

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 201790361 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2017.06.30(51) Int. Cl. A61K 9/66 (2006.01)  
A61K 31/045 (2006.01)  
A61K 47/30 (2006.01)(22) Дата подачи заявки  
2015.08.10

## (54) ДОСТАВКА БИОАКТИВНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ, ЗАКЛЮЧЕННЫХ В НАНОКАПСУЛЫ

(31) 62/035,683; 62/172,455

(32) 2014.08.11; 2015.06.08

(33) US

(86) PCT/US2015/044483

(87) WO 2016/025394 2016.02.18

(88) 2016.05.19

(71) Заявитель:

БОРД ОФ СЬЮПЕРВАЙЗОРЗ ОФ  
ЛУИЗИАНА СТЭЙТ ЮНИВЕРСИТИ  
ЭНД ЭГРИКАЛЧУРАЛ ЭНД  
МЕКЭНИКАЛ КОЛЛЕДЖ  
(US); ЮЛИЮ ХАЦЬЕГАНУ  
ЮНИВЕРСИТИ ОФ МЕДСИН ЭНД  
ФАРМЕСИ (RO)

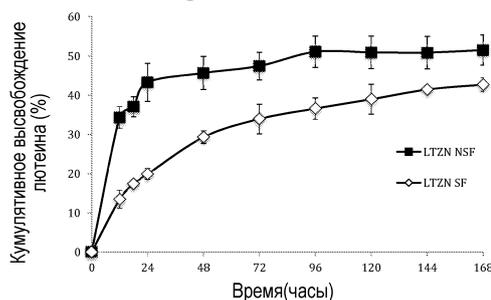
(72) Изобретатель:

Сабиллов Кристина М., Астете Карлос  
Э. (US), Бодоки Еде, Востинару  
Оливиу, Самойла Овидиу Чипрьян,  
Динте Елена (RO)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Раскрыты способы и композиции для доставки лютеина или другого антиоксиданта в биоактивной форме к целевым тканям, таким как ткани глаза, и одновременно защищающие антиоксидант от деградации. Антиоксидант заключен в наночастицы, содержащие белок, такой как зеин, или полимер, такой как сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA). Предпочтительно наночастицы также связаны с поверхностно-активным веществом, обеспечивающим дополнительную защиту антиоксиданта. После введения наночастиц в целевую ткань биоактивный антиоксидант высвобождается в ткань в течение определенного периода времени. Наночастицы необязательно смешивают с термочувствительным биоадгезивным гелем, способствующим медленному высвобождению антиоксиданта. Указанные способы и композиции применимы для лечения или профилактики таких состояний, как возрастная дегенерация желтого пятна или катаракты.



A1

201790361

201790361

A1



зеленые побеги пшеницы, зеленые побеги ячменя, капуста кормовая, шпинат, брокколи, зеленая фасоль, зеленый горошек, фасоль, кочанная капуста, листовая капуста, зелень горчицы и репы), некоторых цветах (например, в лепестках цветков календулы), некоторых желтых фруктах и овощах (таких как морковь, персики, манго, папайя, тыква и апельсины), яичных желтках, куриной коже и курином жире. В кукурузе, например, лютеин находится в основном в роговидном эндосперме. Лепестки цветка календулы (*Tagetes erecta*) также являются превосходным источником лютеина, хотя и более дорогим, чем кукуруза.

[0006] Лютеин содержит последовательность из десяти сопряженных углерод-углеродных двойных связей. Благодаря сопряженной структуре лютеин может функционировать в биологической системе как первичный антиоксидант, улавливая радикалы, такие как перекисные радикалы, однако высокая степень сопряжения также придает лютеину склонность к деградации под действием света, кислорода и нагревания. Склонность к деградации осложняет доставку лютеина к тканям, если существует потребность в такой доставке.

[0007] Гидроксильные группы делают лютеин более полярным, чем его немодифицированный аналог  $\beta$ -каротин. Лютеин способен растворяться как в неполярных, так и в полярных растворителях. См. таблицу 1.

А. Физические свойства лютеина	
Молекулярная формула	$C_{40}H_{56}O_2$
Молекулярная масса	568,85
Температура плавления	183-190°C
Внешний вид	Желтые призмы с металлическим блеском
Стабильность	Нестабилен при воздействии света и кислорода; Стабилен при хранении при -20°C в атмосфере азота
Растворимость	Нерастворим

В воде			
В. Растворимость лютеина в органических растворителях			
Растворитель	Растворимость (мг/л)	Растворитель	Растворимость (мг/л)
Ацетон	800	Этилацетат	800
Ацетонитрил	100	Этиловый эфир	2000
Бензол	600	Гексан	20
Хлороформ	6000	2-Пропанол	400
Циклогексан	50	Метиловый спирт	200
Циклогексанон	4000	Метил-трет- бутиловый эфир	2000
Диметил формаид	1000	Тетрагидрофуран	8000
Этиловый спирт	300	Толуол	500

Таблица составлена на основе материалов J.I.X. Antony *et al.*, "Lutein," *The World of Food Ingredients*, April/May, pp. 64-67 (2001)

*Роль лютеина в здравоохранении и развитии болезней*

[0008] Лютеин снижает риск развития некоторых заболеваний и уменьшает симптомы некоторых заболеваний, в частности, глазных заболеваний, таких как возрастная макулярная дегенерация (AMD), а также заболеваний, связанных с развитием кровеносных сосудов, таких, как рак молочной железы и рак толстой кишки. AMD представляет собой дегенеративное состояние участка сетчатки, который отвечает за центральное зрение. AMD является наиболее частой причиной необратимой потери зрения у пожилых людей. Каротиноиды в глазах сосредоточены во внутреннем слое макулы сетчатки глаза. Данные, полученные в исследованиях на людях, позволяют предположить, что потребление каротиноидов с пищей может способствовать их накоплению в сетчатке, и, предположительно, обеспечить защиту от дегенерации сетчатки. Однако лютеин является нерастворимым в воде, что затрудняет эффективную доставку биологически активного лютеина к целевым тканям, таким как сетчатка, без деградации. Существует

потребность в способах и композициях, обеспечивающих эффективную доставку биоактивного лютеина и других антиоксидантов к целевым тканям живого организма, таким как сетчатка, в биологически активной форме без деградации. Насколько известно авторам изобретения, сообщения о композициях, подходящих для местного введения в ткани глаза, обеспечивающих доставку лютеина к внутренней части глаза, в том числе, к сетчатке, отсутствуют.

[0009] Лютеин защищает клетки пигментного эпителия сетчатки (RPE) от фотоокислительного повреждения благодаря его способности поглощать коротковолновое излучение в синей части спектра, особенно с длиной волны примерно 445 нм. Лютеин также может модулировать воспаление, и может способствовать, по меньшей мере частично, разрыву порочного цикла между окислительным стрессом и воспалительной реакцией в RPE. Кроме того, благодаря способности гасить синглетный кислород, лютеин может участвовать в подавлении состояний, возникающих в результате окислительного стресса, таких как сердечно-сосудистые заболевания, инсульт, рак легких, рак молочной железы и рак толстой кишки. Лютеин характеризуется низкой растворимостью в воде, плохой абсорбцией *in vivo* и низкой биологической доступностью. Существует потребность в усовершенствованных системах доставки, позволяющих использовать способность лютеина функционировать в качестве антиоксиданта, а также улучшить его физико-химическую стабильность при обработке и хранении.

[0010] В Mitri, K.; Shegokar, R.; Gohla, S.; Anselmi, C.; Muller, R. H., Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: preparation, characterization, stability and performance. *International journal of pharmaceutics* **2011**, 414 (1-2), 267-75 описано применение липидных наноносителей для дермальной доставки лютеина, например, для его применения в качестве дермального антиоксиданта, противострессового средства или синего светофильтра. Тестируемые липидные наноносители включают в себя твердые липидные наночастицы, наноструктурированные липидные носители и наноземulsionи. Исследования проникновения через свежую кожу уха свиньи демонстрируют, что лютеин не проникает через кожу, или проникает в очень низкой степени,

позволяя предположить, что активный лютеин остается в коже, не подвергаясь системной абсорбции.

[0011] В Tan, C.; Xia, S.; Xue, J.; Xie, J.; Feng, B.; Zhang, X., Liposomes as vehicles for lutein: preparation, stability, liposomal membrane dynamics, and structure. *Journal of agricultural and food chemistry* **2013**, *61* (34), 8175-8184, описаны наблюдения за влиянием лютеина на стабильность липосомальных мембран с целью потенциального применения заключенного в нанокапсулы лютеина в составе нутрицевтиков и функциональных продуктов питания.

[0012] В Mitri, K.; Shegokar, R.; Gohla, S.; Anselmi, C.; Muller, R. H., Lutein nanocrystals as antioxidant formulation for oral and dermal delivery. *International journal of pharmaceutics* **2011**, *420* (1), 141-6 описано применение гомогенизации высокого давления с целью получения наносуспензий лютеина. Наносуспензию лютеина превращают в гранулы, которые помещают в желатиновые капсулы для использования в качестве нутрицевтиков. Лиофилизированную суспензию вводят в состав кремов или гелей. Тестирование на коже уха свиньи, как модели потенциального дермального применения, демонстрирует, что лютеин не проникает через кожу.

[0013] В Hu, D.; Lin, C.; Liu, L.; Li, S.; Zhao, Y., Preparation, characterization, and in vitro release investigation of lutein/zein nanoparticles via solution enhanced dispersion by supercritical fluids. *Journal of Food Engineering* **2012**, *109* (3), 545-552, описано применение сверхкритических жидкостей для повышения диспергирования раствора при получении лютеиновых/зеиновых наночастиц.

[0014] В Elzoghby, A. O.; Samy, W. M.; Elgindy, N. A., Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. *Journal of Controlled Release* **2012**, *161* (1), 38-49, дается обзор применения белковых наноносителей в качестве потенциальных кандидатов для доставки лекарств и генов.

[0015] В Lim, A. S. L.; Griffin, C.; Roos, Y. H., Stability and loss kinetics of lutein and  $\beta$ -carotene encapsulated in

freeze-dried emulsions with layered interface and trehalose as glass former. *Food Research International* **2014**, 62 (0), 403-409 описан способ получения дегидратированных эмульсий каротиноидов, таких как бета-каротин и лютеин, с целью потенциального применения в составе детских питательных смесей, пищевых добавок и медицинских продуктов питания. Обнаружено, что многослойные системы лучше сохраняют каротиноиды, чем однослойные эмульсии, хотя в многослойных системах также повышается степень изомеризации.

[0016] В Kamil, A.; Smith, D.E.; Blumberg, J.B.; Astete, C.; Sabliov, C.; Chen, C.-Y. O., Bioavailability and biodistribution of nanodelivered lutein. *Food Chemistry* **2016**, 192, 915-923 (опубликованном в Интернете 23 июля 2015), описан синтез наночастиц сополимера молочной и гликолевой кислот, содержащих лютеин, а также фармакокинетика в плазме и отложение лютеина в отдельных тканях после введения наночастиц через желудочный зонд в виде суспензии, которая также содержит оливковое масло, муку и воду.

[0017] Зеин представляет собой природный белок, который можно использовать для синтеза систем нанодоставки. Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA) зеин "признан безопасным" (GRAS) для потребления человеком. Поскольку зеин является гидрофобным, его можно использовать в качестве носителя для улавливания, контролируемого высвобождения и стабилизации жирорастворимых соединений. Синтезированы наночастицы зеина, содержащие уловленные лекарственные средства, противомикробные средства и биологически активные соединения, такие как 5-фторурацил, тимол, куркумин, эфирные масла и лютеин.

[0018] Остается неудовлетворенная потребность в усовершенствованных композициях и способах, обеспечивающих доставку биоактивного лютеина и других антиоксидантов к тканям, в которых они необходимы, таким как ткани глаза, и при этом защиту лютеина или другого антиоксиданта от деградации до их поступления в указанные ткани.

#### ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0019] Авторы настоящего изобретения разработали новый

способ местной доставки биологически активных форм лютеина и других антиоксидантов в целевые ткани, такие как ткани глаза (в том числе способ доставки лютеина в сетчатку), обеспечивающий при этом защиту лютеина или другого антиоксиданта от деградации. Лютеин или другой антиоксидант заключают в наночастицы, содержащие белок, такой как зеин, или синтетический полимер, такой как сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA). Предпочтительно используют поверхностно-активное вещество, связывающееся с наночастицами и обеспечивающее дополнительную защиту лютеина или другого антиоксиданта. После введения наночастиц в целевую ткань биоактивный лютеин или другой антиоксидант высвобождается в ткани в течение некоторого времени. Чтобы обеспечить медленное высвобождение лютеина или другого антиоксиданта, наночастицы предпочтительно смешивают с термочувствительным гелем, обладающим биоадгезивными свойствами.

[0020] В ряде экспериментов авторы изобретения исследуют способность зеин-содержащих наночастиц защищать лютеин от окисления и контролировать высвобождение лютеина как в отсутствие, так и в присутствии поверхностно-активного вещества. Гипотеза авторов заключается в том, что электростатическое притяжение, возникающее между наночастицами зеина и молекулами поверхностно-активного вещества, обеспечивает более длительное высвобождение лютеина, и улучшает химическую стабильность уловленного биоактивного лютеина. Нагруженные лютеином зеиновые наночастицы синтезируют с использованием процесса диспергирования в системе жидкость-жидкость, в присутствии или в отсутствие поверхностно-активного вещества. В качестве поверхностно-активного вещества используют сочетание фосфолипида, такого как соевый лецитин, и три-блок-сополимера Pluronic F127. Можно использовать и другие поверхностно-активные вещества, такие как Tween™ 80 и другие члены семейства Tween™. В качестве контроля используют "стандартные" эмульсии, содержащие лютеин. Физическую стабильность частиц характеризуют методом динамического светорассеяния (DLS) и просвечивающей электронной микроскопии (TEM). Высвобождение лютеина из

наночастиц, суспендированных в PBS, и деградацию лютеина измеряют как в отсутствие, так и в присутствии поверхностно-активного вещества. В качестве показателей химической стабильности измеряют термо- и фотоокисление лютеина. Размер наночастиц в отсутствие поверхностно-активного вещества составляет  $156,1 \pm 18$  нм, а в присутствии поверхностно-активного вещества  $216,5 \pm 29$  нм. Поверхностно-активное вещество повышает коэффициент полидисперсности, снижает зета-потенциал и повышает эффективность улавливания. Наблюдается двухфазный профиль высвобождения: исходное взрывное высвобождение в течение 24 часов, которое уменьшается в присутствии поверхностно-активных веществ; и последующее постепенное и равномерное высвобождение, наблюдающееся как в системах, содержащих поверхностно-активное вещество, так и в системах, не содержащих поверхностно-активное вещество. Деградация лютеина характеризуется кинетикой второго порядка, причем существенные различия между наночастицами, суспендированными в PBS, и эмульгированными контрольными образцами отсутствуют. Включение лютеина в наночастицы повышает стабильность лютеина при воздействии тепла и УФ-облучения, особенно в присутствии поверхностно-активного вещества. Полученные данные демонстрируют, что зеиновые наночастицы, особенно полученные с добавлением поверхностно-активного вещества, способны эффективно улавливать гидрофобный лютеин, сохраняя при этом его биологическую активность, и защищать лютеин от деградации, обеспечивая его медленное высвобождение в физиологических условиях.

[0021] В одном варианте осуществления для доставки биоактивного лютеина в ткани глаза используют полимерные (PLGA) наночастицы. Полезные эффекты введенного в ткани глаза биоактивного лютеина могут включать в себя ингибирование катаракт или дегенерации желтого пятна. Предварительные результаты, полученные на крысиной модели, являются обнадеживающими. Предварительные результаты, полученные авторами настоящего изобретения, демонстрируют, что полимерные наночастицы способны успешно доставлять лютеин в ткани глаза,

обеспечивая терапевтический эффект.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0022] На фигуре 1 приведены результаты анализа кинетики высвобождения лютеина из зеиновых наночастиц, содержащих и не содержащих поверхностно-активное вещество, проводимого в растворе PBS (рН 7,4) при 37°C, 100 об/мин, в течение 7 дней.

[0023] На фигуре 2 показано удерживание лютеина в зеиновых наночастицах, полученных как в присутствии (LTZN SF), так и в отсутствии поверхностно-активного вещества (LTZN NSF), в сравнении с лютеином, эмульгированным в присутствии поверхностно-активного вещества (LTEM SF). Все измерения проводят в растворе PBS (рН 7,4) при 37°C, 100 об/мин, в течение 7 дней.

[0024] На фигурах 3А-3С приведены результаты измерения удерживания лютеина в зеиновых наночастицах в зависимости от времени при разных температурах.

[0025] На фигуре 4 приведены результаты измерения удерживания лютеина в разных композициях после дегградации, индуцированной УФ-излучением, в зависимости от времени.

#### СПОСОБЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

##### *Зеиновые наночастицы с уловленным лютеином.*

[0026] Ранее существовало мало данных по стабильности лютеина, уловленного наночастицами зеина, в разных условиях обработки и хранения, а также по влиянию поверхностно-активных веществ на высвобождение и стабильность лютеина. Авторы настоящего изобретения исследуют термическую стабильность лютеина, его фотостабильность и высвобождение из наночастиц зеина, как в присутствии, так и в отсутствии поверхностно-активного вещества (в качестве которого используют сочетание лецитина и Pluronic F127). Авторы изобретения выдвигают гипотезы, заключающиеся в том, что лютеин, уловленный наночастицами зеина, является более стабильным в разных условиях хранения, и что электростатическое притяжение между наночастицами зеина и поверхностно-активным веществом приводит к замедлению высвобождения лютеина и повышению стабильности

уловленного биоактивного лютеина.

#### *Материалы*

[0027] Пример 1. Зеин, плуроник F127, хлороформ, этанол, пепсин и панкреатин приобретают в Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co. Ltd., St. Louis, MO). Соевый лецитин, соляную кислоту и гидроксид натрия приобретают в Fisher Chemical (Fisher Scientific International, Fairlawn, NJ). Лютеин предоставлен Kemin Foods, L.C. (Iowa, USA). Наночистую воду получают с использованием системы Nanopure Diamond и трубок, содержащих мембраны из сложных эфиров целлюлозы 100 кДа Biotec (Barnstead international, IA, USA), закупоривающие устройства приобретают в Spectrum Laboratories Inc. (CA, USA). Все остальные используемые реагенты и компоненты имеют аналитическую степень чистоты.

#### *Методы*

##### Пример 2: Синтез наночастиц зеина с уловленным лютеином

[0028] Наночастицы синтезируют с использованием дисперсии жидкость-жидкость. 10 мг зеина растворяют в 1 мл смеси этанол-водный раствор (70:30, об/об). Получают раствор лютеина в 100% этаноле с концентрацией 0,75 мг/мл и добавляют его по каплям к раствору зеина в соотношении 1:1 (об/об) в условиях умеренного перемешивания. Затем полученную смесь вводят в 7,5 мл водной фазы, содержащей в качестве поверхностно-активных веществ сочетание лецитина и плуроника F127 в соотношении 0,045%:0,09% (масс/объем). Полученный образец обрабатывают в микрофлюидизаторе при 30000 фунт/дюйм<sup>2</sup> в течение 3 циклов (M-110P, Microfluidics, MA, USA). Затем этанол упаривают в неполном вакууме (примерно при 500-600 мм ртутного столба) с введением азота (80 мм рт.ст.) в роторный испаритель (Buchi R-124, Buchi Analytical Inc., DE, USA). Нагруженные лютеином наночастицы зеина, оставшиеся после полного испарения этанола, промывают путем диализа с использованием мембраны 100 кДа Spectra/POR SE (Spectrum Rancho, CA, USA). Суспензию наночастиц помещают в мембрану и суспендируют в 1,5 л наночистой воды всего в течение 24 часов; диализную среду (воду) меняют каждые 4-6 часов, чтобы удалить свободное поверхностно-активное вещество. Суспензию собирают и хранят при комнатной температуре до последующих

анализов. Одновременно получают наночастицы зеина, не содержащие поверхностно-активного вещества, используя в остальных отношениях идентичные способы. И, наконец, в качестве контроля используют эмульсию лютеина, содержащую только поверхностно-активное вещество (не содержащую наночастицы зеин).

*Характеристика наночастиц зеина*

Пример 3: Размер частиц, коэффициент полидисперсности (PDI) и зета-потенциал.

[0029] Свежеполученные образцы наночастиц характеризуют путем измерения среднего размера частиц, PDI и зета-потенциала методом динамического светорассеяния (DLS), с помощью Malvern Zetasizer Nano ZS Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, U.K.). Перед проведением измерений образцы разводят до конечной концентрации 0,2–0,32 мг/мл. Чтобы стабилизировать образцы и ингибировать агрегацию частиц добавляют цитратный буфер при pH 7,4 (0,1 М). Все измерения проводят с тройными повторами.

Пример 4: Морфология

[0030] Морфологию свежеполученных наночастиц зеина наблюдают методом просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ). Одну каплю образца помещают на медную сетку 400 меш с углеродной пленкой, избыток образца поглощают фильтровальной бумагой. Уранилацетат используют для получения отрицательного пятна, чтобы улучшить контраст образца.

Пример 5: Эффективность улавливания (ЕЕ).

[0031] Образец свежеполученных, нагруженных лютеином наночастиц зеина объемом 1,0 мл центрифугируют при 30000 об/мин в течение 75 мин. Собирают супернатант и осадок, содержащий наночастицы. Оба образца разводят этанолом, после чего лютеин экстрагируют хлороформом (в отношении 1:1). Растворимость лютеина в хлороформе (6000 мг/л) в 20 раз выше, чем его растворимость в этаноле (300 мг/л). Концентрацию лютеина измеряют с помощью спектрофотометра для УФ/видимой области спектра в стеклянной кювете с длиной пути луча 1 см, где поглощение измеряют при 445 нм. Значение оптической плотности превращают в концентрацию лютеина, используя стандартную кривую, полученную для раствора лютеина в смеси этанола и хлороформа

1:1. Эффективность инкапсулирования (%) определяют как отношение количества лютеина в осадке к теоретическому количеству лютеина, доступному для улавливания. Все измерения проводят с тройными повторами.

Пример 6: Высвобождение лютеина из наночастиц зеина в фосфатно-солевом буфере (PBS)

[0032] Авторы исследуют высвобождение уловленного лютеина из наночастиц зеина в фосфатно-солевой буферный раствор (PBS), (рН 7,4 при 37°C); к PBS добавляют 0,5% твин 20, чтобы повысить растворимость высвобождаемого лютеина. Коротко говоря, 10 мл свежеполученных наночастиц добавляют к 20 мл PBS, содержащего твин 20, и тщательно перемешивают. Смесь разделяют и помещают в центрифужные пробирки объемом 1 мл, которые, в свою очередь, помещают во встряхиватель-инкубатор (шейкер-инкубатор C25KC, New Brunswick Scientific, NJ, USA) и инкубируют при 37°C и 100 об/мин. В заданные моменты времени центрифужные пробирки вынимают и центрифугируют при 30000 об/мин в течение 75 мин. Надосадочную жидкость удаляют, экстрагируют хлороформом и этанолом (2 мл:2 мл) и перемешивают на вортексе в течение 10 минут. Экстрагированный лютеин определяют в супернатанте путем измерения оптической плотности при 445 нм с помощью спектрофотометра для УФ/видимой области спектра, что также описано в разделе Эффективность улавливания. Все измерения проводят с тройными повторами.

Пример 7: Деградация лютеина, содержащегося в наночастицах зеина, суспендированных в PBS.

[0033] Деградацию лютеина, уловленного наночастицами зеина (в присутствии и в отсутствии поверхностно-активного вещества), и содержание лютеина в стабилизированной поверхностно-активным веществом эмульсии определяют путем измерения количества лютеина в осадке и в супернатанте в одинаковых условиях.

Пример 8: Физическая стабильность наночастиц зеина, содержащих уловленный лютеин.

[0034] Свежеполученные образцы хранят в темноте при трех разных температурах: при 4°C в холодильнике, при комнатной

температуре 25°C и при 40°C в инкубаторе в течение одного месяца. Образцы анализируют на изменение среднего размера частиц, характеристик поверхности и доли уловленного соединения после 7, 15 и 30 дней хранения. Все эксперименты проводят с тройными повторами.

Пример 9: Фотохимическая стабильность лютеина, уловленного наночастицами зеина.

[0035] Образцы, содержащие наночастицы и эмульсию, хранят в прозрачных стеклянных флаконах в защищенном от света шкафе, где их подвергают воздействию облучения при 365 нм посредством УФ-ламп (100 Вт: Blak-Ray, модель В 100АР) в течение периода до 10 часов. Через промежутки времени, составляющие 0,5, 1, 2, 3, 5, 7 и 10 часов, из каждого образца берут аликвоту объемом 1 мл, проводят экстракцию и определяют концентрацию лютеина с помощью спектрофотометра для УФ/видимой области спектра при 445 нм. Эксперименты проводят с тройными повторами.

Пример 10: Кинетика реакции дегградации.

[0036] Общую формулу скорости реакции дегградации и высвобождения лютеина можно описать как

$$\frac{d[C]}{dt} = -k[C]^n;$$

где  $C$  обозначает концентрацию лютеина,  $k$  обозначает константу скорости реакции, а  $n$  обозначает порядок реакции. Коэффициент корреляции ( $R^2$ ) используют для определения наилучшего соответствия кинетических моделей. Дегградация лютеина под действием УФ-облучения характеризуется кинетикой первого

порядка:  $\ln\left(\frac{[C]}{[C_0]}\right) = -kt$ . При хранении в PBS дегградация лютеина

характеризуется кинетикой второго порядка:  $\frac{1}{[C]} = \frac{1}{[C_0]} + kt$ , где  $C$  обозначает концентрацию лютеина в момент времени  $t$ ,  $C_0$  обозначает исходную концентрацию лютеина,  $t$  обозначает время, а  $k$  обозначает скорость реакции, определяемую по углу наклона с использованием линейного регрессионного анализа.

Пример 11: Статистический анализ результатов.

[0037] Все эксперименты проводят с тройными повторами,

результаты выражают в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка. Статистические анализы проводят с помощью программного обеспечения SAS (версия 9.4, SAS Institute Inc., NC, USA). Для определения значимых различий между системами используют дисперсионный анализ (ANOVA). Уровень значимости ( $p$ ) устанавливают при 0,05.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Пример 12: Определение физико-химических характеристик.

[0038] Дисперсию жидкость-жидкость успешно используют для синтеза нагруженных лютеином наночастиц зеина, как в присутствии, так и в отсутствии поверхностно-активного вещества. Поверхностно-активное вещество, используемое для стабилизации наночастиц в экспериментах такого типа, представляет собой сочетание лецитина и Pluronic™ F127. Лецитин, природный пищевой эмульгатор или стабилизатор, содержит гидрофильную головку, фосфатидилхолин (PC); и два гидрофобных хвоста, фосфатидилэтаноламин (PE) и фосфатидилинозитол (PI). Pluronic™ F127 представляет собой гидрофильный, неионный поверхностно-активный сополимер, содержащий гидрофобный блок полипропилена между двумя гидрофильными блоками полиэтиленгликоля. Авторы изобретения полагают, что один или несколько слоев лецитина покрывают поверхность гидрофобных наночастиц зеина, внутри которых содержится уловленный лютеин. Гидрофильная головка лецитина связывается с гидрофильными полиэтиленгликольными фрагментами Pluronic™ F127; а гидрофобный полипропиленовый фрагмент, возможно, связывается с основной структурой зеина. В результате образуется гидрофильная наночастица зеина, нагруженная гидрофобным лютеином, которую можно использовать для диспергирования биоактивного лютеина в водной среде с одновременной защитой его от деградации.

[0039] Нагруженные лютеином наночастицы зеина и такие же наночастицы, но не содержащие лютеина, причем те и другие получают как в присутствии, так и в отсутствии поверхностно-активного вещества, характеризуют сразу после очистки. Результаты приведены в таблице 2. Средний размер частиц, PDI и

зета-потенциал свежеполученных образцов измеряют после диализа в цитратном буфере (рН 7,4) в течение 24 часов. Средний размер нагруженных лютеином наночастиц зеина, полученных в присутствии или в отсутствие поверхностно-активного вещества, составляет  $217 \pm 29$  нм или  $156 \pm 18$  нм, соответственно. Наночастицы зеина, полученные в присутствии поверхностно-активного вещества, имеют относительно низкую полидисперсность (менее 0,3). Наночастицы, полученные в отсутствие поверхностно-активного вещества, характеризуются более высоким диапазоном PDI, 0,33–0,48.

Таблица 2: Характеристики ненагруженных и нагруженных лютеином (LT) наночастиц зеина (ZN), полученных в присутствии поверхностно-активного вещества (SF) или в отсутствие поверхностно-активного вещества (NSF).

Образец <sup>a</sup>	Размер (нм)	PDI (опт.ед.)	Зета-потенциал (мВ)	EE (%)
ZN SF	$208,8 \pm 8,0$	$0,19 \pm 0,04$	$-47,6 \pm 1,6$	-
LTZN SF	$216,5 \pm 29$	$0,26 \pm 0,09$	$-30,9 \pm 3,3$	$83,0 \pm 5,8$
ZN NSF	$149,2 \pm 5,5$	$0,48 \pm 0,07$	$-31,9 \pm 4,3$	-
LTZN NSF	$156,1 \pm 18$	$0,33 \pm 0,06$	$-21,0 \pm 8,6$	$69,1 \pm 11,4$

Примечание: Результаты приведены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка (n=3).

<sup>a</sup>Массовое отношение зеина к лютеину составляет 1:0,075 (масс/масс), а массовое отношение лецитина к плуронику F127 составляет 1:2 (масс/объем).

[0040] Результаты подтверждают методом просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ) (данные не показаны). Частицы, полученные в присутствии поверхностно-активного вещества, имеют сферическую форму с шероховатой поверхностью, причем некоторые частицы соединяются друг с другом "сеткой" из поверхностно-активного вещества. Наночастицы, полученные в отсутствие поверхностно-активного вещества, имеют меньший размер и более сферическую форму, но являются менее однородными по размеру и чаще образуют скопления, что обуславливает получение более высоких значений PDI методом динамического светорассеяния.

[0041] Зета-потенциал является мерой стабильности

наночастиц. Высокая степень стабильности соответствует зета-потенциалам выше примерно +30 мВ или ниже примерно -30 мВ. Обнаружено, что частицы, полученные в присутствии поверхностно-активного вещества, имеют более высокий отрицательный заряд ( $-47,6 \pm 1,6$  мВ), чем частицы, полученные в отсутствие поверхностно-активного вещества ( $-31,9 \pm 4,3$  мВ) что указывает на хорошую стабильность частиц, стабилизированных поверхностно-активным веществом. Уловленный лютеин уменьшает величину зета-потенциала до  $-30,9 \pm 3,3$  мВ в присутствии поверхностно-активного вещества, или до  $-21,0 \pm 8,6$  мВ в отсутствие поверхностно-активного вещества. Гидрофобное взаимодействие между лютеином и зеином предположительно вызывает перегруппировки в структуре зеина, приводящие к наблюдаемому изменению зета-потенциала.

[0042] В отсутствие поверхностно-активного вещества эффективность улавливания составляет  $69,1 \pm 11,4\%$ . В присутствии поверхностно-активного вещества эффективность улавливания увеличивается до  $83 \pm 5,8\%$ .

Пример 13: Высвобождение и механизм высвобождения. Высвобождение лютеина из наночастиц зеина в PBS.

[0043] Фосфатный буферный солевой раствор (PBS) традиционно используют для тестирования высвобождения лекарственных средств. На фигуре 1 приведены результаты анализа кинетики высвобождения лютеина из наночастиц зеина, полученных в присутствии и в отсутствие поверхностно-активного вещества, в PBS (pH 7,4) при 37°C, 100 об/мин, в течение 7 дней. Профиль высвобождения свидетельствует о двухфазном характере образца, с начальным взрывным высвобождением в течение 24 часов и последующим высвобождением нулевого порядка через 24 часа. См. таблицу 3. Из частиц, полученных в отсутствие поверхностно-активного вещества (LTZN NSF), в течение начальной взрывной фазы высвобождается 43% лютеина. Из частиц, полученных в присутствии поверхностно-активного вещества (LTZN SF), в течение начальной взрывной фазы высвобождается только 20% лютеина. Поверхностно-активное вещество замедляет высвобождение лютеина. Высвобождение лютеина через 24 ч характеризуется кинетикой нулевого порядка.

Результаты приведены ниже в таблице 4. Через 168 часов из частиц, полученных в отсутствие поверхностно-активного вещества, высвобождается 52% лютеина, а из частиц, полученных в присутствии поверхностно-активного вещества, высвобождается только 43% лютеина. Гидрофобные взаимодействия, обусловленные поверхностно-активным веществом, ингибируют гидролитическую деградацию зеина и замедляют высвобождение лютеина. В отсутствие поверхностно-активного вещества быстрое набухание белка приводит к более быстрому высвобождению уловленного биоактивного вещества в результате диффузии через водные каналы, образующиеся в гидратированной, набухшей структуре зеина. Поверхностно-активное вещество обеспечивает более длительное высвобождение лютеина.

Пример 14: Дегградация лютеина в PBS.

[0044] Лютеин более склонен к дегградации под действием нагревания и других факторов, чем многие другие каротины, вследствие наличия у него сопряженных двойных связей и двух гидроксильных групп. Авторы настоящего изобретения анализируют дегградацию лютеина, уловленного наночастицами зеина, полученными как в присутствии (LTZN SF), так и в отсутствие поверхностно-активных веществ (LTZN NSF); полученные результаты сравнивают с аналогичными наблюдениями за дегградацией лютеина, эмульгированного в таких же поверхностно-активных веществах (Ltem SF). Все измерения проводили в растворе PBS (pH 7,4) при 37°C, 100 об/мин, в течение 7 дней. См. фигуру 2. Профили дегградации лютеина соответствуют кинетике второго порядка, причем существенные различия в константах скорости дегградации ( $k$ ) среди исследуемых систем отсутствуют. См. также таблицу 4 ниже.

Примеры 15 и 16: Зависимость химической и физической стабильности наночастиц от времени и от температуры

[0045] Авторы изобретения анализируют физическую стабильность наночастиц зеина при температуре 4°C, 25°C и 40°C в течение 30 дней путем измерения размера, PDI и зета-потенциала. Химическую стабильность уловленного лютеина анализируют в параллельных образцах путем измерения оптической плотности при

445 нм. Результаты приведены в таблице 3. Наночастицы зеина, полученные как в присутствии, так и в отсутствии поверхностно-активного вещества, являются стабильными при низкой температуре, их размер находится в диапазоне от  $156,1 \pm 18$  до  $216,5 \pm 29$  нм после хранения при  $4^\circ\text{C}$  в течение 30 дней. После хранения при более высоких температурах размер наночастиц имеет тенденцию к увеличению с течением времени, особенно в отсутствие поверхностно-активного вещества. Например, после хранения при  $25^\circ\text{C}$  в течение 30 дней размер наночастиц, полученных в присутствии поверхностно-активного вещества, увеличивается до  $380,5 \pm 51$  нм. Тогда как размер частиц, полученных в отсутствие поверхностно-активного вещества, после хранения при  $25^\circ\text{C}$  в течение 30 дней увеличивается намного больше, до  $3103 \pm 332$  нм. В случае хранения при  $40^\circ\text{C}$  частицы размером более 1 мкм можно наблюдать уже через 7 дней, если частицы получают в отсутствие поверхностно-активного вещества. PDI, как правило, увеличивается с повышением температуры и времени хранения (от 0,27 до 0,80). Зета-потенциал находится в диапазоне от -18 мВ до -25 мВ в случае наночастиц, полученных в отсутствие поверхностно-активного вещества, и в диапазоне от -15 мВ до -38 мВ в случае частиц, полученных в присутствии поверхностно-активного вещества.

Таблица 3: Характеристики нагруженных лютеином наночастиц зеина при разных температурах после хранения в течение 30 дней.

Образец	Температура	Время	Размер (нм)	PDI (опт, ед, )	Зета-потенциал (мВ)
LTZN SF	$4^\circ\text{C}$	0 д	$216,5 \pm 50$	$0,27 \pm 0,05$	$-30,9 \pm 3,3$
		7 д	$195,7 \pm 19$	$0,29 \pm 0,05$	$-31,1 \pm 10,8$
		15 д	$183,0 \pm 26$	$0,27 \pm 0,06$	$-32,2 \pm 10,7$
		30 д	$168,6 \pm 2$	$0,27 \pm 0,04$	$-33,0 \pm 10,8$
	$25^\circ\text{C}$	0 д	$216,5 \pm 50$	$0,27 \pm 0,05$	$-30,9 \pm 3,3$
		7 д	$170,8 \pm 65$	$0,38 \pm 0,05$	$-23,3 \pm 2,4$
		15 д	$221,0 \pm 74$	$0,35 \pm 0,06$	$-21,8 \pm 9,5$
		30 д	$380,8 \pm 51$	$0,36 \pm 0,07$	$-15,2 \pm 0,3$

	40°C	0 д	216,5±50	0,27±0,05	-30,9±3,3
		7 д	134,5±40	0,54±0,07	-38,0±1,9
		15 д	203,1±49	0,24±0,06	-31,8±7,4
		30 д	229,5±27	0,29±0,03	-29,5±2,9
LTZN NSF	4°C	0 д	156,1±18	0,26±0,06	-21,0±8,6
		7 д	142,4±32	0,32±0,11	-23,8±1,0
		15 д	189,2±55	0,26±0,07	-24,6±1,7
		30 д	198,9±47	0,39±0,13	-25,0±2,6
	25°C	0 д	156,1±18	0,26±0,06	-21,0±8,6
		7 д	567,7±203	0,56±0,07	-24,6±1,7
		15 д	1406,1±79	0,47±0,13	-23,7±1,5
		30 д	3103±332	0,58±0,15	-23,6±1,4
	40°C	0 д	156,1±18	0,26±0,06	-21,0±8,6
		7 д	1096,1±53	0,58±0,05	-18,0±2,7
		15 д	2434,5±35	0,73±0,19	-21,0±0,6
		30 д	3599,5±94	0,80±0,10	-22,7±4,2

Примечание: Результаты приведены в виде среднего значения±стандартная ошибка (n=3).

[0046] Поверхностно-активные вещества не только обеспечивают долговременную стабильность при хранении в течение, по меньшей мере, 30 дней, но и замедляют деградацию лютеина. См. фиг. 3А-3С. После хранения в течение 30 дней при 25°C деградации подвергается только 26% уловленного лютеина LTZN SF, тогда как лютеин LTZN NSF подвергается деградации на 54%. Аналогичная тенденция наблюдается для частиц обоих типов после хранения при 40°C; 13,8% и 7,5% лютеина остается в наночастицах, полученных в присутствии и в отсутствии поверхностно-активного вещества, соответственно. При всех температурах эмульгированный лютеин разрушается быстрее, чем лютеин, уловленный наночастицами зеина. Деградация лютеина при всех температурах характеризуется кинетикой второго порядка. Результаты приведены в таблице 4. При каждой температуре хранения самая низкая степень деградации наблюдается у нагруженных лютеином наночастиц зеина, полученных в присутствии поверхностно-активного вещества. Во всех системах степень деградации увеличивается при возрастании температуры.

Пример 17: Фотохимическая устойчивость к воздействию УФ-

излучения

[0047] Наночастицы зеина повышают фотохимическую устойчивость лютеина к УФ-индуцированной деградации; а добавление к наночастицам поверхностно-активного вещества дополнительно повышает стабильность. Эмульгированный лютеин подвергается быстрой фотохимической деградации. См. фигуру 4. Через 10 ч в эмульсии лютеина остается только 1,4% уловленного лютеина, тогда как в наночастицах зеина, полученных в отсутствие поверхностно-активного вещества, остается 15,9% лютеина, а в наночастицах зеина, полученных в присутствии поверхностно-активного вещества, остается 46,6% лютеина. Результаты также приведены в таблице 4. Во всех случаях фотохимическая деградация представляет собой разложение первого порядка.

[0048] Не желая быть связанными с данной гипотезой, авторы полагают, что конкурентное поглощение УФ-фотонов зеином может являться причиной повышенной фотохимической стабильности лютеина, уловленного наночастицами зеина. Зеин поглощает УФ-излучение, в особенности его ароматические аминокислоты, такие как фенилаланин. Поверхностно-активные вещества, такие как лецитин, связанные с наночастицами зеина, также повышают устойчивость лютеина к воздействию УФ. Не желая быть связанными с данной гипотезой, авторы полагают, что быстрая передача энергии от возбужденных молекул лютеина на молекулы лецитина обеспечивает устойчивость к УФ-излучению. В целом лютеин, уловленный наночастицами зеина, полученными с использованием лецитина и плуроника F127 в качестве поверхностно-активных веществ, является значительно более устойчивым к деградации под действием УФ.

Таблица 4: Подобранный модель высвобождения и деградации лютеина, загруженного в наночастицы зеина.

Эксперимент	Образец	Время	Кинетическая модель	K	R <sup>2</sup>
Высвобождение	LTZN SF	0-24 ч	Нулевого порядка (начальное взрывное)	0,90930	0,95203
	LTZN NSF			2,02800	0,88626

				высвобождение)		
		LTZN SF	24-	Нулевого порядка	0,00120	0,83448
		LTZN NSF	168 ч		0,01270	0,92693
Деградация	LTZN SF		168 ч	2 <sup>ого</sup> порядка	0,00004	0,96389
	LTZN NSF				0,00003	0,91575
	LTEM SF				0,00003	0,97666
Физическая стабильность	LTZN SF	4°C	30 д	2 <sup>ого</sup> порядка	0,00006	0,92430
		25°C			0,00020	0,84325
		40°C			0,00210	0,99788
	LTZN NSF	4°C	30 д	2 <sup>ого</sup> порядка	0,00020	0,99243
		25°C			0,00050	0,75685
		40°C			0,00420	0,98458
	LTEM SF	4°C	30 д	2 <sup>ого</sup> порядка	0,00040	0,99878
		25°C			0,00210	0,99502
		40°C			0,01210	0,96126
Фотохимическая стабильность	LTZN SF		10 ч	1 <sup>ого</sup> порядка	0,07530	0,98454
	LTZN NSF				0,18690	0,99256
	LTEM SF				0,40930	0,98301

"LTEM SF" обозначает композицию эмульгированных лютеин-зеиновых наночастиц, полученных с использованием поверхностно-активных веществ.

#### Обсуждение

[0049] Авторы настоящего изобретения синтезируют наночастицы зеина, нагруженные 7,5% лютеина и стабилизированные сочетанием поверхностно-активных веществ лецитин/пльуроник F127, используя метод дисперсии жидкость-жидкость в отсутствии растворителей. Добавление поверхностно-активных веществ приводит к небольшому увеличению размера частиц и к улучшению индекса полидисперсности. В присутствии поверхностно-активных веществ немного изменяется зета-потенциал и значительно возрастает эффективность улавливания. Первоначальная высокая скорость высвобождения лютеина уменьшается в образцах, содержащих поверхностно-активное вещество, по сравнению с образцами, не

содержащими поверхностно-активное вещество; уменьшение скорости первоначального, "взрывного" высвобождения является благоприятным фактором для замедленного высвобождения. Наночастицы зеина защищают лютеин от деградации в разных условиях хранения, по сравнению с просто эмульгированным лютеином. Нагруженные лютеином наночастицы зеина, полученные в присутствии поверхностно-активных веществ, можно хранить при температуре 4°C в течение, по меньшей мере, 30 дней, с минимальной потерей активности. Композиция наночастицы/поверхностно-активные вещества защищает лютеин от деградации под действием УФ-света в течение, по меньшей мере, 10 часов.

#### ПОЛИМЕРНЫЕ (PLGA) ЛЮТЕИН-СОДЕРЖАЩИЕ НАНОЧАСТИЦЫ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ КАТАРАКТЫ

[0050] В одном варианте осуществления полимерные наночастицы настоящего изобретения используют для доставки лютеина в ткани глаза. Введение лютеина в ткани глаза может оказывать благоприятные эффекты, способствующие, например, подавлению катаракты или дегенерации желтого пятна. Предварительные результаты, полученные авторами настоящего изобретения на крысиной модели, являются обнадеживающими. Предварительные результаты демонстрируют, что с помощью полимерных наночастиц можно успешно доставлять лютеин в ткани глаза, обеспечивая терапевтическое улучшение.

[0051] Индуцированная селенитом катаракта крыс является быстрой и удобной моделью ядерной катаракты. Введение селенита грудным крысятам вызывает катаракту. Некоторые биохимические механизмы, предположительно участвующие в данном процессе, включают в себя потерю гомеостаза кальция, кальпаин-индуцированный протеолиз, преципитацию кристаллина и утрату цитоскелета. Антиоксидантные свойства лютеина могут способствовать ингибированию, по меньшей мере, некоторых из указанных путей. Новая местная композиция лютеина, уловленного полимерными наночастицами, в особенности дополненная биоадгезивной композицией, увеличивает биодоступность лютеина в

тканях глаза и повышает его терапевтическую эффективность.

[0052] Последующие эксперименты на животных моделях дегенерации желтого пятна подтверждают эффективность новой композиции лютеина при ингибировании развития дегенерации желтого пятна. Модели возрастной дегенерации желтого пятна (AMD) были разработаны, например, на мышах, крысах, кроликах, свиньях и отличных от человека приматах. См., например, Penessi ME, Neuringer M, Courtney RJ. Animal models of age-related macular degeneration. *Mol Aspects Med.* 2012, 33(4): 487-509. Существует, по меньшей мере, четыре модели дегенерации желтого пятна, полученные на грызунах. В основе одной такой модели лежит инактивация гена SOD1 (мыши SOD1<sup>-/-</sup>). См. Imamura Y, Noda S, Hashizume K, Shinoda K, Yamaguchi M, Uchiyama S, Shimizu T, Mizushima Y, Shirasawa T, Tsubota K. Drusen, choroidal neovascularization, and retinal pigment epithelium dysfunction in SOD1-deficient mice: a model of age-related macular degeneration. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2006; 103(30):11282-11287. В основе другой модели лежит инактивация гена ApoE (мыши ApoE<sup>-/-</sup>). См. Dithmar S, Sharara NA, Curcio CA, Le NA, Zhang Y, Brown S, Grossniklaus HE. Murine high-fat diet and laser photochemical model of basal deposits in Bruch membrane. *Arch. Ophthalmol.* 2001; 119(11):1643-1649. Для получения следующей модели используют старых мышей (16 месяцев), получающих пищу с высоким содержанием жиров. См. Cousins SW, Espinosa-Heidmann DG, Alexandridou A, Sall J, Dubovy S, Csaky K. The role of aging, high fat diet and blue light exposure in an experimental mouse model for basal laminar deposit formation. *Exp. Eye Res.* 2002; 75(5):543-553. В основе другой модели лежит индукция дегенерации желтого пятна под действием ультрафиолетового излучения. См. Pavelic SC et al. UV-induced retinal proteome changes in the rat model of age-related macular degeneration. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease.* 2015, 1852 (9):1833-1845. Первые две модели лучше всего подходят для тестирования эффекта нагруженных лютеином наночастиц, потенциально приводящего к ремиссии заболевания. Последние две модели лучше всего подходят для тестирования эффекта нагруженных лютеином

наночастиц, обеспечивающего защиту от развития AMD. В каждом случае лютеин вводят в составе нагруженных лютеином полимерных наночастиц, содержащихся в биоадгезивном гидрогеле, путем местного нанесения гидрогеля на роговицу.

## МЕТОДЫ

### Пример 18

[0053] В одном из вариантов осуществления лютеин-содержащие наночастицы из сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA) синтезируют, используя модифицированный способ эмульгирования/испарения. Коротко говоря, 100 мг PLGA растворяют в 10 мл этилацетата и при умеренном перемешивании добавляют 10 мг лютеина. Затем смесь добавляют по каплям при комнатной температуре к 80 мл водного раствора Tween™ 80 (4 мг/мл), насыщенного этилацетатом. После перемешивания в течение 5 минут образец обрабатывают с помощью микрофлюидизатора при давлении 30000 фунт/кв. дюйм (~200 МПа) в течение 3-х циклов (M-110P, Microfluidics, MA, USA). Затем растворитель упаривают в вакууме с введением азота в роторный испаритель (Buchi R-124, Buchi Inc., DE, USA). Чтобы удалить свободное поверхностно-активное вещество, нагруженные лютеином наночастицы PLGA подвергают диализу, используя мембрану 100 кДа Spectra/POR CE (Spectrum Rancho, CA, USA), против воды в течение 24 ч, с тремя заменами воды. И, наконец, к суспензии наночастиц PLGA добавляют трегалозу (3:1 масс/масс), после чего образец лиофилизируют с помощью лиофильной сушилки (Labconco, Kansas City, MO) в течение 48 часов при -80°C. Порошок из наночастиц хранят при -20°C до использования.

### Пример 19

[0054] В другом варианте осуществления лютеин-содержащие наночастицы из сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA) синтезируют с помощью немного измененного способа эмульгирования/испарения. Полученные с помощью данного способа наночастицы используют в первой серии исследований на животных (примеры 25-38). Коротко говоря, 400 мг сополимера PLGA 50:50 с молекулярной массой 30-60 кДа (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

растворяют в 8 мл этилацетата; после растворения полимера добавляют 40 мг лютеина с получением органической фазы. Органическую фазу смешивают с 60 мл 2% раствора поливинилового спирта (PVA) в воде (водная фаза) и затем микрофлюидизируют (Microfluidics Inc., Westwood, MA) при 25000 фунт/кв. дюйм (~170 МПа) четыре раза в бане со льдом. Растворитель упаривают на роторном испарителе Buchi R-124 (Buchi Labortechnik AG, Switzerland) в присутствии газообразного N<sub>2</sub>. Затем суспензию наночастиц подвергают диализу в течение 48 ч (с заменой воды через каждые 8 ч) с использованием мембраны из эфиров целлюлозы Spectra/Por CE, обеспечивающей отсечение по молекулярной массе 100 кДа (Spectrum Rancho, Dominguez, CA). И, наконец, после добавления трегалозы (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (теоретическое соотношение 1:1 масс/масс) суспензию замораживают. Образец подвергают лиофилизации в течение 40 ч с использованием лиофильной сушилки Freezone 2.5 Plus (Labconco, Kansas City, MO).

#### Пример 20

[0055] В следующем варианте осуществления лютеин-содержащие наночастицы из сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA) синтезируют с помощью несколько иного способа эмульгирования/испарения. Полученные с помощью данного способа наночастицы используют во второй серии исследований на животных (примеры 39-53). Коротко говоря, 100 мг PLGA растворяют в 10 мл этилацетата и затем при умеренном перемешивании добавляют 10 мг лютеина. Полученную смесь добавляют по каплям к 80 мл водного раствора Tween<sup>TM</sup> 80 (4 мг/мл), насыщенного этилацетатом при комнатной температуре. После перемешивания в течение 5 минут образец обрабатывают микрофлюидизатором при 30000 фунт/кв.дюйм (~ 200 МПа) в течение 3-х циклов (M-110P, Microfluidics, MA, USA). Затем растворитель упаривают в вакууме с введением азота в роторный испаритель (Buchi R-124, Buchi Inc., DE, USA). Чтобы удалить свободные поверхностно-активные вещества, нагруженные лютеином наночастицы PLGA подвергают диализу, используя мембрану 100 кДа Spectra/POR CE (Spectrum Rancho, CA, USA), против воды в

течение 24 ч, с тремя заменами воды. И, наконец, к суспензии наночастиц PLGA добавляют трегалозу (3:1 масс/масс), после чего образец лиофилизируют с помощью лиофильной сушилки (Labconco, Kansas City, MO) в течение 48 часов при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Порошок из наночастиц хранят при  $-20^{\circ}\text{C}$  до использования.

#### Пример 21

[0056] В другом варианте осуществления зеин-лютеиновые наночастицы синтезируют с использованием дисперсии жидкость-жидкость. Коротко говоря, 500 мг зеина растворяют в 15 мл раствора ацетона в воде (70:30, об/об). Затем к раствору в смеси ацетон-вода при умеренном перемешивании добавляют лютеин до конечной концентрации 3 мг/мл. Полученную смесь вводят в 110 мл водного раствора Tween<sup>TM</sup> 80 (3 мг/мл). Затем образец обрабатывают в микрофлюидизаторе при 30000 фунт/кв.дюйм ( $\sim 200$  МПа) в течение 3-х циклов (M-110P, Microfluidics, MA, USA). Растворитель упаривают в частичном вакууме (примерно при 500–600 мм Hg) с введением азота (80 мм Hg) в роторный испаритель (Buchi R-124, Buchi Analytical Inc., DE, USA). И, наконец, к суспензии нагруженных лютеином наночастиц зеин добавляют трегалозу в массовом соотношении 1:3, после чего образцы лиофилизируют в течение 2 дней при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . Полученный порошок хранят при  $-20^{\circ}\text{C}$  до использования.

#### Пример 22

[0057] Авторы настоящего изобретения исследуют морфологию лютеин-содержащих наночастиц сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA), полученных по способам примеров 19 и 20, методом просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ) с помощью системы JEOL 100-CX (JEOL USA Inc., Peabody, MA). Коротко говоря, образцы получают следующим образом: 500 мкл суспензии наночастиц смешивают с контрастным веществом (негативное окрашивание, одна капля 2% раствора уранилацетата). Одну каплю смеси помещают на медную сетку 400 меш с угольной пленкой. Избыток образца удаляют фильтровальной бумагой, жидкую пленку на сетке сушат при комнатной температуре в течение 15 мин, после чего сетку помещают в микроскоп. Наблюдаемые наночастицы PLGA, в основном,

являются сферическими и характеризуются равномерным распределением с отсутствием значительной агломерации.

#### Пример 23

[0058] Авторы настоящего изобретения анализируют размер частиц, индекс полидисперсности (PI) и зета-потенциал лютеин-содержащих наночастиц сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA), полученных по способу примера 19, методом динамического светорассеяния (DLS) с помощью анализатора размера частиц, молекулярной массы и зета-потенциала Malvern Nano ZS (Malvern Instruments Inc., Southborough, MA). Образцы ресуспендированных PLGA-лютеиновых наночастиц разбавляют до 0,5 мг/мл. Измеренный средний размер наночастиц составляет  $124 \pm 4$  нм. Измеренный PI составляет  $0,11 \pm 0,09$ . Измеренный зета-потенциал составляет  $-5,3 \pm 1,9$  мВ при pH 6,5. Все образцы измеряют с тройными повторами.

#### Пример 24

[0059] Авторы настоящего изобретения измеряют эффективность улавливания лютеина наночастицами, полученными по способу примера 19, методом УФ/видимой спектрофотометрии. Коротко говоря, 6 мг порошка PLGA-лютеиновых наночастиц ресуспендируют в 600 мкл воды путем обработки ультразвуком, с последующим добавлением 5,4 мл ацетонитрила. Смесь перемешивают в течение 4 часов, после чего центрифугируют при 30000 g в течение 15 мин при 4°C с получением белого осадка. Супернатант собирают и измеряют оптическую плотность при 450 нм с помощью спектрофотометра для УФ/видимой области спектра (Genesys 6, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), чтобы определить концентрацию лютеина. Экспериментальные образцы и образцы, используемые для получения стандартной кривой, измеряют с тройными повторами. Измеренная эффективность улавливания лютеина составляет  $52 \pm 3\%$ .

#### Пример 25

[0060] Получение *in situ* биоадгезивных гелевых композиций, содержащих суспендированные нагруженные лютеином наночастицы PLGA:

[0061] Получаемый *in situ* биоадгезивный гель, используемый

в данных экспериментах в качестве среды для нагруженных лютеином наночастиц, содержит смесь 2,7% (масс/масс) биоадгезивного полимера (полиэтиленоксид, Polyox™ 1105, Dow Chemical, MW ~900000) и 16,5% (масс/масс) полуксамера P407 (триблок-сополимер, содержащий центральный гидрофобный блок из полипропиленгликоля, фланкированный двумя гидрофильными блоками из полиэтиленгликоля; примерная длина двух блоков PEG составляет 101 повторяющийся элемент, а примерная длина пропиленгликолевого блока составляет 56 повторяющихся элементов). Смесь полиэтиленоксид-полуксамер P407 легко образует термообратимый гель. Каждый из полиэтиленоксида 1105 и полуксамера P407 диспергируют отдельно в стерильной воде и хранят до использования. Смесь полиэтиленоксида/полуксамера получают путем смешивания дисперсий и хранят в холодильнике (4°C) до использования. Затем при непрерывном, осторожном перемешивании к основе, образующей *in situ* биоадгезивный гель, добавляют лютеин-содержащие наночастицы.

[0062] Биоадгезивная основа может необязательно содержать другой полимер, сополимер или смесь полимеров или сополимеров с биоадгезионными свойствами, включающих в себя, например, производные полиакриловой кислоты, производные целлюлозы, поликарбофил, другие оксиды полиэтилена, производные гиалуроновой кислоты, пектин, каррагинан, альгинат и т.п. Предпочтительно основа должна быть биоадгезивной и термочувствительной (способной образовывать гель и медленно высвобождать наночастицы при температуре тела, или, более конкретно, при температуре конъюнктивального мешка), она также должна хорошо переноситься слизистой оболочкой глаза и быть совместимой с наночастицами, кроме того, она должна обеспечивать контролируемое и воспроизводимое высвобождение диспергированного биологически активного ингредиента, и пролонгированное удержание после местного введения.

[0063] Предпочтительная биоадгезивная основа, содержащая сочетание полуксамера и полиэтиленоксида, обладает несколькими полезными свойствами и признаками: полуксамер совместим со

слизистой оболочкой глаза. Поллоксамер представляет собой термообратимый полимер, который при повышенных концентрациях и температурах образует устойчивый, твердый гель, который сам по себе трудно использовать для местного применения. При более низких температурах полимер остается в водном растворе, который представляет собой жидкость. При повышении температуры полимер образует гель. Предпочтительно композиция представляет собой жидкость при комнатной температуре, но образует гель при температуре тела (или, более конкретно, при температуре конъюнктивального мешка, которая может быть на 2-3 градуса ниже температуры тела), обеспечивая медленное высвобождение активного ингредиента после образования геля на поверхности роговицы. Полиэтиленоксиды обладают хорошими адгезивными свойствами. Полиэтиленоксид 1105 (с диапазоном молекулярной массы от низкой до средней) является предпочтительным соединением благодаря его реологическим характеристикам. Полиэтиленоксиды также совместимы со слизистой оболочкой глаза. Смесь поллоксамера и полиэтиленоксида представляет собой продукт, который можно легко наносить в виде жидкости на роговицу, в конъюнктивальный мешок, и который образует гель после контакта с конъюнктивой при температуре тела. Данная смесь обладает улучшенными биоадгезионными свойствами, обеспечивающими продолжительное удерживание после местного введения, и, как следствие, улучшенную биодоступность лютеина в тканях глаза, включающих в себя внутреннюю часть глаза и сетчатку. Указанные неионные полимеры не должны обладать несовместимостью с биоактивными компонентами.

[0064] Несмотря на то, что наночастицы предпочтительно вводить в виде капель, которые могут образовывать термообратимый гель, как описано выше, можно использовать и другие способы введения. Применение полимерных компонентов можно пропустить. Необязательно можно использовать другие фармацевтические препараты, известные в данной области, например, жидкие глазные препараты (глазные капли, глазные лосьоны, гелеобразующие растворы); полутвердые глазные препараты (мази, гели); твердые глазные препараты (порошки, глазные вставки); или аэрозоли

(офтальмологические лекарственные средства, смешанные с газом под давлением).

[0065] Все препараты получают в асептических условиях в ламинарном вытяжном шкафу и хранят в предварительно стерилизованных контейнерах. Ни к каким препаратам консерванты не добавляют.

[0066] Путем рутинного экспериментирования с тестированием разных пропорций оптимизируют соотношения и концентрации разных компонентов, чтобы повысить время удержания на роговице и проникновение в роговицу. Типичные диапазоны, тестируемые в вариантах осуществления на сегодняшний день, включают в себя в случае полиэтиленоксида 1105 диапазон 1,5-3,5% (масс/масс), и в случае поллоксамера P407 диапазон 12-19% (масс/масс).

[0067] Биоадгезивная основа должна обеспечивать хорошее распределение наночастиц, она должна иметь достаточную вязкость для поддержания однородности во время хранения (физическая стабильность), она должна обеспечивать легкое нанесение на слизистую оболочку конъюнктивы, и она должна быть совместимой с веществами, используемыми при приготовлении наночастиц.

[0068] В зависимости от концентрации наночастиц в глазном препарате можно корректировать концентрацию биоадгезивного/термочувствительного полимера, чтобы оптимизировать вязкость и биоадгезивную способность. Необходимый масс/об % включенных в состав препарата лютеин-содержащих наночастиц зависит от их нагрузки лютеином. На сегодняшний день авторы тестируют нагрузку лютеином в биоадгезивном геле, в первую очередь, в диапазоне 1-5% масс/об. Также можно тестировать или использовать более высокие и более низкие концентрации.

[0069] Другие биоадгезивные гелеобразующие основы можно получить путем смешивания подходящих полимеров в соответствующих пропорциях. Примеры биоадгезивных полимеров включают в себя один или несколько полимеров, выбранных из полиакриловой кислоты, поликарбофила, полиэтиленоксидов, производных целлюлозы, производных гиалуроновой кислоты, пектина, каррагинана, альгината и т.п. Молекулярную массу можно выбирать с целью

оптимизации рабочих характеристик.

Примеры 26-32: Лечение животных

[0070] Четыре беременные самки крыс-альбиносов Вистар получают из питомника лабораторных животных Университета медицины и фармации Iuliu Hatieganu, Cluj-Napoca, Romania. Каждую самку крысы и выводок ее крысят размещают в пластиковой клетке и держат при 12-часовом цикле освещения и постоянной температуре (22°C), со свободным доступом к корму для крыс и водопроводной воде. В 12-дневном возрасте крысят случайным образом распределяют в семь следующих групп:

Группа 1 (группа, получающая селенит, положительный контроль): лютеин не получают

Группа 2 (PLGA-NP-1): ежедневно получают перорально с помощью желудочного зонда 2,5 мг/кг PLGA-NP-лютеин, диспергированных в 0,5 мл эмульсии, содержащей 30% оливкового масла+70% суспензии муки, что соответствует суточной дозе 2,66 мг лютеина/кг массы тела. (Суспензию муки, в свою очередь, получают путем смешивания 0,3 г муки с 1 мл воды).

Группа 3 (PLGA-NP-2): ежедневно получают перорально через желудочный зонд 5 мг/кг PLGA-NP-лютеин, диспергированные в 0,5 мл эмульсии, содержащей 30% оливкового масла+70% суспензии муки, что соответствует суточной дозе 5,32 мг лютеина/кг массы тела. (Суспензия муки: получают как для 2 группы).

Группа 4 (лютеин): ежедневно получают перорально через желудочный зонд 0,00525 мг немодифицированного лютеина, диспергированного в 0,5 мл эмульсии, содержащей 30% оливкового масла+70% суспензии муки, что соответствует суточной дозе 0,125 мг лютеина/кг массы тела. (Суспензия муки: получают как для 2 группы).

Группа 5 (HG-PLGA-NP-1): получают местно, один раз в день, путем нанесения на роговицу (1 капля в каждый глаз), биоадгезивный гидрогель, содержащий 1 масс % PLGA-NP-лютеин, полученных по способу примера 19. (30 мг Лиофилизированных нагруженных лютеином PLGA NP растворяют в 3 мл биоадгезивного гидрогеля. Объем одной капли гидрогеля с плотностью 0,9444 г/мл

составляет примерно 0,012 мл).

Группа 6 (HG-PLGA-NP-2): получают местно, один раз в день, путем нанесения на роговицу (1 капля в каждый глаз), биоадгезивный гидрогель, содержащий 3% PLGA-NP-лютеин. (90 Лиофилизированных нагруженных лютеином PLGA NP растворяют в 3 мл биоадгезивного гидрогеля. Объем одной капли гидрогеля с плотностью 0,9444 г/мл составляет примерно 0,012 мл).

Группа 7 (отрицательный контроль): не получают ни селенит, ни лютеин.

[0071] На 13-й день после родов у всех животных в группах 1-6 индуцируют катаракту путем однократного внутрибрюшинного введения селенита натрия ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ), 30 мкмоль/кг. Затем животных из групп 2-6 обрабатывают ежедневно в соответствии с приведенными выше схемами. Содержание лютеина в PLGA-NP (42,61 мкг лютеина/мг PLGA-NP) определяют методом УФ/видимой спектрофотометрии (450 нм) с использованием калибровки внешними стандартами. На 21-й день после родов оценивают развитие катаракты с помощью щелевой лампы. Состоянию глаз присваивают одну из пяти стадий: 0 стадия (отсутствие катаракты), 1 стадия (легкое помутнение ядра), 2 стадия (умеренное помутнение ядра, центральная часть с помутнением занимает меньше половины диаметра ядра), 3 стадия (сильное помутнение, центральная часть с помутнением занимает более половины диаметра ядра) и 4 стадия (сильное белое помутнение по всему ядру). Статистическую обработку выполняют с помощью SPSS 14.0 для Windows и Excel. Переменные анализируют на нормальное распределение с помощью теста Шапиро-Уилка. Сравнение групп проводят с использованием теста Вилкоксона. Результаты считают статистически значимыми, если  $p < 0,05$ .

[0072] Все биологические эксперименты были одобрены Комиссией по этике Университета медицины и фармации Iuliu Hatieganu, Cluj-Napoca, и проводились в соответствии с директивой ЕС 86/609/ЕЕС, регулирующей использование лабораторных животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Примеры 33-39

[0073] В таблице 5 показано наблюдаемое распределение тяжести катаракты в разных группах. У всех животных в группе отрицательного контроля симптомы катаракты отсутствуют (стадия 0). У всех животных в группе отрицательного контроля, получающей селенит, наблюдается двусторонняя катаракта 4 стадии.

Таблица 5: Наблюдаемое распределение тяжести катаракты в разных группах крысят на 21 день после родов

Группа	N	Стадия 0 (число животных)	Стадия 1 (число животных)	Стадия 2 (число животных)	Стадия 3 (число животных)	Стадия 4 (число животных)	Стадия катаракты среднее $\pm$ SD
1: Селенит	5	0	0	0	0	5	4,0 $\pm$ 0,0
2: PLGA-NP-1	5	0	1	1	0	3	3,0 $\pm$ 1,4
3: PLGA-NP-2	6	0	0	1	2	3	3,3 $\pm$ 0,8
4: Лютеин	5	0	0	1	2	2	3,2 $\pm$ 0,8
5: HG-PLGA-NP-1	5	0	0	4	1	0	2,2 $\pm$ 0,4*
6: HG-PLGA-NP-2	5	0	2	1	1	1	2,2 $\pm$ 1,3*
7: Контроль	5	5	0	0	0	0	0,0 $\pm$ 0,0

\* (Статистически значимое отличие от 1 группы,  $p < 0,05$ )

[0074] В группе 2, получающей перорально 62,5 мг/кг PLGA-NP-лютеина (что эквивалентно дозе 2,66 мг лютеина/кг), у трех животных развивается катаракта 4 стадии, у одного животного развивается катаракта 2 стадии и еще у одного животного развивается катаракта 1 стадии. В группе 3, получающей перорально 125 мг/кг PLGA-NP-лютеина (что эквивалентно дозе 5,32 мг лютеина/кг), у трех животных развивается катаракта 4 стадии, у двух животных развивается катаракта 3 стадии и у одного животного развивается катаракта 2 стадии. В группе 4, получающей перорально 0,125 мг/кг лютеина, у двух животных развивается катаракта 4 стадии, у двух катаракта 3 стадии, и у одного катаракта 2 стадии. В группе 5, получающей местно 1% PLGA-NP-лютеина в биоадгезивном гидрогеле, у одного животного развивается катаракта 3 стадии, а у остальных четырех животных развивается катаракта 2 стадии. В группе 6, получающей местно 3%

PLGA-NP-лютеина в биоадгезивном гидрогеле, у одного животного развивается катаракта 4 стадии, у одного животного развивается катаракта 3 стадии, у одного животного развивается катаракта 2 стадии, и у двух животных развивается катаракта лишь 1 стадии.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

[0075] Однократное введение селенита индуцирует развитие ядерной катаракты 4 стадии у 100% животных положительного контроля из группы 1. Ни у одного из животных отрицательной контрольной группы 7 катаракта не развивается. Поскольку в группах положительного контроля и отрицательного контроля получены ожидаемые результаты, авторы полагают, что можно исключить возможность влияния осложняющих факторов окружающей среды. Лишь небольшое (и статистически незначимое) снижение развития катаракты наблюдается у животных, получающих перорально один лютеин, или получающих перорально лютеин, уловленный полимерными наночастицами. Однако существенное и значительное снижение развития катаракты наблюдается у животных, получающих местно путем нанесения на роговицу новую местную биоадгезивную композицию, содержащую лютеин, уловленный полимерными наночастицами.

[0076] Полученные результаты демонстрируют, что новая композиция обеспечивает высоко эффективную доставку лютеина в ткани глаза в терапевтически эффективных концентрациях. Лютеин, доставляемый посредством новой композиции, защищает от индуцированной селенитом катаракты, вероятно, путем уменьшения окислительного стресса во всех структурных компонентах глаза. Местная биоадгезивная композиция, содержащая лютеин, уловленный полимерными наночастицами, повышает биодоступность лютеина в тканях глаза.

#### Примеры 40-46: Другие способы лечения животных.

[0077] Девять беременных самок крыс-альбиносов Вистар получают из питомника лабораторных животных Университета медицины и фармации Iuliu Hatieganu, Cluj-Napoca, Romania. Каждую самку крысы и выводок ее крысят размещают в пластиковой клетке и держат при 12-часовом цикле освещения и постоянной

температуре (22°C), со свободным доступом к корму для крыс и водопроводной воде. Детеныши каждой самки крыс составляют одну из следующих девяти исследовательских групп:

Группа 1 (группа, получающая селенит, положительный контроль): лютеин не получают

Группа 2 (лютеин-426): получают местно, один раз в день, путем нанесения на роговицу (1 капля в каждый глаз), немодифицированный лютеин (426 мкг лютеина/мл) в биоадгезивном гидрогеле. 3,21 мг тонко измельченного чистого лютеина диспергируют путем растирания с 7,53 мл биоадгезивного гидрогеля. Объем одной капли гидрогеля с плотностью 1,023 г/мл составляет примерно 0,012 мл. Конечная концентрация лютеина (426 мкг лютеина/мл) эквивалентна 1 масс.% лютеин-нагруженных наночастиц в гидрогеле. (Дозы подбирают так, чтобы все животные в группах 2, 4 и 7 получали примерно одинаковую концентрацию лютеина).

Группа 3 (лютеин-2130): получают местно, один раз в день, путем нанесения на роговицу (1 капля в каждый глаз), немодифицированный лютеин (2130 мкг лютеина/мл) в биоадгезивном гидрогеле. 11,99 мг тонко измельченного чистого лютеина диспергируют путем растирания с 5,63 мл биоадгезивного гидрогеля. Объем одной капли гидрогеля с плотностью 1,023 г/мл составляет примерно 0,012 мл. Концентрация лютеина (2130 мкг лютеина/мл) эквивалентна 5 масс.% лютеин-нагруженных наночастиц в гидрогеле.

Группа 4 (PLGA-NP-лютеин 426): получают местно, один раз в день, путем нанесения на роговицу (1 капля в каждый глаз), 426 мкг лютеина/мл (в виде нагруженных лютеином наночастиц PLGA, полученных по способу примера 20) в биоадгезивном гидрогеле. 375,7 мг лиофилизированных, нагруженных лютеином наночастиц PLGA растворяют в 15,25 мл биоадгезивного гидрогеля. Объем одной капли гидрогеля с плотностью 1,040 г/мл составляет примерно 0,012 мл.

Группа 5 (PLGA-NP-1278): получают местно, один раз в день, путем нанесения на роговицу (1 капля в каждый глаз), 1278 мкг

лютеина/мл (в виде нагруженных лютеином наночастиц PLGA, полученных по способу примера 20) в биоадгезивном гидрогеле. 379,9 мг лиофилизированных, нагруженных лютеином наночастиц PLGA растворяют в 5,14 мл биоадгезивного гидрогеля. Объем одной капли гидрогеля с плотностью 1,040 г/мл составляет примерно 0,012 мл.

Группа 6 (PLGA-NP-2130): получают местно, один раз в день, путем нанесения на роговицу (1 капля в каждый глаз), 2130 мкг лютеина/мл (в виде нагруженных лютеином наночастиц PLGA, полученных по способу примера 20) в биоадгезивном гидрогеле. 376,7 мг лиофилизированных, нагруженных лютеином наночастиц PLGA растворяют в 3,06 мл биоадгезивного гидрогеля. Объем одной капли гидрогеля с плотностью 1,040 г/мл составляет примерно 0,012 мл.

Группа 7 (Зеин-NP-426): получают местно, один раз в день, путем нанесения на роговицу (1 капля в каждый глаз), 426 мкг лютеина/мл (в виде нагруженных лютеином наночастиц зеина, полученных по способу примера 21) в биоадгезивном гидрогеле. 252,1 мг лиофилизированных, нагруженных лютеином наночастиц зеина растворяют в 8,81 мл биоадгезивного гидрогеля. Объем одной капли гидрогеля с плотностью 1,040 г/мл составляет примерно 0,012 мл.

Группа 8 (Зеин-NP-1278): получают местно, один раз в день, путем нанесения на роговицу (1 капля в каждый глаз), 1278 мкг лютеина/мл (в виде нагруженных лютеином наночастиц зеина, полученных по способу примера 21) в биоадгезивном гидрогеле. 345,7 мг лиофилизированных, нагруженных лютеином наночастиц зеина растворяют в 4,03 мл биоадгезивного гидрогеля. Объем одной капли гидрогеля с плотностью 1,040 г/мл составляет примерно 0,012 мл.

Группа 9 (Зеин-NP-2130): получают местно, один раз в день, путем нанесения на роговицу (1 капля в каждый глаз), 2130 мкг лютеина/мл (в виде нагруженных лютеином наночастиц зеина, полученных по способу примера 21) в биоадгезивном гидрогеле. 346,1 мг лиофилизированных, нагруженных лютеином наночастиц зеина растворяют в 2,42 мл биоадгезивного гидрогеля. Объем одной капли гидрогеля с плотностью 1,040 г/мл составляет примерно 0,012 мл.

[0078] На 13-й день после родов у всех животных в группах 1-9 индуцируют катаракту путем однократного внутрибрюшинного введения селенита натрия ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ), 30 мкмоль/кг. Затем животных из групп 2-9 обрабатывают ежедневно в соответствии с приведенными выше схемами. Содержание лютеина в PLGA-NP (17,29 мкг лютеина/мг PLGA-NP) и в зеин-NPs (14,89 мкг лютеина/мг зеин-NP) определяют методом УФ/видимой спектрофотометрии (445 нм) с использованием калибровки внешними стандартами. На 21-й день после родов оценивают развитие катаракты с помощью щелевой лампы. Состоянию глаз присваивают одну из пяти стадий: 0 стадия (отсутствие катаракты), 1 стадия (легкое помутнение ядра), 2 стадия (умеренное помутнение ядра, центральная часть с помутнением занимает меньше половины диаметра ядра), 3 стадия (сильное помутнение, центральная часть с помутнением занимает более половины диаметра ядра) и 4 стадия (сильное белое помутнение по всему ядру). Статистическую обработку выполняют с помощью SPSS 14.0 для Windows и Excel. Переменные анализируют на нормальное распределение с помощью теста Шапиро-Уилка. Сравнение групп проводят с использованием теста Вилкоксона. Результаты считают статистически значимыми, если  $p < 0,05$ .

[0079] Все биологические эксперименты одобрены Комиссией по этике Университета медицины и фармации Iuliu Hatieganu, Cluj-Napoca, и проводились в соответствии с директивой ЕС 86/609/ЕЕС, регулирующей использование лабораторных животных.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Примеры 48-54

[0080] В таблице 6 показано наблюдаемое распределение тяжести катаракты в разных группах.

Таблица 6: Наблюдаемое распределение тяжести катаракты в разных группах крысят на 21 день после родов

Группа	N	Стадия 0 (число животных)	Стадия 1 (число животных)	Стадия 2 (число животных)	Стадия 3 (число животных)	Стадия 4 (число животных)	Стадия катаракты среднее $\pm$ SD
1:	18	3	2	1	8	4	2,44 $\pm$ 1,4

Селени т							2
2: Лютеин -426	14	2	4	3	5	0	1,79±1,1 2
3: Лютеин -2130	14	3	1	7	3	0	1,71±1,0 7
4: PLGA- NP-426	18	6	3	4	3	2	1,56±1,4 2
5: PLGA- NP- 1278	20	15	3	0	1	1	0,50±1,1 5*
6: PLGA- NP- 2130	10	4	2	0	3	1	1,50±1,5 8
7: Зеин- NP-426	20	6	7	4	1	2	1,30±1,2 5
8: Зеин- NP- 1278	18	4	6	4	4	0	1,44±1,1 0*
9: Зеин- NP- 2130	14	4	5	3	2	0	1,21±1,0 5*

\* (Статистически значимое отличие от 1-й группы,  $p < 0,05$ )

[0081] Согласно тесту Шапиро-Уилка, во всех группах данных отсутствует нормальное распределение. Поэтому используют статистический критерий Вилкоксона. Вследствие небольшого числа детенышей в группе 6 (PLGA-NP-5), результаты, полученные для группы 6, не считаются достоверными для дальнейшей статистической оценки. В группах 5 (PLGA-NP-1278), 8 (Зеин-NP-1278) и 9 (Зеин-NP-2130) наблюдаются статистически значимые отличия ( $p < 0,05$ ) от контрольной группы (группа 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

[0082] Сравнение групп, получающих лютеин (группы 2-9), с группой положительного контроля (группа 1), свидетельствует о том, что только в группах 5, 8 и 9 (для группы 5  $p=0,001$ ; для группы 8  $p=0,05$ , и для группы 9  $p=0,05$ ) наблюдается статистически значимое уменьшение развития катаракты. И наоборот, только небольшое и статистически незначимое уменьшение развития катаракты наблюдается в глазах крысят, получающих немодифицированный лютеин в биоадгезивном гидрогеле, независимо от концентрации (426 мкг лютеина/мл или 2130 мкг лютеина/мл). В противоположность этому, лютеин, загруженный в полимерные наночастицы, включенные в состав гидрогеля, успешно доставляется в ткани глаза в терапевтически эффективных количествах (группы 5, 8 и 9). Хотя кажется, что в группе 5 (PLGA-NP-1278) наблюдается более благоприятный результат, он статистически не отличается ( $p=0,112$ ) от результата, полученного в группе 8 (Зеин-NP-1278), получающей наночастицы зеина с такой же нагрузкой лютеина, как и в наночастицах PLGA.

[0083] Полученные на данном этапе результаты демонстрируют отчетливый благоприятный эффект, включающий в себя доставку лютеина в ткани глаза с использованием наноструктурной полимерной среды, введенной в биоадгезивный гидрогель. Однако пока преждевременно делать вывод о том, какой из двух используемых полимеров (зеина и PLGA) является предпочтительным. Лютеин, доставляемый новыми композициями, успешно ингибирует селенит-индуцированную катаракту, скорее всего, за счет уменьшения окислительного стресса в роговице. Насколько известно авторам изобретения, это первый отчет об успешной доставке лютеина в ткани глаза в терапевтически эффективных концентрациях с помощью композиции для местного применения.

#### Пример 55. Другие антиоксиданты

[0084] В прототипных вариантах осуществления настоящего изобретения в ткани глаза доставляется лютеин. Однако настоящее изобретение также можно использовать для доставки других антиоксидантов, таких как бета-каротин, ликопин, ретинол и другие каротиноиды. Кроме того, изобретение можно использовать для доставки антиоксидантов в другие ткани, если это необходимо,

например в кожу.

Разное

[0085] Термин "терапевтически эффективное количество", используемый в настоящем описании и формуле изобретения в применении к композиции, относится к количеству композиции, достаточному для того, чтобы эффективно обеспечивать профилактику, ингибирование, замедление развития или лечение симптомов заболеваний глаз, таких как катаракты, сухая макулярная дегенерация или влажная макулярная дегенерация (возрастная макулярная дегенерация), болезнь Штаргардта или пигментный ретинит. В соответствии с контекстом "терапевтически эффективное количество" композиции также может представлять собой количество композиции, которое при местном введении в ткань является достаточным для обеспечения концентрации антиоксиданта в ткани, оказывающей клинически значимый эффект в данной ткани, или в соседних тканях.

[0086] Содержание всех ссылок, приведенных в данной заявке, полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки. Кроме того, в настоящее описание в качестве ссылки включено полное содержание двух приоритетных заявок, предварительной заявки США 62/035683, поданной 11 августа 2014 года и предварительной заявки США 62/172455, поданной 08 июня 2015 года. Однако в случае непримиримого противоречия настоящее описание обладает преимущественным правом.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ доставки лютеина в глаз млекопитающего, включающий местное введение в глаз млекопитающего композиции, которая содержит смесь наночастиц и гидрогеля:

(a) где наночастицы содержат: (i) синтетический полимер или белок, (ii) лютеин и (iii) поверхностно-активное вещество; причем полимер или белок захватывает лютеин; причем поверхностно-активное вещество связывается с полимером или белком; причем наночастицы имеют диаметр от 50 нм до 250 нм; причем наночастицы являются более гидрофильными, чем нативный лютеин; где лютеин в наночастицах имеет большую устойчивость к деградации под действием кислорода, к деградации под действием ультрафиолетового света, или к той и другой, чем свободный лютеин;

(b) где гидрогель содержит смесь воды, термообратимого гелеобразующего полимера и биоадгезивного полимера; причем композиция представляет собой жидкость при 25°C; причем термообратимый гелеобразующий полимер обуславливает превращение композиции в гель при температуре конъюнктивального мешка или поверхности роговицы млекопитающего; и где биоадгезивный полимер способствует более сильному прилипанию геля к слизистой оболочке конъюнктивы и к роговице, чем в отсутствие биоадгезивного полимера; и

(c) где композицию наносят в виде жидкости на поверхность роговицы или в конъюнктивальный мешок; причем температура конъюнктивального мешка или поверхности роговицы вызывает превращение композиции в гель; причем гель прилипает к слизистой оболочке конъюнктивы, поверхности роговицы, или к той и другой; и где прилипший гель высвобождает лютеин в глаз в течение определенного периода времени.

2. Способ по п.1, где полимер или белок содержит зеин.

3. Способ по п.1, где полимер или белок содержит сополимер молочной и гликолевой кислот.

4. Способ по п.1, где термообратимый гелеобразующий полимер содержит полксамер.

5. Способ по п.1, где биоадгезивный полимер содержит полиэтиленоксид.

6. Способ по п.1, где млекопитающее страдает от возрастной дегенерации желтого пятна, и где способ облегчает симптомы возрастной дегенерации желтого пятна.

7. Способ по п.1, где млекопитающее имеет риск развития возрастной дегенерации желтого пятна, и где способ предотвращает или замедляет начало возрастной дегенерации желтого пятна.

8. Способ по п.1, где млекопитающее имеет одну или более катаракт, и где способ облегчает симптомы одной или более катаракт.

9. Способ по п.1, где млекопитающее имеет риск развития катаракты, и где способ предотвращает или задерживает начало катаракты.

10. Способ по п.1, где указанный способ обеспечивает доставку лютеина к роговице.

11. Способ по п.1, где указанный способ обеспечивает доставку лютеина к сетчатке.

12. Способ доставки антиоксиданта в ткань млекопитающего, включающий местное введение в ткань млекопитающего композиции, которая содержит смесь наночастиц и гидрогеля:

(a) где наночастицы содержат: (i) синтетический полимер или белок, (ii) антиоксидант и (iii) поверхностно-активное вещество; причем полимер или белок захватывает антиоксидант; причем поверхностно-активное вещество связывается с полимером или белком; причем наночастицы имеют диаметр от 50 нм до 250 нм; наночастицы являются более гидрофильными, чем нативный антиоксидант; где антиоксидант в наночастицах имеет большую устойчивость к деградации под действием кислорода, к деградации под действием ультрафиолетового света, или к той и другой, чем соответствующий свободный антиоксидант;

(b) где гидрогель содержит смесь воды, термообратимого гелеобразующего полимера и биоадгезивного полимера; причем композиция представляет собой жидкость при 25°C; причем термообратимый гелеобразующий полимер обуславливает превращение

композиции в гель при температуре ткани; и где биоадгезивный полимер способствует более сильному прилипанию геля к ткани, чем в отсутствие биоадгезивного полимера; и

(с) где композицию наносят в виде жидкости на ткань; причем температура ткани вызывает превращение композиции в гель; причем гель прилипает к ткани; и где прилипший гель высвобождает антиоксидант в ткань в течение определенного периода времени.

### 13. Композиция, содержащая смесь наночастиц и гидрогеля:

(а) где указанные наночастицы содержат: (i) синтетический полимер или белок, (ii) лютеин и (iii) поверхностно-активное вещество; причем указанный полимер или белок захватывает указанный лютеин; причем указанное поверхностно-активное вещество связывается с указанным полимером или белком; причем указанные наночастицы имеют диаметр от 50 нм до 250 нм; причем указанные наночастицы являются более гидрофильными, чем нативный лютеин; где указанный лютеин в указанных наночастицах имеет большую устойчивость к деградации под действием кислорода, к деградации под действием ультрафиолетового света, или к той и другой, чем свободный лютеин;

(b) где указанный гидрогель содержит смесь воды, термообратимого гелеобразующего полимера и биоадгезивного полимера; причем указанная композиция представляет собой жидкость при 25°C; причем указанный термообратимый гелеобразующий полимер обуславливает превращение указанной композиции в гель при температуре 35°C или выше; причем указанный биоадгезивный полимер приспособлен способствовать более сильному прилипанию геля к ткани млекопитающего, чем в отсутствие указанного биоадгезивного полимера; и где прилипший гель приспособлен высвобождать лютеин в ткань млекопитающего в течение определенного периода времени.

### 14. Композиция, содержащая смесь наночастиц и гидрогеля:

(а) где указанные наночастицы содержат: (i) синтетический полимер или белок, (ii) антиоксидант и (iii) поверхностно-активное вещество; причем указанный полимер или белок захватывает указанный антиоксидант; причем указанное

поверхностно-активное вещество связывается с указанным полимером или белком; причем указанные наночастицы имеют диаметр от 50 нм до 250 нм; причем указанные наночастицы являются более гидрофильными, чем нативный антиоксидант; где указанный антиоксидант в указанных наночастицах имеет большую устойчивость к деградации под действием кислорода, к деградации под действием ультрафиолетового света, или к той и другой, чем свободный антиоксидант;

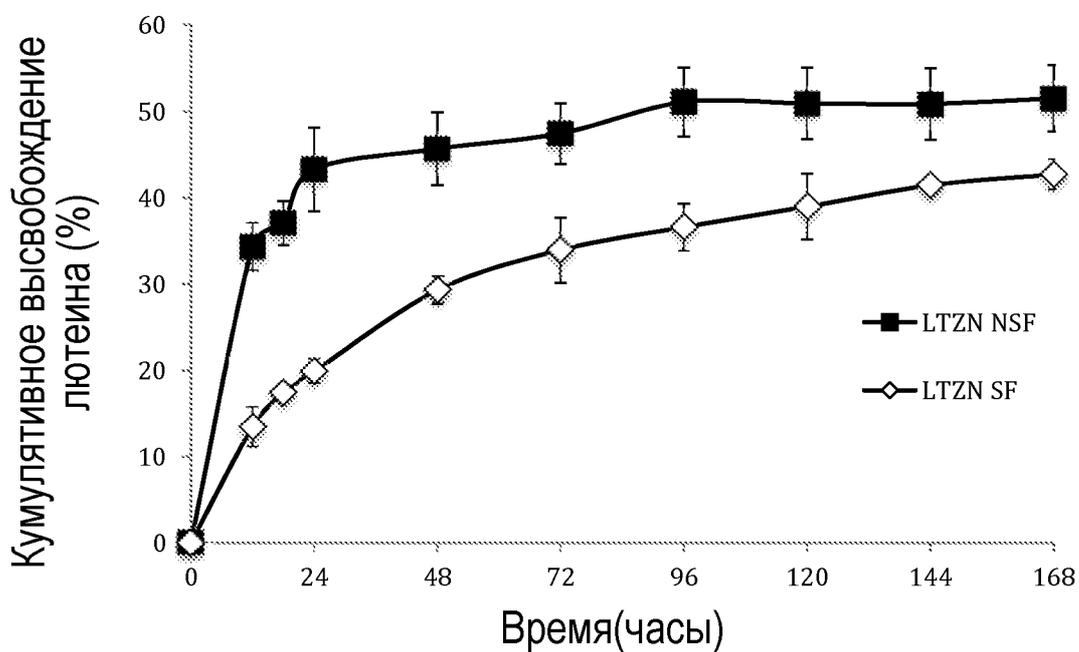
(b) где указанный гидрогель содержит смесь воды, термообратимого гелеобразующего полимера и биоадгезивного полимера; причем указанная композиция представляет собой жидкость при 25°C; причем указанный термообратимый гелеобразующий полимер обуславливает превращение указанной композиции в гель при температуре 35°C или выше; причем указанный биоадгезивный полимер приспособлен способствовать более сильному прилипанию геля к ткани млекопитающего, чем в отсутствие указанного биоадгезивного полимера; и где прилипший гель приспособлен высвобождать указанный антиоксидант в ткань млекопитающего в течение определенного периода времени.

15. Композиция по п.14, где указанный антиоксидант представляет собой каротиноид.

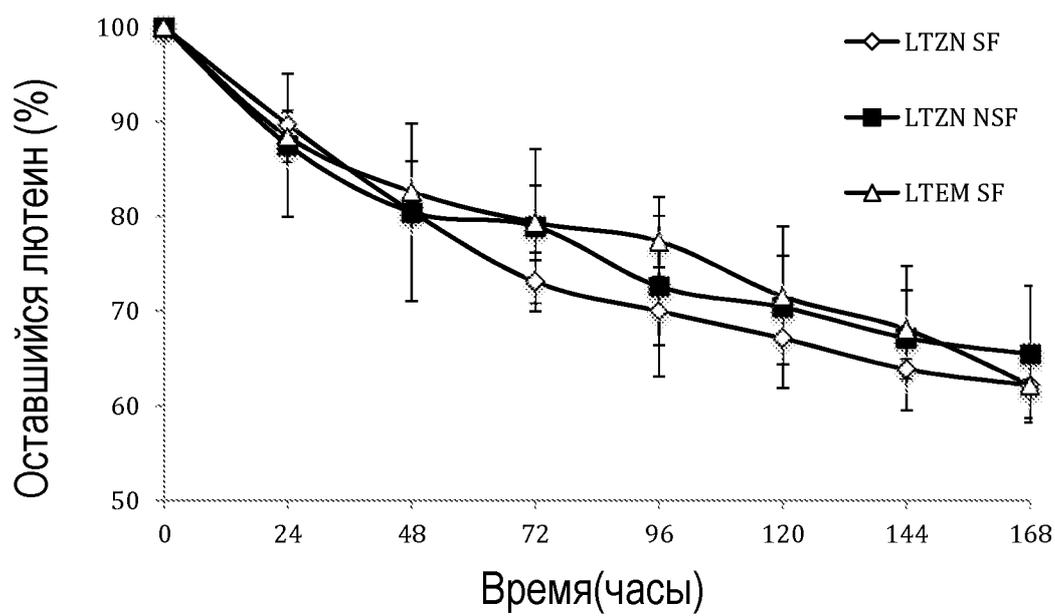
16. Композиция по п.15, где указанный каротиноид выбран из группы, состоящей из бета-каротина, ликопина и ретинола.

По доверенности

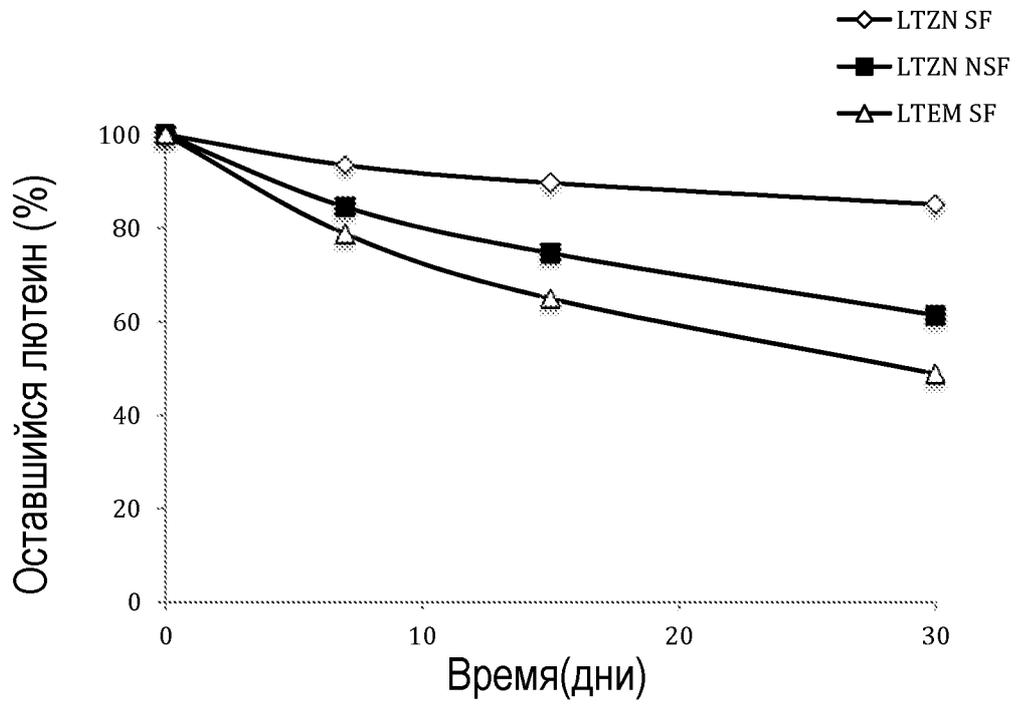
1/4



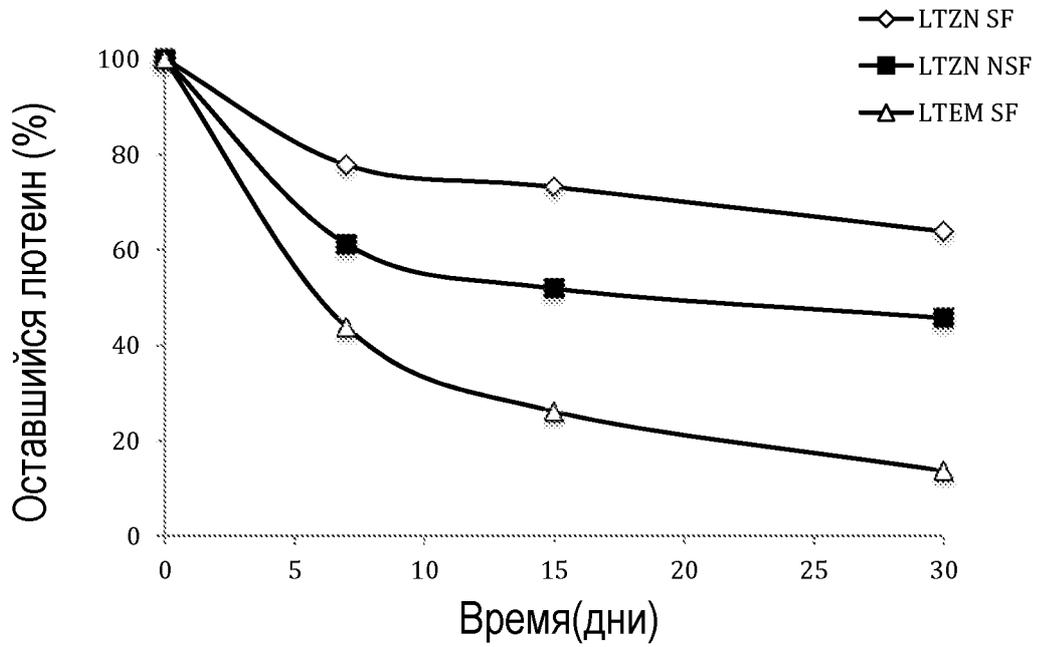
ФИГ. 1



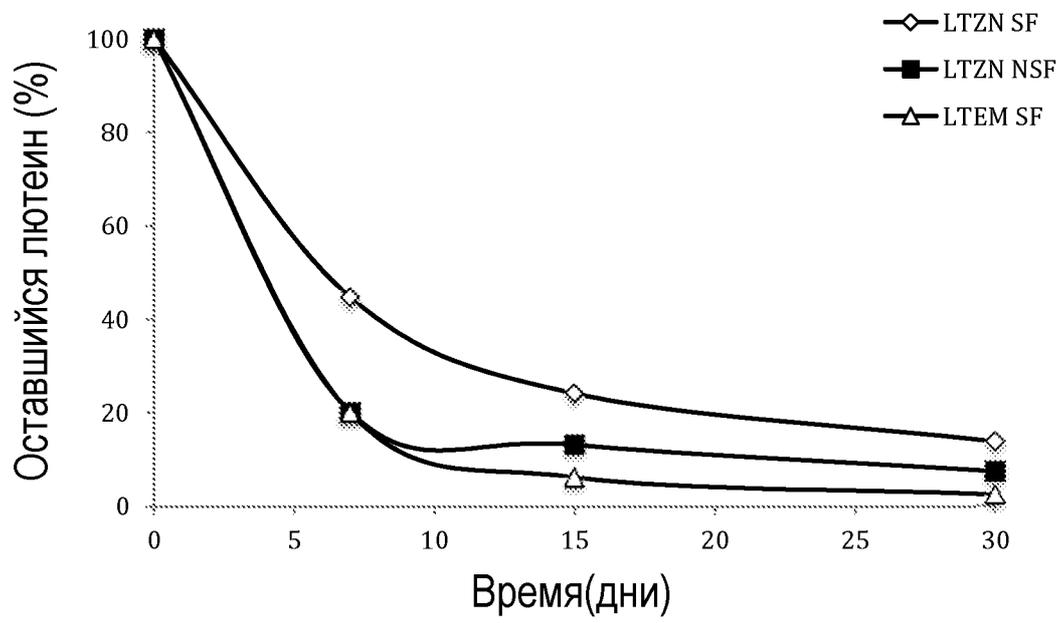
ФИГ. 2



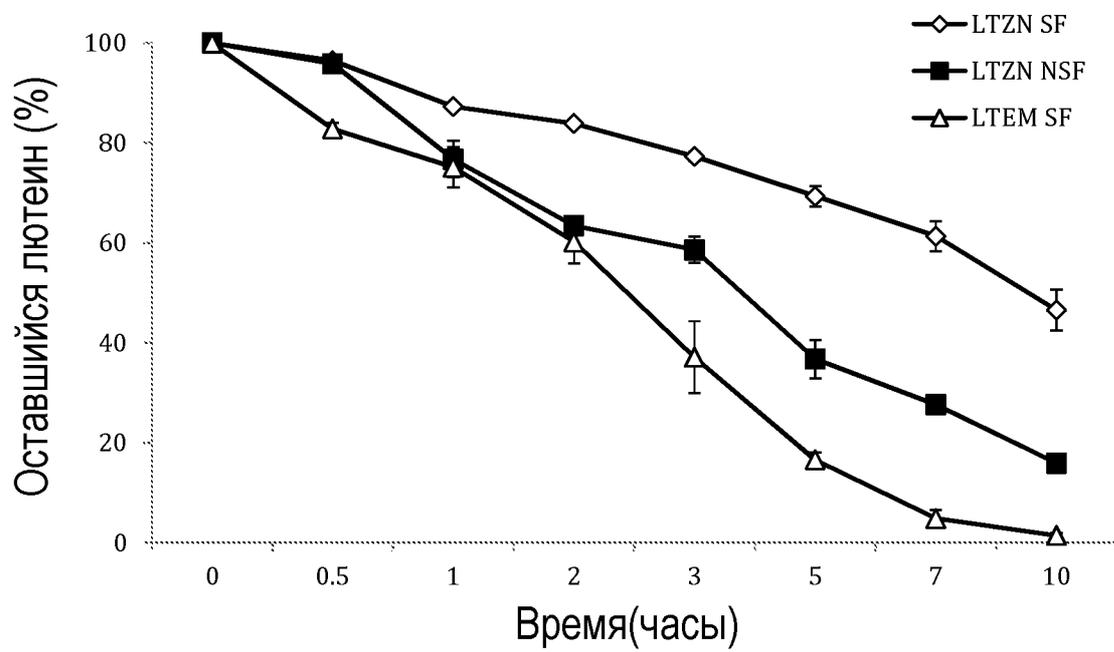
ФИГ. 3А



ФИГ. 3В



ФИГ. 3С



ФИГ. 4