

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035539**(13) **B9**

**(12) ИСПРАВЛЕННОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К
ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(15) Информация об исправлении
**Версия исправления: 1 (W1 B1)
исправления в описании: стр.4
исправления в формуле: п.5, 10**

(51) Int. Cl. *A61K 9/00* (2006.01)
A61K 31/7032 (2006.01)
A61K 31/728 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

(48) Дата публикации исправления
2020.08.07, Бюллетень №8'2020

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.07.01

(21) Номер заявки
201891730

(22) Дата подачи заявки
2016.11.08

**(54) ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ
ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ, СВЯЗАННЫХ С ИЗМЕНЕНИЯМИ
РОГОВИЧНО-КОНЬЮНКТИВАЛЬНОЙ ПОВЕРХНОСТИ**

(31) **102016000012593**

(32) **2016.02.08**

(33) **IT**

(43) **2019.01.31**

(86) **PCT/IB2016/056719**

(87) **WO 2017/137820 2017.08.17**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СООФТ ИТАЛИЯ СПА (IT)

(72) Изобретатель:
**Бьонди Марко, Бьонди Пьеро, Станьи
Эдоардо, Станьи Марчелло (IT)**

(74) Представитель:
Харин А.В. (RU)

(56) RAH ET AL.: "A review of hyaluronan and its ophthalmic applications", OPTOMETRY - JOURNAL OF THE AMERICAN OPTOMETRIC ASSOCIATION, ELSEVIER, NL, vol. 82, no. 1, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 38-43, XP027573889, ISSN: 1529-1839, [retrieved on 2010-12-23], whole document, particularly p. 39, Basic biological functions"; Table

ROBERT L. ET AL.: "Biological effects of hyaluronan in connective tissues, eye, skin, venous wall. Role in aging", PATHOLOGIE ET BIOLOGIE, L'EXPANSION SCIENTIFIQUE FRANCAISE, PARIS, FR, vol. 58, no. 3, 1 June 2010 (2010-06-01), pages 187-198, XP027063426, ISSN: 0369-8114, DOI: 10.1016/J.PATBIO.2009.09.010, [retrieved on 2009-11-22], the whole document
EP-A2-2494954

(57) Офтальмологическая композиция, содержащая ассоциацию лактобионовой кислоты или ее соли и гиалуриновой кислоты или ее соли, для применения при лечении глазных расстройств, вызванных воспалительными состояниями, изменением слезной пленки, синдромом сухого глаза, окислительным стрессом, нагрузкой на глазную поверхность, старением глаза, и при ранозаживлении роговично-конъюнктивального эпителия.

B9**035539****035539****B9**

Область техники

Изобретение относится к медицинской фармацевтической области и, в частности, технической области местных офтальмологических препаратов, которые могут быть применены на роговичной поверхности и в качестве слезозаменителя для стабилизации и реинтеграции слезной пленки, показанных в случае изменений роговично-конъюнктивальной поверхности из-за воспалительных состояний, окислительного стресса, дисбаланса окислительно-восстановительного потенциала и накопления свободных радикалов, сухости глаз и травматических повреждениях. Более того, как было показано, композиция по изобретению также обладает противовоспалительным, антибактериальным и реэпителизирующим действием.

Предшествующий уровень техники

Из-за продолжительного контакта с окружающей средой глаз представляет собой один из органов, который более легко и часто подвергается повреждениям, в частности роговица и конъюктива подвержены риску травм и повреждений вследствие их структуры, специфичной функции и анатомического расположения. Роговица представляет собой мембрану, покрывающую переднюю сторону глаза, через которую можно увидеть радужку и зрачок, она непосредственно контактирует с внешней средой и защищает внутреннюю часть глаза. Передняя поверхность роговицы, выпуклая и непосредственно взаимодействующая с внешней средой, покрыта слезной пленкой.

Конъюктива, напротив, представляет собой тонкую мембрану, покрывающую переднюю поверхность глазного яблока, исключая роговицу и внутреннюю поверхность век. Конъюктива защищает переднюю поверхность глаза от чужеродных тел и инфекций, кроме того, она способствует скольжению век при морганиях и позволяет главному яблоку двигаться без трения поверхностей, благодаря секреции муцинового компонента слезной пленки (тип вязкой слизи, которая защищает роговицу и позволяет выступающему водному слою слезной пленки стратифицировать).

Слезная пленка представляет собой тонкий слой жидкости, распределенной по поверхности глаза, она имеет различную толщину в зависимости от локализации, с максимальной толщиной в области роговицы (приблизительно 8 мкм). Слезная пленка состоит на 98% из воды, а оставшиеся 2% представлены белками и липидами, она непрерывно и равномерно распределена по глазной поверхности за счет закрытия век. Слезная пленка играет важную роль для нашего зрения, поскольку делает однородной поверхность роговицы и улучшает оптическое качество изображения. Слезная пленка обеспечивает достаточную смазку, уменьшает трение век, дает возможность транспорта и диффузии молекул и основных элементов физиологии эпителия и роговицы, таких как кислород, оксид углерода, ионы, муцин и липиды. Более того, слезная пленка выполняет антибактериальную функцию, она обеспечивает оборот молекул и поддерживает глазную поверхность чистой за счет удаления загрязнений из окружающей среды, побочных продуктов метаболизма и слущенных клеток. Глазная поверхность и слезная пленка действуют как единая функциональная сущность. Баланс и целостность их анатомических компонентов, таких как эпителий и слезные железы, их иннервация и иммунный ответ, pH и правильная концентрация электролитов и некоторых органических веществ, условия окружающей среды, такие как ветер, относительная влажность и температура, оказывают прямое влияние на их физиологическую функцию.

Слезы продуцируются слезными железами и непрерывно и однородно распределены по конъюнктивальной слизистой оболочке и по роговице за счет моргания, произвольного закрытия век, происходящего по меньшей мере 12-14 раз в минуту.

Таким образом, слезная пленка выполняет несколько функций:

она смазывает глаз, создавая на роговице гладкую поверхность, по которой веки могут легко перемещаться,

она питает роговицу, которая будучи лишенной кровеносных сосудов, получает питательные вещества и кислород непосредственно через слезную пленку, и, наконец,

она удаляет продукты обмена и защищает глаз от инфекций.

Более того, глаз в силу его особой анатомической структуры и непрерывного контакта с окружающей средой несомненно представляет собой один из органов, который наиболее легко и часто подвергается повреждениям в результате окислительного стресса, т.е. нарушениям баланса между продукцией активных форм кислорода (свободных радикалов) и антиокислительной защитой.

Большинство биологических процессов обычно производят свободные радикалы, которые оказывают положительное влияние, но в случае, когда свободных радикалов становится слишком много, они могут быть крайне разрушительны и воздействовать на основные компоненты клеток, такие как липиды, белки и ДНК.

В частности, действие окислительного стресса на уровне роговицы приводит к появлению структурных и функциональных изменений, как в эпителии, так и в строме роговицы, ассоциированных с апоптозом кератиноцитов и стромальных фибробластов.

Непрерывное воздействие видимого излучения (фотохимическая реакция), приводящее к продукции активных форм кислорода, присутствие перекиси водорода во внутриглазной жидкости, высокая концентрация кислорода в сетчатке в результате высокого тока крови в данной структуре, и гипернакопление липофусцина в пигментном эпителии сетчатки, способные оказать фотосенсибилизирующее действие, являются типичными факторами, определяющими окислительный стресс в глазу.

Более того, существуют заболевания, влияющие на глаза, которые вызваны сильным окислительным стрессом, такие как, но не ограничиваясь ими, катаракта и макулярная дегенерация.

Хотя катаракта представляет собой типичное возрастное заболевание, она также может возникать в менее пожилом возрасте, но в данных случаях она связана с вторичными факторами (диабет, воспаление, врожденные или ятрогенные случаи).

Также макулярная дегенерация, по-видимому, связана с генетикой и условиями окружающей среды. Курение рассматривают как серьезный дозозависимый фактор риска, в то же время менее ясны и противоречивы корреляции с воздействием солнечного света, высоким кровяным давлением, ожирением, операцией по поводу катаракты.

Возникновение воспалительного процесса в глазу или воздействие различных типов радиации или химических агентов может быть непосредственной причиной существенного повышения физиологической концентрации перекиси водорода на уровне роговицы с последующим повышением активных форм кислорода, ответственных за окислительное действие на роговицу.

Окислительное действие свободных радикалов в роговице проявляется возникновением структурных и функциональных изменений как в эпителии, так и в строме роговицы, ассоциированных с апоптотическими процессами, вовлекающими кератоциты и стромальные фибробласты.

Исходя из вышесказанного, очевидна важная роль окислительного стресса в возникновении структурных и функциональных изменений глаза, ответственных за заболевания, которые могут серьезно подорвать состояние здоровья глаза и качества жизни того, у кого он поражен.

С целью противодействия последствиям окислительного стресса очень важно восстановить физиологическое состояние слезной пленки.

Другой тип изменения роговично-конъюнктивальной поверхности, который требует быстрой стабилизации и реинтегрирующего действия слезной пленки и целостности подлежащих тканей, представляет собой эксфолиацию роговицы, т.е. поражение части роговицы с частичной потерей поверхностной ткани.

Наиболее часто эксфолиации возникают в результате травматических повреждений, вызванных чужеродными телами в глазу, царапинами, поломкой контактных линз, незащищенного подвергания ультрафиолету (УФ) и т.д., где также могут быть вовлечены внешние слои роговицы или, в более сложных случаях, более глубокие слои.

Ощущение чужеродного тела, боль, светобоязнь, покраснение глаз и обильное слезотечение являются типичными симптомами истирания роговицы. Однако в случае, если затронута центральная зона роговицы, также будет наблюдаться снижение качества зрения. Обычно, если эксфолиация не слишком глубокая, она может пройти в течение нескольких дней. Лечение варьирует в зависимости от степени повреждения. Обычно истирание роговицы лечат посредством закапывания глазных капель с антибиотиком или закладывания мази с антибиотиком, с последующей перевязкой в течение по меньшей мере 2-3 дней для того, чтобы позволить ткани роговицы восстановиться.

Поэтому лечение комплексных и многофакторных изменений роговично-конъюнктивальной поверхности, также ассоциированных с возрастом, из-за возникновения воспалительных состояний, окислительного стресса, дисбаланса окислительно-восстановительного потенциала и накопления свободных радикалов, синдрома сухого глаза и травматического повреждения, всех состояний, которые иногда могут возникать и формироваться вместе, требует особого внимания и должно быть доступно в виде полных препаратов, обладающих множеством активностей.

Неожиданно было обнаружено, что офтальмологическая композиция по настоящему изобретению, содержащая лактобионовую кислоту в сочетании с гиалуроновой кислотой, не только лучше защищает от гиперосмотического разрушения, которое происходит, например, в случае сухости глаз, обеспечивает быструю реэпителизацию и заживление раны эпителия роговицы, но также обладает защитным эффектом в отношении бактериальных инфекций.

В настоящем изобретении предложено применение гиалуроновой кислоты в сочетании с лактобионовой кислотой в офтальмологической композиции для лечения глазных заболеваний, применяемой в качестве слезозаменителя, стабилизирующего и замещающего слезную пленку, показанной в случае изменений роговично-конъюнктивальной поверхности, ассоциированных с количественным и качественным дефицитом слезной пленки из-за воспалительных состояний, дисбаланса окислительно-восстановительного потенциала, накопления свободных радикалов, давления на глазную поверхность, синдрома сухого глаза, старения, а также состояний, ассоциированных с бактериальными инфекциями.

Кроме того, еще неожиданнее продемонстрировано, что упомянутая композиция полезна при защите тканей глаза от инфекций и обеспечении заживлении раны, соответственно она может быть полезна при реэпителизации роговично-конъюнктивальной поверхности.

Краткое описание изобретения

Следовательно объект настоящего изобретения представляет собой офтальмологическую композицию, содержащую гиалуроновую кислоту в сочетании с лактобионовой кислотой, и ее применение для лечения глазных заболеваний, характеризующихся изменениями роговично-конъюнктивальной поверхности из-за воспалительных состояний, дисбаланса окислительно-восстановительного потенциала, нако-

пления свободных радикалов, давления на глазную поверхность, ассоциированных с возрастом, а также менее пожилым возрастом.

Дополнительный объект настоящего изобретения представляет собой применение упомянутой офтальмологической композиции для репаративного восстановления роговичного эпителия в случае повреждений и микроповреждений роговицы, небольших ран роговицы или конъюнктивы или повреждения глаза, вызванного травматическим стрессом.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 изображает диаграммы оценки при помощи визуально-аналоговой шкалы (ВАШ) в четырех тестируемых группах: А - правый глаз пациентов возраста 18-55 лет; В - левый глаз пациентов возраста 18-55 лет; С - правый глаз пациентов возраста старше 55 лет; D - левый глаз пациентов возраста старше 55 лет;

фиг. 2 - диаграммы оценки частоты симптомов сухого глаза (Symptoms assessment in Dry Eye, SANDE) в четырех тестируемых группах, как описано выше;

фиг. 3 - диаграммы оценки серьезности симптомов сухого глаза (Symptoms assessment in Dry Eye, SANDE) в четырех тестируемых группах, как описано выше;

фиг. 4 - диаграммы теста Ширмера в четырех тестируемых группах, как описано выше;

фиг. 5 - диаграммы теста Норна (тест TBUT) в четырех тестируемых группах, как описано выше;

фиг. 6 - диаграммы оценки осмолярности в четырех тестируемых группах, как описано выше;

фиг. 7 - диаграммы окрашивания по Oxford в четырех тестируемых группах, как описано выше;

фиг. 8 показывает изображения арборизации слезы (10X увеличение) у пациента, получавшего лечение по изобретению;

фиг. 9 изображает диаграмму *in vitro* клеточной пролиферации на клетках линии SIRC, выраженную в % клеточной пролиферации от контрольного образца;

фиг. 10 - диаграмму *in vitro* клеточной пролиферации на клетках линии SIRC, выраженную в процентах от клеточной пролиферации контрольного образца 24 и 48 ч спустя после инкубации с тестируемыми композициями;

фиг. 11 (А) - диаграмму, отображающую процент закрытия раны *in vitro* на клетках линии SIRC с последующей инкубацией с лактобионатом натрия, гиалуроновой кислотой и их комбинациями;

фиг. 11 (В) представляет собой изображения закрытия раны на монослое клеток линии SIRC в тестируемых способах лечения;

фиг. 12 (А) изображает микрофотографию окрашивания флуоресцеином репрезентативной раны роговицы, полученную на 0, 24, 48 и 72 ч после повреждения. Первый ряд панелей показывает поврежденный эпителий роговицы, обработанный PBS в качестве положительного контроля в различные временные точки; нижняя панель показывает неповрежденный эпителий роговицы в качестве отрицательного контроля;

фиг. 12 (В) - диаграмму, отображающую процент закрытия раны *in vivo* на роговицах кроликов после закапывания композиции, содержащей 4% лактобионат натрия и содержащей 4% лактобионат натрия и 0,15% гиалуронат натрия (пример 1);

фиг. 13 (А) - диаграмму вариаций экспрессии матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9) в слезе кроликов на 24, 48 и 72 ч в течение заживления раны;

фиг. 13 (В) - диаграмму вариации экспрессии матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9) в роговице кроликов на 48 и 72 ч в течение заживления раны;

фиг. 14 (А) - диаграмму вариации экспрессии TGF- β в слезе кроликов на 48 ч в течение заживления раны;

фиг. 14 (В) - диаграмму вариации экспрессии TGF- β в роговице кроликов на 48 и 72 ч в течение заживления раны.

Подробное описание изобретения

Цель изобретения заключается в предложении фармацевтической композиции, полученной для офтальмологического местного применения, со стабилизирующим и реинтеграционным действием в отношении слезной пленки, с реэпителизирующей активностью в отношении заживления раны, с антибактериальным действием, основной и характерный компонент которой представляет собой лактобионовую кислоту или ее соли в сочетании с гиалуроновой кислотой или ее соли.

Лактобионовая кислота представляет собой комплексную полигидроксикислоту, также известную как альдоновая кислота полисахарида, состоящую из полигидроксикислоты, глюконовой кислоты и галактозы.

Экспериментальные наблюдения показывают, что местное применение лактобионовой кислоты повышает упругость кожи и корректирует гистологические признаки старения кожи с профилями переносимости и раздражения сравнимыми с таковыми физиологического раствора. Кроме того, полигидроксикислоты не являются причиной феномена сенсорного раздражения и поэтому совместимы с клинически чувствительной кожей, включая розацеа и атопический дерматит, и могут быть применены после косметического лечения. Лактобионовая кислота, а также большинство полигидроксикислот обладает сильными

ми смачивающими и увлажняющими свойствами, она стимулирует функцию барьера, обусловленную роговым слоем эпидермиса, и таким образом стимулирует защитную функцию рогового слоя эпидермиса, повышая устойчивость кожи к химическому воздействию.

В патенте Италии № 1404752, предоставленном заявителем, впервые раскрыто применение лактобионовой кислоты в глазных каплях для лечения отека роговицы глаза, также в ассоциации с воспалением. Упомянутые глазные капли отличаются присутствием лактобионовой кислоты в концентрации, составляющей от 5 до 20 мас.% и более предпочтительно от 6 до 16 мас.%; помимо лактобионовой кислоты растворы по изобретению могут дополнительно содержать другие гиперосмотические агенты, такие как маннитол или хлорид натрия, одни или в комбинации. Гиалуриновая кислота представляет собой естественный компонент соединительной ткани, а именно глюкозаминогликан или молекулу, сформированную длинными неразветвленными цепями дисахаридных звеньев с чередующимися глюкоуроновой кислотой и N-ацетилглюкозамином.

Гиалурионовую кислоту применяют во многих областях:

в косметике, в препаратах увлажняющих, антивозрастных кремов и кремов против морщин; в эстетической медицине в виде инъеклируемого наполнителя для коррекции небольших кожных дефектов, таких как морщины, тонкие губы, опустевшие молочные железы, рубцы и т.д.;

в ортопедии гиалурионовую кислоту инъектируют интраартикулярно (инфильтрация) для лечения артроза;

в области здоровья молекулу применяют для получения оральных антивозрастных добавок; и

в офтальмологии гиалурионовую кислоту применяют для получения препарата глазных капель или офтальмологических мазей, обеспечивающих заживление травм конъюнктивы.

Офтальмологические мази и глазные капли, полученные при помощи гиалурионовой кислоты, полезны при лечении всех глазных расстройств, отличающихся явной сухостью (сухой глаз или сухой кератоконъюнктивит) или поражениями конъюнктивы (например, травматический конъюнктивит). В данных случаях гиалуриновая кислота обеспечивает заживление конъюнктивы в относительно короткое время и ослабляет симптомы, сохраняя глаз увлажненным.

Целью настоящего изобретения является предложение изотонической офтальмологической композиции, отличающейся присутствием лактобионовой кислоты в сочетании с гиалурионовой кислотой или их соответствующих солей, в частности предпочтительно их натриевых солей.

Согласно изобретению в композиции концентрация лактобионовой кислоты или ее соли составляет от 1 до 5 мас.%, предпочтительно от 3,5 до 4,5 мас.%, еще более предпочтительно концентрация лактобионовой кислоты составляет 4,0 мас.%.

Согласно изобретению концентрация гиалурионовой кислоты или ее соли в композиции составляет от 0,01 до 1,0 мас.%, предпочтительно от 0,05 до 0,5% мас.%, более предпочтительно концентрация гиалурионовой кислоты составляет 0,15 мас.%. Предпочтительно гиалурионовая кислота, примененная в настоящем изобретении, имеет массу между 1 и 2 МДа, но данное свойство не ограничено.

Композиция по изобретению представляет собой водный раствор, прозрачный или окрашенный, с рН между 7,0 и 7,4 и изотонической осмоляльностью между 250 и 350 мосмоль/кг.

Значение рН обусловлено буферной системой, приемлемой для поддержания значения рН в диапазоне между 7,0 и 7,4. В некоторых воплощениях настоящего изобретения могут быть применены различные буферные системы, известные специалистам в области техники. Однако в некоторых предпочтительных воплощениях настоящего изобретения применяют буферную систему моноосновного/двуосновного фосфата натрия.

Изотоничность композиции обусловлена присутствием соответствующего количества лактобионовой и гиалурионовой кислоты или их солей, в частности их натриевых солей.

Помимо лактобионовой кислоты в сочетании с гиалурионовой кислотой или их солей композиция по изобретению может дополнительно содержать агенты, стабилизирующие раствор, смазывающие вещества, увлажнители, такие как гидроксипропилметилцеллюлозу или структурные или функциональные аналоги.

Согласно изобретению композиция также содержит консерванты и хелатирующие агенты. Среди консервантов и хелатирующих агентов особо предпочтительны динатриевая ЭДТК (этилендиаминтетрауксусная кислота) и гидроксиметилглицинат.

Согласно изобретению офтальмологическая композиция может включать в своем составе также один или более дополнительных терапевтических агентов, выбранных из группы факторов роста, противовоспалительных агентов, витаминов, фибронектина, коллагена и аминокислот.

Препараты по настоящему изобретению готовят посредством смешивания и перемешивания ингредиентов до растворения всех компонентов.

Затем таким образом полученный раствор стерилизуют посредством фильтрации (0,2 мкм) или при помощи тепловой обработки при температуре 121°C, в течение 20 мин при 1 атмосфере. Однако условия стерилизации могут варьировать и быть оптимизированы специалистами в области техники.

Предпочтительные воплощения изобретения.

Согласно настоящему изобретению офтальмологическая композиция может быть приготовлена в

любой фармацевтической форме, которая допускает ее применение в конъюнктивальном мешочке, такой как глазные капли, коллириум, гели, мази, спрей, но предпочтительно композицию готовят в виде глазных капель, вводимых в виде капель, каждая из которых представляет собой дозированную лекарственную форму, для обеспечения легкого введения и однородного дозирования.

В иллюстративных целях приведены два примера особо предпочтительного препарата. Однако другие аспекты, свойства и модификации внутри объема изобретения будут очевидны специалистам в области техники.

Пример 1. Препарат глазных капель

Ингредиент	масс. %
Лактобионат натрия	4,0
Гиалуронат натрия	0,15
Дигидрофосфат дигидрат натрия	0,225
Динатрия фосфат дегидрат	0,686
Двунариевая ЭДТК	0,100
Гидроксиметилглицинат натрия	0,002
Дистиллированная вода	в достаточном количестве, до 100 г

В особо предпочтительном воплощении изобретения обычно в конъюнктивальный мешочек закапывают 1-2 капли композиции, 2-3 раза в день или более, однако, терапевтически эффективное количество определяет лечащий врач в зависимости от состояния пациента. Также композиция может быть закапана, несмотря на ношение контактных линз. Дозы и способ введения подбирают для обеспечения достаточных уровней активного ингредиента или поддержания желаемого эффекта. Дополнительные факторы, которые должны быть рассмотрены, включают серьезность состояния, течение заболевания, возраст, массу и пол пациента, время и частоту введения, диету, ассоциацию с другими лекарственными средствами, аллергические реакции, переносимость и ответ на терапию.

Применение настоящего изобретения не ограничено человеком, но также может быть распространено, где целесообразно, на других млекопитающих.

Коллириум по настоящему изобретению хорошо переносится пациентами, показавшими в клинических исследованиях хорошее самочувствие.

Согласно изобретению предложенная композиция чрезвычайно проста, поскольку она содержит очень ограниченное число компонентов и эксципиентов, что является выигрышным, поскольку позволяет снизить риск возможных аллергических или сенсибилизирующих явлений.

В частности, в воплощении однодозового препарата или свободного от консервантов многодозового препарата система консервантов может быть исключена.

Пример 2. Препарат однодозовых или свободных от консерванта многодозовых глазных капель

Ингредиент	масс. %
Лактобионат натрия	4,0
Гиалуронат натрия	0,15
Дигидрофосфат дигидрат натрия	0,225
Динатрия фосфат дегидрат	0,686
Дистиллированная вода	в достаточном количестве, до 100 г

Согласно результатам проведенных экспериментальных исследований особо интересная область применения композиции по изобретению представляет собой лечение изменений роговично-конъюнктивальной поверхности в результате воспалительных состояний, окислительного стресса, дисбаланса окислительно-восстановительного потенциала и накопления свободных радикалов, синдрома сухого глаза и травматических повреждений. Кроме того, экспериментальные результаты показали, что изобретение обеспечивает офтальмологическую композицию для применения при заживлении раны и реэпителизации роговично-конъюнктивальной поверхности.

Фактически, данные исследования, описанные ниже, относящиеся к анализу белковых маркеров, вовлеченных в процесс заживления раны, фенотипически подтверждают известное из литературы. Известно, что как MMP-9, так и TGF- β , отрицательно коррелируют с процессом заживления ран, в частности при процессе заживления раны, затрагивающем роговицу, высокие уровни обоих белков замедляют механизмы, участвующие в реэпителизации роговицы [Kim E.C. et al. Acta Ophthalmol. 2012. 90: 540-6]. Уровни обоих белков снижены в слезах и роговицах 48 ч спустя после повреждения после закапывания композиции, имеющей состав, как описано в примере 1, содержащей 4% лактобионата натрия и 0,15% гиалуроната натрия, что обеспечивает экспериментальные данные о быстром процессе реэпителизации роговицы вслед за применением упомянутой композиции.

Неожиданно было показано, что офтальмологическая композиция по изобретению также обеспечи-

вает защиту против бактерий. В настоящее время проводятся дополнительные исследования, предварительные данные в отношении данной активности обнадеживают.

По причине дополнительных технических свойств изобретения его применение изобретения является особенно важным, поскольку изобретение избегает применения бактериостатиков, подобных антибиотикам и химическим дезинфектантам, которые слишком агрессивны и раздражающи для глаза, предпочтительны вещества нетоксичные, хорошо переносимые, чья безопасность хорошо подтверждена.

Композиция по изобретению, обладающая антибактериальной активностью, реэпителизирующей активностью, может быть применена для противодействия изменениям роговично-конъюнктивальной поверхности из-за воспалительных состояний, дисбаланса окислительно-восстановительного потенциала, накопления свободных радикалов и окислительного стресса.

Композиция по изобретению благодаря своим компонентам добавляет к действию в качестве слезозаменивателя, стабилизирующего и восполняющего слезную пленку, свойственному многим сходным продуктам уже доступным на рынке, также реэпителизирующее, заживляющее и антибактериальное действие.

Изобретение и его воплощение будут описаны посредством неограничивающих примеров, которые позволят специалистам в области техники полностью понять преимущества от его применения.

Экспериментальная часть.

Исследование 1. Оценка безопасности и эффективности лактобионовой кислоты в сочетании с гиалуроновой кислотой при лечении синдрома сухого глаза.

Исследование разработано для оценки безопасности и эффективности композиции глазных капель, содержащей лактобионовую кислоту или ее соль и гиалуроновую кислоту или ее соль, по сравнению с идентичной композицией, не содержащей лактобионовую кислоту, в отношении ряда симптомов, обычно имеющих место при синдроме сухого глаза.

На день 7, 21, 35, 45 множественные офтальмологические тесты проводили с целью исключения побочных эффектов тестируемых композиций на структуру глаза и физиологию.

Визуальная аналоговая шкала (ВАШ). Балл общего дискомфорта глаз определяли при помощи 100 мм визуальной аналоговой шкалы (ВАШ), где 0 означает отсутствие симптомов, и 100 означает худший из возможного дискомфорта. Данную оценку проводили до офтальмологической оценки при любом визите. Специфичные глазные симптомы, подлежащие оценке при помощи ВАШ, включали ощущение чужеродного тела, жжение/щипание, зуд, боль, ощущение липкости, нечеткость зрения, фотофобию.

Оценка симптомов синдрома сухого глаза (SANDE). Поскольку не существует "золотого стандарта" диагностического теста для БСГ (болезнь сухого глаза), в качестве диагностического критерия широко применяют комбинацию признаков и симптомов. Из-за вариабельности симптомов сухого глаза и ограничений доступных клинических тестов, опросники, регистрирующие симптомы пациентов являются очень полезными инструментами для диагностики и последующего наблюдения болезни сухого глаза. Опросник для оценки симптомов сухого глаза (SANDE) представляет собой короткий и интуитивный опросник, основанный на визуальной аналоговой шкале, которая количественно оценивает как серьезность, так и частоту симптомов сухого глаза. SANDE состоит из двух вопросов, и в каждом вопросе применена 100 мм горизонтальная линейная визуальная аналоговая шкала. Измерение частоты симптомов варьирует от "редко" до "все время" и серьезность симптомов от "очень мягкий" до "очень серьезный".

Тест Ширмера представляет собой простой тест, позволяющий количественно оценить базальное слезоотделение, которое может быть сниженным при ряде заболеваний (СКВ, ревматоидный артрит, болезнь Сьегрена) или из-за ятрогенных причин, связанных с приемом лекарственных препаратов. При его выполнении полоски 2 мм бумаги помещают в свод конъюнктивы и выжидают несколько минут (5 мин). Затем часть увлажненной полоски измеряют; ниже определенные значения классифицируют как сухой глаз, в случае которого необходима заместительная терапия.

Глаз нормален в случае, когда ≥ 15 мм бумаги увлажнено спустя 5 мин; глаз слабо сухой в случае, в случае, когда 14-9 мм бумаги увлажнено спустя 5 мин; глаз умеренно сухой, в случае, когда 8-4 мм бумаги увлажнено спустя 5 мин; глаз сильно сухой в случае, когда < 4 мм бумаги увлажнено спустя 5 мин.

Время разрыва слезной пленки (ВРСП) представляет собой клинический тест, применяемый для оценки заболевания глаз, обусловленного быстрым испарением влаги. Для измерения ВРСП в слезную пленку пациента закапывают флуоресцеин, и пациента просят не моргать, пока слезную пленку наблюдают под щелевой лампой с кобальтовым синим освещением. ВРСП регистрируют в виде нескольких секунд, которые проходят между последним морганием и появлением первого сухого пятна на слезной пленке, как видно из этой последовательности данных фотографий щелевой лампы с течением времени. ВРСП менее 10 с считают ненормальным.

Осмотические изменения в осмолярности слезной пленки оценивали при помощи прибора TearLab Instrument. Осмолярность менее 290 мосмоль считают нормальной, более 290 и менее 316 считают средней; более 316 считают от умеренной до серьезной.

Осмотр глаза с помощью щелевой лампы (Slit lamp examination, SLE) после окрашивания по Oxford при помощи флуоресцеина для оценки изменений в крае века, конъюнктиве, передней камере, радужке и хрусталике. Некоторая степень окрашивания роговицы является нормальной и обнаруживается в 79% роговиц и 71% конъюнктив нормальны глаз. Однако признаки окрашивания роговицы также свидетель-

ствуют о дефектной роговице. Интересно, но еще не до конца ясно, как флуоресцеин действует на глазную поверхность, однако общеизвестно, что он проникает только через разрывы и щели в эпителии и через поврежденные клетки в межклеточные пространства и подлежащие ткани.

Критерии включения.

В клиническое исследование были включены

мужчины и женщины в возрасте 18 лет и старше;

субъекты с по меньшей мере 3-месячной задокументированной историей сухого глаза в обоих глазах, диагностированной как синдром сухого глаза, сухой кератоконъюнктивит (KCS) или из-за синдрома Сьегрена;

субъекты, не применявшие другие слезозаменители в течение периода лечения;

субъекты, которые не применяли стероидные глазные капли в течение 4 недель перед исследованием;

субъекты, прервавшие ношение линз на одну неделю перед исследованием и на период всего исследования.

Из клинического исследования были исключены

беременные женщины или женщины в период лактации;

потенциально беременные женщины, которые не применяют системную контрацепцию, женщины не после менопаузы, не стерилизованные хирургически;

субъекты, подвергшиеся любому типу хирургии глаза или травмы глаза в течение четырех месяцев перед исследованием;

субъекты, подверженные другим заболеваниям или состояниям по мнению исследователя/лечащего врача несовместимым с оценкой необходимой в данном исследовании;

субъекты с непрерывным активным воспалением глаз, отличным от KCS;

участие в любом другом исследовании в течение 30 дней перед исследованием.

Пациентов, включенных в исследование, делили на две группы: 20 пациентов возрастом между 18 и 50 годами - группа А и 20 пациентов возрастом старше 50 лет - группа В. Внутри каждой группы случайным образом выбранная половина субъектов получала композицию, содержащую 4% лактобионат натрия и 0,15% гиалуронат натрия, и половина принимала контрольную композицию, содержащую только 0,15% гиалуронат натрия. Все пациенты принимали по 1-2 капли композиции три раза в день в течение пяти недель с последующим периодом наблюдения в одну неделю.

Результаты.

Результаты оценки безопасности и эффективности лактобионовой кислоты в сочетании с гиалуроновой кислотой при лечении синдрома сухого глаза приведены на фиг. 1-7 посредством оценки вышеупомянутых параметров, и демонстрируют, что глазные капли на основе только гиалуроновой кислоты или гиалуроновой в сочетании с лактобионовой кислотой, и те и те оказались эффективными, как и предполагалось, при улучшении симптомов и признаков сухого глаза уже после недели лечения. Однако пациенты, получавшие лечение гиалуроновой в сочетании с лактобионовой кислотой, показали существенно лучшее улучшение также в отношении пациентов, получавших лечение только гиалуроновой кислотой, и такая разница была более заметна в группе пациентов старше 55 лет, таким образом, свидетельствуя о превосходстве гиалуроновой в сочетании с лактобионовой кислотой, в частности в пожилом возрасте. Никакие другие глазные капли ни обладали такими различными свойствами в отношении возраста пациента.

Исследование 2. Тест, основанный на феномене арборизации слезы.

Практическое представление композиции слезной пленки очень полезно лечащему врачу для диагностики и лечения пациента. Тест, основанный на феномене арборизации слезы, представляет собой лабораторный тест, но он может быть выполнен в условиях клиники для исследования композиции слезной пленки простым путем. Он заключается в высушивании небольшого образца слезной жидкости на чистом стеклянном предметном стекле; это дает характерный кристаллический паттерн, описываемый как "арборизация слезы".

Тест, основанный на феномене арборизации слезы, обеспечивает качественный показатель стабильности слезной пленки косвенным путем: поэтому данный тест может оценить баланс между мукопротеинами и солями, растворенными в слезе и затем осмолярность слезной пленки.

В нашем исследовании пациент (женщина, 40 лет, страдающая синдромом сухого глаза) получала лечение композицией по изобретению в течение 15 мин.

Результаты.

Результаты для теста, основанного на арборизации слезы, приведены на фиг. 8, изображение (10× увеличение) полученного паттерна кристаллизации показывает, что феномен арборизации при лечении был незначительным на границе слезы и неполным в центре слезы. Пятнадцать минут спустя после применения Lactoyal более плотный и структурированный паттерн арборизации мог наблюдаться как на границе слезы, так и в центре.

Исследование 3. Исследование при помощи кристаллического фиолетового для определения влияния композиции по изобретению на ингибирование выживаемости и роста культивируемых клеток.

Адгезивные клетки открепляются от планшет для культивирования клеток в процессе клеточной гибели. Данная характеристика может быть применена для непрямой количественной оценки клеточной

гибели и для определения различий в пролиферации в результате стимуляции посредством детекции адгезивных и жизнеспособных клеток, окрашенных кристаллическим фиолетовым красителем, связывающимся с белками и ДНК. Клетки, которые подвергаются клеточной гибели, теряют свою адгезию и впоследствии исчезают из популяции клеток, снижая количество кристаллического фиолетового окрашивания в культуре. Данный протокол исследования обеспечивает быстрый и надежный способ скрининга, приемлемый для оценки влияния композиции на ингибирование выживаемости и роста клеток. При растворении количество красителя, захваченного клеточным монослоем, может быть количественно определено при помощи спектрофотометра или планшетного ридера.

Клетки линии SIRC [Statens Seruminstitut Rabbit Cornea] (ATCC® CCL-60™) засеивали и выращивали до желаемой плотности согласно инструкции производителя.

Тестируемые композиции:

КОНТР - контроль (PBS, фосфатно-солевой буфер);

LS(ЛН) 1 - 1% лактобионат натрия;

НА(ГН) 0,03 - 0,03% гиалуронат натрия;

НА(ГН) 0,075 - 0,075% гиалуронат натрия;

МИХ(МИКС) 1 - 1% лактобионат натрия, 0,03% гиалуронат натрия;

МИХ(МИКС) 2 - 1% лактобионат натрия, 0,075% гиалуронат натрия.

После промывки PBS к клеткам добавляли раствор кристаллического фиолетового и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре.

Культуральную среду осторожно удаляли из планшет. Планшеты бережно промывали PBS, нагретым, по меньшей мере, до комнатной температуры.

Затем планшеты промывали дважды водой из-под крана посредством погружения в большой стакан и высушивали вверх дном на бумажном полотенце. Для растворения краски в каждую лунку добавляли 1% SDS.

Планшеты покачивали на орбитальном встряхивателе до однородности окраски без областей плотного окрашивания на дне лунок.

Абсорбцию каждой лунки считывали спектрофотометром при 570 нм.

Результаты.

Значения клеточной пролиферации, полученные после обработки тестируемыми композициями, приведены на диаграммах фиг. 9, где очевиден синергический эффект лактобионата натрия и гиалуроната натрия в композиции по изобретению.

Фиг. 10 показывает значения клеточной пролиферации после 24 и 48 ч инкубации с тестируемыми композициями.

Исследование 3. Исследование заживления раны (ЗР) на клетках линии SIRC.

Прямое биологическое следствие применения композиции, содержащей лактобионат натрия и гиалуронат натрия, на клетки линии SIRC исследовали при помощи теста миграции клеток, т.е. миграции клеток линии SIRC для закрытия раны. Клетки линии SIRC инкубировали в 24-луночных планшетах, покрытых фибронектином и коллагеном типа I, с использованием MEM с 10% (o/o) фетальной бычьей сывороткой до роста, полностью покрывающего поверхность лунки. Клеточный скребок применяли для процарапывания линии поперек центра чашки. Оставшиеся клетки по обе стороны промывали дважды PBS. Затем клетки инкубировали в течение 24, 48 и 72 ч при 37°C с 5% CO₂ соответственно с:

1) среда (MEM с 10% [o/o] фетальной бычьей сывороткой) (КОНТР);

2) среда (MEM с 10% [o/o] фетальной бычьей сывороткой), содержащая 1% лактобионата натрия (LS 1%);

3) среда (MEM с 10% [o/o] фетальной бычьей сывороткой), содержащая 0,03% гиалуроната натрия (НА 0,03%);

4) среда (MEM с 10% [o/o] фетальной бычьей сывороткой), содержащая 0,075% гиалуроната натрия (НА 0,075%);

5) среда (MEM с 10% [o/o] фетальной бычьей сывороткой), содержащая 1% лактобионата натрия, 0,03% гиалуроната натрия (МИКС 1);

6) среда (MEM с 10% [o/o] фетальной бычьей сывороткой), содержащая 1% лактобионата натрия, 0,075% гиалуроната натрия (МИКС 2).

Степень миграции фотографировали и определяли при помощи трех различных экспериментов (триплекат).

Результаты.

Тест на миграцию выполняли в качестве модели *in vitro* для эпителиальной клеточной миграции в течение заживления раны для изучения влияния лактобионата натрия, гиалуроната натрия и их комбинации на клетки линии SIRC. Результаты приведены на фиг. 11 (А и В). Признаки клеточной миграции наблюдали, когда царапина в клеточном монослое постепенно закрывалась в течение инкубации с лактобионатом натрия, гиалуронатом натрия и их комбинацией в течение 24-72 ч. Полученные процентные величины закрытия раны на клетках линии SIRC приведены в табл. 1 и представлены на диаграмме фиг. 11 (А).

Таблица 1

	Контроль	ЛН 1%	ГН 0,03%	ГН 0,075%	МИКС 1	МИКС 2
	КОНТР					
24 ч	17	19	21	22,8	22	24,8
48 ч	39,3	49	50,3	50,5	50,6	53,8
72 ч	79	89	93	95	91	90

Табл. 1 и фиг. 11 (А) показывают, что клетки линии SIRC во всех обрабатываемых группах пролиферировали на 24, 48 и 72 ч по сравнению с таковыми в контрольной группе. Данные свидетельствуют, что различие в процентах закрытия раны является большим после инкубации в течение 24 и 48 ч в присутствии лактобионата натрия и гиалуроната натрия вслед за инкубацией с двумя единичными соединениями в течение одинакового времени в отношении контроля, и таким образом процент закрытия раны является даже большим в случае, когда концентрация гиалуроната натрия составляет 0,075%, а не 0,03%. На 72 ч закрытие раны оказывается большим из-за инкубации только с гиалуронатом натрия. Таким образом, упомянутые данные на 24 и 48 ч ясно свидетельствуют о том, что лактобионата натрия в сочетании с гиалуронатом натрия способен обеспечить реэпителизацию быстрее, чем отдельные ингредиенты, обеспечивающие основной толчок пролиферации в более короткое время. Важность данного свойства будет очевидна специалистам в области техники, поскольку оно положительно влияет на скорость процесса заживления раны. При более длительном времени инкубации (72 ч) композиция прекращала свое положительное действие, поскольку процесс реэпителизации уже произошел и полностью завершился. Более того, важно, чтобы процесс реэпителизации начался очень быстро, поскольку быстрота реэпителизации ограничивает заживление раны и лактобионат натрия в сочетании с гиалуронатом натрия показал способность к такой быстроте *in vitro*.

Подтверждения клеточной миграции наблюдались на царапине в клеточном монослое, поэтапно закрываемой в течение инкубации на рисунках фиг. 11 (В).

Исследование 4. Исследование на животных.

В данном исследовании применяли самцов Ново-Зеландских белых кроликов массой примерно 2,5 кг. Все кролики были предоставлены Harlan-Envigo (Milano) и этический комитет университета Катании одобрил все процедуры. Животных умерщвляли при помощи внутримышечной инъекции золетила (Virbac lab.) при 5 мг/кг (0,1 мл на кролика). Для оценки эффекта реэпителизации композиции по изобретению, имеющей состав, описанный в примере 1 настоящей заявки, и сравнения ее с таковым раствора, содержащего 4% лактобионата натрия, 23 кроличьих глаза подвергали деэпителизации роговицы в одном глазу посредством Algerbrush II (Accutome, USA), контрлатеральный глаз не повреждали и использовали как контроль (без заживления раны). Животных разделяли на три группы

8 кроличьих глаз, закапанных композицией, содержащей 4% лактобионата натрия;

7 кроличьих глаз, закапанных композицией из примера 1;

8 кроличьих глаз, закапанных PBS.

Согласно протоколу лечения в глаза кроликам капали глазные капли четыре раза в день каждые 2 ч. Поврежденные глаза наблюдали ежедневно (T0, T24, T48, T72) после окрашивания 1 мг/мл флуоресцеина для выделения области раны. Спустя 48 и 72 ч после повреждения кроликов умерщвляли.

Раствор флуоресцеина натрия применяли для оценки степени заживления эпителия роговицы. Область раны роговицы определяли количественно посредством фотографий при помощи программного обеспечения Image J фиг. 12 (А). Скорость заживления выражали в виде процента закрытия раны. Данные приведены в табл. 2 и графически представлены на фиг. 12 (В).

Таблица 2

± CO	Контроль	Композиция, содержащая 4% лактобионата натрия, 0,15% гиалуроната натрия	Композиция, содержащая 4% лактобионата натрия
T0	0	0	0
T24	47±19	68±17 p<0,01 vs контроль	60±12
T48	80±11	91±6 p<0,01 vs контроль	92±6 p<0,01 vs контроль
T72	100±12	100±0,5	104±0

Исследование 5. Активность MMP-9.

Существует большое количество данных в отношении матриксных металлопротеиназ (MMPs), которые играют ключевую роль в регуляции воспаления, деградации и ремоделирования нового ВКМ (вне-

клеточного матрикса) в течение процесса заживления. Как часть тканевого ответа на повреждение, активность MMPs строго регулируется на различных уровнях, включая генную экспрессию и тканевые ингибиторы MMPs (TIMPs) [Robert A.R. Tetracyclines and the treatment of corneal stromal ulceration: a review. *Cornea*. 2000; 19:274-277. Fini M.E. et al. Proteolytic mechanisms in corneal ulceration and repair. *Arch Dermatol Res*. 1998; 290 Suppl.: S12- S23. Toriseva M. et al. Proteinases in cutaneous wound healing. *Cell Mol. Life Sci*. 2009; 66:203-224]. Все классы белков внеклеточного матрикса и сигнальных молекул, таких как цитокины и факторы роста являются субстратами для MMPs. В частности, MMP-9 играет существенную роль в ремоделировании стромального ВКМ роговицы и переформировании эпителиальной базальной мембраны [Mulholland B. et al. Matrix metalloproteinase distribution during early corneal wound healing. *Eye*. 2005; 19: 584-588. Ollivier F.J. et al. Proteinases of the cornea and precorneal tear film. *Vet. Ophthalmol*. 2007; 10: 199-206]. MMP-9, также известная как желатиназа В, секретируется эпителиальными клетками роговицы, макрофагами и нейтрофилами в течение заживления раны роговицы. Описаны изменения в уровне MMPs в слезной пленке и экспрессии MMP в роговице в течение заживления раны. MMP-9, матрикс-деградирующий фермент, высоко экспрессируется в участке воспаления и вовлечен в процессы ремоделирования. Также он способствует пополнению клеток воспаления, таких как эозинофилы и нейтрофилы сквозь базальные мембраны. Известно, что при поврежденных роговицах протеолиз в слезной жидкости существенно повышен по сравнению с нормальными глазами.

В нашем исследовании изменение в MMP-9 белках слезы и роговицы оценивали при помощи ELISA согласно стандартным способам известным специалистам в области техники.

Результаты.

Результат анализа активностей MMP-9 образцов слезной пленки в экспериментальной группе по сравнению с группой контроля приведен в табл. 3 и на диаграмме фиг. 13 (А); они показывают существенное снижение активности MMP-9 в условиях нашего эксперимента.

Таблица 3

± CO	24 ч	48 ч	72 ч
без ЗР	1± 0,19	1±0,3	1±0,01
ЗР	1,4±0,15 p<0,01 по сравнению с отсутствием ЗР	1,8±0,14 p<0,01 по сравнению с отсутствием ЗР	0,7±0,1
Композиция, содержащая 4% лактобионат натрия, 0,15% гиалуронат натрия	1,9±0,75	1,2±0,6 p<0,01 по сравнению с отсутствием ЗР	0,7±0,3
Композиция, содержащая 4% лактобионата натрия	1,3±0,5	1,1±0,4 p<0,05 по сравнению с отсутствием ЗР	0,6±0,07

Усиление заживления раны роговицы вследствие применения лактобионата натрия в сочетании с гиалуронатом натрия возможно коррелирует со снижением активности MMP-9 и ослабляет воспаление в участке раны. Посредством ELISA оценивали уровень металлопротеиназ MMP-9 в роговице глаза, обработанного композицией примера 1 данного описания. Исследование показало, что в обработанных роговицах активность металлопротеиназ снижена по сравнению с таковой положительного контроля, который получал повреждение роговицы (ЗР), и подобно отрицательному контролю, с неповрежденной роговицей, как показано в табл. 4 и на диаграмме фиг. 13 (В).

Таблица 4

±CO	48 ч	72 ч
без ЗР	152±2,1	152±2,1
без ЗР	167±4,2 p<0,01 по сравнению с отсутствием ЗР	173±5,2 p<0,01 по сравнению с отсутствием ЗР
Композиция, содержащая 4% лактобионат натрия, 0,5% гиалуронат натрия	153±1,1 p<0,01 по сравнению с	158±3,2 p<0,01 по сравнению с

	отсутствием ЗР	отсутствием ЗР
--	----------------	----------------

Исследование 6. Активность TGF- β .

Трансформирующий фактор роста бета 1 (TGF- β) представляет собой многофункциональный белок, модулирующий клеточную пролиферацию и дифференциацию во многих типах клеток и усиливающий восстановительный ответ тканей. Исходя из литературы известно, что в роговицах крыс 4 ч спустя после царапины клетки острого воспаления, высоко позитивные по TGF- β , появляются в периферической строме и постепенно распространяются в центр роговицы. К 24 ч данные клетки скапливались и формировали псевдомембрану в повреждении эпителия, которая также позитивна по TGF- β , подтверждая, что пептид участвует еще и в остром воспалительном ответе. Обычно реэпителизация происходит на уровне псевдомембраны и завершается спустя 48 ч [Hayashi K. et al. Expression of transforming growth factor-beta in wound healing of vitamin A - deficient rat corneas. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1989; 30: 239-47]. В данном исследовании экспрессию TGF- β исследовали иммуногистохимически при заживлении ран роговичного эпителия у кроликов, как в роговицах, так и в слезе.

На основании ранее полученных результатов, показывающих, что временная точка, критическая для эффекта восстановления кожи, составляет 48 ч, выполняли ELISA для измерения уровня TGF- β .

Результаты.

Результаты показали, что в слезе глаза, в который закапывали композицию, имеющую состав как в примере 1, уровень белка TGF- β снижен по сравнению с таковым глаз контроля (ЗР) и подобно неповрежденному глазу. См. результаты в табл. 5 и на фиг. 14 (А).

Таблица 5

\pm СО	48 часов
без ЗР	3075 \pm 288
ЗР	4402 \pm 308 p<0,05 по сравнению с отсутствием ЗР
Композиция, содержащая 4% лактобионата натрия, 0,15% гиалуроната натрия	3082 \pm 743

Сходный результат, касающийся уровня TGF- β , также был подтвержден в роговице, где ELISA показала пониженный уровень TGF- β в роговице глаза, обработанного композицией, содержащей 4% лактобионата натрия и 0,15% гиалуроната натрия спустя 48 ч и 72 ч после повреждения. Результаты подтверждают сниженный воспалительный ответ тканей на повреждение и последующее заживление раны в обработанных роговицах по сравнению с необработанными роговицами. См. результаты в табл. 6 и на фиг. 14 (В).

Таблица 6

\pm СО	48 ч	72 ч
без ЗР	11,4 \pm 6	11,4 \pm 6
ЗР	98,7 \pm 8 p<0,01 по сравнению с отсутствием ЗР	53 \pm 4 p<0,01 по сравнению с отсутствием ЗР
Композиция, содержащая 4% лактобионата натрия, 0,15% гиалуроната натрия	77 \pm 3,7 p<0,01 по сравнению с отсутствием ЗР	28 \pm 11 p<0,01 по сравнению с отсутствием ЗР

Статистический анализ.

Все результаты выражали в виде среднего \pm стандартное отклонение (СО). Данные между группами обработки сравнивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа (one-way Analysis of Variance, ANOVA). Различия считали существенными при P < 0,05.

Заключение.

Здоровая слезная пленка, здоровая роговица и здоровая конъюнктура очень важны для многих основных функций глаза. Воспаления глаза, посттравматическое или из-за микробных инфекций, и синдром сухого глаза являются существенными клиническими проблемами, которые необходимо решить, но их комплексность и слабая корреляция между клиническими признаками и разнообразием сообщаемых симптомов делают сложным для врачей индивидуальную коррекцию терапевтического подхода. Наше

исследование демонстрирует, что местное применение композиции, содержащей лактобионовую кислоту или ее соль, и гиалуроновую кислоту или ее соль, приводит к существенно лучшему ответу на повреждение, окислительный стресс, старение. Мы смогли продемонстрировать, что фармацевтический препарат по изобретению быстро усиливает процесс заживления раны, в то же время снижая местное воспаление. Исследование подтверждает потенциальное применение композиции, содержащей лактобионат натрия и гиалуронат натрия, для лечения поверхностных повреждений роговицы и воспалений. Более того, местное применение обеспечивает усиление процессов клеточной эпителизации, что делает обещающим применение лактобионовой кислоты в сочетании с гиалуроновой кислотой или их солей в терапевтических целях.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Офтальмологическая композиция, содержащая 1-5 мас.% лактобионовой кислоты или ее соли в сочетании с 0,01-1,0 мас.% гиалуроновой кислоты или ее соли и один или более фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель.

2. Офтальмологическая композиция по п.1, где количество лактобионовой кислоты или ее соли составляет от 3,5 до 4,5 мас.% и количество гиалуроновой кислоты или ее соли составляет от 0,05 до 0,5 мас.%.

3. Офтальмологическая композиция по любому из пп.1 или 2, где количество лактобионовой кислоты или ее соли равно 4 мас.% и количество гиалуроновой кислоты или ее соли равно 0,15 мас.%.

4. Офтальмологическая композиция по любому из пп.1-3, где соль представляет собой натриевую соль.

5. Офтальмологическая композиция по любому из пп.1-4, отличающаяся тем, что она является изотонической с осмоляльностью от 250 до 350 мосмоль/кг и имеющей рН от 7,0 до 7,4.

6. Офтальмологическая композиция по любому из пп.1-5, отличающаяся тем, что она дополнительно содержит стабилизаторы раствора, смазывающие вещества, увлажняющие агенты, буферные агенты, консерванты и хелатирующие агенты.

7. Офтальмологическая композиция по п.6, содержащая двунариевую ЭДТК (этилендиаминтетрауксусная кислота) и N-гидроксиметилглицинат.

8. Офтальмологическая композиция по любому из пп.1-7, дополнительно содержащая дополнительные терапевтические агенты, выбранные из группы: факторы роста, противовоспалительные агенты, витамины, фибронектин, коллаген и аминокислоты.

9. Офтальмологическая композиция по любому из пп.1-8 в любой форме для местного применения.

10. Офтальмологическая композиция по п.9 в форме глазных капель, геля, мази, спрея.

11. Офтальмологическая композиция по пп.1, 9 или 10, имеющая следующий состав:

лактобионат натрия - 4,0 мас.%;

гиалуронат натрия - 0,15 мас.%;

натрия дигидрофосфат дигидрат - 0,225 мас.%;

динатрия фосфат дигидрат - 0,686 мас.%;

двунариевая ЭДТК - 0,100 мас.%;

гидроксиметилглицинат натрия - 0,002 мас.%;

дистиллированная вода - в достаточном количестве, до 100 г.

12. Офтальмологическая композиция по пп.1, 9 или 10, имеющая следующий состав:

лактобионат натрия - 4,0 мас.%;

гиалуронат натрия - 0,15 мас.%;

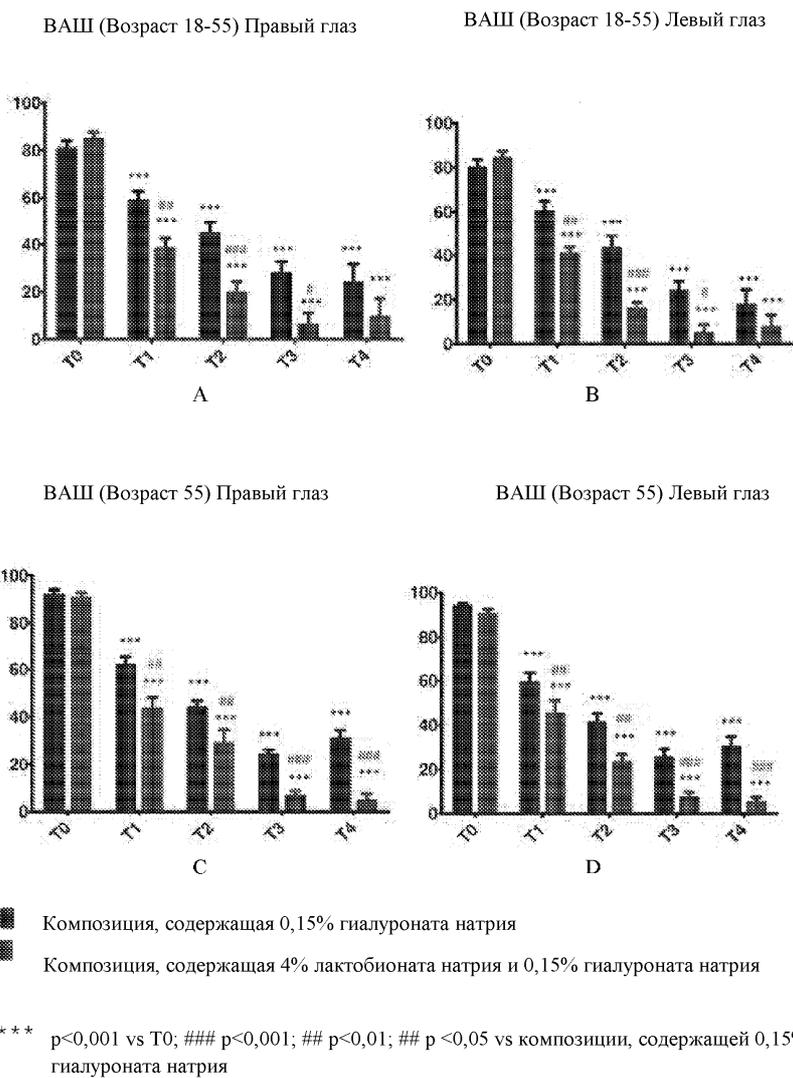
натрия дигидрофосфат дигидрат - 0,225 мас.%;

динатрия фосфат дигидрат - 0,686 мас.%;

дистиллированная вода - в достаточном количестве, до 100 г.

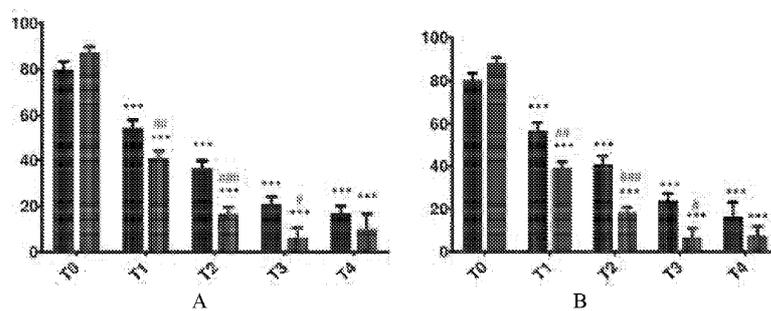
13. Офтальмологическая композиция по любому из пп.1-12 для лечения глазных расстройств, вызванных или характеризующихся воспалительными состояниями, изменениями слезной пленки, синдромом сухого глаза, окислительным стрессом, нагрузкой на глазную поверхность, старением глаза.

14. Офтальмологическая композиция по любому из пп.1-13 для заживления раны роговично-конъюнктивального эпителия.

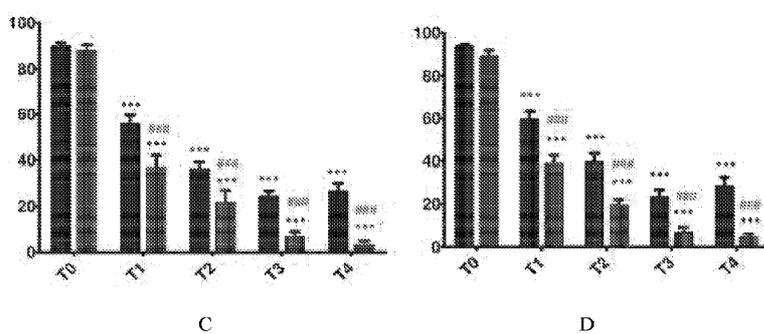


Фиг. 1

Частота симптомов сухого глаза (Возраст 18-55) Правый глаз Частота симптомов сухого глаза (Возраст 18-55) Левый глаз



Частота симптомов сухого глаза (Возраст старше 55) Правый глаз Частота симптомов сухого глаза (Возраст старше 55) Левый глаз



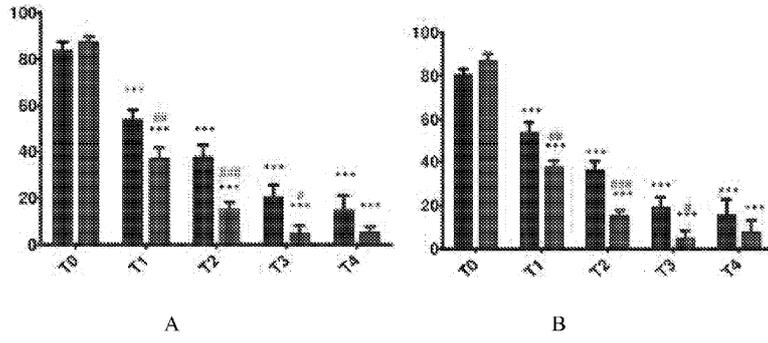
- Композиция, содержащая 0,15% гиалуроната натрия
- ▨ Композиция, содержащая 4% лактобионата натрия и 0,15% гиалуроната натрия

*** $p < 0,001$ vs T0; ### $p < 0,001$; ## $p < 0,01$; # $p < 0,05$ vs композиции, содержащей 0,15% гиалуроната натрия

Фиг. 2

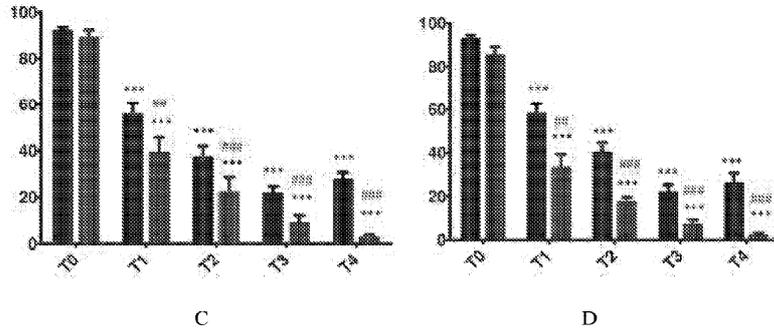
Серьезность симптомов сухого глаза
(Возраст 18-55) Правый глаз

Серьезность симптомов сухого глаза
(Возраст 18-55) Левый глаз



Серьезность симптомов сухого глаза
(Возраст старше 55) Правый глаз

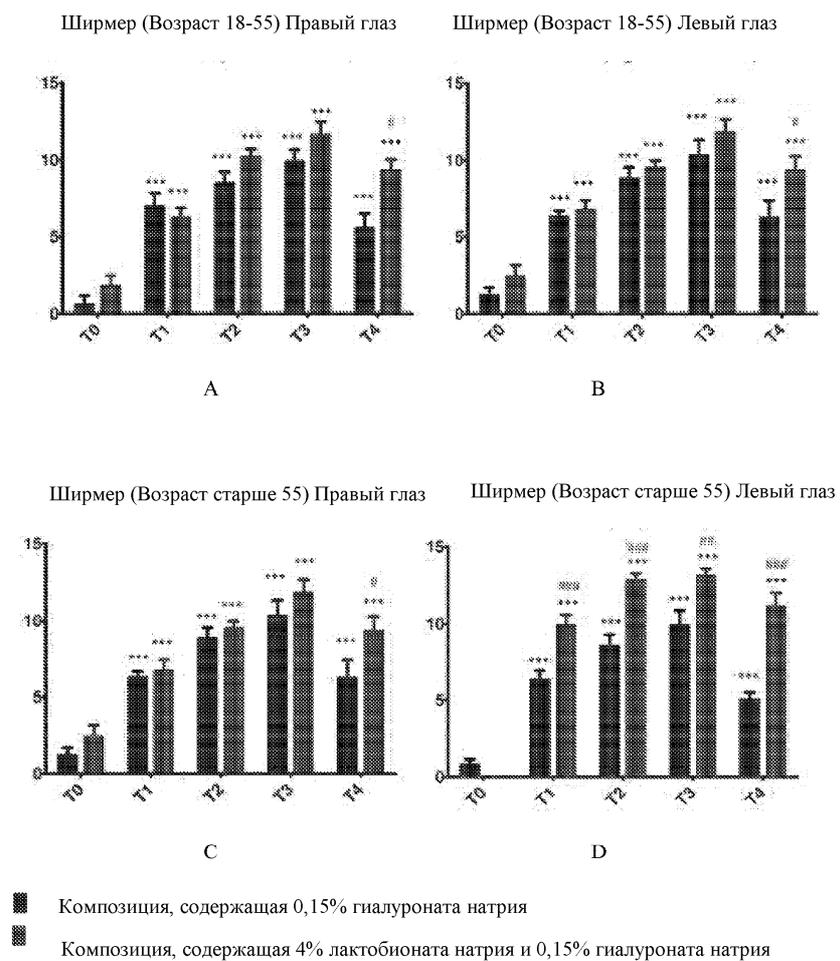
Серьезность симптомов сухого глаза
(Возраст старше 55) Левый глаз



- Композиция, содержащая 0,15% гиалуроната натрия
- Композиция, содержащая 4% лактобионата натрия и 0,15% гиалуроната натрия

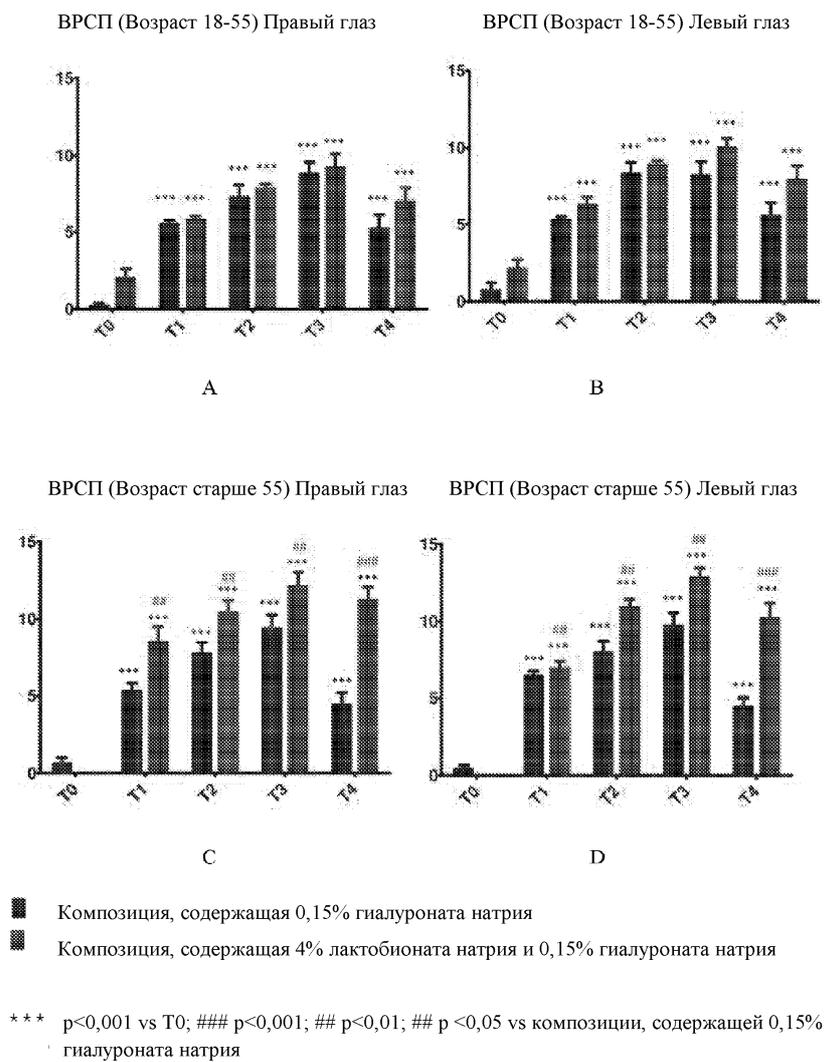
*** p<0,001 vs T0; ### p<0,001; ## p<0,01; # p<0,05 vs композиции, содержащей 0,15% гиалуроната натрия

Фиг. 3

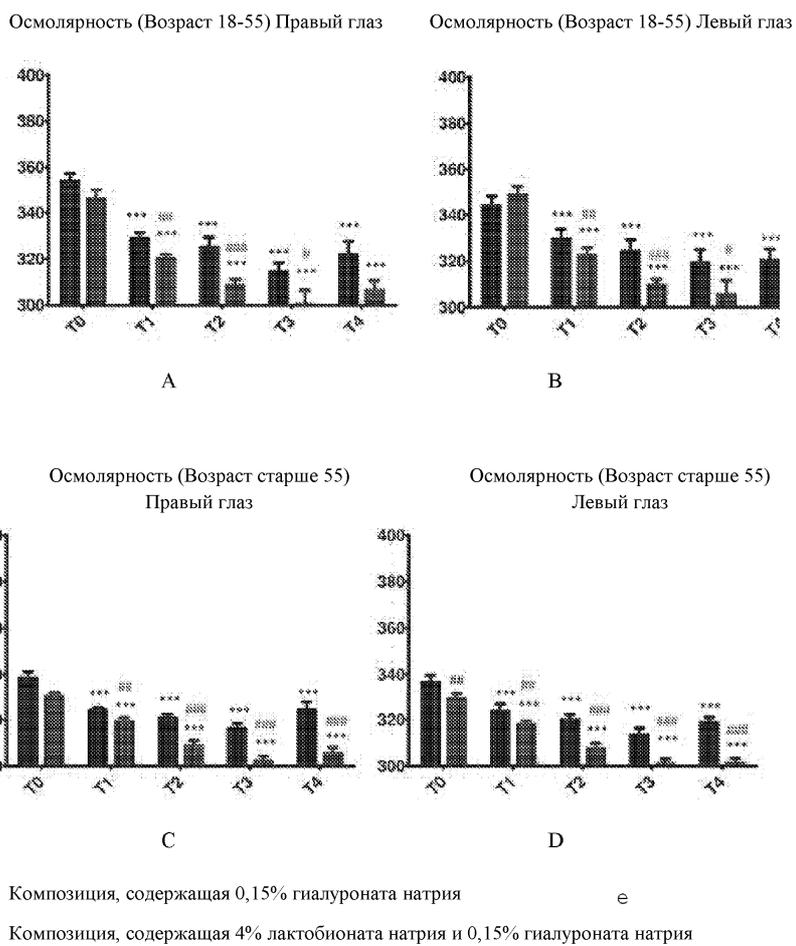


*** $p < 0,001$ vs T0; ### $p < 0,001$; ## $p < 0,01$; # $p < 0,05$ vs композиции, содержащей 0,15% гиалуроната натрия

Фиг. 4

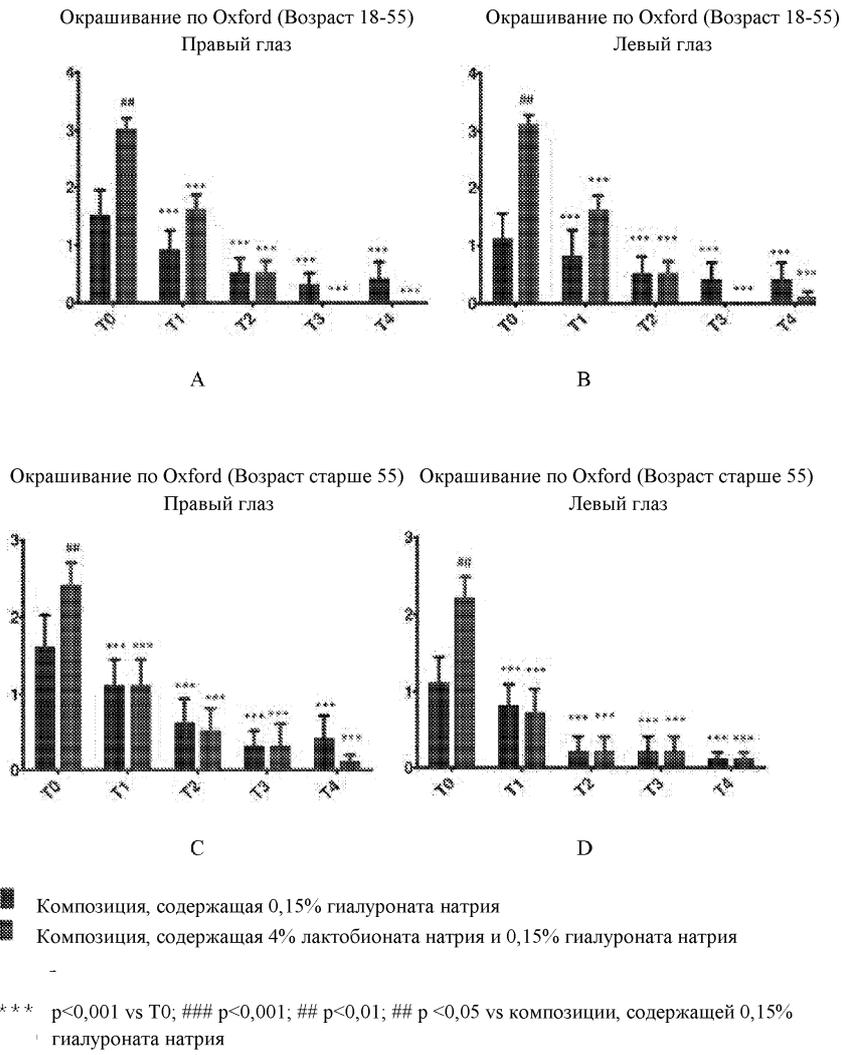


Фиг. 5

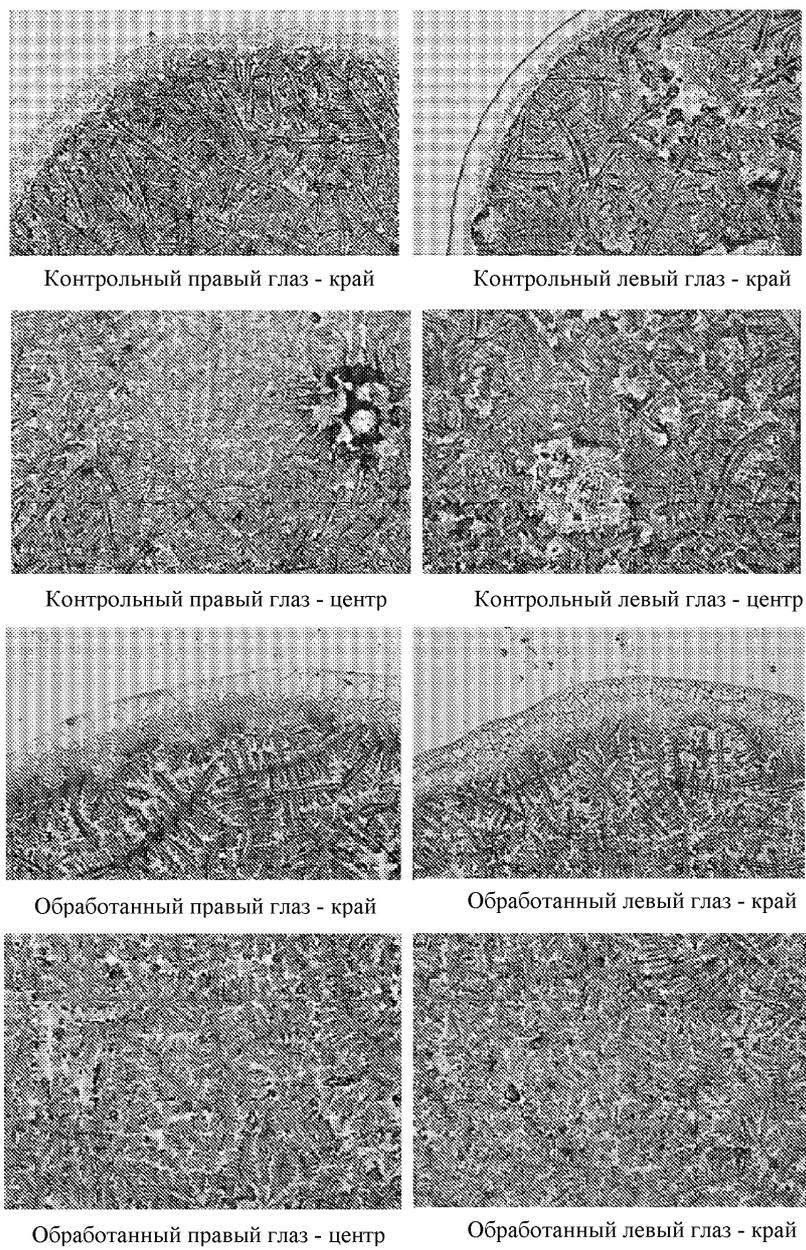


*** p<0,001 vs T0; ### p<0,001; ## p<0,01; # p <0,05 vs композиции, содержащей 0,15% гиалуроната натрия

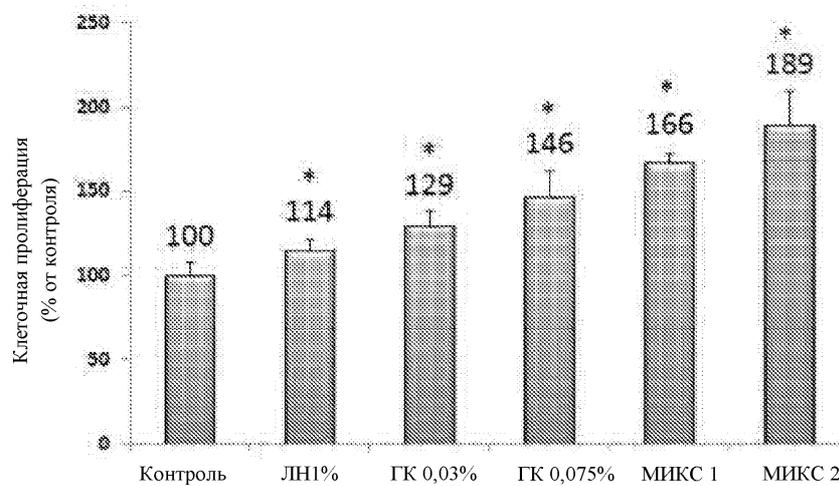
Фиг. 6



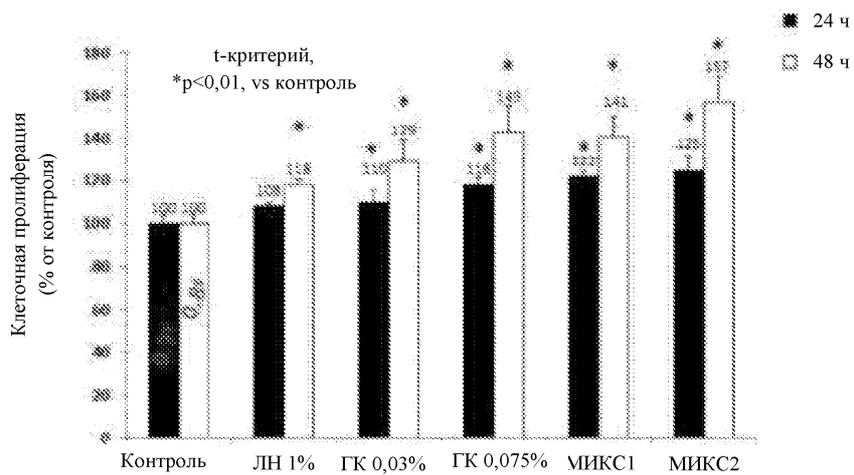
Фиг. 7



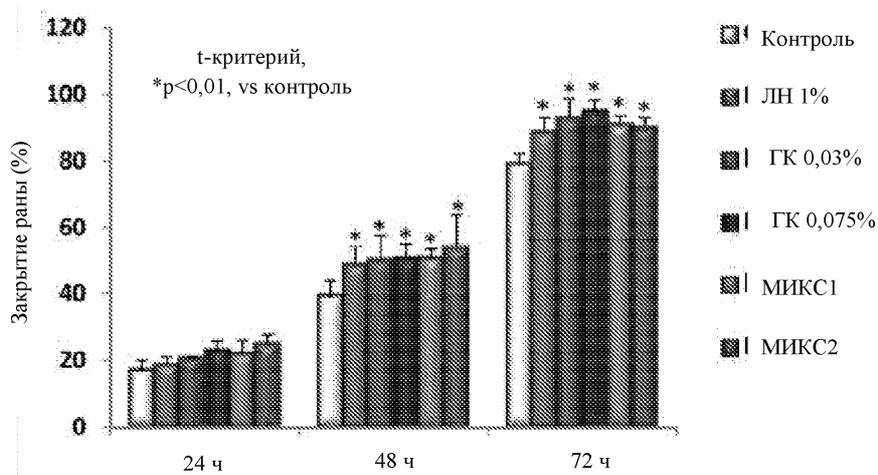
Фиг. 8



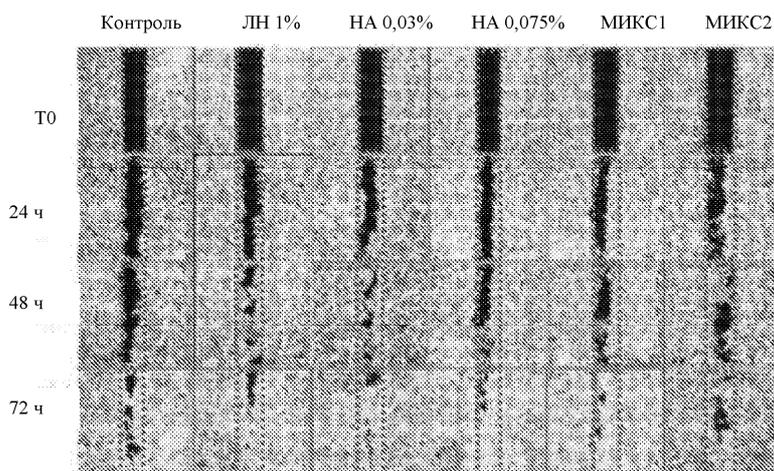
Фиг. 9



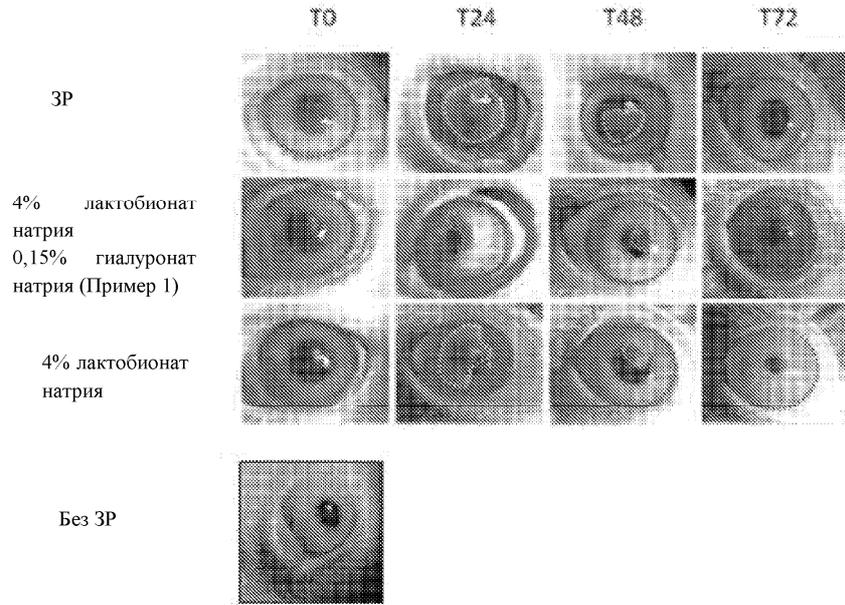
Фиг. 10



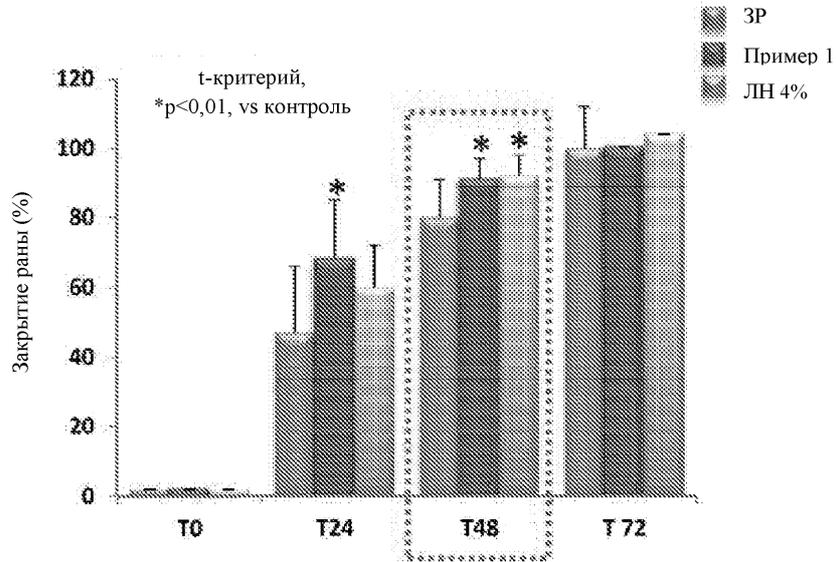
Фиг. 11А



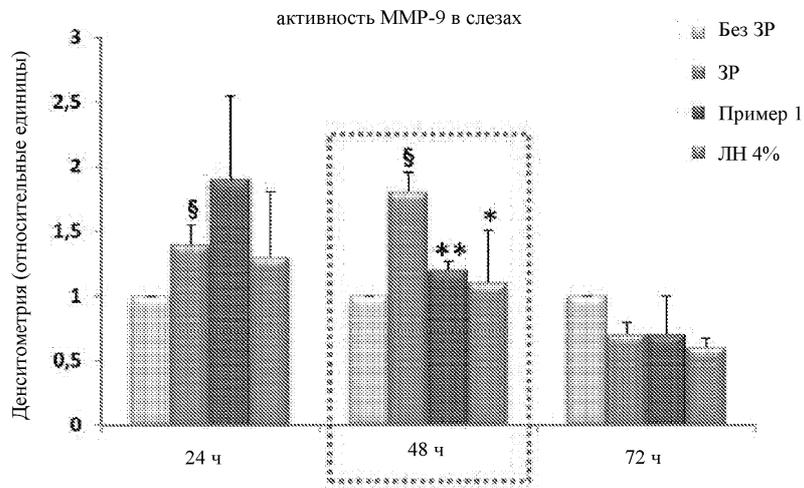
Фиг. 11В



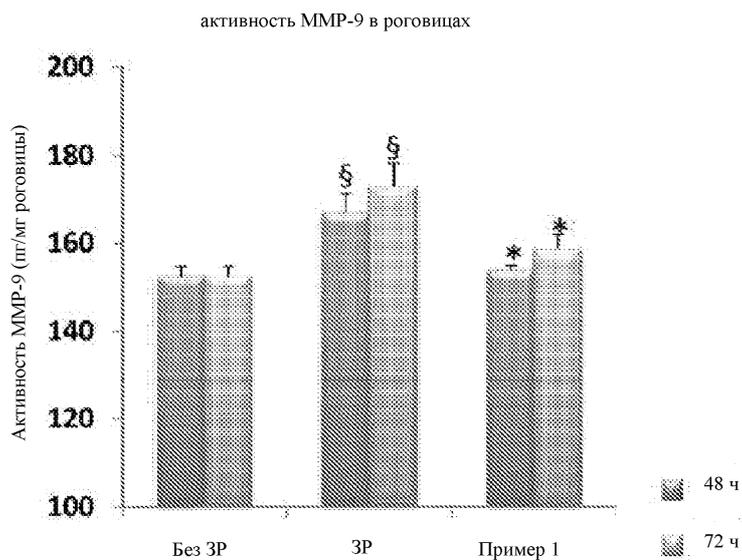
Фиг. 12А



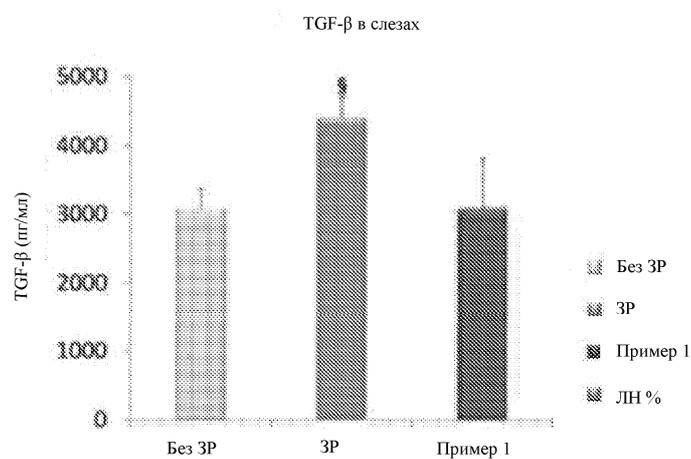
Фиг. 12В



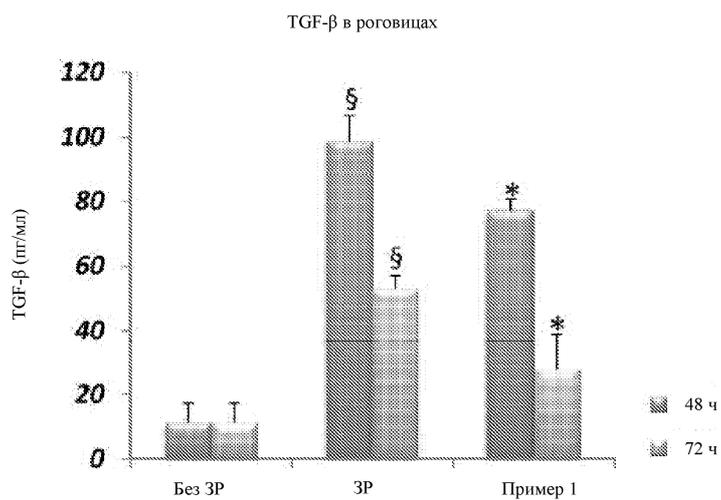
Фиг. 13А



Фиг. 13В



Фиг. 14А



Фиг. 14В

