленбигуанида по п. 13, где указанная буферная система выбрана из группы, состоящей из фосфатного, цитратного, бикарбонатного, боратного, Tris, глицеринового, маннитного, сорбитного, триметамолового, гистидинового, глицинового, HEPES буфера или смешанной системы.

15. Способ получения жидкой композиции на основе полигексаметиленбигуанида по п. 14, где указанная буферная система выбрана из группы, состоящей из двухосновного натрия фосфата додекагидрата/одноосновного натрия фосфата, двухосновного натрия фосфата додекагидрата/лимонной кислоты, Tris/HCl или борной кислоты/бората.

16. Способ получения жидкой композиции на основе полигексаметиленбигуанида по любому из пп. 13-15, где изотонический агент представляет собой хлорид натрия или хлорид калия.

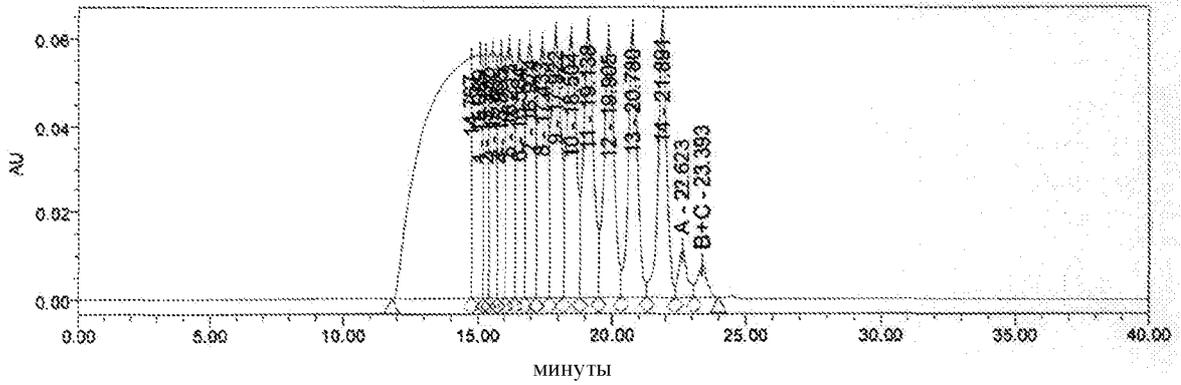
17. Глазные линзы, нагруженные жидкой композицией на основе полигексаметиленбигуанида по любому из пп. 1-11, для контролируемого высвобождения активного ингредиента для применения в лечении акантамебного кератита, коинфекций *Acanthamoeba* и *Pseudomonas aeruginosa* или грибковых инфекций.

2 Композиция на основе полигексаметиленбигуанида
для применения в лечении акантамбного кератита
и/или грибковых инфекций

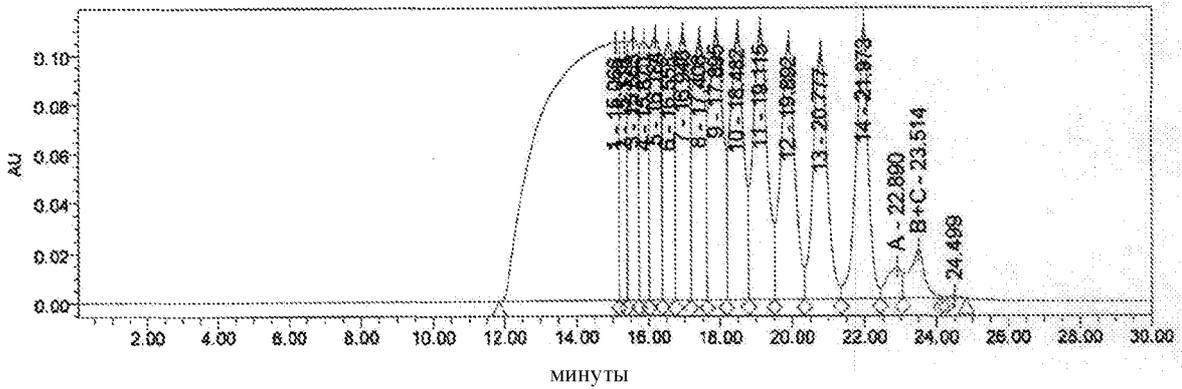


Фиг. 2

3 Композиция на основе полигексаметиленбигуанида для применения в лечении акантамебного кератита и/или грибковых инфекций

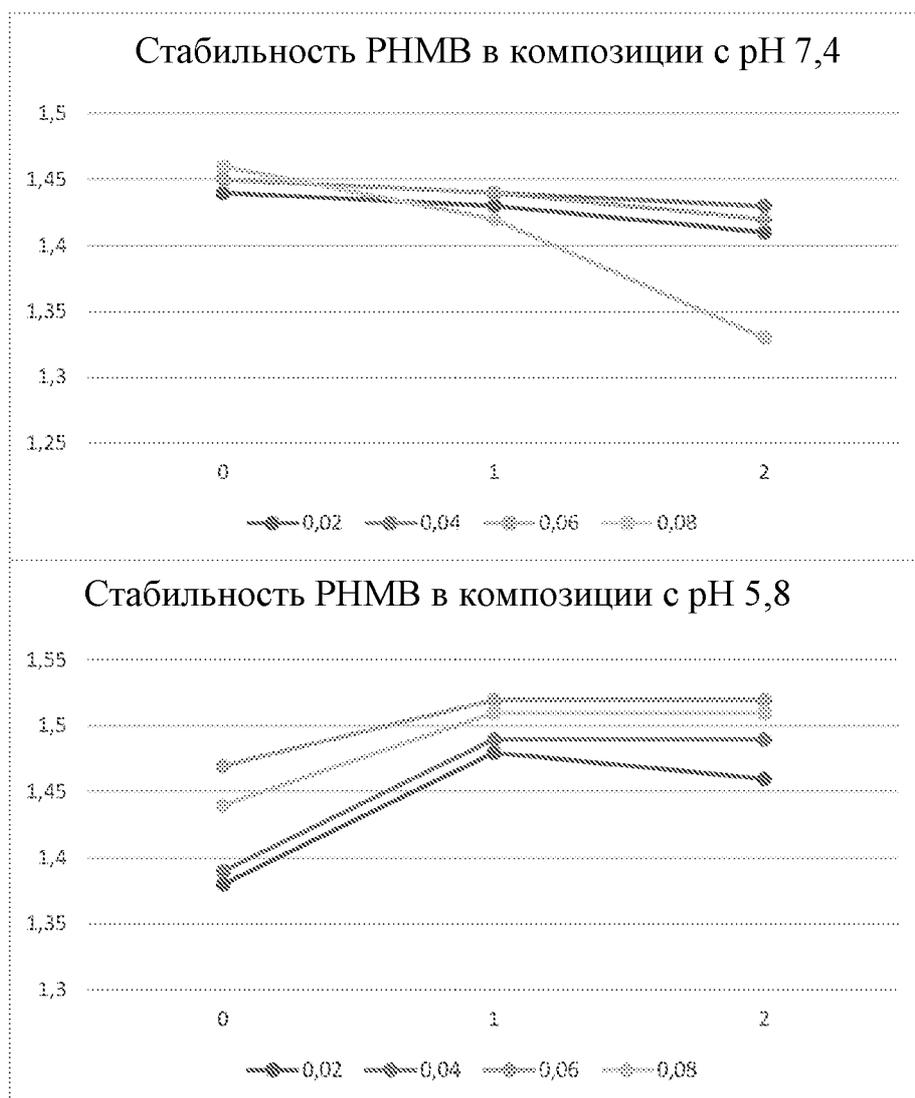


Фиг. 3



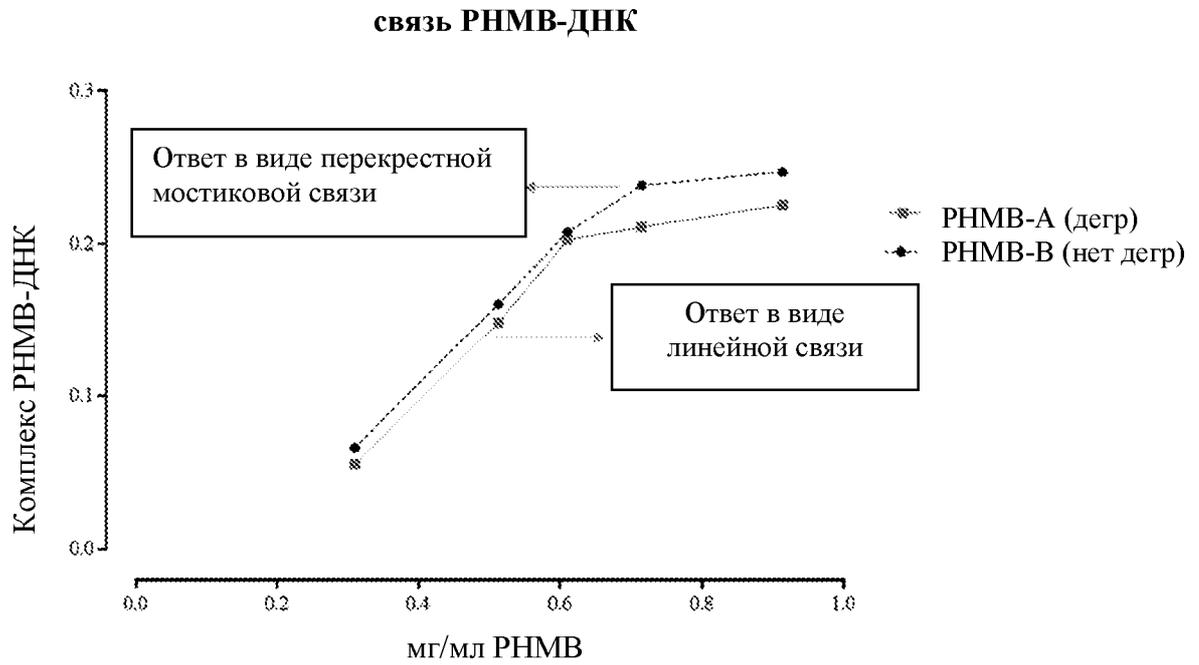
Фиг. 4

4 Композиция на основе полигексаметиленбигуанида
для применения в лечении акантамебного кератита
и/или грибковых инфекций



Фиг. 5

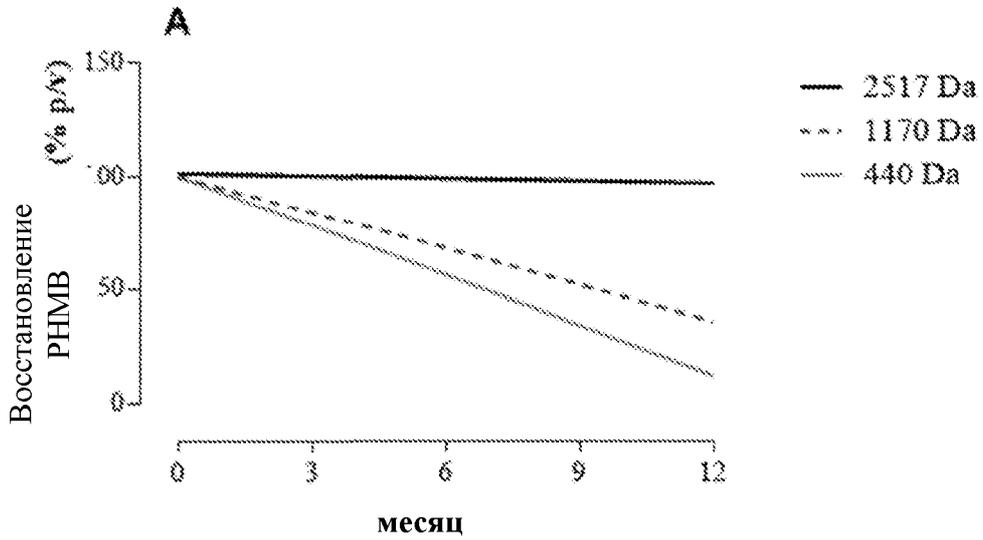
5 Композиция на основе полигексаметиленбигуанида для применения в лечении акантамебного кератита и/или грибковых инфекций



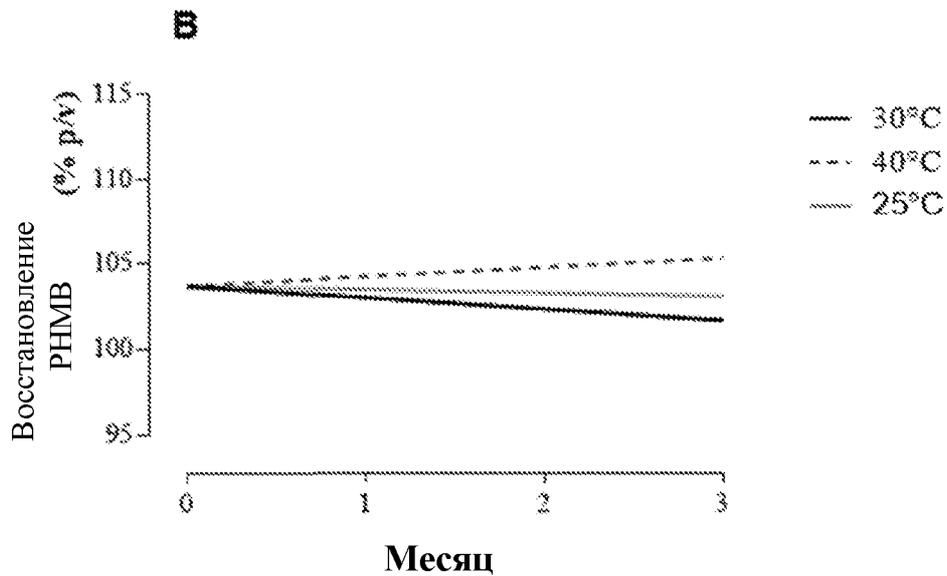
Фиг. 6

6 Композиция на основе полигексаметиленбигуанида для применения в лечении акантамбного кератита и/или грибковых инфекций

Исследование стабильности 0,08%PHMB растворов с pH=5,8 с разными молекулярными массами



Исследование стабильности 0,08%PHMB раствора с pH=5,8 осмолярность 0,290 Осм/кг, MW=2641 а.е.м., PDI=1,6



Фиг. 7