

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202390264** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.03.28**

(22) Дата подачи заявки  
**2021.07.07**

(51) Int. Cl. *A01N 59/00* (2006.01)  
*A01N 37/02* (2006.01)  
*A01N 25/04* (2006.01)  
*A01N 25/10* (2006.01)  
*A01N 25/34* (2006.01)  
*A01P 1/00* (2006.01)

---

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ДЕЗИНФЕКЦИИ, ЛЕЧЕНИЯ И  
ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ МИКРОБНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

---

(31) **63/048,815**

(32) **2020.07.07**

(33) **US**

(86) **PCT/IB2021/000462**

(87) **WO 2022/008972 2022.01.13**

(71) Заявитель:

**ВИАБ ВОТЕР ИННОВЕЙШН АБ (SE)**

(72) Изобретатель:

**Алмас Геир Хермод, Ронгвед Пол,  
Бьярнхолт Томас (NO)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Изобретение обеспечивает стабильные противомикробные и дезинфицирующие композиции, включающие использование твердого предшественника окисленного состояния хлора. Настоящее изобретение также обеспечивает сосуды для хранения и смешивания по требованию и способы приготовления и доставки композиций по требованию. Кроме того, изобретение обеспечивает противовирусные, антибиотические и общие противомикробные применения in vivo, на поверхностях и путем распыления.

**A1**

**202390264**

**202390264**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577069EA/071

### КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ДЕЗИНФЕКЦИИ, ЛЕЧЕНИЯ И ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ МИКРОБНЫХ ИНФЕКЦИЙ

#### Перекрестная ссылка на родственную заявку(заявки)

Настоящая заявка заявляет приоритет и преимущество предварительной заявки США № 63/048815, поданной 7 июля 2020 г., содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

#### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение в целом относится к новым композициям, содержащим комбинации твердого или жидкого предшественника окисленного состояния хлора и уксусной кислоты или ее солей, при этом такие композиции являются полезными дезинфицирующими средствами для лечения широкого спектра бактериальных и/или вирусных, грибковых и паразитарных патогенов, и в совокупности обозначаемых в настоящей заявке микроорганизмами.

#### Предпосылки создания изобретения

Инфекционные заболевания являются ведущей причиной смертности во всем мире и являются причиной 13 миллионов смертельных случаев ежегодно, в том числе почти двух третей всех случаев детской смертности. Более того, резистентность к антибиотикам растет и способствует заболеваемости широким спектром болезней человека, включая пневмонию, туберкулез и холеру. Особую озабоченность вызывает то, что у ряда патогенов человека развилась резистентность к обычным антибиотикам. Внедрение новых, более сильнодействующих производных существующих антибиотиков обеспечивает лишь временное решение, поскольку существующие механизмы резистентности быстро адаптируются к новым производным. Хотя резистентные грамположительные бактерии представляют значительную угрозу, особую озабоченность вызывает появление штаммов с множественной лекарственной резистентностью (MDR) распространенных грамотрицательных патогенов, таких как *Escherichia coli*. Кроме того, было показано, что изоляты *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* и *Enterobacteriaceae* устойчивы практически ко всем антибиотикам.

Вирусы также представляют серьезную проблему в инфекционной эпидемиологии. Серьезные вирусные вспышки, многие из которых имеют зоонозное происхождение, становятся все более распространенными. Например, вспышки SARS (тяжелый острый респираторный синдром) и MERS (ближневосточный респираторный синдром) в начале-середине 2000-х годов, пандемия H1N1 в 2009 году и последующая пандемия SARS CoV-2 в 2020 году сфокусировали внимание как на лечении, так и на профилактике распространения этих вирусных патогенов.

Многие вирусы, поражающие дыхательные пути, передаются воздушно-капельным путем. В этом случае вдыхаемые капли, содержащие вирус, выделяются инфицированным субъектом и подхватываются другими при прямом контакте или при контакте с

поверхностями, на которые попадают капли. Как правило, заражение происходит через связывание вируса с рецепторами на клетках слизистой оболочки или эпителиальных клетках в результате попадания в нос, глаза, уши или рот. Кроме того, некоторые вирусы передаются через аэрозольные частицы, содержащие вирус, или переносятся по воздуху. В любом случае вирус может выживать от нескольких часов до нескольких дней после его выделения инфицированным субъектом.

Обычных композиций и способов дезинфекции поверхностей или контаминированного эпителия недостаточно для инактивации всех инфекционных агентов. Для существующих форм обычных дезинфицирующих композиций может требоваться длительное и нецелесообразное время воздействия, или могут использоваться опасные или вызывающие коррозию растворы или пары, которые нельзя использовать на чувствительных инструментах или на живых тканях, и, таким образом, они не обеспечивают практических решений для растущих рисков для здоровья, связанных с резистентными патогенами.

Оксиды хлора, или окисленный хлор (также обозначаемый в настоящей заявке как "ОС"), включают большой класс химических веществ и часто встречаются в природе, а также в биологических системах у млекопитающих. Оксиды хлора также могут существовать в виде нейтральных соединений или ионов, так называемых оксианионов. Существует несколько оксианионов хлора, в которых оксианион может принимать степень окисления +1, +3, +5 или +7 с соответствующими анионами гипохлорита ( $\text{ClO}^-$ ), хлорита ( $\text{ClO}_2^-$ ), хлората ( $\text{ClO}_3^-$ ) или перхлората ( $\text{ClO}_4^-$ ). Стандартный потенциал восстановления при низком pH хлорноватистой кислоты ( $\text{HOCl}$ ) составляет +1,63, а для хлористой кислоты ( $\text{HClO}_2$ ) стандартный потенциал восстановления составляет 1,64, и при щелочном pH они составляют +0,89 и +0,78, соответственно. При pH от 5 до 7 потенциалы восстановления выше +1.

Следовательно, гипохлорит и хлорит, как правило, являются наиболее полезными состояниями окисления, способными убивать микробов и паразитов. В частности, хлорид-ион  $\text{Cl}^-$  находится в наиболее стабильном состоянии окисления и не является реакционноспособным, а также неэффективен в качестве дезинфицирующего средства. Хлорат и перхлорат в степени окисления +5 и +7 более реакционноспособны, чем в более низких степенях окисления, и с ними может быть труднее обращаться.

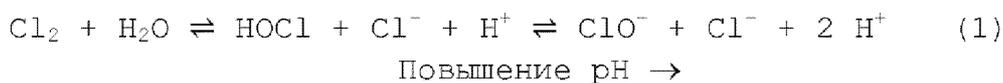
Гипохлорит-ион имеет химическую формулу  $\text{ClO}^-$ , где хлор ( $\text{Cl}$ ) находится в степени окисления +1, что является потенциально нестабильным состоянием окисления, поскольку низкоэнергетическим состоянием окисления  $\text{Cl}$  является -1. И гипохлорит-ион, и хлорит-ион объединяются с рядом катионов с образованием гипохлоритов и хлоритов в виде солей такого окисленного хлора. Типичные примеры включают гипохлорит натрия (бытовой отбеливатель) и гипохлорит кальция, основной активный ингредиент коммерческих продуктов, включая хлорную известь, хлорный порошок или хлорированную известь, обычно используемых для обработки воды (например, в бассейнах и т.п.). Хлорит- и гипохлорит-ионы, также называемые в настоящей заявке "основными оксидами хлора",

полезны в различных контекстах. Хлорит и гипохлорит натрия являются сильными окислителями и используются для очистки воды, дезинфекции, а также для отбеливания и дезодорации продуктов животного происхождения.

Поскольку гипохлорит натрия образует высокотоксичный газообразный хлор в кислотных условиях, коммерчески доступные водные растворы для бытовых целей представляют собой сильнощелочные растворы, рН которых регулируют с использованием гидроксида натрия.

Хлорноватистая кислота является слабой кислотой, которая, как известно, быстро инактивирует бактерии, водоросли, грибки и другие органические вещества, что делает ее эффективным средством против широкого спектра микроорганизмов. Кроме того, хлорноватистая кислота, как правило, нетоксична для человека, потому что это слабая кислота, и люди естественным образом вырабатывают определенные соединения, которые позволяют им переносить хлорноватистую кислоту. Было обнаружено, что благодаря сочетанию биоцидных свойств и профиля безопасности хлорноватистая кислота имеет множество полезных применений во многих различных отраслях, таких как медицина, общественное питание, розничная торговля продуктами питания, сельское хозяйство, уход за ранами, лаборатории, гостиничный бизнес, стоматология или цветочный бизнес.

Хлорноватистая кислота образуется при растворении хлора в воде. В частности, при подкислении гипохлорита образуется хлорноватистая кислота, в которой атом хлора имеет степень окисления +1. Хлорноватистая кислота находится в равновесии с газообразным хлором, который может выделяться из раствора. Равновесие зависит от рН, как показано в следующем уравнении (Уравнение 1):



Что касается вышеприведенного уравнения (уравнение 1), высокий рН смещает реакцию вправо, способствуя диспропорционированию хлора в хлорид и гипохлорит, тогда как низкий рН смещает реакцию влево, способствуя выделению газообразного хлора ( $\text{Cl}_2$ ), который может быть токсичным.

Серьезной проблемой предшествующего медицинского применения растворов хлора, особенно в состоянии окисления выше чем -1, является его стабильность, поскольку эти химические соединения находятся в более высоком энергетическом состоянии и имеют тенденцию возвращаться к хлорид-иону  $\text{Cl}^-$  и будут разлагаться в растворе при температуре окружающей среды. Это не позволяет обеспечить стабильность с требуемым сроком годности в условиях окружающей среды для включающих оксид хлора фармацевтических препаратов и медицинских устройств. Соответственно, для растворов оксидов хлора трудно обеспечить надлежащий срок хранения, который требуется для медицинских устройств и лекарственных средств. Это присущее всем оксидам хлора ограничение ограничивает транспортировку и хранение, особенно при более высокой температуре в местах с переменной температурой, низкой влажностью и атмосферными газами.

Таким образом, в то время как композиции, содержащие оксиды хлора, могут быть эффективными противомикробными средствами, обычные композиции имеют существенные недостатки. Например, слабая кислота НОСІ является нестабильной и загрязненной, когда ее получают в обычных условиях. Следовательно, существует потребность в более контролируемых и обеспечивающих немедленное получение способами, которые могут обеспечивать стабильность оксидов хлора на месте, что делает возможным их целевое краткосрочное использование. В целом существует значительная неудовлетворенная медицинская потребность в новых терапевтических средствах для лечения резистентных микробов и вирусов.

### **Сущность изобретения**

Настоящее изобретение обеспечивает дезинфицирующие композиции, включающие предшественников окисленных состояний хлора, растворенных в фармацевтически приемлемых разбавителях, адъювантах или носителях и объединенных с активаторами. Полученные композиции обеспечивают улучшенные противомикробные препараты для использования *in vivo*, а также для дезинфекции поверхностей. В предпочтительном составе композиции по изобретению включают активатор, такой как уксусная кислота, в комбинации с формой гипохлорита. Необязательно, композиции по изобретению можно объединить с усилителем вязкости и/или красителем. Например, вязкость композиций по изобретению можно регулировать для образования геля с использованием усилителей вязкости. Композиции по изобретению предпочтительно смешивают в контейнере, включающем отдельные секции в качестве части многосекционного устройства, перед применением. Композиции по изобретению могут быть сформулированы для перорального, внутривенного, кожного или ингаляционного введения. Кроме того, композиции по изобретению могут быть получены для ингаляции через небулайзер или подобное устройство для быстрого введения в дыхательную систему пациента. Таким образом, композиции по изобретению являются полезными дезинфицирующими средствами для лечения широкого спектра бактериальных и/или вирусных патогенов как *in vivo*, так и на поверхностях.

В конкретном аспекте настоящее изобретение направлено на противомикробные композиции, которые обеспечивают безопасные и эффективные средства лечения и профилактики респираторных инфекций, включая как вирусные, так и бактериальные инфекции. Предпочтительная композиция включает противовирусный и/или антибактериальный ингаляционный раствор широкого спектра действия на основе хлорноватистой кислоты. Растворы по изобретению предпочтительно распыляют для ингаляционной доставки. Более конкретно, предпочтительная композиция включает хлорноватистую кислоту (НОСІ) (от около 25 ч/млн до около 200 ч/млн), которая стабилизирована уксусной кислотой (приблизительно 0,25%), что приводит к устойчивым концентрациям НОСІ со значительными противомикробными эффектами. Добавление уксусной кислоты повышает стабильность НОСІ, давая возможность, таким образом, разработать лечение с увеличенным сроком хранения. Кроме того, композицию

предпочтительно формулируют при рН 5,5, и она является физиологически изотонической, что повышает переносимость в дыхательных путях.

Композиции по настоящему изобретению обладают уникальными антипатогенными свойствами. В одном аспекте композиции по изобретению действуют на оболочечные вирусы и обеспечивают превосходные противовирусные эффекты против вирусов корона-типа. Соответственно, такие композиции особенно полезны для лечения и предотвращения распространения инфекций SARS (например, COVID-19). В частности, SARS-CoV-2 и многие другие вирусы имеют поверхностные белки (например, спайк-белки), которые являются точками входа в клетки дыхательной системы. Эти спайк-белки включают -SH-группы, уязвимые для окисления посредством HOCl. Даже относительно низкие концентрации HOCl окисляют внеклеточные -SH-группы (например, на вирусных спайк-белках), будучи безвредными для нормальных тканей и внутриклеточных ферментов. Таким образом, противовирусный эффект композиций по настоящему изобретению разрушает вирусные частицы в дыхательных путях при первом воздействии, во время инфицирования и когда вирионы являются внутриклеточными и впоследствии высвобождаются клетками в дыхательных путях.

Поэтому уникальные вирулицидные свойства композиций по настоящему изобретению, особенно в отношении оболочечных вирусов, делают такие композиции мощным инструментом в текущих усилиях по предотвращению распространения коронавирусов. Такие композиции уменьшают продолжительность заболевания и тяжесть симптомов среди широкой популяции пациентов.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает дезинфицирующую композицию, которая включает твердую соль окисленных форм хлора, активатор, такой как уксусная кислота, и фармацевтически приемлемый разбавитель, адъювант или носитель. Твердая соль окисленных форм хлора основана на формуле  $M^{n+} [Cl(O)_x]_n^{n-}$ , где M представляет собой ион щелочного металла, щелочноземельного металла или переходного металла, n имеет значение 1 или 2, и x представляет собой целое число от 1 до 4 включительно. Активатор основан на формуле  $R_1XO_n(R_2)_m$ , где группа  $R_1$  включает от 1 до 10 гидрированных атомов углерода, необязательно замещенных amino, амидо, карбоксильной, сульфоновой или гидроксигруппами, где группа X выбрана из углерода, фосфора и серы; n и m, каждый, независимо имеют значение 2 или 3, и  $R_2$  выбран из H, щелочного металла, щелочноземельного металла, соли иона переходного металла и соли аммония.

В предпочтительных вариантах осуществления соль окисленного хлора включает соль щелочного или щелочноземельного металла хлорноватистой кислоты HOCl. В таком варианте осуществления активатором является уксусная кислота. В других вариантах осуществления соль окисленного хлора включает соль щелочного или щелочноземельного металла хлористой кислоты HOClO. Опять же, в таком варианте осуществления, активатором является уксусная кислота.

В некоторых вариантах осуществления композиция имеет осмоляльность в

диапазоне от около 0,1 мОсм до около 500 мОсм.

В некоторых вариантах осуществления определенное количество соли окисленных соединений хлора, уксусной кислоты или ее соли с металлом или аммонием обеспечивает рН от 4 до 8.

В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно включает агент, повышающий вязкость. В некоторых аспектах повышающий вязкость агент не может быть окислен видами окисленного хлора.

В некоторых вариантах осуществления повышающий вязкость агент включает водорастворимый гелеобразующий агент. Водорастворимый гелеобразующий агент может включать, но не ограничивается этим, полиакриловую кислоту, полиэтиленгликоль, сополимер поли(акриловой кислоты)-акриламидоалкилпропансульфоновой кислоты, фосфинополикарбоновую кислоту и поли(акриловую кислоту)-акриламидоалкилпропан и терполимеры сульфоновой кислоты-сульфонируемого стирола.

В некоторых вариантах осуществления композиция включает краситель. Краситель предпочтительно дает колориметрический индикатор присутствия окисленного соединения хлора в композиции. Краситель может представлять собой окислительно-восстановительный краситель. В предпочтительном варианте осуществления цвет и интенсивность красителя зависят от состояния окисления соединения окисленного хлора.

Композиции по изобретению могут быть представлены в виде водного раствора, геля, крема, мази или масла. Композиции по изобретению можно производить и хранить в многосекционном контейнере. В некоторых аспектах водные и твердые компоненты содержатся в отдельных соответствующих отсеках перед объединением.

Композиции по изобретению полезны в качестве противомикробных средств на поверхностях, а также для применения при лечении заболеваний. Как таковые, композиции по изобретению полезны в качестве продуктов для ингаляции для использования, например, с распылителем, ингалятором, аэрозольным аппаратом или другими подходящими средствами доставки. Кроме того, композиции по изобретению могут быть сформулированы для нанесения на кожу, раны, маститы или любые другие инфекционные заболевания у животных или в сельском хозяйстве; а также для противовирусных применений.

### **Краткое описание чертежей**

Фиг. 1 схематически иллюстрирует типичный многосекционный или разделенный на множество отсеков контейнер для получения, хранения и распределения дезинфицирующей композиции в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения.

Фиг. 2 показывает результаты, полученные с использованием растворов образцов в соответствии с настоящим изобретением.

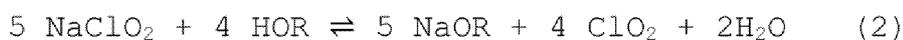
Фиг. 3 показывает результаты, полученные с использованием растворов образцов в соответствии с настоящим изобретением.

### **Подробное описание изобретения**

Настоящее изобретение в целом относится к композициям, включающим комбинацию твердого и жидкого предшественника окисленного состояния хлора и активатора, например, уксусной кислоты или ее солей, а также одного или нескольких дополнительных компонентов. Использование таких композиций действует как дезинфицирующее средство для лечения широкого спектра бактериальных и/или вирусных патогенов на различных биотических и абиотических поверхностях и средах.

Некоторые предпочтительные композиции по изобретению представлены в виде многокомпонентного (т.е. двухкомпонентного, трехкомпонентного, четырехкомпонентного и т.д.) состава в твердой форме, который немедленно образует композиции с долговременной стабильностью. Это уменьшает ограничения, связанные со сроком хранения, обычно наблюдаемые с обычными растворами хлорноватистой кислоты или диоксида хлора, описанными в предшествующем уровне техники. Более конкретно, немедленное получение готовых к использованию композиций окисленных видов хлора из твердых предшественников (API-P) можно осуществить в многосекционном устройстве или контейнере в месте использования. Многосекционное устройство или контейнер используют для приготовления, распределения и длительного стабильного хранения полученных композиций в соответствии с настоящим изобретением. В частности, такие многосекционные контейнеры, описанные в настоящей заявке, могут иметь ряд отсеков или камер, отдельно содержащих компоненты, необходимые для получения композиций по настоящему изобретению. В одном примере состав включает твердый предшественник окисленного состояния хлора и уксусную кислоту или ее соли, усилитель вязкости и краситель, а затем их объединяют для получения противомикробной композиции в желаемое время применения и на месте.

Другой оксид хлора, полезный в качестве API в противомикробных композициях представляет собой диоксид хлора, где атом хлора находится в степени окисления +3. Основной реакцией хлорита натрия является образование диоксида хлора, как показано в следующем уравнении (Уравнение 2):



Ссылаясь на приведенное выше уравнение (Уравнение 2), HOR обычно представляет собой минеральную кислоту, такую как HCl или лимонная кислота, поскольку для превращения хлорита натрия сначала в хлористую кислоту, а затем в диоксид хлора, который является хорошо растворимым в воде газом при комнатной температуре, необходим источник протонов.

Преимущество диоксида хлора заключается в том, что он не может генерировать газообразный хлор,  $\text{Cl}_2$ , который, как известно, реагирует с хлорированными углеводородами, например тригалогенметанами, которые являются токсичными загрязнителями окружающей среды. Еще одним преимуществом диоксида хлора является то, что активность его в качестве дезинфицирующего средства или стабильность его водных растворов не зависят от pH.

Настоящее изобретение направлено на решение проблем, связанных с композициями предшествующего уровня техники, в которых используются оксиды хлора. В частности, настоящее изобретение обеспечивает композиции, включающие комбинацию твердых предшественников окисленных состояний хлора (ОС) и активаторов, обеспечивающих источник протонов. Предпочтительным примером активатора является уксусная кислота или ее соли, при этом дезинфицирующие композиции по изобретению мгновенно получают контролируемым и незамедлительным способом в месте использования со стабильностью, которая допускает предполагаемое кратковременное использование. Такие композиции являются полезными дезинфицирующими средствами для лечения широкого спектра микроорганизмов. В частности, когда активный фармацевтический ингредиент получают из стабильных твердых предшественников, именуемых в дальнейшем "API-P", оксидов хлора на месте использования, с включением, например, уксусной кислоты в качестве активатора, который одновременно забуферивает раствор или гель до биосовместимого значения pH, проблема стабильности предшествующего уровня техники больше не существует.

Как описано ранее, технические решения предшествующего уровня техники не учитывают, как обеспечить ионную силу или осмоляльность конечного противомикробного раствора, биосовместимого с биологическими жидкостями. Более того, предшествующий уровень техники не показывает, как регулировать и увеличивать время контакта и существования API в области, представляющей терапевтический интерес, например, регулируя реологию и текучесть. Также, в предшествующем уровне техники не обеспечиваются относительно простые, но эффективные средства контроля степени окисления API и визуальной индикации того, где API был нанесен во время смешивания дезинфицирующей композиции.

Кроме того, в некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению могут дополнительно включать использование усилителя вязкости (также называемого в настоящей заявке "VE") и/или включать комбинацию твердого предшественника окисленного состояния хлора и активатора, например уксусной кислоты или ее солей.

Другим вариантом осуществления изобретения является включение в композицию красителя, предпочтительно, например, красителя, чувствительного к изменению окислительно-восстановительного потенциала, цвет которого изменяется в зависимости от степени окисления атома хлора.

В частности, некоторые предпочтительные композиции по изобретению находятся в виде многокомпонентного (т.е. двухкомпонентного, трехкомпонентного, четырехкомпонентного и т.д.) состава в твердой форме, разделенного разрушаемыми стенками или барьерами, который мгновенно образует композицию с долговременной стабильностью. Это устраняет любые проблемы, связанные со сроком годности при хранении, характерные для растворов хлорноватистой кислоты или диоксида хлора, описанных в предшествующем уровне техники.

Более конкретно, немедленное получение готовых к использованию композиций окисленных видов хлора из твердых предшественников API-P можно осуществить в многосекционном устройстве или контейнере в месте использования. Многосекционное устройство или контейнер можно использовать для получения, распределения и длительного стабильного хранения полученных композиций в соответствии с настоящим изобретением. В частности, такие многосекционные контейнеры, описанные в настоящей заявке, могут иметь ряд отсеков или камер, отдельно содержащих компоненты, необходимые для получения композиций по настоящему изобретению. Например, твердый предшественник окисленного состояния хлора и активатор, например уксусная кислота или ее соль, усилитель вязкости и краситель смешивают, а затем эта композиция дает желаемую композицию дезинфицирующего средства в желаемое время и в нужном месте применения.

Уксусная кислота представляет собой широко распространенное природное соединение, присутствующее в различных тканях млекопитающих. Она также является побочным продуктом бактериальной ферментации углеводов.

Ацетат натрия нетоксичен и разрешен в лекарственных композициях для перорального и парентерального применения. Бактерицидное действие уксусной кислоты хорошо известно. Она имеет задокументированный эффект против проблемных грамотрицательных бактерий, таких как *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* и *A. Baumannii* и др. Микробиологический спектр уксусной кислоты широк, даже при испытаниях в низких концентрациях 0,5-3%. Концентрации уксусной кислоты, разрушающие предварительно сформированную биопленку, варьировались от 0,10% до 2,5%. Таким образом, уксусная кислота и ее соль с металлом являются очень привлекательными соединениями для использования в противомикробных композициях из-за их способности действовать в качестве буфера вместе с ее солью с металлом для стабилизации pH.

Кроме того, в дополнение к своим противомикробным свойствам, уксусная кислота привлекательна благодаря тому, что она не может быть дополнительно окислена окислителями, такими как ОС, и благодаря ее эндогенной природе в высоких концентрациях в живых тканях.

Соответственно, многосекционный контейнер обеспечивает практическое использование при смешивании компонентов, необходимых для мгновенного создания активного раствора API на месте использования. Следует отметить, что для обеспечения ионной силы или осмоляльности конечного противомикробного раствора для адаптации к осмоляльности в области применения, в случае медицинского применения, предварительно рассчитанное количество NaCl может быть включено в многосекционное устройство, в зависимости от планируемого использования.

Предпочтительным вариантом осуществления изобретения является ингаляционная композиция для респираторного введения. Таким образом, небулайзеры или ингаляторы, обычно используемые для лечения муковисцидоза, астмы, COPD и других респираторных заболеваний или расстройств, которые превращают жидкости в аэрозоли, могут быть полезны в настоящем изобретении. Устройство для ингаляционного введения может

использовать сжатый воздух или ультразвуковую энергию для распыления композиций по изобретению. Компрессорные дозирующие ингаляторы (pMDI), ингаляторы сухого порошка (DPI), ингаляторы медленного впрыскивания (SMI) любого типа также могут быть полезны. Любые электростатические или неэлектростатические ингаляторы, т.е. VORTEX или Pari или Symptoc, также полезны для практического применения изобретения.

Предварительно загруженный многосекционный контейнер, описанный в настоящей заявке, обеспечивает стабильный, противомикробный раствор широкого спектра действия при смешивании компонентов и оставляет в природе только биосовместимые неактивные химические соединения.

Как отмечалось выше, активацию API по изобретению получают с использованием активатора, например уксусной кислоты, которая действует синергетически с окисленным хлором против микробов, а также поддерживает кислотность в диапазоне pH от 4 до 8. Способ по изобретению и его композиции позволяют избежать недостаточной долговременной стабильности, присущей окисленному хлору ОС в растворе, поскольку нет необходимости хранить дезинфицирующую композицию в виде водного раствора.

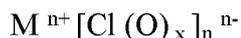
Еще одним преимуществом настоящего изобретения является возможность добавления других соединений, которые облегчают применение. Например, в применениях для заживления ран необходимо увеличить вязкость ( $\mu$ ) продукта на коже, чтобы продлить время контакта. Изобретение решает эту проблему за счет использования водорастворимого или растворимого усилителя вязкости (VE), который химически не может быть окислен API, тем самым обеспечивая улучшенное регулирование времени контакта и присутствия API в области, представляющей терапевтический интерес. VE гарантирует, что реология и текучесть адаптированы к соответствующему методу и области дезинфекции, чтобы получить раствор с полной текучестью или гель. VE может включать, например, водорастворимый гелеобразующий агент, такой как полиакриловая кислота, полиэтиленгликоль или любой другой олигомер или полимер, который не может быть окислен API.

Кроме того, композиции по изобретению могут включать один или несколько красителей, предпочтительно выбранных из группы окислительно-восстановительных красителей (также называемых в настоящей заявке "ROD" или "RODs"), где цвет и интенсивность зависят от степени окисления окисленного хлора. Следует отметить, что помимо обеспечения визуальной индикации (т.е. посредством цвета) степени окисления атома хлора, ROD также обладают собственным противомикробным эффектом. Это по-новому усиливает синергетическое действие между компонентами в композиции. ROD способен сохранять свой цвет в течение периода времени, достаточного для мониторинга окислительной активности API, окисленного хлора, и, кроме того, обеспечивает визуальную индикацию области, на которую была нанесена композиция.

Дополнительные преимущества изобретения, а также дополнительные признаки изобретения будут очевидны из описания изобретения, приведенного ниже.

В предпочтительном варианте осуществления окисленные соединения хлора (ОС)

имеют общую формулу, указанную ниже:



где M представляет собой ион любого щелочного металла, щелочноземельного металла или переходного металла, n представляет собой целое число в диапазоне 1-5 и x представляет собой целое число в диапазоне 1-4

Если M=Na, n=1, x=1, API-P представляет собой твердый NaOCl. Если M=Ca, n=2, x=1, API-P представляет собой твердый Ca(OCl)<sub>2</sub>. Если M=Na, n=1, x=2, API-P представляет собой твердый NaClO<sub>2</sub>. Если M=Ca, n=2, x=2, API-P представляет собой твердый Ca(ClO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>. В случае, когда x=3 или 4, API-P образует более реакционноспособные виды хлората и перхлората.

Одним неограничивающим примером является мгновенное образование хлорноватистой кислоты из гипохлорита натрия или кальция в крышке 2 в соответствии с Фиг. 1, с буферным раствором ацетата натрия в секции 4, что обеспечивает готовый к использованию раствор хлорноватистой кислоты API с pH от 5 до 6 в секции 9, необязательно с красителем и усилителем вязкости.

Другим неограничивающим примером является дигипохлорит кальция Ca(OCl)<sub>2</sub>, который представляет собой стабильный и водорастворимый API-P для HOCl. Он мгновенно растворяется в воде и оставляет только гидроксид кальция, который присутствует в природе и образует HOCl, один из двух активных ингредиентов настоящего изобретения, который разлагается до Cl<sup>-</sup> и биосовместимых частиц, содержащих водород и кислород.

Другим предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения является твердый предшественник окисленного хлора, представляющий собой тетрахлордекаоксид (TCDO), номер в реестре CAS 92047-76-2, известный как WF10 или стабилизированные растворы OXO-K993, полученные как описано в Meuer *et al in* CA2616008, включенном в настоящую заявку в качестве ссылки. Его можно получить, объединив соли щелочных или щелочноземельных металлов хлорит-иона ClO<sub>2</sub><sup>-</sup> с избытком кислорода в воде.

Таким образом, одним из преимуществ настоящего изобретения является то, что предшественники API-P в твердой форме в сухом и безводном качестве лишены проблем, связанных с фармацевтической стабильностью, таким образом, настоящее изобретение решает одну из основных технических проблем предшествующего уровня техники.

Аспектом изобретения является комбинация API-P с молекулой, включающей функциональную группу карбоновой кислоты -COOH, функциональную группу сульфоновой кислоты -SO<sub>3</sub>H, функциональную группу фосфорной кислоты -PO<sub>3</sub>H или функциональную группу борной кислоты -B(OH)<sub>2</sub>, каждая из которых служит активатором API-P в композиции. Как правило, активатор имеет общую формулу R<sub>1</sub>XO<sub>n</sub>(R<sub>2</sub>)<sub>m</sub>, где группа R<sub>1</sub> может представлять собой группу, содержащую от около 1 до около 10 гидрированных атомов углерода, необязательно замещенных аминами, амидо, карбоксильными или гидроксигруппами. Группа X может представлять собой атом углерода, фосфора или серы, n и m

имеет значение 2 или 3 и  $R_2$  представляет собой протон (H) или ион любого щелочного металла, щелочноземельного металла или переходного металла. Природа заместителей в формуле варьируется в зависимости от применения и видов хлора, и это может быть любое соединение, содержащее аминогруппу, например аммиак, аминокислота, например таурин, или терапевтическое лекарственное средство, повышающее синергетический потенциал композиции. Активатор может представлять собой любую комбинацию или смесь двух или более соединений, определяемых общей формулой  $R_1XO_nR_2$ .

Предпочтительными неограничивающими примерами являются карбоновые кислоты  $R_3COOH$ , где  $R_3$  представляет собой H или линейную или разветвленную насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, содержащую от около 1 до около 24 атомов углерода, необязательно замещенных гидроксильными группами. Неограничивающими примерами активатора могут быть уксусная кислота, лимонная кислота, винная кислота, молочная кислота, гиппуровая кислота, малеиновая кислота, борная кислота, серная кислота, фосфорная кислота, борная кислота, 3-(N-морфолино)пропансульфоная кислота (MOPS), 2-(карбамоилметиламино)этансульфоная кислота (ACES), 2-(карбамоилметиламино)этансульфоная кислота (ADA), 2-(карбамоилметиламино)этансульфоная кислота (бицин), пиперазин-N, N'-бис(2-этансульфоная кислота, PIPES) или любая аминокислота.

Таурин является особенно предпочтительным, так как это эндогенная аминокислота, обычно ослабляющая действие ОС на организм, и она может сочетаться с ОС с образованием эндогенных N-хлораминокислот, таких как  $ClNH-CH_2CH_2-SO_3H$ , которые сами по себе обладают антибактериальными свойствами.

Уксусная кислота предпочтительна, поскольку является эндогенной для человека, обладает антибактериальными свойствами, имеет очень низкую токсичность и образует буферы в смеси с солями металлов, и она используется в качестве неограничивающего примера в дальнейшем описании изобретения.

Преимущество изобретения состоит в том, что твердым многокомпонентным продуктам по изобретению не мешают проблемы со стабильностью в фармацевтических или медицинских устройствах, независимо от температуры, воздуха, влажности, света, кислорода или других условий окружающей среды, поскольку API-P являются твердыми и коммерчески доступными в больших количествах.

Раскрытые в настоящей заявке API-P могут быть растворимы в воде и почти мгновенно достигать физиологических значений pH и ионной силы в конечном растворе в комбинации с уксусной кислотой и/или ее солями.

Возможность мгновенного создания противомикробного API in situ повышает простоту использования и универсальность продукта. Кроме того, упаковка компонентов может быть разделена и объединена по требованию, что еще больше влияет на стабильность при хранении и применение в данной области.

Изобретение предусматривает небольшие стабильные одноразовые двух- или

трехкомпонентные устройства, идеально подходящие для путешествий, реагирования на катастрофы, военного персонала или микробных пандемий. Кроме того, конструкция больших форматов (например, резервуары), содержащих предшественники активного противомикробного средства (иногда называемого в настоящей заявке API-P), полезна в сельскохозяйственных условиях, индустрии аквакультуры или военных операциях и подходит для дезинфекции больших площадей.

#### **Усилители вязкости для получения вязких растворов и гелей**

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения могут быть включены компоненты, отличные от API. Например, усилитель вязкости предпочтителен для заживления ран или дезинфекции кожи. Предпочтительными усилителями вязкости являются водорастворимые гелеобразующие агенты, которые не окисляют API. Гелеобразующие агенты обеспечивают пролонгированный период нахождения API в интересующей области, например, на коже.

Примеры гелеобразующих агентов в соответствии с изобретением включают, но не ограничиваются этим, полиакриловую кислоту (CARBOMER), полиэтиленгликоль или любой другой их олигомер, полимер или блок-сополимер. Кроме того, усилитель вязкости может быть выбран из сополимеров поли(акриловой кислоты)-акриламидоалкилпропансульфоновой кислоты, фосфинополикарбоновых кислот и терполимеров поли(акриловой кислоты)-акриламидоалкилпропана и сульфоновой кислоты-сульфированного стирола.

Полимеры, такие как акрилатный сополимер, хорошо работают в композициях по изобретению в диапазоне концентраций от примерно 0,01 до примерно 5%. Акрилатные сополимеры представляют собой гомо- и сополимеры акриловой кислоты, сшитые полиалкенилполиэфиром. Акрилатные сополимеры существуют с различной плотностью прививки. Одним типичным сшивающим агентом является пентаэритрит, который очень стабилен. В настоящем изобретении можно использовать полимеры полиакриловой кислоты (РАА), которые, как известно, стабилизируют композиции  $H_2O_2$ .

Стабилизированные полимером растворы ОС в соответствии с изобретением находят применение во многих контекстах, например, в лечении ран, асептической упаковке, производстве электроники и отбеливании целлюлозы и бумаги. API может быть сформулирован в виде геля или вязкой жидкости, которую можно наносить на целевые поверхности, как не относящиеся к живым организмам, так и представляющие собой инфицированные эпителиальные слизистые оболочки или поверхности кожи, чтобы обеспечить длительный и тесный контакт с необходимыми уровнями API. Невязкие композиции API также можно распылять в воздухе в замкнутых пространствах в виде тумана для дезинфекции окружающей среды или для ингаляции для лечения респираторных заболеваний. Например, концентрация полиакриловой кислоты CARBOMER имеет возрастающую вязкость в концентрации 0,01-0,1%. При желании она образует равномерные гели в диапазоне концентраций 0,1-1%.

#### **Антибактериальные редокс-чувствительные красители в качестве**

## **индикаторов**

Еще одной добавкой к композициям по изобретению являются окислительно-восстановительные красители (далее ROD), в которых цвет и интенсивность красителя зависят от степени окисления ОС. Еще более выгодно то, что ROD сами по себе обладают противомикробными эффектами, усиливая противомикробный синергизм между составляющими композиций, представленных в настоящей заявке. Если стандартный потенциал полуэлементов ROD имеет более низкое положительное значение, чем ОС, цвет композиции будет сохраняться до тех пор, пока ОС активен. Таким образом, цвет обеспечивает визуальную подсказку в области, на которую была нанесена композиция и где присутствует активный ОС. Это особенно полезно, когда, например, композицию в соответствии с изобретением используют для лечения мастита, когда необходимо лечить от мастита большие стада крупного рогатого скота; окрашенная композиция по изобретению визуально показывала, какие животные уже обработаны. Кроме того, полезно использование индикатора противоположного типа, где цвет появляется, когда окислительная способность ОС исчезает.

Неограничивающими примерами подходящих красителей, полезных в изобретении, являются рН-независимые красители, видимые в присутствии ОС. Предпочтительными примерами являются N-фенилантрахиноновая кислота (фиолетово-красный), N-этоксихризоидин (циан), о-дианизидин (красный), дифениламинсульфонат натрия (красно-фиолетовый), дифенилбензидин (фиолетовый), дифениламин (фиолетовый) и виологен, который бесцветный в присутствии ОС, но темно-синий в отсутствие ОС.

Примерами рН-зависимых красителей, которые имеют темно-синий цвет в присутствии активного ОС, но бесцветны в отсутствие ОС, являются 2,6-дибромфенол-индофенол натрия или 2,6-дихлорфенол-индофенол натрия, о-крезол-индофенол натрия, тионин (син. лауц фиолетовый), метиленовый синий, генциановый фиолетовый, индиготетрасульфокислота, индигокармин (син. индигодисульфокислота), индигомонаосульфокислота. Примерами красителей, которые имеют красный или красно-фиолетовый цвет в присутствии ОС, являются феносафранин, сафранин Т, нейтральный красный и диалкил-п-фенилендиамин (SPD, красно-фиолетовый).

Многие из этих красителей сами по себе обладают антибактериальными эффектами, т.е. метиленовый синий (MB) и генциановый фиолетовый (GV), а их комбинации используются в качестве антибактериальных красителей в пенах в раневых повязках в сочетании с такими полимерами, как поливиниловый спирт или полиуретан, например, как описано Edwards в *Advances in Wound Care* (2016), 5, pp 11-19.

Особенно полезным классом красителей, используемых в настоящем изобретении, являются микробные феназины, которые представляют собой пигментированные, редокс-активные, азотсодержащие ароматические соединения, имеющие метаболическое, экологическое и эволюционное значение.

Дополнительный класс феназинов включает бис-N-оксидные феназины с еще более сильными антимикробными свойствами, чем их исходные феназины. Большинство этих

соединений являются природными соединениями, продуцируемыми бактериями, и представляют собой гетероароматические N-окисленные соединения, далее обозначаемые как HANOX. В дополнение к тому, что соединения HANOX являются редокс-красителями, RODS, они полезны в настоящем изобретении, поскольку их цвет зависит от степени окисления ОС.

Кроме того, некоторые производные феназина, в частности продемонстрировали высокую активность в отношении широкого спектра бактерий, дрожжей и грибов, таких как *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium pyogenes*, *Moraxella bovis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* и *Microsporum canis*. Таким образом, производные феназина особенно полезны в сельском хозяйстве при лечении болезней животных микробного происхождения.

Что касается этих производных, неожиданным открытием является отсутствие у них повреждающего действия на ткани в условиях применения, что делает их особенно подходящими для местного применения, предпочтительно при использовании в количестве от 0,05% до 1,0% по массе композиции.

Они имеют особую ценность для местных применений, например, в твердых или гелевых композициях, включая мелкоизмельченные порошки и гранулированные вещества, и в жидких композициях, включая растворы, суспензии, концентрации, настойки, взвеси и аэрозоли, кремы, гели, желе, мази и пасты.

Метиленовый синий является еще одним особенно предпочтительным красителем, используемым в изобретении, поскольку FDA одобрило его в качестве эксципиента в лекарственных препаратах, и он обладает антибактериальными свойствами, а его действие в качестве терапевтического агента может быть усилено при использовании фотодинамической терапии.

### **Многосекционные устройства, полезные в настоящем изобретении**

Фиг. 1 схематически иллюстрирует пример многосекционного устройства для быстрого приготовления композиции в соответствии с изобретением.

Конструкция устройства, включающая ряд отсеков, может быть адаптирована к условиям использования. Устройство 8 состоит из завинчивающейся крышки 1, связанной с первичной секцией, содержащей твердый предшественник API, обозначенный как API-P, в сухом виде (2). Завинчивающаяся крышка 1 имеет возможность открывать уплотнение или порт 3 при ее повороте в одну сторону, пропуская API-P во вторую секцию 4, включающую водный раствор активатора, также включающий предварительно рассчитанное количество хлорида натрия, чтобы конечная осмоляльность раствора была изоосмоляльна с жидкостями организма. Для достижения желаемого конечного pH активатор и, необязательно, предварительно рассчитанное количество его соли металла или аминокислоты в воде можно необязательно предварительно загрузить в секцию 4, 5 или 10. Более мелкие крупинки в секции 4 показывают, что API-P быстро растворяется в растворе активатора с образованием API. Третья секция 5 является необязательной и содержит раствор редокс-красителя (ROD), в зависимости от технического назначения

соответствующего устройства. Секции 4 и 5 разделены стенкой 6. Секции 4 и 5 также отделены от секции 10 разрушаемой перегородкой или стенкой 7. Необязательно, четвертая секция на том же уровне, что и 4 и 5, может содержать аминокислоту, например незаменимую или заменимую аминокислоту или таурин для стабилизации API. Для простоты на представленной иллюстрации четвертая секция 10 может дополнительно содержать чистую воду, раствор активатора. При повороте завинчивающейся крышки 2 в обратном направлении из устройства высвобождается готовый к применению дезинфицирующий раствор, который можно наносить на представляющую интерес область для дезинфекции. Одним из аспектов изобретения является твердый предшественник API-R в завинчивающейся крышке 2, который представляет собой соединение окисленного хлора. Полученный раствор из многосекционного устройства в конечном итоге может быть использован для получения раствора усилителя вязкости (VE) в водном растворе. Любое многосекционное устройство, позволяющее смешивать компоненты-предшественники и добавки, является полезным в контексте изобретения, включая бутылки, пакеты, шприцы, ингаляторы, устройства для дезинфекции рук, распылительные флаконы, колбы или резервуары. Как отмечалось выше, предпочтительными являются устройства, которые можно легко активировать у постели больного или в полевых условиях без сложных процедур смешивания и которые можно хранить при температуре окружающей среды.

Многосекционное устройство в соответствии с изобретением представляет собой закрытую систему и может быть спроектировано так, чтобы исключить ошибки при смешивании для избежания нежелательного воздействия на пациентов и персонал, и чтобы оно соответствовало инструкциям Объединенной комиссии и USO 797.

Неограничивающими примерами конструкции, полезной в настоящем изобретении, являются контейнер Duplex от B Braun, система безопасных шприцев Credence Companion, многосекционные пакеты Dual-Mix или набор Easyrec, включающий завинчивающуюся крышку, выпускающую твердое вещество или смесь твердых веществ для смешивания в одной или нескольких жидких фазах для получения готовой к использованию композиции API.

### **Применение изобретения в качестве противомикробного средства с фотодинамической терапией**

Элиминация бактерий с использованием противомикробной фотодинамической терапии (aPDT) была продемонстрирована с использованием альтернативного терапевтического метода лечения периимплантита. Таким образом, еще одним предпочтительным вариантом осуществления композиции по изобретению, включающей ОС, уксусную кислоту или ее соль, необязательно усилитель вязкости, является включение ROD, примером которого является метиленовый синий, для использования в фотодинамической терапии, например, для улучшения заживления ран или бактериальных инфекций у млекопитающих. В этом случае место введения продукта по настоящему изобретению можно облучать светом с длиной волны, адаптированной для создания фотодинамического эффекта красителя.

В Photodiagnosis Photodyn. Ther. (2018), 23, pp 347-352, Souza *et al* использовали фотодинамическую терапию для демонстрации противомикробной активности растворов гипохлоритов и инструментов с реципрокным вращением, связанных с фотодинамической терапией, на корневых каналах, инфицированных *enterococcus faecalis*. Однако испытываемые растворы не содержали антибактериальный краситель. Эти технологии включены в настоящее изобретение в качестве ссылки.

### **Постадийный способ получения API**

Настоящее изобретение обеспечивает композиции и способы применения твердых предшественников API-P хлорсодержащих соединений в сочетании с активатором, например уксусной кислотой или ее солями, и способы их применения. Иллюстративный способ включает следующие 6 стадий:

1. Предварительно рассчитанное количество API-P, имеющего общую формулу  $M^{n+} [Cl(O)_x]_n^{n-}$ , где M может быть любым ионом щелочного металла, щелочноземельного металла или переходного металла, где n представляет собой целое число в диапазоне 1-5, x представляет собой целое число в диапазоне 1-4, y представляет собой целое число в диапазоне 1-2, при этом твердое состояние (API-P) создает концентрацию API в конечном растворе в форме ОС в диапазоне 0,01-1000 ч/млн, предпочтительно в диапазоне 0,1-100 ч/млн, загружают в секцию 1 многосекционного устройства. API-P смешивают с предварительно рассчитанным количеством NaCl для получения конечной осмоляльности в диапазоне 0,1-500 мОсм, и необязательно с любым другим стабилизирующим твердым веществом.

2. Предварительно рассчитанное количество активатора общей формулы  $R_1XO_n(R_2)_m$ , где активатором является предпочтительно уксусная кислота, необязательно в смеси с ее солью с металлом или аммонием. Активатор растворяют в фармацевтически приемлемом разбавителе, адьюванте или носителе для получения концентрации активатора в диапазоне 0,05-10%, предпочтительно в диапазоне 0,08-0,5%, еще более предпочтительно в диапазоне 0,10-0,2%. Если API-P предварительно не смешан с NaCl, раствор на стадии 2 может включать количество NaCl со стадии, в любом случае создавая конечную осмоляльность в диапазоне 0,1-500 мОсм, предпочтительно около 300 мОсм, что соответствует 150 mM NaCl. Аликвоту раствора загружают во вторую секцию многосекционного устройства.

3. Для получения основного продукта в соответствии с изобретением секции 1 и 2 смешивают путем открытия порта или разрушения герметичной перегородки или мембранного барьера между первой и второй секциями для смешивания содержимого секций с последующим сжатием или встряхиванием в окружающих условиях для приготовления дезинфицирующего раствора. Полученные растворы перед использованием можно извлекать через крышку на многосекционном устройстве. Раствор является изотоническим, имеет pH в диапазоне от 4 до 9, предпочтительно от 5 до 6, и обычно используется для противомикробных целей, например для ингаляционной терапии, например с использованием ингалятора или небулайзера при астме, для борьбы с

вирусными инфекциями верхних дыхательных путей у млекопитающих.

4. Для применений, где цветовой индикатор на стадии 4 может добавить информацию в терапевтическую процедуру, например для лечения мастита или для индикации окислительной активности API, краситель с цветом, который меняется в зависимости от степени окисления API, (ROD), в предварительно рассчитанном количестве для получения концентрации красителя в диапазоне концентраций 0,01-1000 ч/млн, необязательно загружают в необязательную секцию многосекционного устройства.

5. В зависимости от предполагаемого применения предварительно рассчитанное количество аминокислоты в качестве стабилизатора API, предпочтительно таурина в той же концентрации, что и API, необязательно загружают в необязательную секцию многосекционного устройства. Стадию 4 осуществляют для уменьшения окислительного стресса на биологических поверхностях.

6. В зависимости от предполагаемого применения количество водорастворимого усилителя вязкости (VE), который не может быть окислен API, в диапазоне концентраций 0,01-25%, предпочтительно в диапазоне 0,1-10%, еще более предпочтительно в диапазоне 0,2-1% смешивают с раствором, полученным в результате выбранной последовательности стадий 1-3, необязательно в сочетании с любой из стадий 4-5. Концентрация VE 0,01-0,1% образует вязкий, но жидкий раствор, а 0,3-1% образует гель. В случае нанесения на кожу или раны, в процедуру смешивания может быть включена третья секция стадии 3, включающая VE, для получения вязкого или гелеобразного продукта.

#### **Применение изобретения в сельском хозяйстве**

В сельском хозяйстве, особенно на животноводческих фермах, многие виды инфекционных заболеваний, вызываемых бактериями, вирусами и грибами, влияют на повседневную работу фермы и влияют на эксплуатационные расходы. В этих условиях разработанные композиции в соответствии с изобретением действуют терапевтически или профилактически и особенно полезны при кожных инфекциях.

Одним из важных примеров является мастит у крупного рогатого скота, который ежегодно обходится молочной промышленности США примерно в 1,7-2 миллиарда долларов США. Эффективное и безвредное для окружающей среды лечение мастита оказалось затруднительным, поскольку молоко от коров, длительно получавших антибиотики, не может продаваться до тех пор, пока остаточные количества лекарственных средств не будут удалены из системы. Никакие вакцины не эффективны, так как инфекция в вымени и сосках коровы удалена от основного кровотока животного. Чтобы пометить коров, получивших лечение, рабочие молочных ферм наклеивают полоски скотча для предупреждения и маркировки животных, которые получили лечение.

Таким образом, предпочтительным аспектом настоящего изобретения является лечение мастита с использованием геля или вязкого раствора, включающего ОС, уксусную кислоту или ее соль, усилитель вязкости VE и ROD, например метиленовый синий. Окрашенный гель остается в области вымени и сосков, уксусная кислота имеет способность проникать в кожу сосков, а цвет делает ненужным использование полосок скотча. Кроме

того, нанесенный гель можно облучать светом с подходящей длиной волны для усиления терапевтического эффекта геля. В этом случае осуществляют стадии 1-4 и стадию 6 для получения используемой композиции быстрого приготовления.

### **Применение изобретения в аквакультуре**

Качество воды является предпосылкой для успешного разведения водных животных, например рыбы, устриц, омаров и креветок. В открытые водные системы часто попадают такие организмы, как вирусы, бактерии, вши, простейшие, грибковые патогены, водоросли и паразиты. Распространенными вирусными инфекциями, которые приводят к высокой смертности водных видов, привлекательных для производства продуктов питания, являются вирус герпеса кои, болезнь поджелудочной железы (PD) и инфекционная анемия лососевых (ISA). Вода надлежащего качества или достаточное количество чистой воды чаще всего недоступны. Установки для размножения предшествующего уровня техники часто не имеют средств, препятствующих этим инфекционным видам приближаться к размножающимся видам и воздействовать на них. Кроме того, после инфицирования не существует эффективного лекарства, обеспечивающего эффективную терапию против этих заболеваний.

Предпочтительным вариантом осуществления видов окисленного хлора ОС по настоящему изобретению является эффективное лечение всех этих инфекций и вредоносных организмов и клеток. Быстро получаемые композиции ОС очень эффективны в борьбе с этими передающимися через воду патогенами. Например, диоксид хлора представляет собой биоцид широкого спектра действия, эффективный для решения определенных проблем предшествующего уровня техники. Композиции по настоящему изобретению даже используют в специальных резервуарах для многократной обработки, например, выведенного лосося, не повреждая жабр рыб или каких-либо других частей выведенного вида, при этом оказывая губительное воздействие на микроорганизмы, вызывающие заболевание. В этих применениях используют последовательность получения, где АРІ-Р представляет собой  $\text{NaOClO}_2$  или  $\text{Ca}(\text{OClO}_2)_2$ , загружаемый в секцию 1 и смешиваемый с предварительно рассчитанным количеством уксусной кислоты на стадии 1-3.

### **Противовирусное применение изобретения**

В настоящей заявке раскрыты способы для обработки загрязненных поверхностей, оборудования, например медицинского оборудования, поверхностей мебели, дверных ручек, приборов, одежды или персонала. Композиции по изобретению можно наносить в виде геля, водного раствора или путем распыления или испарения АРІ на поверхности или в замкнутом пространстве. Тот факт, что композиция получена по требованию, позволяет обрабатывать участки сильнодействующими противомикробными препаратами, не опасаясь разложения при хранении.

Способы по изобретению предусматривают распыление активных агентов в щелях и микроокружении, даже на персонал, когда имеются подозрения на загрязнение инфицированными тканями или биологическими жидкостями. Испарение этих композиций

может обеспечить благотворное терапевтическое или профилактическое воздействие на резистентные вирусные, бактериальные или грибковые инфекции.

Композиции по изобретению можно применять без существенного риска токсичности. Предпочтительным вариантом осуществления является лечение вирусной инфекции верхних дыхательных путей. Таким образом, системы и способы по изобретению обеспечивают окисленный хлор, ОС, в качестве средства для лечения вирусной инфекции в дыхательных путях. Композиции по изобретению полезны для лечения SARS, MERS и других инфекций, включая, но не ограничиваясь этим, инфекции SARS CoV-2. Этому теперь впервые способствуют быстро получаемые предшественники API, в сочетании с многосекционным устройством в соответствии с изобретением, поскольку нет необходимости оценивать отсутствие активности раствора, который хранился в условиях окружающей среды.

В частности, ингаляционные содержащие хлорноватистую кислоту композиции состоят из ОС, активатора, например уксусной кислоты, эксципиента, регулирующего реологию конечного раствора, регулирующего осмоляльность агента, например хлорида натрия. Такие композиции быстрого приготовления теперь могут быть получены на месте, наряду с тем, что могут использоваться методы доставки через распылитель, такой как жидкостные ингаляторы, струйные небулайзеры, ультразвуковые распылители и небулайзеры на основе технологии вибрирующего сита. При использовании ингаляторы и небулайзеры аэрозолируют композиции по изобретению для доставки посредством ингаляции.

Композиции для аэрозолизации могут быть представлены в виде сухого порошка, раствора или суспензии. Мелкодисперсные капли, спреи и аэрозоли могут доставляться при помощи распылителя насосного типа или бутылки-пульверизатора для интраназальной или внутрилегочной доставки. Композиции также можно вводить ингаляцией при помощи ингалятора, такого как компрессорный дозирующий ингалятор или ингалятор сухого порошка. Композиции также можно вводить ингаляцией при помощи небулайзера, такого как небулайзер с ультразвуковой волной, доставляющий композиции ОС и уксусной кислоты непосредственно в дыхательные пути, используя ингаляционные препараты. Это предотвращает и лечит инфекции дыхательной системы, вызванные вирусами, а также другими микробами. Согласно изобретению, описанные в настоящей заявке композиции безопасны и эффективны для профилактики и лечения вирусных инфекций.

Композиции по изобретению также могут включать фармацевтически приемлемый носитель, такой как разбавитель, для облегчения доставки на слизистую дыхательных путей. Носителем может быть водный носитель, такой как физиологический раствор. Композиция может быть изотонической, имеющей такое же осмотическое давление, как кровь и слезная жидкость. Подходящие нетоксичные фармацевтически приемлемые носители известны специалистам в данной области. Различные носители могут быть особенно подходящими для разных лекарственных форм композиции, например, в зависимости от того, должна ли композиция использоваться в виде капель или спрея,

суспензии или другой формы для доставки в легкие.

Композиции для ингаляции могут быть представлены в виде сухого порошка, раствора или суспензии. Композицию можно доставлять при помощи различных устройств, известных в данной области техники, для введения капель, мелких капель и спреев. Композицию можно доставлять с использованием капельницы, пипетки или дозатора. Мелкодисперсные капли, спреи и аэрозоли можно вводить при помощи распылителя насосного типа или бутылки-пульверизатора для интраназальной или внутривнегочной доставки.

Интраназальную доставку можно обеспечить при помощи назального спрея. Следовательно, композиции в соответствии с изобретением могут быть разработаны в виде назального спрея. Назальный спрей вводится в нос и доставляется в дыхательные пути.

Жидкостные ингаляторы используют механическую энергию пружины при активации пользователем для повышения давления в контейнере с жидкостью, в результате чего содержащаяся жидкость выбрасывается из сопла для ингаляции в виде мягкого тумана. Жидкостные ингаляторы не зависят от газа-вытеснителя или электроэнергии для работы. Средний размер капель в жидкостных ингаляторах составляет около 5,8 мкм.

Струйные небулайзеры являются наиболее часто используемыми и могут называться распылителями. В струйных небулайзерах используется сжатый газ (например, воздух или кислород) для распыления жидкого лекарственного средства при его высвобождении с высокой скоростью. Полученные аэрозольные капли терапевтического раствора или суспензии затем вдыхаются пользователем для лечения. Сжатый газ может быть предварительно сжат в контейнере для хранения или может сжиматься по требованию компрессором в небулайзере.

Ультразвуковые небулайзеры основаны на электронном осцилляторе для генерации высокочастотной ультразвуковой волны, которая при направлении через резервуар с терапевтической суспензией раствора распыляет лекарственное средство для ингаляции.

Небулайзеры на основе технологии вибрирующего сита используют вибрацию мембраны, имеющей тысячи отверстий в верхней части резервуара с жидкостью, для распыления мелкокапельного тумана для ингаляции. Небулайзеры на основе технологии вибрирующего сита лишены некоторых недостатков ультразвуковых небулайзеров, предлагая более эффективное аэрозольное распыление с меньшим временем обработки и меньшим нагревом распыляемой жидкости.

Лечение вирусной инфекции достигается с использованием синергетической композиции уксусной кислоты и хлорноватистой кислоты. Компонент, представляющий собой уксусную кислоту, особенно эффективен для проникновения в ткани, тогда как хлорноватистая кислота особенно эффективна для лечения инфекции на внешней поверхности ткани. Как описано выше, эти композиции эффективны для лечения дыхательных путей и профилактики респираторных инфекций.

Описанные композиции особенно эффективны, поскольку уравнивание концентраций хлорноватистой кислоты и уксусной кислоты при помощи NaCl

обеспечивает безопасное лечение вирусов. Точный баланс зависит от композиции, места обработки и даже желаемой степени проникновения через поверхность. Хлорноватистая кислота может присутствовать в количестве от около 5 ч/млн до около 1000 ч/млн или более. Для различных применений, различных способов доставки и типов тканей могут потребоваться более высокие или более низкие концентрации. Уксусная кислота может присутствовать при около 0,1% и до около 5,0% или более, и предпочтительно около 1,0%. При балансировании этих двух компонентов композиция может иметь двойной эффект лечения на поверхности и под поверхностью ткани, на которую ее наносят.

В случае, когда ОС представляет собой хлорноватистую кислоту  $\text{HOCl}$ , композиция быстрого приготовления с концентрацией около 15-60 ч/млн обычно является достаточной для лечения инфицированных легких. В случае, когда ОС представляет собой диоксид хлора  $\text{OCl}_2$ , обычно достаточно концентрации 0,1-5 ч/млн.

В некоторых случаях для полного уничтожения вируса или предотвращения попадания вируса в респираторный тракт композиция должна находиться в контакте с ним в течение длительного времени, в пределах от нескольких секунд или минут до часа и более. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления композиция находится в форме геля, что обеспечивает более длительное время контакта с очагом инфекции.

Применение композиции в комбинации с известным противовирусным лечением может повысить эффективность композиций. В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению дополнительно включают введение (одновременно или последовательно с композициями по изобретению) одной или нескольких доз противовирусного средства. Такие средства могут включать, но не ограничиваются этим, ацикловир, адефовир, адамантин, боцепревир, бривудин, цидофовир, эмтрицитабин, энтекавир, фамцикловир, фомивирсен, фоскарнет, ганцикловир, ламивудин, пенцикловир, теллапревир, телбивудин, тенофовир, валацикловир, валганцикловир, видарабин, ингибиторы  $m_2$ , ингибиторы нейраминидазы, интерфероны, рибавирин, нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, ингибиторы неструктурного белка 5a (ns5a), антагонисты хемокиновых рецепторов, ингибиторы переноса цепи интегразы, ингибиторы протеазы и пуриновые нуклеозиды.

Композиции по изобретению также полезны в комбинации с известным противомикробным лечением. В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению дополнительно включают введение (одновременно или последовательно с композициями по изобретению) одной или нескольких доз антибиотика, включающего, но не ограничиваясь этим, ципрофлоксацин, бета-лактамы антибиотиков, такие как ампициллин или карбапенемы, азитромицин, цефалоспорины, доксициклин, фузидовую кислоту, гентамицин, линезолид, левофлоксацин, норфлоксацин, офлоксацин, рифампин, тетрациклин, тобрамицин, ванкомицин, амикацин, дефтазидим, цефепим, триметоприм/сульфаметоксазол, пиперациллин/тазобактам, азтреонам, меропенем, колистин или хлорамфеникол.

В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению дополнительно включают введение одной или более доз антибиотического средства из класса антибиотиков, включающих, но не ограничивающихся этим, аминогликозиды, карбацефем, карбапенемы, цефалоспорины первого поколения, цефалоспорины второго поколения, цефалоспорины третьего поколения, цефалоспорины четвертого поколения, гликопептиды, макролиды, монобактам, пенициллины, полипептиды, хинолоны, сульфонамиды, тетрациклины, линкозамиды и оксазолидиноны. В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению включают введение неантибиотического противомикробного вещества, включающего, но не ограничивающегося этим, сертралин, рацемические и стереоизомерные формы тиоридазина, бензоилпероксид, тауролидин и гекситидин.

Схема введения композиции может включать количество, частоту и продолжительность воздействия композиции. Схема введения может зависеть от тяжести инфекции или от схемы, назначенной для лечения или профилактики вирусной инфекции.

Композицию можно вводить в виде разовой суточной дозы или в виде нескольких доз, например, 2, 3, 4 или более доз в день. Субъект, получающий композицию, может подвергаться воздействию композиции в течение нескольких часов или минут. Продолжительность воздействия может зависеть от частоты, количества или даже от тяжести инфекции.

Общее суточное количество API, образующегося в растворе быстрого приготовления из твердых предшественников, может находиться в диапазоне 0,01-1000 мг в зависимости от природы ОС. Фактическая доза может варьироваться в зависимости от конкретной вводимой композиции, способа введения и других факторов, известных в данной области.

Композицию можно вводить в любой участок респираторного тракта, такой как респираторный эпителий, носовая полость, эпителий носовой полости, глотка, пищевод, гортань, надгортанник, трахея, раздвоение трахей, бронхи, бронхиолы или легкие. Введение композиции в дыхательные пути предотвращает любое заболевание или расстройство, которое передается вирусом.

В некоторых других вариантах осуществления композиции по изобретению можно использовать, например, для дезинфекции целого помещения, медицинских устройств и хирургических инструментов. Поставляемые медицинские устройства часто изначально стерильны, но могут потребовать дополнительной или последующей очистки и дезинфекции или стерилизации. В частности, особое значение имеет стерилизация или дезинфекция многоразовых медицинских устройств перед повторным применением с использованием любого известного метода. Композиции можно наносить на медицинское устройство. Например, композицию можно наносить путем протирки или распределения ее по поверхности устройства, распыления композиции в форме аэрозоля на устройство, погружения устройства в сосуд, содержащий определенное количество композиции, или путем размещения устройства в потоке композиции, например, из крана. Дополнительно или альтернативно, медицинские устройства и хирургические инструменты также можно

хранить погруженными в композицию и извлекать во время использования.

Некоторые из раскрытых композиций содержат уксусную кислоту при 2% или более, и ее комбинации с ОС оказались безопасными и эффективными для обработки кожи и других тканей. Было обнаружено, что ОС в этих композициях обладает модулирующим эффектом в отношении уксусной кислоты. Это позволяет композициям использовать дезинфицирующие свойства уксусной кислоты, не причиняя вреда тканям.

### **Применение изобретения для лечения COVID-19 и других респираторных инфекционных заболеваний**

Как описано выше, в одном аспекте настоящее изобретение направлено на дезинфицирующую композицию, разработанную для обеспечения безопасного и эффективного средства лечения и предотвращения распространения респираторных инфекций, включая SARS-CoV-2.

Композиции для применения в лечении инфекций SARS включают распыляемый противовирусный и антибактериальный раствор широкого спектра действия для ингаляций на основе хлорноватистой кислоты. В частности, композиция включает хлорноватистую кислоту (HOCl) (от 25 ч/млн до 200 ч/млн), которая стабилизирована уксусной кислотой (приблизительно 0,25%), что приводит к устойчивым концентрациям HOCl с положительными противомикробными эффектами. Добавление уксусной кислоты повышает стабильность HOCl, что позволяет разработать лечение с увеличенным сроком хранения. Кроме того, композиция сформулирована с повышенным pH 5,5 и изотоничностью, что повышает переносимость в дыхательных путях.

Композиции по настоящему изобретению обладают уникальными вирулицидными свойствами, особенно в отношении оболочечных вирусов, и обеспечивают превосходную противовирусную активность. Соответственно, такая композиция может быть особенно полезна для лечения и профилактики, например, COVID-19. В частности, SARS-CoV-2 и многие другие вирусы имеют поверхностные белки (т.е., спайк-белки), которые называются “открывателями дверей” в клетки человека в дыхательной системе. Эти спайк-белки включают группы -SH, уязвимые для окисления посредством HOCl. Низкие концентрации HOCl, вероятно, окисляют внеклеточные группы -SH (например, вирусные спайк-белки), будучи безвредными для нормальных тканей и внутриклеточных ферментов. Таким образом, противовирусный эффект композиции по настоящему изобретению может разрушать вирусные частицы в дыхательных путях при первом воздействии, во время инфекции и когда вирионы являются внутриклеточными и впоследствии высвобождаются клетками дыхательных путей человека. Следовательно, уникальные вирулицидные свойства композиции по настоящему изобретению, особенно в отношении оболочечных вирусов, делают ее потенциальным мощным инструментом в предпринимаемых усилиях по предотвращению распространения коронавируса. Такая композиция может сократить продолжительность заболевания и тяжесть симптомов среди широкой популяции пациентов с COVID-19, особенно во время беспрецедентной необходимости, учитывая вирулентность коронавируса во всем мире.

В Таблице 1 (ниже) представлен перечень компонентов композиции по настоящему изобретению, которая состоит из 25 ч/млн - 200 ч/млн HOCl+0,25% уксусной кислоты.

**Таблица 1**

**Композиция изотонической 200 ч/млн хлорноватистой кислоты и 0,25 уксусной кислоты, изотонической, pH 5,5**

Исходное вещество	Номер в реестре CAS	Количество в конечном растворе (масс.%)	Функция	Поставщик
Гипохлорит натрия	7681-52-9	0,01	Активное вещество	Aug. Hedinger* GmbH & Co
Уксусная кислота, ледяная $\geq 99,5\%$	64-19-7	0,25	Регулятор pH	Sigma Aldrich/Merck
Гидроксид натрия	1310-73-2	Добавляли до pH 5,5 $\pm$ 0,2	Регулятор pH	Sigma Aldrich/Merck
Хлорид натрия	7647-14-5	0,75	Регулятор осмоляльности	Sigma Aldrich/Merck
Очищенная вода	7732-18-5	Добавляли до 100%	Растворитель	Fargon Nordic

Инертный газ: Аргон (100%)

\*Раствор гипохлорита натрия может быть заменен другим обеспечивающим GMP веществом

Активным ингредиентом в предпочтительных композициях по изобретению является хлорноватистая кислота (HOCl). Этот активный ингредиент получен из гипохлорита натрия, который производится в виде водного раствора в результате реакции газообразного Cl<sub>2</sub> с водой при щелочном pH. Получают 3% NaOCl и добавляют к конечному IS для достижения максимальной концентрации 200 ч/млн (0,01% масс/масс) HOCl. Другие ингредиенты композиции включают следующее: Гидроксид Натрия чистоты Ph.Eur./USP-NF, 0,1M раствор, добавляемый до требуемого pH (5,5); стабилизатор pH Уксусная Кислота чистоты Ph.Eur./USP-NF, ледяная, 0,25%; регулятор осмоляльности Хлорид Натрия чистоты Ph.Eur./USP-NF, добавляемый для достижения изотонической композиции (303 мОсм); и Очищенная Вода - вода, очищенная методом обратного осмоса и деионизированная методом ионного обмена или согласно монографии Ph.Eur./USP-NF.

Предпочтительная клиническая дозировка для композиции составляет 5 мл 25-100 ч/млн хлорноватистой кислоты. Конечный продукт также содержит в качестве буфера 0,25% уксусной кислоты. Таким образом, раствор содержит более 99,1% HOCl и менее 0,9% OCl<sup>-</sup>. HOCl является активным веществом в IS и, как было установлено, в 80 раз более эффективна в качестве дезинфицирующего средства по сравнению с эквивалентной концентрацией OCl<sup>-</sup>. Таким образом, HOCl имеет двойной эффект в IS противомикробном агенте для подавления роста микроорганизмов в конечном продукте. Композиция может быть представлена в пластиковых ПЭТ флаконах/бутылках. Перед введением пациенту композицию переносят в резервуар небулайзера/ингаляционного устройства. Этот перенос осуществляют в клинике. После переноса в небулайзер раствор вводят немедленно (в

течение 1-2 ч) пациенту посредством доставки жидкого аэрозоля. Пациент должен получить 5 мл распыленной композиции.

Композиции для противовирусного применения обычно представляют собой композиции для однократного введения и доставляются в дыхательные пути путем распыления с использованием, например, PARI BOY. Ингаляционная система PARI BOY Classic содержит компрессор PARI BOY Classic, небулайзер PARI LC SPRINT. Для достижения соответствующего осаждения испытываемого раствора в нижних и верхних дыхательных путях небулайзер должен быть снабжен PARI SMARTMASK. Следует отметить, что можно использовать и другие небулайзеры и ингаляторы.

НОС1 продуцируется собственными иммунными клетками организма, то есть нейтрофилами и моноцитами/макрофагами. Это мощный окислитель, который хлорирует и окисляет молекулярные структуры, особенно с тиоловыми, тиол-эфирными и аминокетильными группами (например, белки, жирные кислоты), что приводит к денатурации и потере нормальной функции широкого круга микробов. НОС1 рассматривается Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) как “форма свободного доступного хлора, которая обладает наивысшей бактерицидной активностью против широкого спектра микроорганизмов”. НОС1 является сильным окислителем, однако в низких концентрациях ( $\leq 0,1\%$ ) она очень хорошо переносится и безопасна при лечении ран.

#### **Включение посредством ссылки**

Любые и все ссылки и цитирования других документов, таких как патенты, патентные заявки, патентные публикации, журналы, книги, документы, веб-контент, которые были сделаны в настоящем раскрытии, включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей их полноте для всех целей.

#### **Эквиваленты**

Изобретение может быть реализовано в других конкретных формах без отклонения от его сущности или существенных характеристик. Таким образом, вышеприведенные варианты осуществления во всех отношениях следует рассматривать как иллюстративные, а не ограничивающие изобретение, описанное в настоящей заявке.

#### **ПРИМЕРЫ**

**Пример 1: Общая процедура получения сухих деаэрированных твердых смесей АРІ-Р и NaCl для загрузки в многосекционное устройство.**

**1а. Получение сухого порошка, содержащего 50 ч/млн гипохлорита натрия в хлориде натрия**

К 8,95 г сухого NaCl (молекулярная масса: 58,44 г/моль) добавляли 50 мг сухого гипохлорита натрия (молекулярная масса: 74,44 г/моль) и смешивали до получения гомогенного смешанного порошка и хранили в сухих условиях без доступа воздуха в защищенных от света контейнерах. Аликвоту 90 мг порошка загружали в секцию 1 многосекционного устройства.

**1б. Получение сухого порошка, содержащего 100 ч/млн гипохлорита натрия в**

**хлориде натрия**

К 8,90 г сухого NaCl (молекулярная масса: 58,44 г/моль) добавляли 100 мг сухого гипохлорита натрия (молекулярная масса: 74,44 г/моль) и смешивали до получения гомогенного смешанного порошка и хранили в сухих условиях без доступа воздуха в защищенных от света контейнерах. Аликвоту 90 мг порошка загружали в секцию 1 многосекционного устройства.

**1с. Получение сухого порошка, содержащего 200 ч/млн гипохлорита натрия в хлориде натрия**

К 8,8 г сухого NaCl (молекулярная масса: 58,44 г/моль) добавляли 200 мг сухого гипохлорита натрия (молекулярная масса: 74,44 г/моль) и смешивали до получения гомогенного смешанного порошка и хранили в сухих условиях без доступа воздуха в защищенных от света контейнерах. Аликвоту 90 мг порошка загружали в секцию 1 многосекционного устройства.

**1d. Получение сухого порошка, содержащего 500 ч/млн гипохлорита натрия в хлориде натрия**

К 8,5 г сухого NaCl (молекулярная масса: 58,44 г/моль) добавляли 500 мг сухого гипохлорита натрия (молекулярная масса: 74,44 г/моль) и смешивали до получения гомогенного смешанного порошка и хранили в сухих условиях без доступа воздуха в защищенных от света контейнерах. Аликвоту 90 мг порошка загружали в секцию 1 многосекционного устройства.

**1е. Получение сухого порошка, содержащего 25 ч/млн дигипохлорита кальция в хлориде натрия**

К 8,975 г сухого NaCl (молекулярная масса: 58,44 г/моль) добавляли 25 мг сухого гипохлорита кальция (молекулярная масса: 142,98 г/моль) и смешивали до получения гомогенного смешанного порошка и хранили в сухих условиях без доступа воздуха в защищенных от света контейнерах. Аликвоту 90 мг порошка загружали в секцию 1 многосекционного устройства.

**1f. Получение сухого порошка, содержащего 50 ч/млн дигипохлорита кальция в хлориде натрия**

К 8,975 г сухого NaCl (молекулярная масса: 58,44 г/моль) добавляли 50 мг сухого гипохлорита кальция (молекулярная масса: 142,98 г/моль) и смешивали до получения гомогенного смешанного порошка и хранили в сухих условиях без доступа воздуха в защищенных от света контейнерах. Аликвоту 90 мг порошка загружали в секцию 1 многосекционного устройства.

**1g. Получение сухого порошка, содержащего 100 ч/млн дигипохлорита кальция в хлориде натрия**

К 8,9 г сухого NaCl (молекулярная масса: 58,44 г/моль) добавляли 100 мг сухого гипохлорита кальция (молекулярная масса: 142,98 г/моль) и смешивали до получения гомогенного смешанного порошка и хранили в сухих условиях без доступа воздуха в защищенных от света контейнерах. Аликвоту 90 мг порошка загружали в секцию 1

многосекционного устройства.

**1h. Получение сухого порошка, содержащего 100 ч/млн дигипохлорита кальция в хлориде натрия**

К 8,9 г сухого NaCl (молекулярная масса: 58,44 г/моль) добавляли 100 мг сухого гипохлорита кальция (молекулярная масса: 142,98 г/моль) и смешивали до получения гомогенного смешанного порошка и хранили в сухих условиях без доступа воздуха в защищенных от света контейнерах. Аликвоту 90 мг порошка загружали в секцию 1 многосекционного устройства.

**1i. Получение сухого порошка, содержащего 100 ч/млн дигипохлорита кальция в хлориде натрия**

К 8,9 г сухого NaCl (молекулярная масса: 58,44 г/моль) добавляли 100 мг сухого гипохлорита кальция (молекулярная масса: 142,98 г/моль) и смешивали до получения гомогенного смешанного порошка и хранили в сухих условиях без доступа воздуха в защищенных от света контейнерах. Аликвоту 90 мг порошка загружали в секцию 1 многосекционного устройства.

**1j. Получение сухого порошка, содержащего 1 ч/млн хлорита натрия в хлориде натрия**

К 89,99 г сухого NaCl (молекулярная масса: 58,44 г/моль) добавляли 10 мг сухого хлорита натрия (молекулярная масса: 90,44 г/моль) и смешивали до получения гомогенного смешанного порошка и хранили в сухих условиях без доступа воздуха в защищенных от света контейнерах. Аликвоту 90 мг порошка загружали в секцию 1 многосекционного устройства.

**1k. Получение сухого порошка, содержащего 5 ч/млн хлорита натрия в хлориде натрия**

К 89,99 г сухого NaCl (молекулярная масса: 58,44 г/моль) добавляли 50 мг сухого хлорита натрия (молекулярная масса: 90,44 г/моль) и смешивали до получения гомогенного смешанного порошка и хранили в сухих условиях без доступа воздуха в защищенных от света контейнерах. Аликвоту 90 мг порошка загружали в секцию 1 многосекционного устройства.

**1l. Получение сухого порошка, содержащего 10 ч/млн хлорита кальция в хлориде натрия**

К 89,99 г сухого NaCl (молекулярная масса: 58,44 г/моль) добавляли 100 мг сухого хлорита кальция (молекулярная масса: 157,89 г/моль) и смешивали до получения гомогенного смешанного порошка и хранили в сухих условиях без доступа воздуха в защищенных от света контейнерах. Аликвоту 90 мг порошка загружали в секцию 1 многосекционного устройства.

**Пример 2: Общая процедура получения исходных растворов активатора объемом 1 л для загрузки аликвот малого объема в многосекционное устройство**

**2a. Исходный раствор активатора - уксусной кислоты (0,125%, pH 2,95)**

В 998,75 мл стерильной воды растворяли 1,25 мл уксусной кислоты (молекулярная

масса: 60,05 г/моль).

**2b. Исходный раствор активатора - уксусной кислоты (0,125%, рН 4,3)**

В 998,75 мл стерильной воды растворяли 1,25 мл уксусной кислоты (молекулярная масса: 60,05 г/моль). рН доводили до уровня 4,3 с использованием 10N NaOH.

**2с. Исходный раствор активатора - уксусной кислоты (0,25%, рН 4,3)**

В 998,75 мл стерильной воды растворяли 2,5 мл уксусной кислоты (молекулярная масса: 60,05 г/моль). рН доводили до уровня 4,3 с использованием 10N NaOH.

**2d. Исходный раствор активатора - уксусной кислоты (0,25%, рН 5,0)**

В 998,75 мл стерильной воды растворяли 2,5 мл уксусной кислоты (молекулярная масса: 60,05 г/моль). рН доводили до уровня 5,0 с использованием 10N NaOH.

**2е. Исходный раствор активатора - уксусной кислоты (1%, рН 4,3)**

В 998,75 мл стерильной воды растворяли 10 мл уксусной кислоты (молекулярная масса: 60,05 г/моль). рН доводили до уровня 4,3 с использованием 10N NaOH.

**2f. Исходный раствор активатора - уксусной кислоты (2%, рН 4,3)**

В 998,75 мл стерильной воды растворяли 20 мл уксусной кислоты (молекулярная масса: 60,05 г/моль). рН доводили до уровня 4,3 с использованием 10N NaOH.

**2g. Исходный раствор активатора - уксусной кислоты/ацетата натрия (0,1 М, рН 5,0)**

К 800 мл дистиллированной воды добавляли 5,772 г ацетата натрия (молекулярная масса: 82 г/моль), 1,778 г уксусной кислоты (молекулярная масса: 60,05 г/моль). рН доводили до уровня 5,0 с использованием 10N HCl или 10N NaOH и добавляли дистиллированную воду до тех пор, пока объем не составил 1 л.

**2h. Изотонический исходный раствор активатора - уксусной кислоты (0,125%, рН 2,95)**

В 998,75 мл стерильной воды добавляли 1,25 мл уксусной кислоты (молекулярная масса: 60,05 г/моль) и 8,4 г NaCl (молекулярная масса: 58,44 г/моль).

**2i. Изотонический исходный раствор активатора - уксусной кислоты (0,125%, рН 4,3)**

В 998,75 мл стерильной воды добавляли 1,25 мл уксусной кислоты (молекулярная масса: 60,05 г/моль) и 8,4 г NaCl (молекулярная масса: 58,44 г/моль). рН доводили до уровня 4,3 с использованием 10N NaOH.

**2j. Изотонический исходный раствор активатора - уксусной кислоты (0,25%, рН 4,3)**

В 998,75 мл стерильной воды добавляли 2,5 мл уксусной кислоты (молекулярная масса: 60,05 г/моль) и 8,4 г NaCl (молекулярная масса: 58,44 г/моль). рН доводили до уровня 4,3 с использованием 10N NaOH.

**2к. Изотонический исходный раствор активатора - уксусной кислоты (0,125%, рН 5,0)**

В 998,75 мл стерильной воды добавляли 1,25 мл уксусной кислоты (молекулярная масса: 60,05 г/моль) и 8,4 г NaCl (молекулярная масса: 58,44 г/моль). рН доводили до уровня

5,0 с использованием 10N NaOH.

**2l. Изотонический исходный раствор активатора - уксусной кислоты (0,25%, рН 5,0)**

В 998,75 мл стерильной воды добавляли 2,5 мл уксусной кислоты (молекулярная масса: 60,05 г/моль) и 8,4 г NaCl (молекулярная масса: 58,44 г/моль). рН доводили до уровня 5,0 с использованием 10N NaOH

**2m. Изотонический исходный раствор активатора - уксусной кислоты/ацетата натрия (0,1 М, рН 5,0)**

К 800 мл дистиллированной воды добавляли 5,772 г ацетата натрия (молекулярная масса: 82 г/моль), 1,778 г уксусной кислоты (молекулярная масса: 60,05 г/моль) и 8,4 г NaCl (молекулярная масса: 58,44 г/моль). рН доводили до уровня 5,0 с использованием 10N HCl или 10N NaOH и добавляли дистиллированную воду до тех пор, пока объем не составил 1 л.

**2n. Ацетатный буфер (0,1 М, рН 5,0)**

К 800 мл стерильной воды добавляли 5,772 г ацетата натрия (молекулярная масса: 82 г/моль) и 1,778 г уксусной кислоты (молекулярная масса: 60,05 г/моль). рН доводили до уровня 5,0 с использованием 10N HCl и добавляли дистиллированную воду до тех пор, пока объем не составил 1 л.

**2o. ACES буфер (0,1 М, рН 6,7)**

К 800 мл стерильной воды добавляли 18,22 г N-(2-ацетиамидо)-2-аминоэтансульфоновой кислоты (молекулярная масса: 182,2 г/моль). рН доводили до уровня 6,7 с использованием 10N NaOH и добавляли дистиллированную воду до тех пор, пока объем не составил 1 л.

**2p. Раствор лимонной кислоты (0,1 М, рН 2,2)**

Количество 19,2 г лимонной кислоты (молекулярная масса: 192,1 г/моль) растворяли в 1 л стерильной воды.

**2q. Цитратный буфер (0,1 М, рН 6,0)**

К 800 мл стерильной воды добавляли 12,044 г цитрата натрия (молекулярная масса: 294,1 г/моль) и 11,341 г лимонной кислоты (молекулярная масса: 192,1 г/моль). рН доводили до уровня 6,0 с использованием 0,1N NaOH и добавляли дистиллированную воду до тех пор, пока объем не составил 1 л.

**2r. ADA буфер (0,1 М, рН 6,6)**

К 800 мл стерильной воды добавляли 95,11 г 2-[(2-амино-2-оксоэтил)-(карбоксиметил)амино]уксусной кислоты (ADA, молекулярная масса: 190,22 г/моль). ADA растворялась, когда рН доводили до уровня 6,6 при помощи 10N NaOH, и добавляли дистиллированную воду до тех пор, пока объем не составил 1 л.

**2s. EBBS буфер, включающий краситель феноловый красный (рН 7,0)**

К 800 мл стерильной воды добавляли 200 мг CaCl<sub>2</sub> (молекулярная масса: 110,98 г/моль), 200 мг MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O (молекулярная масса: 246,47 г/моль), 400 мг KCl (молекулярная масса: 75 г/моль), 2,2 г NaHCO<sub>3</sub> (молекулярная масса: 84,01 г/моль), 6,8 г NaCl

(молекулярная масса: 58,44 г/моль), 140 мг  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$  (молекулярная масса: 138 г/моль), 1 г D-глюкозы (декстроза) (молекулярная масса: 180,16 г/моль) и 10 мг фенолового красного (молекулярная масса: 354,38 г/моль). pH раствора довели до 7,0 или другого желаемого уровня pH с использованием HCl или NaOH.

## **2t. Стерильная изотоническая оксигенированная вода**

К исходному объему 1 л стерильной воды, насыщенной кислородом, добавляли 9 г NaCl и хранили при комнатной температуре в герметично закрытой бутылки, защищенной от света.

**Пример 3: Быстрое приготовление готовых к применению дезинфицирующих композиций из твердых солей окисленного хлора, объединенных с растворами из Примера 1.**

### **Пример 3.1: Неограничивающие стадии общей процедуры**

1. Аликвоту 90 мг любого из порошков из Примера 1 загружают в секцию 4 многосекционного устройства.

2. Аликвоту 10 мл любого из растворов активатора из Примера 2 загружают в секцию 4 многосекционного устройства.

3. Для получения основного продукта согласно изобретению герметичную перегородку, барьер или порт 3 согласно Фиг. 1 между завинчивающейся крышкой и секцией 4 разрушают или открывают для смешивания содержимого секции 1 с раствором в секции 4, после чего осторожно сдавливают или встряхивают для получения дезинфицирующего раствора. Полученный раствор можно извлечь через отверстие после удаления завинчивающейся крышки на многосекционном устройстве, и теперь он готов к использованию. Изотонические растворы имеют pH в диапазоне от 4 до 9, предпочтительно от 5 до 6 и обычно используются для противомикробных целей.

4. Необязательно, в зависимости от предполагаемого использования, водорастворимый краситель в твердой форме с цветом, изменяющимся в зависимости от степени окисления API, (ROD), в заранее рассчитанном количестве для обеспечения концентрации красителя в диапазоне концентраций 0,01-1000 ч/млн, необязательно загружают в секцию 9 многосекционного устройства, и процедуру по п. 3 повторяют, включая смесь из секций 1,4 и 9.

5. Необязательно, в зависимости от предполагаемого использования, предварительно рассчитанное количество аминокислоты в качестве стабилизатора API, предпочтительно таурина в той же концентрации, что и API, необязательно загружают в секцию 5 многосекционного устройства и процедуру по п. 3 повторяют, включая смесь из секций 1,4 и 5.

6. Необязательно, в зависимости от предполагаемого использования, например, для нанесения на кожу или раны, количество водорастворимого усилителя вязкости (VE), который не может быть окислен API, предварительно рассчитанное для получения концентрации VE в конечном растворе в диапазоне концентраций 0,01-25%, загружают в секцию 5 многосекционного устройства. Концентрация VE 0,01-0,1% образует вязкий, но

жидкий раствор, а 0,3-1% образует гель. Дисперсию VE в растворе со стадии 3, 4 и/или 5 превращают в вязкий раствор или гель с использованием миксера Silverson или Ystral Mixer и используют на месте для нанесения на кожу или раны. Вязкий раствор или гель обладают повышенной стабильностью из-за более медленного движения молекул и могут быть упакованы в мягкие пакеты, бутылки, защищающие раствор или гель от воздуха и света, для последующего использования.

**Пример 4: Антибиопленочный эффект in vitro испытываемых растворов НОСІ и уксусной кислоты Примера 3.**

Три разных испытываемых раствора были получены из многосекционного устройства. Все три испытываемых раствора получают, как описано в примере 3.1, из многосекционного устройства, содержащего 90 мг сухого порошка, включающего 200 ч/млн гипохлорита натрия в хлориде натрия (пример 1с) в секции 1. Три аликвоты по 10 мл растворов уксусной кислоты (0,125%, рН 4,3, пример 2b) в секции 4 в трех разных многосекционных устройствах. Раствор 1: (0,25%, рН 4,3, пример 2с), Раствор 2: (1%, рН 4,3, пример 2е), Раствор 3: (2%, рН 4,3, пример 2f).

**Экспериментальная установка**

**Испытываемые организмы:** Штаммы дикого типа *Pseudomonas aeruginosa* или *Staphylococcus aureus*. **Тип биопленки:** биопленки, образованные в течение 48 или 24 часов, выращенные на полупроницаемых мембранах, помещенных на отвержденную среду с добавлением 0,5% глюкозы. В случае 48-часовых биопленок мембраны с биопленками переносили на свежие пластины через 24 часа.

**Исходное количество жизнеспособных клеток:**  $5 \times 10^9$  колониеобразующих единиц (КОЕ)

**Способ лечения:** Мембраны с биопленками переносили на новые пластины. На вторую мембрану накладывали 8-10 слоев стерильной марли, на слои марли пипеткой наносили 1 мл противомикробного раствора. Обработку осуществляли при комнатной температуре в течение 2-3 ч или 4-6 ч. В случае обработки продолжительностью от 4 до 6 часов слои марли заменяли свежими слоями марли с 1 мл раствора образца через 2 или 3 часа после начала обработки.

**Способ оценки:** слои марли удаляли, и каждую мембрану с биопленками переносили в пробирку объемом 15 мл, содержащую 5 мл 0,9% NaCl, встряхивали в течение 10 секунд, обрабатывали ультразвуком в ультразвуковой ванне в течение 10 минут и снова встряхивали в течение 10 секунд. Осуществляли десятикратные серийные разведения и по 10 мкл каждого разведения высевали на пластины LB для подсчета жизнеспособных КОЕ.

**Результаты и выводы**

Фиг. 2 показывает результаты, полученные с использованием растворов образцов. Увеличение концентраций НАс с 0,25% до 1% и 2% в растворе 200 ч/млн НОСІ постепенно увеличивало уничтожение биопленок *S. aureus*. Эффект на биопленку только 1% уксусной кислоты был всего лишь незначительным. Три испытываемых раствора сравнивали с 4 различными конкурирующими продуктами для заживления ран, представленными на

рынке, и все они показали лишь незначительное воздействие на биопленки *S. aureus*. Еще более сильный эффект был показан для биопленок из *P. Aeruginosa*. Был сделан вывод, что хлорноватистая кислота и уксусная кислота при pH 4,3 действуют синергетически и эффективно при концентрациях, которые в других исследованиях показали свою безопасность.

### **Пример 5: Исследования токсичности *in vivo***

#### **Пример 5.1: 7-дневное исследование ингаляционной токсичности на крысах.**

7-дневное исследование ингаляционной токсичности на крысах осуществляли, как описано Kogel *et al in 2913 в* [https://www.pmiscience.com/resources/docs/default-source/default-document-library/2013\\_ukogel\\_ict\\_poster.pdf?sfvrsn=d6a9f606\\_0](https://www.pmiscience.com/resources/docs/default-source/default-document-library/2013_ukogel_ict_poster.pdf?sfvrsn=d6a9f606_0).

Исследование с ингаляционным введением крысам осуществляли в соответствии с требованиями Организации экономического сотрудничества и развития (OECD). Испытываемый раствор получали, как описано в примере 3.1, из многосекционного устройства, содержащего 90 мг сухого порошка, включающего 100 ч/млн гипохлорита натрия в хлориде натрия (пример 1 b) в секции 1 и аликвоту 10 мл раствора уксусной кислоты (0,125%, pH 4,3, пример 2b) в секции 4. Указания для испытаний 412, Крыс Sprague-Dawley подвергали воздействию отфильтрованного свежего воздуха (имитация) в качестве эталона или испытываемого раствора. Уход за животными и их использование соответствуют политике Американской ассоциации научных исследований лабораторных животных (1996). Все эксперименты на животных одобрены Институциональным комитетом по уходу и использованию животных (IACUC). Гистопатологическую оценку осуществляли в определенных анатомических участках носа и левого легкого в соответствии с определенной системой оценок. Свободные клетки легких определяли в жидкости бронхоальвеолярного лаважа методом проточной цитометрии, а медиаторы воспаления измеряли методом профилирования с использованием нескольких аналитов (MAP). Для подхода Systems Toxicology получали образцы РНК из определенных участков дыхательных путей, т.е. респираторного эпителия полости носа (RNE) и легких. Для выделения РНК из легких респираторный эпителий главных бронхов и паренхимы легких отделяли лазерной захватывающей микродиссекцией (LCM), с последующим процессингом и анализом на полногеномных микроматрицах Affymetrix (GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array). Не было обнаружено серьезных нарушений, связанных с воспалением, клеточным стрессом, пролиферацией клеток в бронхах или паренхиме легких.

#### **Пример 6: Лечение мастита**

Для применений, где цветовой индикатор на стадии 4 может добавить информацию в терапевтическую процедуру, например для указания на окислительную активность API, в процедуру включена секция, содержащая ROD.

#### **Пример 7: Клиническая противовирусная терапия**

В медицинскую чашку небулайзера Gima Aerosol Corsia загружали 5 мл испытываемого раствора, полученного как описано в примере 3.1 из многосекционного устройства, содержащего 90 мг сухого порошка, включающего 1 ч/млн хлорита натрия в

хлориде натрия (пример 1j) в секции 1 и аликвоту 10 мл раствора лимонной кислоты (0,1 М, рН 2,2, пример 2p) в секции 4. Рот пациента с коронавирусной инфекцией легких соединяют со шлангом, а лицевую маску присоединяют к небулайзеру, который запускают. После 10-15 минут дыхания жидкость израсходована, и небулайзер выключают. Пациент находился под наблюдением в течение нескольких часов, чтобы убедиться в отсутствии побочных эффектов лечения. Слизистую оболочку и реснички пациента исследовали на возможные побочные эффекты.

### **Пример 8: Фармакология ингаляционного раствора (IS)**

Исследованы вирусиактивирующие свойства ингаляционного раствора (IS) композиции в отношении модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA). Продукты IS при 50, 100 и 200 ч/млн HOCl (рН 5,5) (и разбавленные 50% растворы) продемонстрировали инактивирующие вирус свойства, предполагая, что самая низкая концентрация продукта IS, показывающая инактивацию вирусов, составляла 25 ч/млн HOCl. Были испытаны дальнейшие разведения, и разбавленные растворы с концентрациями 5, 10 и 20 ч/млн не показали какой-либо инактивации вируса и эффекта, что предполагает, что был продемонстрирован неактивный нижний диапазон. Продукты IS с концентрациями 50, 100 и 200 ч/млн HOCl (рН 5,5) продемонстрировали противовирусную активность против оболочечной ДНК вируса осповакцины для всех испытанных концентраций HOCl. Продукты, обладающие противовирусной активностью в отношении вируса осповакцины, считаются активными в отношении всех оболочечных вирусов, включая SARS-CoV-2. В отдельном исследовании было показано, что IS инактивирует SARS-CoV-2 при концентрации HOCl от 10 до 200 ч/млн.

Что касается антибактериальной активности, ночные культуры *S. aureus* и *P. aeruginosa* выращивали в течение 2 и 24 часов, соответственно, для испытания IS против как планктонных, так и биопленочных бактерий. Полный эффект наблюдали при 50 ч/млн HOCl IS для *P. aeruginosa* и *S. aureus* (хотя при 100 ч/млн HOCl IS для *S. aureus* biofilm).

Таким образом, продукты IS с концентрацией HOCl от 50 до 200 ч/млн продемонстрировали инактивацию вируса в двух разных испытаниях MVA *in vitro*. После разведений испытываемых продуктов наименьшая концентрация, показывающая противовирусную активность, составляла 25 ч/млн HOCl, а самыми низкими испытанными концентрациями, показывающими отсутствие противовирусной активности, были 5, 10 и 20 ч/млн HOCl. В этих экспериментах было показано, что диапазон противовирусных эффективных концентраций составлял от 25 до 200 ч/млн HOCl. Было показано, что IS инактивирует SARS-CoV-2 в различных концентрациях.

### **Пример 8.1: Противовирусная эффективность**

Противовирусная эффективность HOCl против вируса осповакцины

Противовирусные анализы осуществляли для оценки вирулицидной активности HOCl в отношении модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA). Используемый продукт представлял собой IS, содержащий 50, 100 и 200 ч/млн HOCl в следующих концентрациях:

- Неразбавленный (80,0%)
- Разбавленный водой высокой степени очистки (50,0%)
- Разбавленный водой высокой степени очистки (10,0%)
- Разбавленный водой высокой степени очистки (1,0%) - только 200 ч/млн НОС1

Методы испытаний включали воздействие испытываемых продуктов (50, 100 & 200 ч/млн НОС1) в разведениях от 1 до 80% на *ВНК21-клетки*, инфицированные MVA, что подтверждали анализом инфекционности. Продукт находился в контакте с клетками, инфицированными MVA, в течение 1 или 2 минут, после чего осуществляли анализ инактивации для определения вирулицидной активности. Определение цитотоксичности также осуществляли после контакта с продуктом.

#### **Метод**

Для получения суспензии испытываемого вируса, *ВНК21-клетки* культивировали с MEM и 10% или 2% эмбриональной телячьей сыворотки. Клетки инфицировали с множественностью заражения 0,1. Испытываемый продукт испытывали неразбавленным. За счет добавления мешающего вещества и суспензии испытываемого вируса получали 80,0% раствор.

Инфекционность определяли как титрование по конечной точке в соответствии с EN 5.5, с переносом 0,1 мл каждого разведения в восемь лунок микротитровального микропланшета к 0,1 мл свежерасщепленных клеток ( $10-15 \times 10^3$  клеток на лунку), начиная с самого высокого разведения. Микротитровальные планшеты инкубировали при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> атмосфере. Цитопатический эффект считывали с помощью инвертированного микроскопа. Расчет инфекционной дозы TCID<sub>50</sub>/мл осуществляли по методу Спирмена и Кербера.

Вирулицидную активность испытываемого дезинфицирующего средства оценивали путем расчета снижения титра по сравнению с контрольным титрованием без дезинфицирующего средства. Разница представлена как понижающий коэффициент (RF). В соответствии с EN 14476, дезинфицирующее средство или дезинфицирующий раствор в определенной концентрации обладает эффективностью инактивации вируса, если титр снижается по меньшей мере на 4 log<sub>10</sub> ступеней в течение рекомендуемого периода воздействия. Это соответствует инактивации  $\geq 99,99\%$ .

Определение вирулицидной активности осуществляли в соответствии с EN 5.5. Испытания на инактивацию осуществляли в герметично закрытых пробирках на водяной бане при температуре 20°C±1,0°C. Аликвоты сохраняли после соответствующего времени воздействия и определяли остаточную инфекционность. Определение цитотоксичности осуществляли в соответствии с EN 5.5.4.1. В качестве эталона для валидации теста был включен 0,7% раствор формальдегида в соответствии с EN 5.5.6. Время контакта составляло 5, 15, 30 и 60 минут. Кроме того, определяли цитотоксичность испытываемого раствора формальдегида в соответствии с EN 5.5.6.2 при разведениях до 10<sup>-5</sup>.

#### **Результаты**

Все неразбавленные испытываемые продукты (т.е. 50, 100, 200 ч/млн НОС1) в 80,0%

анализе были способны инактивировать MVA через 1 минуту воздействия. Коэффициенты снижения представляли собой следующие:

- 50 ч/млн HOCl:  $\geq 5,25 \pm 0,33$
- 100 ч/млн HOCl:  $\geq 5,13 \pm 0,25$
- 200 ч/млн HOCl:  $\geq 5,25 \pm 0,33$

Эти данные соответствовали инаktivации  $\geq 99,999\%$ .

50,0% растворы также были способны инактивировать MVA через 1 минуту воздействия. Коэффициенты снижения представляли собой следующие:

- 50 ч/млн HOCl:  $\geq 4,25 \pm 0,33$
- 100 ч/млн HOCl:  $\geq 4,13 \pm 0,25$
- 200 ч/млн HOCl:  $\geq 4,25 \pm 0,33$

Эти данные соответствовали инаktivации  $\geq 99,99\%$ .

10,0% растворы не были способны инактивировать MVA в течение 1 минуты воздействия. 1,0% раствор (200 ч/млн HOCl) также не был способен инактивировать MVA в течение 1 минуты.

В заключение, продукты для ингаляционного раствора (IS) при 50, 100 и 200 ч/млн HOCl, испытанные в неразбавленном виде, продемонстрировали активность против MVA после времени воздействия 1 минута (0,3 г/л BSA).

### **Пример 8.2: Антибактериальная и антибиопленочная эффективность**

#### **Пример 8.2.1. Антибактериальная и антибиопленочная эффективность IS**

Антибактериальный анализ осуществляли для оценки бактерицидной активности IS против *P. aeruginosa* и *S. Aureus*, выращенных в течение 2 или 24 часов для представления планктонных и биопленочных бактерий, соответственно. Используемым продуктом был IS (т.е. с 0,25% уксусной кислоты, pH 5,5, изотонический) в следующих концентрациях:

- 10 ч/млн HOCl
- 50 ч/млн HOCl
- 100 ч/млн HOCl
- 200 ч/млн HOCl
- 500 ч/млн HOCl

Продукт находился в контакте либо с *P. Aeruginosa*, либо с *S. aureus* в течение 1 часа, затем аликвоту высевали и оставляли для инкубации в течение ночи. На следующий день планшеты оценивали на рост и log снижение количественно определяли в случае частичного роста.

#### **Метод**

MH340 (*P. Aeruginosa* PAO1) выращивали в 5 мл LB, а NCTC-8325-4 (*S. aureus*) в 5 мл TSB в культуральных пробирках в течение ночи (17 часов) при 37°C при встряхивании при 180 об/мин.

После этого ночные культуры разбавляли 50-кратно и разведенную бактериальную суспензию помещали, по 200 мкл на лунку, в микротитровальные планшеты с 96 круглыми лунками (8 технических повторов). По одному микротитровальному планшету на состояние

и обработку на бактерию. Два часа роста (планктонные бактерии) + 1 час обработки и 24 часа роста (био пленочные бактерии) + 1 час обработки. Бактерии инкубировали при 37°C в течение 2 и 24 часов, соответственно.

После этого бактерии обрабатывали 0,9% NaCl (контроль), 10 ч/млн HOCl, 50 ч/млн HOCl, 100 ч/млн HOCl, 200 ч/млн HOCl и 500 ч/млн HOCl IS при 37°C в течение 1 часа.

После периода обработки (один час) по 20 мкл на лунку наносили на планшеты LB и культивировали при 37°C в течение ночи. На следующий день планшеты проверяли на рост (раствор хлорида натрия является контролем) или отсутствие роста.

### Результаты

Как видно из Таблицы 2 ниже, планктонные бактерии и биопленки *P. aeruginosa* уничтожались при более низких концентрациях продукта, чем *S. aureus*. Существует полный антибактериальный эффект конечного продукта IS (100 ч/млн HOCl) во всех случаях в репрезентативных планктонных и био пленочных *S. aureus* и *P. aeruginosa*.

**Таблица 2**  
***S. aureus* и *P. Aeruginosa*, выращенные в планктонной форме (2 часа) и в био пленочной форме (24 часа), и их ответ на различные концентрации HOCl во вдыхаемом продукте. Плюс (+) указывает на рост, минус (-) указывает на отсутствие роста**

Концентрация HOCl	0,9% NaCl	10 ч/млн	50 ч/млн	100 ч/млн	200 ч/млн	500 ч/млн
<b><i>S. aureus</i>+1 час обработки</b>						
Планктонная форма (рост 2 часа)	+	1-кратное log снижение	-	-	-	-
Биопленка (рост 24 часа)	+	+	1-кратное log снижение	-	-	-
<b><i>P. aeruginosa</i>+1 час обработки</b>						
Планктонная форма (рост 2 часа)	+	-	-	-	-	-
Биопленка (рост 24 часа)	+	1-кратное log снижение	-	-	-	-

В заключение, IS при концентрациях 10 или 50 ч/млн HOCl убивают обычные планктонные бактериальные патогены *P. aeruginosa* и *S. aureus*, соответственно. IS при концентрациях 50 или 100 ч/млн HOCl убивают био пленочные формы *P. aeruginosa* и *S. aureus*, соответственно.

### Пример 8.2.2. Антибактериальная и антибио пленочная эффективность IS и уксусной кислоты

Другой антибактериальный анализ осуществляли для оценки бактерицидной активности IS и уксусной кислоты против *P. aeruginosa* и *S. Aureus*, выращенных в течение 2 часов для представления планктонных бактерий. Используемым продуктом был IS (т.е. с 0,25% уксусной кислоты, pH 5,5, изотонический) или только уксусная кислота в следующих концентрациях:

- 25 ч/млн HOCl

- 50 ч/млн HOCl
- 100 ч/млн HOCl
- 0,25% уксусной кислоты, pH 5,5, изотонический

Продукт находился в контакте либо с *P. Aeruginosa*, либо с *S. aureus* в течение 1 часа, затем аликвоту высевали и оставляли для инкубации в течение ночи. На следующий день планшеты оценивали на рост и количественно определяли логарифм снижения в случае частичного роста.

#### Метод

Разведенные ночные культуры (OD 0,5,  $\sim 10^7$  для *S. aureus* и  $\sim 10^8$  для *P. aeruginosa*) *S. aureus* (NCTC-8325-4) и *P. aeruginosa* PAO1 (MH340) выращивали в 96-луночных микротитровальных планшетах в течение 2 часов для испытания антибактериальных свойств против планктонных грамположительных и грамотрицательных бактерий. После этого лунки обрабатывали IS при различных концентрациях HOCl (25, 50 и 100 ч/млн HOCl, 0,25% уксусной кислоты, pH 5,5, изотонический), изотоническим раствором 0,25% уксусной кислоты (pH 5,5) и 0,9% раствором хлорида натрия (контроль) за час до сбора.

Через один час во все лунки добавляли нейтрализующий бульон Dey-Engley (Sigma Aldrich, D3435) для инактивации IS, осуществляли 10-кратные серийные разведения содержимого лунок и высевали на соответствующие планшеты с агаром (до  $10^{-8}$ ). Планшеты культивировали в аэробных условиях в течение 18 часов при 37°C. Количество КОЕ рассчитывали по количеству колоний в подсчитываемых разведениях для расчета логарифмического снижения. Испытание осуществляли с тремя техническими повторами для каждой бактерии.

#### Результаты

Как видно из Таблицы 3 ниже, 25, 50 и 100 ч/млн HOCl IS уничтожали как грамположительные (*S. aureus*), так и грамотрицательные (*P. aeruginosa*) бактерии. Изотонический раствор 0,25% уксусной кислоты (pH 5,5) не уничтожил бактерии.

**Таблица 3**

***S. aureus* и *P. aeruginosa*, выращенные в течение двух часов, а затем обработанные IS с различными концентрациями HOCl, 0,25% раствором уксусной кислоты (изотонической, pH 5,5) или раствором хлорида натрия в качестве контроля. Плюс (+) указывает на рост, минус (-) указывает на отсутствие роста**

Испытываемый раствор	0,9% NaCl	25 ч/млн HOCl IS	50 ч/млн HOCl IS	100 ч/млн HOCl IS	0,25% раствор уксусной кислоты, изотонический, pH 5,5
<b><i>S. aureus</i>+1 час обработки</b>					
Планктонная форма (рост 2 часа)	+	-	-	-	+
<b><i>P. aeruginosa</i>+1 час обработки</b>					
Планктонная форма (рост 2 часа)	+	-	-	-	1-кратное log снижение

В заключение следует отметить, что IS эффективно уничтожает планктонные

грамположительные (*S. aureus*) и грамотрицательные бактерии (*P. aeruginosa*) при концентрациях 25 ч/млн и 10 ч/млн, соответственно. Уксусная кислота не уничтожает грамположительные (*S. aureus*) бактерии и показывает минимальное уменьшение грамотрицательных бактерий (*P. aeruginosa*).

### **Пример 8.3: Эффективность против SARS-CoV-2**

Для оценки вирулицидной активности IS против клеток Vero E6, инфицированных SARS-CoV-2, осуществляли анализы на вирусную инактивацию и цитотоксичность. Используемый продукт представлял собой IS при следующих концентрациях:

- 10 ч/млн HOCl
- 50 ч/млн HOCl
- 100 ч/млн HOCl
- 200 ч/млн HOCl

Способ испытания включал воздействие испытываемого продукта при концентрациях от 10 до 200 ч/млн HOCl на клетки Vero E6, инфицированные SARS-CoV-2, в течение 48 часов. Затем клетки окрашивали и подсчитывали количество положительных на вирусный антиген клеток. Для оценки цитотоксичности осуществляли анализ клеточной пролиферации.

### **Метод**

Vero E6 клеток/лунка высевали в 96-луночные планшеты, добавляли вирус (множественность заражения 0,002) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C, или среды только для необработанных контролей и для анализов цитотоксичности. Вирус удаляли и добавляли IS 10 ч/млн HOCl, 50, 100 или 200 ч/млн HOCl, неразбавленный или разбавленный двукратно, на 15 минут, после чего инкубировали в течение 48 часов. Инкубированные клетки фиксировали и окрашивали первичным антителом, химерным моноклональным антителом к спайк-белку SARS-CoV-2, и вторичным антителом, F(ab')<sub>2</sub>-козьим анти-человеческим IgG Fc перекрестно-адсорбированным вторичным антителом, HRP. Отдельные инфицированные клетки визуализировали с использованием субстрата DAB и автоматически подсчитывали при помощи УФ-анализатора ImmunoSpot серии 5. Анализы цитотоксичности осуществляли с использованием анализа клеточной пролиферации Cell Titer AQueous One Solution.

### **Результаты**

В этом исследовании противовирусный эффект испытываемого соединения оценивали по количеству клеток VERO, свободных от вируса, по сравнению с контролем. На основании результатов IS снижал количество вирус-положительных клеток VERO, таким образом, IS инактивировал SARS-CoV-2 при концентрации от 10 ч/млн до 100 ч/млн HOCl, не убивая клетки VERO. Сообщалось, что клетки VERO чрезвычайно хрупкие и не очень подходят для исследования IS, поэтому даже более лучшая противовирусная активность могла бы быть достигнута с более устойчивыми клетками. Однако провести эти эксперименты на других типах клеток было невозможно из-за классификации SARS-CoV-2 как микроорганизма класса 3. Результаты вирусной инактивации и цитотоксичности

представлены на Фиг. 3.

Ссылаясь на Фиг. 3 каждый столбец представляет собой среднее значение со стандартной ошибкой среднего (столбцы ошибок). Левая ось показывает количество положительных на вирусный антиген клеток, нормализованное к необработанным контролям (в процентах). Правая ось показывает жизнеспособность клеток (поглощение), нормализованную к необработанным контролям (в процентах). MOI=Множественность заражения.

Следует отметить, что неразбавленные эксперименты при 50, 100 и 200 ч/млн убивали клетки VERO за счет неизвестного механизма, и поэтому они не представлены на Фиг., указанной выше. Однако 10 ч/млн в неразбавленном виде и разведение 50:50 50, 100 и 200 ч/млн не убивали клетки VERO, и наблюдалась инактивация SARS-Cov-2. В заключение, в различных концентрациях IS инактивирует SARS-CoV-2.

### **Пример 9: Токсикология ингаляционного раствора (IS)**

Было осуществлено несколько исследований *in vivo*, и исследования продолжаются, чтобы охарактеризовать токсикологию IS.

В Ellegaard Göttingen Minipigs в Дании на геттингенских карликовых свиньях были осуществлены не-GLP исследования ингаляционной токсичности *in vivo*. Эти исследования на карликовых свиньях включают 5-дневное исследование с многократным введением путем интубации распыляемого IS, включая период восстановления 2 или 4 недели для выбранных животных. Кроме того, осуществляли небольшое пилотное исследование с интубацией, чтобы облегчить выбор уровней доз для последующих исследований. Интубация была выбрана в качестве пути введения в этих исследованиях, чтобы максимизировать количество IS, достигающего легких.

После этих исследований также осуществляли дополнительное исследование продолжительностью 5 дней на карликовых свиньях Ellegaard Göttingen с дозированием распыляемого IS через маску, чтобы имитировать предполагаемое воздействие на человека, которое будет изучаться в предлагаемых клинических испытаниях.

Дальнейшее не-GLP исследование максимально переносимой дозы на карликовых свиньях осуществляли в качестве предварительного исследования перед 14-дневным GLP исследованием ингаляционной токсичности с многократным введением средства, которое осуществляли на карликовых свиньях. В обоих исследованиях (предварительном и основном) введение осуществляли через маску, опять же, чтобы максимально точно имитировать введение человеку. Из-за ограничений, связанных с благополучием животных, карликовым свиньям можно вводить дозу только один раз в день, и поэтому они подвергаются воздействию распыляемого IS в течение 60 минут для доставки суточной дозы, предназначенной для клинических исследований (т.е. 18 мл при 100 ч/млн), в отличие от дозирования по 5 мл несколько раз в день.

### **Пример 9.1: Токсичность при многократном введении**

Первоначальные исследования токсичности (не-GLP) были проведены на Ellegaard Göttingen Minipigs в Дании. Дополнительное предварительное не-GLP исследование было

проведено в Covance в Англии, и GLP исследование продолжается в Covance в Англии. Все завершённые и запланированные исследования токсичности при многократном введении средства в общем виде описаны в следующих подразделах.

#### **Пример 9.1.1: Исследование ингаляционного введения *in vivo* - интубация**

В этом эксперименте были использованы сорок два здоровых молодых взрослых геттингенских минипига, 21 самец и 21 самка, возраста 6-8 месяцев. Карликовые свиньи весили приблизительно 12 кг. Карликовых свиней разводили и содержали в Ellegaard Göttingen Minipigs в барьерных условиях, одобренных AAALAC International, и в соответствии с местными стандартами среды, кормления и ухода. Протокол эксперимента был одобрен Датской инспекцией по экспериментам на животных (лицензия № 2020-15-0201-00530), и все процедуры осуществляли в соответствии с датским законодательством, касающимся испытаний на животных. Исследование осуществляли не в соответствии с GLP, однако данные регистрировались и сообщались в соответствии с документально оформленным планом исследования и местными стандартными операционными процедурами.

Исследование осуществляли в две отдельных фазы. В первой фазе 32 животных (4 самца и 4 самки на группу) обрабатывали в течение 5 дней и умерщвляли. Во второй фазе еще 10 животных (5 самцов и 5 самок) обрабатывали самой высокой дозой; 1 самец и 1 самка были убиты на 5-й день после последней обработки, а 2 самца и 2 самки были убиты соответственно после 14-дневного или 28-дневного периода восстановления. Обе фазы обобщены и представлены в настоящей заявке как одно исследование для удобства.

Животных распределяли по группам введения следующим образом:

Основная фаза

- 0,9% NaCl в качестве контроля (4 самца и 4 самки)
- 50 ч/млн НОС1+0,25% НАс, рН 5,5, изотонический (4 самца и 4 самки)
- 100 ч/млн НОС1+0,25% НАс, рН 5,5, изотонический (4 самца и 4 самки)
- 200 ч/млн НОС1+0,25% НАс, рН 5,5, изотонический (4 самца и 4 самки)

Фаза восстановления

- 200 ч/млн НОС1+0,25% НАс, рН 5,5, изотонический (1 самец и 1 самка убиты после последней дозы)
- 200 ч/млн НОС1+0,25% НАс, рН 5,5, изотонический (2 самца и 2 самки убиты после 2-недельного восстановления)
- 200 ч/млн НОС1+0,25% НАс, рН 5,5, изотонический (2 самца и 2 самки убиты после 4-недельного восстановления)

Кроме того, в пилотном исследовании использовали четырех карликовых свиней, трем из которых вводили дозу IS 500 ч/млн+0,25% НАс, рН 5,5, изотонический, в то время как один получал раствор хлорида натрия и действовал в качестве контроля.

Всех карликовых свиней анестезировали (пропофолом, потенцированным буторфанолом, через внутривенный катетер) ежедневно в течение пяти дней для получения 5 мл распыляемого продукта (раствор хлорида натрия для контрольной группы) через

эндотрахеальную трубку. Карликовых свиней вентилировали при помощи наркозного аппарата GE при вентиляции с регулируемым объемом с общим потоком 2 л/мин (50% кислорода) и дыхательным объемом 10 мл/кг. Спирометрию, включая  $P_{\text{peak}}$  (основной выходной параметр для оценки потенциальной бронхоконстрикции), регистрировали каждые две минуты, а также капнометрию, неинвазивное артериальное давление, частоту сердечных сокращений (ЭКГ) и температуру.

Животным давали по меньшей мере 10 минут для стабилизации на аппарате ИВЛ, прежде чем регистрировали наблюдения, включая  $P_{\text{peak}}$ . Животных наблюдали в течение 10 минут в качестве исходных измерений; после этого начинали распыление 5 мл продукта (небулайзер Aerogen Solo, Timik Aps, Kolding, Denmark). Распыление длилось 11-20 мин (в соответствии с указаниями изготовителя, 2-5 мин/мл). После распыления всего продукта животных наблюдали еще в течение 15 минут (после ингаляции), прежде чем они могли прийти в сознание.

Каждое утро до и каждый день после анестезии/ингаляции осуществляли балльную оценку всех животных для оценки общего состояния, аппетита, поведения, кашля, функции легких и подвижности. Образцы крови брали перед первой дозой и снова после последней дозы и оценивали на параметры клинической патологии. У выздоравливающих животных кровь также оценивали на клиническую патологию в период отсутствия введения средства.

Всех животных убивали на 5-й день после завершения введения, за исключением животных группы восстановления, которых убивали через 2 или 4 недели после отмены дозы. После эвтаназии опытным ветеринарным патологоанатомом было проведено плановое вскрытие с особым вниманием к дыхательной системе для выявления возможных макроскопических признаков токсичности *in situ*. Взвешивали легкие и медиастинальные лимфатические узлы. Образцы для гистопатологии собирали проксимально (включая главный бронх) и дистально из всех семи долей легкого, из трахеи, раздвоения трахеи, медиастинальных лимфатических узлов, сердца (мышцы правого и левого желудочков), почек и печени всех животных (плюс 2 сентинельных необработанных животных из вивария).

В пилотном исследовании с 500 ч/млн НОС1 наблюдали умеренную потерю ресничек в респираторном эпителии, в основном в образцах проксимальных отделов легких. На основании этого вывода было решено, что 200 ч/млн НОС1 будет подходящей высокой дозой для основного исследования.

В основном исследовании было обнаружено, что все карликовые свиньи были нормальными при клинических оценках два раза в день.

Гематологические и биохимические показатели были ничем не примечательны для всех групп в исходном состоянии (1-й день до ингаляции) и в конце эксперимента (5-й день после ингаляции). Никаких признаков, свидетельствующих об эффекте обработки, получено не было.

В спирометрических показателях основной параметр,  $P_{\text{peak}}$ , не отличался между различными группами обработки или контролем до и после ингаляции. Кроме того,

наибольшая разница в  $P_{\text{peak}}$ , наблюдаемая в расчете на животное, на эксперимент, составляла 1 см  $\text{H}_2\text{O}$ , что находится в пределах обнаружения машины и не является клинически значимым; однако, для двух свиней (одной в контрольной группе и одной в группе 200 ч/млн  $\text{HOCl}$ ) разница в  $P_{\text{peak}}$  составила 2 см  $\text{H}_2\text{O}$ . Это ясно указывает на то, что вдыхание распыленных продуктов не вызывало бронхоконстрикцию. На все остальные параметры обработка не повлияла.

При вскрытии явных макроскопических признаков реакции на обработку не наблюдали.

В первой части исследования (обработка 4+4 животных на группу при 0, 50, 100, или 200 ч/млн, плюс пилотная группа из трех животных, получавших дозу 500 ч/млн  $\text{HOCl}$ ) патологическими результатами, связанными с воздействием лекарственного средства, были локальная гиперплазия лимфатических узлов, утрата эпителиальных реснитчатых тканей в области раздвоения трахеи (бифуркации трахеи) и главных бронхов. Для главных бронхов потеря реснитчатого эпителия в первую очередь присутствовала проксимально в долях легкого, и все доли были поражены в равной степени. Нейтрофильная гранулоцитарная инфильтрация наблюдалась в слизистой оболочке и подслизистой оболочке трахеи, бифуркации трахеи и главных бронхах, а заболеваемость соответствовала картине потери реснитчатого эпителия. При введении 500 и 200 ч/млн  $\text{HOCl}$  присутствовали патологические изменения, связанные с воздействием лекарственного средства. Однако концентрация 500 ч/млн привела к наиболее выраженным результатам. У отдельных животных, получавших 100 ч/млн  $\text{HOCl}$ , наблюдали лишь минимальную потерю реснитчатого эпителия. Все остальные незначительные макроскопические и микроскопические изменения считаются либо связанными с процедурой ежедневной анестезии, либо случайными результатами. Различий между самцами и самками животных не наблюдали.

Во второй части исследования (животные, которым вводили дозу 200 ч/млн и которых убивали сразу после последней дозы (1+1), или после 2 недель восстановления (2+2), или после 4 недель восстановления (2+2)), было обнаружено, что гистопатологические результаты в группе 200 ч/млн  $\text{HOCl}$  без восстановления были сопоставимы с группой 200 ч/млн в основном исследовании. Таким образом, было подтверждено, что ежедневное вдыхание 200 ч/млн  $\text{HOCl}$  в течение пяти дней приводит к потере ресничек в трахее, области раздвоения трахеи и главных бронхах. Восстановление потери реснитчатого эпителия было обнаружено как через 2, так и через 4 недели восстановления. Гиперплазия была замечена в бронхиальном и бронхиолярном эпителии в группах восстановления, что свидетельствует о признаках клеточной регенерации. Нейтрофильную гранулоцитарную инфильтрацию в слизистой и подслизистой оболочке трахеи, раздвоения трахеи и главных бронхов после выздоровления не наблюдали. В группах восстановления наблюдали повышенное количество внутриальвеолярных макрофагов. Однако были замечены большие различия, которые вместе с небольшим количеством животных в каждой группе затрудняют четкое установление связи

результатов с испытываемым лекарственным средством. Кроме того, количество внутриальвеолярных макрофагов в группе 200 ч/млн НОСl, определенное в первом исследовании, было намного выше, чем во втором. Кроме того, очаговая инфильтрация альвеолярных макрофагов, иногда связанная с минерализацией, часто встречается у геттингенских карликовых свиней. Никаких различий между самками и самцами животных не наблюдали.

SIS при 100 ч/млн НОСl (5,0 мл) считался NOAEL (максимальная нетоксическая доза) после введения карликовым свиньям путем интубации.

**Пример 9.1.2: Исследование ингаляционного введения *in vivo* - с использованием маски**

В этом исследовании здоровых карликовых свиней ежедневно в течение пяти дней обрабатывали 10 мл (10 мл добавляют в небулайзер, но ожидаемая доставка составила 8,8 мл, так как остаточный объем составляет 1,2 мл) распыляемого IS или распыляемого раствора хлорида натрия (0,9% масс/об NaCl в качестве контроля) с использованием маски, закрывающей свиной пяточок. Ранее определенную NOAEL 100 ч/млн также испытывали как 50 ч/млн и сравнивали с контрольным раствором хлорида натрия.

В этом эксперименте использовали двенадцать здоровых молодых взрослых геттингенских карликовых свиней (возраст 6-8 месяцев) (31355). Карликовые свиньи (6 самцов и 6 самок) весили приблизительно 12 кг. Карликовых свиней разводили и содержали в Ellegaard Göttingen Minipigs в барьерных условиях, одобренных AAALAC International, и в соответствии с местными стандартами, что касается среды, кормления и ухода. Протокол эксперимента был одобрен Датской инспекцией по экспериментам на животных (лицензия № 2020-15-0201-00530), и все процедуры осуществляли в соответствии с датским законодательством, касающимся испытаний на животных.

Животных случайным образом разделяли на следующие группы введения, по 4 животных на группу (2 самца и 2 самки):

- 0,9% NaCl в качестве контроля (n=4)
- 50 ч/млн НОСl+0,25% уксусной кислоты, pH 5,5, изотонический (n=4)
- 100 ч/млн НОСl+0,25% уксусной кислоты, pH 5,5, изотонический (n=4)

Карликовых свиней обучали к принятию фиксации в лямках два раза течение недели перед исследованием. Во время исследования двух карликовых свиней одновременно помещали в лямки в спокойной и затемненной процедурной комнате. Животных слегка усыпляли низкими дозами мидазолама (0,3-0,7 мг/кг - с повышением в течение пяти дней по мере необходимости, чтобы каждое животное оставалось спокойным), и их глаза прикрывали, чтобы они оставались спокойными. После этого на морду свиньи надевали маску и соединяли с классическим небулайзером Pari Boy®. Камеру небулайзера изначально заполняли 4 мл IS или раствора хлорида натрия и непрерывно пополняли (три раза по 2 мл) до тех пор, пока не было введено 10 мл примерно через 30 мин. По данным производителя остаточный объем составляет примерно 1,2 мл, поэтому введенная доза составила ~8,8 мл. К хвосту каждого животного присоединяли пульсоксиметр для

измерения пульса и насыщения кислородом; показания, включая частоту дыхания, отмечали через 5, 10, 15 и 20 минут ингаляции. После процедуры животных помещали в бокс для восстановления и наблюдали до полного выздоровления, а затем направляли обратно в их стойло. Процедуру повторяли ежедневно в течение пяти дней. На пятые сутки животных усыпляли после последней ингаляции.

Каждое утро до и после процедуры осуществляли балльную оценку всех животных для оценки общего состояния, аппетита, поведения, кашля, функции легких и подвижности.

Образцы крови брали в первый день перед ингаляцией (исходный уровень) и в последний день ингаляции после ингаляции. Осуществляли стандартные биохимические и гематологические анализы, включая лейкоцитарную формулу.

После эвтаназии опытным ветеринарным патологоанатомом было проведено плановое вскрытие с особым вниманием к дыхательной системе для выявления возможных макроскопических признаков токсичности *in situ*. Легкие и медиастинальные лимфатические узлы взвешивали. Образцы для гистопатологии собирали проксимально (включая главный бронх) и дистально из правой краниальной и левой каудальной долей легкого, из трахеи, области раздвоения трахеи, медиастинальных лимфатических узлов, сердца (мышцы правого и левого желудочка), почки и печени. Носовые ходы собирали для гистопатологии с использованием стандартизированного подхода для исследования трех назальных уровней.

Осуществляли гистологическое исследование легких (включая трахею, раздвоение трахеи, бронхи и бронхиолы), лимфатических узлов (трахеобронхиальных), носовых ходов (чешуйчатого, переходного, респираторного и обонятельного эпителия, покрывающего назальное отверстие, носовых раковин, верхнечелюстной области, сошниково-носового органа, верхней и средней носовых раковин, и носоглотки), печени, почек и сердца.

В нескольких случаях было слышно кашель или чихание в связи с вдохом или после снятия маски; это было отмечено для одного животного в контрольной группе, двух животных в группе 50 ч/млн, и одного животного в группе 100 ч/млн. Вероятно, это может быть реакцией на влажную местную среду, которую маска создает вокруг морды. Поскольку заболеваемость была одинаковой в группах, это нельзя отнести за счет IS. Частота дыхания, пульс и насыщение кислородом были одинаковыми между группами. Животные восстанавливались от легкого седативного эффекта максимум через 10 минут после введения дозы.

При регулярных ежедневных осмотрах никаких клинических признаков не было выявлено. Динамика гематологических и биохимических показателей от исходного уровня (день 1 до ингаляции) до окончания эксперимента (день 5 после ингаляции) во всех группах была ничем не примечательной. Повышение уровня креатинкиназы, которое наблюдали во всех группах, считается наиболее вероятным из-за трудностей, связанных с обращением и сбором крови.

При вскрытии явных макроскопических признаков токсичности не наблюдали.

Патологических изменений, связанных с воздействием лекарственного средства в

трахее, области раздвоения трахеи и легких не наблюдали. Все незначительные макроскопические и микроскопические нарушения, обнаруженные в трахее, области раздвоения трахеи и легких, расценивались либо как связанные с ежедневной процедурой седации, безуспешными попытками забора крови из яремной вены, эвтаназией, либо как случайные результаты. Например, фокальную инфильтрацию альвеолярных макрофагов, иногда связанную с минерализацией, наблюдали у некоторых животных во всех группах и описывали как частую обнаруживаемую у геттингенских карликовых свиней. Сообщалось также, что эвтаназия пентобарбиталом может вызвать повреждение легочной ткани, включая гиперемия, отек, кровоизлияние, эмфизему и некроз, на основании исследований на крысах, мышцах, кроликах, морских свинках, овцах, приматах, собаках и кошках, и такая закономерность наблюдается у разных видов.

Внутри носа и носоглотки во всех трех группах наблюдались гиперемия, десквамация эпителия, потеря ресничек и лимфоидная гиперплазия. Изменения чаще всего наблюдали в очаговых областях. Что касается носоглотки, было зарегистрировано больше животных с изменениями как в группах 100 ч/млн, так и 50 ч/млн НОСІ по сравнению с группой, получавшей раствор хлорида натрия. Однако описание поражений было сходным во всех группах, и на основании небольшого количества животных был сделан вывод, что между тремя исследуемыми группами не наблюдается четкой разницы. Следует отметить, что десквамация эпителия может рассматриваться как артефакт забора ткани. Сделан вывод, что вдыхание через маску 100 и 50 ч/млн НОСІ не может быть связано с повышением выявленных нарушений, имеющих значимость, по сравнению с контрольной группой, получавшей раствор хлорида натрия.

В заключение следует отметить, что результаты наблюдали во всех группах, включая контроли с раствором хлорида натрия, но у животных, получавших IS, не было ни одного случая, который можно было бы отнести за счет IS. На основании этого исследования NOAEL для IS составила 100 ч/млн (8,8 мл) при введении через маску.

### **Пример 9.1.3: Исследование безопасности многократного введения *in vivo***

IS испытывали в модели ингаляции *in vivo* на карликовых свиньях для оценки максимально переносимой дозы, чтобы облегчить выбор доз в последующем GLP исследовании. Здоровых карликовых свиней (n=6; 3 группы по 1 самцу и 1 самке в группе) ежедневно в течение семи дней обрабатывали аэрозолями в концентрациях 1,2, 2,3 или 5,4 мкг/л (используя 50, 100, или 200 ч/млн НОСІ+0,25% уксусной кислоты, рН 5,5, изотонический) с использованием маски, закрывающей морду. Ежедневная продолжительность обработки составляла 60 минут, и каждое животное получало соответственно 19,9, 19,1 или 22,2 мл в группах введения 50, 100 и 200 ч/млн IS ежедневно. Животных подвергали эвтаназии в День 8, после 7 дней ингаляции IS. Во время испытания осуществляли исследования клинического состояния, массы тела, потребления пищи, гематологии (периферической крови), биохимии крови, массы органов, макроскопической патологии и гистопатологические исследования. Концентрации НОСІ, рассчитанные по достигнутым концентрациям аэрозолей и номинальной концентрации хлорноватистой

кислоты в композициях, составляли 99%, 92% и 110% от целевого значения для групп 1, 2 и 3, соответственно. Не было никаких связанных с испытываемым веществом эффектов на клиническое состояние, массу тела, потребление пищи, гематологические или биохимические параметры крови или массу органов, и не было никаких связанных с обработкой макроскопических или гистопатологических нарушений. Был сделан вывод, что IS хорошо переносился при введении геттингенским карликовым свиньям через лицевую маску в течение 60 минут в день в течение 7 дней подряд и что концентрации 50, 100 или 200 ч/млн считались подходящими для 60-минутного ежедневного воздействия в долгосрочных исследованиях токсичности на геттингенских карликовых свиньях.

#### **Пример 10: Цитотоксичность раствора для промывания ран (WIS)**

Цитотоксичность *in vitro* раствора для промывания ран (WIS) при 200 ч/млн HOCI оценивали в двух исследованиях цитотоксичности. Цель исследований состояла в том, чтобы определить, токсичен ли WIS для культивируемых клеток млекопитающего L929 *in vitro*. Испытания осуществляли в соответствии с методами, описанными в ISO 10993-5, а подготовку образцов для испытаний осуществляли в соответствии с ISO 10993-12. В следующих подразделах кратко описаны исследования цитотоксичности *in vitro*.

##### **Пример 10.1: Цитотоксичность WIS *in vitro* (200 ч/млн HOCI)**

Образец WIS для испытаний (SOF 0001/05-01), содержащий 0,25% уксусной кислоты и 200 ч/млн HOCI, pH: 4,3, исследовали для определения потенциальной цитотоксической активности в отношении культивируемых клеток млекопитающих (мышинных фибробластов). Испытание осуществляли в соответствии с Фармакопеей США, Метод <87>, и рекомендациями ISO 10993-5.

Композицию WIS (SOF 0001/05-01) получали с использованием полной среды для культивирования клеток (среда Хэма F12 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и 50 мкг/мл гентамицина). Использовали соотношение 0,2 г испытываемого вещества/мл среды для разбавлений. Эту композицию испытывали неразбавленной, а также в разбавленном виде 1 часть композиции+3 части свежей среды для культивирования клеток.

В исследование были включены положительный контроль (лаурилсульфат натрия (SLS), 0,2 мг/мл) и необработанные контрольные культуры (служили также в качестве отрицательного контроля, обработанные полной средой для культивирования клеток). Клеточные культуры обрабатывали в трех повторах в каждой контрольной точке в течение 48 часов. Контрольные обработки давали соответствующие ответы, демонстрируя правильное функционирование и чувствительность тест-системы. Разбавленная композиция не проявляла токсичности (степень цитотоксичности 0 во всех случаях), в то время как неразбавленная композиция проявляла цитотоксичность (степень цитотоксичности 4 во всех случаях).

В условиях этого исследования (длительное воздействие, 48 часов) неразбавленный WIS (0,25% уксусной кислоты и 200 ч/млн хлорноватистой кислоты, pH: 4,3) показал цитотоксические эффекты на культивируемых клетках L929. На основании этих результатов делается вывод, что WIS с 0,25% уксусной кислоты и 200 ч/млн

хлорноватистой кислоты, pH: 4,3, не соответствуют требованиям ISO 10993-5 и USP<87>, поскольку степень цитотоксичности была >2. Однако разбавленная композиция WIS (SOF 0001/05-01) не показала никакой токсичности (во всех случаях степень цитотоксичности 0).

#### **Пример 10.2: Цитотоксичность WIS *in vitro* (200 & 448 ч/млн НОС1)**

В этом исследовании оценивали цитотоксичность *in vitro* композиций WIS (200 ч/млн НОС1, 0,25% уксусной кислоты), SOF 003/53 (448 ч/млн НОС1, 1% уксусной кислоты) и SOF 003/51 (200 ч/млн НОС1, 1% уксусной кислоты). Применяемые анализы *in vitro* измеряют высвобождение лактатдегидрогеназы (LDH) из разрушенных клеточных мембран и метаболическую активность (МТТ) в клеточной линии NCTC клон 929 (L-929) после воздействия композиций в течение 1, 4, 24 и 48 часов. Анализы осуществляли в соответствии с EUNCL SOP (EUNCL-GTA-03).

Для всех испытываемых композиций не наблюдали значительного разрыва мембран при испытываемых концентрациях (10-0,005%) и периодах воздействия (1, 4, 24 и 48 часов).

В соответствии с указаниями международного стандарта ISO-10993-5, ни одна из композиций WIS не вызвала цитотоксического эффекта (т.е. снижения жизнеспособности клеток более чем на 30%) в клетках NCTC клона 929 (L-929) при двух самых коротких периодах воздействия (1 и 4 часа).

После 24 и 48 часов воздействия WIS не оказывал цитотоксического действия на клетки (т.е. снижение жизнеспособности клеток менее чем на 30%), тогда как композиции SOF 003/53 и SOF 003/51 индуцировали цитотоксичность в этих временных точках (т.е. снижение жизнеспособности на 40-45% через 24 часа воздействия и на 55-60% через 48 часов, соответственно).

#### **Пример 11: Генотоксичность ингаляционного раствора (IS)**

GLP исследования *in vitro* с IS осуществляли в Charles River Laboratories, Hungary.

##### **Пример 11.1: Анализ обратных мутаций у бактерий *in vitro***

Ингаляционный раствор по изобретению испытывали на потенциальную мутагенную активность с использованием анализа обратных мутаций у бактерий. Исследование осуществляли в соответствии с GLP.

Эксперимент осуществляли с использованием гистидин-зависимых ауксотрофных штаммов *Salmonella typhimurium* (*Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 и TA1537) и триптофан-зависимого ауксотрофного штамма *Escherichia coli* (*Escherichia coli* WP2 *uvrA*) в присутствии и в отсутствие пост-митохондриального супернатанта (фракция S9), полученного из печени фенотал/β-нафтофлавоин-индуцированных крыс. Исследование включало предварительное испытание на совместимость и анализ 1 (метод внесения в чашку). Следующие концентрации были выбраны и предоставлены спонсором с соответствующей документацией следующим образом: 50 ч/млн, 100 ч/млн, 200 ч/млн и 500 ч/млн, они эквивалентны 0,05, 0,1, 0,2 и 0,5 мг/мл. При самом высоком объеме обработки (500 мкл) они были эквивалентны 25, 50, 100 и 250 мкг/чашка; эти концентрации использовали в Анализе 1. Из-за цитотоксичности также использовали дополнительные концентрации в чашках для обработки с более низкими объемами обработки на чашку с

концентрацией испытываемого образца 50 ч/млн: 0,3162, 1,0, 3,162 и 10 мкг/чашка с использованием объемов обработки поставляемого материала 6,3 мкл, 20 мкл, 63,2 мкл и 200 мкл, соответственно. Максимальная испытываемая концентрация составляла 250 мкг, а минимальная составляла 0,3162 мкг испытываемого образца/чашка (всего восемь концентраций). Ингибирующее, цитотоксическое действие испытываемого образца (отсутствие/незначительное снижение развития фонового бактериального газона) наблюдали для всех исследуемых штаммов бактерий без метаболической активации при концентрациях 250, 100 и 50 мкг/чашка и с метаболической активацией при концентрации 250 мкг/чашка.

В анализе количество ревертантных колоний не показало какого-либо биологически значимого увеличения по сравнению с контролями растворителем. Не было воспроизводимых тенденций, связанных с дозой, и не было никаких указаний на какой-либо эффект, связанный с обработкой.

Приведенные данные этого анализа мутагенности показывают, что в используемых экспериментальных условиях испытываемый образец не вызывал генных мутаций за счет изменений пар оснований или сдвигов рамки считывания в геноме используемых штаммов, и, следовательно, можно сделать вывод, что IS не обладал мутагенной активностью в условиях испытания, используемых в этом исследовании.

#### **Пример 11.2: Микроядерный анализ клеток млекопитающих *in vitro***

Ингаляционный раствор по изобретению испытывали в микроядерном тесте *in vitro* с использованием L5178Y ТК+/- 3.7.2 С клеток мышинной лимфомы. Исследование осуществляли в соответствии с GLP. Осуществляли два анализа (Анализ 1 и Анализ 2). В обоих анализах осуществляли 3-часовую обработку с метаболической активацией (в присутствии S9-mix) и 3-часовую и 24-часовую обработку без метаболической активации (в отсутствие S9-mix). Отбор проб осуществляли через 24 часа после начала обработки.

Исследуемые концентрации образца для испытаний в Анализе 1 (с метаболической активацией и без нее) были выбраны и предоставлены спонсором следующим образом: 50 ч/млн, 100 ч/млн, 200 ч/млн и 500 ч/млн, что эквивалентно 0,05, 0,1, 0,2 и 0,5 мг/мл, с учетом используемого для обработки значения, которое составляло 1 мл, как определено в руководстве OECD № 487 (10% (об/об), в конечной среде для обработки. В Анализе 1 исследование было прекращено, поскольку наблюдали чрезмерную цитотоксичность в испытываемом образце. Выбранные диапазоны концентраций не были достаточно уточнены, чтобы оценить по меньшей мере три исследуемые концентрации на соответствие критериям приемлемости (в пределах соответствующего диапазона цитотоксичности). Любой результат с относительным увеличением числа клеток (RICC) <~40% был неприемлемым для анализа, цель должна заключаться в достижении цитотоксичности приблизительно 40-50% в анализе, чтобы продемонстрировать, что используемые концентрации были достаточными для соответствия рекомендуемым критериям. Поэтому осуществляли дополнительный эксперимент (Анализ 2) с модифицированными и установленными с более близкими промежутками концентрациями для получения

дополнительной информации о цитотоксических эффектах и соответствия нормативным критериям приемлемости.

Исследуемые концентрации испытываемого образца в Анализе 2 (с метаболической активацией и без нее) были такими же, как и в Анализе 1, однако применяли дополнительные более низкие концентрации обработки. Поэтому для оценки выбирали приемлемые концентрации 10, 5 и 2 мкг/мл (всего три) в случае кратковременной обработки с метаболической активацией и концентрации 6, 2 и 1 мкг/мл (всего три) выбирали для оценки в случае кратковременной обработки без метаболической активации, а концентрации 7, 6, 2 и 1 ч/млн (всего четыре) выбирали для оценки в случае длительной обработки без метаболической активации. Ни одна из концентраций обработки не вызвала биологически или статистически значимого увеличения количества микроядерных клеток по сравнению с соответствующим значением отрицательного контроля (носитель) в экспериментах с метаболической активацией и без нее.

Таким образом, IS не вызывал статистически или биологически значимого воспроизводимого увеличения частоты встречаемости микроядерных L5178Y ТК+/- 3.7.2 С клеток мышинной лимфомы в проведенных экспериментах с метаболической активацией и без нее. Поэтому IS считался негенотоксичным в данной системе испытаний в условиях исследования.

### **Пример 12: Другие исследования токсичности**

#### **Пример 12.1: Функциональность легочного сурфактанта *in vitro***

Ингаляционный раствор по изобретению испытывали на смоделированной модели альвеол для оценки его эффекта на функцию легочного сурфактанта. Легочный сурфактант снижает поверхностное натяжение легких, обеспечивая нормальное расширение и сокращение во время дыхания. Вдыхание аэрозолей, которые мешают легочному сурфактанту, может вызвать токсическую реакцию.

Способ испытания заключался в воздействии распыляемого IS на небольшой объем легочного сурфактанта во время имитации дыхательных циклов с одновременным количественным определением поверхностного натяжения легочного сурфактанта. Оценивали изменение поверхностного натяжения.

#### **Метод**

Ранее хорошо описанный постоянный поток через установку сурфактометра с ограниченной каплей использовали для испытания эффекта продукта на функцию легочного сурфактанта. Этот метод показал 100% чувствительность при обнаружении вредных веществ по сравнению с исследованиями *in vivo*.

Каплю легочного сурфактанта (10 мкг) подвергали воздействию распыляемого IS с 500 ч/млн NOCl (5 мл в течение пяти минут) во время имитации дыхательных циклов легочного сурфактанта (для имитации альвеол). Поверхностное натяжение непрерывно оценивали с использованием осесимметричного капельного анализа встряхивания для выявления потенциально критически низкого поверхностного натяжения (ниже 10 мН/м), что может вызвать ателектаз *in vivo*.

## Результаты

Никакого ингибирования функции легочного сурфактанта не наблюдали, когда легочный сурфактант подвергали воздействию распыляемого ингаляционного продукта в самой высокой концентрации (500 ч/млн HOCl+0,25% уксусной кислоты, pH 5,5, изотонический). Аналогичные результаты были получены для 0,9% NaCl (контроль).

### **Пример 12.2: Тест на раздражение глаз с использованием метода изолированного куриного глаза**

Поскольку раствор будет доставляться в рот и нос, осуществляли исследование возможных раздражающих свойств глаз. GLP исследование, тест на раздражение глаз: метод изолированного куриного глаза с раствором для ингаляции (SIS) осуществляли в соответствии со способом, описанным в руководстве OECD 438. Спонсор предоставил четыре концентрации IS соответственно с 500, 200, 100 или 50 ч/млн хлорноватистой кислоты (HOCl). Исследование осуществляли в течение 2 дней, и каждый день обозначался как Эксперимент (т.е. Эксперимент 1 и Эксперимент 2). В каждом эксперименте три глаза обрабатывали 30 мкл испытываемого образца (500 ч/млн или 200 ч/млн в Эксперименте 1 и 100 ч/млн или 50 ч/млн в Эксперименте 2). В каждом эксперименте три положительных контрольных глаза обрабатывали аналогичным образом 30 мкл 5% (масс/об) раствора хлорида бензалкония. Глаз для отрицательного контроля обрабатывали 30 мкл физиологического раствора хлорида натрия (раствор 0,9% (масс/об) NaCl). Измеряли толщину роговицы, помутнение роговицы и задержку флуоресцеина, а также оценивали любые морфологические эффекты (например, вдавление или разрыхление эпителия).

Результаты для всех глаз, использованных в исследовании, соответствовали стандартам контроля качества. Результаты отрицательного контроля и положительного контроля находились в пределах диапазона ранее полученных контрольных данных в эксперименте. Таким образом, исследование было признано достоверным.

Согласно руководству, результатом этого исследования является то, что испытываемое вещество относится к одной из трех категорий: либо не вызывает раздражения, либо вызывает сильное раздражение, либо требуется дополнительная информация. На основании этого анализа раздражения глаз *in vitro* в изолированных глазах цыплят с различными концентрациями ингаляционного раствора (SIS), концентрации испытываемого образца 500 ч/млн, 200 ч/млн и 100 ч/млн классифицировали как требующие дополнительной информации. Исследование *in vivo* показано при таких концентрациях. Концентрацию испытываемого образца 50 ч/млн классифицировали как не вызывающую раздражения.

### **Пример 13: Антибактериальные испытания с ингаляционным раствором (IS)**

Ингаляционный раствор по изобретению испытывали в антибактериальном анализе против выращенных в планктонных условиях грамположительных (*Staphylococcus aureus*) и грамотрицательных (*Pseudomonas aeruginosa*) бактерий, и он показал эффективное уничтожение обоих видов бактерий при концентрациях 10-25 ч/млн HOCl. Испытание осуществляли в Costerton Biofilm Center, University of Copenhagen. Результаты таких

испытаний представлены в Таблице 4 ниже.

Таблица 4

Выращенные в течение ночи *S. aureus* и *P. aeruginosa* разводили в свежей питательной среде и выращивали еще в течение двух часов. После этого их обрабатывали в течение одного часа IS, содержащим различные концентрации HOCl, или раствором хлорида натрия в качестве контроля. Плюс (+) указывает на рост, минус (-) указывает на отсутствие роста

Испытываемый раствор	0,9% NaCl	10 ч/млн HOCl IS	25 ч/млн HOCl IS	50 ч/млн HOCl IS	100 ч/млн HOCl IS	200 ч/млн HOCl IS	500 ч/млн HOCl IS
Бактерии							
<i>S. aureus</i> (G <sup>+</sup> )	+	1-кратное log уменьшение	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> (G <sup>-</sup> )	+	-	-	-	-	-	-

**Результаты:** Как видно из Таблицы 4, антибактериальный эффект наблюдали уже при 10 ч/млн HOCl для *P. aeruginosa*, и ни одна из бактерий не росла при 25 ч/млн HOCl.

**Резюме:** Ингаляционные растворы по изобретению эффективно уничтожают грамположительные (*S. aureus*) и грамотрицательные бактерии (*P. aeruginosa*) при концентрациях 25 ч/млн и 10 ч/млн, соответственно, и выше. Полный эффект для всех бактерий наблюдали при IS 25 ч/млн HOCl.

Основываясь на этих наблюдениях, становится очевидным, что любое потенциальное бактериальное загрязнение во время изготовления IS будет немедленно уничтожено в продукте благодаря противомикробной активности HOCl широкого спектра действия. Таким образом, продуцирование каких-либо эндотоксинов маловероятно, поскольку для продуцирования эндотоксинов нужны бактерии.

**Пример 14: Противовирусная активность IS, в соответствии со стандартом EN 14476 (начиная с 25 ч/млн HOCl), против вируса осповакцины**

EN 14476 на общую вирулицидную активность осуществляли на химических дезинфицирующих средствах и антисептиках. Это количественный суспензионный тест для оценки вирулицидной активности в медицине, который выполняется аккредитованной лабораторией.

Таблица 5

Противовирусная активность, определенная в соответствии со стандартом EN14476, для IS (50 ч/млн НОСl), разбавленного до 80%, 50% и 10% раствора, против вируса осповакцины

Продукт	Концентрация	Мешающе е вещество	Уровень цитотоксичности	log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /мл через... минут					>4 log <sub>10</sub> уменьшение через... минут
				0,25	1	2	30	60	
испытываемый продукт	80,0%	чистые условия	1,50	n.d.	≤1,50+ 0,00	≤1,50+ 0,00	n.d.	n.d.	1 (RF≥5,25+0,33)
испытываемый продукт	50,0%	чистые условия	1,50	n.d.	≤2,50+ 0,00	n.d.	n.d.	n.d.	1 (RF≥4,25+0,33)
испытываемый продукт	10,0%	чистые условия	1,50	n.d.	6,38+0, 41	n.d.	n.d.	n.d.	>1 (RF=0,38+0,53)

n.d.= не определяли

**Результаты для IS:** Испытываемый продукт IS, 50 ч/млн в виде 50% разведения, 25 ч/млн HOCl, был способен инактивировать вирус осповакцины после 1 минуты воздействия в чистых условиях (см. Таблицу 5). Поэтому активность не измеряли через 30 или 60 минут. Коэффициент уменьшения составил  $\geq 4,25 \pm 0,33$  (1 минута). Согласно стандарту EN 14476 продукты, обладающие противовирусной активностью в отношении вируса осповакцины, считаются активными в отношении всех оболочечных вирусов.

**Результаты для дезинфицирующих средств для рук и поверхностей:** EN тесты в соответствии с положениями о биоцидных продуктах также осуществляли на растворах для дезинфекции рук и для дезинфекции поверхностей (HOCl,  $200 \pm 30$  ч/млн, HAc 0,25%, pH 4,3). Результаты показали противомикробную эффективность против *E. coli*, грибов, дрожжей и вируса осповакцины (данные не показаны).

**Резюме:** Все EN тесты показали быструю и эффективную инактивацию дрожжей, грибов, бактерий и вирусов, от 1 минуты до 30 секунд, в соответствии со стандартом для дезинфицирующих средств для рук и дезинфицирующих средств для поверхностей. Результаты, показанные IS, существенно не отличались от растворов для дезинфекции рук и указывают на аналогичные дезинфицирующие свойства, также при 25 ч/млн HOCl.

#### **Пример 15: Испытание противомикробной эффективности**

Испытание с бактериальным заражением можно осуществить в соответствии с USP42-NF37 2S, глава <51>, эффективность, или Ph. Eur. 5.1.3, антибактериальная защита. Партии растворов (pH 4,3, репрезентативные партии HOCl для IS подвергали заражению различными микроорганизмами, и испытания в соответствии с USP42-NF37 2S, глава <51>, представлены в Таблице 6 ниже:

**Таблица 6**

**Противомикробная эффективность репрезентативного раствора для промывания ран (122 ч/млн HOCl, 0,25% HAc, pH 4,3). Результаты представлены в виде значений  $\text{Log}_{10}$  количеств КОЕ**

Микроорга низм	Эталонное значение (log)	Уменьшение через 0 часов	Уменьшение через 14 дней	Уменьшение через 28 дней	Выводы
<i>E. coli</i>	6,60	5,60	5,60	5,60	Приемлемая
<i>P. aeruginosa</i>	6,71	5,71	5,71	5,71	Приемлемая
<i>S. aureus</i>	6,61	5,61	5,61	5,61	Приемлемая
<i>C. albicans</i>	5,72	4,72	4,72	4,72	Приемлемая
<i>A. brasiliensis</i>	5,45	4,45	4,45	4,45	Приемлемая

**Результаты и резюме:** Критерии приемлемости для испытания противомикробной эффективности, как описано в USP 42-NF37 2S, глава <51>, были соблюдены для всех тестируемых микроорганизмов как на 14-й, так и на 28-й день. Кроме того, самая низкая концентрация IS может быть испытана, в соответствии с USP42-NF37 2S глава <51>, на антимикробную эффективность.

**Пример 16: Испытания для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИС)**

Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИС) против пяти

штаммов патогенных бактерий осуществляли методом микроразведений в бульоне (разведения с наибольшей концентрацией исследуемого вещества, раствор  $\text{HOCl}$ , pH 4,3, 100 ч/млн  $\text{HOCl}+1\%$  уксусной кислоты и разведения), репрезентативным для IS. После инкубации в течение 24 часов после обработки в микротитровальном планшете измеряли оптическую плотность для оценки роста. Кроме того, суспензии высевали на агар и контролировали рост на следующий день. Все испытания осуществляли в Центре тестирования биопленок Копенгагенского университета, на факультете здравоохранения и медицинских наук, на кафедре иммунологии и микробиологии.

Таблица 7

**Минимальная ингибирующая концентрация (МИС)  $\text{HOCl}+$ уксусная кислота (pH 4,3) против микроорганизмов**

Штамм	МИС $\text{HOCl}+$ уксусная кислота (pH 4,3)
<i>S. aureus</i>	25 ч/млн и 0,25%
<i>E. faecium</i>	25 ч/млн и 0,25%
<i>P. aeruginosa</i>	25 ч/млн и 0,25%
<i>A. baumannii</i>	25 ч/млн и 0,25%

**Результаты:** Для всех испытываемых микроорганизмов МИС составляла 25 ч/млн  $\text{HOCl}+0,25\%$  уксусной кислоты. Рост определяли как по оптической плотности (планшет-ридер), так и по росту на чашках с агаром Мюллера-Хинтона.

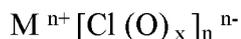
**Заключение о микробиологических характеристиках IS**

Результаты противомикробных испытаний, осуществленных с ингаляционным раствором продукта по изобретению (IS), начиная с 10 ч/млн  $\text{HOCl}$ , а также с другими репрезентативными композициями  $\text{HOCl}$ , ясно подтверждают, что продукт IS обладает превосходной противомикробной активностью, и таким образом, авторы изобретения уверены, что IS также должен поставляться без каких-либо микроорганизмов, как и другие репрезентативные продукты. Это связано с широким спектром противомикробной активности  $\text{HOCl}$  в продуктах, как при pH 4,3, так и при pH 5,5 (SIS), при этом в растворе сильно преобладает кислая форма  $\text{HOCl}$  (>99,1%). Это также подтверждается литературой, в которой сообщается о противомикробной активности  $\text{HOCl}$  (кислотная форма) и о том, что  $\text{HOCl}$  используют в качестве консерванта для подавления роста микробов в различных продуктах медицинского назначения (например, растворах для орошения/промывания ран), уже одобренных и продаваемых на рынке. Поэтому IS производится на неасептическом, нестерильном оборудовании.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Противомикробная композиция, содержащая:

твердую соль окисленного хлора в соответствии с формулой:



где M является одним из иона щелочного металла, щелочноземельного металла и переходного металла, n имеет значение 1 или 2, x имеет значение 1, 2, 3 или 4;

активатор, в соответствии с формулой:



где R<sub>1</sub> включает от 1 до 10 гидрированных атомов углерода, необязательно замещенных амино-, амидо-, карбоксильными, сульфоновыми или гидроксигруппами, X является одним из атома углерода, фосфора и серы, n и m каждый имеет значение 2 или 3, и R<sub>2</sub> является одним из H, щелочного металла, щелочноземельного металла, соли иона переходного металла или соли аммония; и

фармацевтически приемлемый разбавитель, адъювант или носитель.

2. Композиция по пункту 1, где указанная соль окисленного хлора представляет собой соль щелочного или щелочноземельного металла хлорноватистой кислоты.

3. Композиция по пункту 2, где указанный активатор представляет собой уксусную кислоту.

4. Композиция по пункту 1, где указанная соль окисленного хлора представляет собой соль щелочного или щелочноземельного металла хлористой кислоты.

5. Композиция по пункту 4, где указанный активатор представляет собой уксусную кислоту.

6. Композиция по пункту 1, где указанный активатор представляет собой уксусную кислоту.

7. Композиция по пункту 1, имеющая осмоляльность в диапазоне от около 0,1 мОсм до около 500 мОсм.

8. Композиция по пункту 6, имеющая рН от около 4 до около 8.

9. Композиция по пункту 1, дополнительно содержащая повышающий вязкость агент.

10. Композиция по пункту 9, где повышающий вязкость агент устойчив к окислению солью окисленного хлора.

11. Композиция по пункту 9, где повышающий вязкость агент включает водорастворимый гелеобразующий агент.

12. Композиция по пункту 11, где водорастворимый гелеобразующий агент выбран из группы, состоящей из полиакриловой кислоты, полиэтиленгликоля, сополимера поли(акриловой кислоты)-акриламидоалкилпропансульфоновой кислоты, фосфинополикарбоновой кислоты, терполимеров поли(акриловой кислоты)-акриламидоалкилпропана и сульфоновой кислоты-сульфонированного стирола.

13. Композиция по пункту 1, дополнительно содержащая колориметрический краситель.

14. Композиция по пункту 13, где краситель представляет собой окислительно-восстановительный краситель.

15. Композиция по пункту 14, где цвет и интенсивность цвета красителя зависят от степени окисления соединения окисленного хлора.

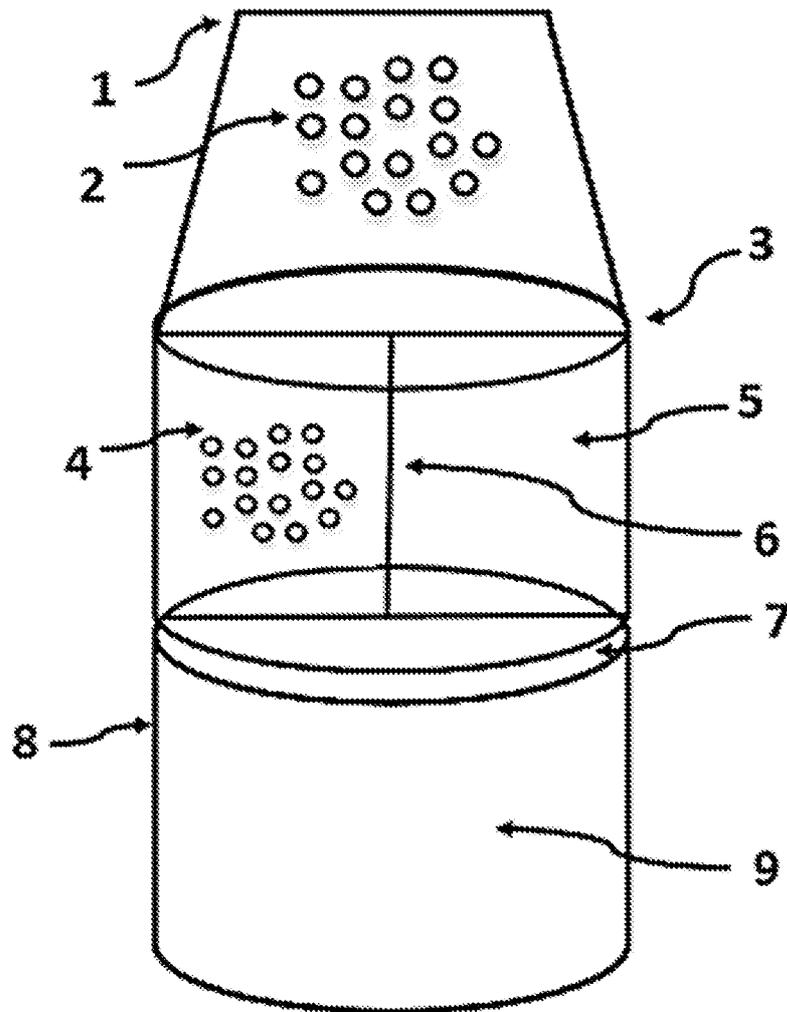
16. Композиция по пункту 1, сформулированная в виде водного раствора, геля, крема, мази или масла.

17. Композиция по пункту 1, изготовленная и хранящаяся в многосекционном контейнере.

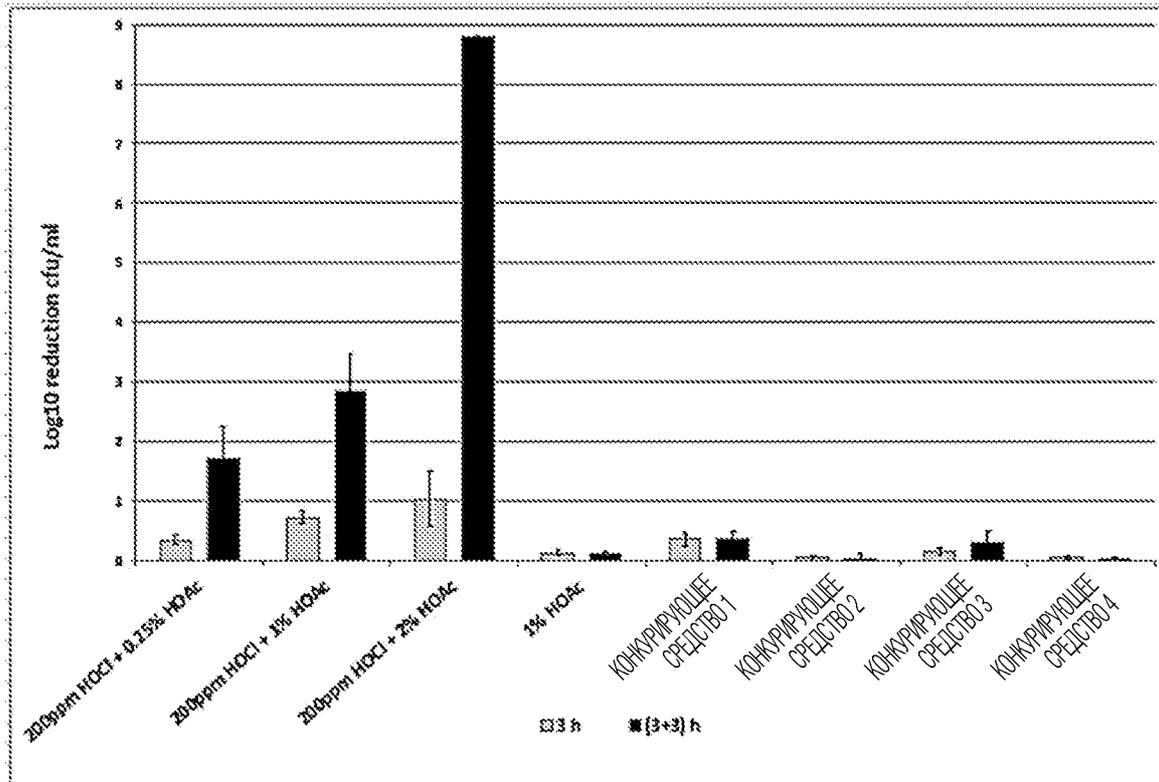
18. Композиция по пункту 17, где жидкие и твердые компоненты содержатся в отдельных соответствующих секциях до объединения указанных жидких и твердых компонентов для получения композиции.

19. Ингаляционная композиция, содержащая от около 25 ч/млн до около 100 ч/млн хлорноватистой кислоты и около 0,25% уксусной кислоты при рН около 5,5.

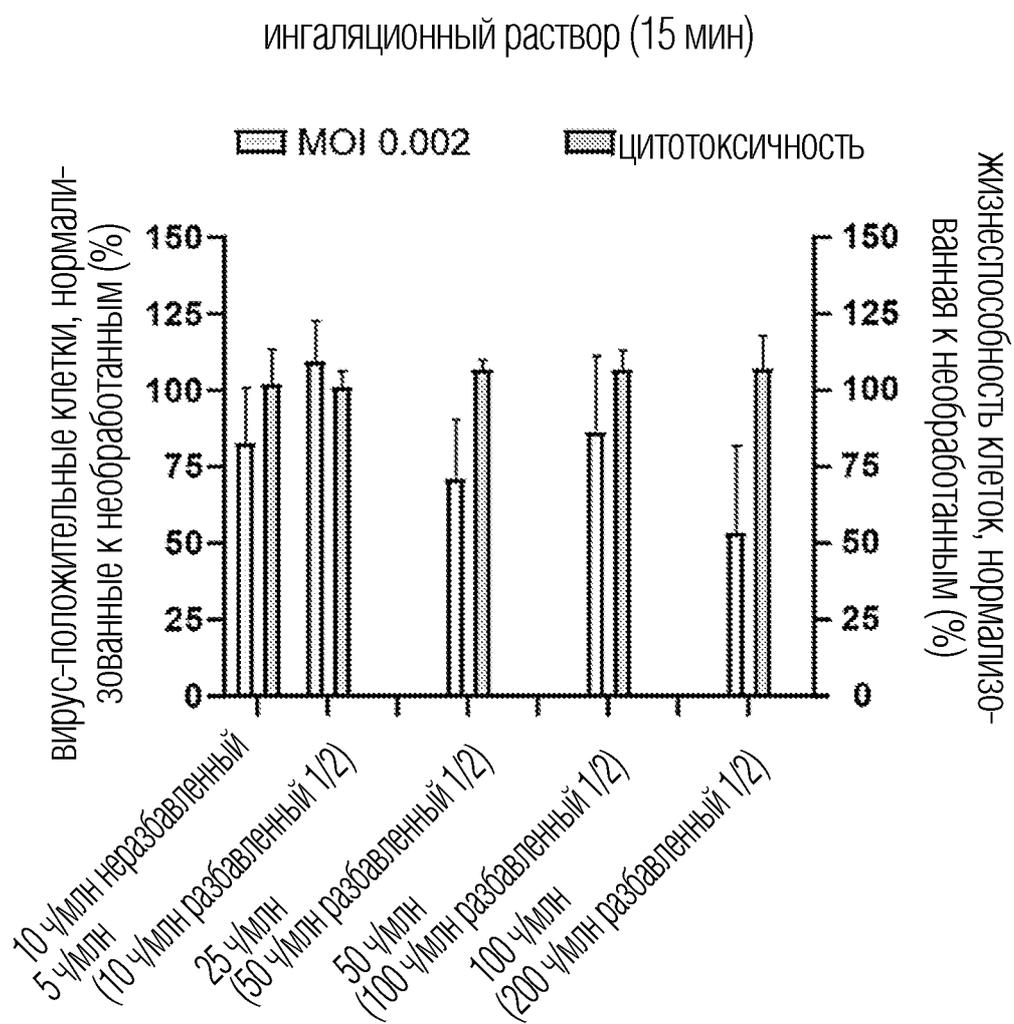
20. Композиция по пункту 19, где композиция является изотонической по отношению к крови.



ФИГ. 1



ФИГ. 2



ФИГ. 3