(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202192435 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.02.15

(22) Дата подачи заявки
2020.03.06

(51) Int. Cl. *A61K 41/00* (2020.01)
A61P 17/00 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ МЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ, СОДЕРЖАЩИЕ ФТАЛОЦИАНИНОВЫЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРЫ

(31) **102019000003247**
(32) **2019.03.06**
(33) **IT**
(86) **PCT/IB2020/051945**
(87) **WO 2020/178791 2020.09.10**

(71) Заявитель:
МОЛЬТЕНИ ТЕРАПЬЮТИКС С.Р.Л. (IT)

(72) Изобретатель:
Ронкуччи Габрио, Фантетти Лиа, Кокки Аннализа, Муникки Мойра, Джулиани Франческо, Тампуччи Сильвиа, Монти Даньела, Кити Джакомо (IT)

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

(57) Настоящее изобретение описывает композиции для местного применения для использования в фотодинамической терапии (ФДТ; англ. PDT) поражений кожи, причём указанные композиции содержат производное Zn-фталоцианина.

202192435 A1

202192435 A1

КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ МЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ, СОДЕРЖАЩИЕ ФТАЛОЦИАНИНОВЫЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРЫ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области композиций для местного применения, содержащих фталоцианиновые фотосенсибилизаторы. В частности, оно относится к композициям, содержащим производные фталоцианина цинка (Zn-фталоцианина), полезные для местной терапии локализованных поражений кожи и слизистых оболочек, в том числе микробного происхождения.

Уровень техники

Известно, что молекулы, содержащие макроцикл фталоцианинового хромофторфора, продуцируют активные формы кислорода (АФК; *англ.* ROS), такие как радикалы или синглетный кислород, после поглощения светового излучения, в частности, видимого света. Благодаря этим свойствам, фталоцианиновые соединения могут возбуждаться под действием излучений, способных проникать в ткани и, как следствие, гарантировать генерирование АФК *in situ*, а не только в поверхностных слоях кожи или слизистой оболочки, что позволяет лечить патологии, которые не носят исключительно поверхностный характер, и с некоторых пор было предложено использовать эти соединения в фотодинамической терапии (далее по тексту обозначается аббревиатурой ФДТ; *англ.* PDT) для терапевтического лечения, а также для диагностических целей.

Примеры таких соединений описаны Ogura *et al.* в *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2006, 10, 1116-1124.

Фотосенсибилизирующими агентами, полезными для использования в ФДТ, являются, например, комплексы фталоцианина с цинком и их конъюгаты, описанные в патенте EP 906 758 (на имя Заявителя).

Кроме того, в EP 1 444 236 и EP 1 883 640 (оба на имя Заявителя) описаны, соответственно, способ разделения региоизомерных смесей и способ получения хлоридов фталоцианиновых комплексов.

Соединения, описанные и полученные в соответствии с вышеуказанными способами, доказали свою эффективность в качестве фотосенсибилизирующих агентов при лечении методом ФДТ, инактивации опухолевых клеток и, следовательно, свою потенциальную пригодность в качестве противоопухолевых средств при раковых или предраковых поражениях участков тела, к которым можно доставить источник светового излучения, а также против патогенов, способных поддерживать микробные инфекции: в частности, продукт [1,8(11),15(18),22(25)-тетракис-(3-N,N,N-триметиламмониофенокси)]

фталоцианината цинка тетрахлорид (RLP068), согласно примеру 53 документа EP 906 758, оказался особенно активным и обладает полезными свойствами для освоения в промышленном масштабе. Документ WO2011/012698 (также на имя Заявителя) описывает хроматографический метод очистки вышеуказанного продукта с целью получения продукта с приемлемой степенью чистоты для клинического использования посредством практически осуществимой и масштабируемой процедуры на уровне стандартного промышленного производства.

Вышеупомянутые молекулы фталоцианина имеют сложную макроциклическую структуру, в которой наличие цинка как металла, координируемого макроциклом, и гидрофильных периферийных заместителей (катионной природы), присутствующих на макроцикле, определяют их амфифильную природу благодаря наличию в основном гидрофобного центрального ядра и ряда периферийных гидрофильных заместителей.

Известно, что композиция с фотосенсибилизирующими агентами на основе Zn-фталоцианина из-за амфифильной природы вышеупомянутых молекул представляет собой проблему в том смысле, что смеси комплекса со многими солюбилизирующими агентами не демонстрируют значительного проникновения в кожу или склонны к образованию агрегатов в силу плоской (планарной) структуры в виде комплексов (Lenznoff C.C. *et al.*, *Photochem. Photobiol.* **49**, 279 (1989)). Последнее явление вызывает потерю фотосенсибилизирующих свойств, обусловленную внутренним процессом переноса энергии, и в конечном итоге долгосрочную нестабильность самой композиции, что препятствует её коммерческой разработке.

EP0720853 описывает композицию для местного применения, содержащую:

(A) Zn-фталоцианин,

(B) в качестве вспомогательных веществ для композиции (A):

(i) моноалкиловый эфир диэтиленгликоля, по существу, в отсутствии N-алкилпирролидона, N, N-диалкилбензамида или диметилсульфоксида, либо

(ii) смесь моноалкилового эфира диэтиленгликоля с липидом; и

(C) гелеобразующий агент.

Simonetti *et al.* (British J. Dermatology 2011, 164(5), 987-995) описали композицию в виде геля для местного применения, содержащего RLP068/Cl (в различных концентрациях: 0,01%, 0,1%, 0,3% и 0,5%), смесь спиртов, загущённую соответствующей концентрацией полимера карбоксиметилцеллюлозы.

Цель настоящего изобретения заключается в том, чтобы предложить улучшенную композицию для местного применения, содержащую фотосенсибилизатор на основе фталоцианина цинка, предпочтительно с гидрофильными заместителями и, в частности,

катионной природы. Эта композиция должна обеспечивать проникновение фотосенсибилизатора в эпидермис, где чаще всего локализуются поражения кожи, однако без повреждения дермы во избежание попадания его в системный кровоток и, как следствие, нежелательного всасывания. Целью настоящего изобретения является также получение стабильной во времени композиции.

Краткое описание сущности изобретения

Предметом настоящего изобретения является композиция, подходящая для местного применения, содержащая или состоящая из:

(a) производного Zn-фталоцианина в качестве фотосенсибилизирующего агента;

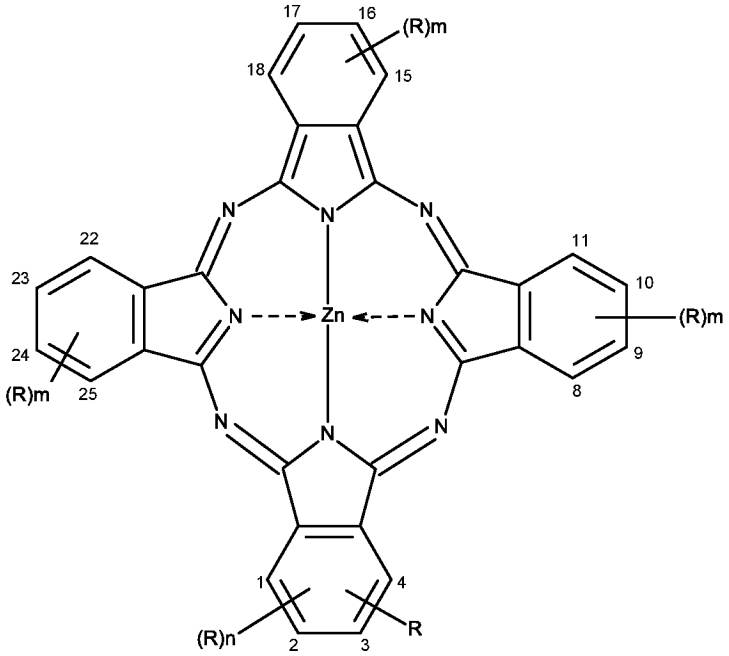
(b) моноалкилового эфира диэтиленгликоля в качестве промотора проникновения в кожу, содержащегося в количестве от 3 до 35% (мас/мас);

(c) растворителя, выбранного из группы, включающей пропиленгликоль и полиэтиленгликоль с различными молекулярными массами;

(d) необязательно, сопромотора проникновения в кожу, выбранного из группы, включающей EtOH и iPrOH;

(e) агента, регулирующего вязкость, выбранного из группы, включающей гидроксипропилцеллюлозу (HPC), гидроксиметилпропилцеллюлозу (HMPC), поливиниловый спирт (PVA), карбоксиметилцеллюлозу (CMC);

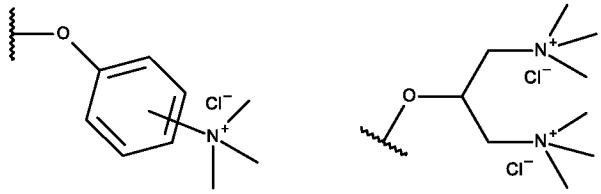
в которой указанное производное Zn-фталоцианина (a) имеет формулу (I)



… (I),

где:

R представляет собой



или ;

n = 0, 1 и m =0, 1, 2, при этом, если n = 0, то m = 0, 1; если n = 1, то m = 0, 2.

Предметом настоящего изобретения является неводная композиция, подходящая для местного и наружного применения и потому полезная для местной терапии поражений кожи и слизистых оболочек.

Композиция по настоящему изобретению обеспечивает проникновение фотосенсибилизатора в эпидермис, предпочтительно локализующийся в поверхностных слоях кожи, с незначительным проникновением в дерму, благодаря чему предупреждается системное действие фотосенсибилизатора или продуктов фоторазложения фталоцианинового продукта после облучения. Хорошо известно, что многие производные с такой химической структурой подвергаются процессу фоторазложения (фотообесцвечивания) после облучения даже видимым светом, что приводит к фрагментации макроциклического кольца фотосенсибилизатора.

Настоящая композиция имеет также очень низкую токсичность вследствие отсутствия в ней консервантов, стабилизаторов и продуктов, которые (хотя они широко используются в композициях для местного применения в качестве промоторов проникновения, в том числе и в косметологии) продемонстрировали в данном контексте нежелательную локализованную токсичность, такие как масло чайного дерева (TTO), (±)-α-бисаболол (BIS) и изопропилмиристат (MYR).

Настоящая композиция также стабильна во времени

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится также к способу получения вышеуказанной композиции.

Подробное описание изобретения

Композиция по настоящему изобретению предпочтительно находится в виде неводного прозрачного геля.

В некоторых случаях композиция может быть стерильной, что достигается с помощью ряда известных способов, подходящих для стерилизации композиций, как более подробно описано ниже. Тот факт, что композиция является прозрачной, а не корпускулярной или состоящей из эмульсии, обуславливает оптимальное пропускание видимого света при соответствующей терапевтической длине волны. Тот факт, что композиция является неводной, делает её средой, не подверженной загрязнению и росту

микроорганизмов, и, как предполагается, такая композиция также может быть стерилизованной.

Предпочтительно композиция, являющаяся предметом настоящего изобретения, имеет вязкость в диапазоне от 25 до 190000 сП: в некоторых вариантах осуществления изобретения вязкость составляет от 25 до 65 сП, в других вариантах осуществления вязкость составляет от 50000 до 190000 сП (где сП означает сантипуаз). Указанная вязкость определяется с помощью капиллярного (диапазон измерения от 25 до 65 сП) или ротационного (диапазон измерения от 50000 до 190000 сП) вискозиметров. Композиции с вязкостью от 25 до 65 сП являются жидкими композициями, полезными для лечения поражений кожи, характеризующихся глубокими повреждениями, в которых композиция может растекаться; композиции с вязкостью от 50000 до 190000 сП являются полутвёрдыми композициями, полезными для лечения поражений кожи, характеризующихся поверхностными повреждениями, на которых композиция может оставаться без растекания.

Композиция по настоящему изобретению предпочтительно не содержит

- других промоторов проникновения в кожу, в частности не содержит эфирного масла чайного дерева (TTO), (±)-α-бисаболола (BIS) и изопропилмиристата (MYR);
- консервантов, в частности не содержит смесей парабенов и/или феноксиэтанола;
- стабилизаторов, в частности не содержит альфа-токоферола ацетата (витамин Е).

TTO (масло чайного дерева), помимо того, что оно является известным промотором проникновения в кожу, обладает также выраженной противомикробной и противогрибковой активностью и, следовательно, его применение в композиции должно бы приводить к синергетическому взаимодействию с такой же терапевтической активностью фотосенсибилизатора.

Вместо этого, неожиданно было обнаружено, что присутствие TTO в композиции облегчает прохождение фотосенсибилизатора в системный кровоток, делая, тем самым, композицию по настоящему изобретению менее пригодной для местного локализованного применения, поэтому предпочтительно, чтобы композиция не содержала TTO. Дополнительная причина для исключения TTO связана с варьируемым составом компонентов, составляющих TTO. Поскольку TTO является натуральным продуктом, существует вероятность изменения состава продукта, а это вступает в противоречие с необходимостью строгой характеризации композиций для терапевтического применения.

(±)-α-Бисаболол (BIS) и изопропилмиристат (MYR) являются промоторами проникновения в кожу, но в случае настоящей композиции оказалось, что они вызывают нежелательные эффекты в отношении объекта по настоящему изобретению. В частности,

протестированные композиции, содержащие MYR, показали себя токсичными в тестах *in vivo*, явившись причиной кожных язв у экспериментальных животных, и поэтому присутствия этого/этих компонента/компонентов предпочтительно следует избегать.

Альфа-токоферол (витамин Е) часто включают в фармацевтические композиции для местного применения в качестве антиоксиданта. Витамин Е – это витамин, необходимый человеку, в организм которого он поступает вместе со специальным питанием. Благодаря своим мощным антиоксидантным и липофильным свойствам, витамин Е известен тем, что он защищает мембраны эпидермальных клеток и липиды от окислительного повреждения. Многочисленные исследования показали, что витамин Е при местном введении обладает способностью снижать как хронические, так и острые раздражения кожи, такие как эритема и отёк; этот эффект, вероятно, связан с процессом гашения синглетного кислорода и/или других активных радикалов кислорода, генерируемых эндогенно макрофагами при наличии воспалительных процессов.

Неожиданным образом было установлено, что в присутствии витамина Е в композициях, являющихся целью настоящего изобретения, не обнаруживается никакого эффекта, связанного с процессом гашения любых активных частиц, генерируемых в процессе фотодинамической терапии *in vivo*. В действительности, его полное исключение не увеличивает число хронических и острых раздражений кожи, таких как эритема и отек.

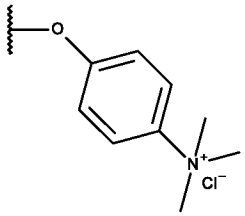
Кроме того, отсутствие витамина Е в композициях, являющихся предметом настоящего изобретения, не оказывает негативного влияния на показатели долгосрочной стабильности.

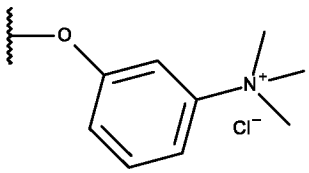
Таким образом, присутствие витамина Е в композиции является излишним и оправдывает стремление сделать состав композиции как можно более простым.

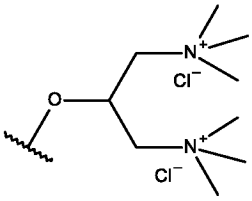
Фотосенсибилизатор (а) в композиции по настоящему изобретению предпочтительно является соединением формулы (I), где:

n = 0, m = 0 и

R, в положении 1 или 2, представляет собой



;


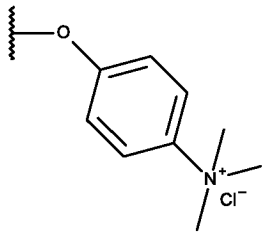
или


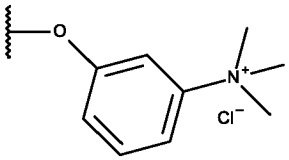
;

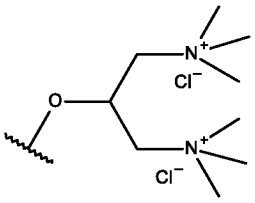
либо

n = 1, m = 0 и

R, в положениях 1,4 или 2,3, представляет собой



; 

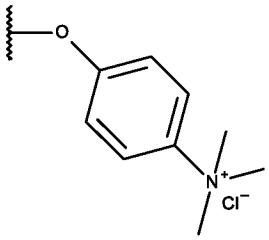
или 

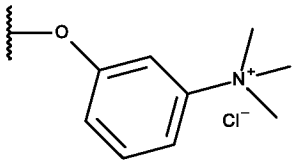
;

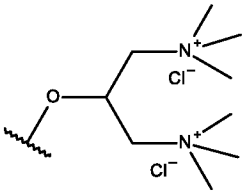
либо

n = 0, m = 1 и

R, в положениях 1,8(11),15(18),22(25) или 2,9(10)16(17),23(24), представляет собой



; 

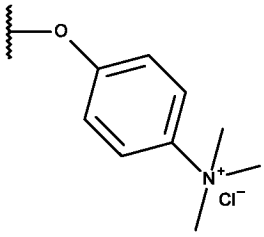
или 

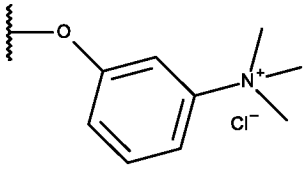
;

либо

n = 1, m = 2 и

R, в положениях 2,3,9,10,16,17,23,24, представляет собой



или 

.

В особенно предпочтительном варианте осуществления фотосенсибилизатор (а) в композиции по настоящему изобретению представляет собой 1,8(11),15(18),22(25)-тетра[3-(N,N,N-триметиламмоний)фенокси]фталоцианината цинка тетрахлорид (II) (в дальнейшем также обозначаемый как RLP068/Cl). В композиции по настоящему изобретению соединение RLP068/Cl предпочтительно присутствует в виде смеси позиционных изомеров, как описано в WO2011/012698, то есть четырёх позиционных изомеров, идентифицированных в соответствии с классами симметрии (D_{2h}, C_{4h}, C_s, C_{2v}), и обозначенных ниже соответственно буквами алфавита (A, B, C, D). Изомер B присутствует в количестве, равном 1 мас.% или менее.

Моноалкиловый эфир диэтиленгликоля обычно представляет собой алкиловый C_1-C_4 эфир указанного гликоля, например метиловый, этиловый, н-пропиловый, изопропиловый или н-бутиловый. Особенно предпочтительным моноалкиловым эфиром является этиловый эфир диэтиленгликоля. Поэтому композиция по настоящему изобретению предпочтительно содержит моноэтиловый эфир диэтиленгликоля [также

известный как 2-(2-этоксиэтокси)этанол] в качестве промотора проникновения в кожу (b). 2-(2-этоксиэтокси)этанол или Transcutol® P (торговое наименование) действует как растворитель для фотосенсибилизатора и как агент, способствующий проникновению фотосенсибилизатора в *stratum corneum* (роговой слой) кожи, не вызывая при этом системной доступности.

Transcutol® P (Транскутол) используется в течение многих лет в фармацевтической и косметической индустрии и поэтому считается продуктом с адекватной безопасностью для клинического использования.

Указанный растворитель, выбранный из группы, состоящей из пропиленгликоля и полиэтиленгликоля с различными молекулярными массами, имеет молекулярную массу от 200 до 600 г/моль. Предпочтительно композиция по настоящему изобретению содержит пропиленгликоль (PG) в качестве сорастворителя (c). Пропиленгликоль является главным компонентом композиции в одном из предпочтительных вариантов её воплощения, а также основным растворителем для фотосенсибилизатора и местнодействующего агента для улучшения проникновения видимого света в кожу. Известно, что применение агентов, таких как пропиленгликоль или глицерин, уменьшает различие между показателями преломления слоёв кожи и значительно минимизирует случайное рассеивание света, улучшая его проникание в слои кожи при видимых длинах волн в течение контролируемого периода времени. Это свойство, также известное как “оптическая компенсация”, приводит к лучшей активации композиции по настоящему изобретению внутри очага поражения терапевтическим светом, используемым для активирования фотосенсибилизаторов, упомянутых в настоящем изобретении.

Предпочтительно композиция по настоящему изобретению содержит этанол в качестве со-энхансера (соусилителя) проникновения (d). Он широко используется в гелях для местного применения или трансдермальных продуктах, даже в намного более высоких концентрациях, чем те, в которых он предпочтительно используется в настоящей композиции. Присутствие этанола в указанных ниже концентрациях не оказывает токсичного и/или раздражающего действия.

Предпочтительно композиция по настоящему изобретению содержит гидроксипропилцеллюлозу (HPC) в качестве агента, регулирующего вязкость (e). HPC предпочтительно используется в качестве загустителя, с тем, чтобы придать композиции по настоящему изобретению требуемые реологические свойства. Вязкость композиции по настоящему изобретению была оптимизирована для достижения удовлетворительного местного применения композиции и уменьшения проблем, связанных с её потерями на поражённом участке перед облучением. Кроме того, выбранный состав композиции

обеспечивает оптическую прозрачность для терапевтического света и отсутствие рассеяния последнего.

Предпочтительно в композиции по изобретению фотосенсибилизатор (a) содержится в количествах от 0,05 до 0,5% (мас./мас.), более предпочтительно – от 0,1 до 0,3% (мас./мас.).

В композиции по изобретению моноалкиловый эфир диэтиленгликоля (b) содержится в количестве от 3 до 35% (мас./мас.), более предпочтительно – от 5 до 10% (мас./мас.).

Предпочтительно в композиции по изобретению растворитель (c) содержится в количестве, достаточном для доведения композиции до 100% (мас./мас.). Поскольку продукт/продукты является/являются гигроскопичным/ми, количество используемого фотосенсибилизатора может варьироваться в зависимости от партии, следовательно, количество пропиленгликоля варьируется, а конечные концентрации других компонентов остаются неизменными.

Предпочтительно в композиции по изобретению сопромотор (d) содержится в количестве от 0 до 15% (мас./мас.), более предпочтительно – от 0 до 10% (мас./мас.).

Предпочтительно в композиции по изобретению регулирующий вязкость агент (e) содержится в количестве от 0,05 до 3% (мас./мас.), более предпочтительно – от 0,1 до 2% (мас./мас.). Для композиций, вязкость которых составляет от 25 до 65 сП, предпочтительнее использовать агент (e) с низким коэффициентом вязкости (такой как Klucel JF) и в количестве от 0,1 до 0,2% (мас./мас.). Для композиций, вязкость которых составляет от 50000 до 190000 сП, предпочтительнее использовать агент (e) с высоким коэффициентом вязкости (такой как, например, Klucel HF) и в количестве от 1 до 2% (мас./мас.).

Предпочтительно композиция по изобретению состоит из:

(a) RLP068/Cl	от 0,1 до 0,3% (мас./мас.)
(b) моноэтилового эфира диэтиленгликоля	от 5,0 до 10,0% (мас./мас.)
(c) пропиленгликоля	q.s* до 100% (мас./мас.)
(d) EtOH (этанол)	от 0 до 10,0% (мас./мас.)
(e) гидроксипропилцеллюлозы	от 0,1 до 1,5% (мас./мас.)

q.s* = достаточное количество

В предпочтительном варианте воплощения композиция (композиция PLUS (ПЛЮС)) по изобретению состоит из:

(a) RLP068/Cl	0,3% (мас./мас.)
(b) моноэтилового эфира диэтиленгликоля	5,0% (мас./мас.)

(c) пропиленгликоля q.s до 100% (мас./мас.)

(e) гидроксипропилцеллюлозы (Klucel JF) 0,1% (мас./мас.)

В другом предпочтительном варианте воплощения композиция (композиция GEL (ГЕЛЬ)) по изобретению состоит из:

(a) RLP068/Cl 0,3% (мас./мас.)

(b) моноэтилового эфира диэтиленгликоля 10,0% (мас./мас.)

(c) пропиленгликоля q.s до 100% (мас./мас.)

(d) EtOH 10,0% (мас./мас.)

(e) гидроксипропилцеллюлозы (Klucel HF) 1,5% (мас./мас.)

В ещё одном предпочтительном варианте воплощения композиция по изобретению состоит из:

(a) RLP068/Cl 0,1% (мас./мас.)

(b) моноэтилового эфира диэтиленгликоля 10,0% (мас./мас.)

(c) пропиленгликоля q.s до 100% (мас./мас.)

(d) EtOH 10,0% (мас./мас.)

(e) гидроксипропилцеллюлозы (Klucel HF) 1,5% (мас./мас.)

% (мас./мас.) рассчитаны по общей массе композиции.

Композицию, являющуюся предметом настоящего изобретения, полезна для использования в фотодинамической терапии (ФДТ) поражений кожи или слизистой оболочки.

Композиция, являющаяся предметом настоящего изобретения, используется в сочетании с активацией красным светом и предпочтительно при длине волны в диапазоне 600-700 нм. Облучение фталоцианинового фотосенсибилизатора светом определённой длины волны генерирует синглетный кислород и радикалы преимущественно нестабильных оксигенированных частиц (активные формы кислорода, АФК; *англ.* ROS), которые имеют среднее время жизни, равное и ограничиваемое несколькими наносекундами, поскольку, учитывая их особую реактивность, они легко инактивируются клеточными компонентами. Поскольку фотосенсибилизаторы, упомянутые в настоящем изобретении, связываются, в основном, с компонентами клеточных мембран и/или стенок, клеточное повреждение происходит на несколько (несколько десятков) нм, то есть на расстоянии, определяемом средним временем жизни частиц АФК. Например, широко признано, что АФК оказывает цитотоксическое действие на грамположительные патогены, такие как бактерии *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp.; грамотрицательные патогены, такие как *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumanni*, *Klebsiella* spp., *Moraxella* spp.; дрожжи вида *Candida* spp. и простейшие, такие как *Leishmania* spp., *Acantamoeba* spp., и

многие другие. Механизм действия такой инактивации преимущественно находится на уровне липидов мембран микроорганизмов аналогично тому, о чём сообщается в литературе в отношении инактивации микроорганизмов нейтрофилами в результате физиологического процесса.

Таким образом, композиция по настоящему изобретению является полезной (в сочетании с облучением красным светом) для местного локализованного лечения кожных инфекций микробного происхождения, вызванных грамположительными, грамотрицательными патогенами, дрожжами, грибами и простейшими.

Наличие низких, следовательно, нелетальных, концентраций фотосенсибилизатора на клетках хозяина, например по периферии повреждённых участков может оказывать стимулирующее действие на процессы заживления и рубцевания, которые происходят одновременно с процессом инактивации бактерий, способствуя созданию микросреды для заживления повреждений (Nesi-Reis V. *et al*. Photodiagnosis Photodyn. Ther. 2018 Mar; 21:294-305; Wounds International, 2016; Reinhard A. *et al*. Expert Rev. Clin. Immunol. 2015 May; 11(5):637-57).

Композиции, являющиеся предметом настоящего изобретения, наносятся местно на поверхностные раны или поверхностные язвы кожи; системного всасывания обнаружено не было. Композиция, являющаяся предметом настоящего изобретения, в контексте ФДТ является эффективным адъювантом также для местного лечения ран и язв на поверхности кожи, поскольку после фотоактивации она модулирует путём физического воздействия микросреду поражённых участков кожи, способствуя их заживлению.

Дополнительные преимущества применения композиции, являющейся предметом настоящего изобретения, приводятся ниже:

- лечение композицией может корректироваться во времени (2/3 раза в неделю, в течение нескольких недель). Оно также может быть начато и прекращено просто путём начала или прекращения облучения;

- лечение не требует никаких усилий со стороны пациента: композиция действует только в зоне облучения; следовательно, это специфическое лечение без побочных эффектов на отдалении от места лечения, что имеет место в случае противомикробных препаратов;

- соотношение “польза-затраты” в целом является положительным;

- терапевтическое лечение пациента не является проблемой, так как процедура может выполняться медицинскими работниками во время обычных визитов врача и осмотров;

- по предписанию врача системное применение антибиотиков может быть

сокращено или полностью исключено;

- однако лечение может включать и одновременное системное применение антибиотиков;

- в случае инфекционных поражений идентификация микроорганизмов, вызвавших инфекцию, не требуется, поскольку лечение гарантирует инактивацию грамположительных и грамотрицательных видов бактерий, грибов и простейших; следовательно, спектр инактивации широк и на него не влияет устойчивость к антибиотикам, что подтверждает, что лечение ФДТ одинаково эффективно как против микроорганизмов дикого типа, так и против микроорганизмов с устойчивостью к антибиотикам.

Кроме того, предлагаемое лечение ФДТ само по себе не вызывает устойчивости, поскольку представляет собой инактивацию на основе химико-физического процесса многоцелевого типа, и не вмешивается в метаболические процессы, как антибиотики.

Таким образом, композиция, являющаяся предметом настоящего изобретения, способна облегчить заживление поверхностных кожных ран, улучшить качество жизни пациента и поддержать положительный профиль в отношении аспектов безопасности и переносимости. Она представляет собой действенный подход к лечению повреждений кожи и ускорению заживления поверхностных ран различной природы.

Предпочтительно способ получения композиции по настоящему изобретению включает методы, описанные ниже.

В случае полутвёрдых стерильных композиций с вязкостью от 50000 до 190000 сП, компоненты (b)-(d) стерилизуются фильтрацией на мембранах 0,2 мкм вместе с фотосенсибилизатором (a) после растворения его в вышеуказанных компонентах (b)-(d). Регулирующий вязкость агент (e), с другой стороны, стерилизуется в автоклаве (при 121°C в течение 15 минут) после смешивания с сорастворителем (c).

Полученные таким образом два стерильных раствора объединяют в асептических условиях в стерильном изолированном помещении (изоляторе). Композицию по изобретению предпочтительно упаковывают также в асептических условиях в одноразовые стерильные апирогенные (т.е. не содержащие пирогенов) флаконы из жёлтого стекла, тип I Schott VADIN2R, закрываемые системой укупорки из бутилхлорида с покрытием Flurotec Plus и герметично запечатываемые алюминиевой кольцевой гайкой, предварительно стерилизованной нагревом.

В случае стерильных композиций с вязкостью от 25 до 65 сП все компоненты и фотосенсибилизатор после полного растворения стерилизуют фильтрацией на мембранах 0,2 мкм.

Предпочтительно стерильную композицию помещают в полиэтиленовые стрипы, состоящие из 5 виал с одноразовой дозой (монодозой) (2 мл), предварительно стерилизованных гамма-излучением.

В случае нестерильных полутвёрдых композиций с варьирующимся уровнем вязкости все компоненты и фотосенсибилизатор перемешивают до полного растворения, что гарантирует поддержание низкой микробной нагрузки на готовую композицию.

Предпочтительно нестерильную композицию помещают в полиэтиленовые стрипы, состоящие из 5 виал с монодозой (3 мл), предварительно стерилизованных гамма-излучением.

Для целей настоящего изобретения термины “композиция” (composition) и “состав” (formulation) являются синонимами.

Настоящее изобретение можно лучше понять из нижеследующих примеров его осуществления.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 – Вертикальная диффузионная ячейка типа Gummer (1, 2: вход и выход рецепторной фазы; 3, 4: вход и выход термостатирующей воды).

Фиг. 2 – Фотография крио-микротома модели Mev. Slee Technik GmbH и схема изготовления срезов кожи.

Фиг. 3 – Профиль проникновения RLP068 через кожу безволосых крыс.

Фиг. 4 – Профиль проникновения RLP068 через кожу безволосых крыс.

Фиг. 5-13 – Распределение RLP068 в коже безволосых крыс при использовании метода механического разделения.

Фиг. 14 – Распределение RLP068 в коже человека при использовании метода механического разделения.

Фиг. 15 – Распределение RLP068 в коже человека при использовании метода разделения крио-микротомом.

Фиг. 16 – Схематическое изображение оборудования, используемого для оценки мукоадгезивных свойств гелей.

Фиг. 17 – Работа адгезии изучаемых композиций.

Фиг. 18 – Калибровочная кривая, полученная для молекулы RLP164.

Фиг. 19 – Калибровочная кривая, полученная для молекулы RLP068.

Фиг. 20 – Распределение RLP068 в слизистой оболочке ротовой полости (щеки) после нанесения композиции на 5 часов (среднее ± S.E. (стандартная погрешность), n = 3).

Фиг. 21 – Распределение RLP068 в слизистой оболочке щеки после нанесения композиции Гель 3 на 5 часов и 30 минут (среднее ± S.E., n = 6).

Фиг. 22 – Распределение RLP068 в слизистой оболочке щеки после нанесения композиции Гель 18 на 5 часов и 30 минут (среднее ± S.E, n = 6).

Фиг. 23 – Распределение RLP164 в слизистой оболочке щеки после нанесения композиции Гель 21 на 5 часов и 30 минут (среднее ± S.E., n = 6)

Фиг. 24 – Распределение RLP164 в слизистой оболочке щеки после нанесения композиции Гель 22 на 5 часов и 30 минут (среднее ± S.E., n = 6).

Фиг. 25 – Эффективность APDT (антибактериальная фотодинамическая терапия)-лечения композицией ГЕЛЬ и композицией ПЛЮС по изобретению (время контакта с местом поражения: 60 мин). Среднее и стандартная ошибка среднего (sem) определены на основе анализа ANOVA (* p<<0,001).

Фиг. 26 – Эффективность APDT-лечения композицией ГЕЛЬ и композицией ПЛЮС по изобретению (время контакта с местом поражения: 30 мин). Среднее и стандартная ошибка среднего (sem) определены на основе анализа ANOVA (* p<<0,001).

Экспериментальная часть

1. Материалы

• 1,8(11),15(18),22(25)-тетра[3-(N,N,N-триметиламмоний)фенокси]тетра-хлорид фталоцианината цинка (II) (Zn-фталоцианинат, RLP068, Molteni Therapeutics S.r.l.., Италия)

• Моноэтиловый эфир диэтиленгликоля (Transcutol P®, Gattefossè, Франция)

• Гидроксипропилцеллюлоза (Klucel HF Pharm, Hercules, Нидерланды)

Эфирное масло чайного дерева (TTO, Main Camp® масло чайного дерева фармацевтического качества, Variati & Co., Италия)

• Изопропилмиристат (MYR, Merck, Schuchardt, Германия)

• (±)-α-бисаболол (BIS, BASF, Германия)

• Пропиленгликоль (PG, Acef S.p.A, Италия)

• Полиэтиленгликоль 200 (PEG 200, Merck, Schuchardt, Германия)

• Додецилсульфат натрия (SDS, Sigma-Aldrich S.r.l., Milan, Италия).

Все использованные соли и растворители были аналитической чистоты (“чистый для анализа”) или степени чистоты для ВЭЖХ.

2. Методы

2.1. *In-vitro* исследования трансдермального (чрескожного) проникновения

2.1.1. Модели кожи

Кожа животного

Кожу безволосой крысы использовали в качестве модели кожи животного для исследований проникновения в кожу “*in vitro*” по причине её лёгкой доступности и

простоты использования и с учётом её сходства по толщине и структуре с человеческой кожей. Как на дорсальной, так и на брюшной поверхности она не прилипает к внутренним органам, и поэтому её можно легко удалить с сохранением равномерной толщины, не прибегая к микротомии. Использовали самок безволосых крыс в возрасте 5 недель (OFA-hr/hr, Charles River Italia SpA). Сразу после умерщвления путём смещения шейного отдела позвоночника неповреждённую кожу аккуратно срезали и дерму тщательно зачищали от любых сращений подкожной ткани и кровеносных сосудов. Вырезали лоскуты размером примерно 3 см с каждой стороны и использовали для экспериментов "*in vitro*" на проникновение и распределение.

Кожа человека

Использовали человеческую кожу, эксплантированную от пациенток европеоидной расы, перенесших операцию по абдоминопластике живота.

Термин "жизнеспособная человеческая кожа" обозначает свежую кожу, использованную сразу после операции; термин "нежизнеспособная человеческая кожа" обозначает кожу, замороженную после операции и используемую по мере необходимости.

В настоящем описании речь идёт о нежизнеспособной человеческой коже: сразу после снятия кожи подкожный жир удаляли и кожу сохраняли до использования при температуре -20°C на влагонепроницаемых алюминиевых листах. Образцы кожи замораживали в течение не более 6 месяцев: многочисленные исследования показали, что при замораживании человеческой кожи в течение такого периода времени ее структура не меняется в такой степени, чтобы это могло повлиять на проникновение лекарственного средства (Harrison и Barry, 1984; Bronaugh *et al.*,1986).

2.2. *In-vitro* исследование высвобождения

Исследование высвобождения "*in vitro*" проводили с использованием вертикальной диффузионной ячейки, описанной Gummer *et al.* (1987, фиг. 1). Эта ячейка состоит из донорной камеры (D), слоя кожи (M) и рецепторной камеры (R), имеющей объём 5,0 мл и площадь диффузии 3,14 см^2. Раствор рецептора перемешивали магнитной мешалкой при постоянной скорости 600 об./мин и температуру в рецепторной камере регулировали с помощью циркулирующей воды, термостатированной при 37°C в двойной стенке ячейки.

В данном исследовании фосфатный буфер 66,7 мМ, pH=7,4, изотонизированный

хлоридом натрия (0,44 г/100 мл) и содержащий азид натрия (0,003%) в качестве консерванта, использовали как рецепторную фазу.

Исследуемые композиции использовали в качестве донорной фазы.

Во всех случаях через соответствующие временные интервалы примерно 5 мл раствора отбирали из рецепторной камеры, заменяя их равным объёмом свежего буфера.

Количество лекарственного средства, присутствующее в образцах, определяли с помощью ВЭЖХ. Эксперименты продолжались 5 часов и проводились сериями (по меньшей мере по четыре).

2.3. Методы разделения слоёв кожи

Для оценки количества лекарственного средства, распределённого внутри разных слоёв кожи после тестов на проникновение, применяли два разных метода разделения кожных слоёв – механическое разделение и разделение с помощью крио-микротома.

2.3.1. Механическое разделение

Этот метод заключается в отделении эпидермиса от дермы (собственно кожи) путём слабого “соскоба” с кожи, выполняемого кромкой металлического шпателя. Такое механическое удаление позволяет эффективно отделить эпидермис от дермы, чья консистенция и внешний вид заметно отличаются от эпидермиса.

Каждый слой, разрезанный подходящим способом на мелкие лоскуты с последующим взвешиванием, приводили в контакт с 2 мл 2%-го раствора додецилсульфата натрия (SDS), подвергали перемешиванию в течение 24 часов при комнатной температуре для достижения частичного расщепления. Затем для полного расщепления добавляли 3 мл смеси $MeOH/CHCl_3$ (2:1), продолжая перемешивание в течение ещё одного часа. После центрифугирования при 5000 об./мин в течение 15 минут отбирали субнатант (жидкость под осадком). Учитывая предполагаемое небольшое количество лекарственного средства, распределённого в коже, раствор субнатанта, разделённый на аликвоты, высушивали, затем удаляли остаток с помощью MeOH и определяли количество извлечённого фталоцианина методом ВЭЖХ.

2.3.2. Разделение крио-микротомом

Этот метод позволил авторам изобретения разделить остатки кожи, оставшиеся от *in-vitro* тестов на проницаемость, на намного меньшие части.

Процедуру получения срезов кожи проводили при -25°C с использованием крио-микротома (Криостат модели Mev Slee Technik GmbH, Майнц, Германия). На фиг. 2 представлена фотография передней части крио-микротома и схема фаз рассечения кожи.

Кожу растягивали, скрепляли на соответствующей подставке с частью эпидермиса, обращённой вверх, и выравнивали, насколько это возможно, поместив на неё груз массой 1 кг на стандартное время (одна минута). Затем подставку вводили в крио-микротом, где в течение нескольких секунд оказывали на кожу с помощью пластмассового диска небольшое давление, направленное параллельно подставке. Эта операция, как оказалось, является очень важной для получения полных срезов кожи в первых слоях эпидермиса, чтобы проследить “путь” фталоцианина уже из самых верхних слоёв. После

замораживания кожу разделяли на образцы толщиной 25 мкм и кожные срезы собирали в предварительно откалиброванные виалы (небольшие флаконы со специальной крышкой), помещая все фрагменты неполных срезов в первую виалу, первый полный срез толщиной 25 мкм – во вторую виалу, и так далее в соответствии со стандартизованной схемой, показанной в таблице 1.

С учётом того, что количество активного ингредиента в срезах предположительно уменьшается с увеличением глубины слоёв кожи (следовательно, числа срезов) для получения количества фталоцианина, превышающего предел чувствительности аналитического метода, срезы, соответствующие самой глубокой части кожи, собирали в одну и ту же виалу.

И, наконец, остаток кожи, из которого больше невозможно было получить полный срез, помещали в последнюю виалу.

Таблица 1. Схема забора кожных лоскутов после разделения

	Число срезов	Общая толщина, мкм
Виала 1	Неполные срезы	Неизвестна
Виала 2	1	25
Виала 3	1	25
Виала 4	2 x 25	50
Виала 5	4 x 25	100
Виала 6	4 x 25	100
Виала 7	4 x 25	100
Виала 8	4 x 25	100
Виала 9	4 x 25	100
Виала 10	4 x 25	100
Виала 11	4 x 25	100
Виала 12	4 x 25	100
Виала 13	4 x 25	100
Виала 14	Остаток	Неизвестна

Каждую виалу взвешивали, с тем чтобы знать массу кожи в каждой из виал. Толщину неполных срезов и остатка рассчитывали по их массе, сопоставляя со слоями кожи известной толщины и массы.

Формула, которую использовали для этого, имеет следующий вид:

$$\text{Толщина неполного среза} = \frac{\sum \text{Толщина среза}}{\sum \text{Масса среза}} \times \text{Масса неполного среза}$$

Затем каждый срез подвергали расщеплению, чтобы извлечь лекарственное средство вышеописанным методом механического разделения, адаптируя подходящие количества растворителей к количеству обрабатываемой кожи.

Для этой цели в каждую виалу добавляли 1 мл 2%-го SDS на 24 часа, а затем 1,5 мл смеси $MeOH/CHCl_3$ (2:1) на 1 час. В заключение аликвоту субнатанта высушивали под вакуумом, чтобы удалить остаток с помощью MeOH.

И, наконец, определяли количество фталоцианина в различных срезах кожи с помощью ВЭЖХ, как и в предыдущем способе.

3. Аналитические методы

3.1. Количественное определение RLP068

Количественный анализ фотосенсибилизатора, присутствующего как в рецепторной фазе "*in-vitro*" исследования проникновения, так и в каждом слое кожи, после разделения и экстракционной обработки, проводили методом ВЭЖХ.

Для этого использовали прибор Shimadzu LC-10AS с УФ-детектором SPD-10AV, оборудованный автоматическим пробоотборником SIL-10AD VP и соответствующим интегрирующим программным обеспечением,

инжекционный клапан Rheodyne ёмкостью 20 мкл,

колонку с обращённой фазой Bondclone (Phenomenex) длиной 30 см, внутренним диаметром 3,9 мм, заполненную 10 мкм C_{18}-фазы.

Условия анализа, подвижная фаза, поток, время удерживания и длина волны детектора фотосенсибилизатора приведены в таблице 2.

Таблица 2. Условия HPLC-анализа.

Вещество	Подвижная фаза (соотношение)	Поток (мл/мин)	Время удерживания (мин)	Длина волны (нм)
RLP068	MeOH: CH_3CN: Slz.A* (55:20:25)	1	11,40	361

* Slz.A: раствор 1,0312 г гексансульфоната натрия в 100 мл H_2O, доведенный до pH=3 ледяной уксусной кислотой

Для "*in-vitro*" тестов на трансдермальное (чрескожное) проникновение количественный анализ фотосенсибилизатора в образцах выполняли путём сравнения с кривой внешней калибровки, полученной растворением базового раствора в метаноле с изотоническим фосфатным буфером при pH=7,4, содержащим азид натрия (0,003% мас./об.).

Количественный анализ фотосенсибилизатора, извлечённого из кожи после тестов на проникновение, проводили путём сравнения с калибровочными кривыми, полученными добавлением известных аликвот фотосенсибилизатора в растворе метанола к холостым образцам кожи (не обработанным предварительно фталоцианином) и обработкой, описанной выше.

Селективность тестируемых образцов была подтверждена индивидуальными анализами холостых образцов как кожных слоёв, так и рецепторной фазы диффузионных ячеек. Полученные с помощью описанного метода анализа пики поглощения, относящиеся к RLP068 как после извлечения из кожных слоёв, так и в рецепторной фазе показали хорошее разрешение.

Калибровочные кривые были линейными в диапазоне от 0,78 до 15,45 мкМ для образцов, извлечённых из кожи, и от 0,65 до 4,00 мкМ для образцов рецепторной фазы.

Линейный регрессионный анализ во всех случаях показал коэффициент корреляции более 0,998.

3.2. Исследуемые композиции

Полутвёрдые композиции на основе RLP068 получали с использованием Transcutol® P в качестве растворителя и содержащего Klucel HF® в качестве регулирующего вязкость агента, способного к образованию прозрачных гелей. Композиции отличались друг от друга не только концентрацией фотосенсибилизатора, составляющей от 0,066% до 0,264% (от 0,5 до 2 мМ), но и видом промотора и его концентрацией внутри переносчика. В некоторых случаях часть Transcutol® P заменяли сорастворителем (EtOH или PG), чтобы удостовериться в возможном синергетическом действии между сорастворителем и промотором проникновения, способствующем накоплению фталоцианина в кожных слоях. Все полученные композиции показаны в таблице 3.

Переносчик Гель 1 (аналогичный композиции, описанной в EP0720853A1, пример 2), содержащий 1 мМ (0,132% мас./мас.) RLP068; Transcutol® и Klucel® HF, был приготовлен в качестве контрольной композиции. Эта композиция была модифицирована добавлением PG (Гель 2) для выявления влияния сорастворителя на накопление фталоцианина в кожных слоях. Для этой же цели был приготовлен переносчик Гель 3, содержащий также EtOH в дополнение к Transcutol® и PG.

Затем были приготовлены переносчики с тремя разными концентрациями RLP068, чтобы оценить влияние концентрации активного ингредиента на количество, накапливаемое в кожных слоях, в отсутствие (Гель 5, Гель 4, Гель 6) и в присутствии TTO (Гель 8, Гель 7, Гель 9) в качестве промотора проникновения в кожу. Композиция, содержащая самую высокую концентрацию фотосенсибилизатора, была приготовлена с TTO в двух различных концентрациях – 20% и 0,25%, соответственно, для переносчиков Гель 9 и Гель 10, с целью изучения влияния концентрации промотора RLP068 на проникновение в кожу.

Поскольку TTO (масло чайного дерева), помимо того, что оно является промотором проникновения в кожу, обладает также хорошей противомикробной и противогрибковой активностью, его использование в композиции может приводить к взаимодействию с терапевтической активностью фотосенсибилизатора. По этой причине были протестированы два новых промотора проникновения в кожу: (±)-α-бисаболол (BIS) и изопропилмиристат (MYR).

(±)-α-Бисаболол использовали в двух разных концентрациях – 20% и 6%, соответственно, в композициях Гель 11 и Гель 12, содержащих 20% этанола в качестве сорастворителя. Такие же композиции, приготовленные с использованием изопропилмиристата в качестве промотора в концентрациях 20% и 6%, были обозначены, соответственно, аббревиатурами Гель 14 и Гель 15.

Затем готовили два переносчика, включающих только Transcutol® и Klucel® HF, причём один содержал 20% (±)-α-бисаболола (переносчик Гель 13), другой содержал 6% изопропилмиристата (переносчик Гель 16).

Таблица 3. Состав (% мас./мас.) полутвёрдых переносчиков на основе RLP068

Композиция RLP068	RLP068	TTO	MYR	BIS	EtOH	PG	Klucel®HF	Transcutol® P
Гель 1	0,132	-	-	-	-	-	1,5	98,368
Гель 2	0,132	-	-	-	-	49	1,5	49,368
Гель 3	0,132	-	-	-	15	49	1,5	34,368
Гель 4	0,132	-	-	-	20	-	1,5	78,368
Гель 5	0,066	-	-	-	20	-	1,5	78,434
Гель 6	0,264	-	-	-	20	-	1,5	78,236
Гель 7	0,132	20	-	-	20	-	1,5	58,368
Гель 8	0,066	20	-	-	20	-	1,5	58,434
Гель 9	0,264	20	-	-	20	-	1,5	58,236
Гель 10	0,264	0,25	-	-	20	-	1,5	77,986
Гель 11	0,132	-	-	20	20	-	1,5	58,368
Гель 12	0,132	-	-	6	20	-	1,5	72,368
Гель 13	0,132	-	-	20	-	-	1,5	78,368
Гель 14	0,132	-	20	-	20	-	1,5	58,368
Гель 15	0,132	-	6	-	20	-	1,5	72,368
Гель 16	0,132	-	6	-	-	-	1,5	92,368

4. Результаты

4.1. Кожа безволосых крыс

4.1.1. Трансдермальное (чрескожное) проникновение

Все полученные полутвёрдые переносчики (таблица 3) были протестированы на трансдермальное проникновение через кожу безволосых крыс с использованием вертикальной диффузионной ячейки описанного Gummer *et al*. типа.

По результатам тестов на проникновение через кожу крыс, представленным на фиг. 3 и фиг. 4, следует отметить, что композиции Гель 7, Гель 8, Гель 9 и Гель 10 приводили к прохождению RLP068 в рецепторную фазу. Для всех композиций трансдермальное проникновение можно объяснить присутствием TTO: в самом деле, в присутствии TTO отмечалось увеличение прохождения в рецепторную фазу по сравнению с контролем без промотора. Кроме того, при уменьшении концентрации TTO в переносчике с 20% (Гель 9) до 0,25% (Гель 10) имело место уменьшение прохождения RLP068 в рецепторную фазу.

Все другие композиции не обеспечивали проникновение RLP068: по сути, в рецепторной камере не было обнаружено сколько-нибудь значительных количеств

продукта; предел определения (0,65 мкМ) аналитического метода позволил авторам изобретения исключить присутствие RLP068 в рецепторной камере.

4.1.2. Распределение в коже

Механическое разделение слоёв кожи

Результаты тестов на распределение RLP068 в коже, полученной методом механического разделения, приведены в цифровом виде в таблице 4.

Таблица 4. Количество RLP068, аккумулированное в коже безволосых крыс, которое определяли после механического разделения слоёв кожи

Переносчик RLP068	Эпидермис	Дерма
	мкг/г ± SE	мкг/г ± SE
Гель 1	25,51 ± 5,26	2,29 ± 0,39
Гель 2	53,26 ± 15,07	0,49 ± 0,18
Гель 3	45,41 ± 17,55	2,96 ± 0,87
Гель 4	589,89 ± 328,64	10,06 ± 2,02
Гель 5	448,49 ± 99,90	1,53 ± 0,21
Гель 6	936,31 ± 362,24	7,12 ± 0,04
Гель 7	4048,23 ± 1145,84	34,51 ± 5,04
Гель 8	303,76 ± 88,20	7,43 ± 4,30
Гель 9	12204,04 ± 3974,57	52,10 ± 6,76
Гель 10	110,89 ± 54,65	3,00 ± 0,50
Гель 11	1109,00 ± 144,67	22,15 ± 7,59
Гель 12	381,51 ± 50,39	2,97 ± 0,34
Гель 13	503,91 ± 119,62	2,90 ± 1,32
Гель 14	1038,74 ± 214,99	10,98 ± 2,68
Гель 15	287,22 ± 69,18	3,30 ± 0,83
Гель 16	184,05 ± 5,03	13,73 ± 7,99

Во всех случаях количество фотосенсибилизатора, аккумулированное в слоях кожи (эпидермис и дерма), приводится в мкг/г кожи. Полученные данные выражаются как среднее по меньшей мере трёх измерений ± стандартная погрешность (SE).

Если RLP068 представлен в виде переносчика Гель 2, содержащего Transcutol®P и PG в равных долях (около 49% мас./мас.), то аккумулирование в эпидермисе вдвое превышает аккумулирование в случае контрольного переносчика Гель 1 на основе одного лишь Transcutol®P (фиг. 5). Для объяснения этого эффекта можно сослаться на литературные данные, согласно которым PG (полиэтиленгликоль) взаимодействует с полярными участками липидов кожи, способствуя проникновению Transcutol® P в кожу, что формирует отложения фотосенсибилизатора в коже (Mura *et al*., Eur. J. Pharm. Sci, 2000, 9, 365-372).

Добавление 15% этилового спирта (EtOH) в композицию (композиция Гель 3) не приводило к увеличению количества RLP068 в эпидермисе; вместо этого примерно в 6 раз возросло количество фотосенсибилизатора, аккумулированное в дерме, по сравнению с переносчиком Гель 2 (фиг. 6). Следовательно, присутствие сорастворителя обеспечивало более глубокое проникновение в кожу производного RLP068, в то время как количество,

аккумулируемое в эпидермисе, оставалось неизменным, и не приводило, тем самым, к полезному улучшению для целей настоящего изобретения.

Выбор EtOH основывается на том факте, что он обладает как свойством промотора проникновения в кожу, так и задокументированным синергетическим взаимодействием с некоторыми другими промоторами. В самом деле, в литературе сообщалось, что EtOH проникает в кожу, изменяет её барьерные свойства, благодаря своему воздействию на липидный компонент (Mutalik & Udupa, Pharmazie, 2003, 58, 891-895). EtOH способен также модифицировать термодинамическую активность переносчика: быстрое проникновение хорошего растворителя из донорской фазы может сохранить фотосенсибилизатор в термодинамически более активном состоянии, чем в присутствии растворителя вплоть до точки перенасыщения. В основном, выдвигалась гипотеза (хотя эта концепция является предметом многочисленных споров и не является доказанной), что растворитель, проникая через кожу, может увлечь продукт за собой (Williams & Barry, Adv. Drug. Deliv. Rew., 2004, 56, 603-618).

Действие EtOH на аккумулирование фотосенсибилизатора в коже также изучалось на композициях, содержащих только Transcutol®P, и на композициях, содержащих также TTO. Эти переносчики были приготовлены с тремя различными концентрациями RLP068, чтобы оценить влияние концентрации фотосенсибилизатора на его аккумулирование в слоях кожи в отсутствие и в присутствии TTO в качестве промотора проникновения в кожу. Поэтому переносчики Гель 5, Гель 4, Гель 6 были приготовлены без TTO и содержали RLP068 в концентрации 0,5, 1 и 2 мМ, соответственно. Соответствующие переносчики, содержащие 20% TTO, были обозначены как Гель 7, Гель 8, Гель 9. Результаты тестов на распределение представлены графически на фиг. 7-9.

Переносчик Гель 4, содержащий 1мМ RLP068 и 20% EtOH без TTO, приводит к аккумулированию в эпидермисе, которое примерно в 23 раза больше, чем аккумулирование, достигаемое при использовании переносчика Гель 1 на основе одного лишь Transcutol®P, что подтверждает способность EtOH повышать проникновение фотосенсибилизатора в кожу.

В отсутствие TTO не наблюдается существенных различий между композициями с различными концентрациями фталоцианина в отношении аккумулирования как в эпидермисе, так и в дерме. Фактически, в эпидермисе было обнаружено 448,49 ± 99,90 мкг/г, 589,89 ± 328,64 мкг/г, 936,31 ± 362,24 мкг/г RLP068 в случае композиций Гель 5, Гель 4, Гель 6, соответственно.

Присутствие 20% TTO в переносчике, в дополнение к увеличению количества фотосенсибилизатора, аккумулированного в эпидермисе по сравнению с контролем без

ТТО, усиливает влияние концентрации RLP068 на аккумулирование в слоях кожи.

В случае композиций Гель 7 и Гель 9 количество RLP068 было примерно в 6,86 и 13,03 раз больше его количества, аккумулированного в эпидермисе при использовании переносчиков Гель 4 и Гель 6, не содержащих ТТО. Однако композиции Гель 5 и Гель 8 не показали статистически значимых различий в количествах RLP068, аккумулированных как в эпидермисе, так и в дерме.

Кроме того, если фталоцианиновое производное RLP068 присутствует с концентрацией 2 мМ в переносчике Гель 9, то аккумулирование в эпидермисе в 3 раза превышает аккумулирование, которое достигается в случае использования переносчика Гель 7, содержащего 1 мМ RLP068, который, в свою очередь, приводит к проникновению в эпидермис, превышающему в 13 раз проникновение, обеспечиваемое переносчиком Гель 8 (0,5 мМ RLP068).

Как видно из фиг. 10, снижение концентрации ТТО в составе с 20% в переносчике Гель 9 до 0,25% в переносчике Гель 10 ведёт к уменьшенному аккумулированию фотосенсибилизатора в обоих слоях кожи – эпидермисе и дерме. Полученный показатель также в 8 раз ниже, чем данные по аккумулированию в эпидермисе для композиции Гель 6, не содержащей ТТО.

В качестве альтернативы ТТО, которое, помимо того, что оно является хорошим промотором проникновения в кожу, обладает значительной противомикробной и противогрибковой активностью, были протестированы два промотора, не обладающие фармакологической активностью.

Композицию Гель 7, содержащую 20% ТТО, сравнивали затем с композициями Гель 11 и Гель 14, содержащими, соответственно, 20% (±)-α-бисаболола (BIS) и 20% изопропилмиристата (MYR). Как можно видеть из данных, приведенных в таблице 4 и на фиг. 11, статистически значимых различий в количествах фотосенсибилизатора, аккумулированных в эпидермисе, между переносчиками Гель 11 и Гель 14 не наблюдается, а разница в данных по аккумулированию в дерме минимальна (22,15 ± 7,59 мкг/г для Геля 11 и 10,98 ± 2,68 мкг/г для Геля 14).

В случае обеих композиций аккумулирование RLP068 в эпидермисе по сравнению с аккумулированием, достигнутым с переносчиком Гель 7, было в 4 раза ниже, а в дерме – в 1,5 и 3,5 раза ниже, чем при использовании переносчиков Гель 11 и Гель 14, соответственно.

При удалении EtOH из композиции Гель 11 и анализе результатов тестов на проникновение в кожу, полученных с соответствующим переносчиком Гель 13, было чётко видно, что количество фталоцианина, аккумулированное в коже, уменьшилось

примерно наполовину в эпидермисе и примерно в 8 раз в дерме.

Полученные данные, показанные на фиг. 12, также подтверждают в этом случае, что присутствие этанола может оказывать синергетическое действие с промотором проникновения. Фактически, наблюдается переход от 503,91±119,62 мкг/г RLP068, аккумулированного в эпидермисе при использовании переносчика Гель 13, содержащего только 20% BIS, и от 589,89±328,64 мкг/г, аккумулированного при использовании Геля 4, содержащего только 20% EtOH, к 1109,01±144,67 мкг/г RLP068, проникающего в эпидермис, когда EtOH и BIS присутствуют в одинаковом количестве в одной и той же композиции (Гель 11).

При снижении концентрации BIS и MYR с 20% до 6% (переносчики Гель 12 и Гель 15) происходит уменьшение количества фотосенсибилизатора, аккумулированного в эпидермисе примерно в 3 раза в случае обеих композиций; показатели проникновения в дерму также снижаются, особенно в случае переносчика Гель 12, в котором количество фотосенсибилизатора примерно в 8 раз меньше. Эти результаты, представленные графически на фиг. 12 и 13, демонстрируют зависимость действия промотора от его концентрации.

Также была получена композиция, содержащая 6% MYR без EtOH (**Гель 16**). В этом случае также было продемонстрировано синергетическое действие EtOH и MYR: показатели накопления в эпидермисе для композиции Гель 16 были фактически в 1,6 раза ниже, чем для композиции Гель 15, содержащей 20% EtOH вместе с промотором.

4.2. Человеческая кожа

4.2.1. Трансдермальное (чрескожное) проникновение

Некоторые из приготовленных полутвёрдых переносчиков (таблица 3) были протестированы на трансдермальное проникновение через человеческую кожу с помощью ячеек вертикальной диффузии Gummer-типа.

Тестировали следующие композиции: Гель 3, Гель 7, Гель 11, Гель 14 и Гель 16.

Результаты тестов на проникновение через человеческую кожу показали, что ни одна из композиций не обеспечила проникновение RLP068: фактически, в рецепторной камере не было обнаружено сколько-нибудь значительных количеств продукта.

4.2.2. Распределение в коже

Механическое разделение слоёв кожи

Результаты тестов на распределение RLP068 в коже, полученные после механического разделения слоёв кожи, приведены в цифровом виде в таблице 5 и графически на фиг. 14.

Таблица 5. Количество RLP068, аккумулированное в человеческой коже, определение которого проводилось после механического разделения слоёв кожи

Переносчик RLP068	Эпидермис	Дерма
	мкг/г ± SE	мкг/г ± SE
Гель 3	201,10 ± 98,18	7,66 ± 0,86
Гель 7	120,42 ± 20,66	8,98 ± 3,91
Гель 11	74,88 ± 17,69	1,24 ± 0,19
Гель 14	145,26 ± 36,60	1,41 ± 0,83
Гель 16	38,61 ± 1,24	2,10 ± 0,024

Во всех случаях количество лекарственного средства, аккумулированное в слоях кожи (эпидермис и дерма), приводится в мкг/г кожи. Полученные данные выражаются как среднее по меньшей мере трёх измерений ± стандартная погрешность (SE).

Композиция Гель 3, содержащая 15% EtOH в PG и Transcutol®P, показала самое высокое количество RLP068 в эпидермисе, которое составило, как было обнаружено, 201,10±98,18 мкг/г. Количество фотосенсибилизатора, аккумулированное в эпидермисе, было примерно в 26 раз выше, чем его количество, аккумулированное в дерме.

Когда на кожу наносили производное RLP068, переносимое в композиции Гель 7, содержащей также 20% EtOH и 20% TTO в дополнение к Transcutol®P, то количество фотосенсибилизатора в эпидермисе было в 1,7 раза ниже, чем в случае композиции Гель 3, в то время как данные по аккумулированию в дерме не столь существенно различались для этих двух композиций.

Две композиции, содержащие промоторы проникновения в кожу, альтернативные TTO, также тестировали на человеческой коже: (±)-α-бисаболол и изопропилмиристат, соответственно, для композиций Гель 11 и Гель 14.

Результаты тестов на распределение в коже показали, что, хотя между данными по аккумулированию в дерме нет статистических значимых различий, количество RLP068 в эпидермисе, когда переносчиком, наносимым на кожу, является Гель 14, примерно в два раза превышает указанное количество, когда переносчиком является Гель 11. Количество лекарственного средства, обнаруженное в эпидермисе, при использовании переносчика Гель 14 не отличалось сколько-нибудь существенно от количества, обнаруженного при нанесении на кожу композиции Гель 7.

При нанесении на кожу композиции Гель 16, содержащей 6% MYR в дополнение только лишь к Transcutol®P в качестве растворителя, количество RLP068 в эпидермисе составило 38,61±1,24 мкг/г, что в от 2 до 5 раз ниже, чем данные по аккумулированию в том же слое при тестировании всех других композиций. И, наоборот, количество лекарственного средства, обнаруженное в дерме, представляло собой величину того же порядка, что и при использовании других переносчиков.

Результаты, полученные в тестах на распределение RLP068 на человеческой коже,

также сравнивали с результатами, полученными при использовании в качестве кожной модели кожи безволосых крыс.

Во всех случаях количество фотосенсибилизатора в эпидермисе крыс превышало его количество, обнаруженное в человеческой коже, причём значения колебались от превышения в 33,6 раз в случае Геля 17 до превышения в 4,7 раз в случае Геля 16. Единственное исключение составил переносчик Гель 3, для которого человеческая кожа была более проницаемой: показатели аккумулирования RLP068 в эпидермисе превысили в 4,4 раза аналогичные показатели с кожей крыс.

Разделение слоёв кожи крио-микротомом

Результаты тестов на распределение RLP068 в коже, полученные после разделения слоёв кожи крио-микротомом, приведены в цифровом виде в таблице 6 и графически представлены на фиг. 15.

Таблица 6. Распределение RLP068 (композиции Гель 3, Гель 7, Гель 11 и Гель 14) в человеческой коже после разделения слоёв кожи крио-микротомом

	Гель 3	Гель 7	Гель 11	Гель 14
Глубина слоёв кожи	Аккумулированное количество	Аккумулированное количество	Аккумулированное количество	Аккумулированное количество
(мм)	(мг/г) ± S.E.	(мг/г) ± S.E.	(мг/г) ± S.E.	(мг/г) ± S.E.
35	8,28 ± 0,60	32,51 ± 14,78	67,06. ± 22,70	213,50 ± 52,41
60	20,85 ± 6,94	41,51 ± 5,22	58,55 ± 38,53	187,74 ± 88,57
110	97,56 ± 19,86	103,98 ± 8,74	296,05 ± 118,06	97,58 ± 38,47
210	54,82 ± 20,63	31,34 ± 6,47	66,75 ± 29,46	96,30 ± 38,64
310	11,69 ± 4,31	14,35 ± 0,71	38,64 ± 17,69	30,89 ± 11,63
410	12,62 ± 5,21	26,08 ± 22,05	5,71 ± 2,35	27,78 ± 19,18
510	11,99 ± 0,46	14,83 ± 12,12	6,77 ± 2,46	12,42 ± 2,94
610	4,46 ± 1,23	13,96 ± 5,39	1,27 ± 0,75	17,11 ± 7,94
710	2,02 ± 0,44	96,45 ± 29,76	2,80 ± 2,80	35,78 ± 23,30
810	4,53 ± 0,55	15,22 ± 13,99	-	15,30 ± 5,60
910	3,12 ± 1,43	12,49 ± 6,37	-	33,08 ± 22,14
1010	0,95 ± 0,083	2,05 ± 0,57	-	4,17 ± 1,45

Во всех случаях количество лекарственного средства, аккумулированное в слоях кожи, приводится в мкг/г кожи. Полученные данные выражаются как среднее по меньшей мере трёх измерений ± стандартная погрешность (SE).

При нанесении исследуемых композиций на кожу наиболее высокая концентрация RLP068 была обнаружена в самых поверхностных участках кожи, соответствующих эпидермису. В случае переносчиков Гель 7 и Гель 11 максимально аккумулированное количество (А.А.) было на уровне 110 мкм с показателями, равными, соответственно, 103,98 ± 8,74 и 237,61 ± 108,52 мкг/г. В случае композиций Гель 3 и Гель 14 наибольшее накопление RLP068 было обнаружено, соответственно, на глубине 10 мкм (А.А.= 129,48) и 35 мкм (А.А.= 213,50 мкг/г), то есть на поверхности оно было намного больше, чем в

случае вышеупомянутых переносчиков.

В самых глубоких участках, соответствующих дерме, количество RLP068 было намного ниже. В случае композиции Гель 11 концентрация фотосенсибилизатора резко снизилась: она уменьшилась в 6,5 раз при переходе от 310 к 410 мкм. Такая же тенденция наблюдалась и в случае переносчика Гель 3, при использовании которого количество RLP068 в коже снизилось в 4,5 раза при переходе от 210 к 310 мкм. Композиции Гель 7 и Гель 14, напротив, показали постепенное снижение концентрации фотосенсибилизатора в самых глубоких слоях кожи с пиками RLP068 примерно 30 мкг/г на глубине 710, 910 и 1110 мкм для композиции Гель 14 и с единственным более устойчивым пиком (А.А.= 96,45 мкм/г) на глубине 710 мкм для композиции Гель 7.

5. Мукоадгезивная способность

Серия композиций на основе RLP068, содержащих различные гидрофильные полимеры, была приготовлена для предварительной оценки мукоадгезивной способности этих композиций. Исследования трансмукозального проникновения и распределения лекарственного средства проводили на этих же композициях с приготовлением срезов слизистой оболочки с помощью крио-микротомии.

Композиция, которая показала удовлетворительные результаты по сравнению с композицией Гель 3, выбранной в качестве контроля, стала предметом более углублённых исследований. Указанная композиция была использована для переноса фталоцианина MRLP164.

5.1. Приготовление композиций, содержащих производные RLP068 и MRLP164 (1,0 мМ)

Transcutol$^{\hat{a}}$ P (Gattefossè) использовали в качестве растворителя, пропиленгликоль (PG) и EtOH (этанол) – в качестве сорастворителей, гидроксипропилцеллюлозу (HPC, Klucel$^{\hat{a}}$ HF, от Hercules), ксантановую камедь (XG, Xantural$^{\hat{a}}$ 75, от C.P. Kelco) и поливинилпирролидон (PVP, Kollidon$^{\hat{a}}$VA64, от Basf) – в качестве агентов, регулирующих вязкость. В качестве консерванта использовали смесь из парабенов и феноксиэтанола (Fenocombin$^{\hat{a}}$ 0,2% (мас./мас.), от Formenti, Милан), а токоферола ацетат (0,05% (мас./мас.), от Sigma) добавляли в качестве стабилизатора.

Все композиции были приготовлены путём первоначальной солюбилизации при комнатной температуре фталоцианина и токоферола ацетата (если он присутствует) в Transcutol$^{\hat{a}}$ P с последующим добавлением других сорастворителей при перемешивании в течение примерно 1 часа. Конечный продукт получали добавлением к раствору подходящего количества вязкого полимера и Fenocombin$^{\hat{a}}$ (если таковой присутствует) и смесь перемешивали до получения готовой гомогенной дисперсии вязкого полимера.

5.2 Предварительное исследование композиций на основе RLP068

Состав композиций, содержащих RLP068, использованных для предварительной оценки, показан в таблице 7.

Исследование предусматривало а) оценку мукоадгезивных свойств, б) оценку реологических свойств и в) скрининг композиций по их воздействию на аккумулирование фталоцианина на мукозальном уровне.

Таблица 7. Состав (% мас./мас.) переносчиков, использованных для предварительных тестов

Компоненты (% мас./мас.)	Композиции				
	Гель 3	Гель 17	Гель 18	Гель 19	Гель 20
RLP068	0,132	0,132	0,132	0,132	0,132
EtOH	15,00	5,00	-	-	-
PG	49,00	49,0	20,00	20,0	49,00
Transcutol^{O} P	34,368	34,368	34,368	34,368	34,368
HPC	1,50	1,50	1,50	-	1,50
XG	-	-	-	1,50	-
PVP	-	-	-	-	5,00
H_2O	-	10,0	44,00	44,0	10,0

5.3 Оценка композиций, содержащих RLP068 и MRLP164

Состав композиций, содержащих RLP068 и MRPL164, использованных для второй части исследования, показан в таблице 8.

Композиции подвергали реологическому анализу и как таковые, и после разбавления искусственной слюной в соотношении 1:1. Кроме того, исследование проникновения и аккумулирования фталоцианина в слизистой оболочке ротовой полости (щеки) проводили для двух временных режимов (30 минут и 5 часов).

Таблица 8. Состав (% мас./мас.) полутвёрдых переносчиков

Компоненты (% мас./мас.)	Гель 3	Гель 18	Гель 21	Гель 22
RLP068	0,132	0,132		
RLP164			0,132	0,132
EtOH	15,00		15,00	
PG	49,00	20,00	49,00	20,00
HPC	1,500	1,500	1,500	1,500
Transcutol^{O} P	34,118	34,118	34,118	34,118
H_2O		44,00		44,00

5.4 Реологические измерения

Чтобы охарактеризовать поведение композиций после приготовления и после нанесения “*in vivo*” на слизистую оболочку щеки, реологические измерения проводили и на композициях как таковых, и после разбавления их искусственной слюной (FS) в соотношении 1:1.

Реологическое поведение определяли с помощью ротационного вискозиметра

(Haake Rheostress RS 150, с измерительной системой “конус-пластинка” C60/4).

Состав искусственной слюнной жидкости был следующим: $NaHCO_3$ 5,208 г/л, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1,369 г/л, NaCl 0,877 г/л, KCl 0,477 г/л, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,441 г/л, NaN_3 0,5 г/л, слизистый секрет (муцин) свиного желудка (TCI, Tokyo Kasei, Япония) 2,160 г/л. Все измерения проводили при постоянной температуре 25°C при значениях градиента скорости в пределах от 0 до 200 $с^{-1}$ и продолжительности 300 с. На основании полученных диаграмм корреляцию между напряжением сдвига (t) и градиентом скорости (D) оценивали математической обработкой с помощью программного обеспечения RheoWin Pro и рассчитывали значения кажущейся вязкости (h’) различных композиций для D = 10 и 20 $с^{-1}$.

Значения вязкости всех препаратов показаны в таблице 9.

Таблица 9. Измерения вязкости исследуемых композиций

Композиция	Вязкость, Па·с	
	D = 10 $с^{-1}$	D = 20 $с^{-1}$
Гель 3	4,22	2,53
Гель 17	1,83	1,14
Гель 18	3,58	2,15
Гель 19	1,15	0,68
Гель 20	2,22	1,44
Гель 21	3,57	2,13
Гель 22	1,62	1,05
Гель 3/FS	0,87	0,55
Гель 18/FS	0,35	0,23
Гель 21/FS	0,29	0,22
Гель 22/FS	0,14	0,11

Реологическое поведение всех исследованных композиций (как таковых, так и после разбавления их искусственной слюной) было псевдопластичного типа. Среди композиций, содержащих фталоцианин RLP068, только Гель 18 показал значения вязкости, сравнимые со значениями вязкости Геля 3.

Разбавление искусственной слюной приводило к явному снижению вязкости при обоих градиентах скорости в 5-10 раз в случае всех композиций, хотя псевдопластичное поведение сохранялось.

5.5 Исследование мукоадгезивных свойств

Оценку мукоадгезивных свойств изучаемых композиций проводили путём измерения работы, необходимой для разделения двух мукозальных поверхностей, между которыми была помещена исследуемая композиция (50 мкл). Мукозальные поверхности состояли из слизистой оболочки щёк свиньи. Используемое оборудование включало микровесы, подвижную платформу и компьютеризованную систему, способную регистрировать силу, необходимую для разделения двух поверхностей (исследуемый образец/слизистый слой) как функцию удлинения. Схема показана на фиг. 16.

Площадь под кривой, представляющая работу адгезии (сила x удлинение), рассчитывали по полученным графикам. Полученные результаты показаны на фиг. 17.

Наилучшие мукоадгезивные свойства наблюдались в случае композиций Гель 18 и Гель 20, чьи значения, составляющие соответственно 156,98 ± 28,9 и 116,77 ± 26,66 эрг/см^2, были сравнимы с аналогичными значениями контрольного Геля 3 (134,95 ± 35,27 эрг/см^2).

5.6 Исследование трансмукозального проникновения и распределения в слизистой оболочке "*ex vivo*"

Для исследования проникновения использовали слизистую оболочку щеки свиньи, предоставленную Научно-исследовательским институтом.

Исследование высвобождения "*ex vivo*" проводили с использованием вертикальной диффузионной ячейки, описанной Gummer *et al.* (1987). Эта ячейка состоит из рецепторной камеры, имеющей объём 5,0 мл и площадь диффузии 3,14 см^2. Раствор рецептора перемешивали магнитной мешалкой при постоянной скорости 600 об./мин, а температура рецепторной камеры регулировалась циркулирующей водой, термостатированной при 37°C в двойной стенке ячейки. В настоящем исследовании в качестве рецепторной фазы использовали фосфатный буфер 66,7 мМ, pH = 7,4, изотонизированный хлоридом натрия (0,44 г/100 мл) и содержащий азид натрия (0,003%) в качестве консерванта. Изучаемую композицию использовали как донорскую фазу. Во всех случаях через подходящие промежутки времени из рецепторной камеры отбирали около 5,0 мл раствора, заменяя их равным объёмом свежего буфера. Количество фотосенсибилизатора, присутствующего в образцах, определяли флуориметрическим анализом. Эксперименты продолжались 30 минут и 5 часов. По каждому тесту проводилось 4 повтора. Образцы рецепторной фазы замораживали до флуориметрического определения после добавления соответствующего количества водного раствора додецилсульфата натрия (SDS; 4% мас./об.).

Метод разделения с помощью крио-микротома применяли для оценки количества фотосенсибилизатора, распределённого в различных слоях слизистой оболочки после тестов на проникновение. Процедуру получения срезов слизистой оболочки проводили при -25°C с помощью крио-микротома (Криостат модели Mev Slee Technik GMBH, Майнц, Германия). Мукозальную мембрану растягивали и скрепляли на специальной опоре с эпидермальной частью, обращённой кверху, а затем вводили в крио-микротом, где в течение нескольких секунд на неё оказывалось невысокое давление, параллельное опоре, посредством пластмассового диска. Эта операция, как оказалось, является важной для получения полных срезов слизистой оболочки, так как позволяет проследить "путь"

фталоцианина, начиная уже с самых верхних поверхностных слоёв. После замораживания слизистую оболочку рассекали на образцы толщиной 25 мкм и собирали различные срезы в предварительно откалиброванные виалы, помещая все фрагменты неполных срезов в первую виалу, первый полный срез толщиной 25 мкм – во вторую виалу и так далее, в соответствии со стандартизированной схемой, показанной в таблице 10.

Таблица 10. Пример забора срезов слизистой оболочки после разделения

	Число срезов	Всего мкм
Виала 1	Неполные срезы	Неизвестно
Виала 2	1	25
Виала 3	2 x 25	50
Виала 4	4 x 25	100
Виала 5	8 x 25	200
Виала 6	8 x 25	200
Виала 7	Остаток	Неизвестно

С учётом того, что количество фотосенсибилизатора в срезах предположительно снижается с увеличением глубины слоёв слизистой оболочки (следовательно, и количества срезов), для достижения количества фталоцианина, превышающего предел чувствительности аналитического метода, в одну и ту же виалу собирали большее число срезов, соответствующих наиболее глубокой части слизистой оболочки.

И, наконец, остаток слизистой оболочки, из которого больше невозможно было получить полный срез, помещали в последнюю виалу.

Толщину неполных срезов и остатка рассчитывали на основе их массы, сопоставляя со слоями слизистой оболочки с известной толщиной и массой.

Затем каждый образец подвергали расщеплению путём добавления подходящих количеств (1-10 мл) водного раствора SDS (4% мас./об.) при перемешивании в течение одного часа при комнатной температуре для извлечения из него фотосенсибилизатора. Изменение объёма расщепляющего раствора стало необходимым для того, чтобы можно было оптимально извлекать фотосенсибилизатор, содержащийся в биологическом образце, без чрезмерного разбавления раствора. Затем суспензию центрифугировали в течение 10 минут при 10 000 об./мин перед проведением анализа.

5.7 Количественное определение фотосенсибилизаторов

Для обеих молекул RLP068 и MRLP164 (обе с молекулярной массой = 1320,5) водный основной раствор, имеющий концентрацию примерно 1,0 мг/мл (0,76 мМ), обозначенный как S1 (базовый раствор), готовили в мерной колбе на 10,0 мл с помощью ультразвуковой ванны. Для соответствующего разбавления S1 (100 мкл) водным раствором SDS (4,0%) готовили стандарт S2 (0,0152 мМ) в мерной колбе на 5,0 мл. Для подходящего разбавления получали серию стандартов, начиная с S2, концентрация которых показана в таблице 11 в качестве примера.

Таблица 11. Концентрация растворов SDS (додецилсульфат натрия), используемых для построения калибровочной кривой

Стандарт	Концентрация RLP068 или MRLP164 (мкМ)
S2	15,2
S3	0,152
S4	0,127
S5	0,101
S6	0,076
S7	0,0505
S8	0,025
S9	0,304

Для флуориметрического определения стандарты S3-S9 и раствор, состоящий только из SDS (4% мас./об.), обрабатывали в пробирках Эппендорфа на 1,5 мл следующим образом:

- 100 мкл стандарта S3-S9 + 400 мкл SDS (4% мас./об.) + 500 мкл milliQ-воды (сверхчистая вода/фильтрованная через систему milliQ);

- 500 мкл SDS (4% мас./об.) + 500 мкл milliQ-воды (калибровочный образец, B1).

В качестве примера на фиг. 18 и 19 показаны калибровочные кривые, полученные в соответствии с описанной процедурой.

Для флуориметрического анализа фталоцианинов в образцах рецепторной фазы, полученных при исследованиях проникновения, калибровочный образец состоял из такого же калибровочного образца (B1), используемого для построения стандартной кривой.

Для образцов, полученных при экстракционной обработке слизистой оболочки, калибровочный образец состоял из супернатанта, полученного в результате обработки образца слизистой оболочки 4%-м раствором SDS, разбавленным следующим образом:

- 500 мкл супернатанта + 500 мкл milliQ-воды (калибровочный образец, B2).

5.8 Анализ водных образцов, полученных в исследованиях проникновения (рецепторная фаза)

Количественное определение фотосенсибилизатора, присутствующего в рецепторной фазе исследований проникновения “*ex vivo*”, проводили путём разбавления в соотношении 1:1 образца, извлечённого с помощью раствора SDS (4% мас./об.).

5.9 Анализ образцов щёчной слизистой оболочки

Разработка метода экстракции щёчной слизистой оболочки

Для количественного анализа фталоцианинов в образцах слизистой оболочки, полученных при изготовлении срезов крио-микротомом после выполнения исследований проникновения, был разработан метод экстракции, позволяющий количественно извлекать молекулы:

- точно взвешенный образец слизистой оболочки (в диапазоне от 2 до 100 мг)

помещали в стеклянные виалы и добавляли 10 мкл стандартного водного раствора фотосенсибилизатора (концентрация варьировалась от 1,0 до 50,0 мкМ). Спустя 3 часа к образцу добавляли различные объёмы раствора SDS (4% мас./об.) от 1 до 20 мл с последующим перемешиванием магнитной мешалкой в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем суспензию центрифугировали при 10 000 об./мин в течение 10 минут и супернатант анализировали с применением флуориметра после разбавления в соотношении 1:1 milliQ-водой. Результаты тестов на экстракцию для двух молекул показаны в таблице 12.

Процентное количество извлечённого фталоцианина составило для RPL068 и RPL164 соответственно 66,36 и 66,62%.

Таблица 12. Разработка метода извлечения RLP068 и MRLP164

Концентрация стандартных растворов (мкМ)	Масса слизистой оболочки (мг)	Извлечение RLP068 (%)	Масса слизистой оболочки (мг)	Извлечение MRLP164 (%)
10,0	6,17	66,06	75,91	69,76
45,0	12,65	70,30	3,65	67,15
8,5	2,31	63,24	15,58	66,74
50,0	91,38	69,28	83,64	63,89
1,0	15,73	62,97	8,46	69,01
25,0	78,06	66,31	28,07	63,18

Анализ фталоцианина в щёчной слизистой оболочке

Количество фталоцианина, содержащегося в различных слоях щёчной слизистой оболочки, определяли после обработки образцов в соответствии с изложенным в главе 5.6 и использованием раствора B2 в качестве холостого раствора для анализа.

5.10 Результаты

Результаты тестов на проникновение, проводившихся в течение 5 часов на предварительных композициях Гель 17-20 и контроле Гель 3, содержащих RLP068, показали, что фталоцианин (при этих условиях) не поддаётся определению в рецепторной фазе, что свидетельствует о том, что он не проникает в щёчную слизистую оболочку. Исследование распределения (фиг. 20) в слоях слизистой оболочки показывают, что бóльшее аккумулирование RLP068 происходило в случае композиций Гель 17 и Гель 18, хотя и в меньшей степени, чем в случае контрольного Геля 3.

Поскольку предварительные исследования показали, что

- наилучшие мукоадгезивные свойства наблюдались у композиций Гель 18 и Гель 20, значения которых сравнимы со значениями, полученными для контрольного Геля 3 (см. фиг. 17),

- бóльшее накопление фотосенсибилизатора в щёчной слизистой оболочке имело место в случае композиций Гель 17 и Гель 18 (см. фиг. 20),

- только композиция Гель 18 показала значения вязкости, сравнимые со значениями вязкости Геля 3 (см. таблицу 9), было решено протестировать композиции Гель 3 и Гель 18. Эти композиции были использованы для композиций на основе RLP068 и MRLP164 во второй части исследований проникновения и распределения через щёчную слизистую оболочку.

Таким образом, композициями, которые использовались для заключительной части исследования, служили Гель 3, Гель 18, Гель 21, Гель 22. К тому же, эти композиции были подвергнуты реологическому исследованию после разбавления искусственной слюной (см. главу 5.4).

Для того, чтобы проверить возможное аккумулирование фталоцианина в щёчной слизистой оболочке даже после короткого периода применения, композиции Гель 3, Гель 18, Гель 21, Гель 22 исследовали на проникновение/распределение лекарственного средства в течение 30 минут и 5 часов.

Из полученных результатов можно было сделать вывод, что ни в одном из случаев количество фотосенсибилизатора в рецепторной фазе не поддавалось определению, что указывает на неспособность активных молекул проникать из этих композиций через щёчную слизистую оболочку свиньи.

Результаты исследований распределения фотосенсибилизаторов в слизистой оболочке показаны на фиг. 21-24.

На основании полученных результатов можно наблюдать, что фталоцианин RLP068 в большем количестве аккумулируется в первых слоях слизистой оболочки (до 100 мкм) по сравнению с MRLP164, независимо от используемой композиции. Однако композиция, содержащая этанол (Гель 3), более эффективно способствует проникновению молекул в слизистую оболочку. Такое поведение также сохраняется и в течение 30 минут обработки – предположительного времени контакта при нанесении *in vivo*.

Промышленная разработка

Таким образом, разработка вышеуказанной композиции показала, что Гель 3 является наиболее подходящей композицией местного применения для клинической и промышленной разработки с конечной целью применения у пациента.

Первый промышленный прототип, разработанный на основе Геля 3, представлял собой композицию GEL (торговое название гель VULNOFAST® 0,3%), состоящую из

(a) RLP068/Cl	0,3% (мас./мас.)
(b) моноэтилового эфира диэтиленгликоля	10,0% (мас./мас.)
(c) пропиленгликоля	q.s* до 100% (мас./мас.)
(d) EtOH	10,0% (мас./мас.)

(e) гидроксипропилцеллюлозы (Klucel HF) 1,5% (мас./мас.)

*q.s = сколько потребуется для доведения до 100%.

В этой композиции (по сравнению с Гелем 3) снижение концентрации моноэтилового эфира диэтиленгликоля объясняется тем фактом, что результаты исследований стабильности, проводившихся на растворах RLP068/Cl в различных возможных эксципиентах, показали, что моноэтиловый эфир диэтиленгликоля, используемый в качестве растворителя RLP068/Cl, не обеспечивает адекватной защиты вышеуказанной молекулы от теплового стресса. Кроме того, выбор снижения концентрации моноэтилового эфира диэтиленгликоля в пользу концентрации пропиленгликоля, который, как оказалось, является наиболее многообещающим для получения готовой композиции, стабильной с тепловой точки зрения, был также предпринят в свете нормативных указаний FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, США), согласно которым максимальная концентрация моноэтилового эфира диэтиленгликоля должна быть менее 5% для трансдермального (чрескожного) применения и менее 25% для местного применения и, следовательно, ниже концентрации моноэтилового эфира диэтиленгликоля в Геле 3 (34,118%).

Однако вышеуказанная композиция GEL (ГЕЛЬ) показала некоторые критические точки в процессе перехода к промышленному производству, которые были устранены с помощью технологического варианта PLUS (ПЛЮС) (торговое название VULNOFAST® plus), состоящего из:

(a) RLP068/Cl	0,3% (мас./мас.)
(b) моноэтилового эфира диэтиленгликоля	5,0% (мас./мас.)
(c) пропиленгликоля	q.s до 100% (мас./мас.)
(e) гидроксипропилцеллюлозы (Klucel JF)	0,1% (мас./мас.)

Первым изменением, сделанным в композиции GEL, было исключение этанола. Было установлено, что этанол, вследствие его высокой воспламеняемости, является критичным компонентом с точки зрения расширения масштабов в процессе использовании производственных установок для изготовления промышленных партий. Кроме того, из-за его летучести, исключение этого компонента было гарантией предупреждения любых проблем с герметизацией первичной упаковки.

Что касается вязкости композиции, то следует подчеркнуть, что высокая вязкость

композиции GEL, обусловленная высокой концентрацией загустителя, привела, в процессе перехода к промышленному производству, к необходимости использования комбинации методов стерилизации, с тем чтобы обеспечить соответствие требованиям по

стерильности готового продукта. Действительно, композиция была изготовлена в асептических условиях (смешивание в условиях стерильности); эти операции, выполняемые вручную в изоляторе с положительным давлением, включают смешивание в асептических условиях порций полуфабриката, подвергнутого различным методам стерилизации. Такой метод работы был признан непрактичным с точки зрения последующего увеличения масштабов промышленного производства продукта более крупными партиями, прежде всего, из-за высокого экономического влияния на конечную цену продукта.

Вариант PLUS отличается составом с уменьшенным содержанием загустителя в соотношении 1:15, что позволило проводить стерилизацию готового продукта единым методом, а именно стерилизующей фильтрацией. Это изменение количественного состава загустителя привело к более отлаженному процессу, который легче контролировать в плане микробиологических характеристик.

К тому же, производственный способ, принятый для варианта PLUS, привёл к сокращению методов стерилизации первичных упаковочных материалов и к автоматизации операций асептического розлива с минимальным вмешательством операторов.

Переход на вариант PLUS позволил увеличить производственный масштаб устройства с всего лишь 2 кг состава для композиции GEL (гель VULNOFAST®) до 300-400 кг для варианта PLUS (VULNOFAST® plus), обеспечив заметное увеличение размера промышленных партий.

Вариант PLUS сравнивали с композицией GEL в следующем далее исследовании эффективности *in vivo* на мышах.

Эффективность ФДТ-лечения фотосенсибилизатором RLP068/Cl, представленным в двух вариантах (GEL и PLUS), против вида *Staphylococcus* оценивали на мышиной модели раневой инфекции.

В исследовании использовали мышей-самцов линии BALB/c. Устойчивый к метициллину клинический изолят *Staphylococcus aureus* использовали для экспериментальной инфекции (штамм ATCC 43300, предоставлен отделением инфекционных болезней больничного комплекса Анконы, Италия [Ospedali riuniti [Torrette section]). Колонии бактерий собирали после 18 часов роста на агаре с сердечно-мозговым экстрактом (BHI) и суспендировали в физиологическом растворе до достижения конечной инокуляции 1×10^8 клеток/мл.

В день 0 мышей анестезировали и сбривали волосы в области спины; затем кожу очищали 10%-ным раствором повидон-йода. С помощью шаблона диаметром 0,7 мм на

каждое животное наносили рану, которая пересекала *panniculus carnosus* в подкожном слое кожи спины. На каждую рану помещали клейкий марлевый тампон с последующей инокуляцией 100 мкл бактериальной суспензии. Раневой карман закрывали шовными скобками. Эта процедура приводит к локальному абсцессу, который развивается спустя 24-48 ч.

Спустя 48 ч (день +2), то есть после размножения бактерий внутри раны и её инфицирования, раны открывали, марлю удаляли и начинали ФДТ-лечение фотосенсибилизатором RLP068/Cl.

Группы, получавшие лечение, кратко описаны ниже:

группа A - инфекционный контроль (без лечения)

группа B - контроль света (светодиодный источник при 630 нм)

группа C - APDT-лечение (антибактериальная фотодинамическая терапия) композицией GEL 0,3% + светом (светодиодный источник (630 нм))

группа D - APDT-лечение композицией PLUS 0,3% + светом (светодиодный источник (630 нм)).

Среднее относится к 2 независимым экспериментам с n=8/экспериментальную группу. В окончательной обработке n = 13-15/группу.

Результаты

• Одна фотодинамическая терапия (ФДТ), основанная на применении RLP068/Cl, разработанного в двух вариантах (GEL и PLUS), показала себя очень эффективной при концентрации, равной 0,3% (мас./мас.), и бактериальная нагрузка была существенно ниже по сравнению с необработанными контролями при времени контакта с участком поражения кожи как 60 минут, так и 30 минут.

• ФДТ на основе применения RLP068/Cl, разработанного в двух вариантах (GEL и PLUS), значительно отличалась также от группы, лечение которой проводилось только светом (группа B); фактически, один лишь свет не способен снизить бактериальную нагрузку.

Таким образом, результаты этого неклинического экспериментального исследования, проведенного на “язвоподобной” трансляционной модели на мыши, позволили подтвердить биоэквивалентность в плане эффективности, а также переносимость двух композиций GEL (ГЕЛЬ) и PLUS (ПЛЮС) по настоящему изобретению.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для местного применения, содержащая или состоящая из:

(a) производного Zn-фталоцианина в качестве фотосенсибилизирующего агента;

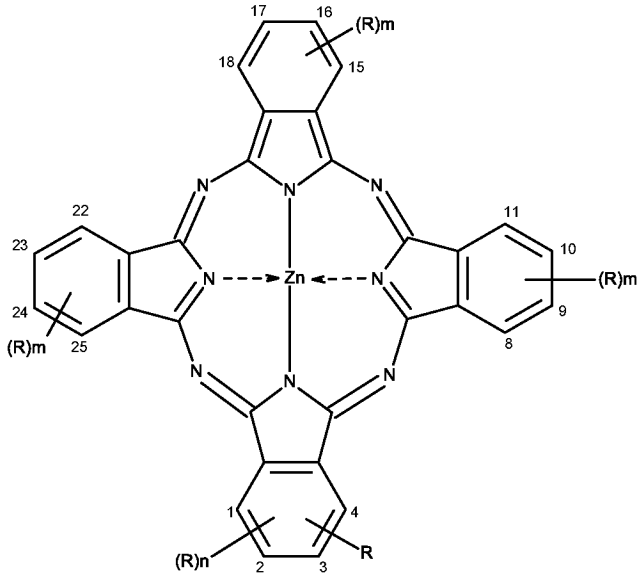
(b) моноалкилового эфира диэтиленгликоля в качестве промотора проникновения в кожу, содержащегося в количестве от 3 до 35% (мас/мас);

(c) растворителя, выбранного из группы, состоящей из пропиленгликоля и полиэтиленгликоля;

(d) необязательно, сопромотора проникновения в кожу, выбранного из группы, состоящей из EtOH (этанол) и iPrOH (изопропанол);

(e) агента, регулирующего вязкость, выбранного из группы, состоящей из гидроксипропилцеллюлозы (HPC), гидроксиметилпропилцеллюлозы (HMPC), поливинилового спирта (PVA), карбоксиметилцеллюлозы (CMC);

в которой указанное производное Zn-фталоцианина (a) имеет формулу (I)

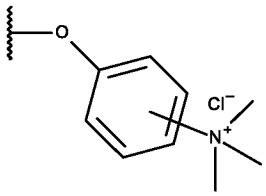


… (I),

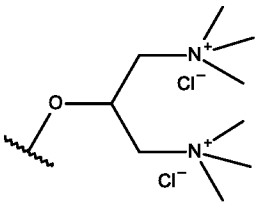
где

n = 0, 1 и m =0, 1, 2, при этом, если n = 0, то m = 0, 1; если n = 1, то m = 0, 2;

R представляет собой



или



.

2. Композиция по п. 1 в виде неводного прозрачного геля.

3. Композиция по любому из пп. 1-2, отличающаяся тем, что она не содержит консервантов, стабилизаторов и других промоторов проникновения в кожу, включающих,

в частности, масло чайного дерева (TTO), (±)-α-бисаболол (BIS) и изопропилмиристат (MYR).

4. Композиция по любому из предшествующих пунктов, имеющая вязкость от 25 до 1900 сП; предпочтительно в некоторых вариантах осуществления вязкость составляет от 25 до 65 сП, в других вариантах осуществления вязкость составляет от 50000 до 190000 сП.

5. Композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой

фотосенсибилизатор (a) содержится в количестве от 0,050 до 0,500% (мас./мас.);

моноалкиловый эфир диэтиленгликоля (b) содержится в количестве от 3 до 35% (мас./мас.);

растворитель (c) содержится в достаточном количестве для получения 100% (мас./мас.) композиции;

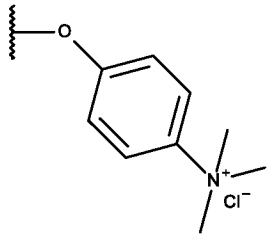
сопромотор (d) содержится в количестве от 0 до 15% (мас./мас.);

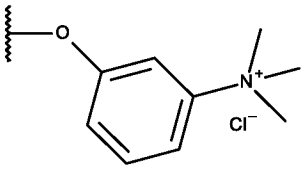
агент (e), регулирующий вязкость, содержится в количестве от 0,05 до 3% (мас./мас.).

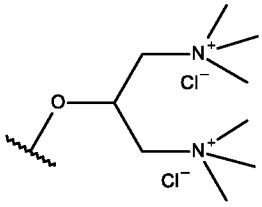
6. Композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой фотосенсибилизатор (a) является соединением формулы (I), где

n = 0, m = 0 и

R в положении 1 или 2 представляет собой



;


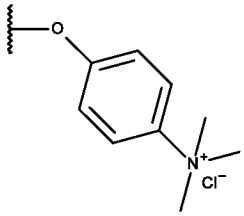
или


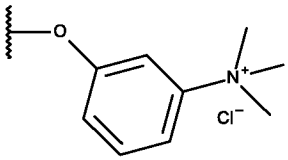
;

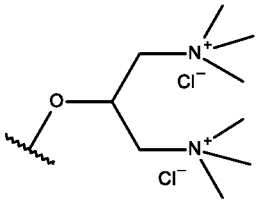
либо

n = 1, m = 0 и

R в положениях 1,4 или 2,3 представляет собой



;


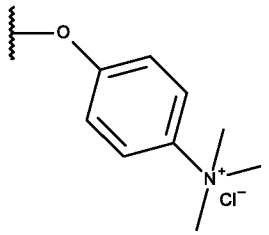
или


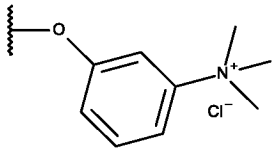
;

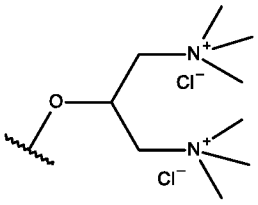
либо

n = 0, m = 1 и

R в положениях 1,8(11),15(18),22(25) или 2,9(10)16(17),23(24)) представляет собой



; 

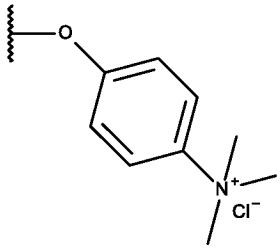
или 

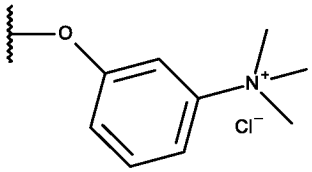
;

либо

n = 1, m = 2 и

R в положениях 2,3,9,10,16,17,23,24 представляет собой



или 

.

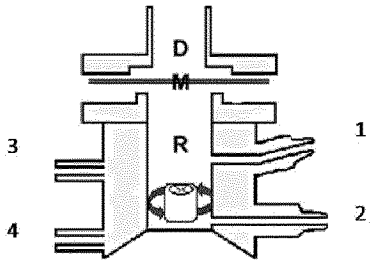
7. Композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой фотосенсибилизатор (a) является соединением 1,8(11),15(18),22(25)-тетракис[3-(N,N,N-триметиламмоний)фенокси]фталоцианината цинка (II) тетрахлорид (RLP068/Cl).

8. Композиция по п. 7, состоящая из

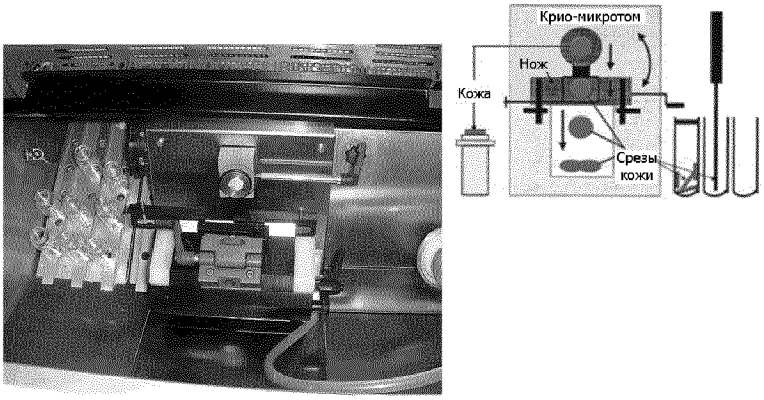
(a) RLP068/Cl	0,1-0,3% (мас./мас.)
(b) моноэтилового эфира диэтиленгликоля	5,0-10,0% (мас./мас.)
(c) пропиленгликоля	q.s* до 100% (мас./мас.)
(d) EtOH	0-10,0% (мас./мас.)
(e) гидроксипропилцеллюлозы	0,1-1,5% (мас./мас.).

9. Композиция по любому из предшествующих пунктов для применения в фотодинамической терапии поражений кожи или слизистой оболочки и для стимуляции процессов заживления и рубцевания.

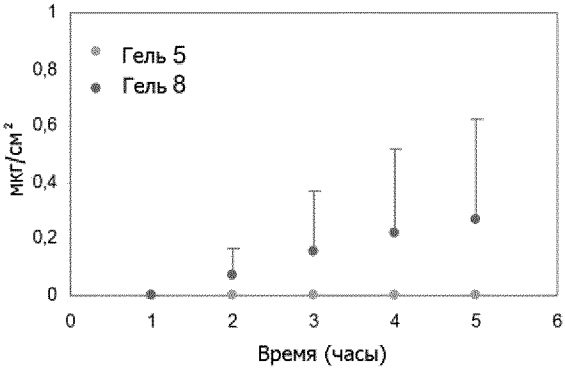
10. Композиция для применения по п. 9 в комбинации с облучением красным светом для локализованного местного лечения кожных инфекций микробного происхождения, вызванных грамположительными, грамотрицательными патогенами, дрожжами, грибками и простейшими.

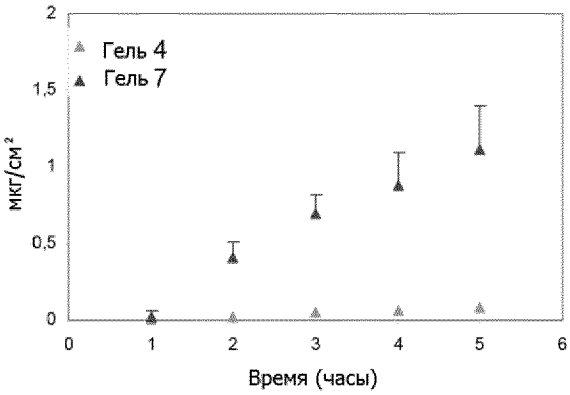


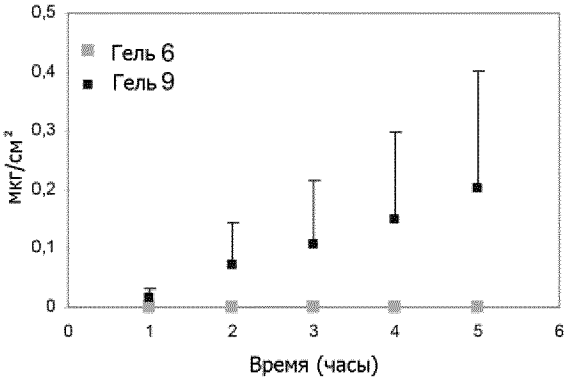
Фиг. 1



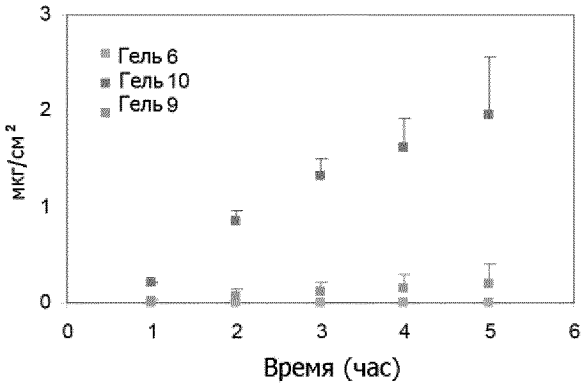
Фиг. 2


Гель 5
Гель 8
мкг/см²
Время (часы)

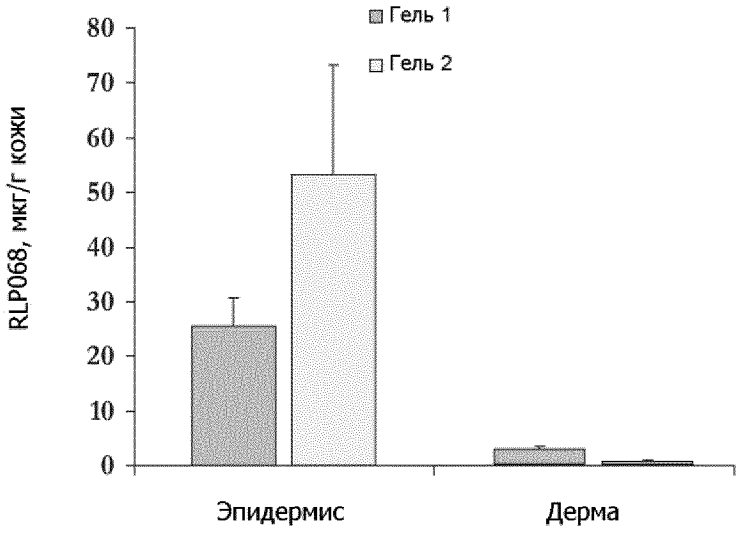

Гель 4
Гель 7
мкг/см²
Время (часы)


Гель 6
Гель 9
мкг/см²
Время (часы)

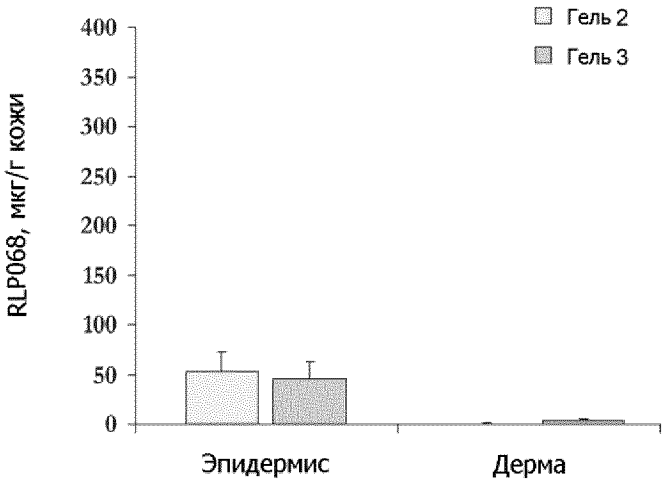
Фиг. 3


Гель 6
Гель 10
Гель 9
мкг/см²
Время (час)
0
1
2
3
4
5
6

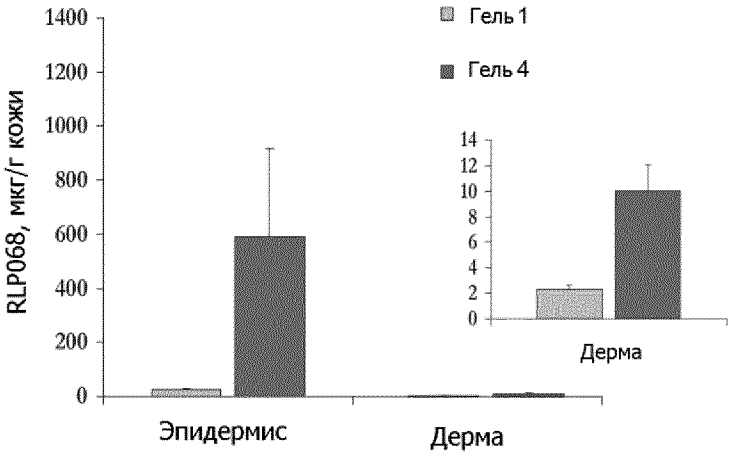
Фиг. 4


Гель 1
Гель 2
RLP068, мкг/г кожи
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Эпидермис
Дерма

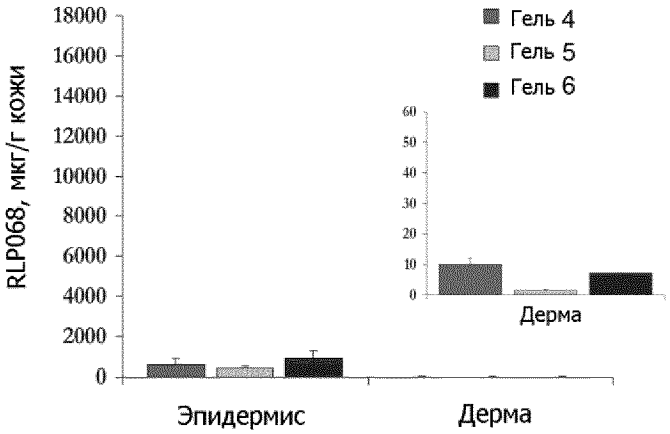
Фиг. 5


Гель 2
Гель 3
RLP068, мкг/г кожи
400
350
300
250
200
150
100
50
0
Эпидермис
Дерма

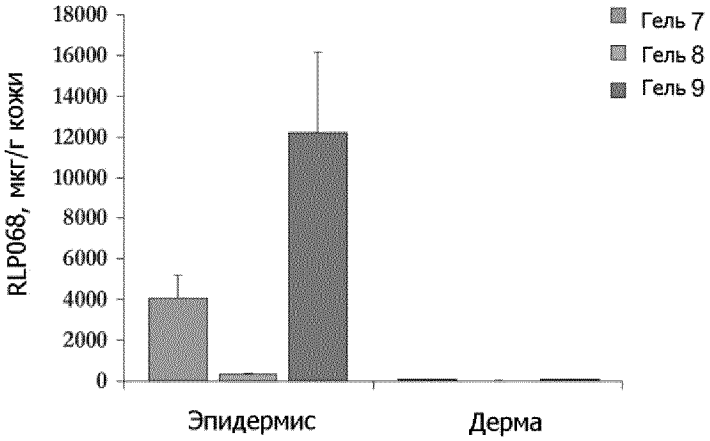
Фиг. 6


Гель 1
Гель 4
RLP068, мкг/г кожи
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
14
12
10
8
6
4
2
0
Дерма
Эпидермис
Дерма

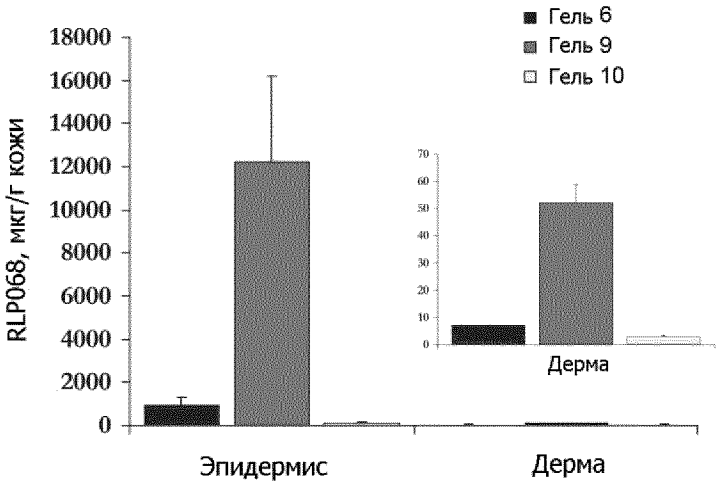
Фиг. 7


18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
RLP068, мкг/г кожи
Гель 4
Гель 5
Гель 6
60
50
40
30
20
10
0
Дерма
Эпидермис
Дерма

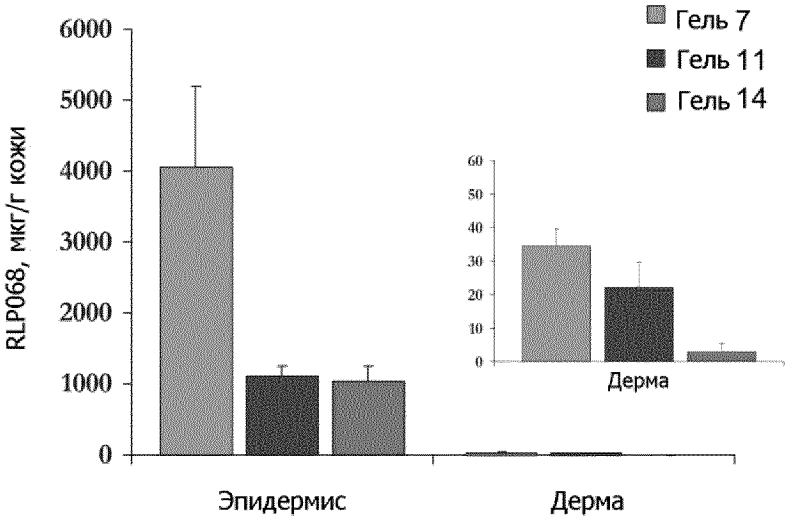
Фиг. 8


18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
RLP068, мкг/г кожи
Гель 7
Гель 8
Гель 9
Эпидермис
Дерма

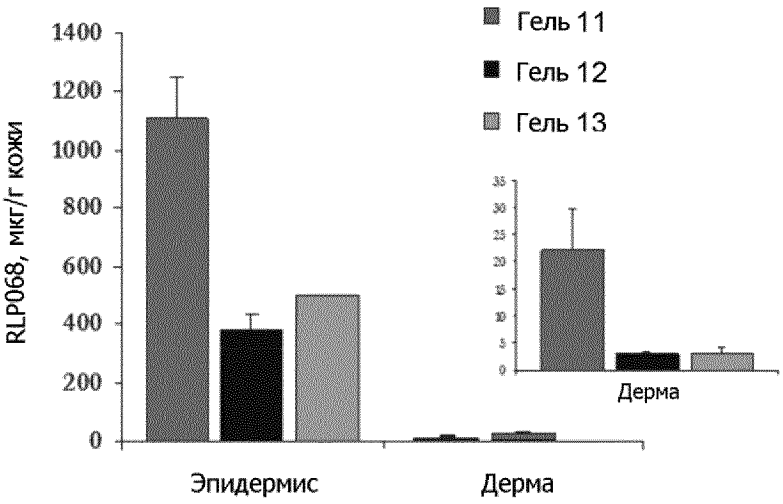
Фиг. 9


Гель 6
Гель 9
Гель 10
RLP068, мкг/г кожи
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
70
60
50
40
30
20
10
0
Дерма
Эпидермис
Дерма

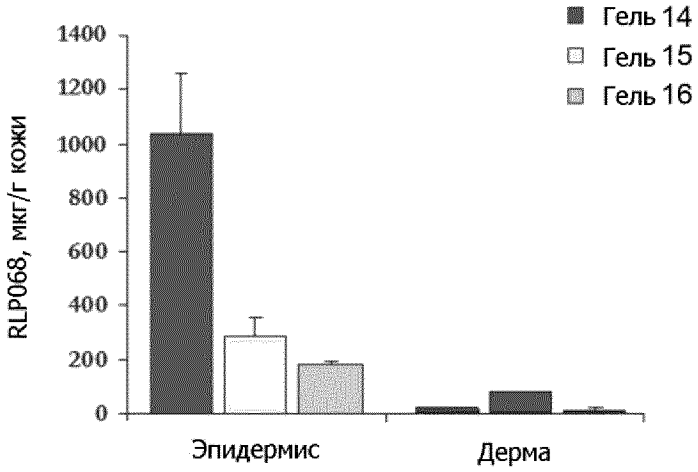
Фиг. 10


Гель 7
Гель 11
Гель 14
RLP068, мкг/г кожи
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
60
50
40
30
20
10
0
Дерма
Эпидермис
Дерма

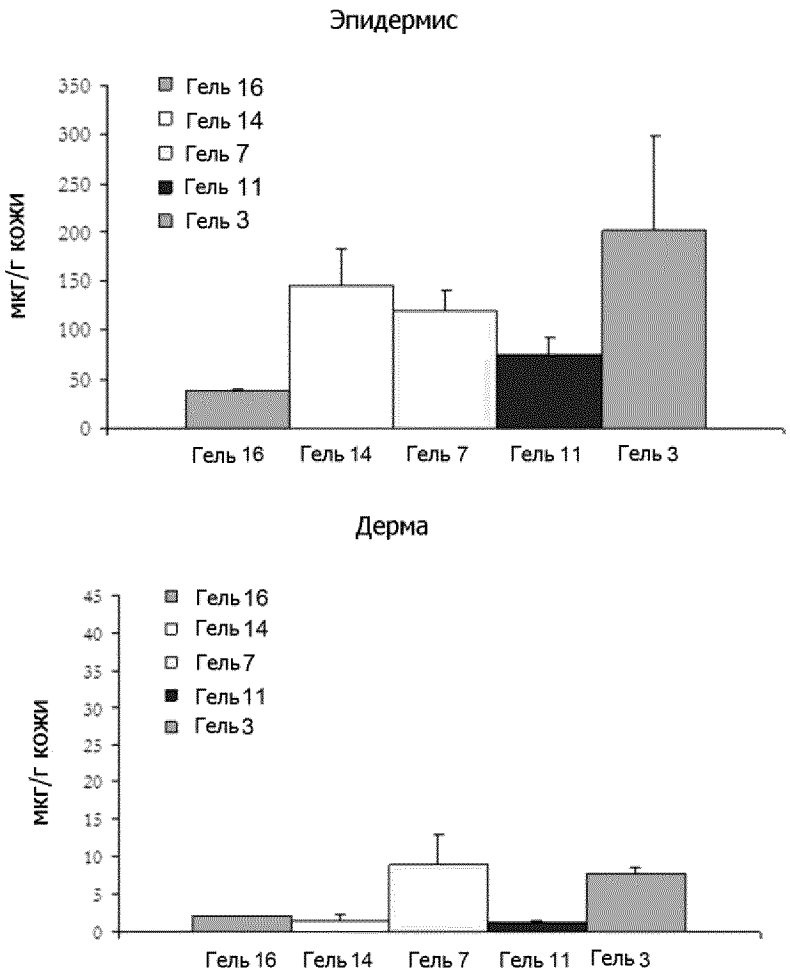
Фиг. 11


Гель 11
Гель 12
Гель 13
RLP068, мкг/г кожи
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Эпидермис
Дерма
Дерма

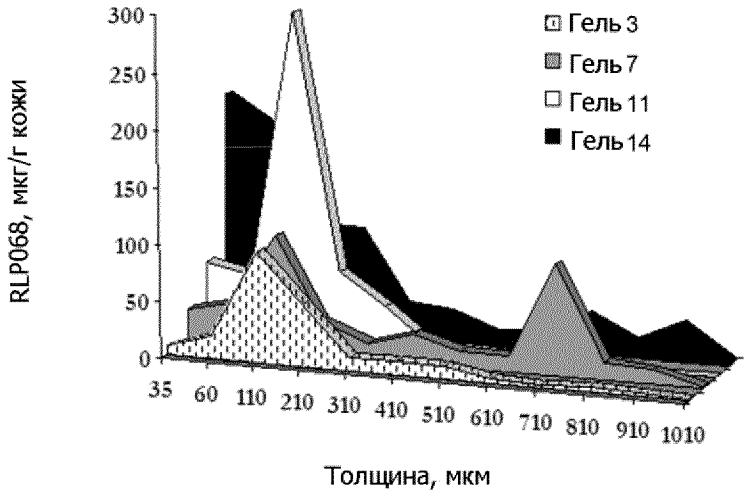
Фиг. 12


Гель 14
Гель 15
Гель 16
RLP068, мкг/г кожи
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Эпидермис
Дерма

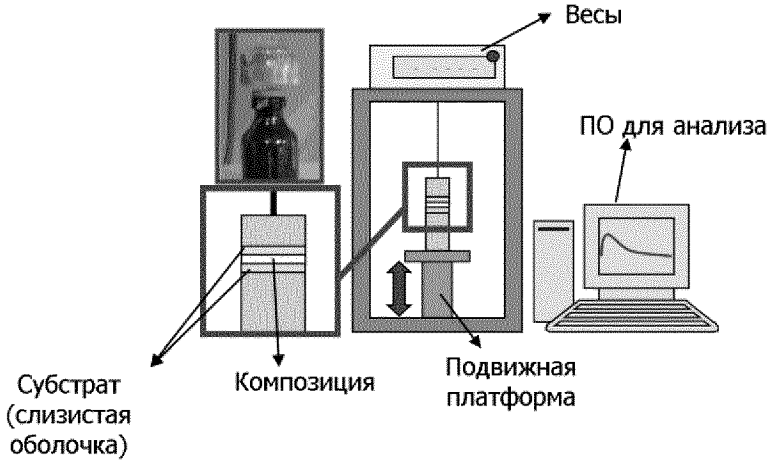
Фиг. 13


Эпидермис
мкг/г кожи
350
300
250
200
150
100
50
0
Гель 16
Гель 14
Гель 7
Гель 11
Гель 3
Гель 16
Гель 14
Гель 7
Гель 11
Гель 3
Дерма
мкг/г кожи
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Гель 16
Гель 14
Гель 7
Гель 11
Гель 3
Гель 16
Гель 14
Гель 7
Гель 11
Гель 3

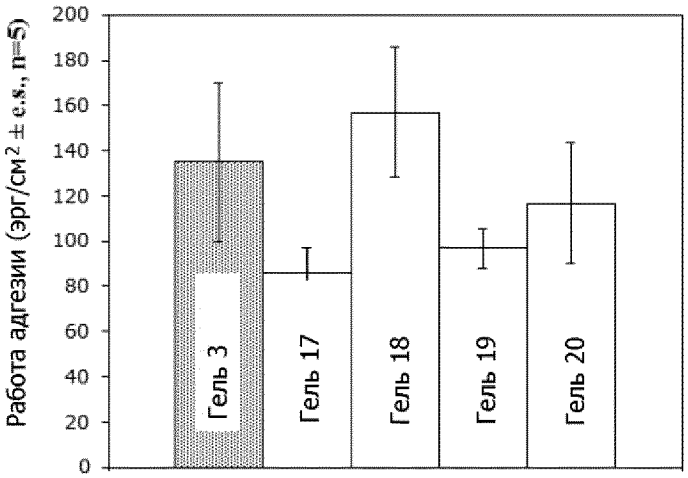
Фиг. 14


300
250
200
150
100
50
0
RLP068, мкг/г кожи
Гель 3
Гель 7
Гель 11
Гель 14
35
60
110
210
310
410
510
610
710
810
910
1010
Толщина, мкм

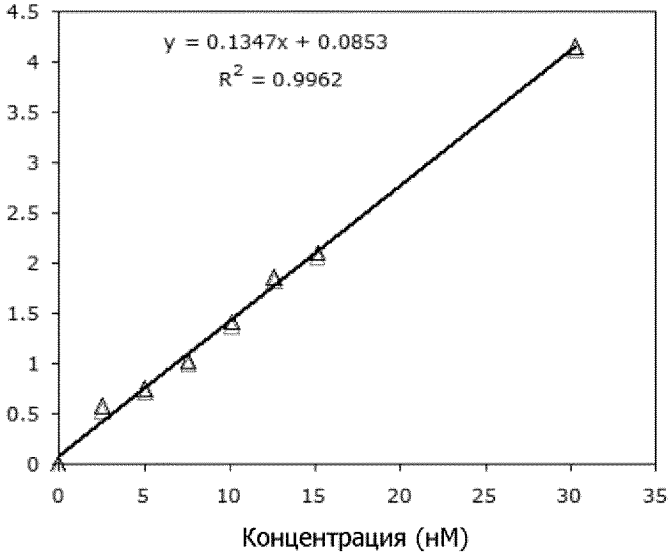
Фиг. 15


Весы
ПО для анализа
Субстрат (слизистая оболочка)
Композиция
Подвижная платформа

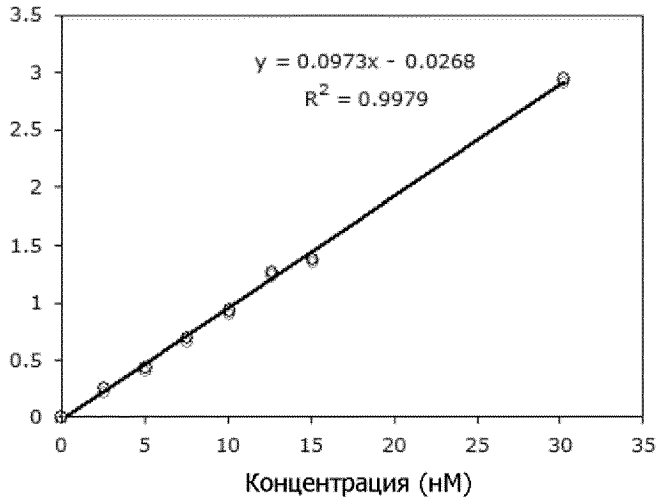
Фиг. 16


Работа адгезии (эрг/см^2 ± e.s., n=5)
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Гель 3
Гель 17
Гель 18
Гель 19
Гель 20

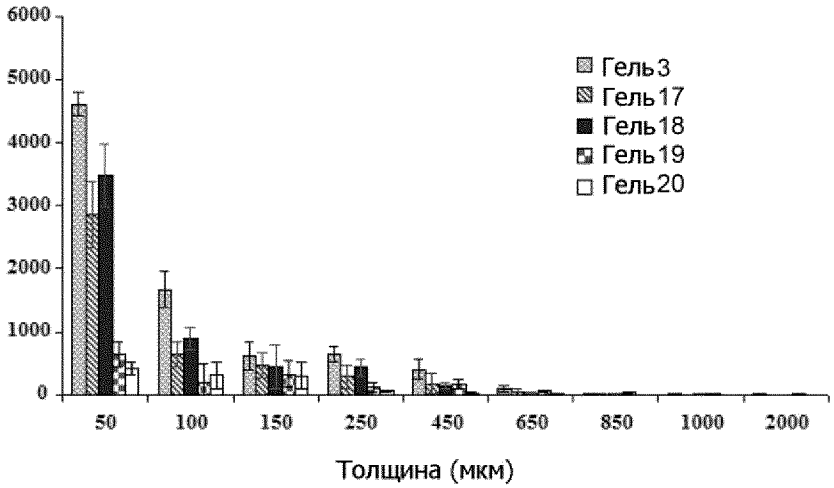
Фиг. 17


y = 0.1347x + 0.0853
R^2 = 0.9962
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
5
10
15
20
25
30
35
Концентрация (нМ)

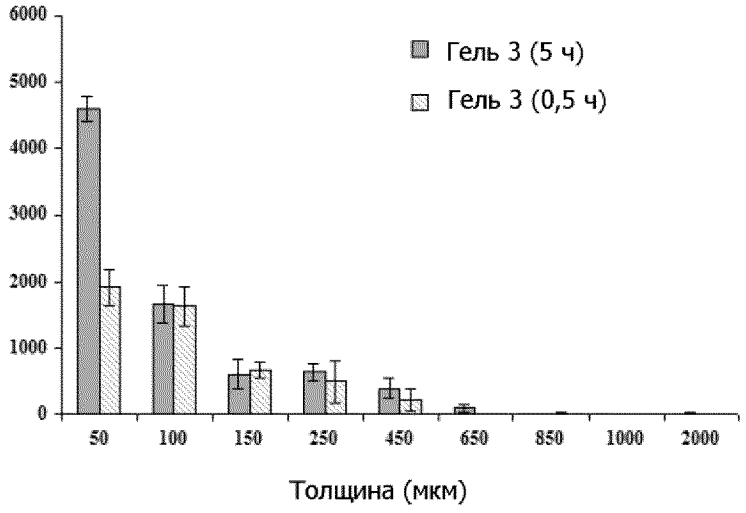
Фиг. 18


y = 0.0973x - 0.0268
R2 = 0.9979
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
5
10
15
20
25
30
35
Концентрация (нМ)

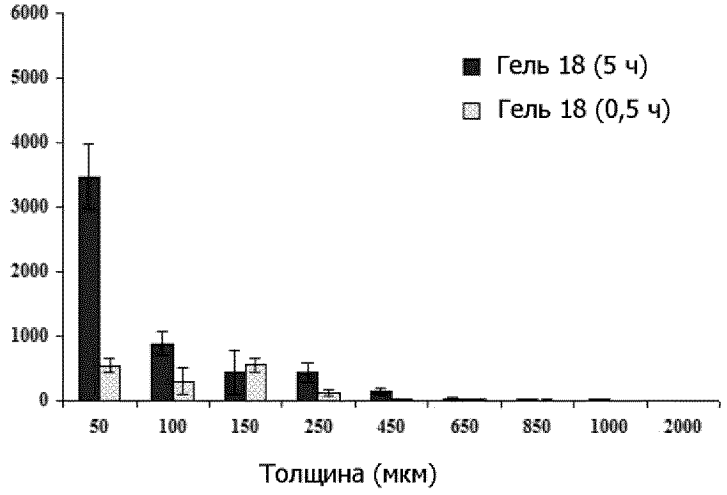
Фиг. 19


6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Гель3
Гель17
Гель18
Гель19
Гель20
50
100
150
250
450
650
850
1000
2000
Толщина (мкм)

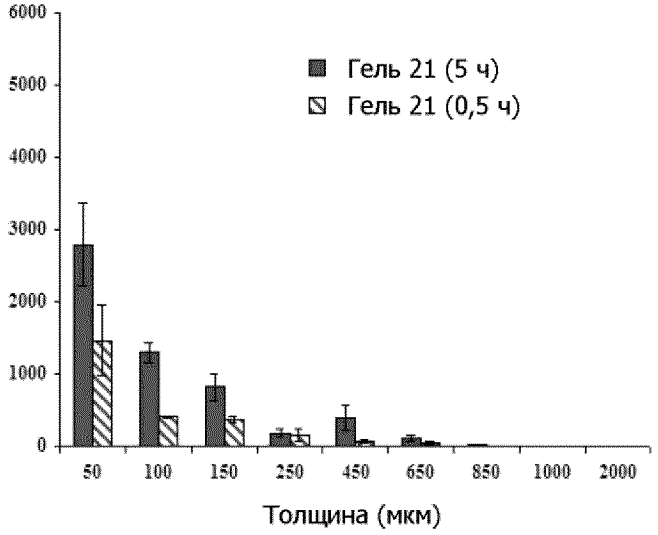
Фиг. 20


6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Гель 3 (5 ч)
Гель 3 (0,5 ч)
50
100
150
250
450
650
850
1000
2000
Толщина (мкм)

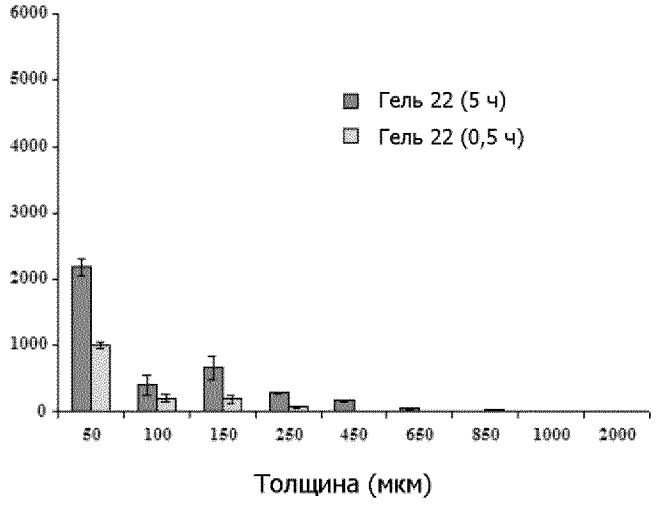
Фиг. 21


6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Гель 18 (5 ч)
Гель 18 (0,5 ч)
50
100
150
250
450
650
850
1000
2000
Толщина (мкм)

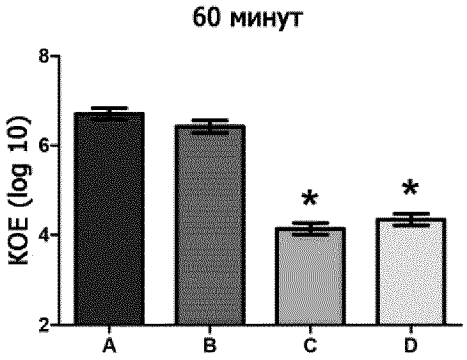
Фиг. 22


6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Гель 21 (5 ч)
Гель 21 (0,5 ч)
50
100
150
250
450
650
850
1000
2000
Толщина (мкм)

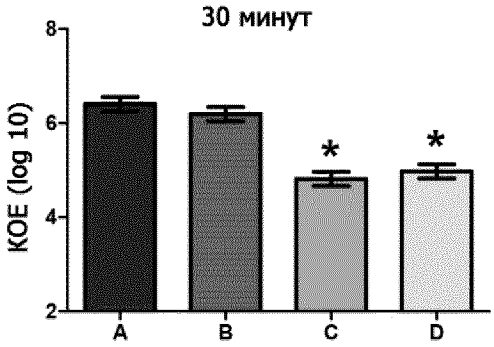
Фиг. 23


6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Гель 22 (5 ч)
Гель 22 (0,5 ч)
50
100
150
250
450
650
850
1000
2000
Толщина (мкм)

Фиг. 24



Фиг. 25



Фиг. 26