



(51) МПК
A61K 9/10 (2006.01)
A61K 31/4375 (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01)
A61P 17/10 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 9/0014 (2006.01); *A61K 31/4375* (2006.01); *A61K 45/06* (2006.01); *A61K 47/10* (2006.01); *A61K 2121/00* (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2014136492, 08.09.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
30.06.2010

Дата регистрации:
01.11.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
30.06.2009 US 61/221,725

Номер и дата приоритета первоначальной заявки,
из которой данная заявка выделена:
2012102898 30.06.2009

(43) Дата публикации заявки: 27.03.2016 Бюл. №
9

(45) Опубликовано: 01.11.2018 Бюл. № 31

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение
3, ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ХУАН Шуэнь-Лу (CN),
 ЧУН Вэнь-Хун (CN),
 ЧАН Цэ-Вэнь (CN)

(73) Патентообладатель(и):

ДЕРМАН БАЙОМЕДИСИН КО. ЛТД.
 (CN)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: CN 1923199 A, 07.03.2007. KR
20030082200 A, 22.10.2003. WO 2006138056
A1, 28.12.2006. RU 2358750 C2, 20.06.2009.

(54) КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ БЕРБЕРИН ИЛИ ЕГО АНАЛОГИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ КОЖНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ С РОЗАЦЕА ИЛИ С ПОКРАСНЕНИЕМ ЛИЦА

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической промышленности и дерматологии и представляет собой местную фармацевтическую композицию для лечения акнеформного дерматита, индуцированного ингибиторами EGFR, содержащую по меньшей мере 0,02% берберина или биологически эквивалентного аналога берберина, такого как пальматин, и компонент, выбранный из группы, состоящей из воды,

метанола, этанола и диметилсульфоксида, где берберин или биологически эквивалентный аналог берберина представляет собой основной фармацевтически активный компонент. Изобретение обеспечивает расширение арсенала средств для лечения акнеформного дерматита, индуцированного ингибиторами EGFR. 2 н. и 2 з.п. ф-лы, 2 ил., 6 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 9/10 (2006.01)
A61K 31/4375 (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01)
A61P 17/10 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 9/0014 (2006.01); *A61K 31/4375* (2006.01); *A61K 45/06* (2006.01); *A61K 47/10* (2006.01); *A61K 2121/00* (2006.01)

(21)(22) Application: **2014136492, 08.09.2014**

(24) Effective date for property rights:
30.06.2010

Registration date:
01.11.2018

Priority:

(30) Convention priority:
30.06.2009 US 61/221,725

Number and date of priority of the initial application,
from which the given application is allocated:
2012102898 30.06.2009

(43) Application published: **27.03.2016 Bull. № 9**

(45) Date of publication: **01.11.2018 Bull. № 31**

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, stroenie 3,
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i
Partnery"**

(72) Inventor(s):

**KHUAN Shuen-Lu (CN),
CHUN Ven-Khun (CN),
CHAN Tse-Ven (CN)**

(73) Proprietor(s):

DERMAN BAJOMEDISIN KO. LTD. (CN)

(54) **COMPOSITIONS CONTAINING BERBERINE OR ANALOGS THEREOF FOR TREATING ROSACEA OR RED FACE RELATED SKIN DISORDERS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to pharmaceutical industry and dermatology, and is a topical pharmaceutical formulation for the treatment of EGFR inhibitors induced acneiform dermatitis comprising at least 0.02 % berberine or a biologically equivalent analog of berberine such as palmate, and a component selected from group consisting of water, methanol,

ethanol and dimethylsulfoxide, wherein berberine or a biologically equivalent analogue of berberine being the primary pharmaceutically active component.

EFFECT: invention provides a wider range of agents for the treatment of EGFR inhibitors induced acneiform dermatitis.

4 cl, 2 dwg, 6 ex

C 2 2 6 7 1 4 9 2 R U

R U 2 6 7 1 4 9 2 C 2

1. Розацеа, его основные симптомы

Розацеа представляет собой хроническое заболевание кожи, которое проявляется покраснением и отечностью, в основном на лице и в особенности, в центральной части лица. Другие поражаемые этим заболеванием зоны включают волосистую часть головы, шею, уши, грудную клетку, спину и глаза. Розацеа проявляется покраснением лица, эритемой, телангиэктазией, эпизодами воспаления с папулами и пустулами, и в тяжелых случаях, ринофимой. Существенно, что отсутствуют комедоны¹.

Для пациентов с розацеа в основном характерна повышенная чувствительность кожи лица и сухость, чешуйчатый дерматит, отек лица и персистирующие грануламатозные папулозные узлы². По клиническим и гистопатологическим характеристикам это заболевание может быть классифицировано на четыре подтипа: а) эритематотелангиэктатический, б) папулопустулярный, с) фиматозный и (d) глазной, где каждый из указанных подтипов по тяжести состояния характеризуется тремя степенями (слабая, умеренная, тяжелая)³. Заболевание в основном протекает как хроническое с ремиссиями и повторными обострениями.

2. Другие кожные расстройства, проявляющиеся покраснением лица

Розацеа представляет собой наиболее распространенное кожное расстройство, проявляющееся покраснением лица. Другие кожные расстройства, проявляющиеся покраснением лица и имеющие сходные симптомы и, возможно, близкие патологические причины, включают обыкновенные угри, себорейный дерматит, фотодерматит и контактный дерматит. Указанные состояния, связанные с покраснением лица, могут варьировать от ощущения тепла и чувствительности кожи до гиперемии или сильного ощущения жара⁴. Пациенты с розацеа и другими расстройствами кожи, связанными с покраснением лица, часто демонстрируют повышенную чувствительность к факторам внешней среды и к местно вводимым средствам⁵. Индуцированный стероидами розацеа-подобный дерматит (или стероидный розацеа) представляет собой поражение, протекающее в виде папул или пустул с эритематозной или отечной основой, при наличии или в отсутствие телангиэктазии, которая вызывается длительным введением местных стероидов на лицо, или проявляется в виде феномена отмены, который возникает после прекращения приема местных стероидов^{6,7} (Chen AY Zirwas MJ, 2009; Lee DH, Li K, Suh DH 2008). Ингибиторы EGFR, такие как цетуксимаб, эрлотиниб, gefитиниб, вызывают акнеформный дерматит на лице или другой области кожи, включающий папуло-пустулярную реакцию, эритему, телангиэктазию и гиперемию у 30-90% пациентов, и в этом случае может также наблюдаться суперинфекция бактериями, такими как *Staphylococcus aureus*^{8,9} (Wollenberg A, Kroth J et al, 2010; Lacouture ME, Maitland ML et al, 2010).

3. Патогенез розацеа

Этиология розацеа не совсем ясна. Относительно ряда различных факторов было высказано предположение об их участии в развитии и проявлении розацеа. Однако роль ни одного из этих факторов не была подтверждена.

3.1. Роль генетических факторов

Более ранние исследования показали наличие генетической предрасположенности у людей к гиперемии, представляющей собой наиболее ранний симптом розацеа на лице¹⁰. Дополнительно, было показано, что нулевой генотип по глутатион-S-трансферазе MU-1 (GSTM1) и глутатион-S-трансферазе тета 1 (GSTT1) ассоциирован

с повышенным риском развития розацеа¹¹.

3.2. Воспаление и врожденная иммунная система

По мере прогрессирования розацеа, появляются воспалительные поражения. Розацеа, в отличие от обыкновенных угрей, не является бактериальным заболеванием

пилосебацейного комплекса. В этом случае, комедоны обычно отсутствуют и в образцах кожи, взятых у пациентов с розацеа, идентифицируется только нормальная бактериальная флора¹². Воспалительная стадия розацеа может рассматриваться как форма хронического стерильного целлюлита¹³. Хотя наличие микроорганизмов рассматривалось как возможный фактор, влияющий на развитие розацеа, результаты исследования были неубедительными¹. Клещи *Demodex folliculorum* считаются факультативными и не играют важной роли в патогенезе розацеа, хотя воспалительная реакция на клещей может ухудшать симптомы заболевания¹⁴.

Yamasaki et al обнаружили аномально высокий уровень кателицидинов при гистопатологическом окрашивании пораженных участков кожи у пациентов с розацеа. Было показано, что эпидермальные кератиноциты человека, стимулированные кателицидиновыми пептидами, повышают высвобождение IL-8. Инъекция кателицидиновых пептидов в кожу мышей вызывала воспалительные изменения с повышенной инфильтрацией нейтрофилов и образованием микрососудов, характерные для кожного расстройства при розацеа у людей¹⁵. Возможно, что кателицидины играют двойную роль в иммунитете, поскольку они могут и уничтожать микроорганизмы, и стимулировать воспалительные реакции организма-хозяина, такие как индукция высвобождения IL-8¹⁶. Другие воспалительные цитокины, уровень которых повышается при розацеа, включают IL-1 альфа и трансформирующий фактор роста бета-2^{17,18}.

3.3. Сосудистые медиаторы

Воспалительные медиаторы могут отвечать за вазодилатацию, наблюдаемую у пациентов с розацеа. Например, такое предположение высказывалось относительно вещества P, гистамина, серотонина, брадикинина или простагландинов¹⁹. Smith et al показали повышенную экспрессию фактора роста эндотелия сосудов и его рецепторов при розацеа²⁰.

4. Существующие в настоящее время подходы к лечению пациентов с розацеа

Для лечения розацеа использовалось множество антибиотиков, таких как тетрациклин и доксициклин. Было высказано предположение, что такие антибиотики оказывают, скорее, противовоспалительный, а не антимикробный эффект. Однако, другие противовоспалительные агенты были не эффективны при лечении розацеа. Иммуносупрессоры, такие как кортикостероиды, зачастую ухудшают воспалительное состояние при розацеа¹.

Вводимый местно метронидазол и некоторые системные антибиотики часто использовались как препараты первой линии для терапии розацеа. В основном для лечения розацеа применялись тетрациклин, доксициклин и миноциклин, вводимые в пероральном режиме. Считается, что эффективность пероральных антибиотиков в основном связана с их противовоспалительным эффектом, а не с антибиотическим действием. 15% гель азелаиновой кислоты был разрешен Федеральным Агентством по контролю за приемом лекарственных средств (FDA) США в 2002 году для местного лечения розацеа, выраженного в степени от «слабой» до «умеренной». Другие стандартные местные средства, которые применялись не по зарегистрированному

показанию, включали клиндамицин, сульфациетамид и серу, но механизм их действия недостаточно изучен.

5. Использование берберина при расстройствах, не связанных с кожей

Берберин (натуральный желтый 18, 18,6-дигидро-9,10-диметоксибензо)(g)-1,3-бензодиоксоло (5,6-а)хинолизиний) представляет собой изохинолиновый алкалоид, присутствующий в травяных растениях, таких как коптис (*Coptidis rhizome*), филлодендрон, *Scutellaria baicalensis*, *Mahonia aquifolium* и барбарис²³. Было показано, что берберин и его производные обладают антимикробной и противомаларийной активностью. Он может действовать против различных видов патогенов, таких как грибы, сахаромицеты, паразиты, бактерии и вирусы²⁴. Было показано, что берберин обладает другими потенциально полезными свойствами. Например, он может применяться для снижения высокого уровня холестерина крови, при сердечнососудистых заболеваниях, диабете и при опухолях²⁵.

Берберин также обладает противовоспалительным действием, хотя точный механизм его действия неизвестен. Недавно рядом исследователей было обнаружено, что механизм противовоспалительного действия берберина связан с метаболизмом циклооксигеназы-2 (COX-2), поскольку COX-2 играет ключевую роль в синтезе простагландинов, который усиливается при воспалении²⁶. Берберин использовался в качестве ингредиента в растворах некоторых глазных капель или в глазной мази, применяемых для лечения трахомы²⁷.

6. Использование берберина при расстройствах кожи

В патенте США No. 6440465 описываются содержащие берберин композиции для местного нанесения на кожу, включающие глюкозамин в смягчающей основе, для лечения псориаза²⁸. В заявке на патент США No. 20050158404 описывается пищевая продукт, диетическая добавка или фармацевтическая композиция, которая содержит витамин А, витамин Е, селен, витамин В6, цинк, хром и травяной источник берберина, для лечения акне в режиме перорального введения²⁹. В патенте США No. 6974799 описываются местные композиции, содержащие трипептид (N-пальмитоил-Gly-His-Lys) и тетрапептид (N-пальмитоил-Gly-Gln-Pro-Arg), для лечения видимых признаков старения, включающих морщины, складки и темные круги³⁰. Указанная композиция может содержать дополнительные ингредиенты, включающие берберин. В указанных изобретениях берберин включается в качестве одного из многих ингредиентов и его концентрация не указывается.

В заявке на патент No. 20040146539 описываются местные нутрицевтические композиции, способствующие похудению и обладающие омолаживающим действием, связанным с улучшением тонуса тела, которые использовались для лечения старения кожи, снижения морщин, при шелушении кожи, акне, розацеа и других кожных проблемах³¹. Композиция по настоящему изобретению включает антимикробные средства, выбранные из нескольких веществ, включающих берберин. В состав этих нутрицевтических композиций берберин включался как один из многих ингредиентов и его концентрация не указывалась. Был предложен крем с 10% содержанием *Mahonia aquifolium* (Relieva™, Apollo Pharmaceutical Canada Inc) для лечения псориаза³², который содержал 0,1% берберина.

Терапевтический эффект берберина при лечении розацеа и других расстройств кожи, связанных с покраснением лица, неизвестен. До настоящего времени не было прямых

доказательств, подтверждающих тот факт, что берберин может улучшать симптомы, возникающие при розацеа.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящее время имеется потребность в эффективной стратегии лечения розацеа и других аналогичных расстройств кожи, которая бы характеризовалась минимальными побочными эффектами. Настоящее изобретение относится к местным фармацевтическим композициям, которые эффективны и безопасны в случае их применения для лечения розацеа и других расстройств кожи, связанных с покраснением лица, таких как акне, себорейный дерматит, контактный дерматит и фотодерматит. В настоящем изобретении учитывается недостаточность на настоящий момент доступных местных фармацевтических композиций или исследуемых композиций, содержащих берберин в качестве одного из его компонентов, и устраняет этот недостаток.

Имеется ряд данных, полученных в исследованиях на животных и в клинических испытаниях на людях, относительно того, что берберин представляет собой активный лекарственный ингредиент, где использовался очищенный берберин или использовались композиции, содержащие травный экстракт, содержащий берберин. При лечении многих заболеваний, таких как бактериальные и грибные инфекции и сердечнососудистые заболевания, иногда достигалась статистически значимая эффективность берберина. Были также получены эффективные результаты в испытаниях композиций, содержащих обогащенный берберинном экстракт, при псориазе, хотя эффективность берберина при псориазе до сих пор не подтверждена. Эти результаты позволяют полагать, что берберин может действовать на молекулярные мишени и вызывать модификацию ряда молекулярных путей и клеточных функций, таких как описанные во вводной части в данной заявке на патент.

Фармакологические исследования большого числа фармацевтических соединений показали, что фармацевтически активное соединение должно присутствовать в организме или пораженных тканях в количестве, превышающем пороговые концентрации для данного лекарственного соединения, с тем чтобы достигался значимый биологический и фармакологический эффект, и, соответственно, также и терапевтический эффект, у субъекта, который проходит лечение. В травных медицинских препаратах, которые содержат экстракты одного или множества растений, присутствует множество активных лекарственных ингредиентов. В большинстве случаев, при лечении с использованием травных препаратов, вводимых в пероральном или местном режиме, отдельные лекарственные ингредиенты присутствуют в субпороговых концентрациях в организме или пораженных тканях того или иного субъекта, подлежащего лечению. Однако, несколько соединений из одного и того же растения или разных растений могут действовать на одну и ту же молекулярную мишень, или несколько соединений из одного и того же растения или разных растений могут действовать на разные молекулярные мишени в одном и том же биологическом пути. В результате, различные соединения, действующие в сочетании, вызывают значимый биологический и фармакологический ответ, а, в итоге, и терапевтический и ответ.

В том случае, когда травный фармацевтический препарат не вызывает терапевтического эффекта у субъекта, который проходит лечение, вероятно, что указанное фармакологически активное соединение, содержащееся в этом препарате, присутствует в слишком низкой концентрации в организме субъекта, и что, в этой связи, соединение, само по себе или в сочетании с другими, имеющимися в препарате соединениями, не способно вызвать значимый биологический и фармакологический эффект. Фактически, в растениях было идентифицировано множество важных

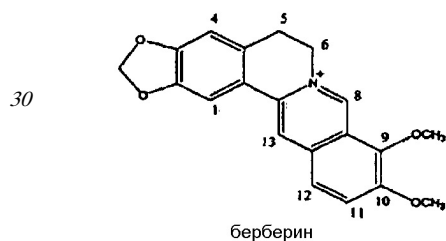
лекарственных соединений (отдельных химических веществ), которые используются в травяных препаратах. В случае использования таких чистых соединений, достигаемая терапевтическая эффективность зачастую превышает ту эффективность, которая наблюдалась в травяных препаратах, содержащих эти соединения.

5 Местные травяные фармацевтические композиции, которые включают обогащенные берберинотом растительные экстракты, использовались столетиями для лечения различных заболеваний, включающих множество кожных расстройств, таких как псориаз, акне, экзема и т.п. Однако результаты применения таких местных травяных препаратов во многом варьировали. В ряде таких препаратов содержащий берберин экстракт включает
10 примерно 10% различных компонентов, введенных в состав композиции. Было установлено, что берберинотое соединение в таких местных препаратах составляет примерно 0,1 вес.% от всей готовой композиции³².

На основе указанных выше данных, авторы предприняли исследование *in vitro* эффекта берберина в различных концентрациях на биологические пути, которые могут
15 вовлекаться в патогенез розацеа. На основании результатов и описанных выше данных, авторы разработали химически определенные местные фармацевтические композиции, которые содержат берберин в установленных процентных концентрациях, превышающих концентрации берберина в стандартных травяных фармацевтических композициях берберина. Авторы исследовали эффект полученных композиций на пораженных
20 участках кожи у пациентов с розацеа. Полученные результаты показали, что местные фармацевтические композиции, содержащие берберин в количестве выше 0,1 вес.%, действуют эффективно и хорошо переносятся при лечении пациентов с розацеа и родственными расстройствами кожи лица, склонной к покраснению.

Аналоги берберина

25 Структура берберина (5,6-дигидро-9,10-диметоксибензо(g)-1,3-бензодиоксоло (5,6-а) хинолизиния) показана ниже.



35 Может быть получено несколько протоберберинотых алкалоидов, которые обладают варьирующей биологической активностью, аналогичной берберину, такие как: ятрооризин, пальматин, коптизин, 9-деметилберберин, 9-деметилпальматин, 13-гидроберберин, берберрубин, пальматрубин, 9-О-этилберберрубин, 9-О-этил-13-этилберберрубин, N-метиловая соль 13-метилдигидроберберина,
40 тетрагидропротобербериноты и их N-метиловые соли, 13-гексилберберин, 13-гексилпальматин и 9-лауроилберберрубина хлорид^{33,34}.

Пальматин присутствует в растениях, относящихся к различным семействам, и в особенно заметных в количествах в корневищах *Fibrarurea Tinctoria Lour*. Пальматин представляет собой изохинолиновый алкалоид и композиции, содержащие пальматин,
45 широко использовались в Китае для лечения гинекологических воспалений, бактериальной дизентерии, энтерита, инфекции дыхательных путей и инфекции мочевых путей. Дополнительно, пальматин обладает антиаритмической функцией, является антисептиком, обладает бактериостатической и противовирусной активностью.

Пальматин может также использоваться в качестве соединения, полезного при скрининге противоопухолевых лекарственных средств³⁵. Была также описана фармацевтическая композиция, содержащая пальматин, которая использовалась как местно наносимый ингибитор роста волос (Keramene, Divine Skin Solutions D S Laboratories Keramene Body Hair Minimizer).

Коптизин представляет собой алкалоид, обнаруженный в растениях коптиса трехлистного китайского (*Coptis chinensis*). Он использовался в китайской травной медицине вместе с родственным бербериновым соединением для лечения расстройств пищеварительного тракта, вызванных бактериальными инфекциями. Коптизин также оказывает некоторое значимое ингибирующее воздействие на рост опухоли. Как было показано *in vitro*, коптизин оказывает цитотоксический эффект на клеточную линию опухолевых клеток толстой кишки человека³⁶, клеточную линию клеток гепатомы человека и лейкозные клеточные линии³⁷.

В исследованиях, проведенных авторами, были изучены *in vitro* и *in vivo* эффекты разных концентраций пальматина и коптизина на биологические пути, которые могут вовлекаться в патогенез розацеа. На основании полученных результатов и описанных выше данных, авторы также разработали химические определенные местные фармацевтические композиции, которые содержат пальматин или коптизин в установленных концентрациях. Указанные композиции могли давать эффективные и хорошо переносимые пациентами результаты при лечении розацеа и аналогичных расстройств, связанных со склонностью кожи лица к покраснению.

Пример 1: Эффекты берберина на ингибирование секреции кератиноцитами человека цитокина, индуцированной кателицидиновыми пептидами (тест *in vitro*)

В проведенном *in vitro* исследовании берберин (Sigma, St. Louis, MO, USA) растворяли в воде, метаноле, этаноле или диметилсульфоксиде (ДМСО). Нормальные кератиноциты человека (Invitrogen, CA, USA) растили в среде EpiLife (Invitrogen, CA, USA) с добавкой 0,06 мМ Ca⁺², 1% ростовой добавки EpiLife и 1% пенициллина/стрептомицина (Invitrogen, CA, USA). Клетки растили при температуре 37°C в увлажненной атмосфере с содержанием 5% CO₂ и 95% воздуха. Человеческие кератиноциты культивировали до слияния и обрабатывали синтетическими кателицидиновыми пептидами (LL-37) (6,4 мкМ) в течение 16 часов для индукции воспалительного ответа, аналогичного ответам, наблюдаемым при розацеа. Некоторые из культур кератиноцитов, обработанных кателицидином, инкубировали с берберином в концентрациях от 1,25 мкг/мл до 12,5 мкг/мл. Культуры кератиноцитов, обработанные кателицидином или кателицидином с 1% этанолом, а также не обработанные берберином, использовались в качестве отрицательных контролей. Супернатанты собирали и помещали в стерильные лунки 96-луночного планшета для проведения, в рамках ИФТФА, анализа интерлейкина-8 (IL-8), интерлейкина-1-альфа (IL-1 alpha) и фактора роста венозных эпителиальных клеток (VEGF), согласно инструкциям производителя (R&D Systems, MN, USA).

В результате было показано, что кателицидин может индуцировать высвобождение IL-8, IL-1 альфа и VEGF из культивируемых кератиноцитов человека. Ингибирующий эффект берберина на высвобождение IL-8 (фиг. 1А), IL-1 альфа (фиг. 1В) и VEGF (фиг. 1С) исследовали при добавлении в культуральную среду различных концентраций (0~12,5 мкг/мл) берберина. Отмечалось снижение высвобождения IL-8, IL-1 альфа и VEGF на 31,4%, 24,9% и 29,1%, соответственно, когда стимулированные кателицидином кератиноциты обрабатывали берберином в концентрации 1,25 мкг/мл, в сравнении с вариантом обработки кателицидиновым пептидом вместе с 1% этанолом, исследованным

в качестве контроля ($P < 0,05$). Эти результаты показали, что берберин может в значительной мере ингибировать индуцируемый кателицидином воспалительный ответ в дозозависимом режиме, когда концентрация берберина была выше, чем 6,25 мкг/мл, указывая на то, что берберин обладает противовоспалительной активностью, направленной против индуцированного кателицидином высвобождения цитокинов, связанного с развитием розацеа.

Пример 2: Получение местных фармацевтических композиций, содержащих очищенный берберин и пальматин в установленных процентных концентрациях

На основании описанных выше данных, были получены местные фармацевтические композиции, содержащие берберин, по настоящему изобретению, которые содержали одну ключевую особенность: они включали очищенный берберин в установленных процентных концентрациях, где указанные концентрации превышали те концентрации, которые достигались в стандартных, использовавшихся ранее композициях с применением экстрактов растений, обогащенных берберином. Исследовали разные концентрации, взятые в определенном диапазоне, на животных моделях и в клинических испытаниях на человеке.

Для проведения исследований на моделях животных и в испытаниях на людях, согласно настоящему изобретению, очищенный берберин растворяли в 100% этаноле и затем добавляли воду до достижения желательной концентрации берберина в готовом растворе. В случае гелевой композиции, берберин, например, в 0,1% или 0,2% концентрации, вносили в 10% этанол. Раствор или гелевую композицию закрывали колпачком и хранили при температуре 4°C до употребления. Результаты исследования авторов на моделях животных и в испытаниях на людях с розацеа показывают, что концентрация берберина в композициях должна составлять 0,1% или выше, для того, чтобы достигались стабильные удовлетворительные результаты. Причем, эти концентрации превышают те концентрации, которые имелись в местных композициях, содержащих берберин, изготавливаемых с использованием обогащенного берберином растительного экстракта.

В настоящее время проводятся эксперименты по изготовлению композиций в форме мазей, гелей, кремов, лосьонов или распыляемых средств, которые бы в большей мере подходили для их применения в клинических условиях пациентами. В местных фармацевтических композициях по настоящему изобретению, берберин или биологически эквивалентный аналог берберина (например, пальматин и коптизин) представляет собой единственное или главное активное лекарственное соединение. Очищенный пальматин, использованный в исследованиях авторов настоящего изобретения, растворяли в 100% воде и затем разбавляли, так чтобы в готовом растворе или готовой гелевой композиции достигались установленные концентрации пальматина, составляющие, например, 0,02%, 0,1% или 0,2%.

Однако, улучшенные или модифицированные композиции могут содержать дополнительные ингредиенты, вводимые с целью повышения растворимости берберина или его аналога, для улучшения эмульгирующих, скользящих свойств, антибиотической активности или гидратации.

Один из предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения связан с повышением растворимости берберина или биологически эквивалентного аналога берберина и включает добавление глицерина в композицию. Один вариант осуществления настоящего изобретения относится к повышению антибиотической активности композиции и связан с добавлением растительного экстракта, который, по известным данным, обладает антибиотической активностью. Один вариант

осуществления настоящего изобретения связан с повышением гидратирующих свойств местной композиции по настоящему изобретению и включает добавление гиалуроновой кислоты.

Пример 3: Эффекты местного фармацевтического препарата по настоящему изобретению на модель розацеа на мышах

Животная модель розацеа: животная модель розацеа была адаптирована из предшествующих исследований¹⁸. В общих чертах, эксперимент состоял в том, что мышей BALB/c и C57BL/6 брили за 24 часа до эксперимента и дважды в день инъецировали им подкожно в спину 40 мкл кателицидинового пептида (320 мкМ). Через сорок восемь часов после первичной инъекции (всего после четырех инъекций) в месте инъекции отмечались эритема и отек, имитирующие клинические признаки розацеа.

В проведенных авторами экспериментах мышей, которым инъецировали кателицидин, обрабатывали местной композицией берберина два раза в день или не обрабатывали этой композицией, для оценки эффекта берберина по снижению воспаления. Полученные результаты показали, что у мышей, которым проводили подкожные инъекции кателицидиновых пептидов, через 48 часов развивалась эритема и сосудистая дилатация на коже, которые были похожи на клинические признаки розацеа. Мышей после инъекции кателицидина разделили на две группы, где в одном из групп животным вводили берберин (n=3), а в другой группе не вводили берберин (n=3; контроли), соответственно, в течение следующих 2 дней. Местную композицию, содержащую 0,1% берберина, наносили на индуцированные кателицидином поражения кожи 2 раза в день. Эритематозные или воспалительные поражения длились более 7 дней в контрольной группе. На 4-ый день эритема и расширение сосудов были существенно снижены в группе лечения берберином, в сравнении с контролем. Эти результаты показали, что местное внесение берберина может снижать воспалительную реакцию, индуцированную кателицидином *in vivo*.

Пример 4: Клиническое испытание на людях, проведенное с целью оценки эффективности местных фармацевтических композиций по настоящему изобретению у пациентов с розацеа

Метод: Клиническое испытание с открытой меткой проводили с целью оценки эффективности местных композиций берберина по настоящему изобретению по лечению розацеа и родственных кожных расстройств. Пациенты, включенные в данное испытание, были диагностированы дерматологами как имеющие клинически определенное проявление розацеа. Всем пациентам давали 0,1% бербериновый гель два раза в день в течение 6 недель. В определенные временные точки после начала лечения и через 2 недели и 6 недель после окончания лечения пациентов осматривали на наличие симптомов розацеа. Пациентам не разрешалось использовать другие лекарственные средства, включающие антибиотики, применяемые при таких кожных расстройствах. Были разрешены лишь пероральные антигистаминные препараты для облегчения симптомов зуда.

Для оценки эффективности лечения использовалась стандартная система ранжирования симптомов розацеа, разработанная Национальным Экспертным Комитетом по исследованию розацеа (National Rosacea Society Expert Committee on the Classification and Staging of Rosacea)³. Дополнительно, использовались такие параметры, как общая оценка исследователем (IGA) и общая оценка тяжести эритемы у пациентов по балльной системе в следующих временных точках: 0 недель, 2 недели и 6 недель, в ходе бербериновой терапии. Показатель IGA выражали по 7-балльной системе с варьированием баллов от 0 (чистая кожа) до 6 (тяжелое состояние). Тяжесть общей

эритемы лица и телангиэктазии, соответственно, ранжировали с использованием таких терминов, как «отсутствие», «слабая», «умеренная» или «тяжелая», которым соответствовали баллы от 0 до 3. Система ранжирования, использованная для оценки тяжести общей эритемы кожи лица, была описана ранее³⁸.

5 Результаты: в данное исследование было включено в целом 20 пациентов с розацеа (18 женщин и 2 мужчин). Средний возраст в исследуемой популяции составлял 43,3 (19-85) лет. Средняя длительность розацеа до лечения берберином составляла 4 (1-24) лет. Среди 20 пациентов с розацеа, имелись 13 случаев эритематотелангиэктатического типа (65%), 7 случаев папулопустулярного типа (35%) и 5 случаев (25%) фиматозного типа.

10 Согласно 7-значной системе ранжирования, IGA балл по оценке розацеа на базовом уровне (начало лечения) составлял $4,1 \pm 1,3$. Указанный параметр снизился до $2,6 \pm 0,9$ на 2 неделе и затем достиг значения $1,6 \pm 0,8$ к 6 неделе. Различия в баллах IGA между неделями 0, недель 2 и недель 6 были статистически значимыми (W2 против W0: парный тест Стьюдента $P < 0,0001$; W6 против W0: парный тест Стьюдента $P < 0,0001$). В начале лечения тяжесть состояния большинства пациентов (95%) оценивалась от «слабой» до «умеренной» (3) и до «тяжелой» (6). К концу лечения 19 из 20 пациентов (95%) характеризовались показателем тяжести от «слабой» (2) до состояния «чистая кожа» (0).

20 Общая тяжесть эритемы, оцениваемая исследователем, составляла $2,35 \pm 0,6$ в начале исследования, $1,5 \pm 0,5$ на 2 неделе и $0,95 \pm 0,4$ на 6 неделе. Улучшение на 2 неделе или 3 неделе было статистически значимым (W2 против W0: парный тест Стьюдента $P < 0,0001$; W6 против W0: парный тест Стьюдента $P < 0,0001$). В начале лечения, выраженность эритемы у большинства пациентов (95%) варьировала от «умеренной» (2) до «тяжелой» (3). К концу лечения 19 из 20 пациентов (95%) характеризовались эритемой в степени от «слабой» (1) до ее «отсутствия» (0).

Безопасность и переносимость: не наблюдалось серьезных побочных эффектов в ходе испытания. Лишь в 2 случаях (10%) отмечались ощущения покалывания в области нанесения местного препарата, но все они проходили без прерывания испытания.

30 Пример 5: Местная композиция берберина была эффективна для лечения индуцированного стероидом розацеа-подобного дерматита и акнеформного дерматита, индуцированного ингибиторами EGFR

40 Авторы исследовали также гель, содержащий 0,1% берберина, в режиме его введения дважды в день в течение 6 недель, на 10 пациентах с розацеа-подобным дерматитом, индуцированным стероидом, и на 5 пациентов с акнеформным дерматитом, индуцированным ингибитором EGFR. Все 15 пациентов демонстрировали улучшение симптомов заболевания и хорошо переносили местное лечение, как это было видно по признакам розацеа.

Пример 6: Пальматин продемонстрировал эффективность при лечении розацеа или расстройств, связанных с покраснением лица

45 Авторы также исследовали местную композицию, содержащую пальматин в концентрации 0,02 вес.%, на 10 пациентах с розацеа и родственными расстройствами, связанными с покраснением лица. Все 10 пациентов демонстрировали улучшение по симптомам заболевания и хорошо переносили местное лечение, как это отмечалось в ситуации с берберином.

Выводы, сделанные по результатам описанных примеров:

Исследования с использованием культуры *in vitro*, показали, что берберин оказывает противовоспалительный эффект за счет ингибирования индуцированной кателицидином продукции IL-8, IL-1 альфа и VEGF человеческими кератиноцитами. Поскольку

воспаление вовлекается в патогенез розацеа и родственных расстройств кожи, противовоспалительный эффект берберина может отвечать за клинически значимые благоприятные эффекты при розацеа и родственных воспалительных кожных расстройствах.

5 Результаты проведенных авторами клинических испытаний показали, что местные фармацевтические композиции по настоящему изобретению, содержащие очищенный берберин в концентрации более чем 0,1% или пальматин в концентрации более чем 0,02%, могут быть эффективными, безопасными и хорошо переноситься пациентами при лечении розацеа и родственных расстройств, связанных с покраснением кожи, таких как акне, контактный дерматит, себорейный дерматит и фотодерматит, розацеа-подобный дерматит, индуцированный стероидами, и акнеформный дерматит, индуцированный ингибиторами EGFR.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

15 Фиг. 1. Берберин ингибировал индуцированное кателицидиновым пептидом (LL-37) высвобождение IL-8, IL-1 альфа и VEGF из человеческих кератиноцитов. Кератиноциты стимулировали кателицидиновым пептидом (LL-37) и высвобождение IL-8 (фиг. 1А), IL-1 альфа (фиг. 1В) и VEGF (фиг. 1С) кератиноцитами исследовали по методу ИФТФА.

20 Фиг. 2. А. Общая оценка исследователем, проведенная в начале лечения берберинном и на 2 неделе и 6 неделе лечения, в соответствии с системой ранжирования. В. Общая балльная оценка тяжести эритемы в начале лечения местным препаратом берберина и на 2 неделе и 6 неделе после начала лечения.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

25

30

35

40

45

1. Plewig G, Jansen T. Rosacea. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, et al., eds. *Dermatology in General Medicine*. 6th ed. New York, NY: McGraw-Hill Health Professions Division (2003) pp.688-696.

5 2. Lonne-Rahm SB, Fischer T, Berg M. Stinging and rosacea. *Acta Derm Venereol* 1999; 79:460-461.

3. Wilkin J, Dahl M, Detmar M, et al. Standard grading system for rosacea: report of the National Rosacea Society Expert Committee on the Classification and Staging of Rosacea. *J Am Acad Dermatol* 2004; 50:907-912.

10 4. Griffiths WA. The red face-an overview and delineation of the MARSH syndrome. *Clin Exp Dermatol*. 1999; 24:42-47.

5. Draelos ZD. Assessment of skin barrier function in rosacea patients with a novel 1% metronidazole gel. *J Drugs Dermatol*. 2005; 4:557-562.

15 6. Chen AY, Zirwas MJ. Steroid-induced rosacealike dermatitis: case report and review of the literature. *Cutis*. 2009 83(4):198-204.

7. Lee DH, Li K, Suh DH. Pimecrolimus 1% cream for the treatment of steroid-induced rosacea: an 8-week split-face clinical trial. *Br J Dermatol*. 2008;158(5):1069-76.

20 8. Wollenberg A, Kroth J, Hauschild A, Dirschka T. Cutaneous side effects of EGFR inhibitors--appearance and management. *Dtsch Med Wochenschr*. 2010;135(4):149-54.

9. Lacouture ME, Maitland ML, Segaert S, et al. A proposed EGFR inhibitor dermatologic adverse event-specific grading scale from the MASCC skin toxicity study group. *Support Care Cancer*. 2010;18(4):509-22.

25 10. Palleschi GM, Torchia D. Rosacea in a monozygotic twin. *Australas J Dermatol*. 2007; 48:132-133.

30 11. Yazici AC, Tamer L, Ikizoglu G, Kaya TI, Api H, Yildirim H, Adiguzel A. GSTM1 and GSTT1 null genotypes as possible heritable factors of rosacea. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2006; 22:208-210.

12. Jansen T, Plewig G. Rosacea: classification and treatment. *J R Soc Med*. 1997; 90:144-150.

13. Wilkin JK. Rosacea. Pathophysiology and treatment. *Arch Dermatol*. 1994; 130:359-362.

35 14. Forton F, Seys B: density of *Demodex folliculorum* in rosacea: A case- control study using standardized skin-surface biopsy. *Br J Dermatol*. 1993; 128:650.

15. Yamasaki K, Di Nardo A, Bardan A, Murakami M, Ohtake T, Coda A, Dorschner RA, Bonnart C, Descargues P, Hovnanian A, Morhenn VB, Gallo RL. Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea. *Nat Med*. 2007; 13:975-980.

40 16. Zuyderduyn S, Ninaber DK, Hiemstra PS, Rabe KF. The antimicrobial peptide LL-37

enhances IL-8 release by human airway smooth muscle cells. *Allergy Clin Immunol.* 2006; 117:1328-1335.

5 17. Afonso AA, Sobrin L, Monroy DC, Selzer M, Lokeshwar B, Pflugfelder SC. Tear fluid gelatinase B activity correlates with IL-1alpha concentration and fluorescein clearance in ocular rosacea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999; 40:2506-2512.

18. Pu LL, Smith PD, Payne WG, Kuhn MA, Wang X, Ko F, Robson MC. Overexpression of transforming growth factor beta-2 and its receptor in rhinophyma: an alternative mechanism of pathobiology. *Ann Plast Surg.* 2000; 45:515-519.

10 19. Guarrera M, Parodi A, Cipriani C, et al. Flushing in rosacea: a possible mechanism. *Arch Dermatol Res.* 1982; 272:311-316.

20. Smith JR, Lanier VB, Braziel RM, Falkenhagen KM, White C, Rosenbaum JT. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rosacea. *Br J Ophthalmol.* 2007; 91:226-229.

15 21. McDonnell JK, Tomecki KJ. Rosacea: an update. *Clev Clinic J Med.* 2000; 67:587-590.

22. Gupta AK, Gover MD. Azelaic acid (15% gel) in the treatment of acne rosacea. *Int J Dermatol.* 2007; 46:533-538.

20 23. Berberine (2000). *Altern Med Rev.* 5:175-177

24. Yu HH, Kim KJ, Cha JD, et al. Antimicrobial activity of berberine alone and in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Food.* 2005; 8:454-461.

25 25. Mantena SK, Sharma SD, Katiyar SK. Berberine, a natural product, induces G1-phase cell cycle arrest and caspase-3-dependent apoptosis in human prostate carcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.* 2006; 5:296-308.

26. Kuo CL, Chi CW, Liu TY. The anti-inflammatory potential of berberine *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Lett.* 2004; 203:127-137.

30 27. Khosla PK, Neeraj VI, Gupta SK, Satpathy G. Berberine, a potential drug for trachoma. *Rev Int Trach Pathol Ocul Trop Subtrop Sante Publique.* 1992; 69:147-65.

28. Meisner; Lorraine Faxon. Topical composition for the treatment of psoriasis and related skin disorders. United States Patent 6440465 (2002).

35 29. Goodless, Dean R. Composition and method for treatment of acne. United States Patent Application 20050158404 (2005).

30. Lintner; Karl. Compositions containing mixtures of tetrapeptides and tripeptides. United States Patent 6974799 (2005).

40 31. Gupta, Shyam K. Topical nutraceutical compositions with selective body slimming and tone firming antiaging benefits. United States Patent Application 20040146539 (2004).

32. Gulliver WP, Donsky HJ. A report on three recent clinical trials using *Mahonia aquifolium* 10% topical cream and a review of the worldwide clinical experience with *Mahonia aquifolium* for the treatment of plaque psoriasis. *Am J Ther.* 2005; 12:398-406.

33. Iwasa K, et al. Fungicidal and herbicidal activities of berberine related alkaloids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2000; 64:1998-2000.

34. Iwasa K, Nanba H, Lee DU, Kang SI. Structure-activity relationships of protoberberines having antimicrobial activity. *Planta Med.* 1998; 64:748-751.

35. Prabal Giri, Maidul Hossain and Gopinatha Suresh Kumar. RNA specific molecules: Cytotoxic plant alkaloid palmatine binds strongly to poly(A). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2006; 16:2364-2368 .

36. Colombo M.L. et al. Cytotoxicity evaluation of natural coptisine and synthesis of coptisine from Berberine. *Farmaco* 2001; 56:403-409.

37. Chun-Ching Lin et al. Cytotoxic effects of *Coptis chinensis* and *Epimedium sagittatum* extracts and their major constituents (berberine, coptisine and icariin) on hepatoma and leukaemia cell growth. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2004; 31:65-69.

38. Thiboutot D, Thieroff-Ekerdt R, Graupe K. Efficacy and safety of azelaic acid (15%) gel as a new treatment for papulopustular rosacea: results from two vehicle-controlled, randomized phase III studies. *J Am Acad Dermatol* 2003; 48:836–845.

(57) Формула изобретения

1. Местная фармацевтическая композиция для лечения акнеформного дерматита, индуцированного ингибиторами EGFR, содержащая по меньшей мере 0,02% берберина или биологически эквивалентного аналога берберина, такого как пальматин, и компонент, выбранный из группы, состоящей из воды, метанола, этанола и диметилсульфоксида,

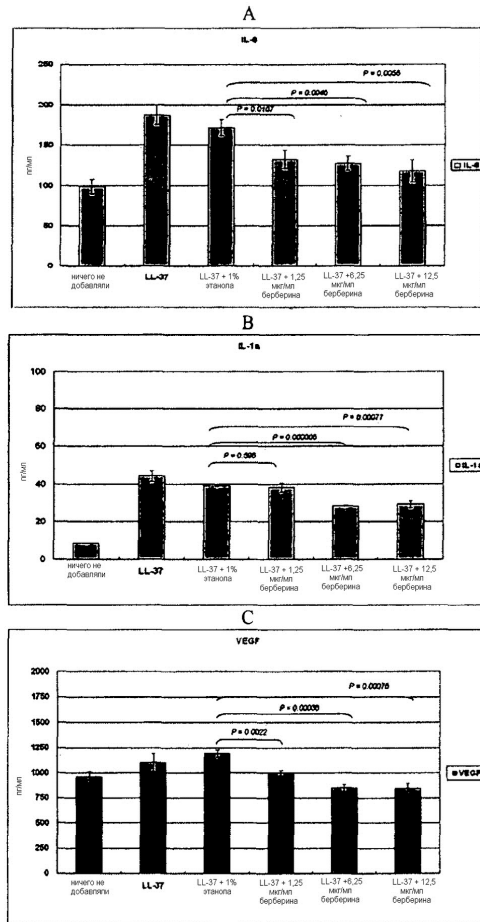
где берберин или биологически эквивалентный аналог берберина представляет собой основной фармацевтически активный компонент.

2. Местная фармацевтическая композиция по п. 1, где концентрация берберина или биологически эквивалентного аналога берберина составляет от приблизительно 0,05 вес.% до приблизительно 2 вес.%.

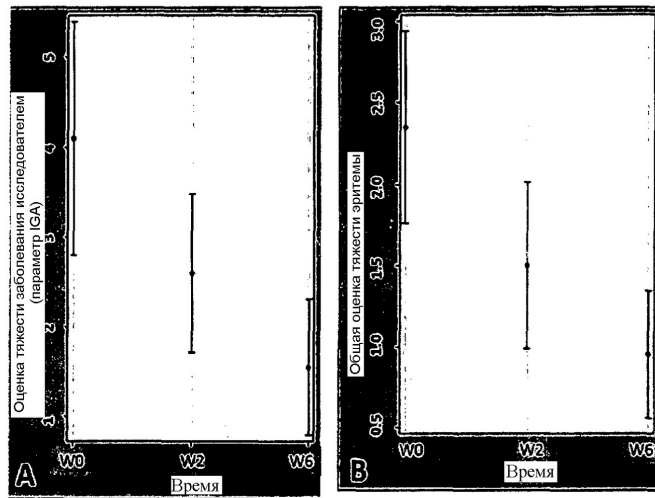
3. Способ лечения акнеформного дерматита, индуцированного ингибиторами EGFR, включающий местное нанесение на пораженную кожу терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере 0,02 вес.% берберина или его биологически эквивалентного аналога, такого как пальматин, и компонент, выбранный из группы, состоящей из воды, метанола, этанола и диметилсульфоксида, где берберин или биологически эквивалентный аналог берберина представляет собой основной фармацевтически активный компонент.

4. Способ по п. 3, где фармацевтическая композиция содержит от приблизительно 0,05 вес.% до приблизительно 2 вес.% берберина или биологически эквивалентного аналога берберина.

1/2



Фиг. 1



Фиг.2