

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) RU (11) 2 585 373<sup>(13)</sup> C2

(51) МПК  
A61K 38/48 (2006.01)  
A61K 9/10 (2006.01)  
A61K 47/30 (2006.01)  
A61K 47/44 (2006.01)  
A61P 17/02 (2006.01)  
C12N 9/00 (2006.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012126852/15, 08.12.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
08.12.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
08.12.2009 US 61/267,730

(43) Дата публикации заявки: 20.01.2014 Бюл. № 2

(45) Опубликовано: 27.05.2016 Бюл. № 15

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 20050281806 A1, 22.12.2005. US 20050036950 A1, 17.02.2005. WO 2002004004 A1, 17.01.2002. WO 2004064882 A1, 05.08.2004. RU 2367456 C2, 20.09.2009. RAYMOND C ROWE et al., Handbook of pharmaceutical excipients, fifth edition, 2006. Factors Affecting Enzyme Activity, Bio Factsheet, April, 1999, Number 43.

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 09.07.2012

(86) Заявка РСТ:  
US 2010/059409 (08.12.2010)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2011/071986 (16.06.2011)

Адрес для переписки:  
119019, Москва, Гоголевский бульвар, 11, этаж 3, "Гоулингз Интернэшнл Инк.", В.А. Клюкину

(72) Автор(ы):

ШИ Лей (US),  
ИОВАНОВИЧ Алекса (US),  
ОСТ Дункан (US)

(73) Патентообладатель(и):

Смит & Невью Ортопедикс АГ (CH)

C 2  
C 3  
C 7  
C 3  
C 7  
C 8  
C 2  
R U

R U  
2 5 8 5 3 7 3  
C 2

## (54) ФЕРМЕНТНАЯ КОМПОЗИЦИЯ И СПОСОБ ОБРАБОТКИ РАН

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине и заключается в безводной композиции для обработки ран, композиция содержит гидрофильную дисперсную фазу, включающую ПЭГ 400 и коллагеназу; и гидрофобную непрерывную фазу, включающую гидрофобную основу; при этом гидрофильная дисперсная фаза диспергирована в гидрофобной непрерывной

фазе; количество ПЭГ 400 составляет 13-27% масс. В вариантах осуществления изобретения используется также ПЭГ 600 или Полоксамер 124 в количестве 20-40% масс. Технический результат заключается в улучшении ферментативной активности композиции. 3 н. и 3 з.п. ф-лы, 9 пр., 13 табл., 10 ил.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) RU<sup>(11)</sup> 2 585 373<sup>(13)</sup> C2

(51) Int. Cl.  
*A61K 38/48* (2006.01)  
*A61K 9/10* (2006.01)  
*A61K 47/30* (2006.01)  
*A61K 47/44* (2006.01)  
*A61P 17/02* (2006.01)  
*C12N 9/00* (2006.01)

## (12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2012126852/15, 08.12.2010

(24) Effective date for property rights:  
08.12.2010

Priority:

(30) Convention priority:  
08.12.2009 US 61/267,730

(43) Application published: 20.01.2014 Bull. № 2

(45) Date of publication: 27.05.2016 Bull. № 15

(85) Commencement of national phase: 09.07.2012

(86) PCT application:  
US 2010/059409 (08.12.2010)

(87) PCT publication:  
WO 2011/071986 (16.06.2011)

Mail address:

119019, Moskva, Gogolevskij bulvar, 11, etazh 3,  
"Goulingz Interneshnl Ink.", V.A. Kljukinu

(72) Inventor(s):

SHI Lei (US),  
JOVANOVIC Aleksa (US),  
AUST Duncan (US)

(73) Proprietor(s):

Smith & Nephew Orthopaedics AG (CH)

R U 2 5 8 5 3 7 3 C 2

## (54) ENZYME COMPOSITION AND METHOD FOR TREATMENT OF WOUNDS

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine and consists in an anhydrous composition for treatment of wounds, composition contains a hydrophilic dispersed phase including PEG 400 and collagenase; and hydrophobic continuous phase, including hydrophobic base; wherein hydrophilic dispersed phase is dispersed

in hydrophobic continuous phase; amount of PEG 400 makes 13-27 wt%. In embodiments of invention PEG 600 or Poloxamer 124 in amount of 20-40 wt% is also used.

EFFECT: technical result consists in improvement of enzymatic activity of composition.

6 cl, 9 ex, 13 tbl, 10 dwg

## ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка заявляет приоритет Предварительной Заявки США №61/267730 от 8 декабря 2009 г. Содержание указанной заявки включено здесь ссылкой.

## ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

### 5 А. Область изобретения

Настоящее изобретение относится в целом к композициям местного применения для обработки ран и методам обработки ран, нуждающихся в санации раневой поверхности.

### Б. Уровень техники

Лечение ран представляет собой сложную процедуру, которая зачастую осложняется

10 присутствием нежизнеспособной некротической ткани в раневой области. Обработка представляет собой процесс удаления из раны нежизнеспособной ткани для предотвращения или уменьшения заражения и облегчения лечения. Ранее для ферментативной обработки ран использовали композиции для местного применения, содержащие протеолитические ферменты, такие как трипсин, папаин, бромелайн,

15 субтилизин, сутилайн и коллагеназа. Обычная стандартная терапия состоит в нанесении композиции на рану, нуждающуюся в обработке, один раз в сутки (однократно каждые 24 часа) или чаще, если композиция загрязняется. Поскольку многие протеолитические ферменты подвержены разложению в композициях на основе воды, многие композиции для обработки ран готовят на безводной гидрофобной основе, такой как вазелин,

20 минеральное и/или растительное масло, как это раскрыто в патентах США 3821364 и США 6479060, которые оба включены здесь ссылкой. Однако ферментные композиции для обработки ран на гидрофобной основе обычно не смешиваются с водной средой раневого ложа, и контакт протеолитического фермента с раневым ложем оказывается затрудненным. Некоторые другие композиции готовят на безводной гидрофильтральной

25 основе, такой как пропиленгликоль или полоксамеры, как это раскрыто в патентах США 6548556, США 2003/0198631 и США 2003/0198632, которые все включены здесь ссылкой.

## СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предметом настоящего изобретения являются ферментные композиции местного

30 применения с повышенной ферментативной активностью для обработки ран. Эти композиции представляют собой дисперсную фазу, содержащую по меньшей мере один протеолитический фермент и по меньшей мере один гидрофильтральный полиол; и непрерывную фазу, содержащую гидрофобное основание. Композиции для обработки ран по данному изобретению обладают повышенной ферментативной активностью по сравнению с композициями для обработки ран предыдущего уровня техники.

35 В одном варианте данного изобретения описана композиция для лечения ран, содержащая дисперсную фазу, включающую жидкий гидрофильтральный полиол и по меньшей мере один протеолитический фермент; и непрерывную фазу, содержащую гидрофобное основание; причем количество жидкого гидрофильтрального полиола составляет

40 ±10 масс. оптимального количества жидкого гидрофильтрального полиола. Например, если оптимальное количество составляет примерно 30 масс.%, то для достижения повышенной ферментативной активности состава количество жидкого гидрофильтрального полиола, которое можно использовать, будет примерно 20-40 масс.% от всего состава.

45 В другом варианте количество жидкого гидрофильтрального полиола составляет ±9%, 8%, 7% или 6 масс.% оптимального количества жидкого гидрофильтрального полиола. В еще одном варианте количество жидкого гидрофильтрального полиола составляет ±5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% или 0.1 масс.% оптимального количества жидкого гидрофильтрального полиола.

«Оптимальное количество жидкого гидрофильтрального полиола» в композиции,

содержащей (а) дисперсную фазу, включающую жидкий гидрофильный полиол и по меньшей мере один протеолитический фермент; и (б) непрерывную фазу, включающую гидрофобное основание, можно определить способом, описанным в параграфе А раздела Подробное описание в данной спецификации, который включен ссылкой в

5 данный раздел.

Способ, позволяющий определить, находится ли композиция в пределах  $\pm 10$  масс.% от оптимального количества жидкого гидрофильного полиола, описан в параграфе В раздела Подробное описание в данной спецификации, который включен ссылкой в

данный раздел.

10 Оптимальное количество жидкого гидрофильного полиола в композициях с различными протеолитическими ферментами, может различаться. Кроме того, оптимальное количество в композициях с конкретным протеолитическим ферментом может различаться в зависимости от компонентов композиции. Например, оптимальное количество жидкого гидрофильного полиола в композиции с коллагеназой, содержащей  
15 ПЭГ-400 и вазелин, может отличаться от оптимального количества жидкого гидрофильного полиола в композиции с коллагеназой, содержащей ПЭГ-600 и вазелин, или отличаться от композиции с коллагеназой, содержащей полоксамер-124 и вазелин.

20 Термин «гидрофильный полиол» означает водорастворимые полярные алифатические спирты по меньшей мере с двумя гидроксильными группами и включает, но не ограничивается этим, полимерные полиолы (например, полиэтиленгликоли и полоксамеры).

Термин «жидкий» в контексте описания «гидрофильного полиола», «полиэтиленгликоля» или «полоксамера» означает, что вещество находится в жидким состоянии при 25°C.

25 Термин «твердый» в контексте описания «гидрофильного полиола», «полиэтиленгликоля» или «полоксамера» означает, что вещество находится в твердом состоянии при 25°C.

В другом варианте настоящего изобретения раскрыт способ обработки раны, нуждающейся в лечении, включающий: нанесение на рану композиции, содержащей  
30 дисперсную фазу, включающую жидкий гидрофильный полиол, по меньшей мере один протеолитический фермент в эффективной лечебной концентрации; и непрерывную фазу, содержащую гидрофобное основание; причем количество жидкого гидрофильного полиола составляет  $\pm 10$  масс.% оптимального количества. В другом варианте количество жидкого гидрофильного полиола составляет  $\pm 9\%$ , 8%, 7% или 6 масс.%  
35 оптимального количества. В еще одном варианте количество жидкого гидрофильного полиола составляет  $\pm 5\%$ , 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% или 0.1 масс.% оптимального количества.

В некоторых вариантах протеолитический фермент представляет собой металлопротеазу, цистеинпротеазу, серинпротеазу или аспартатпептидазу. В целом оптимальное количество гидрофильного полиола в композициях, содержащих  
40 металлопротеазу, цистеинпротеазу или серинпротеазу, составляет примерно от 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39 масс.% до примерно 40 масс.%, или любые численные значения в любом интервале. Оптимальное количество гидрофильного полиола в композициях, содержащих аспартатпептидазу, составляет  
45 примерно от 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67 масс.% до примерно 68 масс.% или любые численные значения в любом интервале. В одном варианте металлопротеаза является коллагеназой. В другом варианте металлопротеаза является коллагеназой, и оптимальное количество

гидрофильного полиола составляет от примерно 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39 масс.% до примерно 40 масс.% или численные значения в любом интервале в этих пределах. В одном варианте металлопротеаза представляет собой термолизин. В другом варианте металлопротеаза представляет собой термолизин, и оптимальное количество гидрофильного полиола составляет от примерно 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38 масс.% до примерно 39 масс.% или численные значения в любом интервале в этих пределах. В одном варианте цистеинпротеаза представляет собой папаин. В другом варианте цистеинпротеаза представляет собой папаин, и оптимальное количество гидрофильного полиола составляет от примерно 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38 масс.% до примерно 39 масс.% или численные значения в любом интервале в этих пределах. В одном варианте серинпротеаза представляет собой трипсин. В другом варианте серинпротеаза представляет собой трипсин, и оптимальное количество гидрофильного полиола составляет от примерно 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23 масс.% до примерно 24 масс.% или численные значения в любом интервале в этих пределах. В одном варианте аспартатпептидаза представляет собой пепсин. В другом варианте аспартатпептидаза представляет собой пепсин, и оптимальное количество гидрофильного полиола составляет от примерно 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67 масс.% до примерно 68 масс.% или численные значения в любом интервале в этих пределах. В некоторых вариантах протеолитический фермент сuspendedирован в дисперсной фазе. В других вариантах протеолитический фермент растворен в дисперсной фазе.

В некоторых вариантах жидкий гидрофильный полиол представляет собой жидкий полиэтиленгликоль или жидкий полоксамер или их смеси.

В некоторых вариантах настоящего изобретения дисперсная фаза может содержать также твердый гидрофильный полиол для физической стабилизации композиции или уменьшения или предотвращения разделения фаз. В некоторых вариантах твердый гидрофильный полиол представляет собой твердый полоксамер или твердый полиэтиленгликоль или их смеси.

В разных вариантах настоящего изобретения гидрофобное основание включает вазелин, минеральное масло или растительное масло или их смеси. В одном варианте основание содержит вазелин. В другом варианте гидрофобное основание содержит растительное масло. В еще одном варианте гидрофобное основание содержит минеральное масло. В следующем варианте гидрофобное основание содержит вазелин и минеральное масло, вазелин и растительное масло, минеральное масло и растительное масло или вазелин, минеральное масло и растительное масло. В еще одном варианте гидрофобное основание содержит растительное масло, которое является касторовым маслом.

В одном варианте композиция является полужидкой. В другом варианте композиция является жидкой. В других вариантах композицией пропитывают прокладку, марлю или губку. В одном варианте композиция является стерильной или безводной или такой и другой.

Композицию можно поместить в любую упаковку для дозирования очистителя раны. Композиции можно упаковать в упаковки многоразовые, с одной дозой или отмеряющие дозы. Неограничивающие примеры включают трубку, бутылку, банку, контейнер с

насосом, контейнер под давлением, мягкую емкость, аэрозольный контейнер, аэрозольный распылительный контейнер, неаэрозольный распылительный контейнер, шприц, пакет или пакетик.

В другом варианте настоящего изобретения описан способ определения оптимального

- 5 количества жидкого гидрофильного полиола для добавки в целевую композицию, содержащую дисперсную фазу, включающую протеолитический фермент, и непрерывную фазу, включающую гидрофобное основание, причем способ включает: (1) получение серии композиций, содержащих дисперсную фазу и непрерывную фазу, причем дисперсная фаза включает также жидкий гидрофильный полиол и каждая композиция
- 10 в серии композиций включает идентичное количество протеолитического фермента и разное количество жидкого гидрофильного полиола; (2) определение ферментативной активности каждой композиции в серии композиций; (3) определение наивысшей точки на графике зависимости ферментативной активности от количества жидкого гидрофильного полиола, содержащегося в каждой композиции в серии композиций,
- 15 причем наивысшая точка на графике коррелирует с оптимальным количеством жидкого гидрофильного полиола, которое добавляют в целевую композицию. В одном варианте ферментативную активность серии композиций можно определить с помощью модели тестирования *in-vitro* искусственного ожогового струпа, как здесь описано.

В следующем варианте настоящего изобретения раскрыт способ повышения

- 20 ферментативной активности целевой композиции, содержащей дисперсную фазу, включающую протеолитический фермент, и непрерывную фазу, включающую гидрофобное основание, включающий: (1) получение серии композиций, содержащих дисперсную фазу и непрерывную фазу, причем дисперсная фаза включает также жидкий гидрофильный полиол, а каждая композиция в серии композиций включает идентичное
- 25 количество протеолитического фермента и разное количество жидкого гидрофильного полиола; (2) определение ферментативной активности каждой композиции в серии композиций; (3) определение наивысшей точки на графике зависимости ферментативной активности от количества жидкого гидрофильного полиола, содержащегося в каждой композиции в серии композиций, причем наивысшая точка на графике коррелирует с
- 30 оптимальным количеством жидкого гидрофильного полиола, которое добавляют в целевую композицию, и (4) добавление  $\pm 10$  масс.% оптимального количества жидкого гидрофильного полиола в целевую композицию, что увеличивает ферментативную активность целевой композиции. В одном варианте ферментативную активность серии композиций можно определить с помощью модели тестирования *in-vitro* искусственного ожогового струпа, как здесь описано.

Количество полиола в серии композиций может варьироваться произвольно или в расчете на выбранное количество. В одном варианте количество полиола в каждой композиции серии композиций может составлять 0%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% или 100% по массе или объему от данной композиции.

Термин «безводный» означает, что композиции содержат менее примерно 5 масс.% или менее примерно 3 масс.% или менее примерно 1 масс.% или менее примерно 0.5

масс.% или менее примерно 0.1 масс.% в расчете на всю композицию или 0% свободной или добавленной воды, не считая воду гидратации, связанную воду или обычный уровень влажности, присущей любому из сырых компонентов композиций.

Если не обозначено иное, приведенные здесь проценты являются массовыми и

<sup>5</sup> относятся ко всему составу композиции.

Использование слов «а» или «ап» в сочетании с термином «включающий» или «содержащий» в формуле и/или описании может означать «один», но также согласуется со значениями «один или несколько», «по меньшей мере один» и «один или более одного».

<sup>10</sup> Во всем тексте заявки термин «примерно» используют для того, чтобы указать, что данное значение включает степень ошибки в устройстве, в котором это значение получено, в способе получения данного значения или в вариациях между оцениваемыми объектами.

<sup>15</sup> Используемые в данном описании и формуле слова «содержащий» (или любые формы слова, такие как «содержат» или «содержит»), «имеющий» (и любые формы, такие как «имеют» и «имеет»), «включающий» (и любые формы слова, такие как «включает» и «включают») или «состоящий» (и любые формы типа «состоит» и «состоят») носят охватывающий или не ограничивающий характер и не исключают дополнительные не указанные элементы или стадии способа.

<sup>20</sup> Термины «обработка», «ингибирование», «предотвращение» или «уменьшение» или любая вариация этих терминов при использовании в формуле и/или описании включают любое измеримое или полное ингибиование для достижения нужного результата.

<sup>25</sup> Термин «эффективный» при использовании в данном описании и/или формуле означает адекватность получению желаемого, ожидаемого или запланированного результата.

Композиции и способы их использования могут «содержать», «составлять»  
<sup>30</sup> исключительно из» или «составлять» из любых компонентов или стадий, раскрытых в описании. По отношению к переходной фразе «состоящий исключительно из» и в одном неограничивающем варианте основные и новые характеристики и способы, раскрытые в данном описании, включают повышенную ферментативную активность композиций.

<sup>35</sup> Другие объекты, особенности и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из последующего подробного описания. Следует понимать, однако, что подробное описание и конкретные примеры, хотя и показывают конкретные варианты изобретения, даны только для иллюстрации, т.к. специалисты в данной области увидят различные изменения и модификации в духе и объеме изобретения.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

<sup>40</sup> ФИГ. 1. График коллагеназной зависимости активности in-vitro (мг/мл) серии композиций с дисперсной фазой, содержащей коллагеназу и ПЭГ-400, диспергированные в гидрофобной фазе, содержащей медицинский вазелин (ось у), от процентного содержания ПЭГ-400 в серии композиций (ось х).

ФИГ. 2. График коллагеназной зависимости активности in-vitro (мг/мл) серии композиций с дисперсной фазой, содержащей коллагеназу и ПЭГ-600, диспергированные в гидрофобной фазе, содержащей медицинский вазелин (ось у), от процентного содержания ПЭГ-600 в серии композиций (ось х).

<sup>45</sup> ФИГ. 3. График коллагеназной зависимости активности in-vitro (мг/мл) серии композиций с дисперсной фазой, содержащей коллагеназу и полоксамер-124, диспергированные в гидрофобной фазе, содержащей медицинский вазелин (ось у), от процентного содержания полоксамира-124 в серии композиций (ось х).

ФИГ. 4. График коллагеназной зависимости активности *in-vitro* (мг/мл) серии композиций с дисперсной фазой, содержащей трипсин и ПЭГ-400, диспергированные в гидрофобной фазе, содержащей медицинский вазелин (ось у), от процентного содержания ПЭГ-400 в серии композиций (ось х).

5 ФИГ. 5. График коллагеназной зависимости активности *in-vitro* (мг/мл) серии композиций с дисперсной фазой, содержащей папаин и ПЭГ-400, диспергированные в гидрофобной фазе, содержащей медицинский вазелин (ось у), от процентного содержания ПЭГ-400 в серии композиций (ось х).

10 ФИГ. 6. График коллагеназной зависимости активности *in-vitro* (мг/мл) серии композиций с дисперсной фазой, содержащей термолизин и ПЭГ-400, диспергированные в гидрофобной фазе, содержащей медицинский вазелин (ось у), от процентного содержания ПЭГ-400 в серии композиций (ось х).

15 ФИГ. 7. График коллагеназной зависимости активности *in-vitro* (мг/мл) серии композиций с дисперсной фазой, содержащей пепсин и ПЭГ-400, диспергированные в гидрофобной фазе, содержащей медицинский вазелин (ось у), от процентного содержания ПЭГ-400 в серии композиций (ось х).

20 ФИГ. 8. График физического высвобождения коллагеназы (мг) в серии композиций с дисперсной фазой, содержащей коллагеназу и ПЭГ-400, диспергированные в гидрофобной фазе, содержащей медицинский вазелин (ось у), от процентного содержания ПЭГ-400 в серии композиций (ось х).

ФИГ. 9. Устойчивость фермента в суспензии ПЭГ в медицинском вазелине по сравнению с кремом на основе эмульсии масло-в-воде.

ФИГ. 10. Эффективность заживления при удалении струпа ожоговой раны свиньи.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

25 Один вариант настоящего изобретения предлагает композиции с повышенной ферментативной активностью для местной ферментативной очистки раны. Эти композиции включают дисперсную фазу, содержащую по меньшей мере один протеолитический фермент и гидрофильный полиол, и непрерывную фазу, содержащую гидрофобное основание. В одном варианте изобретения гидрофильный полиол 30 представляет собой жидкий гидрофильный полиол.

Было установлено, что ферментативная активность (например, в коллагенолизе *in vitro*) композиций по данному изобретению, которые являются суспензиями гидрофильного полиола и протеолитического фермента в гидрофобном основании, не только была выше ферментативной активности композиций ферментов на основе 35 только комбинации протеолитического фермента с гидрофобным основанием (т.е. без гидрофильной фазы типа гидрофильного полиола), но также неожиданно оказалась выше активности композиций ферментов только на основе комбинации протеолитического фермента с гидрофильным основанием (т.е. без гидрофобной фазы, такой как вазелин). Поскольку ферменты активируются в присутствии влаги, можно 40 было ожидать наиболее высокой ферментативной активности у композиций только на основе комбинации протеолитического фермента с гидрофильным основанием, где основание полностью смешивалось с влагой и условия были максимально благоприятными для высвобождения и активации фермента. Однако дисперсная композиция гидрофильной и гидрофобной фаз по настоящему изобретению имели 45 максимальную ферментативную активность, соответствующую оптимальному количеству гидрофильного полиола, которое составляло более 0% и менее 100% гидрофильного полиола в композиции.

Как ожидалось, было установлено, что физическое высвобождение фермента в

композициях на основе только гидрофильного носителя было больше, чем высвобождение фермента в композициях на основе одного только гидрофобного носителя и также больше, чем в композициях по настоящему изобретению. Как видно на ФИГ.8, скорость высвобождения фермента в целом увеличивалась с повышением 5 содержания гидрофильного полиола (ПЭГ-400) достигало максимума при 100%» и минимума при 0%. Однако неожиданным было то, что ферментативная активность была выше у дисперсных композиций по настоящему изобретению (см. ФИГ. 1-7). Таким образом, времененная зависимость ферментативной активности этих дисперсных 10 композиций не коррелирует со скоростью физического высвобождения фермента, как этого можно было бы ожидать.

Композиции по данному изобретению пригодны для обработки раны, нуждающейся в очистке, путем нанесения на рану композиции с дисперсной фазой, содержащей гидрофильный полиол, эффективную для очистки концентрацию по меньшей мере одного протеолитического фермента и непрерывную фазу, содержащую гидрофобное 15 основание, причем количество гидрофильного полиола составляет ±10 масс.% оптимального количества или ±9%, 8%, 7%, или 6 масс.% оптимального количества или ±5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% или 0.1 масс.% оптимального количества гидрофильного полиола.

Эти и другие неограничивающие варианты настоящего изобретения обсуждаются 20 более подробно в следующих разделах.

А. Способ определения оптимального количества жидкого гидрофильного полиола

Для приготовления серии композиций (называемых «Серия композиций») и 25 последующего определения оптимального количества жидкого гидрофильного полиола, который используют в суспензии по настоящему изобретению, применяли следующую методику:

В Серии композиций использовали одиннадцать (11) композиций. Следует отметить, что количество (масс.%) протеолитического фермента в Серии композиций поддерживали постоянным. Приготовление одиннадцати (11) композиций включает следующие стадии:

30 (i) Выбор компонентов (т.е. жидкого гидрофильного полиола, протеолитического фермента и гидрофобного основания), которые надо использовать в Серии композиций, и выбор количества используемого протеолитического фермента. Например, жидкий гидрофильный полиол (например, ПЭГ 400), протеолитический фермент (например, коллагеназа при концентрации 1 масс.%) и гидрофобное основание (например, медицинский вазелин).

35 (ii) Для композиции номер один в Серии композиций используют 0% жидкого гидрофильного полиола, выбранное количество протеолитического фермента и достаточное количество гидрофобного основания до 100%. Например, следуя приведенной выше ссылке на стадию (i), композиция один в Серии композиций 40 содержала бы: 0 масс.% ПЭГ 400, 99 масс.% медицинского вазелина и 1 масс.% коллагеназы.

(iii) Для композиции номер два в Серии композиций используют 10 масс.% жидкого гидрофильного полиола, такое же количество протеолитического фермента и нужное количество гидрофобного основания до 100%. (Следует отметить, что можно 45 использовать твердый гидрофильный полиол для получения жидкого гидрофильного полиола, если это необходимо для получения в композициях из Серии композиций физически устойчивой суспензии).

(iv) Для композиции номер три в Серии композиций используют 20 масс.% жидкого

гидрофильного полиола, такое же количество протеолитического фермента и нужное количество гидрофобного основания до 100%.

(v) Для композиции номер четыре в Серии композиций используют 30 масс.% жидкого гидрофильного полиола, такое же количество протеолитического фермента и нужное количество гидрофобного основания до 100%.

(vi) Для композиции номер пять в Серии композиций используют 40 масс.% жидкого гидрофильного полиола, такое же количество протеолитического фермента и нужное количество гидрофобного основания до 100%.

(vii) Для композиции номер шесть в Серии композиций используют 50 масс.% жидкого гидрофильного полиола, такое же количество протеолитического фермента и нужное количество гидрофобного основания до 100%.

(viii) Для композиции номер семь в Серии композиций используют 60 масс.% жидкого гидрофильного полиола, такое же количество протеолитического фермента и нужное количество гидрофобного основания до 100%.

(ix) Для композиции номер восемь в Серии композиций используют 70 масс.% жидкого гидрофильного полиола, такое же количество протеолитического фермента и нужное количество гидрофобного основания до 100%.

(x) Для композиции номер девять в Серии композиций используют 80 масс.% жидкого гидрофильного полиола, такое же количество протеолитического фермента и нужное количество гидрофобного основания до 100%.

(xi) Для композиции номер десять в Серии композиций используют 90 масс.% жидкого гидрофильного полиола, такое же количество протеолитического фермента и нужное количество гидрофобного основания до 100%.

(xii) Для композиции номер одиннадцать в Серии композиций используют 0% гидрофобного основания, такое же количество протеолитического фермента и нужное количество гидрофильного полиола.

(xiii) Определение ферментативной активности каждой из одиннадцати композиций в Серии композиций с использованием модели тестирования *in vitro* искусственного ожогового струпа в течение следующих периодов времени: 6, 12, 18 и 24 час, как это описано в параграфе Н раздела Подробное описание в данной спецификации.

(ivx) Построение графика зависимости ферментативной активности каждой композиции от соответствующего количества жидкого гидрофильного полиола, присутствующего в каждой композиции из Серии композиций, кумулятивно для каждого периода времени. Наивысшая точка на кривой для кумулятивного 24-часового периода соответствует оптимальному количеству жидкого гидрофильного полиола, которое можно использовать в суспензии.

Кроме того, учитывая, что в Серию композиций можно включать многие компоненты (например, полиол(ы), протеолитический фермент, гидрофобное основание и дополнительные компоненты в дисперсной фазе и/или дополнительные компоненты в непрерывной гидрофобной фазе), можно создать Серию композиций с помощью (1) варьирования количества гидрофильного полиола, как рассмотрено выше для каждой композиции в Серии, (2) использования определенного количества протеолитического фермента и (3) добавления нужного количества до 100% дополнительных компонентов, включая гидрофобное основание; за исключением композиции номер одиннадцать, где нужное количество может быть обеспечено добавлением дополнительных компонентов, включая гидрофильный полиол. В. Способ определения, содержит ли композиция (в пределах  $\pm 10$  масс.%) оптимальное количество жидкого гидрофильного полиола

Можно определить, содержит ли композиция (а) с дисперсной фазой, включающей

жидкий гидрофильный полиол и по меньшей мере один протеолитический фермент; и (b) с непрерывной фазой, содержащей гидрофобное основание (названная «испытуемой композицией»), оптимальное количество (в пределах  $\pm 10\%$ ) жидкого гидрофильного полиола, с применением следующей методики:

5 Стадия один: получение испытуемой композиции, которая включает: (i) дисперсную фазу, содержащую жидкий гидрофильный полиол и протеолитический фермент; и (b) непрерывную фазу, содержащую гидрофобное основание.

Стадия два: приготовление серии композиций (названной «Серия композиций») на основе испытуемой композиции. Следует отметить, что количество (масс.%)

10 протеолитического фермента в Серии композиций поддерживают постоянным и таким же, как его количество (масс.%) в целевой композиции. Для приготовления Серии композиций можно использовать следующие стадии:

(i) Определить количества всех компонентов в испытуемой композиции (масс.%).

(ii) Определить общее количество непрерывной фазы в испытуемой композиции

15 (масс.%). Например, если испытуемая композиция содержит 15 масс.% жидкого гидрофильного полиола (например, ПЭГ 400), 1 масс.% протеолитического фермента (например, коллагеназы) и 84 масс.% гидрофобного основания (например, медицинского вазелина), то испытуемая композиция содержит 84 масс.% непрерывной фазы и 16 масс.% дисперсной фазы.

20 Стадия три: Приготовить Серию композиций так же, как это описано в параграфе А данного описания (например, это включало бы приготовление 11 композиций таким способом, как описано в разделе А данного описания).

Стадия четыре: Определить ферментативную активность каждой из одиннадцати композиций в Серии композиций с использованием модели тестирования *in vitro*

25 искусственного ожогового струпа для каждого из следующих периодов времени: 6, 12, 18 и 24 часа, как описано в параграфе Н подробного описания в данной спецификации.

Стадия пять: Построить график зависимости ферментативной активности каждой композиции от соответствующего количества жидкого гидрофильного полиола, присутствующего в каждой композиции Серии композиций, кумулятивно для каждого

30 периода времени. Наивысшая точка кривой кумулятивного 24-часового накопления соответствует оптимальному количеству жидкого гидрофильного полиола в испытуемой композиции.

Стадия шесть: Сравнить количество жидкого гидрофильного полиола, присутствующего в испытуемой композиции, для выяснения того, составляет ли оно

35 (в пределах  $\pm 10$  масс.%) оптимальное количество жидкого гидрофильного полиола в испытуемой композиции.

### С. Протеолитические ферменты

Для данного изобретения пригоден любой протеолитический фермент, применяемый для очистки ран. Протеолитические ферменты (протеазы) разрушают белок путем

40 гидролиза пептидных связей, которые соединяют аминокислоты в полипептидной цепи белка. Они делятся на четыре основные группы по механизму катализа: серинпротеазы, цистеинпротеазы, металлопротеазы и аспартатпротеазы. Некоторые протеазы были идентифицированы с другими аминокислотами в активном центре, такими как треонин и глутаминовая кислота; однако они не образуют основных групп.

45 1. Серинпротеаза

Серинпротеазы реагируют на гидроксильную группу в остатке серина, действующего как нуклеофил, который атакует пептидную связь. Основные кланы, обнаруженные у человека, включают гидролазы, подобные химотрипсину и субтилизину, а также альфа/

бета-гидролазу и сигнальные пептидазные кланы. В истории эволюции серинпротеазы были первоначально пищеварительными ферментами. У млекопитающих они образуются при дупликации генов и задействованы в механизмах свертывания крови, иммунитета и воспаления. Эти протеазы обладают широкой специфичностью к субстратам и работают в широком диапазоне рН. Неограничивающие примеры серинпротеаз включают трипсин, химотрипсин, субтилизин, сутилайны, плазмин и эластазы.

## 2. Цистеинпротеазы

Пептидазы, в которых нуклеофил, связанный с расщепляемой пептидной связью в

сульфгидрильной группе цистeinового остатка, известны как цистеинпротеазы. Цистеинпротеазы обычно содержатся в фруктах, в том числе папайе, ананасах и киви. Цистеинпротеазы обладают широкой специфичностью и широко используются в физиологических условиях. Для очистки ран в течение длительного времени из этого семейства широко используют папаин. Другие цистеинпротеазы, такие как бромелайн и аналаин, также были изучены на предмет использования для очистки ран. Другие неограничивающие примеры цистеинпротеаз включают калпаин, каспазы, химопапаин и клостропапаин.

## 3. Металлопротеазы

Металлопротеазы входят в число протеаз, в которых в нуклеофильной атаке на

пептидную связь участвует молекула воды, в то время как катион двухвалентного металла, обычно цинка, но иногда кобальта, марганца, никеля или меди, активирует молекулу воды. Ионы металла чрезвычайно важны для активности. Любые соединения, способные взаимодействовать с ионом металла путем хелатирования или окисления, будут влиять на ферментативную активность. Неограничивающие примеры металлопротеаз в этом семействе включают термолизин, коллагеназы, матричные металлопротеиназы (MMPs), бациллолизин, диспазу, вибриолизин, псевдолизин, стромелизин и различные нейтральные металлопротеазы, выделенные из бактерий.

## 4. Аспартатпептидазы

Аспартатпептидазы названы так потому, что остатки аспарагиновой кислоты

являются лигандами активированной молекулы воды. В большинстве ферментов этого семейства пары остатков аспарагиновой кислоты действуют вместе для связывания и активации каталитически активных молекул воды. Все или большинство аспартатпептидаз являются эндопептидазами. Большинство аспартатпептидаз обладают широкой специфичностью. Однако оптимальное значение рН для большей части аспартатпептидаз находится в кислотном диапазоне. Неограничивающие примеры аспартатпептидаз включают пепсин, химосин, бета-секретазу, плазмепсин, кислотные пептидазы растений и ретровирусные протеазы.

## 5. Коллагеназа

Протеолитическим ферментом, пригодным для очистки ран, является

металлопротеаза коллагеназа. Коллагеназа может быть практически чистой или может содержать определяемые концентрации других протеаз.

Анализ возможностей коллагеназы и значение использованного здесь термина «единица коллагеназы» основаны на переваривании неденатурированного коллагена из сухожилий быка при рН 7.2 и 37°C в течение 24 час. Число расщепленных пептидных связей определяют по реакции с нингидрином. Вычитают число аминогрупп, выделившихся под контролем переваривания в присутствии трипсина. Одна единица коллагеназы солюбилизирует реактив нингидрин, эквивалентный 1 наномолю лейцинового эквивалента в минуту.

Количество (эффективность или концентрация) коллагеназы в композициях по настоящему изобретению соответствует эффективной концентрации для очистки раны. Обычно эффективность коллагеназы в композициях может варьироваться примерно от 1 до примерно 10000 единиц коллагеназы на грамм продукта в расчете на активность коллагеназы в продукте. В разных вариантах эффективность, выраженная в единицах коллагеназы на грамм продукта, составляет примерно от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500 до примерно 10000, или любого интервала или численных значений в его пределах.

Концентрация коллагеназы в композициях может варьироваться примерно от 0.001 масс.% до примерно 8 масс.%. В разных вариантах концентрация, выраженная в массовых процентах, составляет примерно от 0.001, 0.002, 0.003, 0.004, 0.005, 0.006, 0.007, 0.008, 0.009, 0.010, 0.015, 0.020, 0.025, 0.030, 0.035, 0.040, 0.050, 0.055, 0.060, 0.065, 0.070, 0.075, 0.080, 0.085, 0.090, 0.095, 0.100, 0.125, 0.150, 0.175, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45, 0.50, 0.55, 0.60, 0.65, 0.70, 0.75, 0.80, 0.85, 0.90, 0.95, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 до примерно 8 или любого интервала или численных значений в его пределах.

В одном варианте коллагеназу получают из *Clostridium histolyticum*; однако в других вариантах коллагеназу можно получать из других источников. Способы получения подходящей коллагеназы раскрыты в патентах США 3705083; 3821364; 5422261; 5332503; 5422103; 5514370; 5851522; 5718897 и 6146626, которые все включены ссылками.

## 6. Трипсин

Другим протеолитическим ферментом, пригодным для очистки ран, является серинпротеаза трипсин. Обычно трипсин получают из поджелудочной железы здоровых быков или свиней или обоих животных. Кроме того, трипсин можно получить из рекомбинантных источников. Трипсин фармацевтической чистоты (USP/NF) известен как кристаллизованный трипсин. Он содержит не менее 2500 USP единиц трипсина на мг, рассчитанных на сухую основу, и не менее 90.0% и не более 110.0% номинальной активности. Оценка эффективности трипсина, так же как определение USP единиц трипсина, содержится в Монографии кристаллизованного трипсина USP 31 (официально 1 августа 2008), включенной здесь ссылкой.

Количество (эффективность или концентрация) трипсина в композициях по настоящему изобретению соответствуют эффективной концентрации для очистки ран. Обычно эффективность трипсина в композициях может варьироваться примерно от 90 до примерно 60000 USP единиц трипсина на грамм продукта. В разных вариантах эффективность трипсина, выраженная в USP единицах трипсина на грамм продукта, составляет примерно от 90, 100, 150, 200, 250, 300, 320, 350, 375, 400, 500, 600, 675, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000 до примерно 60000 или любого интервала или численных значений в этих пределах.

Концентрацию трипсина в композициях обычно можно варьировать от примерно 0.0025 масс.% до примерно 1 масс.%. В разных вариантах концентрация трипсина, выраженная в массовых процентах, составляет примерно от 0.0025, 0.0050, 0.010, 0.015, 0.020, 0.025, 0.030, 0.035, 0.040, 0.045, 0.050, 0.055, 0.060, 0.065, 0.070, 0.075, 0.080, 0.085, 0.090, 0.095, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45, 0.50, 0.55, 0.60, 0.65, 0.70, 0.75, 0.80, 0.85, 0.90, 0.95 до примерно 1 или любого интервала или численных значений в этих пределах.

## Д. Гидрофильные полиолы

Гидрофильные полиолы по настоящему изобретению - это водорастворимые полярные алифатические спирты по меньшей мере с двумя гидроксильными группами, и они включают полимерные полиолы, например, полиэтиленгликоли и полоксамеры. В одном варианте изобретения гидрофильный полиол в дисперсной фазе представляет собой жидккий гидрофильный полиол. В некоторых вариантах жидкый гидрофильный полиол является жидким полиэтиленгликолем или жидким полоксамером или их смесью. Твердые гидрофильные полиолы, такие как твердые полиэтиленгликоли или твердые полоксамеры, можно также добавлять в дисперсную фазу по данному изобретению для физической стабилизации суспензии. Другие примеры жидких гидрофильных полиолов включают, но не ограничиваются этим, пропиленгликоль, бутиленгликоль, пентиленгликоль, гексиленгликоль, глицерин, гексиленгликоль, метоксиполиэтиленгликоль, пропиленкарбонат и этоксидигликоль, и их можно также добавлять в дисперсную фазу.

#### 1. Полиэтиленгликоли

Полиэтиленгликоли представляют собой гомополимеры этиленгликоля и воды, которые можно представить формулой:



в которой  $n$  представляет среднее число оксиэтilenовых групп. Полиэтиленгликоли могут быть либо жидкими, либо твердыми при 25°C в зависимости от их молекулярной 20 массы.

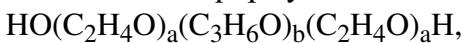
Следующие подходящие неограничивающие примеры жидких полиэтиленгликолей описаны с использованием USP номенклатуры: полиэтиленгликоль 200, полиэтиленгликоль 300, полиэтиленгликоль 400, полиэтиленгликоль 500 и 600.

Следующие подходящие неограничивающие примеры твердых полиэтиленгликолей 25 описаны с использованием USP номенклатуры: полиэтиленгликоль 700, полиэтиленгликоль 800, polyethylene полиэтиленгликоль 900, полиэтиленгликоль 1000, полиэтиленгликоль 1100, полиэтиленгликоль 1200, полиэтиленгликоль 1300, полиэтиленгликоль 1400, полиэтиленгликоль 1450, полиэтиленгликоль 1500, полиэтиленгликоль 1600, полиэтиленгликоль 1700, полиэтиленгликоль 1800, 30 полиэтиленгликоль 1900, полиэтиленгликоль 2000, полиэтиленгликоль 2100, полиэтиленгликоль 2200, полиэтиленгликоль 2300, полиэтиленгликоль 2400, полиэтиленгликоль 2500, полиэтиленгликоль 2600, полиэтиленгликоль 2700, полиэтиленгликоль 2800, полиэтиленгликоль 2900, полиэтиленгликоль 3000, полиэтиленгликоль 3250, полиэтиленгликоль 3350, полиэтиленгликоль 3750, 35 полиэтиленгликоль 4000, полиэтиленгликоль 4250, полиэтиленгликоль 4500, полиэтиленгликоль 4750, полиэтиленгликоль 5000, полиэтиленгликоль 5500, полиэтиленгликоль 6000, полиэтиленгликоль 6500, полиэтиленгликоль 7000, полиэтиленгликоль 7500 и полиэтиленгликоль 8000.

Жидкие и твердые полиэтиленгликоли выпускают DOW Chemical Company под 40 торговой маркой CARBOWAX™ и BASF Corporation под марками LUTROL® E и PLURACAPvE® E. В данном изобретении пригодны полиэтиленгликоли как фармацевтической чистоты (USP/NF), так и косметические.

#### 2. Полоксамеры

Полоксамеры представляют собой синтетические блок-сополимеры этиленоксида, представленные формулой::



в которой  $a$  и  $b$  представляют число повторяющихся единиц. Обычно  $a$  составляет

от 2 до 150 и в от 15 до 70 в зависимости от конкретного полоксамера. Полоксамеры могут быть либо жидкими, либо твердыми при 25°C в зависимости от их молекулярной массы.

Следующие подходящие неограничивающие примеры жидких полоксамеров описаны

<sup>5</sup> с использованием номенклатуры CTFA/iNCI: полоксамер 101, полоксамер 105, полоксамер 122, полоксамер 123, полоксамер 124, полоксамер 181, полоксамер 182, полоксамер 183, полоксамер 184, полоксамер 212, полоксамер 231, полоксамер 282, полоксамер 331, полоксамер 401 и полоксамер 402.

Следующие подходящие неограничивающие примеры твердых полоксамеров описаны

<sup>10</sup> с использованием номенклатуры CTFA/INCI: полоксамер 108, полоксамер 188, полоксамер 217, полоксамер 237, полоксамер 238, полоксамер 288, полоксамер 338, полоксамер 407, полоксамер 185, полоксамер 215, полоксамер 234, полоксамер 235, полоксамер 284, полоксамер 333, полоксамер 334, полоксамер 335 и полоксамер 403.

Жидкие и твердые полоксамеры выпускают BASF Corporation под торговыми марками

<sup>15</sup> PLURONIC® и LUTROL® и UNIQEMA Corporation под торговой маркой SYNPERONIC®. Фармацевтическую чистоту (USP/NF) имеют полоксамер 124, полоксамер 188, полоксамер 237, полоксамер 338 и полоксамер 407. В данном изобретении пригодны полоксамеры как фармацевтической чистоты (USP/NF), так и косметической чистоты.

#### E. Гидрофобные основания

<sup>20</sup> Гидрофобные основания по настоящему изобретению могут включать, но не ограничиваются этим, растительные, животные, парафиновые и синтетические жиры, масла, сало, воски, растворители и масла; минеральные масла, растительные масла, вазелин, не растворимые в воде органические сложные эфиры и триглицериды, силиконы или фторированные соединения или их смеси. В одном варианте настоящего изобретения гидрофобное основание является вазелином.

<sup>25</sup> Вещества растительного происхождения включают, но не ограничиваются этим, арахисовое масло, масло бальзам Перу, карнаубский воск, кадилльский воск, касторовое масло, гидрированное касторовое масло, масло какао, кокосовое масло, кукурузное масло, хлопковое масло, масло жожоба, масло семян макадамии, оливковое масло, апельсиновое масло, апельсиновый воск, масло из пальмовых косточек, рапсовое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, жир масляного дерева, соевое масло, подсолнечное масло, масло чайного дерева, растительное масло и гидрированное растительное масло.

<sup>30</sup> Неограничивающие примеры веществ животного происхождения включают пчелиный воск, масло печени трески, жир эму, свиной жир, норковый жир, масло печени акулы, сквалан, сквален и топленое сало.

<sup>35</sup> Неограничивающие примеры парафиновых веществ включают изопарафин, микрокристаллический воск, тяжелое минеральное масло, легкое минеральное масло, озокерит, вазелин и парафин.

<sup>40</sup> Подходящие неограничивающие примеры органических сложных эфиров и триглицеридов включают алкил-C12-15 бензоаты, изопропилмиристат, изопропилпальмитат, триглицериды со средней алкильной цепью, трилаурин и тригидрокистеарин.

<sup>45</sup> Неограничивающие примеры силиконов включают диметикон и циклометикон. Неограничивающим примером фторированных соединений является политетрафторэтилен (PTFE).

#### 1. Вазелин

Вазелин является очищенной смесью полужидких углеводородов, полученных из

нефти, и его цвет варьируется от темно-янтарного до светло-желтого. Медицинский вазелин является полностью или почти обесцвеченным вазелином, и его окраска находится в пределах от кремового до снежно-белого. Вазелин и медицинский вазелин могут также отличаться температурой плавления, вязкостью и консистенцией.

5 В промышленности разные марки вазелина различной чистоты выпускает PENRECO Corporation под торговыми марками: PENRECO<sup>®</sup>ULTIMA, PENRECO<sup>®</sup>SUPER, PENRECO<sup>®</sup> SNOW, PENRECO<sup>®</sup>REGENT, PENRECO<sup>®</sup>LILY, PENRECO<sup>®</sup>CREAM, PENRECO<sup>®</sup>ROYAL, PENRECO<sup>®</sup>BLOND и PENRECO<sup>®</sup>AMBER. Разные марки выпускает также SONNEBORN  
10 Corporation под торговыми марками: ALBA<sup>®</sup>, SUPER WHITE PROTOPET<sup>®</sup>, SUPER WHITE FONOLINE<sup>®</sup>, WHITE PROTOPET 1S<sup>®</sup>, WHITE PROTOPET 2L<sup>®</sup>, WHITE PROTOPET 3C<sup>®</sup>, WHITE FONOLINE<sup>®</sup>, PERFECTA<sup>®</sup>, YELLOW PROTOPET 2A<sup>®</sup>, YELLOW FONOLINE<sup>®</sup>, PROTOLINE<sup>®</sup>, SONOJELL #4<sup>®</sup>, SONOJELL #9<sup>®</sup>, MINERAL JELLY #10<sup>®</sup>, MINERAL JELLY  
15 #14<sup>®</sup>, MINERAL JELLY #17<sup>®</sup> и CARNATION TROUGH GREASE<sup>®</sup>.

Вазелин и медицинский вазелин выпускают косметической и фармацевтической (USP/NF) чистоты и оба они пригодны для целей настоящего изобретения. F. Композиции для местного применения

20 Композиции для местного применения по настоящему изобретению являются суспензиями, содержащими гидрофильную дисперсную фазу в гидрофобной непрерывной фазе. Дисперсная фаза включает протеолитический фермент и гидрофильный полиол. В одном варианте изобретения гидрофильный полиол является жидким гидрофильным полиолом. В некоторых вариантах жидкый гидрофильный полиол является жидким полиэтиленгликолем или жидким полоксамером или их смесями. Непрерывная фаза  
25 содержит гидрофобное основание. Гидрофобное основание может быть вазелином. Эти композиции используют для обработки ран и их очистки.

Композиции могут быть безводными, как здесь описано. Композиции могут быть полужидкими или жидкими. Композициями можно пропитать прокладку, марлю или губку. Композиции могут также быть стерильными.

30 Композиции могут включать дополнительные вещества, известные в данной области, которые пригодны для композиций местного применения такой природы, например, поглотители, дезодоранты, поверхностно-активные вещества, растворители, модификаторы реологии, пленкообразователи, стабилизаторы, умягчители, увлажнители, консерванты, антибактериальные вещества, антиоксиданты, хелатирующие реагенты, 35 отдушки и красители.

Композиции могут также включать дополнительные фармацевтически активные компоненты, известные в данной области, которые пригодны для местных композиций данной природы, например, противомикробные реагенты, реагенты для заживления раны, анестетики, лекарственные травы и гемостатики. Неограничивающим примером лекарственной травы является бальзам Перу.

40 Композиции можно упаковать в любую тару, пригодную для нанесения очистителя раны. Композиции можно упаковать в многоразовую, однодозовую или отмеривающую дозу упаковку. Неограничивающие примеры включают трубку, бутылку, банку, контейнер с насосом, контейнер под давлением, мягкий контейнер, аэрозольный контейнер, аэрозольный распылительный контейнер, неаэрозольный распылительный контейнер, шприц, пакет или пакетик. G. Способ приготовления

Композиции по настоящему изобретению можно приготовить по методикам и способам, известными специалистам в данной области, путем растворения или

суспенсирования протеолитического фермента в части имеющегося гидрофильного полиола или во всем полноле. Полученный раствор или супензию можно смешать с гидрофобным основанием с образованием супензии, в которой гидрофобное основание становится непрерывной фазой, а фаза гидрофильного полиола/фермента становится дисперсной фазой. Эти композиции можно приготовить на оборудовании, известном специалистам в данной области, например, с помощью смесителей, миксеров, мельниц, гомогенизаторов, диспергаторов, устройств для растворения и т.п.Н. Модель тестирования *in vitro* искусственного ожогового струпа

Повышение ферментативной активности композиций наблюдали при тестировании

- 10 композиций *in vitro* с использованием модели искусственного ожогового струпа, как описано ниже и в публикации "Study on the debridement efficacy of formulated enzymatic wound debriding agents by *in vitro* assessment using artificial wound eschar and by an *in vivo* pig model", Shi et. al, Wound Repair Reen. 2009, 17(6):853, включенной здесь ссылкой. Для создания субстрата искусственного раневого струпа (AWE) использовали бычий
- 15 коллаген (типа I), бычий фибриноген и эластин. Сырьем для получения субстрата AWE служили FITC-меченный коллаген, эластин-родамин и фибрин-кумарин. Для приготовления 1 г субстрата AWE взвесили 650 мг FITC-меченого коллагена и по 100 мг каждого из препаратов эластин-родамина и фибрин-кумарина в 50 мл пробирке и гомогенизировали в 10 мл Tris-буферного солевого раствора. В отдельной пробирке
- 20 приготовили 10 мл раствора фибриногена в 15 мг/мл Tris-буферного солевого раствора. Два раствора объединили и тщательно перемешали. Добавили раствор тромбина (0.25 мл при 50 U/мл), быстро перемешали и вылили раствор в чашку Петри, в которую был помещен 90 мм нереакционноспособный мембранный фильтр. В результате индуцированной тромбином полимеризации фибриногена вещество начинило
- 25 формировать мягкий пласт поверх мембранных фильтров путем свертывания окрашенных белков в твердой матрице. Субстрату AWE после свертывания дали затвердеть в течение 30 мин и затем промыли водой в течение 15 мин для удаления тромбина. Затем из субстрата AWE удалили воду до содержания влаги 75%.

Из субстрата AWE, прикрепленного к мемbrane, с помощью дырокола отделили

- 30 кусочек диаметром 35 мм. Кусочек субстрата AWE поместили на верхнюю плоскую поверхность системы Franz Diffusion Cell System (Hanson Research, Chatsworth, CA) и сверху поместили держатель образца из TEFLON®. Образцы очищающей мази наносили в центр держателя образца и избыток удаляли соскабливанием. Раствор в рецепторных клетках представлял собой Tris-буферный раствор при pH 7.4 в случае образцов,
- 35 содержащих коллагеназу, папаин, термолизин или трипсин; и натрий-ацетатный буфер с pH 2 для образцов, содержащих пепсин. Пробы по 1 мл раствора в рецепторных клетках отбирали в такой последовательности: через 0, 1, 2, 3, 6, 12, 18 и 24 час. После этого образцы анализировали методом флуоресценции красителя FITC при 485 нм (длина волны возбуждения) и 520 нм (длина волны эмиссии) для определения
- 40 переваривания коллагена (коллагенолиза), выраженного в мг/мл.

#### I. Тест *in-vitro* на физическое высвобождение фермента

- Высвобождение фермента из композиций определяли методом Franz cell diffusion study с использованием фильтров PVDF (0.45 мкм). Определение проводили при 35°C в течение 6 час. С образцами раствора в клетках рецептора проводили полный белковый
- 45 анализ.

Концентрацию белка определяли методом ВСА (Peirce) с использованием в качестве эталона той же коллагеназы. Подробности можно описать следующим образом.

ВСА-анализ белка объединяет хорошо известное восстановление Cu<sub>2+</sub> до Cu<sub>1+</sub> белком

в щелочной среде при высокочувствительном и селективном колориметрическом определении катиона одновалентной меди ( $\text{Cu}_{1+}$ ) с помощью бицинхониновой кислоты.

Первая стадия представляет собой образование хелата меди с белком в щелочной среде с образованием окрашенного в голубой цвет комплекса. В этой реакции, известной как биуретовая реакция, пептиды, содержащие три или более остатков аминогрупп, образуют в щелочной среде окрашенный хелатный комплекс с ионами меди, содержащий тартрат натрия-калия. Она известна как биуретовая реакция, т.к. аналогичный комплекс образуется из органического соединения биурета ( $\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$ ) и иона меди.

Биурет, образующийся из избытка мочевины при нагревании, реагирует с медью и образует светло-голубой тетрадентатный комплекс. На следующей стадии цветной реакции ВСА, реагент для высокочувствительного и селективного колориметрического детектирования, реагирует с катионом одновалентной меди ( $\text{Cu}^{1+}$ ), который образуется на стадии 1. Фиолетовый продукт реакции образуется при образовании хелатного комплекса из двух молекул ВСА с одним катионом одновалентной меди. Комплекс ВСА/медь растворяется в воде и сильно поглощает при 562 нм при увеличении концентрации белка. Фиолетовая окраска может быть определена на любой длине волны между 550 нм и 570 нм при минимальной (менее 10%) потере сигнала. См. следующую работу, включенную ссылкой: Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150, 76-85.

### ПРИМЕРЫ

Следующие примеры включены для демонстрации некоторых неограничивающих вариантов изобретения. Для специалистов в данной области важно знать, что в примерах раскрыты методики, которые, как установили заявители, хорошо себя зарекомендовали в практике данного изобретения. Однако специалисты в данной области должны понимать в свете настоящего описания, что в конкретные раскрытое варианты можно вносить много изменений и получить подобные или аналогичные результаты, не отклоняясь от духа и объема изобретения.

#### Пример 1: Суспензии коллагеназы/ПЭГ 400 в вазелине

Суспензии в ТАБЛИЦЕ 1 приготовили с разными концентрациями полиэтиленгликоля 400 (ПЭГ-400) в вазелине.

ТАБЛИЦА 1

Суспензия	ПЭГ 400 масс.%	ПЭГ-1450 масс.%	Медицинский вазелин масс.%	Полоксамер 407 масс.%	Коллагеназа масс.%
A	0	0	99.8	0	0.2
B	10	0	89.8	0	0.2
C	15	0	84.8	0	0.2
D	20	0	79.9	0.4	0.9 0.2
E	30	0	69	0.9	0.2
F	50	0	49.3	1.2	0.2
G	68	0	29.8	2.0	0.2
H*	83	12.5	4.5	0	0.2
I*	70	29.8	0	0	0.2

\*ПЭГ-1450 добавили к ПЭГ-400 с образованием полужидкой композиции с суммарно концентрацией ПЭГ примерно 96% и 100% соответственно.

Ферментативную очищающую активность каждой суспензии определяли с помощью описанной выше модели *in-vitro* искусственного ожогового струпа, и результаты показаны на ФИГ.1. Как видно из результатов на ФИГ.1, оптимальное количество

ПЭГ-400 рассчитанное из 24-часовой кривой, составляет примерно 20 масс.% ПЭГ-400.

Пример 2: Суспензии коллагеназа/ПЭГ 600 в вазелине

Суспензии в ТАБЛИЦЕ 2 приготовили с разными концентрациями полиэтиленгликоля 600 (ПЭГ-600) в вазелине.

5

ТАБЛИЦА 2				
Суспензия	ПЭГ-600 масс.%	Медицинский вазелин масс.%	Полоксамер 407 масс.%	Коллагеназа масс.%
J	0	99.8	0	0.2
K	10	89.525	0.275	0.2
L	20	79.248	0.552	0.2
M	30	68.973	0.827	0.2
N	50	48.42	1.38	0.2
O	80	17.59	2.21	0.2
P	97	0	2.8	0.2

Ферментативную очищающую активность каждой суспензии определяли с помощью описанной выше модели *in-vitro* искусственного ожогового струпа. Результаты показаны на ФИГ.2. Как видно из результатов на ФИГ.2, оптимальное количество ПЭГ-600, рассчитанное из 24-часовой кривой, составляет примерно 30 масс.% ПЭГ-600.

Пример 3: Суспензии коллагеназа/полоксамер 124 в вазелине

Суспензии в ТАБЛИЦЕ 3 приготовили с различными концентрациями полоксамиера 124 в вазелине.

20

ТАБЛИЦА 3				
Суспензия	Полоксамер 124 масс.%	Медицинский вазелин масс.%	Полоксамер 407 масс.%	Коллагеназа масс.%
Q	0	99.8	0	0.2
R	10	89.8	0	0.2
S	20	79.8	0	0.2
T	30	69.8	0	0.2
И	50	48.14	1.66	0.2
V	80	17.14	2.66	0.2
W	85*	0	15	0.2

30

Ферментативную очищающую активность каждой суспензии определяли с помощью описанной выше модели *in-vitro* искусственного ожогового струпа. Результаты показаны на ФИГ.3. Как видно из результатов на ФИГ.3, оптимальное количество полоксамиера 124, рассчитанное из 24-часовой кривой, составляет примерно 30 масс.% полоксамиера 124.

35

Пример 4: Суспензии трипсин/ПЭГ 400 в вазелине

Суспензии в ТАБЛИЦЕ 4 приготовили с разными концентрациями полиэтиленгликоля 400 (ПЭГ-400) в вазелине.

40

ТАБЛИЦА 4					
Суспензия	ПЭГ 400 масс.%	ПЭГ 1450 масс.%	Медицинский вазелин масс.%	Полоксамер 407 масс.%	Трипсин масс.%
X	0	0	99.8	0	0.2
Y	14	0	84.9	0.4	0.2
Z	29	0	69.8	0.9	0.2
AA	59	0	39.16	1.64	0.2
BB	80	0	17.06	2.74	0.2
CC	82*	15.2	0	2.6	0.2

\*ПЭГ-1450 добавили к ПЭГ-400 с образованием полужидкого вещества с суммарной концентрацией ПЭГ примерно 97%.

Ферментативную очищающую активность каждой суспензии определяли с помощью

описанной выше модели *in-vitro* искусственного ожогового струпа. Результаты показаны на ФИГ.4. Как видно из результатов на ФИГ.4, оптимальное количество ПЭГ-400, рассчитанное из 24-часовой кривой, составляет примерно 14 масс.% ПЭГ-400.

**Пример 5: Суспензии папаин/ПЭГ 400 в вазелине**

Суспензии в ТАБЛИЦЕ 5 приготовили с разными концентрациями полиэтиленгликоля 400 (ПЭГ-400) в вазелине.

ТАБЛИЦА 5					
Суспензия	ПЭГ 400 масс.%	ПЭГ 1450 масс.%	Медицинский вазелин масс.%	Полоксамер 407 масс.%	Папаин масс.%
DD	0	0	99.85	0	0.15
EE	15	0	85.05	0.4	0.15
FF	29	0	69.82	0.83	0.15
GG	43	0	54.85	1.24	0.15
HH	59	0	39.694	1.636	0.15
II	82*	15.01	0	2.67	0.15

\*ПЭГ-1450 добавили к ПЭГ-400 с образованием полужидкого вещества с суммарной концентрацией ПЭГ примерно 97%.

Ферментативную очищающую активность каждой суспензии определяли с помощью описанной выше модели *in-vitro* искусственного ожогового струпа. Результаты показаны на ФИГ.5. Как видно из результатов на ФИГ.5, оптимальное количество ПЭГ-400, рассчитанное из 24-часовой кривой, составляет примерно 14 масс.% ПЭГ-400.

**Пример 6: Суспензии термолизин/ПЭГ 400 в вазелине**

Суспензии в ТАБЛИЦЕ 6 приготовили с разными концентрациями полиэтиленгликоля 400 (ПЭГ-400) в вазелине.

ТАБЛИЦА 6					
Суспензия	ПЭГ 400 масс.%	ПЭГ 1450 масс.%	Медицинский вазелин масс.%	Полоксамер 407 масс.%	Термолизин масс.%
JJ	0	0	99.85	0	0.15
KK	14	0	85.05	0.4	0.15
LL	29	0	69.82	0.83	0.15
MM	59	0	39.694	1.636	0.15
NN	82*	15.01	0	2.67	0.15

\*ПЭГ-1450 добавили к ПЭГ-400 с образованием полужидкого вещества с суммарной концентрацией ПЭГ примерно 97%.

Ферментативную очищающую активность каждой суспензии определяли с помощью описанной выше модели *in-vitro* искусственного ожогового струпа. Результаты показаны на ФИГ.6. Как видно из результатов на ФИГ.6, оптимальное количество ПЭГ-400, рассчитанное из 24-часовой кривой, составляет примерно 14 масс.% ПЭГ-400.

**Пример 7: Суспензии пепсин/ПЭГ 400 в вазелине**

Суспензии в ТАБЛИЦЕ 7 приготовили с разными концентрациями полиэтиленгликоля 400 (ПЭГ-400) в вазелине.

ТАБЛИЦА 7					
Суспензия	ПЭГ 400 масс.%	ПЭГ 1450 масс.%	Медицинский вазелин масс.%	Полоксамер 407 масс.%	Пепсин масс.%
OO	0	0	99	0	
PP	15	0	84.2	0.4	1
QQ	29	0	68.97	0.83	1
RR	44	0	54.005	1.24	1
SS	58	0	38.844	1.636	1
TT	81*	15.01	0	2.67	1

\*ПЭГ-1450 добавили к ПЭГ-400 с образованием полужидкого вещества с суммарной концентрацией ПЭГ примерно 96%.

Ферментативную очищающую активность каждой суспензии определяли с помощью

описанной выше модели *in-vitro* искусственного ожогового струпа. Результаты показаны на ФИГ.7. Как видно из результатов на ФИГ.7, оптимальное количество ПЭГ-400, рассчитанное из 24-часовой кривой, составляет примерно 58 масс.% ПЭГ-400.

Пример 8: Суспензии коллагеназа/ПЭГ 400 в вазелине для физического выделения 5 фермента

Суспензии в ТАБЛИЦЕ 8 приготовили с разными концентрациями полиэтиленгликоля 400 (ПЭГ-400) в вазелине.

ТАБЛИЦА 8					
	Суспензия	ПЭГ 400 масс.%	ПЭГ 1450 масс.%	Медицинский вазелин масс.%	Коллагеназа масс.%
10	UU	0	0	99.8	0.2
VV	5	0		94.8	0.2
WW	10	0		89.8	0.2
XX	15	0		84.8	0.2
YY	83*	12.5		4.5	0.2
ZZ	70*	29.8		0	0.2

\*ПЭГ-1450 добавили к ПЭГ-400 с образованием полужидкого вещества с суммарной концентрацией ПЭГ примерно 83% и 100% соответственно.

Физическое высвобождение фермента определяли с помощью теста *in-vitro* на физическое высвобождение фермента, как описано выше. Результаты показаны на ФИГ.8. Как видно из результатов ФИГ.8, физическое высвобождение коллагеназы в 20 целом увеличивается по мере увеличения концентрации ПЭГ-400 в суспензии и достигает наиболее высокого уровня высвобождения при 100% и наиболее низкого уровня высвобождения при 0% ПЭГ-400.

Как видно из приведенных результатов, динамика физического высвобождения фермента в суспензиях в зависимости от возрастающей концентрации гидрофильного 25 полиола не коррелирует с динамикой ферментативной активности фермента в зависимости от увеличивающейся концентрации гидрофильного полиола.

Пример 9: Данные по стабильности и эффективности

На ФИГ.9 показаны данные по сравнению стабильности коллагеназы в суспензии по настоящему изобретению («30% ПЭГ в WP суспензии») и эмульсии масло-в-воде 30 («крем на водной основе»). Эти данные предполагают, что коллагеназа была более стабильна в суспензии 30% ПЭГ в WP по сравнению с кремом на водной основе. В таблицах 9-10 приведены составы суспензии 30% ПЭГ в WP и крема на водной основе.

ТАБЛИЦА 9 (30% ПЭГ в водостойкой суспензии)*	
Компоненты	Масс.%
ПЭГ-600	30.059774
Полоксамер-407	1.5078044
Медицинский вазелин	68.309516
Коллагеназа	0.1228163
ВСЕГО	100

\*ПЭГ в WP суспензии готовили следующим образом: (A) Активная фаза: (1) 9.71 г ПЭГ-600 и 0.2361 г коллагеназы смешивали в течение 20 мин при комнатной температуре (20-25°C) в течении 45 мин. (B) Основная фаза: (1) 102.784 г медицинского вазелина, 37.65 г ПЭГ-600 и 2.27 г полоксамира-407 смешали при 70°C до однородности; (2) смесь охладили до 40-45°C. Добавили 7,79 г активной фазы к основной фазе, затем перемешивали 30 мин или до получения гомогенной смеси.

ТАБЛИЦА 10 (Крем на водной основе)*	
Компоненты	масс.%
Изопропилмиристат	30.57437
Эмульгирующий воск	4.502116
Медицинский вазелин	20.369574
Incroquat TMS	4.502116

Вода	20.009404
Глицерин (96%)	19.839324
Коллагеназа	0.2030955
ВСЕГО	100

\*Крем на водной основе готовили следующим образом: (А) Активная фаза: (1) 0.2 г коллагеназы смешали с 20 г деионизированной воды. (В) Основная фаза: (1) 20.36 г медицинского вазелина смешали с 4.5 г эмульгирующего воска, 4.5 г Incroquat TMS и 19.83 г глицерина (96%) при 70°C до однородности; (2) смесь охладили до 35-40°C. Добавили активную фазу к основной фазе, затем перемешивали 30 мин или до получения гомогенной смеси.

На ФИГ.10 приведены данные по сравнению очищающей эффективности фермента в удалении струпа на ожоговой ране свиньи в суспензии по настоящему изобретению (<ПЭГ-в-медицинском вазелине> - таблица 11) для следующих трех составов: (1) крем на водной основе - таблица 12; (2) SANTYL® («промышленный продукт», который является смесью коллагеназы и медицинского вазелина); и состав гидрогеля - таблица 13. Ожоговые раны создали у свиней и через несколько дней образовались твердые струпья. Составы наносили на твердые струпья один раз в день в течение двух недель. Только полностью очищенные раны считались «полностью очищенными». Обработали всего 20 ран.

ТАБЛИЦА 11 (ПЭГ в медицинском вазелине)\*

Компоненты	масс.%
Полоксамер-407	0.99891551
Медицински вазелин	78.7544989
Термолизин	0.20168104
ПЭГ-600	20.0449046
ВСЕГО	100

\*ПЭГ-в-медицинском вазелине готовили следующим образом: (А) Активная фаза: (1) 32.67 г ПЭГ-600 и 1.63 г полоксамира-407 гомогенизировали при 70°C до тех пор, пока смесь оставалась прозрачной; (2) смесь охладили до примерно 35°C; и (3) добавили термолизин и перемешивали в течении по меньшей мере 30 мин. (В) Основная фаза: (1) 236.52 г медицинского вазелина, 30,05 г ПЭГ-600 и 1.5 г полоксамира-407 гомогенизировали при 70°C; и (2) смесь охладили до примерно 35°C. Активную фазу (В) добавили к основной фазе (В) и перемешивали при комнатной температуре (20-25°C) в течение 45 мин.

ТАБЛИЦА 12 (Крем на водной основе)\*

Компоненты	масс.%
Эмульгирующий воск	14.993927
1% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> в воде (pH=7.5)	74.057507
Изопропилпальмитат, NF	5.4571649
Глицерин	5.0104708
Термолизин	0.2001065
Метилпарабен	0.2007937
Пропилпарабен	0.0800301
ВСЕГО	100

\*Крем на водной основе готовили следующим образом: (1) парабены расплавили в буфере при высокой температуре (>70°C) вместе с глицерином; (2) добавили эмульгирующий воск и изопропилпальмитат; (3) смесь перемешивали при высокой температуре в течение 45 мин и затем охладили до примерно 35°C; (4) добавили термолизин в виде суспензии в буфере; (5) смесь охладили до комнатной температуры (20-25°C).

ТАБЛИЦА 13 (Гидрогель)\*

Компоненты	масс.%
Гидроксипропилметилцеллюлоза	2.250621745
1% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> в воде (pH=7.5)	77.96851753
Термолизин	0.202530294
Метилпарабен	0.244719829
Пропилпарабен	0.0480663
Пропиленгликоль	19.28554438
ВСЕГО	100

\*Гидрогель готовили следующим образом: (1) парабены и пропиленгликоль растворили в воде при 70°C; (2) добавили НРМС при комнатной температуре (20-25°C); (3) добавили термолизин и получили раствор молочной вязкости.

## Формула изобретения

1. Композиция для обработки ран, содержащая:

- (а) гидрофильную дисперсную фазу, включающую ПЭГ 400 и коллагеназу; и
- (б) гидрофобную непрерывную фазу, включающую гидрофобную основу;

при этом гидрофильная дисперсная фаза диспергирована в гидрофобной

5 непрерывной фазе; количество ПЭГ 400 составляет 13-27% вес/вес в расчете на композицию, композиция является безводной, оптимальное количество ПЭГ 400 в композиции находится в указанных пределах 13-27% ПЭГ 400 и указанное оптимальное количество в композиции отражает количество ПЭГ 400 в композиции, когда достигается наибольшая ферментативная активность композиции.

10 2. Композиция для обработки ран по п. 1, в которой гидрофобной основой является петролатум.

3. Композиция для обработки ран, содержащая:

- (а) гидрофильную дисперсную фазу, включающую ПЭГ 600 и коллагеназу; и
- (б) гидрофобную непрерывную фазу, включающую гидрофобную основу;

15 при этом гидрофильная дисперсная фаза диспергирована в гидрофобной непрерывной фазе; количество ПЭГ 600 составляет 20-40% вес/вес в расчете на композицию, композиция является безводной, оптимальное количество ПЭГ 600 в композиции находится в указанных пределах 20-40% ПЭГ 600 и указанное оптимальное количество в композиции отражает количество ПЭГ 600 в композиции, когда достигается

20 наибольшая ферментативная активность композиции.

4. Композиция для обработки ран по п. 3, в которой гидрофобной основой является петролатум.

5. Композиция для обработки ран, содержащая:

- (а) гидрофильную дисперсную фазу, включающую Полоксамер 124 и коллагеназу;

25 и

- (б) гидрофобную непрерывную фазу, включающую гидрофобную основу;

при этом гидрофильная дисперсная фаза диспергирована в гидрофобной непрерывной фазе; количество Полоксамира 124 составляет 20-40% вес/вес в расчете на композицию, композиция является безводной, оптимальное количество Полоксамира

30 124 в композиции находится в указанных пределах 20-40% Полоксамира 124 и указанное оптимальное количество в композиции отражает количество Полоксамира 124 в композиции, когда достигается наибольшая ферментативная активность композиции.

6. Композиция для обработки ран по п. 5, в которой гидрофобной основой является петролатум.

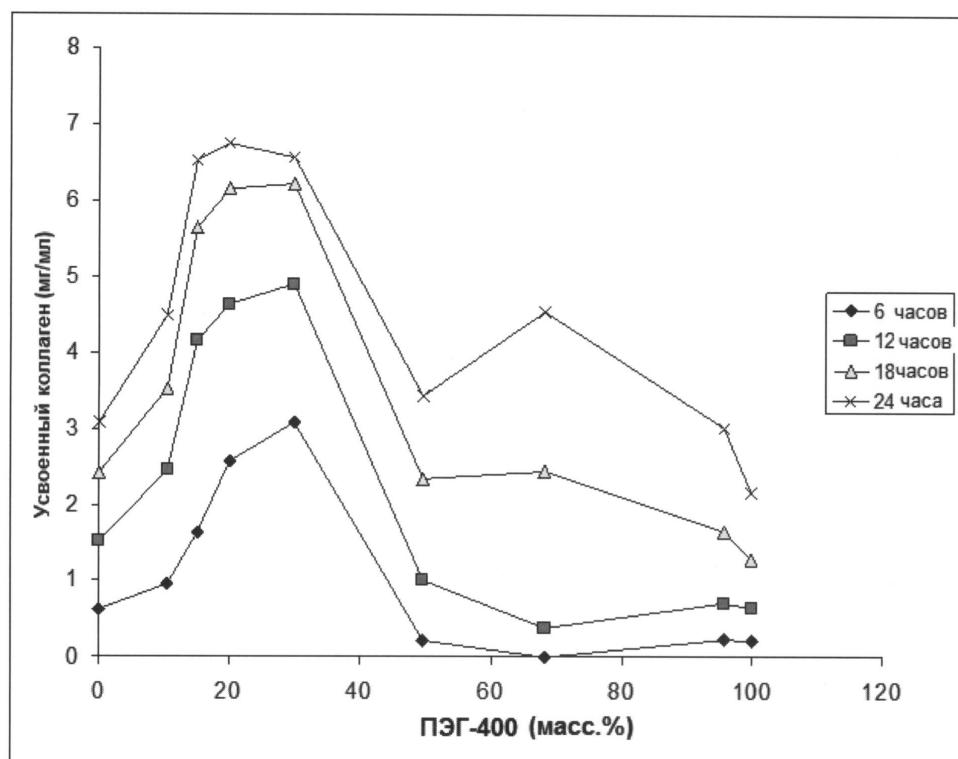
35

40

45

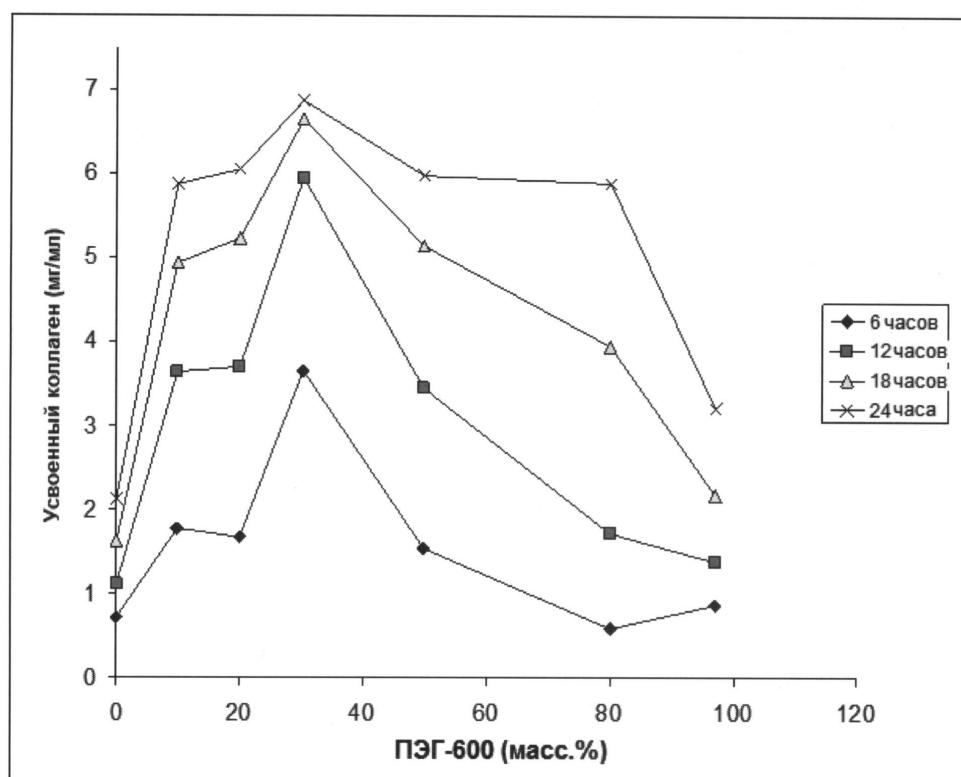
**ФИГ. 1**

Активность коллагеназы в модельном струпе как функция концентрации ПЭГ-400 в медицинском вазелине



ФИГ. 2

Активность коллагеназы в модельном струпе как функция концентрации ПЭГ-600 в медицинском вазелине

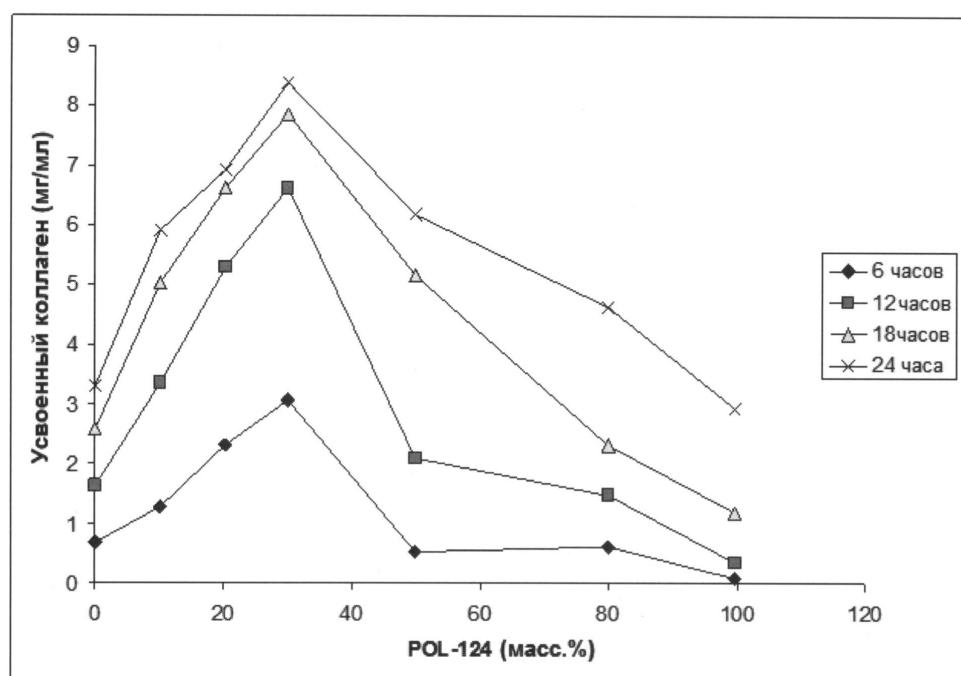


38

3/10

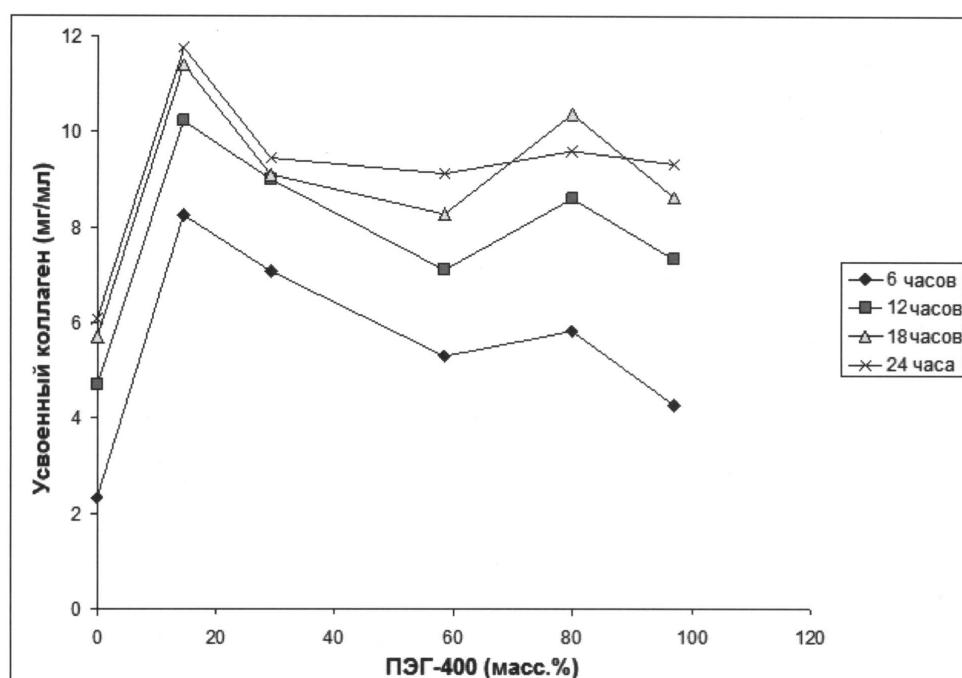
**ФИГ. 3**

Активность коллагеназы в модельном струпе как функция концентрации Полоксамера 124 (POL-124) в медицинском вазелине



**ФИГ. 4**

Активность трипсина в модельном струпе как функция концентрации ПЭГ-400 в медицинском вазелине

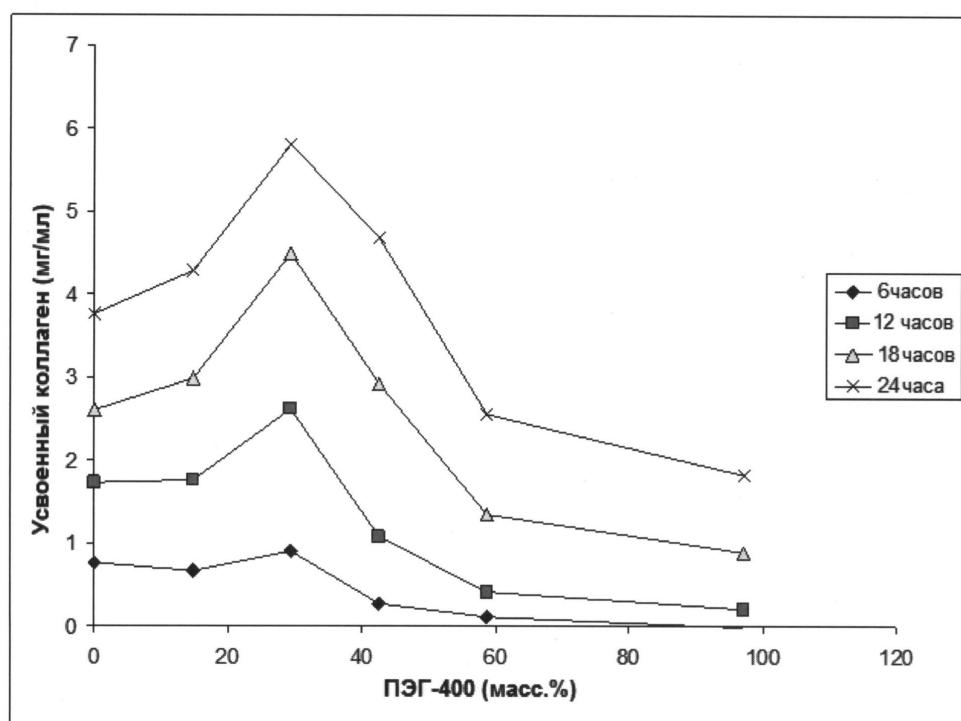


40

5/10

**ФИГ. 5**

Активность папаина в модельном струпе как функция концентрации ПЭГ-400 в медицинском вазелине

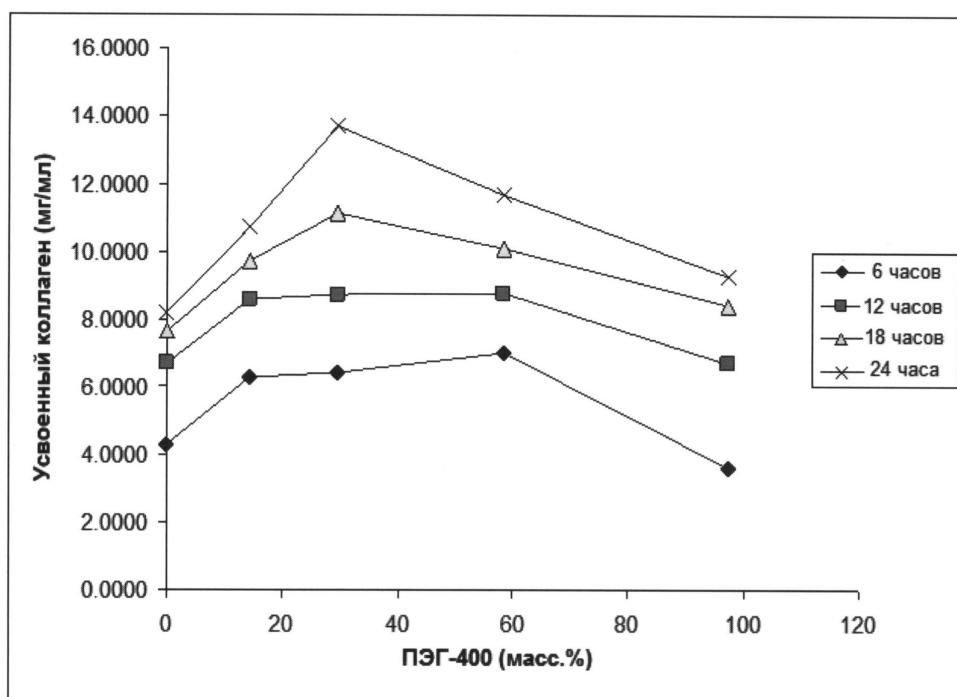


41

6/10

**ФИГ. 6**

Активность термолизина в модельном струпе как функция концентрации ПЭГ-400 в медицинском вазелине

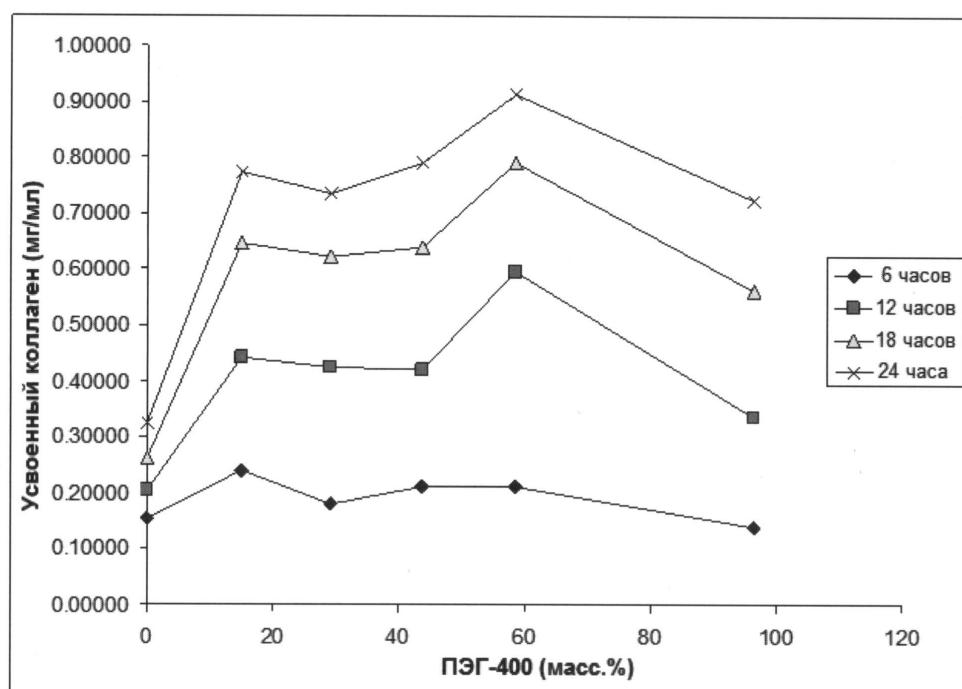


42

7/10

ФИГ. 7

Активность пепсина в модельном струпе как функция концентрации ПЭГ-400 в медицинском вазелине

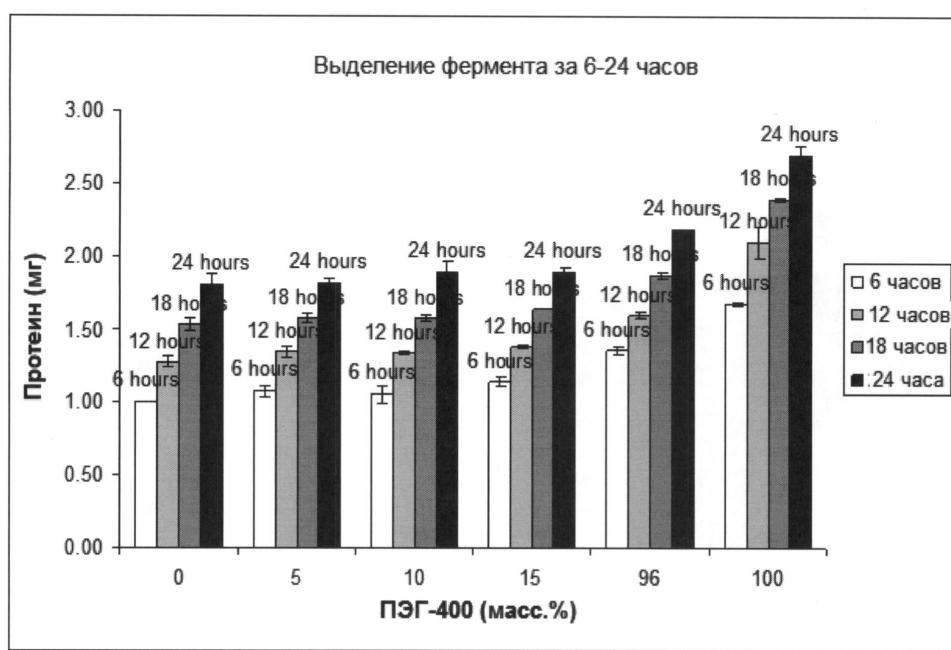


43

8/10

**ФИГ. 8**

Выделение коллагеназы как функция концентрации ПЭГ-400 в медицинском вазелине

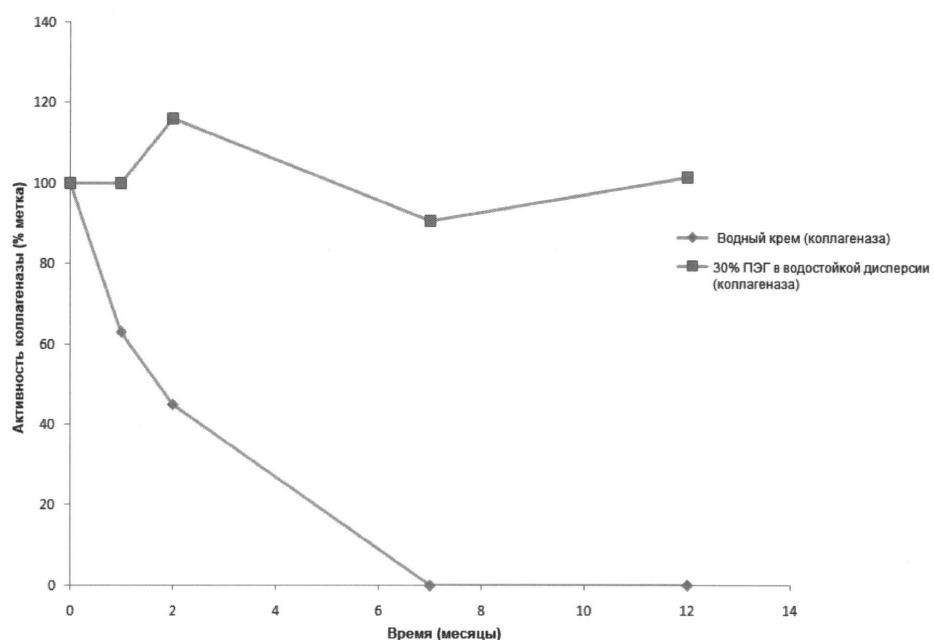


44

9/10

**ФИГ. 9**

Сравнение стабильности фермента (хранение при комнатной температуре) в супензии ПЭГ в медицинском вазелине по сравнению с кремом на основе масло-водной эмульсии



45

10/10

**ФИГ. 10**

Эффективность очистки ожоговой раны свиньи

