



(51) МПК
A61K 31/135 (2006.01)
A61K 31/343 (2006.01)
A61K 33/10 (2006.01)
A61N 7/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/135 (2021.02); A61K 31/343 (2021.02); A61K 33/10 (2021.02); A61N 7/00 (2021.02)

(21)(22) Заявка: 2020130545, 17.09.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.09.2020

Дата регистрации:
11.06.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 17.09.2020

(45) Опубликовано: 11.06.2021 Бюл. № 17

Адрес для переписки:

410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83, СГУ,
ЦПУ, Гембицкой Е.И.

(72) Автор(ы):

Свенская Юлия Игоревна (RU),
 Ленгерт Екатерина Владимировна (RU),
 Тальникова Екатерина Евгеньевна (RU),
 Терентюк Георгий Сергеевич (RU),
 Савельева Мария Сергеевна (RU),
 Тучин Валерий Викторович (RU),
 Бучарская Алла Борисовна (RU),
 Васильева Наталья Всеволодовна (RU),
 Босак Илья Алексеевич (RU),
 Выборнова Ирина Владимировна (RU),
 Чилина Галина Анастасьевна (RU),
 Крылова Екатерина Валерьевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
 образовательное учреждение высшего
 образования "Саратовский национальный
 исследовательский государственный
 университет имени Н.Г. Чернышевского"
 (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: RU 2570753 C2, 10.12.2015. RU

2633928 C1, 19.10.2017. SU 884700 A1, 30.11.1981.
ТАЛЬНИКОВА Е.Е. и др.
ТРАНСФОЛЛИКУЛЯРНАЯ ДОСТАВКА:
СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ
ПРОБЛЕМЫ (ОБЗОР)/ Саратовский научно-
 медицинский журнал, 2018, N 4(14), стр. 735-
 737. GUSLIAKOVA O. et al. Use of Submicron
 Vaterite Particles Serves as an Effective Delivery
 Vehicle to the (см. прод.)

(54) СПОСОБ ТЕРАПИИ ПОВЕРХНОСТНЫХ МИКОЗОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине. Способ
 терапии поверхностных микозов заключается в
 воздействии на поверхность кожи
 трансдермального препарата, содержащего
 противогрибковое соединение, при этом в
 качестве трансдермального препарата

используют трансfolликулярный препарат,
 представляющий собой иммобилизованное в
 ватеритные частицы противогрибковое
 соединение, воздействие трансfolликулярного
 препарата осуществляют путём аппликации его
 спиртовой суспензии концентрацией 100-150 мг/

мл на поверхность кожи в области патологии до достижения дозы 4-5 мг частиц/см², содержащих 10-20 вес.% противогрибкового соединения, после чего на область аппликации воздействуют ультразвуком частотой 0,88-1 МГц интенсивностью 0,4-0,5 Вт/см² в течение 2-3 минут, при этом процедуру лечения проводят не чаще 1 раза в 3 дня. Изобретение обеспечивает

повышение эффективности противогрибковых средств для лечения поверхностных микозов при сокращении количества процедур нанесения противогрибкового препарата, а также обеспечение возможности местного применения препаратов, ранее не имеющих топической формы из-за плохой растворимости и низкой биодоступности. 1 з.п. ф-лы, 6 пр., 6 табл., 18 ил.

(56) (продолжение):

Respiratory Portion of the Lung / Front. Pharmacol., 2018, 13 pages.

RU 2749481 C1

RU 2749481 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 31/135 (2006.01)
A61K 31/343 (2006.01)
A61K 33/10 (2006.01)
A61N 7/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 31/135 (2021.02); A61K 31/343 (2021.02); A61K 33/10 (2021.02); A61N 7/00 (2021.02)(21)(22) Application: **2020130545, 17.09.2020**(24) Effective date for property rights:
17.09.2020Registration date:
11.06.2021

Priority:

(22) Date of filing: **17.09.2020**(45) Date of publication: **11.06.2021 Bull. № 17**

Mail address:

**410012, g. Saratov, ul. Astrakhanskaya, 83, SGU,
TSPU, Gembitskoj E.I.**

(72) Inventor(s):

**Svenskaia Iuliia Igorevna (RU),
Lengert Ekaterina Vladimirovna (RU),
Talnikova Ekaterina Evgenevna (RU),
Terentiuk Georgii Sergeevich (RU),
Saveleva Mariia Sergeevna (RU),
Tuchin Valerii Viktorovich (RU),
Bucharskaia Alla Borisovna (RU),
Vasileva Natalia Vsevolodovna (RU),
Bosak Ilia Alekseevich (RU),
Vybornova Irina Vladimirovna (RU),
Chilina Galina Anastasevna (RU),
Krylova Ekaterina Valerevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe biudzhethnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia "Saratovskii natsionalnyi
issledovatel'skii gosudarstvennyi universitet
imeni N.G. Chernyshevskogo" (RU)**

(54) METHOD FOR SURFACE MYCOSIS THERAPY

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine. The method of treating superficial mycoses consists in exposing the skin surface to a transdermal preparation containing an antifungal compound, while a transfollicular preparation is used as a transdermal preparation, which is an antifungal compound immobilized in vaterite particles, the effect of a transfollicular preparation is carried out by applying its alcohol suspension with a concentration of 100-150 mg / ml on the surface of the skin in the area of pathology until a dose of 4-5 mg of particles / cm² containing 10-20 wt.% of an antifungal compound is reached, after

which the application area is exposed to ultrasound with a frequency of 0.88-1 MHz with an intensity of 0.4-0,5 W / cm² for 2-3 minutes, while the treatment procedure is carried out no more than 1 time in 3 days.

EFFECT: invention provides increased effectiveness of antifungal agents for treatment of superficial mycoses while reducing the number of procedures for applying an antifungal drug, as well as providing possibility of topical application of drugs that previously did not have a topical form due to poor solubility and low bioavailability.

1 cl, 18 dwg, 6 tbl, 6 ex

C 1
1
8
4
9
4
8
1
C 1
R UR U
2
7
4
9
4
8
1
C 1

Изобретение относится к медицине и направлено на лечение поверхностных микозов с использованием противогрибковой композиции для местного применения, обладающей способностью к проникновению и накоплению в волосяных фолликулах. Композиция содержит ватеритные частицы-носители, нагруженные противогрибковым средством.

5 Изобретение обеспечивает эффективную интрадермальную аккумуляцию и пролонгированное поступление действующего вещества, благодаря чему снижается частота нанесения противогрибкового средства и курсовая доза без потери антигрибковой эффективности.

Поверхностные грибковые инфекции являются одним из наиболее распространенных инфекционных заболеваний кожи и ее придатков и охватывают 20-25% популяции мирового населения, причем их распространение заметно выросло за последнюю четверть века, вследствие роста туристической активности, изменения характера миграции, как результат перемен социально-экономического характера [Ameen M. *Clinics in dermatology*. 2010, 28, 197-201; Aggarwal N. J. *Pharmaceutics*. 2012, 437, 277-287; Bottonae E.J. *J. Dermatology*. 2006, 2, 41-50]. Данная патология обладает высокой контагиозностью в человеческой популяции, в частности, детской аудитории.

10

15

Несмотря на существование большого ряда эффективных противогрибковых средств, к настоящему моменту сохраняется актуальность усовершенствования противогрибковой терапии, обусловленная необходимостью снижения риска развития побочных эффектов, оказываемых на организм, повышения биодоступности препаратов, сокращение длительности курса лечения и повышение эффективности наружной терапии грибковых заболеваний в целом [Медведева Т. В. и др. *Ж. Кожных и Венерических болезней*, 2007, 4, 54-57; Lewis R. E. *Mayo Clinic Proceedings*. 2011, 86, 805-817]. В связи с этим, в последние десятилетия особенной популярностью пользуется разработка

20

25

30

подходов, связанные с иммобилизацией антимикотических средств в различные наноразмерные и субмикронные системы, такие, как липосомы, мицеллы, эмульсии, полимерные или липидные контейнеры [Kumar L. et al. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2014, 42, 32-46; Basak A. et al. *Recent trends in antifungal agents and Antifungal Therapy*, Springer India; 2016; Scorzoni L. et al. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8, 36; Bangia R. et al. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2019, 16, 377-96; Nicola A.M. et al. *Pharmacology & Therapeutics*, 2019, 195, 21-38].

Однако несмотря на многочисленные попытки создания эффективной системы доставки противогрибковых средств, на сегодняшний день существует лишь три коммерчески доступных противогрибковых медицинских препарата на основе наночастиц: липосомальная форма Амфотерицина В – препарат «Амбизом» (AmBisome®), липидный комплекс Амфотерицина В «Абельцет» (Abelcet®), коллоидные дископодобные частицы Амфотерицина В «Амфоцил» или «Амфотек», в зависимости от страны регистрации (Amphotec®/Amphocil®), а также липосомальный Нистатин «Ниотран» (Nyotran®). Причем данные препараты применяются в терапии системных

35

40

грибковых инфекций и предназначены для внутривенных инфузий.

Известен способ терапии поверхностных микозов с использованием лекарственной формы Амфотерицина В на основе холестеринсодержащих наносом диаметром 20-200 нм (патент РФ № 2481100, по кл. МПК А61К 9/127, опубл. 10.05.2013). Отличительной особенностью данного изобретения является возможность ресуспензирования такой лекарственной формы в физиологическом растворе, что позволило заменить последним декстрозу при внутривенных инфузиях и, таким образом, снизить нефротоксичность вводимого внутривенно Амфотерицина В. При этом суспензия холестеринсодержащих наносом в физиологическом растворе являлась стабильной.

45

Поскольку при поверхностных микозах, как правило, поражаются поверхностные слои кожи, а также ее придатки (волосы и ногти), без вовлечения в патологический процесс других органов и тканей [Aggarwal N. J. *Pharmaceutics*. 2012, 437, 277-287], то целесообразной является разработка подходов к повышению эффективности наружного применения антимикотиков [Kaur I.P. et al. *Expert opinion on drug delivery*, 2010, 7, 1303-1327]. Достоинствами наружного применения является снижение побочных эффектов и нагрузки на ЖКТ, по сравнению с их системным применением, благодаря возможности локализации терапевтического воздействия в зоне патологии [Kaur I.P. et al. *Expert opinion on drug delivery*, 2010, 7, 1303-1327; Güngör S. J. *Cosmetics, Dermat. Sc. and App.*, 2013, 3, 56-65].

При местном применении крема на основе упомянутых выше холестеринсодержащих наносом Амфотерицина В была продемонстрирована возможность более эффективного накопления препарата в коже, по сравнению со стандартным кремом Амфотерицина В. Однако данный результат был достигнут лишь через 2 часа после нанесения крема, а эффективность накопления предложенных наносом в коже все же уступает другим существующим системам интра- и трансдермальной доставки лекарств, возможность проникновения в волосяные фолликулы не обсуждается авторами. Кроме того, для данного изобретения не приведена оценка противогрибковой эффективности при лечении микозов кожи и придатков *in vivo*, хотя продемонстрирована хорошая противогрибковая активность *in vitro* в отношении большого спектра грибов, а также *in vivo* для офтальмологического применения на примере модели кератита *Aspergillus fumigatu* у кроликов.

Известны также способы лечения поверхностных микозов с использованием топических композиций, действие которых направлено на обеспечение длительного контакта лекарственного вещества с пораженным участком за счет формирования покрытия, содержащего противогрибковое средство. Так, например, известен способ лечения путём аэрозольного воздействия на поражённый участок средством, содержащим антимикотик кетоконазол, эмульсионный носитель, эмульгаторы, касторовое масло, воду, а также целевые добавки - стабилизатор и консервант (патент РФ № 2337689 по кл. МПК А61К 31/496, опубл. 10.11.2008). Изобретение способно обеспечить более длительный контакт лекарственного вещества с пораженным участком одновременно с его защитой от внешних воздействий и в результате снизить опасность передачи микоза от зараженного человека другим людям. Кроме того, такая лекарственная форма обладает повышенной гигиеничностью использования и седиментационной устойчивостью. Фунгицидная активность композиции в отношении штаммов *Candida albicans* и *Aspergillus nige* была продемонстрирована *in vitro*, однако эффективность терапии дерматомикозов *in vivo* данного изобретения не обсуждалась.

Известен также способ лечения грибковых инфекций на основе жидкой композиции для местного нанесения (см. заявку WO 2007/039533 по кл. МПК А61К47/32, опубл. 12.04.2007), содержащей противогрибковый агент, пленкообразующий агент и растворитель. При этом противогрибковый агент выбран из группы, состоящей из имидазолов, триазолов и алиалминов. Данная форма предназначена для нанесения на инфицированную область кожи, где образует противогрибковую пленку, обеспечивающую поступление действующего вещества. При лечении пациентов с межпальцевой эпидермофитией стоп установлено, что при однократном нанесении композиции, предлагаемой в изобретении, достигается эффективность лечения, эквивалентная или превышающая эффективность лечения, достигаемую при выполнении режимов многократного нанесения классических противогрибковых фармацевтических

продуктов в течение одной-четырёх недель. Применение данной композиции обеспечивало проникновение противогрибкового препарата в роговой слой кожи пациентов, однако возможность ее проникновения и депонирования в таких придатках кожи, как волосяные фолликулы, не была рассмотрена.

5 Разработка подходов, направленных на обеспечение интра- и трансдермальной адресации и депонирования в коже противогрибковых средств при их наружном применении, является значимой задачей в лечении поверхностных микозов.

10 Наиболее близким к заявленному техническому решению является способ лечения грибковых инфекций с использованием трансдермального абсорбируемого препарата, содержащего противогрибковое соединение и усилитель его чрезкожного проникновения (патент РФ №2576612 по кл. МПК А61К 31/445, опубл. 10.03.2016). В качестве такого усилителя данное изобретение предлагает использование таких соединений, как высшие спирты, высшие монокарбоновые кислоты или их эфиры, ароматические/неароматические монотерпены, как по отдельности, так и в комбинации. Стоит отметить, что использование различных химических усилителей является одним из классических подходов к повышению эффективности трансдермальной доставки биологически активных веществ, многократно продемонстрировавшим свою эффективность [*Prausnitz M. R. et al. Dermatology. 2012, 2065–2070; Haque T. et al. Advanced Pharmaceutical Bulletin. 2018, 8, 169–179*]. Исследование проникающей способности различных вариаций

15 упомянутого выше изобретения проводилось *in vitro* на коже, иссеченной из брюшины лысой крысы, помещенной в диффузионную ячейку Франца. Противогрибковая активность данного технического решения не была исследована авторами. Кроме того, авторами вновь не рассматривалась возможность проникновения и депонирования противогрибкового соединения в волосяных фолликулах. Более того, использование

20 кожи безволосой крысы в качестве модели исключало возможность изучения вклада трансфолликулярного переноса в накопление вещества в коже в силу различий в анатомии и физиологии волосяных фолликулов специально выведенных линий безволосых и стандартных животных [*Ishii Y. et al. Journal of anatomy. 1997, 191 (1), 99-106*].

30 Однако возможность повышения эффективности интрафолликулярного проникновения противогрибковых средств вызывает особый интерес в рамках наружной терапии дерматомикозов, поскольку пространство сально-волосяного фолликула само по себе способно служить резервуаром для хранения лекарственной субстанции, обеспечивая ее локализацию в области поражения [*Knorr F. J. Pharm. Biopharm. 2009, 71, 173-180*]. Применение матриц-носителей для иммобилизации активного вещества является

35 одним из значимых подходов, обеспечивающих их эффективную трансфолликулярную доставку лекарств [*Lademann J. Opt. Health Sci. 2015, 8, 1-7*].

Технической проблемой заявляемого нами изобретения является разработка способа местной терапии поверхностных микозов, предполагающего интрафолликулярную

40 доставку противогрибкового препарата при помощи контейнеров-носителей и отличающегося высокой терапевтической эффективностью и отсутствием выраженных токсических эффектов.

Технический результат заявляемого изобретения заключается в повышении эффективности противогрибковых средств для лечения поверхностных микозов при

45 сокращении количества процедур нанесения противогрибкового препарата, а также в обеспечении возможности местного применения препаратов, ранее не имеющих топической формы из-за плохой растворимости и низкой биодоступности.

Указанный технический результат достигается тем, что в способе терапии

поверхностных микозов, заключающемся в воздействии на поверхность кожи трансдермального препарата, содержащего противогрибковое соединение, согласно изобретению, в качестве трансдермального препарата используют трансфолликулярный препарат, представляющий собой иммобилизованное в ватеритные частицы противогрибковое соединение, воздействие трансфолликулярного препарата осуществляют путём аппликации его спиртовой суспензии концентрацией 100-150 мг/мл на поверхность кожи в области патологии до достижения дозы 4-5 мг частиц/см², содержащих 10-20 вес.% противогрибкового соединения, после чего на область аппликации воздействуют ультразвуком частотой 0.88-1 МГц интенсивностью 0,4-0,5 Вт/см² в течение 2-3 минут, при этом процедуру лечения проводят не чаще 1 раза в 3 дня.

В качестве противогрибкового соединения используют нафтифина гидрохлорид или гризеофульвин.

Изобретение обеспечивает транспортировку частиц с иммобилизованным в них противогрибковым средством на глубину волосяного фолликула, таким образом гарантирует его улучшенную внутрикожную аккумуляцию. Постепенная деградация частиц в волосяных фолликулах способствует увеличению продолжительности (продлонгации) контакта антимикотика с пораженным участком.

Изобретение поясняется таблицами и чертежами, описание которых приведено ниже.

Таблица 1. Значения толщины флуоресцирующей приповерхностной области (d) и средней интенсивности ее флуоресценции (I), рассчитанные по КЛСМ-изображениям криосрезов кожи крысы из интактной области и области внедрения частиц карбоната кальция, нагруженных гризеофульвином. Значения представлены как (среднее ± стандартная ошибка). Статистика набрана по 3 срезам для каждой области, по 15-20 профилям флуоресценции от каждого среза.

Таблица 2. Опытные группы лабораторных животных (морских свинок) с моделью дерматомикоза, участвовавших в эксперименте по исследованию терапевтического эффекта от местного применения противогрибковой композиции на основе частиц ватерита.

Таблица 3. Интенсивность проявления клинических признаков инфекционного процесса перед началом лечения у лабораторных животных из эксперимента по исследованию терапевтического эффекта от местного применения противогрибковой композиции на основе частиц ватерита. В таблице приведены баллы для каждого животного, а также усредненные значения для группы ($M \pm m$), представленные как (среднее ± стандартное отклонение).

Таблица 4. Интенсивность проявления клинических признаков инфекционного процесса на 14-й день после заражения (по прошествии 1 недели лечения, т.е. в середине исследования) у лабораторных животных из эксперимента по исследованию терапевтического эффекта от местного применения противогрибковой композиции на основе частиц ватерита. В таблице приведены баллы для каждого животного, а также усредненные значения для группы ($M \pm m$), представленные как (среднее ± стандартное отклонение).

Таблица 5. Интенсивность проявления клинических признаков инфекционного процесса по завершении лечения у лабораторных животных из эксперимента по исследованию терапевтического эффекта от местного применения противогрибковой композиции на основе частиц ватерита. В таблице приведены баллы для каждого животного, а также усредненные значения для группы ($M \pm m$), представленные как (среднее ± стандартное отклонение).

Таблица 6. Сводная таблица с результатами оценки интенсивности проявления клинических признаков инфекционного процесса в ходе исследования у лабораторных животных из эксперимента по исследованию терапевтического эффекта от местного применения противогрибковой композиции на основе частиц ватерита. В таблице приведены усредненные значения суммы баллов для каждой группы животных, представленные как (среднее \pm стандартное отклонение).

Фиг. 1. Изображение, полученное методом сканирующей электронной микроскопии, частиц ватерита, содержащих противогрибковое вещество нафтифина гидрохлорид.

Фиг. 2. Изображение, полученное методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, криосреза кожи крысы после *in vivo* внедрения частиц ватерита, нагруженных противогрибковым веществом нафтифина гидрохлоридом и меченных флуоресцентным красителем цианином-7. Синий флуоресцентный канал соответствует автофлуоресценции тканей волосяного фолликула в диапазоне 420-490 нм, в красном канале демонстрируется интрадермальное распределение красителя Cy7 в диапазоне 750-790 нм. Обеспечена доставка красителя на всю глубину волосяного фолликула, о чем говорят четкие очертания волосяных луковиц.

Фиг. 3. Изображение, полученное методом сканирующей электронной микроскопии, частиц ватерита, содержащих противогрибковое вещество гризеофульвин.

Фиг. 4. Изображения, полученные методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, частиц ватерита, нагруженных противогрибковым веществом гризеофульвином. Наложение флуоресцентного изображения и изображения, полученного методом просвечивающей микроскопии, (а) и только флуоресцентное изображение (б). Синий флуоресцентный сигнал соответствует флуоресценции гризеофульвина в диапазоне 420-490 нм при возбуждении на длине волны 405 нм.

Фиг. 5. Изображения, полученные методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, криосрезом кожи крысы из интактной области (а) и области внедрения частиц ватерита, нагруженных противогрибковым веществом гризеофульвином (б). Синий сигнал соответствует автофлуоресценции тканей волосяного фолликула, а также флуоресценции гризеофульвина в диапазоне 420-490 нм при возбуждении на длине волны 405 нм.

Фиг. 6. Изображения, полученные методом сканирующей электронной микроскопии, разрушенных лезвием луковиц волос, выдернутых после внедрения частиц ватерита, нагруженных противогрибковым веществом нафтифином гидрохлоридом. Изображения иллюстрируют постепенную деградацию контейнеров в фолликулах мыши *in vivo*. Нижний ряд изображений представляет увеличенные области, выбранные на соответствующих изображениях верхнего ряда.

Фиг. 7. Характерные результаты микроскопического (а, б) и культурального (в) исследований биоматериала (чешуек кожи и волос животных), отобранного из очага поражения перед началом лечения животных с моделью трихофитии: флуоресцентное (а) и светлоспольное изображения (б), полученные при увеличении $\times 400$; рост колонии грибка после посева(в).

Фиг. 8. Фотографии очага трихофитии морской свинки из контрольной группы без лечения (группа 1): 6-й (а), 10-й (б), 13-й (в), 16-й (г), 19-й (д) и 21-й (е) дни после заражения.

Фиг. 9. Фотографии очага трихофитии морской свинки из контрольной группы с внедрением ненагруженных частиц ватерита (группа 2): а – перед первым внедрением частиц (7-й день после заражения перед внедрением частиц); б – перед вторым внедрением частиц (10-й после заражения); в – перед третьим внедрением частиц (13-й

после заражения); г – перед четвертым внедрением частиц (16-й после заражения); д – перед пятым внедрением частиц (19-й после заражения); е – по окончании эксперимента (21-й день после заражения).

5 **Фиг. 10.** Фотографии очага трихофитии морской свинки из группы с внедрением частиц ватерита, нагруженных противогрибковым веществом нафтифином гидрохлоридом (группа 3): а – перед первым внедрением частиц (7-й день после заражения перед внедрением частиц); б – перед вторым внедрением частиц (10-й после заражения); в – перед третьим внедрением частиц (13-й после заражения); г – перед четвертым внедрением частиц (16-й после заражения); д – перед пятым внедрением
10 частиц (19-й после заражения); е – по окончании эксперимента (21-й день после заражения).

Фиг. 11. Фотографии очага трихофитии морской свинки из группы с внедрением частиц ватерита, нагруженных противогрибковым веществом гризофульвином (группа 4): а – перед первым внедрением частиц (7-й день после заражения перед внедрением
15 частиц); б – перед вторым внедрением частиц (10-й после заражения); в – перед третьим внедрением частиц (13-й после заражения); г – перед четвертым внедрением частиц (16-й после заражения); д – перед пятым внедрением частиц (19-й после заражения); е – по окончании эксперимента (21-й день после заражения).

Фиг. 12. Фотографии очага трихофитии морской свинки из группы с лечением
20 препаратом сравнения «Микодерил» (группа 5): а – перед началом лечения (7-й день после заражения перед внедрением частиц); б – через 3 дня ежедневного лечения (10-й после заражения); в – через 6 дней ежедневного лечения (13-й после заражения); г – через 9 дней ежедневного лечения (16-й после заражения); д – через 12 дней ежедневного
25 лечения, 21-й день после заражения).

Фиг. 13. Макрофотографии интактного (а) и контрольных участков кожи кроликов (б-и) из эксперимента по исследованию *in vivo* токсичности местного применения противогрибковой композиции на основе частиц ватерита: область аппликации спирта после первого нанесения (б) и по завершении эксперимента (е); зона аппликации
30 спиртовой суспензии ненагруженных частиц ватерита после первого нанесения (в) и по завершении эксперимента (ж); зона аппликации спиртовой суспензии противогрибкового вещества гризофульвина после первого нанесения (г) и по завершении эксперимента (з); зона аппликации спиртовой суспензии частиц ватерита, нагруженных противогрибковым веществом гризофульвином, после первого нанесения
35 (д) и по завершении эксперимента (и). Нанесение всех растворов и суспензий сопровождалось ультразвуковым воздействием.

Фиг. 14. Гистологический препарат кожи в контрольной группе животных (группа 1) из эксперимента по исследованию *in vivo* токсичности местного применения противогрибковой композиции на основе частиц ватерита. Окраска срезов проведена
40 по стандартной схеме с использованием гематоксилина и эозина.

Фиг. 15. Гистологический препарат кожи с аппликацией спирта (группа 2) животным из эксперимента по исследованию *in vivo* токсичности местного применения противогрибковой композиции на основе частиц ватерита. Окраска срезов проведена по стандартной схеме с использованием гематоксилина и эозина.

45 **Фиг. 16.** Гистологический препарат кожи с аппликацией ненагруженных частиц ватерита (группа 3) животным из эксперимента по исследованию *in vivo* токсичности местного применения противогрибковой композиции на основе частиц ватерита. Окраска срезов проведена по стандартной схеме с использованием гематоксилина и эозина.

Фиг. 17. Гистологический препарат кожи с аппликацией противогрибкового вещества гризеофульвина (группа 4) животным из эксперимента по исследованию *in vivo* токсичности местного применения противогрибковой композиции на основе частиц ватерита. Окраска срезов проведена по стандартной схеме с использованием гематоксилина и эозина.

Фиг. 18. Гистологический препарат кожи с аппликацией частиц ватерита, нагруженных противогрибковым веществом гризеофульвином, (группа 5) животным из эксперимента по исследованию *in vivo* токсичности местного применения противогрибковой композиции на основе частиц ватерита. Окраска срезов проведена по стандартной схеме с использованием гематоксилина и эозина.

Раскрытие изобретения

Предлагаемый способ лечения поверхностных микозов предполагает применение иммобилизованной в ватеритные частицы формы противогрибкового вещества.

Частицы ватерита обладают пористой структурой, а также рядом таких достоинств, как биосовместимость, биodeградируемость, растворимость при $\text{pH} < 6.5$, простота приготовления, низкая себестоимость [D. V. Volodkin et al. *Langmuir*. 2004, 20, 3398; Yu. Svenskaya et al. *Biophysical chemistry*. 2013, 182, 11-15; Yu. Svenskaya et al. *ACS applied materials & interfaces*. 2019, 11(19), 17270-17282]. Пористость частиц ватерита определяет эффективность включения лекарственных форм в их объем. Возможность использования ватеритных контейнеров для инкапсуляции лекарственных средств обусловлена, кроме того, их низкой цитотоксичностью и отсутствием влияния на жизнеспособность клеточных культур [Yu. Svenskaya et al. *Colloid Surf. B*. 2016, 146, 171-179; B. Parakhonskiy et al. *Biomaterials Science*. 2013, 1(12), 1273-1281].

Синтез частиц осуществляется путем кристаллизации из раствора при сливании эквиобъемных эквимольярных растворов солей хлорида кальция (CaCl_2) и карбоната натрия (Na_2CO_3) с последующей трехкратной промывкой образовавшегося осадка 95% этиловым спиртом и сушкой при температуре 60°C в сушильном шкафу или лиофилизацией при температуре -50°C .

Иммобилизация антимикотика в частицы ватерита проводится методом его совместного осаждения с частицами в процессе их формирования [Yu. Svenskaya et al. *Colloid Surf. B*. 2016, 146, 171-179] или методом индуцированной кристаллизацией адсорбции [S. German et al. *Scientific reports* 2018, 8 (1), 17763]. В первом случае, 2 мл водно-спиртового раствора антимикотика добавляется к 40 мг сухих ватеритных контейнеров. Пробирка с реакционной смесью выдерживается в морозильной камере при температуре -20°C в течение 2 часов до полной заморозки при постоянном перемешивании. Далее производится разморозка частиц при комнатной температуре с последующей однократной промывкой водно-спиртовым раствором. Цикл заморозки/разморозки может повторяться несколько раз, пока не будет иммобилизовано необходимое количество действующего вещества. Затем образец лиофильно высушивается. Во втором случае, растворы солей Na_2CO_3 и CaCl_2 одновременно приливаются к раствору антимикотика в растворителе в соотношении 1:5. Процесс смешивания растворов производится с помощью магнитной мешалки при скорости 700 об/мин в течение 2-2.5 часов при комнатной температуре. Полученные частицы трижды промываются 95% этиловым спиртом, затем образец лиофильно высушивается.

Применение ватеритных носителей противогрибкового средства для лечения поверхностных микозов связано с возможностью обеспечения их эффективной доставки в и через придатки кожи (в частности, в волосяные фолликулы) к местам

непосредственной локализации патологических процессов. Такой способ лечения отличается локализованностью и адресностью терапевтического воздействия, поскольку известно, что при дерматомикозах повреждаются прежде всего придатки кожи, без вовлечения в патологический процесс других органов и тканей [G. Ginter-Hanselmayer et al. *Clinically Relevant Mycoses*. Springer, Cham, 2019, 145-176; N. J. Aggarwal. *Pharmaceutics*. 2012, 437, 277-287].

Предполагается диспергирование порционной навески сухих частиц ватерита, нагруженных противогрибковым соединением, в растворителе (70% этиловом спирте) непосредственно перед применением. Трансфолликулярная доставка контейнеров осуществляется путем аппликации данной суспензии на поверхность кожи в области патологии и последующего их внедрения при помощи терапевтического ультразвука.

Нанесение частиц проводят не чаще одного раза в три дня. Такая кратность нанесения обусловлена биodeградируемостью контейнеров: заметное снижение интрафолликулярной концентрации частиц наблюдается лишь через 72 часа после их внедрения.

Примеры реализации способа.

Иммобилизация и интрафолликулярная доставка противогрибковых веществ с помощью ватеритных контейнеров.

Пример 1. Подтверждение интрафолликулярной доставки частиц ватерита с противогрибковым веществом.

Пример рассматривает поверхностное нанесение суспензии частиц ватерита, содержащих противогрибковое вещество из группы аллиламинов (нафтифина гидрохлорид), меченных флуоресцентным красителем цианином-7 (Cy7), с целью подтверждения возможности их интрафолликулярной доставки, а также оценки глубины их чрезкожного проникновения. Исследование проводят *in vivo* на участке спины самца белой лабораторной крысы.

Иммобилизацию нафтифина гидрохлорида (Нф) осуществляют методом его адсорбции из раствора на поверхность предварительно полученных частиц ватерита методом индуцированной кристаллизацией адсорбции. Для этого, 2 мл водно-спиртового раствора НФ концентрацией 1 мг/мл добавляют к 30 мг частиц. Пробирку с реакционной смесью выдерживают в морозильной камере при температуре -20°C в течение 2 часов до полной заморозки, постоянно перемешивая. После этого образцы размораживают при комнатной температуре и однократно промывают водой. Цикл заморозки/разморозки повторяют дважды.

При применении такой методики получены контейнеры диаметром 0.9 ± 0.2 мкм, содержащих 10 вес.% НФ (вес.% выражают отношение массы иммобилизованного антимикотика к массе частиц). Изображение частиц, полученное методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), приведено на **Фиг.1**.

С целью дальнейшего исследования проникновения частиц в кожу крыс с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ), осуществляют их мечение с помощью флуоресцентного красителя Cy7. Для этого навеску сухих частиц ватерита, содержащих Нф, выдерживают в растворе красителя при непрерывном встряхивании с помощью шейкера в течение 30 минут. Затем проводят однократную промывку этанолом 70%.

За сутки до проведения эксперимента на участке 4x4 см спины животных выбривают шерсть станком до длины 1 мм без повреждения кожного покрова. Непосредственно перед проведением исследования крыса подвергается анестезии. Навеска высушенных частиц массой 30 мг диспергируется в 300 мкл 70% этилового спирта (концентрация

суспензии 100 мг/мл) и наносится на подготовленную область диаметром 3 см. Затем осуществляют воздействием при помощи низкоинтенсивного терапевтического ультразвука частотой 0.88 МГц и интенсивностью 0.4 Вт/см² в течение 2 минут на область аппликации. По завершении процедуры внедрения избыток частиц удаляется с поверхности кожи с помощью ватного диска, смоченного в воде.

Глубину чрезкожного проникновения частиц исследуют путем анализа гистологических срезов биопсийного материала, отобранного у лабораторных животных (без их умерщвления) сразу после внедрения. Последующую заморозку образцов и подготовку гистологических срезов толщиной 20 мкм осуществляют при помощи криостата. Исследование полученных срезов проводят методом КЛСМ. Характерное изображение, полученные при оценке глубины проникновения частиц в кожу, приведено на **Фиг.2**. Синий флуоресцентный сигнал на данных изображениях соответствует автофлуоресценции тканей волосяного фолликула в ультрафиолетовом диапазоне (в частности, стержню волоса), красный – флуоресценции красителя Су7 в диапазоне 750-795 нм.

В результате продемонстрировано внедрение частиц на всю глубину волосяного фолликула, что подтверждается наличием флуоресцентного сигнала в красном канале, четко очерчивающего волосяные луковицы и распространяющегося вдоль стержня волоса.

Пример 2: Аккумуляция в коже противогрибкового вещества, не имеющего коммерчески доступной топической формы, при применении его иммобилизованной в ватеритные частицы формы.

Пример 2 рассматривает создание формы для поверхностного применения противогрибкового вещества, обладающего низкой растворимостью и биодоступностью (гризеофульвин), путем его иммобилизации в частицы ватерита. Изучение возможности интрадермальной аккумуляции предлагаемой формы. Данное исследование проводят *in vivo* на участке спины самца белой лабораторной крысы.

Синтез контейнеров проводится путем совместного осаждения противогрибкового вещества гризеофульвина (ГФ) с частицами ватерита в процессе их формирования в среде этиленгликоля при 60°C. Для этого навеску ГФ добавляют к среде этиленгликоля до получения раствора концентрацией 4 мг/мл. Затем, водные растворы солей Na₂CO₃ и CaCl₂ смешивают с суспензией ГФ в этиленгликоле в соотношении 1:5. Процесс смешивания растворов проводят с помощью магнитной мешалки на скорости 700 об/мин в течение 2.5 часов. Полученные частицы трижды промывают 95% этиловым спиртом, затем образец лиофильно высушивают.

При применении такой методики получены контейнеры диаметром 1.1±0.4 мкм, содержащие 20 вес.% ГФ. СЭМ-изображение полученных частиц приведено на **Фиг.3**.

С целью подтверждения чрезкожной транспортировки ГФ с помощью частиц ватерита, а также его аккумуляции в волосяных фолликулах и прилегающих к ним тканях, проводят исследование гистологических срезов биопсийного материала методом КЛСМ.

Интрафолликулярную доставку частиц, а также забор, подготовку и исследование биопсийного материала выполняют по схеме, описанной в *примере 1*, с тем отличием, что КЛСМ-визуализацию криосрезов проводят в диапазоне 420-490 нм при возбуждении лазером с длиной волны 405 нм. Хотя данные параметры возбуждения флуоресценции ГФ не являются оптимальными (оптимум соответствует параметрам Ex=292/Em=412), однако позволяют осуществить детекцию флуоресцентного сигнала от нагруженных

препаратом частиц ватерита. Этот факт подтверждается наличием яркого, хорошо выраженного флуоресцентного сигнала от самих контейнеров на КЛСМ-изображениях, приведенных на **Фиг.4**.

5 Исследование возможности интрадермальной аккумуляции ГФ при поверхностном применении его иммобилизованной в частицы ватерита формы проводят в сравнении с интактной областью кожи (без аппликации частиц). Характерные флуоресцентные изображения полученных криосрезов кожи представлены на **Фиг.5**.

10 Несмотря на то, что при использованных параметрах съемки наблюдают автофлуоресценцию тканей, вклад флуоресценции ГФ, внедренного в кожу, очевиден. Об аккумуляции препарата в коже крыс после применения нагруженных им частиц ватерита, свидетельствует повышение интенсивности флуоресцентного сигнала в приповерхностном слое кожи, а также заметное увеличение толщины приповерхностной флуоресцирующей области.

15 Для численной оценки указанных изменений проводят исследование профилей флуоресценции приповерхностного слоя на КЛСМ-изображениях исследованных образцов. Для этого методом КЛСМ исследуют по 3 независимых криосреза, полученных из биопсийного материала интактной области и области внедрения частиц. По полученным изображениям проводят анализ распределения интенсивности флуоресценции по глубине с использованием программного обеспечения Gwyddion и рассчитывают толщину флуоресцирующей области в отмеченной зоне (d) и среднюю интенсивность флуоресцентного сигнала в ней (I). Полученные данные приведены в **Табл. 1**.

25 Установлено, что интенсивность флуоресцентного сигнала приповерхностной области после внедрения частиц ватерита, нагруженных противогрибковым веществом ГФ, увеличилась в 2.6 раз по сравнению с интактной областью, а толщина флуоресцирующей приповерхностной области в – 1.6. Проведенный дисперсионный анализ (ANOVA) полученных данных, подтвердил, что указанные различия между двумя исследованными выборками статистически значимы при $p < 0.05$.

30 Таким образом, методом КЛСМ была продемонстрирована аккумуляция противогрибкового вещества гризеофульвина в коже крысы после топического применения нагруженных им частиц ватерита.

Постепенная деградация частиц ватерита, нагруженных противогрибковым веществом, в волосяных фолликулах

35 Пример 3: Подтверждение постепенной биодеградации частиц ватерита с противогрибковым веществом в волосяных фолликулах.

Осуществляют интрафолликулярную доставку частиц ватерита, содержащих противогрибковое вещество из группы аллиламинов (нафтифина гидрохлорид), с целью изучения длительности их деградации в волосяных фолликулах. Исследование проводят *in vivo* на участке спины лабораторной мыши линии Balb/c.

40 Синтез контейнеров и их трансдермальное внедрение проводят по протоколу, приведенному в примере 1, без предварительной анестезии лабораторных животных. Для оценки состояния ватеритных носителей, содержащих противогрибковое вещество Нф, в волосяных фолликулах осуществляют экстракцию волос вместе с луковицей из области их нанесения сразу после внедрения частиц, а затем через 3,5, 24, 48, 72, 120 часов после внедрения. Экстракцию волос осуществляют в количестве 5 штук на каждый образец. После этого ткань изъятых волосяных луковиц каждого волоса разрушают при помощи лезвия и проводят исследование полученного материала методом СЭМ. Результаты такого исследования представлены на **Фиг.6**.

Установлено, что целостность ватеритных частиц, содержащих противогрибковое вещество нафтифина гидрлорид, в фолликулах сохраняется в течение 48 часов после внедрения. Через 72 часа наблюдается заметное прореживание контейнеров в фолликулах, через 120 часов контейнеры полностью резорбируются в фолликулах
 5 мыши. В связи с этим, за частоту нанесения предлагаемой поверхностной формы целесообразно принять промежуток не чаще 1 раза в 3 дня. Таким образом, постепенная деградация частиц в волосяных фолликулах способствует увеличению продолжительности контакта антимикотика с пораженным участком.

Терапевтическая эффективность предлагаемого способа лечения дерматомикозов

10 Пример 4. Исследование терапевтического эффекта от местного применения противогрибковой композиции на основе частиц ватерита, обладающей способностью к проникновению и накоплению в волосяных фолликулах, на модели микотического заболевания *in vivo*.

В рамках изучения противогрибковой активности разработанной формы
 15 антимикотика проводится *in vivo* исследование на модели микотического поражения кожи (трихофитии, обусловленной *Trichophyton mentagrophytes*) морских свинок. Исследуется поверхностное применение частиц ватерита, содержащих противогрибковое вещество нафтифина гидрохлорид, и частиц ватерита, содержащих противогрибковое вещество гризеофульвин, в сравнении с коммерчески доступным препаратом

20 Микодерил® в форме мази для поверхностного применения.

Для проведения эксперимента осуществляют подготовку следующих образцов:

- ватеритные контейнеры с иммобилизованным нафтифином гидрохлоридом (ВкНф);
- ватеритные контейнеры с иммобилизованным гризеофульвином (ВкГф);
- ненагруженные ватеритные контейнеры (Вк).

25 Синтез контейнеров осуществляют по методикам, описанным в *примерах 1 и 2*.

Синтез контрольных контейнеров (ненагруженные частицы ватерита) проводят по аналогичному протоколу, но без добавления антимикотика. Подготовка контейнеров осуществляют в асептических условиях, затем дополнительно обеззараживают этанолом 70%.

30 Доза контейнеров для поверхностного нанесения определяется, исходя из требований к оптимальной дозе по действующему веществу для конкретного антимикотика. В данном случае доза для нанесения соответствует 30 мг ватеритных контейнеров (т.е. 3 мг нафтифина гидрохлорила и 6 мг гризеофульвина).

Штамм *T. mentagrophytes* РКПГ F 1457 для исследования взят из Российской коллекции
 35 патогенных грибов НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина. Для подготовки тест-культуры для заражения осуществляют ее выращивали в течение 14 дней при 28°C на агаризованной среде Сабуро в чашках Петри.

Экспериментальные животные (морские свинки, *Cavia porcellus*) взяты из ФГУП ПЛЖ
 40 «Рапполово» РАМН. Возраст животных – 30 суток, масса животных к началу эксперимента 250 – 300 г. Общее количество животных в исследовании составило 18.

До начала проведения испытаний животные проходят акклиматизацию в лаборатории в течение 7 дней. Во время этого периода осуществляется ежедневный осмотр внешнего состояния животных. После карантина животные досматриваются с целью исключения из эксперимента больных и травмированных особей. Затем проводят их рандомизацию
 45 в опытные группы по схеме, приведенной в Табл.2. Условия содержания животных соответствуют стандартам ГОСТ Р 53434 – 2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и «Санитарных правил по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденным МЗ СССР

06.07.1973 г.

Осуществляют заражение животных выращенной тест-культурой гриба. Далее на 5-й и 21-й дни после заражения (после развития характерных признаков заболевания) скальпелем и пинцетом отбирают кожные чешуйки, шерсть, корки из очага поражения в стерильные чашки Петри для проведения микроскопического и культурального исследований. Ежедневно проводят осмотр зараженных животных с фотофиксацией очага поражения, измеряют и описывают его размер, а также наличие и степень эритемы, коркообразование и шелушение в очаге заражения. Наблюдение за животными продолжают 21 сутки. Параметры инфицирования оценивают в баллах по шкале:

- 0 – отсутствие наблюдаемого признака,
- 1 – небольшое наличие признака в очаге поражения,
- 2 – заметное наличие признака в очаге поражения,
- 3 – наличие ярко выраженного признака на более широкой области очага,
- 4 – наличие ярко выраженного признака на всем очаге поражения.

За день до начала лечения клинические проявления в контрольных и экспериментальных группах по четырём из пяти наблюдаемым признакам были охарактеризованы как равномерные и не отличающимися между группами (Табл. 3). Отмечено, что в экспериментальной группе 5 изъязвление в очаге заражения было более выраженным. Микроскопическое исследование биоматериала (кожные чешуйки, шерсть), взятого перед началом лечения на 6-й день после заражения у животных в контрольных и экспериментальных группах, подтвердило наличие септированного мицелия микромицета. При посеве на плотную питательную среду во всех пробах получен рост *T. Mentagrophytes*. Изображения, полученные для животных группы 1, приведены на Фиг.7. Аналогичная картина наблюдалась во всех группах животных с заражением (группы 1-5).

Лечение животных в группах 2-4 начинали через 6 дней после заражения культурой микромицета, когда клиническая картина заражения была выраженной.

Лечение животных с применением ВкНф, ВкГф и Вк осуществлялось путем нанесения суспензии контейнеров на исследуемую поверхность кожи и последующего воздействия терапевтическим ультразвуком частотой 1 МГц при интенсивности 0.5 Вт/см² в течение 2 минут. Процедуру нанесения контейнеров проводили один раз в три дня в течение 14 дней (5 процедур), т.е. на 7-й, 10-й, 13-й, 16-й и 19-й дни после заражения.

Суспензии готовили непосредственно на коже в очаге заражения. Для этого перед нанесением контейнеров на очаг поражения наносили 50 мкл растворителя (70% этанол), затем вносили навеску исследуемых контейнеров (одна доза), после чего добавляли ещё 50 мкл растворителя. Через одну минуту воздействия ультразвуком добавляли 100 мкл растворителя в пробирку с остатками исследуемого объекта и полученную взвесь наносили на очаг поражения, продолжая воздействие ультразвуковым аппаратом в течение еще одной минуты.

Лечение животных препаратом сравнения (Микодерил® 1%, ЗАО «Лекко») в группе 5 начинали через 6 дней после заражения и выполняли ежедневно, однократно в течение 14 дней, т.е. с 7-го по 20-й дни после заражения, путём нанесения 0.3 мл (т.е. 3 мг нафтифина гидрохлорида) препарата сравнения на пораженные участки кожи морских свинок.

Наблюдение за инфицированными животными проводили в течение 21 дня после заражения.

Для животных в контрольной группе без лечения проводили весь перечень исследований, как и для животных в группах с лечением.

Фотографии очага в динамике для групп 1-5 приведены на **Фиг. 8-12**. Показатели инфекционного процесса в баллах, зарегистрированные в середине в конце наблюдения, приведены в **Таблицах 4-6**.

По мере наблюдения за животными контрольных групп 1 и 2 после их заражения трихофитией происходило прогрессирования заболевания, сопровождаемое интенсификации инфекционного процесса и нарастанием выраженности клинических признаков в течение 19-ти и 16-ти дней наблюдения, соответственно. Затем признаки проявления заболевания (покраснение, шелушение и коркообразование) ослабевали, но оставались ярко выраженными к концу эксперимента (**Фиг.8 и 9**). При применении Вк было отмечено изменение клинической картины по сравнению с животными в группе без лечения. Небольшое снижение показателей инфекционного процесса и ускорение его ослабления связано с применением 70% этанола в качестве среды для приготовления суспензии и частиц при их применении на очаг поражения, поскольку этанол обладает антифунгальной активностью в отношении дерматомицетов.

При лечении животных с применением ВкНф и ВкГф, а также препарата сравнения – крема «Микодерил 1%» (действующее вещество - нафтифина гидрохлорид) (группы 3-5), наблюдался выраженный терапевтический эффект, выражающийся в заметном ослаблении клинических проявлений заболевания через неделю после начала лечения (**Фиг. 10-12**).

Микроскопическое исследование материала, отобранного из очагов поражения на 21-й день после заражения, подтвердило отсутствие грибка как в кожных чешуйках, так и в волосах животных из групп 3 и 5. Посевы биоматериала от животных этих групп на плотную питательную также дали отрицательный результат, подтвердив эффективность проведенной терапии. В группе 4 с внедрением в волосы животных элементы гриба обнаружены также не были. При микроскопии материала от животных из контрольной группы 1 (без лечения) были обнаружены споры и септированный мицелий микромицета в волосах и чешуйках из очага заражения.

Таким образом, по завершении эксперимента при прямой микроскопии волос из очагов поражения мицелий и споры гриба были обнаружены только в группе 1 (заражение без лечения). При этом, кратность применения препарата сравнения (препарат «Микодерил»[®]) составила 15 нанесений, а кратность нанесения частиц ватерита, содержащих противогрибковое вещество нафтифина гидрохлорид, и частиц ватерита, содержащих противогрибковое вещество гризеофульвин – 5. То есть число процедур лечения было сокращено в 3 раза. Таким образом, продемонстрировано, что применение заявляемого изобретения обеспечивает оптимизацию лечения поверхностных микозов.

Оценка *in vivo* токсичности предлагаемого способа лечения дерматомикозов.

Пример 5: Оценка патологического влияния *in vivo* местного применения противогрибковой композиции на основе частиц ватерита, обладающей способностью к проникновению и накоплению в волосяных фолликулах.

С целью оценки местно-раздражающего действия и его обратимости при инфрафолликулярном внедрении разработанной формы антимикотика проводится *in vivo* исследование на кроликах калифорнийской породы. Исследуется поверхностное применение частиц ватерита, содержащих противогрибковое вещество гризеофульвин, в сравнении с контролями (в том числе с поверхностным нанесением суспензии неиммобилизованного гризеофульвина).

Для проведения эксперимента осуществляют подготовку следующих образцов:

- ватеритные контейнеры с иммобилизованным гризеофульвином (ВкГф);

- спиртовая суспензия гризеофульвина (Гф);
- ненагруженные ватеритные контейнеры (Вк).

Синтез контейнеров осуществляют по методике, описанной в примере 2. Синтез контрольных контейнеров (ненагруженные частицы ватерита) проводят по аналогичному протоколу, но без добавления антимикотика. Подготовку контейнеров осуществляют в асептических условиях, затем дополнительно обеззараживают этанолом 70%.

Доза контейнеров для поверхностного нанесения определяется, исходя из требований к оптимальной дозе по действующему веществу для конкретного антимикотика. В данном случае доза для нанесения соответствует 30 мг ватеритных контейнеров. Данная навеска высушенных частиц диспергируется в 200 мкл 70% этилового спирта (концентрация суспензии 150 мг/мл) непосредственно перед нанесением на кожу в группах с нанесением как Вк, так и ВкГф.

Навеска свободного Гф, необходимая для приготовления суспензии для сравнительного нанесения, соответствует массе Гф, содержащегося в одной дозе ВкГф, т.е. в данном случае составляет 6 мг. Такая навеска противогрибкового вещества диспергируется в 200 мкл 70% этилового спирта непосредственно перед нанесением на кожу.

Возраст экспериментальных животных (кроликов калифорнийской породы) в исследовании составляла 6 месяцев, масса животных к началу эксперимента составляла 2.0 ± 0.5 кг. Общее количество животных в исследовании составило 24.

До начала проведения испытаний животные проходят акклиматизацию в лаборатории в течение 7 дней. Во время этого периода осуществляется ежедневный осмотр внешнего состояния животных. После карантина животные досматриваются с целью исключения из эксперимента больных и травмированных особей. Затем проводят их рандомизацию в 5 групп. За сутки до начала эксперимента у кроликов удаляют волосяной покров методом выбривания, избегая порезов и ссадин, на участке кожи в области спины, площадью 8×9 см.

Исследование проводится для следующих групп:

1. Контрольная группа, без воздействия, интактная кожа.
 2. Группа сравнения 1 – поверхностное нанесение этанола 70%.
 3. Группа сравнения 2 – аппликация спиртовой суспензии Вк.
 4. Опытная группа 1 – аппликация спиртовой суспензии Гф.
 5. Опытная группа 2 – аппликация спиртовой суспензии ВкГф.
- Аппликация веществ (200 мкл спирта, а также спиртовых суспензий ВкГф, Гф и Вк) животным из групп 2-5 осуществляется с последующим воздействием терапевтическим ультразвуком частотой 0.89 МГц при интенсивности 0.5 Вт/см^2 в течение 3 минут.

Все образцы наносят трехкратно, один раз в неделю, в течение трех недель.

В течение двух месяцев ежедневно регистрируют общее состояние животных, особенности их поведения, координацию движений, потребление корма и воды. Реакцию кожи регистрируют сразу после применения исследуемых веществ и далее ежедневно в течение 60 дней. Фотофиксацию очагов исследования проводят сразу после первого нанесения веществ и после последнего (третьего) нанесения. Результаты фотофиксации в таком эксперименте представлены на **Фиг. 13**.

Через неделю, две недели и месяц после последнего нанесения исследуемых веществ, с предварительным обезболиванием золетилом (40 мг/кг), у животных забирают образцы кожи для гистологического исследования.

В результате аппликации на кожу кроликов испытуемых препаратов симптомов

интоксикации не отмечено. При исследовании раздражающего действия препаратов установлено, что при однократном воздействии препаратов на кожу, проявлялось кратковременное легкое покраснение, так как препараты были приготовлены на спирте (Фиг. 13). При дальнейшем обследовании обработанного участка кожи в сравнении с исходным периодом и контрольными животными не наблюдали признаков, которые свидетельствовали бы о выраженном раздражающем действии испытуемых препаратов.

Таким образом установлено, что суспензии Гф и ВкГф не вызывали видимых функциональных нарушений кожи, таких как выраженная эритема, отеки, трещины, изъязвления и изменения локальной температуры кожи.

При гистологическом исследовании контрольной группы животных (группа 1) на всех этапах исследования отмечали нормальное строение кожи и подкожно-жировой клетчатки (Фиг. 14).

В группе 2 через неделю после первой аппликации спирта отмечали акантоз и признаки слабо выраженного гиперкератоза (Фиг. 15). Через 2 недели степень выраженности гиперкератоза увеличивалась, утолщался и сам эпидермис, появлялась инфильтрация дермы лимфоцитами, увеличивалась выраженность полнокровия капилляров. Через месяц строение кожи и подкожной клетчатки приближалось к норме, отмечались папилломатозные выросты. Данные гистологического исследования свидетельствовали о высушивающем эффекте спиртового раствора на кожу, однако данная реакция является обратимой.

В группе 3 через неделю после первой аппликации Вк в коже отмечали умеренный отек дермы, папилломатозные выросты эпидермиса (Фиг. 16). В дерме наблюдали воспалительную инфильтрацию. Через 2 недели нарастала выраженность отека в дерме, наблюдали незначительное утолщение эпидермиса. Через месяц наблюдали только умеренный отек дермы. Таким образом, наблюдалась неспецифическая воспалительная реакция, вызванная иммунным ответом организма на введение карбоната кальция. Однако реакция также являлась обратимой.

В группе 4 через неделю после первой аппликации суспензии Гф отмечали незначительный акантоз и утолщение эпидермиса, гиперкератоз, в дерме наблюдали отек и полнокровие сосудов (Фиг. 17). Через 2 недели сохранялось только полнокровие сосудов. Через месяц строение эпидермиса и дермы приближалось к норме. Таким образом, воспалительная реакция на введение Гф отсутствовала, наблюдаемые изменения являлись обратимыми.

В группе 5 с аппликацией ВкГф через неделю после внедрения частиц в дерме отмечали отек и полнокровие сосудов, наблюдали папилломатоз (Фиг. 18). Через 2 недели усиливался отек дермы, истончался эпидермис. Через месяц отек уменьшался. Лимфоидная инфильтрация, развивающаяся в ответ на введение ВкГф, может свидетельствовать об активации иммунной системы в ответ на введение исследуемых препаратов.

Таким образом, продемонстрировано, что исследуемые вещества не вызывали видимого повреждения всех слоев кожи, но при гистологическом исследовании, было установлено развитие неспецифической воспалительной реакции в дерме в ответ на введение Вк и появление лимфоидной инфильтрации в дерме в ответ на введение ВкГф. Через 2 недели отмечалось нарастание выраженности морфологических изменений, прежде всего нарушения кровенаполнения – полнокровия, отека дермы, а также реакции самого эпидермиса и изменения его толщины. Однако через месяц строение кожи приближалось к норме, что подтверждает обратимость описанных изменений.

Обнаруженный ответ лимфатической системы у здоровых животных на

интрафолликулярное внедрение ватеритных контейнеров с антимикотиком рассматривается как позитивное явление, поскольку такая неспецифическая стимуляция иммунного ответа может сыграть особую роль в терапии дерматомикозов.

5 Пример 6. Исследование влияние местного применения противогрибковой композиции на основе частиц ватерита, обладающей способностью к проникновению и накоплению в волосяных фолликулах, на биохимические параметры мочи животных.

С целью оценки патологического действия интрафолликулярного внедрения разработанной формы антимикотика белым лабораторным крысам проводится анализ их образцов мочи по 10 основным физиологическим показателям: уровень сахара, билирубин, удельный вес, уровни кетонов, эритроцитов, рН, белка, уробилиногена, нитратов и лейкоцитов. Исследуется поверхностное применение частиц ватерита, содержащих противогрибковое вещество гризеофульвин.

Синтез контейнеров осуществляют по методике, описанной в примере 2.

15 Доза контейнеров для поверхностного нанесения в данном эксперименте выбирается заведомо большей оптимальной (в 1.67 раза). Поскольку за оптимальную дозу для поверхностного нанесения ватеритных контейнеров с ГФ на площадку диаметром 3 см ранее была принята навеска, соответствующая 30 мг (что в пересчете на единицу площади соответствовало 4 мг частиц/см²), то в данном исследовании изучают влияние 50-мг навески контейнеров. Для этого пришлось увеличить также площадь области до 20 10 см², чтобы обеспечить эффективное внедрение частиц, таким образом, в пересчете на единицу площади доза в итоге составила 5 мг частиц/см². В пересчете на активное вещество это соответствует 10 мг гризеофульвина, примененным на 1 крысу.

25 Экспериментальная группа включала трех самцов белой лабораторной крысы в возрасте от 6 до 8 месяцев массой 800±50 г.

За день до начала эксперимента нижняя часть спины каждой крысы выбривают, избегая нарушения целостности кожного покрова. Затем животных помещают в индивидуальные метаболические клетки (OpenScience, Россия). Через сутки для биохимического исследования были собраны образцы контрольной мочи. Далее 30 осуществляют внедрение частиц ватерита, содержащих Гф, по методике, описанной в *примере 5*, с ультразвуковым воздействием частотой 0.88 МГц интенсивностью 0.4 Вт/см² в течение 3 минут. Остаток суспензии частиц тщательно удаляют с поверхности кожи крыс ватным диском по завершении процедуры внедрения.

35 Отбор мочи производят каждый день в течение 12 дней после внедрения частиц (каждые 24 часа в течение 288 часов). После центрифугирования образцов в течение 5 минут на скорости 3000 оборотов/мин измеряют основные показатели с помощью тест-полосок для анализа мочи (UroColorTM10, Standard Diagnostics, Корея).

40 Кроме того, проводят исследование мочи контрольной группы животных, включающей также 3 особи белой лабораторной крысы, которым не проводят внедрения частиц. Однако остальные манипуляции (бритье, посадка в боксы, изучение параметров мочи в течение 288 часов) проводят.

45 Такая оценка в результате не выявила каких-либо отклонений в показателях у животных опытной группы, что свидетельствовало об отсутствии патологических процессов, связанных с состоянием углеводного обмена, функции почек и печени, кислотно-щелочного баланса и инфекции мочевыводящих путей.

На основании данных наблюдений можно сделать вывод, что предлагаемая система доставки не оказывала выраженного токсического эффекта на организм животных.

(57) Формула изобретения

1. Способ терапии поверхностных микозов, заключающийся в воздействии на поверхность кожи трансдермального препарата, содержащего противогрибковое соединение, отличающийся тем, что в качестве трансдермального препарата используют трансфолликулярный препарат, представляющий собой иммобилизованное в ватеритные частицы противогрибковое соединение, воздействие трансфолликулярного препарата осуществляют путём аппликации его спиртовой суспензии концентрацией 100-150 мг/мл на поверхность кожи в области патологии до достижения дозы 4-5 мг частиц/см², содержащих 10-20 вес.% противогрибкового соединения, после чего на область аппликации воздействуют ультразвуком частотой 0,88-1 МГц интенсивностью 0,4-0,5 Вт/см² в течение 2-3 минут, при этом процедуру лечения проводят не чаще 1 раза в 3 дня.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве противогрибкового соединения используют нафтифина гидрохлорид или гризеофульвин.

20

25

30

35

40

45

Таблица 1

	Интактная область	Область внедрения контейнеров с гризофульвином
d, мкм	39.5±1.9	61.3±3.6
I	19.2±1.2	49.1±3.0

Таблица 2

Номер группы	Наименование группы	Количество животных в группе
1	Отрицательный контроль: заражение без лечения	3
2	Отрицательный контроль: частицы CaCO ₃ + ультразвук	3
3	Лечение: частицы (CaCO ₃ +Nf) + ультразвук	3
4	Лечение: частицы (CaCO ₃ +Gf) + ультразвук	3
5	Лечение: препарат сравнения Микодерил 1%	3
6	Интактная группа	3

Таблица 3

	№ животного	Покраснение	Коркообразование	Шелушение	Общая сумма баллов
Группа 1	1	1	0	1	2
	2	2	1	2	5
	3	2	1	2	5
M±m		1.67±0.58	0.67±0.58	1.67±0.58	4.00±1.73
Группа 2	4	2	1	2	5
	5	1	1	2	4
	6	2	1	2	5
M±m		1.67±0.58	1.00±0.00	2.00±0.00	4.67±0.58
Группа 3	7	2	1	2	5
	8	2	2	2	6
	9	3	2	3	8
M±m		2.33±0.58	1.67±0.58	2.33±0.58	6.33±1.53
Группа 4	10	2	1	2	5
	11	3	2	3	8
	12	3	2	3	8
M±m		2.67±0.58	1.67±0.58	2.67±0.58	7.00±1.73
Группа 5	13	2	2	2	6
	14	3	2	3	8
	15	2	2	2	6
M±m		2.33±0.58	2.00±0.00	2.33±0.58	6.67±1.15

Таблица 4

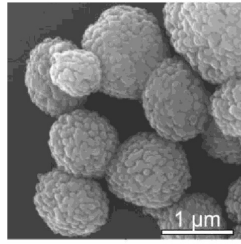
	№ животного	Покраснение	Коркообразование	Шелушение	Сумма баллов
Группа 1	1	4	4	3	11
	2	4	4	2	10
	3	4	4	2	10
M±m		4.00±0.00	4.00±0.00	2.33±0.58	10.33±0.58
Группа 2	4	4	4	3	11
	5	4	4	2	10
	6	4	4	3	11
M±m		4.00±0.00	4.00±0.00	2.67±0.58	10.67±0.58
Группа 3	7	3	3	3	9
	8	3	2	2	7
	9	3	3	3	9
M±m		3.33±0.58	2.67±0.58	2.67±0.58	8.33±1.15
Группа 4	10	3	3	3	9
	11	3	3	3	9
	12	3	2	3	8
M±m		3.00±0.00	2.67±0.58	3.00±0.00	8.66±0.58
Группа 5	13	2	2	4	8
	14	2	2	4	8
	15	2	2	4	8
M±m		2.00±0.00	2.00±0.00	4.00±0.00	8.00±1.00

Таблица 5

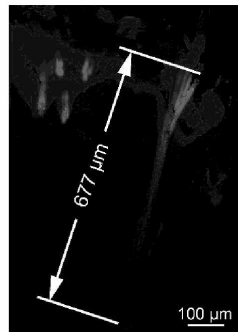
	№ животного	Покраснение	Коркообразование	Шелушение	Сумма баллов
Группа 1	1	1	2	2	5
	2	2	0	1	3
	3	2	2	1	5
M±m		1.67±0.58	1.00±0.00	1.33±0.58	4.33±1.15
Группа 2	4	1	1	2	4
	5	2	1	1	4
	6	1	2	2	5
M±m		1.33±0.58	1.33±0.58	1.67±0.58	4.33±0.58
Группа 3	7	1	1	2	4
	8	2	1	2	5
	9	1	1	1	3
M±m		1.33±0.58	1.00±0.00	1.67±0.58	4.00±1.00
Группа 4	10	2	2	2	6
	11	2	2	2	6
	12	1	1	2	4
M±m		1.67±0.58	1.67±0.58	2.00±0.00	5.33±1.15
Группа 5	13	2	1	2	5
	14	2	1	3	6
	15	1	0	3	4
M±m		1.67±0.58	0.67±0.58	2.67±0.58	5.00±1.00

Таблица 6

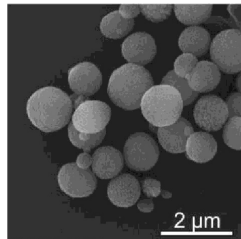
	Сумма баллов		
	до лечения	середина эксперимента	конец эксперимента
Группа 1	4.00±1.73	10.33±0.58	4.33±1.15
Группа 2	4.67±0.58	10.67±0.58	4.33±0.58
Группа 3	6.33±1.53	8.33±1.15	4.00±1.00
Группа 4	7.00±1.73	8.66±0.58	5.33±1.15
Группа 5	6.67±1.15	8.00±1.00	5.00±1.00



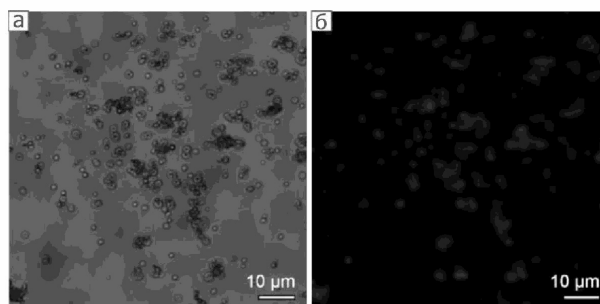
Фиг. 1



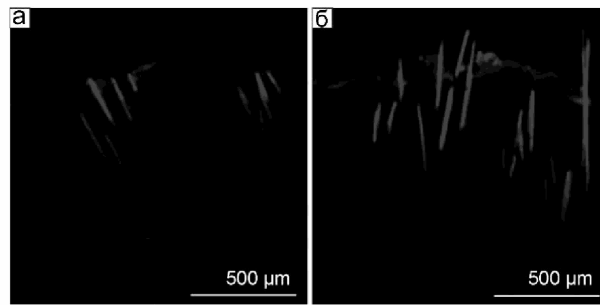
Фиг. 2



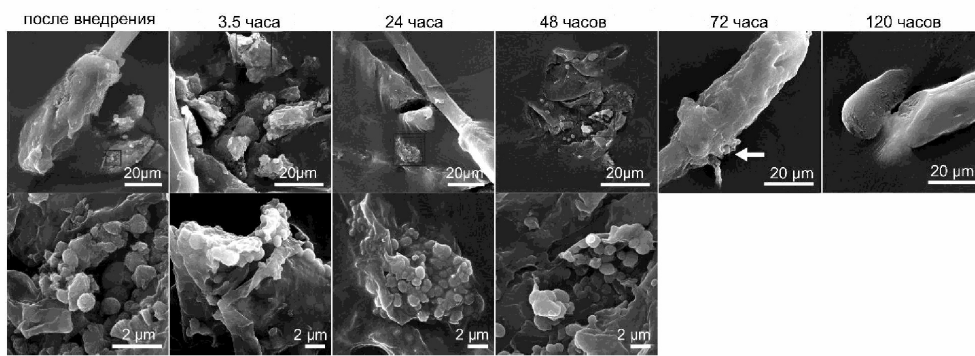
Фиг. 3



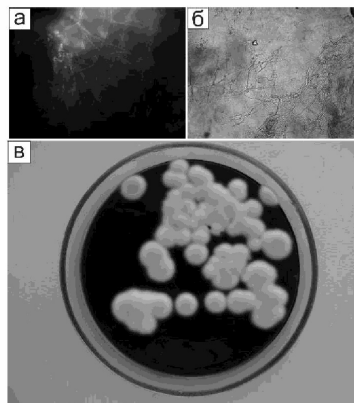
Фиг. 4



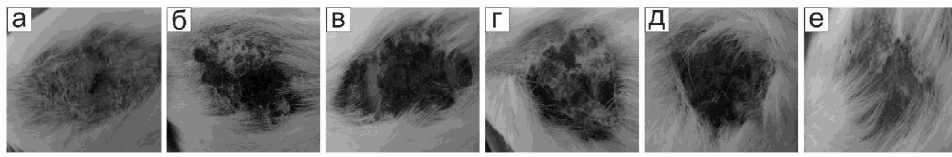
Фиг. 5



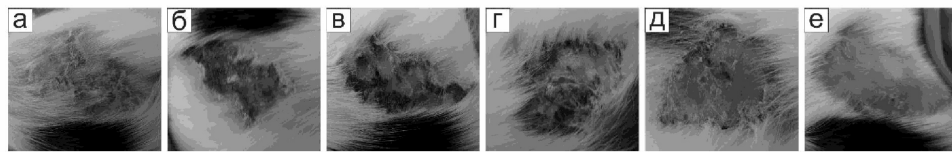
Фиг. 6



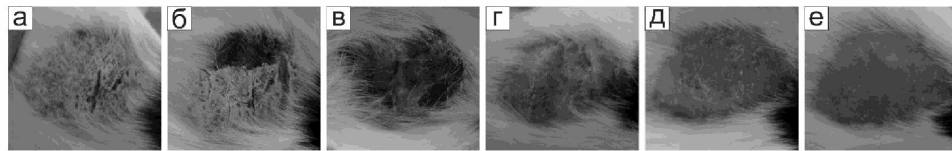
Фиг. 7



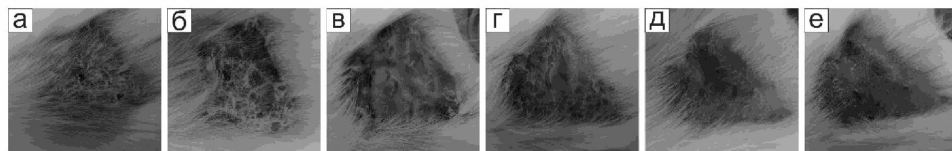
Фиг. 8



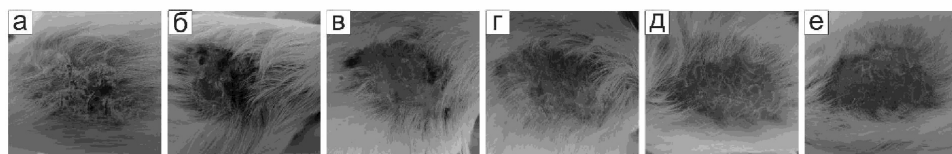
Фиг. 9



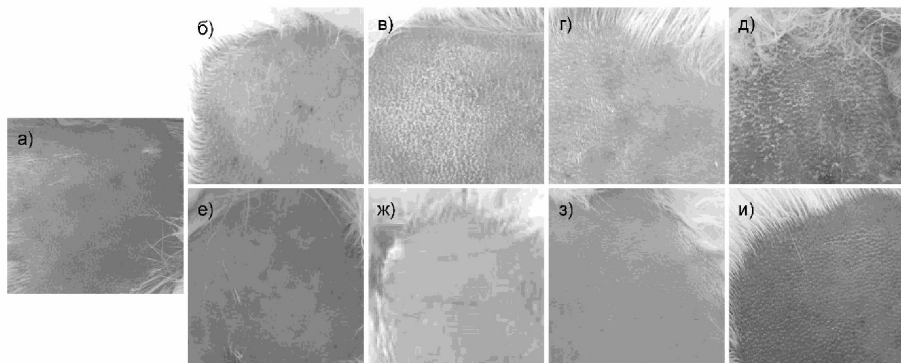
Фиг. 10



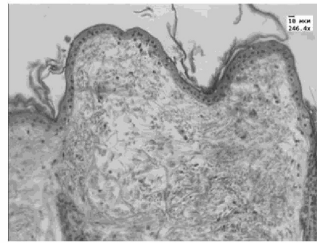
Фиг. 11



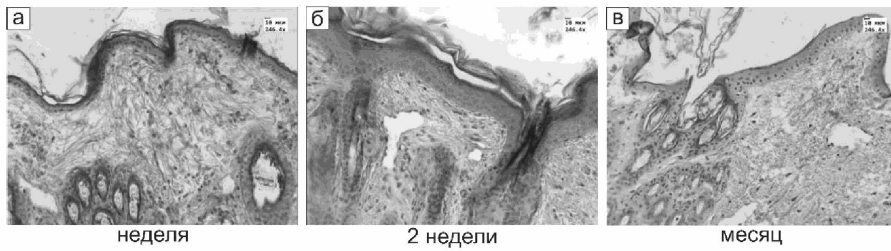
Фиг. 12



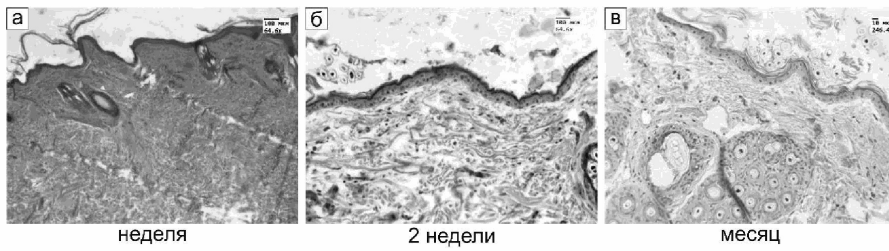
Фиг. 13



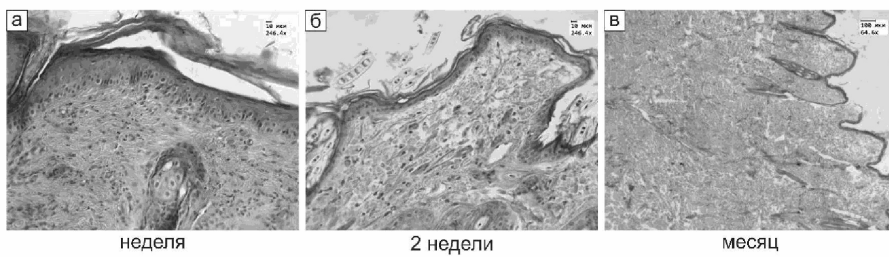
Фиг. 14



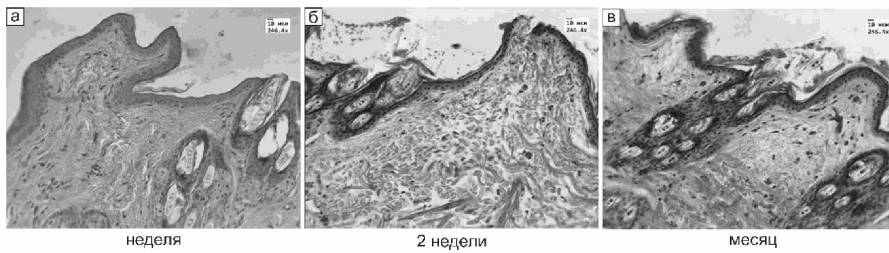
Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18