

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091351** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.09.15

(51) Int. Cl. *A61K 8/64* (2006.01)
A61K 8/25 (2006.01)
A61Q 11/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.12.12

(54) КОМПЛЕКС ЛАКТОФЕРРИНА И ДИОКСИДА КРЕМНИЯ, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ГИГИЕНЫ ПОЛОСТИ РТА

(31) 102017000143342

(72) Изобретатель:

(32) 2017.12.13

**Систернас Систернас Ясна Изабель
(IT)**

(33) IT

(86) PCT/IB2018/059937

(74) Представитель:

(87) WO 2019/116258 2019.06.20

Нагорных И.М. (RU)

(71) Заявитель:

Л.И.КО.РАЙС С.Р.Л. (IT)

(57) Комплекс, содержащий по меньшей мере один лактоферрин и по меньшей мере один диоксид кремния, имеющий удельную площадь поверхности, составляющую от 100 до 1000 м²/г (ВЕТ-поверхность, измеряемая в соответствии со стандартом ISO 9277-2010), при этом указанный комплекс может быть получен путем добавления указанного лактоферрина в указанный диоксид кремния в форме золь-геля с водным растворителем и последующей сушки золь-геля. Комплекс особенно пригоден для применения в продуктах для ухода за полостью рта, в частности зубной пасте, растворах для промывания полости рта, гелях, жевательной резинке, таблетках для применения при уходе за полостью рта, красках для десен и т.п. Комплекс характеризуется высоким уровнем стабильности и биодоступности, так что он обладает эффективным, длительным антибактериальным и антиоксидантным действием в полости рта. Комплекс особенно пригоден для профилактики или лечения заболеваний зубного аппарата, в частности для профилактики или лечения периодонтита или периимплантита, предпочтительно, у пациентов, страдающих от сахарного диабета.

202091351

A1

A1

202091351

КОМПЛЕКС ЛАКТОФЕРРИНА И ДИОКСИДА КРЕМНИЯ, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ГИГИЕНЫ ПОЛОСТИ РТА

Настоящее изобретение относится к комплексу, содержащему один лактоферрин и один диоксид кремния, способу его получения и его композиции для гигиены полости рта, в частности, при повышенном оксидативном стрессе полости рта.

Широко известно, что гигиена полости рта является определяющим фактором при профилактике заболеваний зубного аппарата, таких как кариес, гингивит, периодонтит, периимплантит и т.д.

Известно, что периодонтит представляет собой хроническое воспалительное заболевание, характеризующееся разрушением опорных структур зуба (периодонтальной связки, альвеолярной кости). Периодонтит обладает очень широким распространением в общей популяции (приблизительно у 10-15% взрослых людей) и вызывает многочисленные отрицательные факторы воздействия на качество жизни.

С другой стороны, периимплантит представляет собой воспалительный процесс, который оказывает воздействие на ткань, окружающую остеоинтегрированный имплантат, приводя к потерям в костной ткани и, следовательно, в самом имплантате. Причиной может быть инфекция, или же он может быть вызван неправильной импланто-протатической пассивацией (окклюзионной травмой), хотя в клинических условиях могут присутствовать оба случая. Рентгеновское исследование обеспечивает возможность простого отличия периимплантита от окклюзионной травмы, вызванной бактериями.

Для предотвращения или замедления развития этих патологий, особенно точная гигиена полости рта становится решающей у людей, страдающих от дисфункций или заболеваний, в частности, сахарного диабета, что повышает оксидативный стресс в полости рта.

С клинической точки зрения, сахарный диабет представляет собой клинически и генетически гетерогенную группу метаболических расстройств, характеризующихся высокими уровнями глюкозы в крови (гипергликемией). Гипергликемия может быть прямым последствием дефицита секреции инсулина, вызванной дисфункцией панкреатических β -клеток или резистентностью к одному и тому же гормону у гепато-мышечных тканей, или также комбинацией вышеуказанных явлений. Это метаболическое расстройство часто связано с изменением метаболизма адипоцитов и в любом случае может считаться синдромом. При

длительном течении, хроническая гипергликемия приводит к множественным повреждениям различных органов, таких как, например, сердце, глаза, почки, нервы, сосудистая система.

Многочисленные недавние эпидемиологические исследования подтверждают то, что сахарный диабет можно считать важным фактором риска развития заболевания пародонта. Научные доказательства за последние 15-20 лет составляют основу для существенной независимой связи между воспалением пародонта и гликемическим состоянием. Подверженность к возникновению периодонтита в три раза выше у пациентов с сахарным диабетом.

Недавние данные, предоставленные Всемирной организацией здравоохранения, демонстрируют, что частота возникновения диабетической патологии сильно повышается. Прямым следствием этих данных является параллельное увеличение пациентов, страдающих от заболевания пародонта, поскольку сахарный диабет представляет собой фактор риска развития периодонтита, вне зависимости от уменьшения привычки курения и улучшенной гигиены полости рта.

Сахарный диабет и заболевание пародонта характеризуются состоянием системного воспаления. Хроническая гипергликемия, а также периодонтит, вызывают гиперактивацию иммунной системы, что в результате приводит к гиперпродукции провоспалительных молекул (TNF- α , IL6, IL1). Входя в системный цикл, они могут оказывать отрицательное воздействие на организм. В этом смысле, хроническое воспаление гингивальных тканей может ухудшить гликемический и клинический профиль пациента, страдающего от сахарного диабета. Таким образом, в свете упомянутого выше, эту взаимосвязь следует рассматривать, как имеющую двунаправленную природу.

Другим аспектом, связанным с хроническим периодонтитом, является изменение иммунной системы в части баланса между антиоксидантами и веществами, которые вступают в реакцию с кислородом, в пользу последнего. Оксидативный стресс может усиливать клинические проявления у пациента с сахарным диабетом. С другой стороны, сахарный диабет, в свою очередь, является причиной оксидативного стресса, и это может обосновывать тот факт, что клинические сценарии, являющиеся результатом периодонтита, являются особенно сильными у пациентов с сахарным диабетом. Широкое распространение и высокая степень тяжести заболевания пародонта у пациентов с сахарным диабетом может рассматриваться в качестве осложнения, являющегося результатом состояния хронической гипергликемии и скопления конечных продуктов усиленного гликозилирования (AGE). Продолжительный оксидативный стресс в гингивальных тканях может обосновывать сильное

разрушение тканей периодонта у пациентов с сахарным диабетом. Взаимодействие между AGE и их клеточными рецепторами вызывает увеличение оксидативного стресса, что может вносить вклад в хроническую гиперактивацию моноцитов, в активацию системы NF-Kb, в результате приводя к экспрессии провоспалительных мРНК.

Лактоферрин представляет собой противомикробный и несущий железо гликопротеин, который естественным образом присутствует в различных биологических жидкостях у млекопитающих, таких как молоко, слюна, слезы. Он также присутствует в нейтрофильных гранулоцитах, которые представляют собой иммунные клетки, обладающие функцией защиты от бактериальных и грибковых инфекций.

Лактоферрин считается особенно полезным продуктом ввиду его антиоксидантных, иммуномодуляторных и антиинфекционных свойств. Противомикробные свойства лактоферрина главным образом обусловлены его способностью к связыванию с железом, его извлечению из метаболизма таких бактериальных видов, как *Escherichia coli*, которые зависят от него ввиду его собственной мультимпликации и адгезии со слизистой оболочкой кишки (бактериостатический эффект). Он также обладает прямым антибактериальным действием (бактерицидным) благодаря способности наносить повреждения внешним слоям клеточной мембраны некоторых грамм-отрицательных бактериальных видов.

Применение лактоферрина в области продуктов для ухода за полостью рта в настоящее время не было широким, главным образом, вследствие его плохой стабильности и совместимости со вспомогательными веществами, которые обычно применяются в продуктах для ухода за полостью рта, таких как зубные пасты, гели или жидкости для полоскания полости рта. Лактоферрин также обладает относительно низкой биодоступностью при местном применении и подвержен явлению оксидативной деградации.

Таким образом, заявителем была поставлена задача получения композиции, содержащей лактоферрин, которая была бы пригодной для применения в гигиене полости рта, в частности, в форме зубной пасты, геля или жидкости для полоскания полости рта, и которая имела бы высокую стабильность и биодоступность, для осуществления эффективного и длительного антибактериального и антиоксидантного действия в полости рта.

Данная и другие задачи, которые будут лучше проиллюстрированы ниже, были решены посредством связывания одного лактоферрина с по меньшей мере одним диоксидом кремния, имеющим высокую удельную площадь поверхности, которая способна образовывать комплекс с белком для формирования стабильного комплекса, который усиливает и сохраняет длительное антиоксидантное и антибактериальное действие лактоферрина.

Таким образом, согласно первому аспекту, настоящее изобретение относится к комплексу по меньшей мере одного лактоферрина и по меньшей мере одного диоксида кремния, имеющему удельную площадь поверхности, составляющую от 100 м²/г до 1000 м²/г, предпочтительно, от 150 м²/г до 700 м²/г (ВЕТ-поверхность, измеряемая в соответствии со стандартом ISO 9277-2010), при этом указанный комплекс может быть получен путем добавления указанного лактоферрина в указанный диоксид кремния в форме золь-геля с водным растворителем и последующей сушки золь-геля.

Предпочтительно, сушку выполняют путем обработки сверхкритическим СО₂ или путем лиофилизации, что лучше описано ниже.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение относится к композиции для гигиены полости рта, в частности, для гигиены полости рта пациентов с сахарным диабетом, которая содержит указанный комплекс и по меньшей мере одно физиологически приемлемое вспомогательное вещество.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение относится к определенному выше комплексу для применения в профилактике или лечении заболеваний зубного аппарата путем местного применения в полости рта, в частности, для применения в профилактике или лечении периодонтита или периимплантита, предпочтительно, у пациентов с сахарным диабетом.

Что касается лактоферрина, он может быть природного или синтетического происхождения, и может принимать различные формы, как мономерную, так и олигомерную, возможно уже связанный с железом (ололактоферрин) или не связанный с железом (аполактоферрин).

Что касается диоксида кремния, он может быть получен путем синтеза или путем переработки материалов природного происхождения, что лучше проиллюстрировано ниже. Из числа синтетических диоксидов кремния особенно предпочтительными формами являются пирогенные диоксиды кремния или осажденные диоксиды кремния. Предпочтительно, диоксид кремния представляет собой гидрофильный диоксид кремния.

Для целей настоящего изобретения особенно предпочтительными являются диоксиды кремния в форме аэрогеля. Они представляют собой аморфные диоксиды кремния, характеризующиеся высокой удельной площадью поверхности, а также очень высокой пористостью и очень низкой плотностью. В целом, пористость составляет более 85% и может достигать даже значений 95-99%, а плотность, как правило, составляет от 0,003 г/см³ до 0,8 г/см³, предпочтительно, от 0,005 г/см³ до 0,3 г/см³.

Особенно предпочтительным является диоксид кремния в форме аэрогеля, полученного из растительных отходов, в частности, из лузги, полученной после переработки зерновых, таких как рис, овес, пшеница, рожь, спельта. Этот диоксид кремния, который получен из возобновляемых источников, характеризуется высоким уровнем биосовместимости и имеет большую область поверхности и высоко пористую структуру с открытыми порами, что способствует взаимодействию с лактоферрином. Особенно предпочтительным является диоксид кремния, полученный из рисовой лузги.

Диоксид кремния в форме аэрогеля из растительных отходов может быть получен многостадийным способом, включающим: сжигание растительных отходов, обработку полученной таким образом золы щелочным раствором (NaOH) для получения силиката (натрия), обработку последнего раствором кислоты (HCl) с образованием влажного золь-геля и конечную сушку влажного золь-геля, предпочтительно, посредством обработки сверхкритическим CO₂. Дополнительные подробности получения таких форм диоксида кремния описаны, например, в заявке на выдачу патента WO 2016/193877 и в статье авторства R.S. Kumar et al . *Int. J. Chem. Eng. and Appls.*, Vol. 4, No. 5, October 2013.

Предпочтительно, в комплексе, в соответствии с настоящим изобретением, указанный по меньшей мере один лактоферрин и указанный по меньшей мере один диоксид кремния присутствуют в весовом соотношении от 0,05:1 до 10:1, более предпочтительно, от 0,1:1 до 5:1.

Предпочтительно, композиция, в соответствии с настоящим изобретением, содержит:

от 10 вес.% до 70 вес.% по меньшей мере одного диоксида кремния;

от 0,05 вес.% до 15 вес.% по меньшей мере одного лактоферрина;

от 25 вес.% до 80 вес.% водной фазы.

Более предпочтительно, композиция, в соответствии с настоящим изобретением, содержит:

от 20 вес.% до 50 вес.% по меньшей мере одного диоксида кремния;

от 0,2 вес.% до 10 вес.% по меньшей мере одного лактоферрина;

от 40 вес.% до 75 вес.% водной фазы.

Следует отметить, что количества диоксида кремния, указанные выше, относятся к количеству всего диоксида кремния, присутствующего в композиции, вне зависимости от того, объединен ли он в комплекс с лактоферрином или нет.

В соответствии с предпочтительным вариантом реализации, композиция, в соответствии с настоящим изобретением, содержит указанный выше комплекс по меньшей мере одного лактоферрина и по меньшей мере одного диоксида кремния в смеси с гидрофильным диоксидом кремния, который не был объединен в комплекс с лактоферрином, в частности, синтетическим диоксидом кремния, предпочтительно, гидрофильным пирогенным диоксидом кремния. Основная цель добавления диоксида кремния, не объединенного в комплекс, заключается в дополнительной стабилизации комплекса диоксида кремния и лактоферрина, по существу действуя в качестве барьера для взаимодействия с другими ингредиентами композиции, которые могут дестабилизировать комплекс.

Весовое соотношение диоксида кремния, объединенного в комплекс с лактоферрином, и гидрофильного диоксида кремния, не объединенного в комплекс с лактоферрином, предпочтительно, составляет от 1:200 до 1:1, более предпочтительно, от 1:150 до 1:5.

Что касается водной фазы, то она, предпочтительно, содержит смесь воды и полиола, более предпочтительно, глицерин или сорбитол. Весовое соотношение воды к полиолу, предпочтительно, составляет от 1:20 до 1:1, более предпочтительно, от 1:10 до 1:2.

Заявителем было обнаружено, что комплекс лактоферрина и диоксида кремния, в соответствии с настоящим изобретением, обеспечивает возможность получения улучшенного антибактериального и антиоксидантного эффекта по сравнению с используемым отдельно лактоферрином при тех же концентрациях, который длится дольше и позволяет продлить эффект без необходимости слишком частого повторного применения композиции.

Комплекс, в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно, получают посредством способа, который включает:

получение диоксида кремния, имеющего удельную площадь поверхности в диапазоне от 100 м²/г до 1000 м²/г, предпочтительно, от 150 м²/г до 700 м²/г (ВЕТ-поверхность, измеряемая в соответствии со стандартом ISO 9277-2010), в форме золь-геля с водным растворителем;

добавление по меньшей мере одного лактоферрина в диоксид кремния в форме золь-геля;

проведение этапа сушки полученной таким образом смеси.

Добавление лактоферрина в диоксид кремния в форме золь-геля может осуществляться путем постепенного добавления белка в золь-гель и механического смешивания до получения однородной дисперсии. В целом, температуру смешивания поддерживают от 15°C до 50°C.

Предпочтительно, сушку выполняют путем обработки сверхкритическим CO₂ или путем лиофилизации. Таким образом, гарантируется образование комплекса диоксида кремния и лактоферрина, при этом последний не претерпевает денатурацию или другие структурные модификации, которые могли бы поставить под угрозу его функциональность.

Комплекс лактоферрина и диоксида кремния, в соответствии с настоящим изобретением, может быть обработан по меньшей мере одним полиолом, предпочтительно, глицерином или сорбитолом. Полиол обладает функцией покрытия частиц диоксида кремния, нагруженных лактоферрином, дополнительно стабилизируя структуру.

Вода может быть использована в качестве водного растворителя, необязательно с примесью по меньшей мере одного водорастворимого органического растворителя, например, этилацетата или ацетона.

Предпочтительно, этап сушки сверхкритическим CO₂ выполняют в автоклаве при температуре от 15°C до 60°C и давлении от 80 бар до 150 бар. Для предотвращения деградации лактоферрина предпочтительно использовать температуру не более чем 60°C. Обработку выполняют в течение времени, предпочтительно, в диапазоне от 2 часов до 10 часов, более предпочтительно, от 4 часов до 8 часов.

Предпочтительно, этап сушки путем лиофилизации (криогенной сушки) выполняют путем охлаждения в условиях вакуума при температуре от -80°C до -30°C и последующего нагревания, вновь в условиях вакуума, при температуре не более чем 60°C, предпочтительно, от 20°C до 50°C. Предпочтительно, давление во время лиофилизации поддерживают от 0,1 бар до 0,8 бар.

Композиция для гигиены полости рта, в соответствии с настоящим изобретением, содержит, помимо комплекса, по меньшей мере один физиологически приемлемое вспомогательное вещество. Это предусмотрено для того, чтобы получить продукт для гигиены полости рта в различных формах, например, в форме зубной пасты, раствора для промывания полости рта, жевательной резинки, таблеток для перорального применения, краски для десен и тому подобного.

Для этой цели, композиция, в соответствии с настоящим изобретением, может содержать ингредиенты, которые традиционно используются в области продуктов для гигиены зубов, такие как, например: абразивные вещества в форме аэрозоля, увлажняющие вещества, связующие вещества, загустители, регуляторы вязкости, поверхностно-активные вещества, подсластители, ароматизаторы, консерванты, противоналетные вещества, красители и т.д.

Приведенные далее примеры вариантов реализации представлены исключительно с целью иллюстрации настоящего изобретения, и не предназначены для ограничения объема защиты, определенного прилагаемой формулой изобретения.

ПРИМЕРЫ 1-3.

Получали композиции, показанные в Таблице 1 (% по весу всей композиции):

ТАБЛИЦА 1

ПРИМЕР	1	2	3 (*)
глицерин	51,6	51,0	74,0
вода	7,0	15,0	25,0
гидрофильный диоксид кремния	40,0	30,0	--
диоксид кремния из рисовой лузги	0,4	3,0	--
лактоферрин	1,0	1,0	1,0

(*) сравнительный

- гидрофильный диоксид кремния: гидрофильный пирогенный диоксид кремния, имеющий удельную площадь поверхности, составляющую приблизительно 200 м²/г (ВЕТ-поверхность, измеряемая в соответствии со стандартом ISO 9277-2010) (доступный в продаже продукт Aerosil™ 200 от «Evonik»);

- диоксид кремния из рисовой лузги: диоксид кремния в форме аэрогеля, имеющий удельную площадь поверхности, составляющую приблизительно 550 м²/г (ВЕТ-поверхность, измеряемая в соответствии со стандартом ISO 9277-2010) и плотность, составляющую приблизительно 0,050 г/см³.

Диоксид кремния из рисовой лузги и лактоферрин заранее объединяли в комплекс следующим способом. Диоксид кремния из рисовой лузги получали так, как описано в Примере 1 в WO 2016/193877, с тем отличием, что после получения золь-геля диоксида кремния, его добавляли в лактоферрин, а затем подвергали сушке сверхкритическим СО₂, как описано в том же Примере 1, за исключением того, что золь-гель диоксида кремния с добавленным лактоферрином обрабатывали в автоклаве при температуре 50°С и давлении 100 бар в течение времени, равном 6 часам, для обеспечения сушки золь-геля без деградации лактоферрина.

Полученный таким образом комплекс и другие ингредиенты композиции смешивали в колбе с помощью стержневого магнита до получения однородного состава. Следует отметить, что гидрофильный диоксид кремния добавляли сам по себе, т.е. не объединенный в комплекс с лактоферрином.

Проверяли антиоксидантные и антибактериальные свойства этих композиций, оценивая изменчивость эффективности с течением времени.

Антиоксидантная активность (поглотитель).

Антиоксидантную активность (поглотитель свободных радикалов) указанных выше композиций оценивали путем измерения способности к противодействию формированию свободных радикалов (АФК) в клеточных культурах кератиноцитов человека. Для этой цели, кератиноциты обрабатывали скалярными концентрациями продукта (разбавления 1:2, начиная с 1,0 мг/мл), а затем подвергали действию УФА-лучей при комнатной температуре для стимуляции выработки АФК. Необработанные клетки представляют собой негативный контроль. В то же время, анализ на захват нейтрального красного (ЗНК) выполняли перед и после облучения для проверки того, что жизнеспособность клеток не была существенно снижена в экспериментальных условиях. Результаты ЗНК-испытания перед воздействием УФА-лучами демонстрировали отсутствие ингибирования жизнеспособности клеток при всех использованных концентрациях. Таким образом, для дозирования АФК принимали во внимание все концентрации.

Результаты, полученные посредством дозирования АФК, демонстрировали антиоксидантное действие, выраженное в % снижения АФК по сравнению с негативным контролем.

Ниже более подробно представлены использованные материалы и рабочие условия.

Использовали кератиноциты человека (Niker), выращенные в DMEM (среда Игла в модификации Дульбекко), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и 1% антибиотиков (пенициллина и стрептомицина), инкубированной в стандартных условиях культивирования (37°C, 5% CO₂). Применяли надлежащие практики культивирования клеток.

Для имитации состояния воздействия окружающей среды, способного вызывать образование АФК, клетки подвергали облучению УФА-лучами. Лампа, которую использовали в ходе экспериментов, представляла собой имитатор солнечного света, который воспроизводит спектр солнечного облучения с постоянным диапазоном УФА-излучения от 315 нм до 400 нм и с интенсивностью излучения 1,7 мВт/см². Излучение УФВ

соответствующим образом проверяли для предотвращения цитотоксичного повреждения, направленного на клеточные культуры.

Оценивали воздействия выработки АФК в различные моменты времени облучения: 4, 8, 12, 16 и 20 мин.

Каждый образец испытуемых композиций растворяли в воде, а затем разбавляли в среде для роста до желаемых конечных концентраций от 0,0156 до 1,0 мг/мл (1:2 разбавления). 2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетат (DCFDA) использовали в качестве флуориметрического индикатора с растворением в диметилсульфоксиде (DMSO) при концентрации 50 мМ, а затем разбавляли в соответствующем буфере до концентрации для применения, составляющей 250 мМ.

Каждый образец клеток (кератиноцитов человека) высевали в 96-луночные планшеты. Сразу после достижения наполовину слившегося монослоя, клетки промывали фосфатным буфером (ФСБ), а затем инкубировали с раствором DCFDA на 20 мин при стандартных условиях культивирования. Затем DCFDA удаляли, клетки промывали в ФСБ, обрабатывали различными концентрациями испытуемой композиции и положительным контролем, инкубировали на 20 мин при стандартных условиях, а затем облучали УФА в течение 4, 8, 12, 16 и 20 мин. В конце каждого периода облучения проводили измерение флуориметром при длине волны возбуждения 485 нм и длине волны излучения 530 нм.

Для проверки того, что жизнеспособность клеток не была существенно изменена в присутствии исследуемой композиции и в примененных экспериментальных условиях, перед и после облучения выполняли анализ на захват нейтрального красного (ЗНК). Нейтральный красный (НК) представляет собой слабо катионный зонд, который проходит через клеточную мембрану за счет неионной пассивной диффузии и концентрируется в лизосомах, где он связывается с анионными сайтами матрицы посредством электростатических взаимодействий. Захват НК зависит от способности клеток к созданию градиентов pH, определяемых, в свою очередь, выработкой АТФ. Таким образом, НК скапливается только в живых клетках, из которых он извлекается с помощью кислого раствора этанола: поглощаемость раствора, измеряемая с помощью спектрофотометра, пропорциональна жизнеспособности клеток.

После аккуратного удаления среды, клетки обрабатывали нейтральным красным (НК) (50 мкг/мл) и инкубировали на 3 часа при стандартных условиях. Затем клетки промывали с помощью ФСБ для удаления остатков красителя и извлекали НК. Планшеты аккуратно встряхивали в течение по меньшей мере 10 мин (для способствования растворению НК) и определяли поглощаемость (оптическую плотность, ОП) с помощью

спектрофотометрического измерения при 540 нм. Поглощаемость, измеренная при 540 нм, пропорциональна жизнеспособности клеток. Процентные значения вычисляли на основе значений поглощаемости при 540 нм, при этом поглощаемость негативного контроля (необработанных клеток) брали, как 100%. В отсутствие УФА-облучения, жизнеспособность клеток кератиноцитов, обработанных продуктом, была сравнима с таковой у необработанных кератиноцитов по всем испытанным концентрациям, следовательно, все концентрации были приняты во внимание в дозировках АФК.

Противомикробная активность.

Каждую композицию испытывали для проверки на противомикробную активность относительно *E. coli*. Количество композиции, равное 9 г, добавляли в 1 мл инокулята *E. coli* (АТСС 8739) для получения конечной нагрузки, составляющей приблизительно 10^5 КОЕ. После увеличения времени контакта (1, 4, 8 и 24 часа) отбирали 0,5 мл суспензии для определения количества микроорганизмов посевом на чашках Петри (метод поверхностной спатуляции). Таким образом, изменение % количества бактерий определяли относительно исходного.

Результаты показаны в следующих таблицах, где в левом столбце показано время (в минутах для Таблицы 2 и в часах для Таблицы 3). Эти же результаты представлены на графиках, приложенных, как Фиг. 1 и Фиг. 2.

ТАБЛИЦА 2

(антиоксидантное действие: % снижения АФК)

ПРИМЕР	1	2	3 (*)
t = 8	50	40	60
t = 12	65	65	30
t = 16	40	50	20
t = 20	25	30	10

(*) сравнительный

ТАБЛИЦА 3

(антибактериальное действие: % снижения бактериальной нагрузки)

ПРИМЕР	1	2	3 (*)
t = 1	30	25	45
t = 4	45	35	55
t = 8	70	75	58
t = 24	70	77	60

(*) сравнительный

Из полученных результатов явно видно, что комплекс, содержащий лактоферрин и диоксид кремния, обеспечивает возможность повышения эффективности как в части антиоксидантного, так и в части антибактериального действия, более постепенным образом, а также их сохранения с течением времени, по сравнению с применением лактоферрина отдельно.

ПРИМЕРЫ 4-6.

Примеры 2 и 3 повторно проводили при тех же условиях и с теми же ингредиентами, которые показаны выше (Примеры 4 и 5). Также был проведен еще один сравнительный пример (Пример 6) вновь с той же процедурой и теми же ингредиентами, в котором лактоферрин просто смешали с гидрофильным диоксидом кремния, т.е. без приготовления комплекса, в соответствии с настоящим изобретением, причем диоксид кремния готовили в форме золь-геля, добавляли лактоферрин и затем сушили. Композиции представлены в Таблице 4 (% по весу всей композиции):

ТАБЛИЦА 4

ПРИМЕР	4	5 (*)	6 (*)
глицерин	51,0	74,0	51,0
вода	15,0	25,0	15,0
гидрофильный диоксид кремния	30,0	--	33,0
диоксид кремния из рисовой лузги	3,0	--	--
лактоферрин	1,0	1,0	1,0

(*) сравнительный

Проверяли антиоксидантные и антибактериальные свойства этих композиций, оценивая изменчивость эффективности с течением времени, как описано в Примерах 1-3.

Результаты представлены в следующих таблицах, где в левом столбце показано время (в минутах для Таблицы 5 и в часах для Таблицы 6). Эти же результаты представлены на графиках, приложенных, как Фиг. 3 и Фиг. 4.

ТАБЛИЦА 5

(антиоксидантное действие: % снижения АФК)

ПРИМЕР	4	5 (*)	6 (*)
t = 4	35	60	55
t = 8	38	58	50
t = 12	60	35	30
t = 16	55	25	20
t = 20	48	15	10

(*) сравнительный

ТАБЛИЦА 6

(антибактериальное действие: % снижения бактериальной нагрузки)

ПРИМЕР	4	5 (*)	6 (*)
t = 1	26	45	50
t = 4	42	55	55
t = 8	60	58	60
t = 24	77	60	63

(*) сравнительный

Из полученных результатов явно видно, что комплекс, содержащий лактоферрин и диоксид кремния, обеспечивает возможность повышения эффективности как в части антиоксидантного, так и в части антибактериального действия, более постепенным образом, а также их сохранения с течением времени, по сравнению с применением лактоферрина отдельно, а также по сравнению с простой смесью лактоферрина с диоксидом кремния без образования комплекса, в соответствии с настоящим изобретением.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комплекс по меньшей мере одного лактоферрина и по меньшей мере одного диоксида кремния, имеющий удельную площадь поверхности, составляющую от $100 \text{ м}^2/\text{г}$ до $1000 \text{ м}^2/\text{г}$, предпочтительно от $150 \text{ м}^2/\text{г}$ до $700 \text{ м}^2/\text{г}$ (ВЕТ-площадь, измеряемая в соответствии со стандартом ISO 9277-2010), при этом указанный комплекс получен добавлением указанного лактоферрина к указанному диоксиду кремния в форме золь-геля с водным растворителем и последующей сушкой золь-геля.

2. Комплекс по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что указанный по меньшей мере один диоксид кремния представляет собой синтетический диоксид кремния, выбранный из пирогенных диоксидов кремния и осажденных диоксидов кремния.

3. Комплекс по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что указанный по меньшей мере один диоксид кремния находится в форме аэрогеля.

4. Комплекс по п. 3, отличающийся тем, что указанный по меньшей мере один диоксид кремния, находящийся в форме аэрогеля, имеет пористость более 85% и плотность в диапазоне от $0,003 \text{ г}/\text{см}^3$ до $0,8 \text{ г}/\text{см}^3$, предпочтительно от $0,005 \text{ г}/\text{см}^3$ до $0,3 \text{ г}/\text{см}^3$.

5. Комплекс по п. 3 или п. 4, отличающийся тем, что указанный по меньшей мере один диоксид кремния получен из растительных отходов, в частности, из лузги, полученной после переработки зерновых, предпочтительно риса.

6. Комплекс по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что указанный по меньшей мере один лактоферрин и указанный по меньшей мере один диоксид кремния присутствуют в весовом соотношении от 0,05:1 до 10:1, предпочтительно от 0,1:1 до 5:1.

7. Комплекс по любому из предыдущих пунктов, представленный в форме частиц, поверхность которых обработана по меньшей мере одним полиолом, предпочтительно глицерином или сорбитолом.

8. Способ получения комплекса по любому из пп. 1-7, который включает:

получение диоксида кремния, имеющего удельную площадь поверхности в диапазоне от $100 \text{ м}^2/\text{г}$ до $1000 \text{ м}^2/\text{г}$, предпочтительно от $150 \text{ м}^2/\text{г}$ до $700 \text{ м}^2/\text{г}$ (ВЕТ-поверхность, измеряемая в соответствии со стандартом ISO 9277-2010), в форме золь-геля с водным растворителем;

добавление по меньшей мере одного лактоферрина в диоксид кремния в форме золь-геля;

проведение этапа сушки полученной таким образом смеси.

9. Способ по п. 8, который дополнительно включает обработку высушенной смеси путем добавления по меньшей мере одного полиола, предпочтительно глицерина или сорбитола.

10. Способ по п. 8 или п. 9, отличающийся тем, что этап сушки выполняют путем обработки сверхкритическим CO₂.

11. Способ по п. 8 или п. 9, отличающийся тем, что этап сушки выполняют путем лиофилизации.

12. Способ по п. 10, отличающийся тем, что этап сушки сверхкритическим CO₂ выполняют в автоклаве при температуре в диапазоне от 15°C до 60°C и давлении в диапазоне от 80 бар до 150 бар.

13. Способ по п. 11, отличающийся тем, что этап сушки путем лиофилизации выполняют путем охлаждения в условиях вакуума при температуре от -80°C до -30°C и последующего нагревания, вновь в условиях вакуума, при температуре не более чем 60°C, предпочтительно от 20°C до 50°C.

14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что лиофилизацию выполняют при давлении от 0,1 бар до 0,8 бар.

15. Композиция для гигиены полости рта, которая содержит по меньшей мере один комплекс по любому из пп. 1-7 и по меньшей мере одно физиологически приемлемое вспомогательное вещество.

16. Композиция по п. 15, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один комплекс находится в смеси с по меньшей мере одним гидрофильным диоксидом кремния, который не объединен в комплекс с лактоферрином, предпочтительно гидрофильным пирогенным диоксидом кремния.

17. Композиция по п. 16, содержащая:

от 10 вес.% до 70 вес.%, предпочтительно от 20 вес.% до 50 вес.%, по меньшей мере одного диоксида кремния;

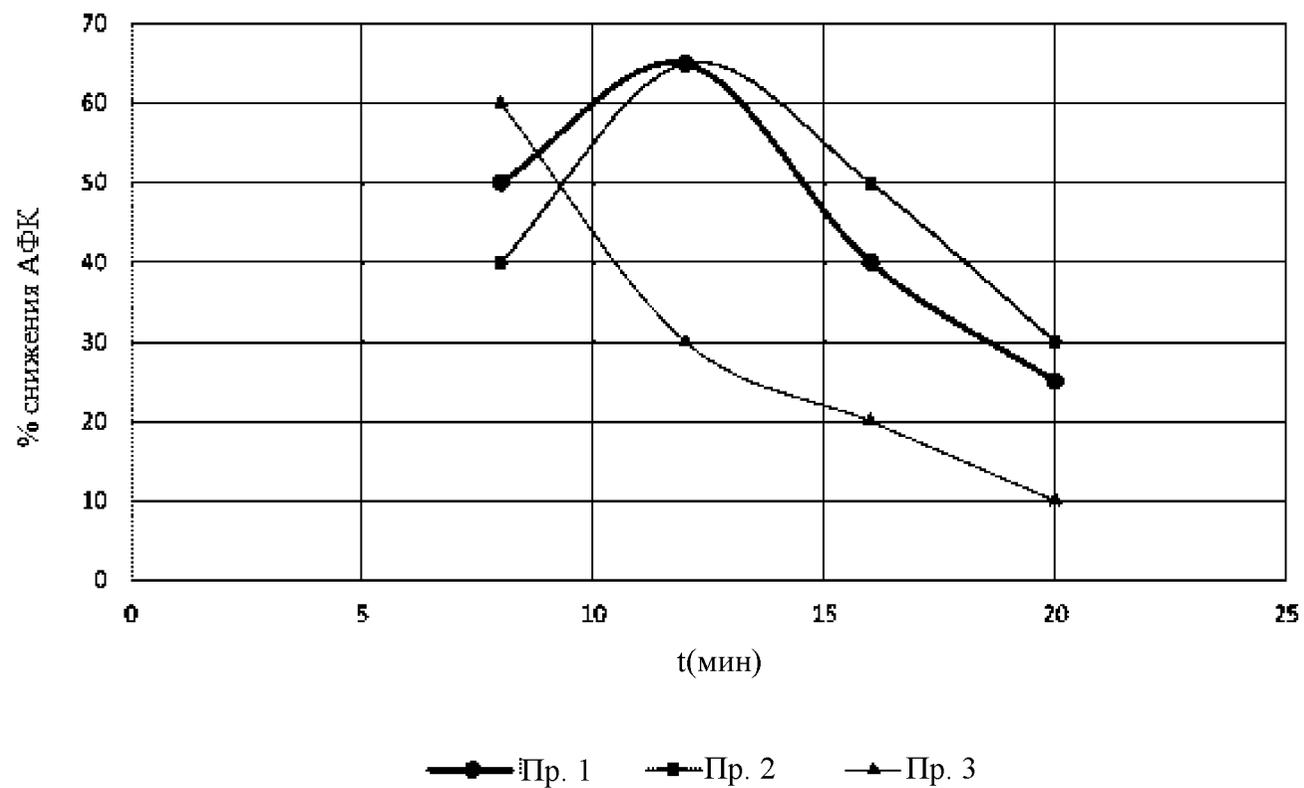
от 0,05 вес.% до 15 вес.%, предпочтительно от 0,2 вес.% до 10 вес.%, по меньшей мере одного лактоферрина;

от 25 вес.% до 80 вес.%, предпочтительно от 40 вес.% до 75 вес.%, водной фазы.

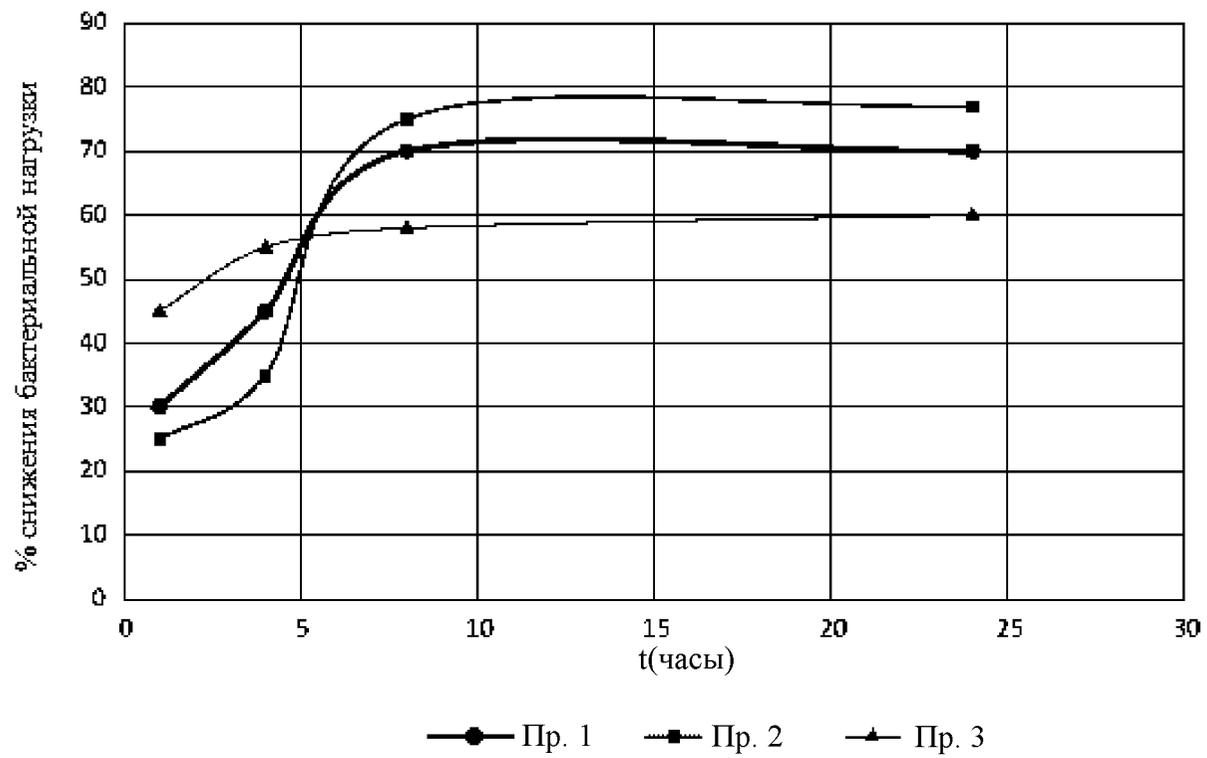
18. Композиция по любому из пп. 15-17, отличающаяся тем, что водная фаза содержит смесь воды и полиола, предпочтительно глицерина или сорбитола.

19. Комплекс по любому из пп. 1-7 для применения в профилактике или лечении заболеваний зубного аппарата путем местного применения в полости рта, в частности, для применения в профилактике или лечении периодонтита или периимплантита, предпочтительно у пациентов с сахарным диабетом.

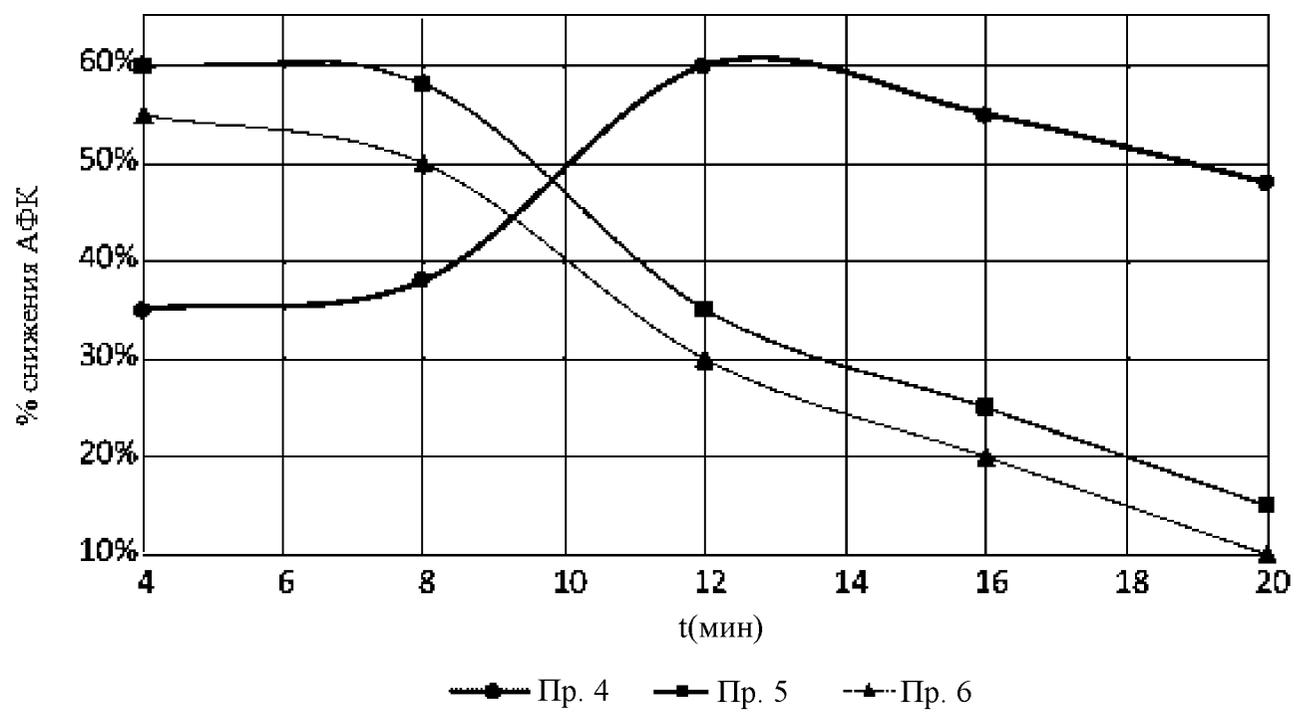
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

