

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **234554**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **418515**

(22) Data zgłoszenia: **31.08.2016**

(51) Int.Cl.

A61K 31/496 (2006.01)

A61K 31/513 (2006.01)

A61K 9/10 (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01)

(54) **Mieszanina oksytiaminy i ketokonazolu oraz kompozycja farmaceutyczna**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

12.03.2018 BUP 06/18

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

31.03.2020 WUP 03/20

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Medyczny
W Białymstoku, Białystok, PL
UNIwersytet W Białymstoku,
Białystok, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**ADAM TYLICKI, Białystok, PL
MAGDALENA SIEMIENIUK, Białystok, PL
URSZULA CZYŻEWSKA, Supraśl, PL
KATARZYNA WINNICKA, Białystok, PL
KATARZYNA SOSNOWSKA, Kuriany, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Sławomir Kotara

PL 234554 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest mieszanina oksytiaminy i ketokonazolu oraz kompozycja farmaceutyczna. Wynalazek dotyczy dziedziny środków przeciwgrzybiczych.

Grzyby z rodzaju *Malassezia* należą do oportunistycznych drożdżaków i wchodzą w skład mikroflory skóry oraz błon śluzowych ludzi i zwierząt. W przypadku upośledzenia funkcji układu odpornościowego gospodarza grzyby te mogą prowadzić do rozwoju wielu chorób skóry, takich jak łupież pstry (*pityriasis versicolor*) czy zapalenie mieszków włosowych (*Malassezia folliculitis*). Patogeny te mogą również być związane z nasileniem zmian chorobowych w przebiegu takich schorzeń jak łojotokowe zapalenie skóry (*dermatitis seborrhoica*) oraz z zaostrzeniem przebiegu łuszczycy (*psoriasis*) i atopowego zapalenia skóry (*dermatitis atopica*). *Malassezia pachydermatis* uważana jest za gatunek typowo zoofilny. Drożdżak ten jest izolowany w ok. 70% przypadków zapalenia zewnętrznego kanału słuchowego (*otitis externa*) i ok. 30% przypadków zapalenia skóry (*dermatitis*), głównie u psów i kotów. Obecnie coraz częściej diagnozowane są również u ludzi przypadki odzwierzęcych dermatoz, a także fungemii powodowanych przez *Malassezia pachydermatis*. Szczególnie narażone na zakażenia są noworodki hospitalizowane na oddziałach intensywnej terapii i pacjenci żywieni pozajelitowo.

Największą grupę środków przeciwgrzybiczych wykorzystywanych w leczeniu infekcji wywołanych przez grzyby z rodzaju *Malassezia* stanowią azole, spośród których powszechnie stosowany jest ketokonazol. Mechanizm działania ketokonazolu polega na blokowaniu syntezy ergosterolu przez hamowanie demetylacji węgla C14 w cząsteczce lanosterolu, co powoduje upośledzenie funkcjonowania błony komórkowej i w efekcie obumarcie komórki grzyba. Ketokonazol charakteryzuje się wysoką skutecznością oraz szerokim zakresem działania. Jednakże, miejscowe i ogólnoustrojowe stosowanie ketokonazolu wiąże się z efektami ubocznymi, takimi jak skórne reakcje nadwrażliwości, bóle brzucha, nudności, wymioty, biegunka, zaparcia, dreszcze, gorączka, bóle i zawroty głowy oraz zmiany w składzie krwi. Ketokonazol stosowany przez dłuższy okres czasu może wywierać negatywny wpływ na wątrobę, łącznie z jej uszkodzeniem oraz może powodować zaburzenia układu hormonalnego, czego objawami mogą być skąpomocz, ginekomastia, spadek libido, impotencja, zaburzenia w składzie nasienia u mężczyzn oraz zaburzenia miesiączkowania u kobiet. Oprócz efektów ubocznych, ketokonazol wykazuje również niepożądane interakcje z innymi lekami, co może prowadzić do poważnych zaburzeń rytmu serca i hipoglikemii. Istnieje też pewna grupa pacjentów z przeciwwskazaniami do stosowania ketokonazolu.

Silne efekty uboczne stosowanych środków przeciwgrzybiczych, długoterminowy charakter leczenia, trudności terapeutyczne wynikające z szybko narastającej oporności patogenów na aktualnie stosowane antymykotyki oraz nawracająca liczba diagnozowanych infekcji grzybiczych skłaniają do poszukiwania nowych środków przeciwgrzybiczych i/lub związków chemicznych, które mogłyby być zastosowane jako środki wspomagające leczenie grzybic.

Aby zminimalizować efekty uboczne stosowanych antymykotyków, podjęto liczne działania mające na celu zmniejszenie dawki tych środków w stosowanych preparatach, mając na względzie jednocześnie utrzymanie ich terapeutycznego działania na skutecznym poziomie. Środki przeciwgrzybicze były łączone z innymi antymykotykami lub innymi związkami chemicznymi wspomagającymi leczenie, w celu uzyskania silniejszego działania mieszaniny niż działanie tych substancji stosowanych oddzielnie. Dzięki temu można było obniżyć dawki substancji czynnych w stosowanym leku.

W opisie patentowym EP0925070B1 ujawniono kompozycję zawierającą znany środek przeciwgrzybiczy z grupy azoli, w tym ketokonazol, w połączeniu z innym środkiem przeciwgrzybiczym, pochodną pneumokandyny. Badania *in vivo* wykazały efekt addycyjny i synergistyczny tej kompozycji. Innym tego typu połączeniem jest mieszanina związku imidazolowego i biguanidu poliheksametylenowego, przedstawiona w opisie zgłoszeniowym EP3049056A1, która wykazywała silny synergizm działania w odniesieniu do grzybów patogennych. Jednym z wykorzystanych imidazoli był ketokonazol.

Podobne działanie stwierdzono w opisie patentowym EP1555989B1. Dokument ten dotyczy kompozycji zawierającej synergistyczną mieszaninę środka przeciwłupieżowego i sprzężonego kwasu linolowego.

W opisie zgłoszeniowym EP1867332A1 ujawniono kompozycję przeciwgrzybiczą zawierającą pochodną aryloamidynową i ketokonazol. Połączenie obu tych substancji wykazywało silne działanie synergistyczne wobec *Malassezia furfur*.

Innym rozwiązaniem znanym ze stanu techniki jest kompozycja do ciała i włosów, ujawniona w opisie patentowym EP0975312B1, zawierająca synergistyczne połączenie amfoterycznego fosfolipidu i ketokonazolu. Kompozycja ta była stosowana do leczenia łupieżu, łojotokowego zapalenia skóry i łuszczyca związanych z infekcją *Malassezia furfur*.

W opisie patentowym EP0963195B1 ujawniono połączenie dwóch substancji aktywnych o działaniu przeciwgrzybiczym. Pierwszą substancją był związek hamujący biosyntezę ergosterolu, a drugą metylosiarczan 10'-undecen-3-oiloaminopropylotrimetylammoniumowy. Badania *in vitro* wykazały synergistyczne działanie mieszaniny z ketokonazolem wobec *Malassezia furfur*. Badano również połączenie ketokonazolu z lekiem z grupy inhibitorów kalcyneuryny jak takrolimus. Uzyskano wartości minimalnego stężenia hamującego wobec szczepów *Malassezia globosa*, *Malassezia restricta*, *Malassezia sympodialis* i *Malassezia furfur* cztery razy niższe niż w przypadku tych substancji stosowanych osobno (Sugita T., Tajima M., Ito T., Saito M., Tsuboi R., Nishikawa A.: Antifungal Activities of Tacrolimus and Azole Agents against the Eleven Currently Accepted *Malassezia* Species. J. Clin. Microbiol. 2005 43(6): 2824–2829).

Zaobserwowano zwiększenie działania ketokonazolu w obecności ekstraktów roślinnych z *Datura metal* i *Albizia amara* wobec szczepów *Malassezia globosa* i *Malassezia restricta* (Mohanty B.K., Gokul Shankar S., Ranjith M.S., Prabhmanju M.: Is synergy of antimicrobials the effective way of management of resistance among cosmetically significant skin microflora? Science and Technology Against Microbial Pathogens: Research, Development and Evaluation, Mendez-Vilas A., World Scientific, 2011, 164–169).

W ostatnich badaniach stwierdzono wpływ oksytiaminy, antyvitaminowej pochodnej witaminy B1, niewykorzystywanej wcześniej w celach terapeutycznych na zahamowanie wzrostu szczepów *Malassezia pachydermatis*.

Wyznaczając minimalne stężenie hamujące wykazano wysoką aktywność oksytiaminy w stosunku do szczepów *Malassezia pachydermatis*. Natomiast szacując wartości minimalnego stężenia grzybobójczego nie stwierdzono działania bójczego (Ziółkowska G., Tokarzewski S., Strumiło S., Tylicki A. Antifungal efficacy of oxythiamine – antivitamin derivative of vitamin B1. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska Sectio DD. 2006; 61: 69–73).

Stwierdzono wpływ oksytiaminy na poziom kwasów tłuszczowych w szczepach *Malassezia pachydermatis*. Całkowita zawartość kwasów tłuszczowych została zmniejszona o 50% (Tylicki A., Siemieniuk M., Dobrzyń P., Ziółkowska G., Nowik M., Czyżewska U., Pyrkowska A.: Fatty acid profile and influence of oxythiamine on fatty acid content in *Malassezia pachydermatis*, *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. Mycoses. 2012; 55(3): 106–113).

Po podaniu oksytiaminy odnotowano dwukrotne zmniejszenie tempa wzrostu komórek, czterokrotne obniżenie aktywności dehydrogenazy jabłczanowej oraz zmianę parametrów kinetycznych tego enzymu w kulturach *in vitro* *Malassezia pachydermatis* (Siemieniuk M., Czyżewska U., Strumiło S., Tylicki A.: Thiamine antivitamin – an opportunity of therapy of fungal infections caused by *Malassezia pachydermatis* and *Candida albicans*. Mycoses. 2016; 59(2): 108–116).

Celem wynalazku jest opracowanie nowej mieszaniny przeciwgrzybiczej, charakteryzującej się małymi efektami ubocznymi dzięki stosunkowo niskiej zawartości substancji aktywnych, a jednocześnie dużą skutecznością terapeutyczną.

Przedmiotem wynalazku jest mieszanina oksytiaminy i ketokonazolu lub ich farmaceutycznie dopuszczalnych soli w synergistycznie skutecznych ilościach, przy czym stosunek ilościowy oksytiaminy do ketokonazolu lub ich farmaceutycznie dopuszczalnych soli wynosi od 50:1 do 30000:1. Korzystnie, stosunek ilościowy oksytiaminy do ketokonazolu lub ich farmaceutycznie dopuszczalnych soli wynosi od 50:1 do 200:1.

Przedmiotem wynalazku jest również wyżej określona mieszanina do zastosowania jako lek przeciwgrzybiczy w leczeniu i/lub zapobieganiu infekcji wywołanej grzybami z rodzaju *Malassezia*.

Ponadto, przedmiotem wynalazku jest kompozycja farmaceutyczna zawierająca substancje aktywne i substancje pomocnicze, charakteryzująca się tym, że substancjami aktywnymi są oksytiamina i ketokonazol lub ich farmaceutycznie dopuszczalne sole w synergistycznie skutecznych ilościach, przy czym stosunek ilościowy oksytiaminy do ketokonazolu lub ich farmaceutycznie dopuszczalnych soli wynosi od 50:1 do 30000:1. Korzystnie, stosunek ilościowy oksytiaminy do ketokonazolu lub ich farmaceutycznie dopuszczalnych soli wynosi od 50:1 do 200:1. W korzystnym wariantcie kompozycji zawartość

oksytiaminy wynosi od 5000 $\mu\text{g/ml}$ do 20000 $\mu\text{g/ml}$, a zawartość ketokonazolu wynosi 100 $\mu\text{g/ml}$. Kompozycja według wynalazku jest korzystnie przeznaczona do stosowania miejscowego i ma postać hydrożelu.

W mieszaninie według wynalazku między oksytiaminą i ketokonazolem zachodzi zjawisko synergizmu. Dzięki temu grzybobójcze działanie mieszaniny obu substancji jest dużo wyższe niż działanie tych substancji osobno. Daje to możliwość zastosowania znacząco mniejszych dawek oksytiaminy i ketokonazolu w preparacie, co wiąże się z możliwością ograniczenia skutków ubocznych, jednocześnie przy identycznym, a nawet lepszym działaniu terapeutycznym niż tradycyjne środki przeciwgrzybicze zawierające w składzie ketokonazol.

Wynalazek został przedstawiony za pomocą następujących przykładów realizacji.

W celu wykazania synergistycznego działania mieszaniny według wynalazku porównano bójcze działanie tej mieszaniny do bójczego działania oksytiaminy i ketokonazolu osobno oraz do bójczego działania komercyjnego preparatu Nizoral zawierającego ketokonazol o stężeniu 20000 $\mu\text{g/ml}$.

Oznaczanie bójczego działania oksytiaminy i ketokonazolu wykonano wobec referencyjnego szczepu *M. pachydermatis* (CBS 7925) oraz 65 środowiskowych szczepów *M. pachydermatis*. Natomiast określenie bójczego działania mieszaniny oksytiaminy z ketokonazolem wykonano wobec referencyjnego szczepu *M. pachydermatis* (CBS 7925) oraz 39 środowiskowych szczepów *M. pachydermatis*. Wszystkie oznaczenia bójczego działania testowanych substancji i ich mieszanin przeprowadzono na podstawie oszacowania wartości MFC (minimalne stężenie grzybobójcze) metodą podwójnych rozcieńczeń, zgodnie z zaleceniami CLSI (Instytut Norm Klinicznych i Laboratoryjnych), na płynnej pożywce MLNA zawierającej oksytiaminę w zakresie stężeń 5–40000 $\mu\text{g/ml}$, ketokonazol w zakresie stężeń 0,01–2,5 $\mu\text{g/ml}$ lub mieszaninę obu związków w zakresie stężeń 0,15–1,2 $\mu\text{g/ml}$ (oksytiamina) i $0,05 \times 10^{-4}$ – $0,4 \times 10^{-4}$ $\mu\text{g/ml}$ (ketokonazol). Oszacowano również wrażliwość 44 szczepów *M. pachydermatis* na oksytiaminę i ketokonazol w postaci hydrożelu. Oznaczenia te zostały wykonane metodą dyfuzyjno-krażkową zgodnie z zaleceniami CLSI.

Wartości MFC oksytiaminy wobec środowiskowych szczepów *M. pachydermatis* kształtowały się w zakresie od 80 do 10000 $\mu\text{g/ml}$. Wśród wszystkich badanych szczepów 51 wykazało równą lub większą wrażliwość na oksytiaminę w porównaniu ze szczepem referencyjnym (5000 $\mu\text{g/ml}$), natomiast 15 spośród szczepów środowiskowych wykazało wartość MFC oksytiaminy wyższą niż szczep referencyjny (10000 $\mu\text{g/ml}$, Tabela 1).

Wartości MFC ketokonazolu wobec tych samych co w przypadku oznaczeń MFC oksytiaminy szczepów *M. pachydermatis* kształtowały się w zakresie 0,04–0,32 $\mu\text{g/ml}$. Największą wrażliwość wykazały 3 testowane szczepy, których wzrost był nieodwracalnie zahamowany już przy 0,04 $\mu\text{g/ml}$ ketokonazolu. Wartość MFC ketokonazolu dla 12 najbardziej opornych szczepów wynosiła 0,32 $\mu\text{g/ml}$ (Tabela 2).

Wartości MFC mieszaniny oksytiaminy i ketokonazolu zostały określone względem 40 szczepów *M. pachydermatis*. Spośród przebadanych szczepów maksymalną oporność wykazały dwa, dla których wartość MFC oksytiaminy i ketokonazolu podawanych łącznie była równa odpowiednio 1,2 $\mu\text{g/ml}$ i $0,4 \times 10^{-4}$ $\mu\text{g/ml}$. Zastosowane w tej mieszaninie stężenie ketokonazolu było mniejsze o cztery rzędy wielkości od wartości MFC dla tego związku działającego osobno. Podobny wynik uzyskano dla komponenty oksytiaminowej, dla której stężenie potrzebne do osiągnięcia efektu bójczego w mieszaninie było niższe o cztery rzędy wielkości niż stężenie tej antywitamiны działającej osobno. Wzrost znaczącej większości badanych szczepów był nieodwracalnie hamowany przez jeszcze niższe stężenia obu związków w mieszaninie. Minimalne stężenia substancji działających razem, przy których nastąpiło zahamowanie wzrostu 10 spośród przebadanych szczepów wynosiło zaledwie 0,15 $\mu\text{g/ml}$ oksytiaminy i $0,05 \times 10^{-4}$ ketokonazolu (Tabela 3).

Poprzez zastosowanie hydrożeli sprawdzono praktyczny aspekt wykorzystania mieszaniny oksytiaminy i ketokonazolu w zwalczaniu środowiskowych szczepów *M. pachydermatis*. Oksytiamina i ketokonazol w postaci hydrożelu wykazały silny efekt synergistyczny w hamowaniu wzrostu szczepów *M. pachydermatis* we wszystkich badanych kombinacjach stężeń obu substancji. Preparat hydrożelowy łączący oksytiaminę i ketokonazol wykazywał działanie porównywalne lub silniejsze w stosunku do Nizoralu przy znacznie mniejszych stężeniach ketokonazolu (Tabela 4).

T a b e l a 1. Wartości MFC oksytiaminy względem 66 szczepów *M. pachydermatis*

Stężenie oksytiaminy (µg/ml)	Liczba szczepów
80	4
160	1
312	2
625	2
1250	2
2500	15
5000	25
10000	15

n = 66

T a b e l a 2. Wartości MFC ketokonazolu względem 66 szczepów *M. pachydermatis*

Stężenie ketokonazolu (µg/ml)	Liczba szczepów
0,04	3
0,08	18
0,16	33
0,32	12

n = 66

T a b e l a 3. Wartości MFC mieszanin oksytiaminy i ketokonazolu względem 40 szczepów *M. pachydermatis*

Stężenie oksytiaininy/ketokonazolu (µg/ml)	Liczba szczepów
0,15/0,05 x 10 ⁻⁴	10
0,3/0,1 x 10 ⁻⁴	23
0,6/0,2 x 10 ⁻⁴	5
1,2/0,4 x 10 ⁻⁴	2

n = 40

T a b e l a 4. Aktywności 7 formułacji hydrożelowych oraz Nizoralu wobec 44 szczepów *M. pachydermatis*

Formułacja hydrożelu	Średnia wartość strefy zahamowania wzrostu (mm)
Placebo	0
oksytiamina 20000 µg/ml	20,63 ± 1,04
ketokonazol 20000 µg/ml	34,23 ± 0,58
ketokonazol 100 µg/ml	29,31 ± 0,71
ketokonazol 100 µg/ml + oksytiamina 5000 µg/ml	36,08 ± 0,71
ketokonazol 100 µg/ml + oksytiamina 10000 µg/ml	37,63 ± 0,89
ketokonazol 100 µg/ml + oksytiamina 20000 µg/ml	39,09* ± 0,97
Nizoral (ketokonazol 20000 µg/ml)	34,39 ± 0,53

* test t Studenta; p < 0,05 w stosunku do Nizoralu; ± SE; n=44

Wynalazek znajduje zastosowanie w leczeniu infekcji grzybiczych, jako środek powierzchniowo czynny, zwłaszcza infekcji wywołanej grzybami z rodzaju *Malassezia* oraz związanych z nią chorób, takich jak łupież pstry, łuszczyca, zapalenie mieszków włosowych, zapalenie skóry, łojotokowe zapalenie skóry, atopowe zapalenie skóry, zapalenie zewnętrznego kanału słuchowego oraz fungemia i odzwierzęce choroby skóry powodowane przez *M. pachydermatis*.

Zastrzeżenia patentowe

1. Mieszanina oksytiaminy i ketokonazolu lub ich farmaceutycznie dopuszczalnych soli w synergistycznie skutecznych ilościach, przy czym stosunek ilościowy oksytiaminy do ketokonazolu lub ich farmaceutycznie dopuszczalnych soli wynosi od 50:1 do 30000:1.
2. Mieszanina według zastrz. 1, **znamienna tym**, że stosunek ilościowy oksytiaminy do ketokonazolu lub ich farmaceutycznie dopuszczalnych soli wynosi od 50:1 do 200:1.
3. Mieszanina określona w zastrz. 1–2 do zastosowania jako lek.
4. Mieszanina do zastosowania według zastrz. 3, **znamienna tym**, że jest stosowana jako lek przeciwgrzybiczy.
5. Mieszanina do zastosowania według zastrz. 4, **znamienna tym**, że jest stosowana w leczeniu i/lub zapobieganiu infekcji wywołanej grzybami z rodzaju *Malassezia* i związanych z nią chorób.
6. Kompozycja farmaceutyczna zawierająca substancje aktywne i substancje pomocnicze, **znamienna tym**, że substancjami aktywnymi są oksytiamina i ketokonazol lub ich farmaceutycznie dopuszczalne sole w synergistycznie skutecznych ilościach, przy czym stosunek ilościowy oksytiaminy do ketokonazolu lub ich farmaceutycznie dopuszczalnych soli wynosi od 50:1 do 30000:1.
7. Kompozycja farmaceutyczna według zastrz. 6, **znamienna tym**, że stosunek ilościowy oksytiaminy do ketokonazolu lub ich farmaceutycznie dopuszczalnych soli wynosi od 50:1 do 200:1.
8. Kompozycja farmaceutyczna według zastrz. 7, **znamienna tym**, że zawartość oksytiaminy wynosi od 5000 µg/ml do 20000 µg/ml, a zawartość ketokonazolu wynosi 100 µg/ml.
9. Kompozycja farmaceutyczna według zastrz. 6–8, **znamienna tym**, że jest przeznaczona do stosowania miejscowego.
10. Kompozycja farmaceutyczna według zastrz. 6–9, **znamienna tym**, że ma postać hydrożelu.