

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10) **PL 247904 B1**

(12)

## Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **443813**

(22) Data zgłoszenia: **2023.02.17**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.08.19 BUP 34/2024**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.09.15 WUP 37/2025**

(51) MKP:

**A61K 9/10** (2006.01)

**A61K 9/107** (2006.01)

**A61K 47/10** (2017.01)

**A61K 47/36** (2006.01)

**A61K 47/44** (2017.01)

**A61P 1/02** (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU,  
Białystok, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**EMILIA SZYMAŃSKA, Grabówka, PL  
MAŁGORZATA PIETRUSKA, Białystok, PL  
MAGDALENA SULEWSKA, Białystok, PL  
KATARZYNA WINNICKA, Białystok, PL  
JOANNA POTAS, Białystok, PL  
MARCIN BARANOWSKI, Nowodworce, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Urszula Gągała, Warszawa, PL**

(54) Tytuł:

**Kompozycja farmaceutyczna o właściwościach mukoadhezyjnych oraz jej zastosowanie**

**PL 247904 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest kompozycja farmaceutyczna o właściwościach mukoadhezyjnych oraz jej zastosowanie w łagodzeniu przebiegu oraz leczeniu chorób jamy ustnej.

Schorzenia stomatologiczne, do których należą choroby zębów, dziąseł i błony śluzowej, to powszechny problem społeczny z którym zmagają się zarówno osoby dorosłe, jak i dzieci. Tkanki jamy ustnej, w szczególności błona śluzowa i dziąsła, są delikatne i narażone na urazy mechaniczne. Dodatkowo, stały kontakt jamy ustnej z drobnoustrojami ze środowiska zewnętrznego zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia uszkodzeń i rozwoju stanu zapalnego.

Powszechnym schorzeniem dotykającym pacjentów w każdym wieku jest zapalenie błony śluzowej jamy ustnej. Zmiany w zależności od przyczyny mogą przybierać różnorodny wygląd: od zaczerwienienia z obrzękiem po rozległe nadżerki i owrzodzenia obejmujące niekiedy niemal całą powierzchnię błony śluzowej. Dolegliwości pojawiają się w następstwie chorób ogólnoustrojowych (m.in. cukrzycy), stanów obniżonej odporności (np. u pacjentów onkologicznych), przewlekłej farmakoterapii (np. glikokortykosteroidami) czy urazów (m.in. w przebiegu leczenia ortodontycznego, po zabiegu chirurgicznym). W następstwie uszkodzeń błona śluzowa traci funkcję bariery ochronnej co sprzyja rozwojowi infekcji o podłożu wirusowym, bakteryjnym lub grzybiczym.

Uciążliwym i nawracającym schorzeniem są kandydozy jamy ustnej wywołane grzybami drożdżopodobnymi (*Candida* sp.), które łatwo i szybko rozwijają się na powierzchni błony lub w przestrzeniach między płytką protezy a śluzówką. Na rozwój choroby podatne są zwłaszcza dzieci oraz osoby z obniżoną odpornością. Leczenie kandydozy rozpoczyna się zazwyczaj od miejscowo stosowanych preparatów o właściwościach przeciwgrzybiczych. Brak poprawy lub nawracające infekcje są podstawą do wdrożenia leczenia ogólnego. Klotrimazol (CLO) należy do pochodnych imidazolu o aktywności przeciwgrzybiczej. Jest to najczęściej stosowana substancja aktywna w przypadku terapii kandydoz skóry i błon śluzowych jamy ustnej i pochwy (*Neil J. Khatler; Moien AB Khan. Clotrimazole. StatPearls 2022*). Dostępne na polskim rynku farmaceutycznym produkty z substancjami przeciwgrzybiczymi przyjmują postać kremów, past, żeli, płynów do płukania oraz nieprzyjaznych dla pacjentów zawiesin o gorzkim smaku do pędzlowania zmian chorobowych. W wielu wypadkach są to preparaty przeznaczone do zastosowania na skórę co powoduje, że charakteryzują się niską zdolnością przylegania do błony lub w ogóle są tej zdolności pozbawione. W efekcie zbyt szybko spływają z powierzchni śluzówki nie będąc w stanie utrzymać leku w miejscu aplikacji, co negatywnie wpływa na skuteczność terapeutyczną i dodatkowo obniża komfort stosowania leku przez pacjenta.

Na europejskim rynku farmaceutycznym znajdują się jedynie preparaty z CLO przeznaczone do stosowania jedynie na skórę oraz dopochwowo. Na rynku światowym dostępny jest natomiast CLO w postaci pastylek do ssania (Clotrimazole troches, 10 mg, <https://www.drugs.com/pro/clotrimazole-lozenge.html>).

Szczególnym problemem są stany przednowotworowe, których etiologia w większości jest nieznana. Jednym z najczęściej występujących przewlekłych schorzeń śluzówkowo-skórnych jest liszaj płaski. Szacunkowo choroba ta dotyka około 2–3% społeczeństwa, a brak uchwytnej przyczyny powstawania choroby sprawia, że leczenie jest tylko objawowe, a więc niewystarczająco skuteczne. Zmianom towarzyszy przewlekły ból i pieczenie utrudniające codzienne funkcjonowanie. Dostępne metody leczenia: chirurgiczne usunięcie zmiany lub miejscowa i ogólna kortykosteroidoterapia dają tylko tymczasową poprawę. W krótkim czasie po chirurgicznym usunięciu zmiany czy odstawieniu leczenia farmakologicznego obserwowane są nawroty choroby. Długotrwała kortykosteroidoterapia obciążona jest ponadto ryzykiem wystąpienia wielu skutków niepożądanych m.in. ze strony przewodu pokarmowego czy układu krążenia.

Alternatywę dla wyżej wymienionych metod stanowi terapia fotodynamiczna (ang. photodynamic therapy, PDT), która polega na selektywnym niszczeniu tkanek zmienionych chorobowo pod wpływem substancji fotouczulającej oraz promieniowania o odpowiedniej długości fali. Jedynymi dostępnymi fotouczulaczami są kwas delta-aminolewulinowy (ALA) w postaci chlorowodoru oraz jego ester metylowy. Obie substancje to proleki o działaniu cytotoksycznym i immunomodulującym, które w organizmie przekształcają się do właściwego uczulacza protoporfiryny IX. Zaletą ALA jest fakt, że po podaniu miejscowym gromadzi się w błonie śluzowej, a nie w błonie podśluzowej czy mięśniowej, co w efekcie zwiększa szanse na selektywne niszczenie komórek bez wpływu na struktury podporowe tkanek.

W ostatnich latach podejmowano próby wykorzystania PDT w leczeniu zmian przednowotworowych jamy ustnej. Przykładowo, w badaniach przeprowadzonych w Zakładzie Chorób Przyzębia i Błony Śluzowej Jamy Ustnej UMB zaobserwowano istotną remisję objawów klinicznych liszaja płaskiego przy niskim ryzyku nawrotu choroby nawet po 12 miesiącach od zakończenia leczenia (Sulewska M. i wsp., 2017). Pomimo korzyści wynikających z zastosowania substancji fotouczulającej, w badaniach tych obserwowano ograniczenia związane z samą postacią leku (stosowano lipofilową bazę dla ALA), tj. trudnością w aplikacji leku i problemami z utrzymaniem na powierzchni błony śluzowej.

Należy więc podkreślić, że na rynku brakuje preparatów z substancjami fotouczulającymi przeznaczonych do zastosowania na błony śluzowe, stąd w praktyce konieczne staje się użycie produktów z substancjami fotouczulającymi przeznaczonych do zastosowania na skórę (preparaty Ameluz (Biofronterra) oraz Metvix (PhotoCure) niedostępne w Polsce). Problem ten wynika głównie z braku odpowiednich nośników wykazujących dobre właściwości mukoadhezyjne.

W stanie techniki istnieją rozwiązania dotyczące samych nośników jak również ich połączeń z substancją aktywną.

W ostatnich latach na rynku farmaceutycznym pojawiły się mukoadhezyjne preparaty pozbawione substancji aktywnych, przeznaczone do pielęgnacji błony śluzowej jamy ustnej, tj. płyn MuGard (<https://www.rxlist.com/mugard-drug.htm>) oraz żel zawierający ekstrakty roślinne Mucosit (<https://www.herbapol.poznan.pl/pl/produkty/mucosit>). W składzie preparatów znajduje się karbomer – syntetyczny polimer kwasu akrylowego o potwierdzonej zdolności oddziaływania z błoną śluzową *in vivo* odpowiedzialny za działanie osłaniające oraz wspomagające regenerację błony śluzowej. Karbomer występuje w wielu odmianach o zmiennych cechach fizykochemicznych. Ze względu na jego wrażliwość na zmiany pH oraz wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia niekorzystnych interakcji z substancjami aktywnymi, trudno jest otrzymać trwały preparat o pożądanym cechach biofarmaceutycznych i jakościowych.

Ponadto w zgłoszeniu WO 2020/248232 ujawniono kompozycję do zastosowań wewnątrz jamy ustnej zawierającą kwas hialuronowy i kombinację polimerów, wśród których wymieniono również naturalne gumy w tym takie jak tragakantowa i ksantanowa, przy czym jako korzystną wskazano gumę ksantanową. Taka kompozycja w szczególności zapewnia formułację bez splukiwania o dobrej rozsmarowywalności, co może być pomocne dla poprawy leczenia ran dziąseł.

W publikacji Prezotti i wsp., 2019 ujawniono mukoadhezyjne powłoki o potencjalnym zastosowaniu jako system dostarczania leku do jamy ustnej zawierające połączenie gumy gellan i pektyny z dodatkiem glicerolu jako plastyfikatora. Ujawnione w publikacji powłoki mają grubość zawierającą się w przedziale 18–30  $\mu\text{m}$ , są przezroczyste, elastyczne i homogenne. Ponadto wykazano, że wysoka zawartość gumy gellan poprawiała odporność mechaniczną i mukoadhezję powłok. Ponadto zbadano również tempo uwalniania leku, którym w tym przypadku była kurkumina wykazująca między innymi właściwości przeciwzapalne.

W publikacji Potaś i wsp., 2020 ujawniono kompleksy polielektrolitowe gumy tragakantowej i chitozanu oraz ich potencjalne zastosowanie w hydrożelach dodatkowo wzbogaconych o gumę ksantanową przeznaczonych do zastosowania w preparatach na błonę śluzową jamy ustnej. Preparaty hydrożelowe zawierały ponadto odpowiednią ilość glikolu propylenowego i wody oraz kwasu octowego, których obecność wynikała ze sposobu przygotowania poszczególnych komponentów polimerowych. Preparaty te nie były testowane pod kątem uwalniania leków a jedynie pod kątem mukoadhezyjności i pęcznienia.

Mimo dużej różnorodności polimerów stosowanych w nośnikach wciąż nie są dostępne takie kombinacje, które wykazywałyby dobrą mukoadhezyjność, biogodność, a jednocześnie były kompatybilne z substancjami aktywnymi przeznaczonymi do leczenia chorób dziąseł a co za tym idzie pozwalałyby na uzyskanie preparatów zapewniających odpowiednie uwalnianie leków oraz wykazujących odpowiednie przyleganie do błony śluzowej, co z kolei przekładałoby się na skuteczność preparatów odpowiednio w łagodzeniu przebiegu oraz leczeniu chorób jamy ustnej.

Celem wynalazku było opracowanie kompozycji farmaceutycznej o dobrej mukoadhezyjności, wysokiej biogodności i kompatybilności z substancjami aktywnymi farmaceutycznie oraz takiej, która łącząc się z substancją aktywną nie traciłaby swoich korzystnych właściwości i wspomagałaby działanie substancji aktywnej. Celem wynalazku było również opracowanie kompozycji, które nadawałyby się do zastosowania w łagodzeniu przebiegu oraz leczeniu chorób jamy ustnej.

Przedmiotem wynalazku jest kompozycja farmaceutyczna o właściwościach mukoadhezyjnych zawierająca amfoteryczny promotor wchłaniania wybrany z grupy obejmującej żelatynę i lecytynę, olej

roślinny, środki konserwujące, humektant wybrany z grupy obejmującej glikol propylenowy, glicerol, glikol polietylenowy i ich kombinację, wodę oraz co najmniej jedną naturalną gumę wybraną z grupy obejmującej gumę gellan, tragakantę, gumę ksantanową oraz ich kombinację charakteryzująca się tym, że zawartość gumy naturalnej zawiera się w przedziale od 2 do 8% w/w a stosunek amfoterycznego promotora wchłaniania: oleju roślinnego: środków konserwujących: humektanta wyrażony w % w/w zawiera się w przedziałach 0,3 do 0,7: 1,7 do 2,3: 0,1 do 0,3: 3 do 7; przy czym zawartość wody stanowi uzupełnienie do 100% w/w.

Korzystnie amfoteryczny promotor wchłaniania oznacza lecytynę.

Korzystnie humektant oznacza glikol propylenowy.

Korzystnie olej roślinny jest wybrany z grupy obejmującej olej rycynowy, arachidowy, bawełniany, krokoszowy, lniany, migdałowy, rzepakowy, sezamowy, sojowy, słonecznikowy, wiesiołkowy, z kielków pszenicy, z ogórecznika lekarskiego, z oliwek i ich kombinację.

Korzystnie olej roślinny oznacza olej rycynowy.

Korzystnie środki konserwujące są wybrane z grupy obejmującej wersenian disodowy, benzoesan sodu, kwas benzoesowy, kwas sorbowy, sorbinian potasu, chlorek benzalkonium i ich kombinację.

Korzystnie środki konserwujące oznaczają kombinację wersenianu disodowego i benzoesanu sodu w stosunku 1:1.

Korzystnie guma gellan oznacza formę wysoko acylowaną.

Korzystnie lepkość tragakanty mierzona dla roztworu o stężeniu 1% wynosi 150 do 250 cPas w temperaturze  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Korzystnie lepkość gumy ksantanowej mierzona dla roztworu o stężeniu 1% wynosi 1450 do 1550 cPas w temperaturze  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Korzystnie naturalna guma oznacza tragakantę w ilości zawierającej się w przedziale 3 do 7% w/w.

Korzystnie naturalna guma oznacza kombinację tragakanty z gumą ksantanową w ilościach wyrażonych w % w/w odpowiednio zawierających się w przedziałach dla tragakanty od 3 do 7% w/w, a dla gumy ksantanowej od 0,3 do 1,2% w/w.

Korzystnie naturalna guma oznacza kombinację gumy ksantanowej z gumą gellan w ilościach wyrażonych w % w/w odpowiednio zawierających się w przedziałach dla gumy ksantanowej od 1,7 do 2,3% w/w a dla gumy gellan 0,5 do 1% w/w.

Przedmiotem wynalazku jest kompozycja farmaceutyczna o właściwościach mukoadhezyjnych zawierająca amfoteryczny promotor wchłaniania wybrany z grupy obejmującej żelatynę i lecytynę, olej roślinny, środki konserwujące, humektant wybrany z grupy obejmującej glikol propylenowy, glicerol, glikol polietylenowy i ich kombinację, wodę oraz co najmniej jedną naturalną gumę wybraną z grupy obejmującej gumę gellan, tragakantę, gumę ksantanową oraz ich kombinację charakteryzująca się tym, że zawartość gumy naturalnej zawiera się w przedziale od 2 do 8% w/w a stosunek amfoterycznego promotora wchłaniania: oleju roślinnego: środków konserwujących: humektanta wyrażony w % w/w zawiera się w przedziałach 0,3 do 0,7: 1,7 do 2,3: 0,1 do 0,3: 3 do 7 i zawiera substancję aktywną farmaceutycznie przeznaczoną do leczenia chorób jamy ustnej wybraną z grupy obejmującej substancje przeciwgrzybicze i substancje fotouczulające przy czym substancja aktywna jest obecna w ilości zawierającej się w przedziale 0,3 do 7% w/w, przy czym zawartość wody stanowi uzupełnienie do 100% w/w.

Korzystnie substancja przeciwgrzybicza oznacza klotrimazol obecny w ilości pomiędzy 0,3 a 1,2% w/w.

Korzystnie substancja fotouczulająca jest wybrana z grupy obejmującej kwas delta-aminolewulinowy w postaci chlorowodoru oraz jego ester metylowy w ilości pomiędzy 3 a 7% w/w, najkorzystnie kwas delta-aminolewulinowy w postaci chlorowodoru.

Korzystnie kompozycje według wynalazku mają postać żelu, korzystnie emulżelu.

Korzystnie kompozycje według wynalazku zawierają dodatkowo płynny aromat wybrany z grupy obejmującej aromat wiśniowy i miętowy w ilości 0,04% w/w.

Przedmiot wynalazku stanowią ponadto kompozycje według wynalazku do zastosowania w łagodzeniu przebiegu i leczeniu chorób jamy ustnej.

Korzystnie leczenie chorób jamy ustnej oznacza terapię fotodynamiczną.

Korzystnie choroby jamy ustnej wybrane są z chorób grzybiczych i stanów przednowotworowych.

Jeszcze korzystnie stan przednowotworowy oznacza liszaj płaski błony śluzowej jamy ustnej.

Jeszcze korzystniej choroba grzybicza oznacza kandydozę jamy ustnej wywołaną przez *Candida* sp.

Kompozycje według wynalazku jak również ich połączenie z odpowiednim środkiem aktywnym farmaceutycznie takim jak klotrimazol i kwas delta-aminolewulinowy nadają się do zastosowania odpowiednio w łagodzeniu przebiegu i leczeniu niepowikłanych stanów chorobowych tkanki nabłonkowej, w szczególności błony śluzowej jamy ustnej, jak również wspomagająco po zabiegach chirurgicznych, periodontologicznych czy implantologicznych. Wynika to przede wszystkim z faktu, iż kompozycje i ich połączenia z substancjami aktywnymi w kontakcie z błoną śluzową tworzą rodzaj ochronnej warstwy równomiernie pokrywającej miejsce aplikacji, pełniąc tym samym funkcję osłaniającą i powlekającą. Ponadto wykazują one wysoką zdolność do oddziaływania z błoną śluzową (właściwości mukoadhezyjne) umożliwiając utrzymanie się leku w miejscu aplikacji. Oprócz tego zaobserwowano zdolność do poprawy wchłaniania leku a tym samym do zwiększenia jego skuteczności farmakologicznej. Opracowana kompozycja według wynalazku w połączeniu z substancją przeciwgrzybiczą taką jak klotrimazol, dzięki zdolności oddziaływania z błoną śluzową umożliwia dłuższy czas kontaktu leku z tkanką zmienioną chorobowo, a dodatkowo poprzez częściowe rozpuszczenie klotrimazolu w kompozycji, co w efekcie przyczynia się do poprawy skuteczności leczenia kandydozy. Z kolei połączenie kompozycji według wynalazku z ALA stanowi odpowiedź na potrzeby terapeutyczne pacjentów zmagających się z przewlekłymi stanami przednowotworowymi w obrębie jamy ustnej tj. liszajem płaskim, którego standardowe leczenie – miejscowa kortykosteroidoterapia – nie jest skuteczne a dotychczas stosowane w terapii preparaty jeśli w ogóle, były przeznaczone do terapii innych powierzchni ciała ludzkiego niż błona śluzowa jamy ustnej, co przekładało się na ich skuteczność, która w przypadku kompozycji według wynalazku zawierającej kwas delta-aminolewulinowy była istotnie lepsza.

Przedmiot wynalazku został przedstawiony za pomocą figur rysunku, spośród których:

Fig. 1 przedstawia właściwości mukoadhezyjne wyrażone jako praca mukoadhezji (Wad) kompozycji według wynalazku B1-B3, kompozycji według wynalazku zawierających dodatkowo kwas delta-aminolewulinowy w postaci chlorowodoru (F1-F3 (5% ALA)) oraz kompozycji według wynalazku zawierających dodatkowo klotrimazol (C1-C3 (1% CLO)) w porównaniu do preparatu Anaftin (średnia  $\pm$  S.D.; n=4); \* p< 0,05; \*\* p< 0,01

Fig. 2 przedstawia właściwości mechaniczne: **(a)** twardość (ang. *Hardness*); **(b)** rozsmarowywalność (ang. *Consistency*); **(c)** spoiistość (ang. *Cohesiveness*) kompozycji według wynalazku B1-B3, kompozycji według wynalazku zawierających dodatkowo kwas delta-aminolewulinowy w postaci chlorowodoru (F1-F3 (5% ALA)) oraz kompozycji według wynalazku zawierających dodatkowo klotrimazol (C1-C3 (1% CLO)) w porównaniu do preparatu stomatologicznego Anaftin (średnia  $\pm$  S.D.; n  $\geq$  4).

Fig. 3 przedstawia przeżywalność (wyrażoną jako % kontroli) modelu błony śluzowej jamy ustnej po aplikacji kompozycji (a) według wynalazku (B1-B3) oraz (b) kompozycji według wynalazku zawierających 5% (w/w) ALA (F1-F3) (n=3, średnia  $\pm$  S.D.)

Fig. 4 przedstawia stężenie interleukiny 1beta w medium tkankowym po aplikacji kompozycji (a) według wynalazku (B1-B3) oraz (b) kompozycji według wynalazku zawierających 5% (w/w) ALA (F1-F3) (n=3, średnia  $\pm$  S.D.)

Fig. 5 przedstawia obraz mikroskopowy wycinka modelu tkankowego błony śluzowej jamy ustnej (SkinEthic): (a) po 2 h i (b) po 5 h inkubacji z kompozycją według wynalazku (B1-B3), kompozycjami według wynalazku zawierającymi 5% (w/w) kwas delta-aminolewulinowy w postaci chlorowodoru (F1-F3) oraz kontroli NC – wody i PS – laurylosiarczanu sodu. Barwienie hematoksylina-eozyna, powiększenie x40.

Fig. 6 przedstawia profil uwalniania ALA (wyrażony jako procent dawki leku zamkniętej w teflonowej komorze ekstrakcyjnej) w płynie akceptorowym z kompozycji F1-F3 w porównaniu do komercyjnego preparatu Ameluz (Referent) (średnia  $\pm$  SD; n = 3).

Fig. 7 przedstawia: (a) przenikanie ALA do płynu akceptorowego wyrażone w  $\mu$ g na jednostkę powierzchni zwierzęcego modelu błony śluzowej w zależności od zastosowanej kompozycji według wynalazku (B1-B3) w porównaniu do komercyjnego preparatu Ameluz (Referent); (b) retencja ALA w błonie śluzowej określona po 3 h analizy w odniesieniu do preparatu referencyjnego Ameluz (n=5; średnia  $\pm$  S.D.).

W toku badań nad opracowaniem kompozycji o właściwościach mukoadhezyjnych badano różne kombinacje komponentów należących do grupy naturalnych polimerów pod kątem uzyskania jak najlepszych właściwości w kontekście zastosowania w leczeniu i zapobieganiu chorobom tkanki nabłonkowej, w szczególności błony śluzowej jamy ustnej. Kompozycja według wynalazku ma postać emulżelu

o konsystencji umożliwiającej łatwą i szybką aplikację na powierzchnię tkanki. Obecne w składzie substancje konserwujące, stabilizujące oraz promotory wchłaniania to substancje pomocnicze powszechnie wykorzystywane w preparatach do podawania miejscowego.

Opracowane kompozycje według wynalazku wytwarzane są prostą i powtarzalną techniką z zastosowaniem mieszadła (lub homogenizatora) mechanicznego. Sposób ten testowano w warunkach laboratoryjnych przy użyciu mieszadła mechanicznego (np. typu Heidolph czy Ika, lub robota typu unguator). Jednorazowo otrzymywano produkt w gramaturze nie przekraczającej 200 g. Otrzymanie homogennej kompozycji o pożądanej konsystencji wymaga zastosowania odpowiedniej kolejności łączenia składników.

Kompozycje według wynalazku powstały na bazie naturalnych polimerów wielkocząsteczkowych, przy czym pochodzenie surowców jest dość istotne, ponieważ w zależności od producenta charakteryzują się one odmiennymi właściwościami, tj. masa cząsteczkowa, stopień czystości, stopień acylacji. Do badań nad prototypami zostały użyte surowce firmy CK Kelco (guma gellan w postaci wysoce acylowanej (ang. High acyl HA) oraz Sigma Aldrich (tragakanta o lepkości 1% 200±15 cPas, guma ksantanova o lepkości 1% roztworu 1500±30 cPas). Badanie lepkości przeprowadzono przy użyciu wiskozymetru rotacyjnego Viscotester 6 Plus ThermoHaake (Thermo Scientific, Niemcy), wyposażonego w rotor TL 7, w temperaturze 25°C ± 1°C. Pomiary wykonywano przy prędkości obrotowej 30–60/min). Zastosowany w przykładach wykonania kwas delta-aminolewulinowy ma postać chlorowodoru. Dopuszczalne jest również zastosowanie estru metylowego kwasu delta-aminolewulinowego.

### **Przykład 1**

#### Sposób wytwarzania kompozycji według wynalazku

Na skalę laboratoryjną, kompozycje wykonywane są metodą homogenizacji z zastosowaniem mieszadła mechanicznego (np. typu Heidolph czy Ika, lub robota typu unguator). Otrzymanie homogennej kompozycji o pożądanej konsystencji wymaga zastosowania odpowiedniej kolejności łączenia składników.

W pierwszym etapie sporządza się dyspersję tragakanty i gumy ksantanowej (kompozycja B1) lub wyłącznie tragakanty (kompozycja B2) w wodzie. Zaleca się stopniowe dodawanie polimerów (w postaci proszku) na powierzchnię rozpuszczalnika o temperaturze pokojowej. W przypadku kompozycji B1 oba polimery mogą być jednocześnie, porcjami dyspergowane w wodzie. W osobnych naczyniach sporządza się roztwór wodny środków konserwujących (wersenian disodowy i benzoesan sodu w stosunku 1:1) oraz roztworu amfoterycznego promotora wchłaniania w tym przypadku lecytyny w humektancie (tu glikolu propylenowym). Roztwory te kolejno wprowadza się do dyspersji polimerów przy ciągłym mieszaniu. Do tak przygotowanej mieszaniny dodaje się olej roślinny, którym w tym przypadku jest olej rycynowy. Dopuszczalne oleje roślinne stosowane w kompozycjach farmaceutycznych to: rycynowy, arachidowy, bawełniany, krokoszowy, lniany, migdałowy, rzepakowy, sezamowy, sojowy, słonecznikowy, wiesiołkowy, z kielków pszenicy, z ogórecznika lekarskiego, z oliwek. W każdym etapie, czas homogenizacji nośnika żelowego z użyciem robota recepturowego nie przekracza 4–5 min (przy szybkości obrotów ok. 400–500 rpm). Należy przy tym dodać, że rolę środków konserwujących mogą pełnić na przykład wersenian disodowy, benzoesan sodu, kwas benzoesowy, kwas sorbowy, sorbinian potasu, chlorek benzalkonium, natomiast rolę humektantów takie substancje jak glikol propylenowy, glicerol, glikol polietylenowy. Jako amfoteryczny promotor wchłaniania może poza lecytiną zostać zastosowana betaina i jej pochodne oraz żelatyna.

Celem otrzymania kompozycji B3, do całkowitego rozpuszczenia gumy gellan, niezbędne jest wstępne ogrzanie rozpuszczalnika do temperatury 80°C. Dopiero do gotowej dyspersji gumy gellan wprowadza się gumę ksantanową. W osobnych naczyniach sporządza się roztwór wodny środków konserwujących (wersenian disodowy i benzoesan sodu w stosunku 1:1) oraz roztwór lecytyny w glikolu propylenowym. Do mieszaniny lecytyny w glikolu etylenowym może zostać dodany płynny aromat dobrany w zależności od smaku substancji leczniczej taki jak na przykład wiśniowy lub miętowy w ilości 0,04% w/w. Roztwory te kolejno wprowadza się do dyspersji polimerów przy ciągłym mieszaniu. Do tak przygotowanej mieszaniny dodaje się olej roślinny, którym w tym przypadku jest olej rycynowy. W każdym etapie, czas homogenizacji nośnika żelowego z użyciem robota recepturowego nie przekracza 4–5 min (przy szybkości obrotów ok. 400–500 rpm).

Otrzymaną w ten sposób kompozycję łączy się następnie z substancją aktywną. Skład kompozycji według wynalazku został przedstawiony w tabeli 1.

**Tabela 1:** Skład kompozycji B1-B3 według wynalazku

Składnik	Stężenie (% w/w)		
	B1	B2	B3
Tragakanta	5,0	5,0	-
Guma ksantanowa	1,0	-	2,0
Guma gellan	-	-	0,7
Lecytyna	0,5		
Olej rycynowy uwodniony	2,0		
Benzoesan sodu	0,1		
Wersenian disodu	0,1		
Glikol propylenowy	5,0		
Woda	Do 100,0	Do 100,0	Do 100,0

**Przykład 2**

Sposób wytwarzania kompozycji według wynalazku zawierających dodatkowo substancję aktywną w postaci odpowiednio kwasu delta-aminolewulinowego i klotrimazolu

W celu wytworzenia kompozycji według wynalazku dodatkowo zawierających substancję aktywną, która jest rozpuszczalna w wodzie (tutaj kwas delta-aminolewulinowy w postaci chlorowodoru, ALA), odważoną substancję aktywną rozciera się z humektantem, (tj. glikolem propylenowym, zalecana proporcja ALA do glikolu propylenowego 3:1, w/w), a następnie porcjami łączy z odpowiednią kompozycją według wynalazku B1-B3 uzyskaną według sposobu opisanego w przykładzie 1. Zalecana jest homogenizacja np. z użyciem robota typu unguator (czas 3–4 min, szybkość obrotów 400–500). Kompozycja zawierać może ponadto aromat wiśniowy w ilości 0,04% (w/w). Końcowe stężenie ALA w kompozycjach F1-F3 wynosi 5% (w/w) – tabela 2.

**Tabela 2:** Skład kompozycji F1-F3 według wynalazku zawierających 5% (w/w) kwasu delta-aminolewulinowego w postaci chlorowodoru (ALA) i odpowiednią kompozycją według wynalazku

Składnik	Stężenie (% w/w)		
	F1	F2	F3
Kwas delta-aminolewulinowy w postaci chlorowodoru	5,0	5,0	5,0
Tragakanta (lepkość 1% (w/w) roztworu w 25°C - 200 cPas)	5,0	5,0	-

Składnik	Stężenie (% w/w)		
	F1	F2	F3
Guma ksantanowa (lepkość 1% roztworu (w/w) w 25°C - 1500 cPas)	1,0	-	2,0
Guma gellan (CG-HA)	-	-	0,7
Lecytyna ( <i>mieszanina fosfolipidów, głównie fosfatydylocholiny z nasion soi</i> )	0,5	0,5	0,5
Olej rycynowy	2,0	2,0	2,0
Wersenian disodowy	0,1	0,1	0,1
Benzoosan sodu	0,1	0,1	0,1
Glikol propylenowy	5,0	5,0	5,0
Woda	do 100,0	do 100,0	do 100,0

W przypadku wytworzenia kompozycji farmaceutycznej według wynalazku zawierającej substancję aktywną przyjmującą postać krystalicznego proszku, trudno rozpuszczalnego w wodzie (tu z klotrimazolem, CLO), substancję aktywną wprowadza się do roztworu lecytyny w glikolu propylenowym (zalecane ogrzewanie do temperatury 50°C). Tak powstałą płynną zawiesinę homogenizuje się z bazą żelową uzyskaną według sposobu opisanego w przykładzie 1, np. z użyciem robota typu unguator (4 min, szybkość obrotów 400–500). Kompozycja może zawierać ponadto aromat miętowy w ilości 0,04% (w/w). Końcowe stężenie CLO w odpowiednich kompozycjach C1-C3 według wynalazku wynosi odpowiednio 0,5 i 1% (w/w) – tabela 3.

**Tabela 3:** Skład kompozycji C1-C3 według wynalazku zawierających 1% (w/w) klotrimazolu (CLO).

Składnik	Stężenie (% w/w)		
	C1/C1A	C2/C2A	C3/C3A
Klotrimazol	0,5/1,0	0,5/1,0	0,5/ 1,0
Tragakanta (lepkość 1% (w/w) roztworu w 25°C - 200 cPas)	5,0	5,0	-
Guma ksantanowa (lepkość 1% roztworu (w/w) w 25°C - 1500 cPas)	1,0	-	2,0

Składnik	Stężenie (% w/w)		
	C1/C1A	C2/C2A	C3/C3A
Guma gellan (CG-HA)	-	-	0,7
Uwodorniony olej rycynowy	2,0	2,0	2,0
Lecytyna ( <i>mieszanina fosfolipidów, głównie fosfatydylocholiny z nasion soi</i> )	0,5	0,5	0,5
Wersenian disodowy	0,1	0,1	0,1
Benzoesan sodu	0,1	0,1	0,1
Glikol propylenowy	5,0	5,0	5,0
Woda	do 100,0	do 100,0	do 100,0

### Przykład 3

Ocena kompozycji B1-B3 według wynalazku oraz kompozycji według wynalazku odpowiednio F1-F3 i C1-C3 zawierających odpowiednio ALA i CLO pod względem jakości farmaceutycznej i bezpieczeństwa

Kompozycje B1-B3 według wynalazku o składzie podanym w tabeli 1 zostały ocenione pod względem jakości farmaceutycznej oraz bezpieczeństwa stosowania w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem modelu tkankowego 3D błony śluzowej jamy ustnej.

Badanie właściwości mukoadhezyjnych prowadzono przy użyciu analizatora tekstury TA.XT.Plus wyposażonego w głowicę tensometryczną 5 kg i przystawkę G/Muc (tabela 4).

Kompozycję w ilości 1 ml nakładano przy użyciu strzykawki równomiernie na powierzchnię przystawki G/Muc, którą następnie montowano w ramieniu głowicy. Świeżo wypreparowaną świńską błonę śluzową policzka mocowano do termostатовanej płyty grzewczej klejem cyjanoakrylowym. Następnie na powierzchnię tkanki opuszczano głowicę z przystawką z prędkością 0,5 mm/sec. Ustalone doświadczalnie parametry pracy analizatora tekstury wynosiły: siła nacisku głowicy 0,3 N, czas utrzymywania siły 60 s, szybkość podnoszenia głowicy 0,1 mm/s. Pomiar właściwości mukoadhezyjnych opierał się na ocenie pracy niezbędnej do przerwania kontaktu pomiędzy postacią leku a materiałem biologicznym.

W identyczny sposób przebadano kompozycje według wynalazku zawierające odpowiednio ALA (F1-F3) oraz klotrimazol (C1-C3).

Przeprowadzone testy wykazały, że wszystkie kompozycje według wynalazku mające postać emulżelu charakteryzują się wysoką zdolnością przylegania do błony śluzowej, co potwierdzono w warunkach *ex vivo* metodą tensometryczną z wykorzystaniem zwierzęcego modelu błony śluzowej policzka w porównaniu do kontroli – dostępnego na rynku farmaceutycznym preparatu stomatologicznego Anaftin (fig. 1). Najwyższymi wartościami pracy mukoadhezji odznaczała się kompozycja B1 dla której odnotowano ok. 40% wyższe wartości parametru pracy mukoadhezji w porównaniu do preparatu Anaftin oraz ok. 30% wyższe w odniesieniu do kompozycji B2 i B3. Obecność substancji aktywnej nie wpływała w sposób istotny na właściwości mukoadhezyjne kompozycji zawierających substancje aktywne.

**Tabela 4.** Warunki badania mukoadhezji oraz parametry pracy analizatora tekstury.

<i>Parametr</i>	
<i>Sposób przymocowania materiału biologicznego</i>	Mocowane do klejem cyjanoakrylowym termostatowanej płyty grzewczej
<i>Sposób przymocowania kompozycji/preparatu</i>	Na górnym próbniku G/Muc zabezpieczony kołnierzem mocującym
<i>Ilość postaci leku</i>	1,0 ml
<i>Szybkość opuszczania głowicy*</i>	0,5 mm/s
<i>Sila nacisku głowicy*</i>	0,3 N
<i>Czas utrzymywania siły*</i>	60 s
<i>Szybkość podnożenia głowicy*</i>	0,1 mm/s

**Przykład 4**Analiza właściwości mechanicznych kompozycji według wynalazku oraz kompozycji według wynalazku zawierających substancje aktywne według wynalazku.

Badanie właściwości mechanicznych kompozycji według wynalazku B1-B3 prowadzono przy pomocy analizatora tekstury TA.XT.Plus wyposażonego w przystawkę A/BE do ekstruzji wstecznej o średnicy 35 mm. Emulżel (30 g) umieszczano w naczyniu pomiarowym na 2 h przed pomiarem, po czym opuszczano przystawkę z prędkością 2 mm/s na głębokość 10 mm. W analizie właściwości mechanicznych określających cechy aplikacyjne kompozycji według wynalazku wykazano różnice pomiędzy poszczególnymi kompozycjami farmaceutycznymi. Oceniano wpływ składu kompozycji na twardość (Fig. 2a), rozsmarowywalność (Fig. 2b) oraz spoistość kompozycji (Fig. 2c) – cech mających wpływ na zdolność pobierania kompozycji z opakowania, rozsmarowywania na powierzchni tkanki oraz przylegania do jej powierzchni.

Kompozycje według wynalazku charakteryzowały się porównywalnymi wartościami twardości i spoistości oraz bardziej zwartą konsystencją (obserwowano niemal trzykrotnie wyższe wartości rozsmarowywalności) w odniesieniu do kontroli, dostępnego wyrobu medycznego Anaftin.

Zaobserwowano istotny wpływ obecności substancji aktywnej, zwłaszcza w formie zawieszony w bazie (CLO) na konsystencję i właściwości aplikacyjne kompozycji oznaczonych numerem C1 i C3 vs. odpowiadającym im kompozycjom B1 i B3 (Fig. 2).

Wprowadzenie ALA i CLO do kompozycji B1 istotnie zwiększyło wartości analizowanych parametrów mechanicznych (odnotowano prawie 1,6 oraz 2,5-krotny wzrost wartości parametru twardości odpowiednio dla kompozycji F1 i C1 w porównaniu do kompozycji B1), w przeciwieństwie do kompozycji B3 w której obserwowano ok. 30% zmniejszenie twardości kompozycji w obecności ALA i CLO, jak również obniżenie parametru rozsmarowywalności o ok. 50% po zawieszeniu ALA w tej kompozycji. W przypadku kompozycji B2 wprowadzenie CLO przyczyniło się do niemal dwukrotnego wzrostu analizowanych parametrów rozsmarowywalności i spoistości, podczas gdy obecność ALA powodowała obniżenie ich wartości o ok. 20%.

**Przykład 5**Ocena potencjału drażniącego

Ocenę potencjału drażniącego *in vitro* kompozycji według wynalazku oraz kompozycji według wynalazku zawierających oprócz kompozycji substancję aktywną – klotrimazol i kwas delta-aminolewulinowy przeprowadzono zgodnie z aktualnymi normami prawnymi w zakresie oceny preparatów na skórę i błony śluzowe (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, In Vitro Skin and Mucosa Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method, OECD/OCDE 439, 2015; EN ISO 10993-10:2013 Biological evaluation of medical devices – Part 10: Tests for irritation and skin sensitization (ISO 10993-10:2010)).

Do badań wytypowano kompozycje według wynalazku (B1-B3) oraz kompozycje według wynalazku zawierające dodatkowo 5% (w/w) ALA (F1-F3), substancję cytotoksyczną (należącą do kategorii ATC L01XD – leki przeciwnowotworowe i immunomodulujące, cytostatyki, pozostałe leki przeciwnowotworowe według międzynarodowego systemu anatomiczno-terapeutyczno-chemicznego porządkującego leki) o wyższym potencjale drażniącym w porównaniu do CLO (ATC D01A leki do stosowania zewnętrznego, pochodne imidazolu i triazolu). Na powierzchnie modelu nabłonka jamy ustnej nakładano odpowiednią ilość kompozycji i inkubowano w 4 punktach czasowych przez 1, 2, 5 i 18 h celem wykreślenia krzywej odpowiedzi na czas kontaktu z kompozycją farmaceutyczną i wyznaczenia czasu granicznego, przy którym żywotność komórek zostaje zahamowana w 50% w stosunku do komórek w próbie kontrolnej. Efekt cytotoksyczny badanych kompozycji na żywotność modelu tkankowego oceniano za pomocą testu kolorymetrycznego MTT (badanie redukcji soli tetrazoliowej przez dehydrogenazę bursztynianową w komórkach aktywnych metabolicznie). Dodatkowo metodą cytometryczną przy użyciu cytometru przepływowego BD FACSCanto II z oprogramowaniem FCAP Array v3 software (BD Biosciences Systems, USA) określono wydzielanie interleukin prozapalnych w medium tkankowym. W tym celu zastosowano gotowy zestaw Human Inflammatory Cytokines Kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) a analizę przeprowadzono zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta oraz procedurą opisaną w literaturze [Czarnomysy R, Bielawska A., Bielawski K. Effect of 2nd and 3rd generation PAMAM dendrimers on proliferation, differentiation, and pro-inflammatory cytokines in human keratinocytes and fibroblasts. *Int. J. Nanomedicine* 2019, 14: 7123].

Do oceny korelacji między wynikami badań *in vitro* a efektem *in vivo* zastosowano model prognostyczny zgodnie z European Centre for Validation of Alternative Methods (EVCAM) zgodnie z którym potencjał drażniący preparatu jest prognozowany, jeżeli żywotność modelu tkankowego wyniesie poniżej 50%, a stężenie graniczne zdefiniowane dla  $IL-1 \geq 50$  pg/ml.

Wyniki badań żywotności zrekonstruowanego ludzkiego nabłonka jamy ustnej po aplikacji testowanych kompozycji bez substancji aktywnej zaprezentowano na Fig. 3(a), natomiast z 5% (w/w) ALA zaprezentowano na Fig. 3(b).

Żadna z kompozycji nie wykazała efektu drażniącego nawet po 18 h inkubacji. Najmniejszy wpływ na żywotność komórek modelu tkankowego wykazała kompozycja B3 według wynalazku oraz kompozycja dodatkowo zawierająca ALA (F3), choć należy podkreślić, że różnice w efekcie działania kompozycji B3 i F3 były niewielkie ( $p > 0,05$ ). Co istotne, obecność ALA nie zwiększa potencjału drażniącego.

Wydzielanie interleukiny 1beta w medium hodowlanym zmierzono cytometrycznie (Fig. 4).

Wydzielanie IL-1beta dla kompozycji bez substancji aktywnej (B1-B3) było niewielkie (poniżej 5 pg/ml) (Fig. 4a). Kompozycje według wynalazku zawierające ALA jako substancję aktywną (F1-F3) spowodowały umiarkowane uwalnianie IL-1beta, choć należy podkreślić, że jej poziom nie przekroczył 15 pg/ml i był istotnie niższy niż obserwowany dla kontroli pozytywnej – kationowo czynnego związku powierzchniowo czynnego o potwierdzonym działaniu drażniącym (Fig. 4b). Jedynie w przypadku punktu czasowego 5 h odnotowano wyższe stężenie IL-1beta w medium.

Zgodnie z klasyfikacją EU and GHS classification (R38/ Category 2 or no label) można zatem uznać kompozycje farmaceutyczne za niedrażniące nawet po 18 h inkubacji z modelem tkankowym.

Dodatkowo przeprowadzono analizę histopatologiczną w oparciu o wytyczne *International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria* (INHAND) opracowanych przez stowarzyszenia toksykologów i patologów z Europy (ESTP), Wielkiej Brytanii (BSTP), Japonii (JSTP), i Stanów Zjednoczonych (STP). Fragmenty nabłonka jamy ustnej *ex vivo* utrwalano w formalinie, po czym zatapiano w bloczkach parafinowych. Tkankę nabłonkową oceniano mikroskopowo (mikroskop Axiolab 5 wyposażony w kamerę Axiocam i program ZEN 2.0 (Zeiss) po uprzednim wybarwieniu materiału biologicznego metodą hematoksylina-eozyna.

W badaniu skupiono się na ocenie stopnia nasilenia zmian patologicznych komórek w zakresie wystąpienia keratynizacji (świadczącej o nieodwracalnym procesie o charakterze zwyrodnieniowym), atypii (wskazującej na wczesne zwyrodnienie odwracalne komórek), odklejania od membrany, apoptozy

oraz martwicy. Pod względem patofizjologicznym najpoważniejsze zmiany to martwica i apoptoza związane ze śmiercią komórek. Przykładowe zdjęcia zaprezentowano na Fig. 5.

W przypadku kompozycji według wynalazku zawierających substancje aktywne stwierdzono efekty cytotoksyczne o umiarkowanym stopniu nasilenia, przy czym ich wystąpienie w czasie było różne. Najpoważniejszą zmianą stwierdzoną była atypia o nasileniu umiarkowanym. Keratynizacja nabłonka oraz martwica miały nasilenie nieznaczne, a odklejenie od membrany oraz apoptoza wystąpiły w stopniu minimalnym. Wykazano, że kompozycją o największej cytotoksyczności jest F2. W przypadku kompozycji F3 obserwowano natomiast zmniejszanie stopnia nasilenia zmian w czasie.

W grupie kompozycji B1-B3 według wynalazku zmiany histopatologiczne nie wystąpiły (martwica) lub były minimalne – (nieznaczna atypia i apoptoza, keratynizacja o niewielkim stopniu nasilenia). Kompozycja B1 wykazała najmniejsze efekty cytotoksyczne, natomiast w przypadku kompozycji B2 i B3 obserwowano narastanie zmian cytotoksycznych wraz z upływem czasu inkubacji (efekt zależny od czasu). Należy wziąć pod uwagę, że zmiany (szczególnie w zakresie apoptozy) pojawiły się również w grupie kontrolnej NC. Może to wynikać z faktu, że tkanka, która znajduje się w środowisku *ex vivo* może reagować na czynniki środowiskowe w sposób patologiczny. Dodatkowo naturalnym procesem nabłonków jest dojrzewanie i złuszczenie się ich komórek, co w warunkach *ex vivo* dominuje nad procesami ich regeneracji.

Warto również podkreślić, że z uwagi na warunki fizjologiczne (wydzielanie śliny, ruchy żuchwy), przeciętny czas kontaktu preparatu z błoną śluzową nie przekracza 30–60 min. Powyższe wyniki wskazują zatem na bezpieczeństwo kompozycji według wynalazku w kontakcie z błoną śluzową jamy ustnej.

#### **Przykład 6**

##### *Badania dostępności farmaceutycznej i przenikania ALA przez wypreparowaną świńską błonę śluzową jamy ustnej dla kompozycji F1-F3 według wynalazku*

Dodatkowo dla kompozycji F1-F3 według wynalazku (zawierających ALA) przeprowadzono badania dostępności farmaceutycznej *in vitro* w teflonowej komorze ekstrakcyjnej farmakopealną metodą łopatkową oraz test przenikania *ex vivo* przez zwierzęcy model błony śluzowej policzka z zastosowaniem aparatu przepływowego wyposażonego w termostатовane komory dyfuzyjne zgodnie z aktualnymi wytycznymi *EMA In vitro skin permeation studies (IVPT)*.

W badaniu dostępności farmaceutycznej jako płyn akceptorowy zastosowano odgazowany płyn buforowy imitujący ślinę o pH 6,8 w ilości 100 ml. Doświadczenia prowadzono w temperaturze 37°C ± 0,5°C. W określonych punktach czasowych pobierano 2 ml płynu akceptorowego, który po przesączeniu przez celulozowe filtry strzykawkowe o średnicy porów 0,45 µm rozcieńczano odpowiednią ilością PBS. Stężenie ALA oznaczano metodą HPLC opracowaną przez Namjoshi i wsp. (2007). Ubytek medium uzupełniano świeżym płynem akceptorowym o temperaturze 37°C.

W badaniu przenikania wykorzystano świńską błonę śluzową policzka uzyskaną od zwierząt o masie ok. 200–250 kg (ubojnia Bost, Turośń Kościelna). Zastosowany materiał biologiczny uważany jest za podobny do ludzkiej błony śluzowej pod względem struktury, składu lipidowego, jak również zdolności zatrzymywania substancji chemicznych. Wypreparowaną bezpośrednio po zabiciu zwierzęcia tkankę myto i zamrażano w temperaturze -20°C w soli fizjologicznej. Przed rozpoczęciem doświadczeń materiał rozmrażano w temperaturze pokojowej, płukano roztworem soli fizjologicznej, po czym oddzielano błonę śluzową od warstwy mięśniowej przy użyciu narzędzi chirurgicznych. Proponowany test *ex vivo* z wykorzystaniem błony śluzowej nie wymagał zgody Lokalnej Komisji Bioetycznej. Wypreparowaną błonę śluzową po umieszczeniu w komorze dyfuzyjnej kondycjonowano medium akceptorowym (zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej PBS o pH 7,2) przez 60 min (36±1°C). Próbkę żelu (odpowiadającą 5 mg ALA) наносzono na powierzchnię błony śluzowej. Stężenie substancji leczniczej w komorze (zgodnie z zaleceniami *EMA In vitro skin permeation studies (IVPT)*) nie ograniczało szybkości i nie wpływało na stopień przenikania przez błonę śluzową. Płyn akceptorowy obmywał tkankę od strony warstwy mięśniowej. Wielkość powierzchni przenikania wynosiła 0,81 cm<sup>2</sup>. Doświadczenia prowadzono w temperaturze 36±1°C przez 3 h. W określonych punktach czasowych (tj., 30, 60, 90, 120 i 180 min) pobierano płyn akceptorowy, a ubytek medium uzupełniano świeżym płynem o temperaturze 36°C. Bezpośrednio przed analizą chromatograficzną próby sączono przez celulozowe filtry strzykawkowe o średnicy porów 0,22 µm. Po upływie 3 h, żel z powierzchni tkanki zaaspirowano do osobnego naczynia, a tkankę przemywano porcjami płynu imitującego ślinę SSF pH 6,8 (10 ml) w celu całkowitego usunięcia substancji leczniczej z powierzchni materiału biologicznego. Aspirat wraz z płynem przemywającym wytrząsano na łaźni wodnej (150 rpm, 30°C). Po przesączeniu (filtry nylonowe 0,45 µm), aspirat rozcieńczono PBS i analizowano ilościowo metodą chromatografii cieczowej. Po zakończeniu badania tkankę

cięto na kawałki, homogenizowano z wykorzystaniem fazy do HPLC i inkubowano 3 h w łaźni wodnej (30°C, 150 rpm). Po odwirowaniu (4000 rpm, 15 min) i przesączeniu przez filtry nylonowe o średnicy porów 0,45 µm, ilość substancji leczniczej kumulującej się w tkance oznaczono metodą chromatografii cieczerwowej.

Zaobserwowano pewne różnice w profilu uwalniania substancji fotouczulającej pomiędzy kompozycjami według wynalazku (Fig. 6). Zasadniczo najszybciej substancja aktywna uwalniała się z preparatu Ameluz (w 30 min testu w płynie akceptorowym odnotowano 77% początkowej dawki leku). W przypadku kompozycji według wynalazku F1 i F3 ok. 80% dawki leku odnotowano w 90 min testu. Już w pierwszych 30 min badania ilość ALA w płynie akceptorowym (zbuforowany płyn imitujący ślinę, SSF pH 6,8) przekroczyła 40% dla wszystkich badanych formułacji. Kompozycja F2 charakteryzowała się przedłużonym uwalnianiem substancji czynnej.

Odnotowano również różnice w stopniu przenikania leku z badanych kompozycji z ALA przez model tkankowy (Fig. 7). Kompozycje F1 i F3 istotnie poprawiały przenikanie substancji aktywnej szczególnie w drugiej części badania. Powyższe obserwacje korelują z wynikami dostępności farmaceutycznej (Fig. 6). Po 3 h testu odnotowano ok. 30% więcej substancji aktywnej w płynie akceptorowym w porównaniu do kompozycji F2. Należy podkreślić, że wszystkie kompozycje zwiększały przenikanie ALA w porównaniu do zarejestrowanego preparatu z ALA Ameluz (Referent) a F1 i F3 dodatkowo nasilały retencję substancji leczniczej w tkance (Fig. 7).

Kompozycja F1 umożliwiająca osiągnięcie szybkiego początku działania leku przy jednoczesnej wysokiej zdolności penetracji do głębszych warstw nabłonka wydaje się taką, która zawiera najbardziej optymalny nośnik dla fotouczulacza.

#### **Przykład 7**

##### *Badania aktywności mikrobiologicznej kompozycji C1-C3 z klotrimazolem według wynalazku.*

Aktywność przeciwgrzybiczą kompozycji C1-C3 zawierających klotrimazol wyznaczano metodą dyfuzyjno-agarową według wytycznych CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) [Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast, Approved Standard, CLSI document M-27-A3, 3rd ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne, USA, **2008**; Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast. Third Informational Supplement, CLSI document M27-S3; Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne, USA, **2008**]. Metoda ta określa wrażliwość badanego szczepu na podstawie wielkości średnicy strefy zahamowania wzrostu wokół studzienki (krążka) wypełnionej preparatem. Do badań wykorzystano szczepy wzorcowe *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilopsis* ATCC 22019 oraz *Candida krusei* ATCC 6528. Badane szczepy grzybów drożdżopodobnych zawieszano w jałowym roztworze fizjologicznym 0,9% NaCl. Następnie wysiewano je na płytki z podłożem Sabourand uzyskując gęstość końcową  $1,4 \times 10^6$  cfu/ml (co odpowiada 0,5 w skali *Mc Farlanda*). Na powierzchnię posiewu, do wydrążonych w podłożu studzienek o średnicy 8 mm w warunkach aseptycznych wprowadzano 100 mg badanych kompozycji C1-C3 oraz kontroli (preparatu klotrimazolu w kremie Clotrimazolum GSK, 10 mg/g oraz roztworu klotrimazolu w dimetylosulfotlenku 5 mg/g oraz 10 mg/g). Płytki inkubowano w temperaturze  $37^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$  przez 24 h, po czym mierzono z dokładnością do 0,1 mm średnicę stref zahamowania wzrostu kolonii grzybów wokół studzienek.

Wykazano, że kompozycje C1-C3 istotnie hamują wzrost wszystkich badanych szczepów *Candida* sp. ( $p < 0,05$ ) w odniesieniu do preparatu referencyjnego Clotrimazolum GSK w kremie i wykazują lepsze zdolności penetracji emulżelu w głąb medium hodowlanego. Odnotowano niewielkie różnice w wielkości stref zahamowania wzrostu pomiędzy poszczególnymi szczepami. Pośród badanych, kompozycja C3 wykazuje silniejszą aktywność wobec *C. albicans* i *C. krusei*, natomiast C2 w największym stopniu hamuje wzrost *C. parapsilopsis*. Należy podkreślić, że nie zaobserwowano istotnych różnic w aktywności przeciwgrzybiczej pomiędzy kompozycjami z klotrimazolem w stężeniu 5 mg/g oraz 10 mg/g. Otrzymane wyniki wskazują, że działanie przeciwgrzybicze klotrimazolu może być związane ze stopniem jego rozpuszczalności w preparacie/kompozycji. Należy przy tym podkreślić, że badane kompozycje z klotrimazolem w stężeniu 5 mg/g odznaczają się lepszą aktywnością *in vitro* wobec grzybów drożdżopodobnych w odniesieniu do dostępnego na rynku preparatu Clotrimazolum GSK w kremie z klotrimazolem w stężeniu 10 mg/g. Wyniki przedstawiono odpowiednio w tabelach 5–7.

**Tabela 5.** Aktywności kompozycji według wynalazku z klotrimazolem C1-C3 oraz Clotrimzaolum GSK krem wobec szczepu *Candida albicans* ATCC 10231 (średnia  $\pm$  S.D.; n = 3).

Kompozycja	Średnia wartość strefy zahamowania wzrostu (mm)
Placebo (dimetylosulfotlenek)	0
Klotrimazol 5000 $\mu\text{g/g}$	35,0 $\pm$ 2,9
Klotrimazol 10000 $\mu\text{g/g}$	44,0 $\pm$ 3,8
C1 5000 $\mu\text{g/g}$	37,1 $\pm$ 2,8
C1A 10000 $\mu\text{g/g}$	39,2 $\pm$ 2,1*
C2 5000 $\mu\text{g/g}$	37,1 $\pm$ 3,0
C2A 10000 $\mu\text{g/g}$	38,9 $\pm$ 2,9*
C3 5000 $\mu\text{g/g}$	40,1 $\pm$ 2,0*
C3A 10000 $\mu\text{g/g}$	39,0 $\pm$ 2,2*
Clotrimazolum GSK krem 10000 $\mu\text{g/g}$	33,8 $\pm$ 2,0

\* *test Mann-Whitney; p < 0,05 w odniesieniu do Clotrimazolum GSK w kremie*

**Tabela 6.** Aktywności kompozycji według wynalazku z klotrimazolem C1-C3 oraz Clotrimzaolum GSK krem wobec szczepu *Candida parapsilopsis* ATCC 6528 (średnia  $\pm$  S.D.; n = 3).

Kompozycja	Średnia wartość strefy zahamowania wzrostu (mm)
Placebo (dimetylosulfotlenek)	17,0 $\pm$ 3,8
Klotrimazol 5000 $\mu\text{g/g}$	59,0 $\pm$ 4,9
Klotrimazol 10000 $\mu\text{g/g}$	62,0 $\pm$ 3,1
C1 5000 $\mu\text{g/g}$	45,1 $\pm$ 2,1*
C1A 10000 $\mu\text{g/g}$	45,2 $\pm$ 2,7*
C2 5000 $\mu\text{g/g}$	48,1 $\pm$ 3,0*
C2A 10000 $\mu\text{g/g}$	49,0 $\pm$ 2,9*
C3 5000 $\mu\text{g/g}$	47,2 $\pm$ 2,1*
C3A 10000 $\mu\text{g/g}$	44,1 $\pm$ 3,0
Clotrimazolum GSK krem 10000 $\mu\text{g/g}$	41,1 $\pm$ 2,0

\* *test Mann-Whitney; p < 0,05 w odniesieniu do Clotrimazolum GSK w kremie*

**Tabela 7.** Aktywności kompozycji według wynalazku z klotrimazolem C1-C3 oraz Clotrimazolium GSK krem wobec szczepu *Candida krusei* ATCC 22019 (średnia  $\pm$  S.D.; n = 3).

Kompozycja	Średnia wartość strefy zahamowania wzrostu (mm)
Placebo (dimetylosulfotlenek)	0
Klotrimazol 5000 $\mu\text{g/g}$	43,2 $\pm$ 2,1
Klotrimazol 10000 $\mu\text{g/g}$	47,2 $\pm$ 3,1
C1A 5000 $\mu\text{g/g}$	35,8 $\pm$ 1,5*
C1 10000 $\mu\text{g/g}$	35,7 $\pm$ 0,9*
C2 5000 $\mu\text{g/g}$	35,9 $\pm$ 3,0*
C2A 10000 $\mu\text{g/g}$	36,2 $\pm$ 1,8*
C3A 10000 $\mu\text{g/g}$	35,6 $\pm$ 0,5*
Clotrimazolium GSK krem 10000 $\mu\text{g/g}$	32,3 $\pm$ 0,7

\* *test Mann-Whitney; p < 0,05 w odniesieniu do Clotrimazolium GSK w kremie*

### Przykład 8

#### Badania skuteczności działania kompozycji F1 z kwasem delta-aminolewulinowym według wynalazku.

W oparciu o powyższe wyniki oraz ocenę sensoryczną na grupie ochotników w Zakładzie Chorób Przyzębia i Błony Śluzowej UMB wytypowano kompozycję F1 do dalszych badań na ochotnikach.

Do badań zakwalifikowano 79 pacjentów z potwierdzonymi histopatologicznie zmianami liszaja płaskiego błony śluzowej jamy ustnej (OLP). Pacjentów zrandomizowano do dwóch grup. W grupie pierwszej (I) ogniska OLP poddano terapii fotodynamicznej (5 sesji). W grupie drugiej (II) wdrożono farmakoterapię miejscową, gdzie na zmianę chorobową aplikowano steryd 2 x w ciągu dnia przez okres 2 tygodni. Pacjenci z obu grup zostali objęci 6-cio miesięcznym okresem obserwacji.

Własny protokół PDT zakładał użycie kwasu delta-aminolewulinowego (ALA), który aplikowano na osuszoną ze śliny zmianę i otaczającą błonę śluzową (warstwa około 2 mm) na 40 minut przed naświetlaniem lampą diodową FotoSan® 630 dostarczającą z końca światłowodu promieniowanie o długości fali 630 nm. Sesje PDT powtarzano 5 – krotnie w odstępach cotygodniowych.

Przed rozpoczęciem leczenia oraz 1, 3 i 6 miesięcy po wdrożonej procedurze (grupa I i II) wykonywano dokumentację fotograficzną oraz makroskopowo oceniano wielkość zmian (w centymetrach) przy użyciu sondy periodontologicznej PCPUNC 15 (Hu-Friedy, IL, USA). Pomiar dotyczył długości i szerokości najdłuższego odcinka łączącego skrajne punkty w obrębie ogniska chorobowego i granicy zdrowej błony śluzowej.

Okres 6-miesięcznej obserwacji ukończyło 79 osób (14 mężczyzn i 65 kobiet):

- grupa I – 46 osób (83 ogniska OLP)
- grupa II – 33 osoby (50 ognisk OLP).

Spośród 133 zmian OLP, 113 (84,96%) zlokalizowanych było na wyścielającej błonie śluzowej: 93 na policzkach, 18 na bocznej powierzchni języka i 1 na błonie śluzowej wargi dolnej. Dwadzieścia jeden ognisk występowało na żującej błonie śluzowej: 17 na dziąśle, 3 na podniebieniu i 1 na grzbietowej powierzchni języka.

Terapii fotodynamicznej (grupa I) poddano 83 ogniska OLP: 70 umiejscowionych na wyścielającej błonie śluzowej (55 na policzkach, 15 na bocznej powierzchni języka), 13 – na żującej (rogowaciejącej) błonie śluzowej (9 na dziąsłach, 3 na podniebieniu i 1 na grzbietowej powierzchni języka).

Średnia wielkość ognisk OLP w grupie I przed leczeniem wynosiła 2,29 cm<sup>2</sup>  $\pm$  1,65. Średnia wielkość zmian zlokalizowanych na nierogowaciejącej błonie śluzowej była większa (2,39 cm<sup>2</sup>  $\pm$  1,74) w porównaniu do zmian występujących na żującej błonie śluzowej (1,74 cm<sup>2</sup>  $\pm$  0,84). Sześć miesięcy po terapii PDT poprawę stwierdzono w 72 miejscach, w tym w 47 – całkowite ustąpienie zmian, co wskazuje, że na terapię zareagowało (odpowiedziało) 86,75% leczonych ognisk OLP. Średnia redukcja

wielkość zmian wynosiła 74,24%, przy zmniejszeniu średniej wielkości pola powierzchni do  $0,59 \text{ cm}^2 \pm 1,06$ . Po okresie 6 miesięcznej obserwacji odnotowano 79,08% redukcję wielkości zmian zlokalizowanych na wyścielającej błonie śluzowej (z  $2,39 \text{ cm}^2 \pm 1,74$  do  $0,5 \text{ cm}^2 \pm 1,00$ , zmniejszenie średniej wielkości o  $1,89 \text{ cm}^2$ ). Ogniska OLP zlokalizowane na żującej błonie śluzowej wykazały zmniejszenie powierzchni o  $0,62 \text{ cm}^2$  (z  $1,72 \text{ cm}^2 \pm 0,84$  do  $1,12 \text{ cm}^2 \pm 1,26$ ), przy 35,64% redukcji ich wielkości.

Średnia wielkość ognisk OLP w grupie II przed leczeniem wynosiła  $2,42 \text{ cm}^2 \pm 2,08$ . Zmian zlokalizowanych na wyścielającej błonie śluzowej było 42 (średnia wielkość:  $2,63 \text{ cm}^2 \pm 2,19$ ), na dziąśle – 8 (średnia wielkość:  $2,02 \text{ cm}^2 \pm 1,32$ ). Po półrocznej obserwacji poprawę stwierdzono w 24 miejscach, w tym w 12 – całkowite ustąpienie zmian. Spośród 50 zmian poddanych miejscowemu działaniu sterydu, w 26 miejscach (52%) nie odnotowano odpowiedzi na leczenie, a w 2 z nich zaobserwowano zaostrenie choroby i wzrost ekspresji zmian OLP wyrażonej wzrostem wielkości ognisk.

Średnia redukcja wielkości zmian wyniosła 36,37%. Redukcja wielkości zmian zlokalizowanych na wyścielającej błonie śluzowej wynosiła 40,69% 5 (zmniejszenie pola powierzchni z  $2,63 \text{ cm}^2 \pm 2,19$  do  $1,56 \text{ cm}^2 \pm 2,32$ ). Ogniska liszaja umiejscowione na żującej błonie śluzowej nie zareagowały na leczenie. Odnotowano wzrost ich wielkości o 11,36% (wzrost pola powierzchni o  $0,15 \text{ cm}^2$  do  $1,47 \text{ cm}^2 \pm 1,47$ ).

Otrzymane wyniki wskazują na wyższą skuteczność terapii PDT z wykorzystaniem kompozycji według wynalazku w postaci emulżelu z ALA w porównaniu do miejscowej kortykosteroidoterapii w leczeniu liszaja płaskiego jamy ustnej.

W grupie I odnotowano istotnie wyższą redukcję wielkości ognisk OLP w porównaniu do grupy II (74,24% vs 36,37%) ( $p < 0,001$ ) (Tabela 8).

**Tabela 8.** Średnia wielkość, odchylenie standardowe i średnia redukcja zmian OLP w badanych grupach (grupa I i grupa II) przed i po leczeniu.

<i>Gru pa</i>	<i>Liczba osób</i>	<i>Liczb a zmian</i>	<i>Średnia wielkość zmian [cm<sup>2</sup>] i odchylenie standardowe</i>	<i>Średnia redukcja zmian</i>	<i>p- poziom istotności</i>
I	46	83	2,29±1,65	72,74%	<b>p&lt;0,001</b>
II	33	50	2,42±2,08	6,37%	p=0,056

#### Literatura:

1. Potaś J. i wsp, *Tragacanth gum/chitosan polyelectrolyte complexes-based hydrogels enriched with xanthan gum as promising materials for buccal application. Materials* 2020
2. Prezotti F. G. *Mucoadhesive films based on gellan gum/pectin blends as potential platform for buccal drug delivery. Pharm Dev Technol* 2020
3. Sulewska M. i wsp. *A clinical evaluation of efficacy of photodynamic therapy in treatment of reticular oral lichen planus: a case series. Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2019
4. Khatler NJ, Khan MAB. *Clotrimazole. [Updated 2022 Jul 11]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560643/>*

#### Zastrzeżenia patentowe

1. Kompozycja farmaceutyczna o właściwościach mukoadhezyjnych zawierająca amfoterycyny promotor wchłaniania wybrany z grupy obejmującej żelatynę i lecytynę, olej roślinny, środki konserwujące, humektant wybrany z grupy obejmującej glikol propylenowy, glicerol, glikol polietylenowy i ich kombinację, wodę oraz co najmniej jedną naturalną gumę wybraną z grupy obejmującej gumę gellan, tragakantę, gumę ksantanową oraz ich kombinację, **znamienna tym**, że zawartość gumy naturalnej zawiera się w przedziale od 2 do 8% w/w a stosunek

- amfoterycznego promotora wchłaniania: oleju roślinnego: środków konserwujących: humektanta wyrażony w % w/w zawiera się w przedziałach 0,3 do 0,7: 1,7 do 2,3: 0,1 do 0,3: 3 do 7; przy czym zawartość wody stanowi uzupełnienie do 100% w/w.
2. Kompozycja według zastrz. 1, **znamienna tym**, że amfoteryczny promotor wchłaniania oznacza lecytynę.
  3. Kompozycja według zastrz. 1, **znamienna tym**, że humektant oznacza glikol propylenowy.
  4. Kompozycja według któregośkolwiek z zastrz. od 1 do 3, **znamienna tym**, że olej roślinny jest wybrany z grupy obejmującej olej rycynowy, arachidowy, bawełniany, krokoszowy, lniany, migdałowy, rzepakowy, sezamowy, sojowy, słonecznikowy, wiesiołkowy, z kielków pszenicy, z ogórecznika lekarskiego, z oliwek i ich kombinację.
  5. Kompozycja według zastrz. 4, **znamienna tym**, że olej roślinny oznacza olej rycynowy.
  6. Kompozycja według któregośkolwiek z zastrz. od 1 do 5, **znamienna tym**, że środki konserwujące są wybrane z grupy obejmującej wersenian disodowy, benzoesan sodu, kwas benzoowy, kwas sorbowy, sorbinian potasu, chlorek benzalkonium i ich kombinację.
  7. Kompozycja według zastrzeżenia 6, **znamienna tym**, że środki konserwujące oznaczają kombinację wersenianu disodowego i benzoesanu sodu w stosunku 1:1.
  8. Kompozycja według któregośkolwiek z zastrz. od 1 do 7, **znamienna tym**, że guma gellan oznacza formę wysoko acylowaną.
  9. Kompozycja według któregośkolwiek z zastrz. od 1 do 8, **znamienna tym**, że lepkość trągakanty mierzona dla roztworu o stężeniu 1% wynosi 150 do 250 cPas w temperaturze  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .
  10. Kompozycja według któregośkolwiek z zastrz. od 1 do 9, **znamienna tym**, że lepkość gumy ksantanowej mierzona dla roztworu o stężeniu 1% wynosi 1450 do 1550 cPas w temperaturze  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .
  11. Kompozycja według dowolnego z zastrz. od 1 do 10, **znamienna tym**, że naturalna guma oznacza tragakantę w ilości zawierającej się w przedziale 3 do 7% w/w.
  12. Kompozycja według dowolnego z zastrz. od 1 do 10, **znamienna tym**, że naturalna guma oznacza kombinację trągakanty z gumą ksantanową w ilościach wyrażonych w % w/w odpowiednio zawierających się w przedziałach dla trągakanty od 3 do 7% w/w, a dla gumy ksantanowej od 0,3 do 1,2% w/w.
  13. Kompozycja według dowolnego z zastrz. od 1 do 10, **znamienna tym**, że naturalna guma oznacza kombinację gumy ksantanowej z gumą gellan w ilościach wyrażonych w % w/w odpowiednio zawierających się w przedziałach dla gumy ksantanowej od 1,7 do 2,3% w/w a dla gumy gellan 0,5 do 1% w/w.
  14. Kompozycja farmaceutyczna o właściwościach mukoadhezyjnych zawierająca amfoteryczny promotor wchłaniania wybrany z grupy obejmującej żelatynę i lecytynę, olej roślinny, środki konserwujące, humektant wybrany z grupy obejmującej glikol propylenowy, glicerol, glikol polietylenowy i ich kombinację, wodę oraz co najmniej jedną naturalną gumę wybraną z grupy obejmującej gumę gellan, tragakantę, gumę ksantanową oraz ich kombinację, **znamienna tym**, że zawartość gumy naturalnej zawiera się w przedziale od 2 do 8% w/w a stosunek amfoterycznego promotora wchłaniania: oleju roślinnego: środków konserwujących: humektanta wyrażony w % w/w zawiera się w przedziałach 0,3 do 0,7: 1,7 do 2,3: 0,1 do 0,3: 3 do 7 i zawiera substancję aktywną farmaceutycznie przeznaczoną do leczenia chorób jamy ustnej wybraną z grupy obejmującej substancje przeciwgrzybicze i substancje fotouczulające przy czym substancja aktywna jest obecna w ilości zawierającej się w przedziale 0,3 do 7% w/w, przy czym zawartość wody stanowi uzupełnienie do 100% w/w.
  15. Kompozycja według zastrz. 14, **znamienna tym**, że substancja przeciwgrzybicza oznacza klotrimazol obecny w ilości pomiędzy 0,3 a 1,2% w/w.
  16. Kompozycja według zastrz. 14, **znamienna tym**, że substancja fotouczulająca jest wybrana z grupy obejmującej kwas delta-aminolewulinowy w postaci chlorowodoru oraz jego ester metylowy w ilości pomiędzy 3 a 7% w/w, korzystnie kwas delta-aminolewulinowy w postaci chlorowodoru.
  17. Kompozycja według któregośkolwiek z zastrz. od 1 do 15 oraz kompozycja według któregośkolwiek z zastrzeżeń 14 do 16 **znamienna tym**, że ma postać żelu, korzystnie emulżelu.

18. Kompozycja według któregokolwiek z zastrz. od 1 do 15 oraz kompozycja według któregokolwiek z zastrzeżeń od 14 do 16, **znamienna tym**, że zawiera dodatkowo płynny aromat wybrany z grupy obejmującej aromat wiśniowy i miętowy w ilości 0,04% w/w.
19. Kompozycja jak określono w którymkolwiek z zastrz. od 1 do 15 oraz kompozycja według któregokolwiek z zastrzeżeń od 14 do 16, do zastosowania w łagodzeniu przebiegu i leczeniu chorób jamy ustnej.
20. Kompozycja według zastrz. 19, **znamienna tym**, że leczenie chorób jamy ustnej oznacza terapię fotodynamiczną.
21. Kompozycja według zastrz. 19 albo 20, **znamienna tym**, że choroby jamy ustnej wybrane są z chorób grzybiczych i stanów przednowotworowych.
22. Kompozycja według zastrz. 21, **znamienna tym**, że stan przednowotworowy oznacza liszaj płaski błony śluzowej jamy ustnej.
23. Kompozycja według zastrz. 21, **znamienna tym**, że choroba grzybicza oznacza kandydozę jamy ustnej wywołaną przez *Candida* sp.

### Rysunki

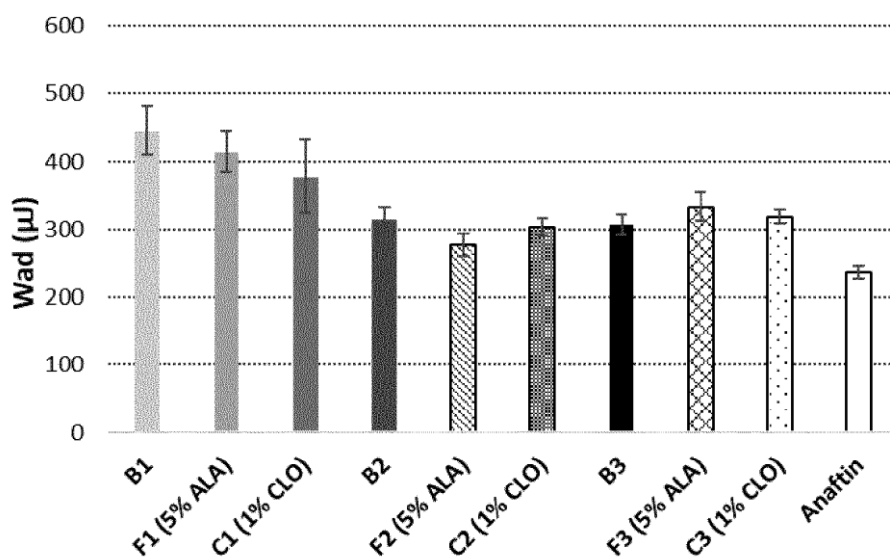


Fig. 1

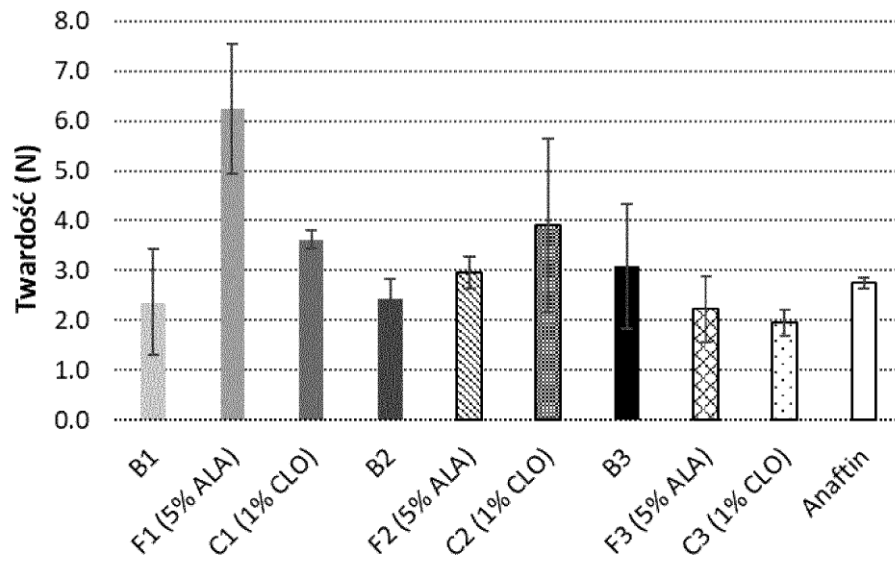


Fig. 2(a)

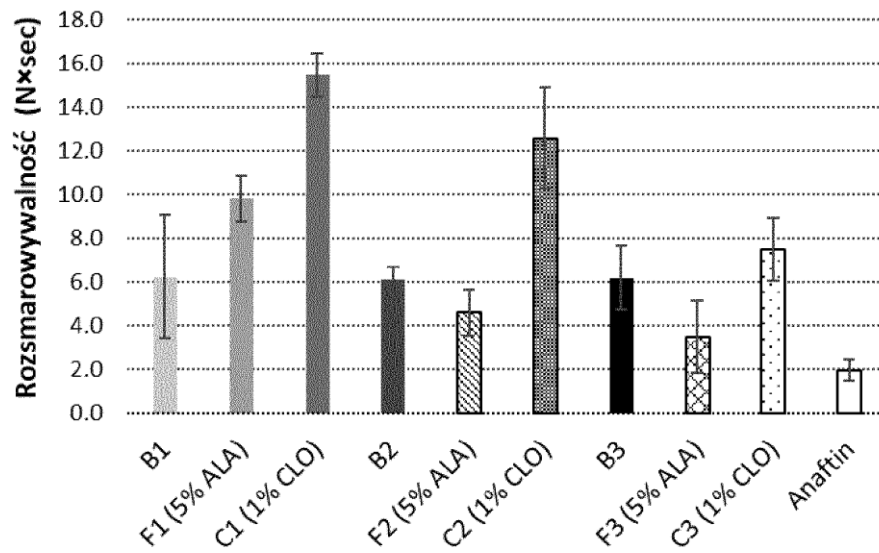


Fig. 2(b)

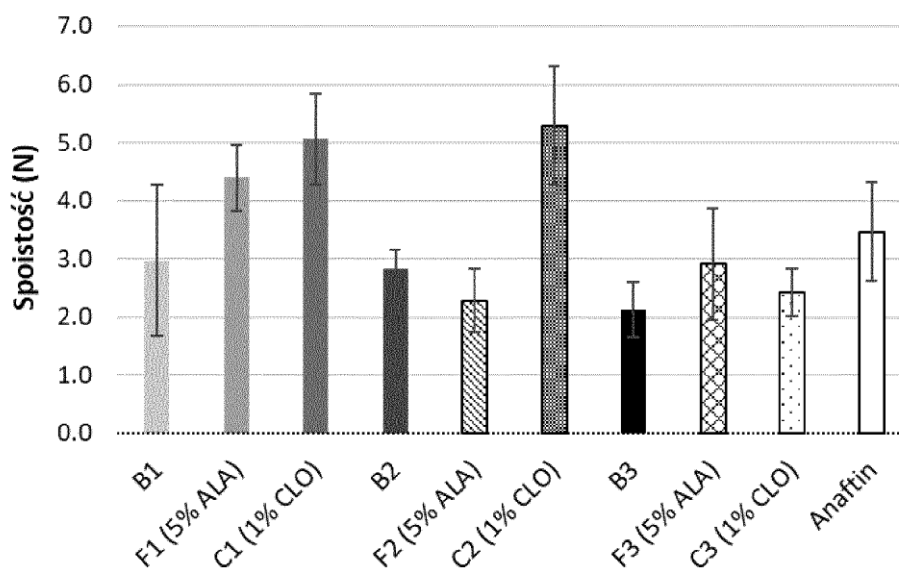


Fig. 2(c)

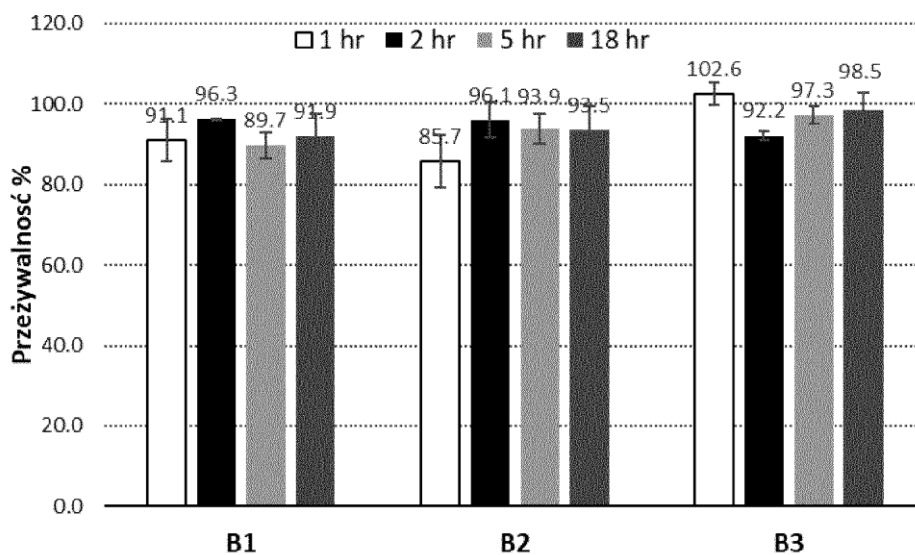


Fig. 3(a)

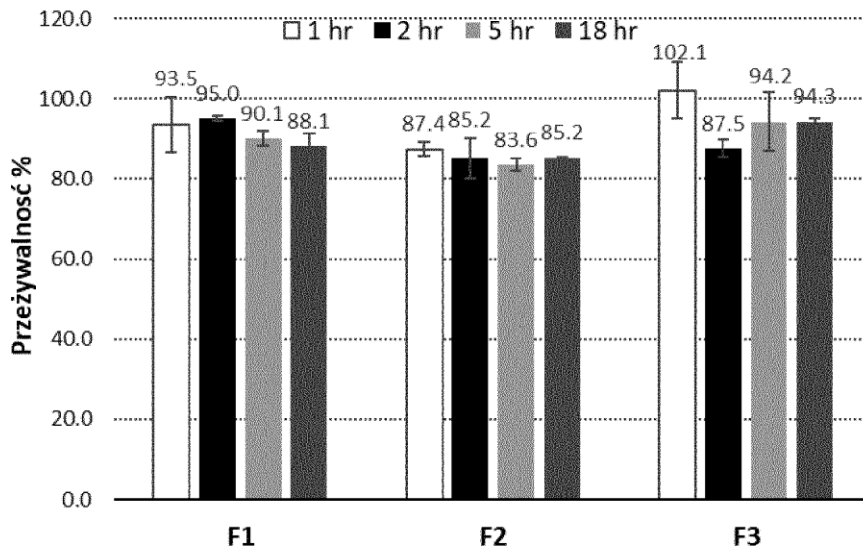


Fig. 3(b)

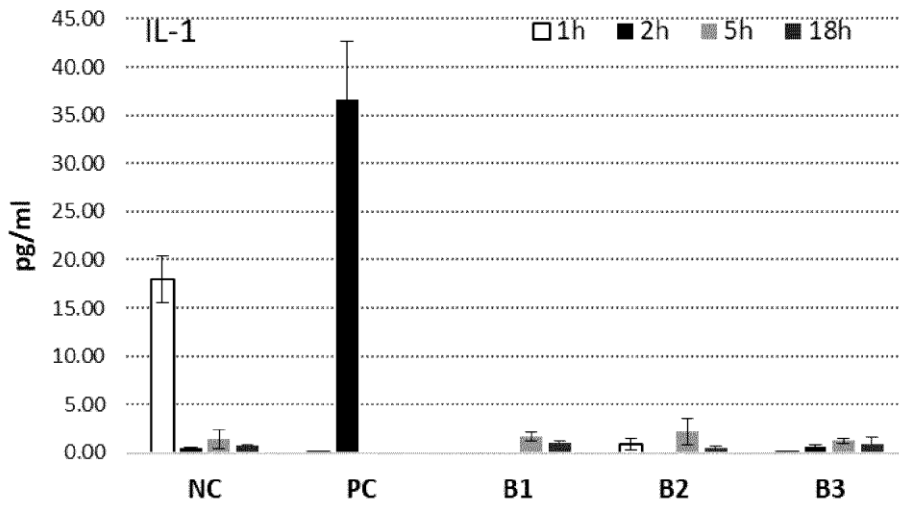


Fig. 4(a)

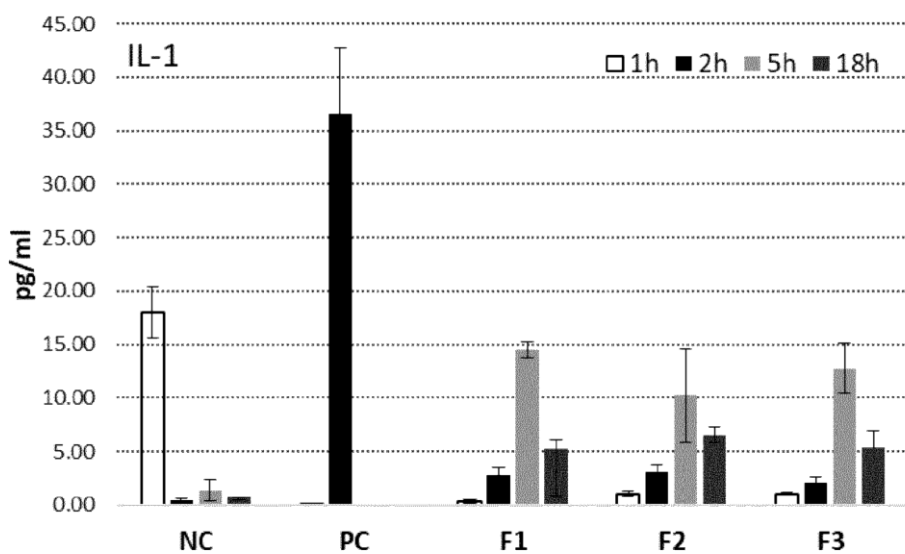


Fig. 4(b)

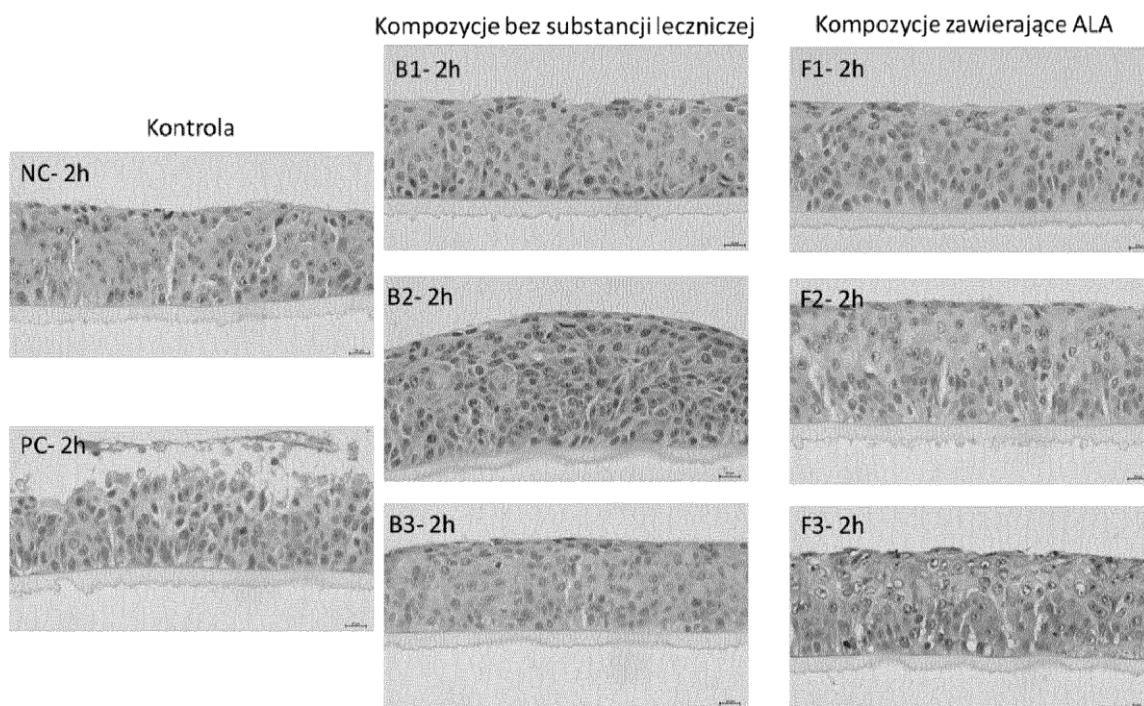


Fig. 5(a)

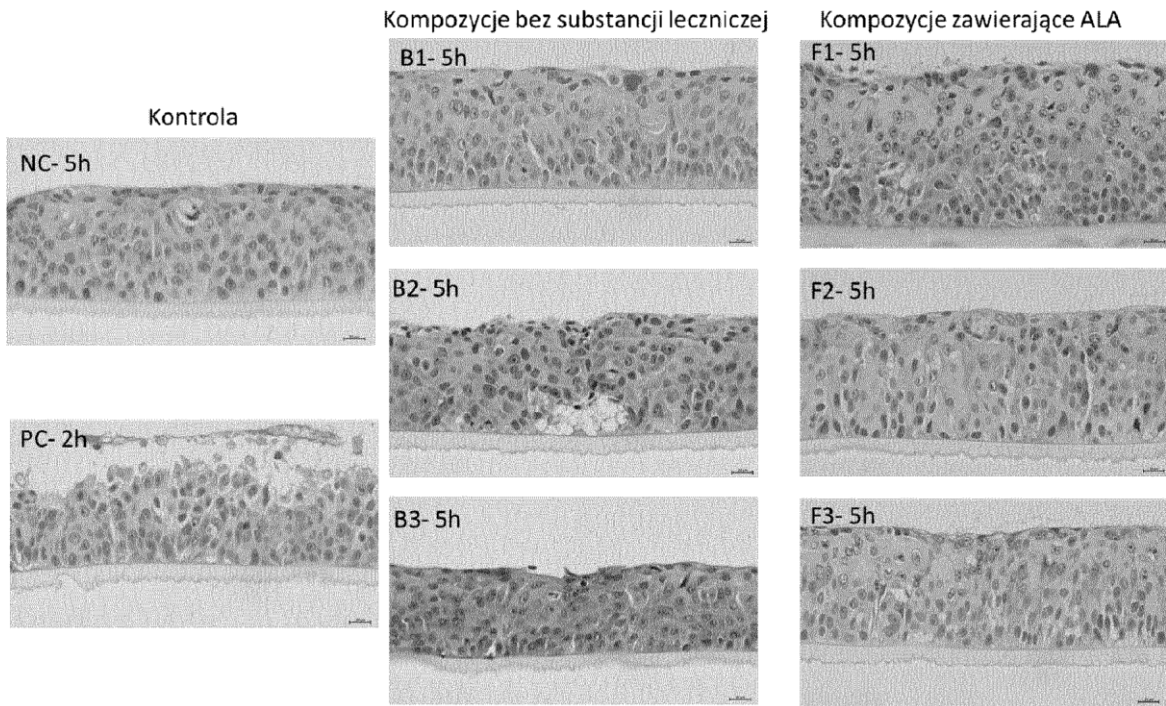


Fig. 5(b)

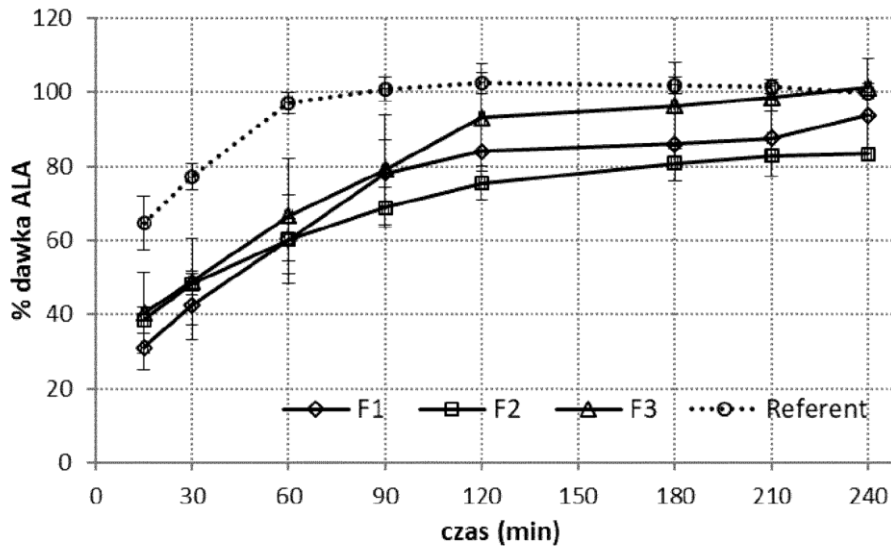


Fig. 6

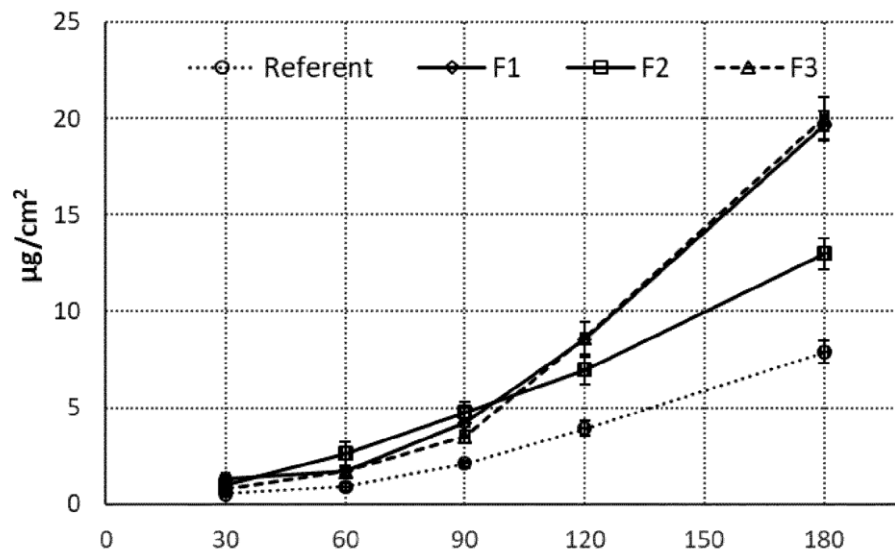


Fig. 7(a)

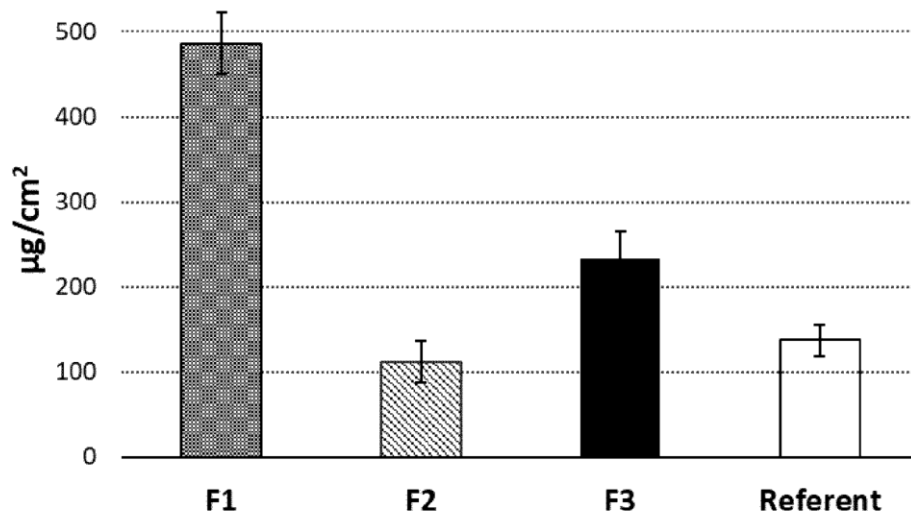


Fig. 7(b)