

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 243275 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **434136**

(22) Data zgłoszenia: **2020.05.30**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2021.12.06 BUP 36/2021**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.07.24 WUP 30/2023**

(51) MKP:

A61K 31/7016 (2006.01)

A61K 31/728 (2006.01)

A61K 31/737 (2006.01)

A61P 27/04 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**SUPROBION SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ SPÓŁKA
KOMANDYTOWA, Mirków, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**WOJCIECH SADŁEK, Wrocław, PL
JAROSŁAW SADŁEK, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

Józefa Halina Winohradnik, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Kompozycja farmaceutyczna do regeneracji i nawilżania powierzchni oka

PL 243275 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest kompozycja farmaceutyczna, przeznaczona do regeneracji i nawilżania powierzchni oka, do stosowania w leczeniu chorób oczu.

Z literatury naukowej i patentowej znane jest stosowanie fukoidanu w celach prozdrowotnych. W japońskim zgłoszeniu patentowym JP2013252062A opisana jest kompozycja zawierająca induktor różnicujący komórki macierzyste do komórek ektodermalnych, z fukoidanem jako składnikiem aktywnym, mająca zastosowanie w leczeniu chorób oczu i neuropath. W chińskim zgłoszeniu wynalazku CN104027294A, ujawniono zastosowanie fukoidanu jako składnika aktywnego w kremie do oczu, ograniczającym zmiany skóry związane ze starzeniem. Zdolność fukoidanu do zachowywania odpowiedniego nawilżenia oczu wykorzystano w kompozycji kosmetycznej według JP2017095424A. Kompozycja fukoidanu i ekstraktów ziołowych ujawniona w zgłoszeniu patentowym CN107260597A służy do nawilżania i opóźniania procesów starzenia. Patent nr EA031541B1 opisuje formulację, stosowaną w celu resorpcji obrzęku błon śluzowych górnych dróg oddechowych, zawierającą jonowy, wodny roztwór polisacharydów siarczanowych wyizolowanych z brązowych alg lub syntetyczny fukoidan.

Z publikacji zgłoszenia WO2018107226 znane jest zastosowanie fukoidanu, jako inhibitora heparanazy w leczeniu stanu zapalnego i dysfunkcji oka. W innym zgłoszeniu w trybie PCT nr WO2004050132 opisano zastosowanie fukoidanu jako nośnika substancji antymikrobiologicznych w pokryciu soczewek kontaktowych.

Trehaloza stosowana jest w preparatach okulistycznych, ze względu na jej właściwości przeciwzapalne, przeciwutleniające oraz ograniczające stres oksydacyjny. Z opisu WO2006069540 oraz z patentu CN1285339C, znane jest zastosowanie kwasu hialuronowego i trehalozy w kroplach do oczu oraz w opatrunkach przyspieszających gojenie się ran i uszkodzeń po oparzeniach.

W zgłoszeniu patentowym WO9724129A1, ujawniono zastosowanie trehalozy w kroplach do oczu, maści lub wewnątrzgałkowym środku nawadniającym, w których stężenie trehalozy wynosi 0,01–20%. Kompozycję kropli do oczu zawierających trehalozę i fluran, opisano w koreańskim zgłoszeniu patentowym KR20040088794, do stosowania jako substytut łez, płyn do soczewek kontaktowych oraz materiał służący do dostarczania leków. Formulację sztucznych łez, zawierającą trehalozę, mukoproteiny oraz adjuwant do stosowania w okulistyce opisana została w dokumencie CN101181279.

W dokumencie WO2018124694 opisano krople do oczu o spowolnionym uwalnianiu, a w zgłoszeniu patentowym EP3213763, krople do oczu, zawierające jako składniki aktywne 0,5–7,5% w wagowych trehalozy i cyklosporyny. Patent JP4033510 opisuje zastosowanie trehalozy, zwłaszcza roztworu estru siarkowego trehalozy, w którym zawartość trehalozy wynosi 0,01–20%, do perfuzji okulistycznej oraz w maści lub balsamie do oczu. Zgłoszenie patentowe EP1192947 dotyczy zastosowania trehalozy jako składnika aktywnego w farmaceutycznej kompozycji oftalmologicznej używanej jako środek terapeutyczny dla pacjentów z klinicznymi objawami zespołu Sjögrena. Kompozycja opisana w dokumencie WO2014114124, zawierająca czwartorzędową sól amoniową trehalozy służy do nawilżania rogówkowych soczewek kontaktowych oraz niwelowania suchości i naprawy komórek nabłonka rogówki. Z patentu JP3065897 znany jest środek do higieny soczewek kontaktowych, zawierający trehalozę w stężeniu 0,0001–10%. Zgłoszenie patentowe CZ201784A3 dotyczy leku do zapobiegania i leczenia chorób zapalnych i zwyrodnieniowych, przedniego i tylnego odcinka oka, zawierającego cząsteczkowy wodór H połączony z trehalozą. W publikacji zgłoszenia WO2010119942A1 opisano emulsję do oczu, w której środek izotonizujący zawiera lewokabastynę lub jej sole jako składniki aktywne oraz chlorek benzalkoniowy, trehalozę i polimer. Zastosowanie trehalozy, jako czynnika izotonizującego opisano w patencie CNI00389770, dotyczącym kropli do oczu z latanoprostem.

Wodny roztwór kropli do oczu opisany w dokumencie JPH1072376A, zawiera kwas hialuronowy lub jego sól oraz stabilizator lepkości, wybrany z grupy obejmującej glikol etylenowy, glicerol lub alkohol poliwinylowy, kwas polikarboksylowy, polikarboksylan i węglowodan, korzystnie sorbitol i trehalozę.

Formulacja oftalmologiczna opisana w zgłoszeniu JP2014237686A, zawiera witaminę A oraz składnik, wybrany z grupy obejmującej: glikol lub glikol propylenowy, ksylitol, sorbitol, mannitol, trehalozę, diwodorofosforan sodu lub chlorek sodu. Patent CN1302812C ujawnia system do transportu składników aktywnych do oczu, zawierający trehalozę i kwas hialuronowy, stosowany w leczeniu kseroftalmii oraz różnych chorób okulistycznych lub wspomagający działanie leków okulistycznych. Zgłoszenie patentowe EP2494954A dotyczy leczenia obrzęków rogówki, z zastosowaniem kwasu lakto-

bionowego lub jego soli oraz trehalozy jako substancji pomocniczej. W zgłoszeniu patentowym US20110301250A1, opisano kompozycję do oczu zawierającą polimer z grupą karboksy, pojedynczy polioli oraz trehalozę jako składnik pomocniczy.

Celem wynalazku jest otrzymanie formułacji farmaceutycznej, wykazującej bardzo silne właściwości regeneracyjne i nawilżające powierzchnię oka, a przy tym bezpiecznej i szczególnie dobrze tolerowanej przy podaniu miejscowym.

Istotę wynalazku stanowi kompozycja farmaceutyczna, do regeneracji i nawilżania powierzchni oka, zawierająca w wodnym roztworze trehalozę w ilości 0,01–20%, fukoidan w ilości 0,01–10% wagowych, 0,01–10% wagowych kwasu hialuronowego lub jego farmaceutycznie akceptowalnych soli, 0,01–10% wagowych pochodnych kwasu pantotenowego, korzystnie D-pantenolu, ewentualnie substancję izotonizującą, korzystnie w postaci chlorku sodu i/lub substancję buforującą i/lub zwiększającą lepkość.

Przy czym substancja izotonizująca wybrana jest z grupy obejmującej akceptowalne farmaceutycznie sole kwasów nieorganicznych, alkohole cukrowe, zwłaszcza ksylitol, mannitol, sorbitol, glicerol oraz glukozę lub fruktozę.

Substancja buforująca wybrana jest z grupy obejmującej bufor fosforanowy, bufor cytrynianowy, bufor boranowy, trometamol, roztwór TRIS lub lizynę.

Substancja zwiększająca lepkość ma postać kwasu hialuronowego lub jego akceptowalnych farmaceutycznie soli, kwasu poliakrylowego, alginianu, chitozanu i jego pochodnych, karbomeru, powidonu, tyloksapolu, alkoholu poliwinylowego, glikolu propylenowego, modyfikowanej celulozy, modyfikowanej skrobi, poloksameru, kwasu poligalakturnowego, ksyloglukanu, gumy: ksantanowa, gellan, guar, skleroglukan, karagenian, agar.

Korzystnie kompozycja zawiera ponadto farmaceutyczne środki pomocnicze, takie jak osmoprotektanty i/lub konserwanty i/lub związki utleniające. Przy czym osmoprotektanty wybrane z grupy cukrów, takich jak sacharoza, maltoza, maltotrioza, rafinoza, gentabioza, melibioza, turanoza, stachyzoza, werbaskoza, altoza, palatynoza i celebioza lub polioli, takich jak: glicerol, sorbitol, inozytol, mannitol, erytrol, arabitol i maltitol lub aminokwasów, takich jak: glicyna, prolina, karnozyna, kamityna, betaina, ektoina i hydroksyektoina. Konserwantami są czwartorzędowe sole amoniowe, a związki utleniające wybrane są z grupy obejmującej nadboran sodu, GenAqua, stabilizowny kompleks oksychlorowy, Purite, Oxyd, OcuPure czy SofZia, chlorobutanol, biguanid poliheksametylenowy (PHMB), guanidyna poliheksametylenowa (PHMG), N-hydroksymetyloglicynian (N-IG), kwas sorbowy, wersenian czterosodowy, Polyxetonium, octan chlorheksydyny, glukonian chlorheksydyny, azotan lub octan fenylortęciowy, kwas askorbinowy, kwas sorbowy, tiomersal, benzoesan sodu, nipagina, parabeny.

Ewentualnie kompozycja zawiera jedną lub więcej substancji aktywnych w terapeutycznie efektywnej ilości, takich jak antybiotyki, związki antybakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe, immunosupresanty, substancje działające przeciwzapalnie, związki przeciwjaskrowe, takie jak prostaglandyny, beta-blokery, inhibitory anhidrazy węglanowej lub agoniści alfa-adrenergiczni.

Kompozycja według wynalazku wykazująca bardzo silne właściwości regeneracyjne w stosunku do komórek nabłonka, w tym komórek nabłonka rogówki, przeznaczona jest do stosowania w oftalmologii. Szczególnie zalecane jest stosowanie kompozycji po wszelkiego rodzaju zabiegach okulistycznych.

Kompozycja charakteryzuje się optymalną w aplikacji lepkością, pH w granicach 5,0–8,5 oraz ciśnieniem osmotycznym w zakresie 200–400 mOsm/l, przeznaczona jest do stosowania miejscowego na powierzchnię oka, do worka spojówkowego, również do nosa. Ze względu na to, że dozowanie w miejscu aplikacji nie zakłóca fizjologicznych procesów w obrębie miejsca naniesienia preparatu, kompozycja może być dawkowana miejscowo w formie kropli, maści, insertu, sprayu, płynu do przemywania, płynu do nasączania, w celu przyspieszenia naturalnych mechanizmów regeneracyjnych komórek w procesie leczenia i zapobiegania dysfunkcjom związanym z prawidłowym wydzielaniem łez oraz z nieodpowiednim nawilżeniem powierzchni oka.

Zaletą wynalazku jest, że dzięki połączeniu hialuronianu sodu z trehalozą, fukoidyną i/lub D-pantenolem następuje wzrost lepkości kropli do oczu, przez co czas utrzymywania się ich na powierzchni gałki ocznej wydłuża się. Krople przeznaczone są do intensywnego nawilżania oraz wspomagania regeneracji bariery ochronnej powierzchni oka przy jej suchości dając długotrwałe uczucie komfortu, co w konsekwencji również prowadzi do ograniczenia częstotliwości powtarzania aplikacji w ciągu dnia oraz szybszy efekt terapii w porównaniu do produktów konkurencyjnych. Krople łagodzą objawy zespołu suchego oka o umiarkowanym i ciężkim przebiegu oraz przyspieszają regenerację powierzchniowych struktur oka po zabiegach operacyjnych.

Interwencje chirurgiczne w obrębie oka powodują powstawanie ran i blizn na powierzchni rogówki, co skutkuje zaburzeniami w rozpraszaniu filmu łzowego na powierzchni oka i zaburzeniami w nawilżeniu powierzchni oka oraz funkcji ochronnych filmu łzowego, prowadząc do powstania stanów zapalnych czy infekcji. Kompozycja według wynalazku szczególnie korzystnie wpływa na proliferację komórek nabłonka rogówki, przyspieszając proces gojenia się ran, ograniczając bliznowacenie, zmniejszając ryzyko powstania stanów zapalnych. Kompozycja wspomaga procesy leczenia oraz umożliwia normalne funkcjonowanie osobom z zaburzeniami, których konsekwencją jest nieodpowiednie nawilżenie błon śluzowych, dlatego nadaje się również do nawilżenia błon śluzowych nosa, jamy ustnej i gardła.

Przedmiot wynalazku został przedstawiony w przykładach realizacji, w których oprócz składów kompozycji farmaceutycznej, zaprezentowane zostały wyniki badań właściwości prozdrowotnych kompozycji. Badania obejmują ocenę ryzyka działania uczulającego oraz drażniącego na skórę i oczy, ocenę aktywności w gojeniu się ran, ocenę stopnia cytotoksyczności.

Przykład 1

Kompozycja farmaceutyczna w postaci kropli do oczu zawiera:

Składnik	Zawartość w procentach wagowych [%]
Hialuronian sodu	0,15
Fukoidan	0,10
Trehaloza	3,00
D-pantenol	2,00
Chlorek sodu	0,30
Woda wysokooczyszczona	do 100%

Krople do oczu o w/w składzie mają pH 7 i ciśnienie osmotyczne 200 mOsm/l, stosuje się do worka spojówkowego po jednej kropli 3 razy dziennie do każdego oka. Ponieważ krople nie zawierają konserwantów, mogą być używane codziennie, również przez użytkowników soczewek kontaktowych. Do zakrapiania częściej, po zabiegach uszkadzających powierzchnię oka i nasilonych dolegliwościach.

Przykład 2

Kompozycja farmaceutyczna w postaci kropli do oczu zawiera:

Składnik	Zawartość w procentach wagowych [%]
Hialuronian sodu	0,15
Fukoidan	0,1
Trehaloza	3
D-pantenol	2
Wodorofosforan disodu	0,1
Diwodorofosforan sodu	0,1
Chlorek sodu	0,42
Wersenian czterosodowy	0,1
Cetrymid	0,01
Woda wysokooczyszczona	do 100%

Krople do oczu o w/w składzie mają pH 8 i ciśnienie osmotyczne 300 mOsm/l. Należy stosować zewnętrznie do worka spojówkowego 3–4 razy dziennie po jednej kropli.

Przykład 3

Kompozycja farmaceutyczna w formie kropli do oczu zawiera:

Składnik	Zawartość w procentach wagowych [%]
Hialuronian sodu	0,15
Fukoidan	0,1
Trehaloza	3
D-pantenol	2
Chlorek sodu	0,2
Woda do iniekcji	do 100%

Krople do oczu o w/w składzie mają pH 6,6 i ciśnienie osmotyczne 306 mOsm/l, stosuje się zewnętrznie do worka spojówkowego 3–4 razy dziennie po jednej kropli.

Badania działania drażniącego i uczulającego oraz cytotoksyczności kropli do oczu według przykładu 3:

Krople do oczu o składzie podanym w przykładzie 3, przeznaczone do intensywnego nawilżania oraz wspomagania regeneracji bariery ochronnej powierzchni oczu przy ich suchości poddano badaniom tolerancji miejscowej przy podaniu do spojówkowego, mającym na celu określenie działania drażniącego na oczy: Badanie obejmowało dwa etapy:

W pierwszym etapie badano właściwości drażniące po podaniu na skórę

Badanie przeprowadzono z użyciem jednego królika Imp:BN rasy biało-nowozelandzkiej. Na 24 h przed rozpoczęciem badania wstępnie wystrzyżono i wygolono sierść po obu stronach części grzbietowej tułowia królika tak, aby powstały cztery pola o powierzchni ok 150 cm² (10x15 cm). Na dwa pola tj. na pole przednie lewego i tylne prawego boku, aplikowano jednorazowo po 0,5 ml badanego roztworu. Na pozostałe dwa pola tj. przednie prawego i tylne lewego boku, aplikowano po 0,5 ml kontroli, którą była woda do iniekcji. Zabezpieczono jałowym kompresem z gazy i utrzymywano w kontakcie ze skórą przez opatrunek okluzyjny w warunkach dermalnej 4-godzinnej ekspozycji zamkniętej. Następnie opatrunki zdjęto, umyto skórę i po upływie 1 h od zdjęcia opatrunków dokonano pierwszego odczytu próby badanej i kontroli. Kolejne odczyty wykonywano po 24, 48 i 72 h od zdjęcia opatrunków. Oceniano charakter i stopień nasilenia zmian w skórze, zgodnie z klasyfikacją reakcji skórnych Magnussona i Kligmana. Wyniki badania wykazały, że badany roztwór nie wywołał żadnych zmian odczynowych w postaci rumienia i obrzęku w skórze królika Imp: BN po jednorazowej 4 h ekspozycji zamkniętej.

W drugim etapie przebadano i oceniono działanie drażniące na oczy

Badanie przeprowadzono z użyciem 3 królików Imp:BN rasy białonowozelandzkiej. Na 24 h przed rozpoczęciem badania zbadano ich wzrok za pomocą oftalmoskopu. Do badania użyto króliki, których oczy nie wykazywały żadnych nieprawidłowości. U 3 królików Imp:BN odciągnięto dolną powiekę od gałki ocznej prawego oka i wkroplono po 1,0 ml badanego roztworu do dolnego worka spojówkowego. Przez około 1 sekundę delikatnie przytrzymało aby zapobiec utracie substancji badanej.

Oko lewe spełniło rolę kontrolną – punktu odniesienia. Obserwacji oczu dokonano po upływie 1, 24, 48 i 72 godzin, zgodnie z systemem klasyfikacji uszkodzeń oczu normy ISO 10933-10:2015-02. W badaniu po 1, 24, 48 i 72 godzinach obserwacji nie stwierdzono zmętnienia rogówki, braku reakcji na światło i krwawienia tęczówki oraz zaczerwienienia, obrzęku i wydzieliny spojówki u żadnego z 3 królików po jednorazowej aplikacji badanego roztworu. W związku z tym uznano, że badany roztwór nie stworzy ryzyka wystąpienia działania drażniącego na oczy u człowieka.

Badanie działania uczulającego na skórę:

Badanie działania uczulającego na skórę przeprowadzono metodą testu Buehlera *in vivo* na kawiach domowych Imp: D-H. Badanie wykonano na 15 dorosłych kawiach domowych Imp:D-H, w tym 10 kawii domowych – grupa uczulana a 5 – grupa kontrolna. Przed rozpoczęciem badania

przeprowadzono 5-dniową adaptację kawii, w trakcie której codziennie mierzono masę ich ciała. Na 24 h przed rozpoczęciem badania u 15 kawii domowych Imp:D-H usunięto sierść poprzez dokładne golenie części grzbietowej tułowia, wykluczając skaleczenie skóry. Właściwe badanie przebiegło wieloetapowo. W pierwszym etapie wykonano indukcję, polegającą na aplikacji badanego roztworu bezpośrednio na skórę lewego boku w ilości 0,5 ml u 10 kawii z grupy uczulanej i 0,5 ml kontroli, którą stanowiła woda do iniekcji u 5 kawii z grupy kontrolnej. Skórę w miejscu nałożenia próby badanej i kontroli zabezpieczono jałowym kompresem z gazy 17-nitkowej o wymiarach 5 x 5 cm i utrzymywano w kontakcie ze skórą przez 6 godzin za pomocą niedrażniącego przylepca. Procedurę indukcyjną powtarzano w dniach 6–8, 13–15, 20–22 dni. W 35 dniu badania u 15 kawii domowych Imp:D-H wywołano reakcję uczuleniową poprzez aplikację 0,5 ml badanego roztworu na tylną część wygolonej powierzchni prawego boku, a na przednią część wygolonej powierzchni prawego boku aplikowano 0,5 ml kontroli – wody do iniekcji. Skórę w miejscu nałożenia próby badanej i kontroli zabezpieczono jałowym kompresem z gazy 17-nitkowej o wymiarach 5 x 5 cm i utrzymywano w kontakcie ze skórą przez 6 h za pomocą niedrażniącego przylepca. Po upływie 24 i 48 h wykonano test sprawdzający zgodnie z klasyfikacją Magnussona i Kligmana dla oceny reakcji skórnych.

Grupa uczulana – 10 kawii domowych Imp:D-H: Po 24 i 48 godz. od wywołania reakcji uczuleniowej wykonano test sprawdzający i nie stwierdzono odczynu uczuleniowego w skórze w miejscu aplikacji badanego roztworu u żadnej z 10 kawii zgodnie z klasyfikacją według Magnussona i Kligmana dla oceny reakcji skórnych.

Grupa kontrolna – 5 kawii domowych Imp:D-H: Po 24 i 48 godz. od wywołania reakcji uczuleniowej wykonano test sprawdzający i nie stwierdzono odczynu uczuleniowego w skórze w miejscu aplikacji kontroli u żadnej z 5 kawii zgodnie z klasyfikacją według Magnussona i Kligmana dla oceny reakcji skórnych. Zgodnie z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniającym i uchylającym dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniającym rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 substancje, które w teście Buehlera wywołują reakcję uczuleniową u mniej niż 15% zwierząt, nie powinny stwarzać ryzyka reakcji uczuleniowej u człowieka i nie powinny być klasyfikowane jako substancje o właściwościach uczulających. Uzyskane wyniki wskazują, że badany roztwór nie wywołał reakcji uczuleniowej u żadnej z 15 kawii domowych Imp:D-H, nie powinien więc stwarzać reakcji uczuleniowych u człowieka.

Wyniki badania działania uczulającego na skórę metodą testu Buehlera:

Grupa	Kod numeryczny kawii domowej Imp:D-H	Płeć kawii domowej Imp:D-H	Jednorazowa dawka badanego roztworu	Czas ekspozycji w trakcie reakcji wywołania	Test sprawdzający	
					Reakcje skórne po 24 h	Reakcje skórne po 48 h
Grupa badana n=10 kawii domowych Imp:D-H	507	Samiec	0,5 ml	6 h	0	0
	511	Samiec	0,5 ml	6 h	0	0
	516	Samiec	0,5 ml	6 h	0	0
	539	Samiec	0,5 ml	6 h	0	0
	568	Samiec	0,5 ml	6 h	0	0
	571	Samiec	0,5 ml	6 h	0	0
	575	Samiec	0,5 ml	6 h	0	0
	579	Samiec	0,5 ml	6 h	0	0
	642	Samiec	0,5 ml	6 h	0	0
	649	Samiec	0,5 ml	6 h	0	0
Grupa kontrolna n=5 kawii domowych Imp:D-H	578	Samiec	0,5 ml	6 h	0	0
	580	Samiec	0,5 ml	6 h	0	0
	636	Samiec	0,5 ml	6 h	0	0
	640	Samiec	0,5 ml	6 h	0	0
	643	Samiec	0,5 ml	6 h	0	0

Badanie cytotoksyczności:

Badanie cytotoksyczności *in vitro* przeprowadzono zgodnie z założeniami normy PN-EN ISO 10993-5:2009 metodą dyfuzji na agarze. Użyto fibroblastów mysich NCTC klon 929, ATCC. W badaniu zastosowano kontrolę negatywną, pozytywną, kontrolę hodowli i nośnika. W wyniku przeprowadzonego badania nie stwierdzono zmian wokół ani pod próbką. Uzyskano stopień cytotoksyczności „0”, który należy interpretować jako brak reaktywności próbki i tym samym badaną próbkę należy uznać za niecytotoksyczną.

Wyniki badań dla składników aktywnych kompozycji**Test proliferacji komórek:**

Test proliferacji prowadzono na fibroblastach mysich w celu ustalenia optymalnego stężenia fukoidanu oraz trehalozy, przy którym aktywność proliferacji komórek – liczba aktywnych metabolicznie – żywych komórek w populacji, jest najwyższa. Do hodowli komórek użyto podłoża Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) z dodatkiem 10% surowicy (FBS) oraz 2% roztworu Antibiotics & Antimycotics i 0,5% Fungizone Amfoterycyna B, w celu kontroli lub wyeliminowania zanieczyszczeń hodowli komórkowej. Hodowlę prowadzono na sterylnych płytkach 96-dółkowych (1×10^4 komórek), inkubowanych w inkubatorze z przepływem 5% CO₂, w temp. 37°C przez 24 h. Po namnożeniu komórek zlewano podłoże hodowlane. Komórki przepłukiwano roztworem buforowym PBS oraz poddawano działaniu 0,25% roztworu trypsyny z EDTA (0,02%) i czerwieni fenolową, w celu otrzymania zawiesiny komórek potrzebnej do przeprowadzenia doświadczenia. Następnie podłoże hodowlane zastąpiono podłożem zawierającym różne stężenia fukoidanu lub trehalozy (0,01; 0,1; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 lub 5,0%), a jako próby referencyjnej użyto komercyjnie dostępnego preparatu o podobnym działaniu, w tych samych stężeniach. Próby inkubowano w inkubatorze z przepływem 5% CO₂, w temp. 37°C przez 24 h. Po 24 h, aktywność metaboliczną komórek określono za pomocą kolorymetrycznego testu MTT. W tym celu, do każdego dołka sterylnej płytki 96-dółkowej, dodano roztwór pożywki, zawierający 10 ml MTT (5 mg MTT/1 ml) w 100 ml i inkubowano w temp. 37°C przez 4 h. W celu rozpuszczenia purpurowego produktu – formazanu w zabarwionym roztworze, po upływie 4 godzin, dodano roztwór solubilizujący (10% roztwór dodecylosiarczanu sodu SDS w rozcieńczonym kwasie chlorowodorowym 0,01 N HCl).

W celu zatrzymania reakcji MTT, płytkę owinięto i pozostawiono w temp. pokojowej na jedną noc. Intensywność zabarwienia-absorbancję, zależną od stężenia formazanu obecnego wewnątrz i na powierzchni komórek, mierzono spektrofotometrycznie w zakresie od 500 do 600 nm (przy długości fali 595 nm) trzy razy. Im wyższe stężenie formazanu, tym intensywniejszy fioletowy kolor oraz wyższa absorbancja. Redukcja barwnika tetrazoliowego MTT jest proporcjonalna do aktywności oksydacyjnej mitochondriów komórki, a w określonych warunkach doświadczalnych do liczby aktywnych metabolicznie (żywych) komórek w populacji.

Wyniki zebrane są w tabeli

Nazwa	Stężenie [%]	Procent proliferacji komórek [%]
Fukoidan 85%	0,01	44,0381 ± 0,8956
	0,1	121,0423 ± 0,7656
	1,0	119,0734 ± 0,8749
	2,0	117,8709 ± 0,9443
	3,0	109,3280 ± 0,9888
	4,0	108,2546 ± 0,9564
	5,0	105,5596 ± 0,9345
Trehaloza	0,01	46,2563 ± 0,8945
	0,1	110,2355 ± 0,9253
	1,0	112,5698 ± 0,9125
	2,0	116,4589 ± 0,8978
	3,0	127,3562 ± 0,9523
	4,0	122,4589 ± 0,9586
	5,0	113,5326 ± 0,9433
Próba referencyjna	0,01	43,2569 ± 0,8752*
	0,1	123,8528 ± 0,9326*
	1,0	123,7361 ± 0,8066*
	2,0	122,9502 ± 0,6167*
	3,0	103,2654 ± 0,8972*
	4,0	97,5366 ± 0,9745*
	5,0	92,1125 ± 0,9546*
Kontrola pozytywna	-	100,0000 ± 0,8996*
Kontrola podłoża	-	0,0000 ± 0,8235*

Wartości są wyrażone jako średnia ± SEM przy użyciu jednokierunkowej ANOVA; n = 3 w każdej grupie * p < 0,05: istotnie różni się w przypadku próby odniesienia. Wyniki testu proliferacji na fibroblastach mysich wykazują, że pożywka zawierająca fukoidan w stężeniu 0,1%, charakteryzowała się najwyższym odsetkiem żywych komórek w populacji (121,0423% ± 0,7656), a pożywka zawierająca trehalozę w stężeniu 3% (127,3562% ± 0,9523). Roztwór fukoidanu o stężeniu 0,1% oraz trehalozy o stężeniu 3% uznano za najkorzystniejszy do zastosowania w kompozycji farmaceutycznej, ponieważ niższe lub wyższe stężenie nie wpłynęło znacząco na zmianę wartości procentowej proliferacji komórek.

Test migracji komórek:

Dla wybranego stężenia substancji aktywnej, przeprowadzono test migracji komórek w hodowli fibroblastów mysich, polegający na mechanicznym uszkodzeniu (wykonaniu rysy) monowarstwy ko-

mórkowej oraz rejestracji za pomocą mikroskopu świetlnego w regularnych odstępach czasu (0, 24, 48 lub 72 godzinach) stopnia regeneracji (zamknięcia) rany. Badanie migracji komórek przeprowadzono techniką laboratoryjną za pomocą testu „wound healing assay” w celu określenia procentowego zamknięcia rany. Metoda ta służy do oceny aktywności substancji aktywnej mającej wpływ na ruchliwość komórek *in vitro*. Celem mechanicznego uszkodzenia monowarstwy komórek było utworzenie obszaru wolnego od komórek, który miał być bodźcem do migracji komórek i uruchomienia mechanizmu zamknięcia rany. Migracja jest kluczową właściwością żywych komórek i ma znaczenie dla normalnego rozwoju odpowiedzi immunologicznej. Komórki w ilości 5×10^4 , zawieszone w podłożu hodowlanym DMEM wlewano na sterylne 24-dółkowe płytki hodowlane. Do tak przygotowanych hodowli komórkowych dodawano odpowiednio roztwór fukoidanu o stężeniu 0,1%, trehalozy o stężeniu 3% lub mieszaninę roztworów 0,1% fukoidanu i 3% trehalozy w stosunku procentowym 50:50, 75:25 lub 25:75, a następnie inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny i barwiono. Rysę na monowarstwie komórkowej wykonywano, aż do uzyskania określonego rozmiaru rany, a nieprzytwierdzone komórki usuwano poprzez przemycie płytek roztworem buforowym PBS zawierającym 0,5% surowicy FBS. Pozostałe komórki na płytce przemyto roztworem buforowym PBS z wykorzystaniem terapii podciśnieniowej w leczeniu ran EAF, a następnie inkubowano w temperaturze 37°C przez 72 godziny. Szybkość migracji komórek oceniano po 0, 24, 48 lub 72 godzinach przy użyciu mikroskopu świetlnego. Roztwór fukoidanu o stężeniu 0,1%, w przeprowadzonym badaniu wykazuje 100% zamknięcie rany po 72 godzinach, roztwór trehalozy o stężeniu 3% po 48 godzinach. Uzyskane wyniki testu aktywności migracji komórek sugerują, że najwyższą skutecznością zamykania rany charakteryzowała się kombinacja fukoidanu w stężeniu 0,1% i trehalozy w stężeniu 3% w proporcji 50:50.

Wyniki badań aktywności gojenia się ran w oparciu o test migracji komórek fibroblastów mysich (procent zamknięcia rany) przedstawiono w tabeli 2.

Nazwa	Procent zamknięcia rany [%]		
	24 godziny	48 godzin	72 godzin
Fukoidan 0,1%	27,7450 ± 0,8743*	79,6154 ± 0,6127*	100,0000 ± 0,0000*
Trehaloza 3%	74,2689 ± 0,8116*	100,0000 ± 0,0000*	100,0000 ± 0,0000*
fukoidan 0,1% : trehaloza 3% 50:50	82,6907 ± 0,8023*	100,0000 ± 0,0000*	100,0000 ± 0,0000*
fukoidan 0,1% : trehaloza 3% 75:25	7,5236 ± 0,8004*	3,0298 ± 0,6215*	0,3255 ± 0,1102*
fukoidan 0,1% : trehaloza 3% 25:75	2,1256 ± 0,8011*	1,0523 ± 0,5426*	0,1081 ± 0,1881*
Próba referencyjna	29,3467 ± 0,9011*	81,6758 ± 0,6148*	95,2865 ± 0,1134*
Kontrola pozytywna	13,2437 ± 0,8378	72,8800 ± 0,5657	100,0000 ± 0,0000

Zastrzeżenia patentowe

1. Kompozycja farmaceutyczna do regeneracji i nawilżania powierzchni oka, obejmująca wodny roztwór substancji aktywnych z ewentualnym udziałem akceptowalnych farmaceutycznie

środków pomocniczych, zwłaszcza substancji izotonizującej i/lub buforującej, **znamienna tym**, że w wodnym roztworze zawiera trehalozę w ilości 0,01–20%, fukoidan w ilości 0,01–10% wagowych, kwas hialuronowy lub jego farmaceutycznie akceptowalne sole w ilości 0,01–10% wagowych, 0,01–10% wagowych pochodnych kwasu pantotenowego, korzystnie D-pantenolu.

2. Kompozycja według zastrz. 1, **znamienna tym**, że substancje izotonizujące wybrane są z grupy obejmującej akceptowalne farmaceutycznie sole kwasów nieorganicznych, korzystnie w postaci chlorku sodu, alkohole cukrowe, zwłaszcza ksylitol, mannitol, sorbitol, glicerol oraz cukry, zwłaszcza glukozę lub fruktozę.
3. Kompozycja według zastrz. 1, **znamienna tym**, że substancje buforujące wybrane są z grupy obejmującej bufor fosforanowy, bufor cytrynianowy, bufor boranowy, trometamol, roztwór TRIS lub lizynę.
4. Kompozycja według zastrz. 1, **znamienna tym**, że zawiera osmoprotektanty wybrane z grupy cukrów, poliooli lub aminokwasów.
5. Kompozycja według zastrz. 1, **znamienna tym**, że zawiera konserwanty i związki utleniające.
6. Kompozycja według zastrz. 1, **znamienna tym**, że zawiera witaminę B5.
7. Kompozycja według zastrz. 1, **znamienna tym**, że zawiera antybiotyki, związki antybakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe, immunosupresanty, substancje działające przeciwzapalnie i związki przedwaskrowe.
8. Kompozycja według zastrz. 1, **znamienna tym**, że przeznaczona jest do stosowania miejscowego na powierzchnię oka oraz do worka spojówkowego.