

Hindawi Publishing Corporation  
Journal of Drug Delivery  
Volume 2012 (2012), Article ID 604204, 16 pages

*Обзорная статья*

## **Успешное улучшение доставки лекарственных веществ в ткани глаза с помощью катионной наноэмульсии Novasorb**

**Frederic Lallemand,<sup>1</sup> Philippe Daull,<sup>1</sup> Simon Benita,<sup>2</sup> Ronald Buggage,<sup>1</sup> and Jean-Sebastien Garrigue<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Research and Development Department, Novagali Pharma SA, 1 rue Pierre Fontaine, 91058 Evry Cedex, France*

<sup>2</sup>*The Institute for Drug Research, School of Pharmacy, The Hebrew University of Jerusalem, POB 12065, 91120 Jerusalem, Israel*

Корреспонденцию следует адресовать Jean-Sebastien Garrigue,  
jean-sebastien.garrigue@novagali.com

Получена 7 сентября 2011; Принята 9 ноября 2011

Academic Editor: Abhijit A. Date

Copyright © 2012 Frederic Lallemand et al. Это статья открытого доступа, распространенная согласно Лицензии Creative Commons «С указанием авторства», которая разрешает свободное использование, распространение и воспроизведение любым агентом, если оригинал цитируется надлежащим образом.

Местная офтальмологическая доставка активных компонентов может осуществляться с помощью катионной наноэмульсии. В течение последнего десятилетия компания Novagali Pharma успешно разработала и выпустила на рынок передовую фармацевтическую технологию Novasorb, применяемую для лечения офтальмологических заболеваний. В этой статье описаны основные этапы разработки катионной наноэмульсии от подбора ингредиентов до клинических испытаний. Основной задачей при разработке технологии являлся выбор катионного агента с приемлемой степенью безопасности, который бы обеспечил достаточное время задержки препарата на глазной поверхности. Проведенные затем фармакокинетические испытания и испытания на токсичность показали, что катионная эмульсия безопасна и хорошо переносится. Даже в отсутствие активного компонента во время клинических испытаний катионная эмульсия продемонстрировала благоприятное воздействие на глазную поверхность. Кроме того, клинические исследования продемонстрировали эффективность и безопасность катионной эмульсии, содержащей в составе циклоспорин А, в лечении пациентов с синдромом сухого глаза. Проводимые в настоящее время исследования по оценке латанопрост-содержащей эмульсии у пациентов с сочетанием глаукомы и патологии поверхности глаз

свидетельствуют о её благоприятном воздействии, выражающемся в уменьшении повреждений глазной поверхности у этой группы пациентов. Кульминацией этих усилий стало появление на рынке Катионорма – не содержащей консервантов катионной эмульсии, применяемой для симптоматической терапии синдрома сухого глаза.

## 1. Введение

Для лечения заболеваний глаз в основном применяются глазные капли на водной основе. Однако эти лекарственные формы поднимают технические проблемы (такие как растворимость, стабильность и хранение) и клинические вопросы (эффективность, местная токсичность и режим применения). Традиционные водные растворы ограничиваются возможностью использования только водорастворимых молекул, а также тем фактом, что в течение двух минут после инстилляции более 80% препарата выводится через носослезный канал, сокращая проникающую способность лекарства до менее чем 1% от инстиллировавшейся дозы [1]. Поэтому фармацевтические компании столкнулись с задачей разработки новой лекарственной формы для местного применения, которая бы позволила расширить диапазон потенциально активных ингредиентов и при этом дольше задерживалась на глазной поверхности, обеспечивая поддержание терапевтической концентрации, а также соответствовала нормативным критериям для её одобрения контролирующими органами. Основные трудности при доставке лекарств в ткани глаза и ключевые факторы при разработке офтальмологического препарата перечислены в Таблице 1.

Нанотехнологии в настоящее время рассматриваются в качестве лучшего решения для улучшения доставки офтальмологических лекарств в ткани глаза, и, тем не менее, на рынке все еще недостаточно продуктов, использующих нанотехнологии [2]. Некоторые причины этого кроются в том, что большинство наносистем, даже фармацевтически эффективных, столкнулись с техническими проблемами, такими как стабильность коллоидных систем [3], необходимость применения новых вспомогательных веществ или использования органических растворителей, несоответствующих регуляторным стандартам либо имеющим неизвестные или неприемлемые профили токсичности [4] или уникальные по своим масштабам требования к производству.

Тем не менее, нанотехнологии остаются перспективным подходом к проблеме доставки лекарств в ткани глаза. По сравнению с доступными на сегодняшний день подходами применения глазных капель, наносистемы с биоадгезивными свойствами (например: катионные наноэмульсии) являются более эффективными при доставке в ткани глаза биоактивных молекул в надлежащей концентрации.

В основе биоадгезивности наносистем лежит механизм электростатического взаимодействия, которое продлевает время нахождения препарата на поверхности глаза [5]. Для создания электростатического взаимодействия с отрицательно заряженными клетками глазной поверхности, носитель должен иметь положительный

заряд. В этом и заключается преимущество катионной наноэмульсии, созданной по технологии Novasorb.

Таблица 1: Основные трудности при доставке лекарств в ткани глаза и ключевые факторы.

---

### *Трудности*

---

*Абсорбция:* глазная биодоступность не более 3–4% после местного применения традиционных глазных капель.

*Плохо растворимые лекарственные средства:* традиционные глазные капли на водной основе не подходят для липофильных лекарств (40-60% новых химических соединений)

*Выполнение назначений:* для достижения терапевтического эффекта часто необходимы многочисленные инстилляций глазных капель.

*Высокие требования к переносимости /комфорту* ограничивают выбор лекарственной формы.

*Выбор вспомогательных веществ:* не так много вспомогательных веществ разрешены к офтальмологическому применению (масла, полимеры, поверхностно активные вещества...)

*Доставка лекарств в задний сегмент глаза:* не существует систем местного применения для заднего сегмента; из-за отсутствия альтернативы применяется инвазивное лечение.

---

### *Ключевые факторы*

---

*Анатомия и физиология глаза:* муциновый слой, веки, метаболизм, вымывание при мигании...

*Состав слезы:* липидный наружный слой, стабильность слезной пленки, ферменты....

*Состояние болезни:* влияние кератита или воспаления на абсорбцию и выведение...

*Комфорт для глаз:* переносимость препарата, pH, осмолярность, вязкость, размер капли...

*Концентрация препарата:* влияние на абсорбцию, эффективность, режим дозирования, выполнение назначений

---

Цель данной статьи заключается в описании этапов разработки технологии по созданию катионной наноэмульсии от теоретических изысканий до клинического применения. Первая стадия разработки после предварительного исследования для проверки концепции, проведенного Иерусалимским университетом (University of Jerusalem), состояла в подборе компонентов наноэмульсии: катионного агента, масляной фазы и поверхностно активных веществ, которые бы удовлетворяли

стандартам международной фармакопеи (т.е. фармакопеи США и ЕС). Затем была поставлена задача изготовить стабильную и стерильную катионную наноэмульсию, содержащую активное вещество, одобренное регуляторными органами. Завершение полного цикла доклинических и клинических испытаний с участием пациентов с патологией глазной поверхности привело к запуску первого продукта, основанного на технологии катионной наноэмульсии.

## **2. Катионная наноэмульсия для глазной доставки**

Поскольку нейросетчатка – это продолжение центральной нервной системы, наружная часть глаза и его придатки созданы для защиты внутренних структур глаза, в частности, от вредных химических соединений [6]. Первый защитный барьер – это веки, которые действуют, как заслонка, предотвращающая попадание инородных тел на глазную поверхность. Вторым барьером – это слеза, которая постоянно вырабатывается для вымывания с поверхности глаза экзогенных субстанций. По этой причине слеза, главным образом, ответственна за короткое время контакта с поверхностью глаза и низкую абсорбцию офтальмологических препаратов местного действия. Последний защитный глазной барьер – это роговица. Нейронная система роговицы способна обнаруживать изменения в уровне pH и осмолярности, что может индуцировать рефлекторные мигание и слезотечение. Кроме того, роговица формирует плотный структурный барьер, созданный из трех различных слоев тканей с переменными гидрофильными и липофильными свойствами для предотвращения абсорбции внутрь глаза нежелательных субстанций [7].

Для того чтобы продлить время контакта местных препаратов с поверхностью глаза и улучшить их биодоступность, терапевтическую эффективность и комплаенс путем уменьшения количества необходимых инстилляций, были выполнены многочисленные попытки [8-10]. Гидрогели, которые сейчас широко распространены в офтальмологической фармацевтической промышленности, позволили, например, снизить частоту применения тимолола, от двух инстилляций в день до одной. Некоторые вспомогательные вещества с вязкостными, либо с биоадгезивными свойствами часто используются для продления времени нахождения препарата на глазной поверхности: гели на основе карбопола, производные целлюлозы, декстран, желатин, глицерин, полиэтиленгликоль, полоксамер 407, полисорбат 80, пропиленгликоль, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон. Тем не менее, использование данных вспомогательных веществ остается применимым лишь для гидрофильных субстанций, а преимущество повышенной вязкости должно находиться в равновесии с потенциальным недостатком, выражающимся в глазном дискомфорте, вызываемом затуманиванием зрения после инстилляцией вследствие изменения показателя преломления глазной поверхности. Кроме того, другим недостатком повышенной вязкости является то, что высокая вязкость раствора затрудняет его инстилляцию из флакона, а также накладывает ограничения на способы стерилизации при изготовлении. Совсем недавно были предложены такие усовершенствования, как obturators слезных точек с дозатором

активного вещества [11], лечебные контактные линзы пропитанные препаратами для лечения глаукомы, а также инъецируемые биораспадающиеся микро- и наночастицы, однако сегодня еще слишком рано говорить, что они доступны для пациентов.

Наряду с проблемой увеличения времени контакта с поверхностью глаза в последние годы стали доступны многочисленные липофильные и плохо растворимые в воде субстанции, которые могли бы использоваться для лечения различных глазных заболеваний. Эти лекарства создают трудности композиции для ученых-фармацевтов из-за их ограниченной растворимости в воде. Лекарственные формы для местного применения липофильных препаратов включают в себя масляные и мицеллярные растворы, лосьоны, мази и суспензии. Офтальмологическое применение таких лекарственных форм не только некомфортно для пациента, но также имеет ограниченную эффективность. Несмотря на относительно большой выбор субмикронных коллоидных носителей по доставке лекарств в ткани глаза, наночастицы и липосомы привлекают наибольшее внимание, благодаря тому, что они потенциально более эффективны по сравнению с существующими лекарственными формами [12, 13].

Липидные эмульсии типа «масло в воде», изначально предназначенные для парентерального применения, были изучены за последнее десятилетие и сейчас используются в качестве носителя для улучшения глазной биодоступности липофильных препаратов [14,15]. Среди них наноэмульсии считаются превосходной альтернативой для доставки в ткани глаза липофильных лекарственных субстанций. Эмульсия обеспечивает высокий показатель инкапсуляции, а также улучшенные показатели стабильности активного ингредиента и проникающую способность. Первым представленным на рынке офтальмологическим эмульсионным лекарственным средством был Restasis (Allergan) – не содержащая консервантов анионная эмульсия 0,05% циклоспорина А, назначаемая для подавления воспаления у пациентов с недостаточной слезопродукцией. И хотя Restasis был одобрен FDA (US Food and Drug Administration) в 2002 г., в странах ЕС его не утвердили. Другими глазными каплями в форме эмульсии являются слезозаменители (Soothe (Bausch & Lomb) и Refresh Endura (Allergan)), доступные на рынке США. Другие офтальмологические наноэмульсии находятся на стадии разработки, и среди них есть продукты, основанные на технологии Novasorb, появившиеся в результате работы в Herbrew University of Jerusalem профессора Simon Benita и разработанные французской фармацевтической компанией Novagali Pharma.

Платформа технологии Novasorb базируется на подходе катионной наноэмульсии. Общая стратегия технологии Novasorb основана на факте, что клетки роговицы и конъюнктивы, а также муциновый слой гликозаминогликанов, покрывающий глазную поверхность, являются отрицательно заряженными при физиологическом уровне pH [16]. После инстилляции положительно заряженного лекарственного средства, очевидно, возникает электростатическое притяжение, которое продлевает время нахождения препарата на глазной поверхности (Рис.1). Кроме того, наноразмер

масляных капелек эмульсии создает огромную контактную площадь с клетками глазной поверхности, обеспечивая улучшенную абсорбцию. Изначально этот подход был предложен для перорального пути введения [17], но через пару лет Klang et al. адаптировали его для доставки в ткани глаза индометацина [18], а Abdulrazik et al. [19] предложили таким образом улучшить биодоступность циклоспорина А.



**Рис. 1:** Катионная наноэмульсия, взаимодействующая с отрицательно заряженными клетками роговицы. Эффекты катионной наноэмульсии: (1) восполнение липидного слоя и стабилизация слезной пленки, (2) электростатическое взаимодействие с муцинами и (3) улучшение глазной абсорбции.

Потенциал катионной наноэмульсии по доставке лекарственных веществ в ткани глаза демонстрирует преимущества по сравнению с существующими носителями препаратов местного действия [20-22]. Однако этот подход доставки субстанций включает в себе определенные препятствия и технологические сложности, в частности, при подборе элементов композиции, как мы это увидим позже. В ходе разработки препаратов (от доклинической до клинической) приходилось возвращаться на этап создания композиции с целью оптимизации физико-химических свойств продуктов из-за проблем с их стабильностью, токсичностью, либо из-за вопросов фармакокинетики. На протяжении 10 лет разработки было протестировано и запатентовано три поколения катионных наноэмульсий [23-25].

### 3. Разработка композиции

**3.1. Катионные агенты.** Поверхностный заряд наноэмульсии определяется дзета потенциалом. Он соответствует электрическому потенциалу, который окружает масляную нанокнопельку в плоскости гидродинамического среза и измеряется электрофоретической мобильностью. Последняя зависит от природы катионного


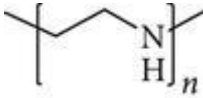
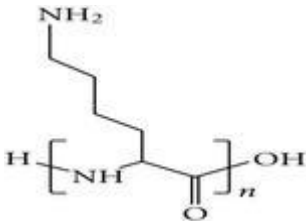

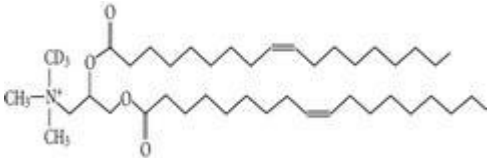
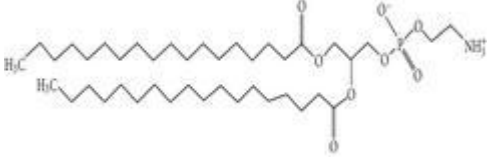
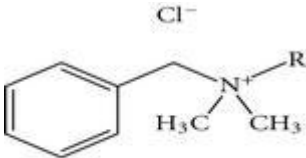
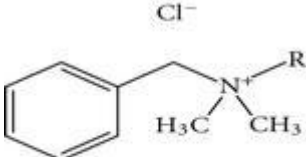
агента, его концентрации и электролитической среды, окружающей масляную нанокпельку. В дополнение к увеличению времени нахождения на отрицательно заряженной глазной поверхности положительный заряд катионного агента содействует стабилизации эмульсии образованием электростатического отталкивания между масляными капельками наноэмульсии [26]. Подтверждение того, что специфическая природа катионной молекулы может отвечать за улучшенные свойства поглощения, было дано Calvo et al., которые показали, что два различных типа содержащих индометацин катионных нанокпсул (покрытых поли-L-лизином или хитозаном) привели к совершенно разным кинетическим профилям лекарств [27]. Поэтому ещё до начала фармацевтической разработки необходимо тщательно изучить выбранный катионный агент, так как успех рецептуры, в значительной мере, зависит от выбора такого катионного агента, как это будет описано далее.

Специалисты компании Novagalí установили, что при дзета потенциале ниже +10мВ, наноэмульсия не может быть автоклавирована без дестабилизации масляных капелек. Поэтому первой из задач при разработке технологии Novasorb было создать катионную эмульсию с более высоким дзета потенциалом для стабилизации наноэмульсии, при этом с как можно меньшей концентрацией катионного поверхностно-активного вещества, во избежание компромисса с безопасностью. Было продемонстрировано, что оптимальный диапазон дзета потенциала находится в пределах между +20 мВ и +40мВ. Согласно литературным данным описано, множество катионных агентов (Таблица 2), которые в большинстве своем являются поверхностно активными веществами: положительно заряженная область их молекулы не проникает в масляное ядро капельки, а остается на её поверхности, что делает их очень полезными для эмульсий. К сожалению, лишь некоторые из них перечислены в фармакопях и приемлемы для офтальмологических препаратов из-за проблем со стабильностью, либо токсичностью.

По сравнению с анионными и неионогенными поверхностно-активными веществами (ПАВ), катионные ПАВ известны как наиболее токсичные [28]. Поэтому для разработки технологии Novasorb, было необходимо найти подходящее катионное поверхностно-активное вещество, которое бы обеспечило достаточно высокий катионный заряд, имело малую токсичность и соответствовало международным стандартам.

Стеарилламин – это один из наиболее широко используемых в академическом мире катионных липидов, особенно для производства катионных липосом [29] или катионных наноэмульсий [19]. Однако поскольку это вещество очень реактивно по отношению к другим вспомогательным веществам и активным компонентам, а также не включено ни в одну из фармакопей, это был не обоснованный выбор для фармацевтической разработки. Олейламин – еще один катионный липид, который использовался для производства офтальмологических эмульсий [30], но у этого липида также есть проблемы стабильности из-за его изначальной аминной функции и присутствия ненасыщенных областей в алифатической цепи.

Таблица 2: Химическая структура характерных молекул, которые могли бы использоваться в качестве катионных агентов для доставки лекарственных препаратов

Стеариламин	
Поли(этиленимин) (PEI)	
Поли-L-лизин (PLL)	
Олейламин	
DOTAP	
Фосфатидилэтаноламин (DOPE)	
Бензалкония хлорид	 R = -C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> ... - C <sub>18</sub> H <sub>37</sub>
Цеталкония хлорид	 R = C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>

Другие катионные молекулы, которые обычно используются для трансфекции ДНК, также часто используются для создания систем катионной доставки лекарств: поли(этиленимин) (ПЭИ) и поли-L-лизин (ПЛЛ). ПЭИ – это органический полимер, имеющий высокую плотность аминогрупп, которые могут быть протонированы. При физиологическом уровне рН этот поликатион очень эффективен в связывании ДНК и



может содействовать трансфекции эукариотических клеток [31]. В качестве катионного агента он использовался в мицеллах [32], наночастицах [33], альбуминовых наночастицах [34], липосомах [35] и наноразмерных катионных гидрогелях [36]. Несмотря на то, что некоторые авторы заявляют, что этот полимер безопасен, другие ученые, такие как Hunter [37], обнаружили, что ПЭИ очень цитотоксичен. ПЛЛ – полимер, состоящий из нескольких лизинов (аминокислот). Лизин обладает так называемой аминной функцией  $\text{NH}_2$ -группы, которая ионизируется при физиологическом уровне pH, предоставляя этому полимеру несколько катионных зарядов. Как катионный агент он также иногда используется в системах доставки лекарств, таких как микрочастицы [38]. Однако он оказался токсичным [39], и этот полимер не одобрен к использованию в офтальмологических лекарственных формах.

Катионные липиды DOTAP (N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N триметиламмоний) хлорид и DOPE (диолеил-фосфатидилэтаноламин) представляют собой другой потенциальный класс катионных агентов. Это амфифильные молекулы с цепочкой жирных кислот и полярной группой, несущей катионный заряд. Их главное преимущество заключается в их биodeградируемости и хорошей переносимости. DOPE, который также несет и отрицательный заряд, является нейтральным липидом «помощником» и часто входит в состав катионных наноэмульсий [40]. С использованием DOTAP были успешно созданы катионные твердые липидные наночастицы для переноса ДНК-содержащих вакцин [41]. Hagigit et al. [42,43] показали, что идея использования DOTAP для создания стабильных катионных наноэмульсий лучше, чем использование для тех же целей полунатурального липидного олеиламина. Кроме того, катионная эмульсия на базе DOTAP позволила улучшить проникающую способность нечувствительных олигонуклеотидов как после их инстилляции в конъюнктивную полость, так и после интравитреальных инъекций. Но, как и большинство полунатуральных липидов, эти агенты химически нестабильны и нуждаются в хранении при температуре  $-20^\circ\text{C}$ , что сильно ограничивает их промышленное использование.

Первоначальные ограничивающие факторы против использования ранее упомянутых катионных агентов в технологии Novasorb, даже не смотря на то, что они показали возможности в формировании катионной системы доставки лекарств, заключаются в том, что (1) они не входят в список фармакопей США и ЕС, (2) их токсичность по отношению к глазной поверхности, в достаточной степени, не была установлена и (3) ни один из этих агентов не имел успеха на рынке фармацевтических продуктов. Поэтому компания Novagalí решила сузить поиск подходящего катионного агента, осуществив его среди уже зарегистрированных, используемых в офтальмологических препаратах, либо соответствующих фармакопеям.

Поэтому были рассмотрены другие вспомогательные вещества, ранее одобренные органами здравоохранения. Производные четверичного аммония, которые, как правило, используются как консерванты, имеют свойства ПАВ и потенциал для обеспечения наноэмульсии катионным зарядом. Эти агенты включают цетримид, бензалкония

хлорид, бензетония хлорид, бензододециния бромид и цетилпиридиний. Как консерванты, эти вещества защищают от инфекционного загрязнения электростатическим связыванием с отрицательно заряженной поверхностью бактерий и простейших и разрушением их клеточных мембран. Недостаток производных четверичного аммония состоит в том, что их эффект на клеточную мембрану не ограничивается микроорганизмами, и они также способны повреждать эпителиальные клетки, покрывающие глазную поверхность, за счет такого же механизма действия. Поэтому производные четверичного аммония первоначально не рассматривались для использования в эмульсиях. В 2002 году Sznitowska обнаружила, что консервирующая активность этого класса ПАВ ослаблялась или нейтрализовывалась в присутствии эмульсий [44]. Часть четверичного аммония связывалась с эмульсией, что приводило к уменьшению в водной фазе количества свободных поверхностно активных молекул, оказывающих антимикробное воздействие и, вместе с этим, токсический эффект на эпителий глазной поверхности. Компания Novagali Pharma использовала это физико-химическое свойство для создания нового типа катионного нанопереносчика, используя бензалкония хлорид (БАХ) и цеталкония хлорид (ЦКХ) в роли катионных агентов. ЦКХ является высоко липофильным ( $\log P = 9.5$ ) компонентом БАХ. Поэтому он главным образом будет связан с липидной фазой эмульсии, обеспечивая высокий дзета потенциал на поверхности масляных капелек и в тоже время почти не оставляя свободных молекул, индуцирующих токсичность по отношению к глазной поверхности. БАХ (и ЦКХ, как компонент БАХ) регулярно используется в качестве консерванта в различных доступных на рынке глазных каплях (например, БАХ используется в препарате Ксалатан) и принят, как соответствующий требованиям контролирующих органов для офтальмологических препаратов. Эти эксципиенты, используемые в низких концентрациях, как катионные агенты в эмульсиях, продемонстрировали себя безопасными для глаза, что мы и увидим в главе, посвященной токсикологии, в данной статье. Что более важно, использование БАХ и ЦКХ в качестве катионных агентов только в эмульсиях, защищено в настоящее время несколькими уже выданными и ожидающими решения американскими и европейскими патентами (например: EP1655021 [25], EP1809237 [45], EP18009238 [46] и EP1827373 [47], которые уже выданы).

*3.2 Прочие вопросы композиции.* После выбора катионного агента, другие эксципиенты, такие как неионогенные сурфактанты (ПАВ), осмотические агенты и масла, требуют тщательного отбора и определения их приемлемой концентрации (Таблица 3). Разрешенные для офтальмологического применения вспомогательные вещества довольно многочисленны, и стадия их отбора в основном была вопросом времени. Эмульсия – система довольно нестабильная по своей природе. Дальнейшая ее стабильность обеспечивается комбинацией вспомогательных веществ с сурфактантами. Эта комбинация также определяет размер эмульсии. Концентрация сурфактантов должна обеспечивать равновесие между стабильностью и токсичностью. Наиболее

широко используемые сурфактанты – это полоксамеры, полисорбаты, кремофоры, тилоксапол и витамин Е (токоферол полиэтиленгликоль сукцинат, TPGS).

Таблица 3: Эксципиенты, которые могут быть использованы в офтальмологических эмульсиях

Функция	Эксципиенты
Осмотический агент	Маннитол, глицерол, сорбитол, пропиленгликоль, декстроза
Масла	Среднецепочечные триглицериды, минеральное масло, растительное масло (такое как касторовое)
Катионные агенты	Бензалкония хлорид, цетилпиридина хлорид, цетримид, бензетония хлорид
Сурфактанты	Полисорбаты, кремофоры, полоксамеры, тилоксапол, Витамин Е-TPGS
Буферы, соли и анионы	По возможности избегаются
Вода	Вода для инъекций
Прочее	Загустители: преимущественно нейтральные Консерванты: преимущественно неионогенные и гидрофильные

Для выбора подходящих эксципиентов и их концентрации необходимо учитывать такие параметры, как конечная осмолярность и уровень pH наноэмульсии. Параметры продукта, применяемого на глазной поверхности, должны быть как можно более приближены к физиологическим. Это представляет еще одну сложность, так как буферы и осмотические агенты могут скрывать поверхностный заряд катионных наночастиц и потенциально дестабилизировать эмульсию. Естественная слеза имеет уровень pH между 6,9 и 7,5 [48]. По данным литературы инстилляцией 20 мкл 0.067 М буферного раствора с уровнем pH 5,5, быстро приводит слезу к pH 6-6,5 [49]. Кроме того, также известно, что низкий уровень pH хорошо переносится, если pH слезы быстро возвращается к нормальному значению [50]. Поэтому можно предположить, что буферизация не столь важна. В случае с Novasorb, эмульсия может быть слегка буферизована с помощью трис-буфера (Катионорм), или не буферизована вовсе. В этом случае слеза быстро восстановит физиологический уровень pH слезной пленки.

Были использованы такие нейтральные осмотические агенты как полиолы (глицерол, манитол, или сорбитол). Липидные эмульсии более или менее схожи физически с лекарственными формами в виде простых глазных капель на водной основе, так как более 90% дисперсной среды является водной не зависимо от состава препарата. Главное отличие – это визуальный аспект: их молочно-белый вид. Окончательная спецификация показана в Таблице 4. Стоит отметить, что, не смотря на то, что БАХ и ЦКХ присутствуют в препарате в качестве катионных агентов, композиция не содержит

консерванта [51]. Поэтому эмульсия упаковывается в тубик-капельницы разового использования при помощи технологии «Выдуй-Заполни-Запечатай» (BFS). В итоге, носитель имеет формулу, представленную в Таблице 5. Активный ингредиент при этом добавляется в масляную фазу, а в водную фазу для создания комбинированного продукта могут быть добавлены некоторые гидрофильные молекулы.

Таблица 4: Конечная спецификация катионной наноэмульсии.

Спецификация	Значения
Внешний вид	От молочно- белого до полупрозрачного
pH	5,5 - 7
Осмолярность	180 до 300 мОсм/кг
Дзета потенциал	От +20 до +40 мВ
Средняя величина масляной капельки	От 150 до 300 нм
Стерильность	Стерильно
Вязкость	1,1 м <sup>2</sup> /с
Поверхностное натяжение	Схожее со слезой: 41 мН/м

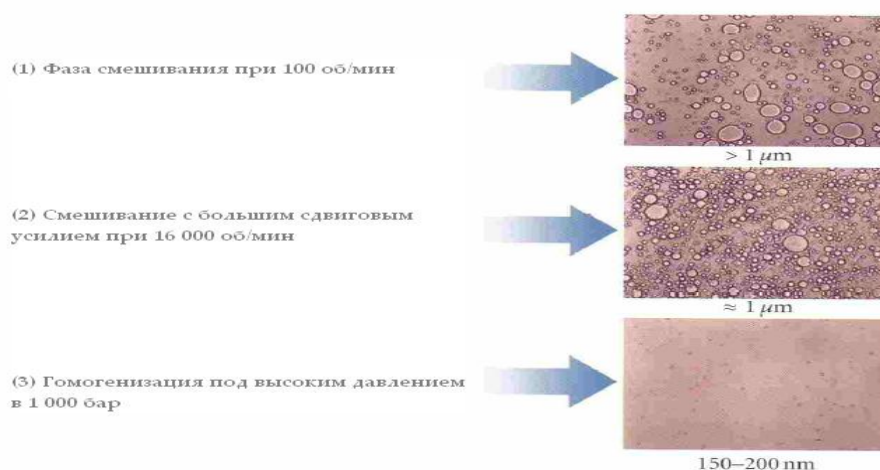
Таблица 5: Состав типичного носителя на основе технологии Novasorb.

	Экципиент	Функция	Концентрация %
	Триглицериды среднецепочечные	Внутренняя фаза	1 до 2
Масляная фаза	Центалкония хлорид	Катионный агент	0,005
	Тилопаксол	Сурфактант	0,2
	Полоксамер 188	Сурфактант	0,01
Водная фаза	Глицерол	Осмотический агент	1,5-2,5
	NaOH	pH регулятор	До pH 6-7
	Вода для инъекций	Внешняя фаза	До 100

Размер масляных наночастиц наиболее важен, так как он влияет на стабильность эмульсии и ее глазную абсорбцию. Насколько нам известно, еще не было доказано, что глазная абсорбция связана с размером наночастицы, хотя по логике вещей, чем меньше объект, тем выше ожидаемое поглощение. Как уже обсуждалось Rabinovich-Guilatt et al. [21], существует несколько механизмов абсорбции наночастиц роговицей. В случае катионных наноэмульсий, положительно заряженные масляные наночастицы, вероятнее всего, не проникнут через роговицу, так как капельки будут связаны с отрицательно заряженными муцинами. По этой причине доставка активных ингредиентов в ткани глаза, вероятно, связана с пассивной диффузией на фоне увеличенного времени контакта.

Дополнительный фактор, благоприятствующий абсорбции лекарства, связан с малым размером наночастиц, то есть с площадью поверхности доступной для лекарственного обмена. Учитывая, что средний диаметр масляной капельки составляет 150 нм, а объем эмульсии при инстиляции на глазную поверхность – примерно 30 мкл, количество масляных наночастиц в одной капле эмульсии близко к  $10^{10}$ . Как следствие, при такой чрезвычайно возросшей площади поверхности обмена (почти  $1000 \text{ мм}^2$ ) диффузия активных ингредиентов в целевые ткани также должна значительно увеличиться. Таким образом, малый размер частиц наноэмульсии должен быть ассоциирован с лучшей клинической эффективностью препарата.

Производственный процесс состоит из трех шагов, как показано на Рисунке 2. Первый шаг – фаза смешивания в магнитной мешалке при 100 об/мин. в течение нескольких минут, за которой следует фаза расщепляющего перемешивания при 16 000 об/мин. в течение 10 минут. На этой стадии масляные капельки эмульсии приобретают размер приблизительно в 1 мкм. Для достижения субмикронного размера (150-200 нм) эмульсию гомогенизируют под давлением в 1000 бар на фоне охлаждения.



**Рис. 2:** Три шага производственного процесса, необходимых для уменьшения размера эмульсионной капельки. Представленные фотографии сделаны с помощью оптического микроскопа.

После проведения отборочного теста (циклы замораживания / размораживания, центрифугирования и температурный тест при  $80^\circ \text{C}$ ) из более чем сотни прототипов были отобраны стабильные катионные наноэмульсии. В дополнение к этому, образцы систематически подвергались глубокому физико-химическому анализу, включая измерение pH, осмолярности, дзета потенциала, размера капельки эмульсии, межфазового и поверхностного натяжения и вязкости. Все эти тесты способны распознать потенциальную дестабилизацию эмульсии, такую как пенообразование, слипание, окисление по Оствальду и фазовое разделение, и в конечном итоге получить лекарственное средство, соответствующее спецификации, представленной в Таблице 4.

И, в конце концов, продукт должен быть стерильным. Поскольку процесс стерилизации оказывает большое влияние на физическую целостность эмульсии, его следует рассматривать на самой ранней стадии разработки рецептуры. Стерилизационная фильтрация невозможна для эмульсий, так как при этом методе используется фильтр с размерами пор в 0,22 мкм, которые могут забиться в процессе фильтрации. Асептические процессы слишком дорогостоящи. Оставшимся вариантом была тепловая стерилизация. Однако она может быть выполнена лишь над очень стабильными эмульсиями, отсюда и необходимость тщательного выбора вышеупомянутых вспомогательных веществ.

*3.3. Наполнение лекарственным веществом.* Платформа технологии Novasorb была изначально разработана для того, чтобы иметь возможность наполнения активными молекулами. Эмульсии, предпочтительно неионогенные, абсолютно адекватны для наполнения липофильными субстанциями с  $\log P = 2-3$  (где  $P$  – коэффициент распределения между октанолом и буферным раствором при pH 7,4), и таких кандидатов множество. Хотя катионная эмульсия без активного ингредиента сама по себе обладает благоприятными свойствами. Ее состав, включающий минеральные масла, воду, сурфактанты и глицерин, уменьшает испарение слезы с поверхности глаза, а также оказывает смазывающее и увлажняющее действие. Все вместе эти компоненты производят защитный эффект, благоприятно воздействуя на все слои слезной пленки. Унаследовав неотъемлемые свойства технологии Novasorb, восстанавливающей поврежденные слои естественной слезной пленки, Катионорм<sup>®</sup>, не содержащая консервантов катионная эмульсия без активных ингредиентов, была выпущена на мировые рынки для коррекции симптомов сухого глаза (Таблица 6).

Таблица 6: Основные продукты на основе технологии Novasorb, существующие на рынке или которые поступят в ближайшее время

Продукт	Активные ингредиенты	Применение	Статус
Катионорм <sup>®</sup>	–	Синдром сухого глаза	На рынке
Cyclokat <sup>®</sup>	0,1% циклоспорин А	Синдром сухого глаза средней тяжести	Фаза III
Vekacia <sup>®</sup>	0,1% циклоспорин А	Весенний кератоконъюнктивит	Фаза III
Catioprost <sup>®</sup>	0,005% латанопрост	Глаукома, сочетающаяся с патологией поверхности глаза	Фаза II

Приблизительно 40% новых химических веществ имеют низкую растворимость в воде, но потенциально могут быть внесены в эмульсию Novasorb [52]. Компания Novagali Pharma изучила эту возможность для примерно сорока липофильных активных ингредиентов разных терапевтических классов (нестероидные противовоспалительные препараты, стероидные противовоспалительные препараты, антибиотики,

антимикотики и др.), доказав многофункциональность эмульсии. В этой статье мы остановимся лишь на самых передовых продуктах. Не смотря на то, что местное применение препаратов циклоспорина А показало его низкую биодоступность, этот липофильный имунномодулятор широко используется офтальмологами благодаря признанному терапевтическому потенциалу в лечении различных глазных заболеваний (синдром сухого глаза, аллергия и воспаление) [53]. Циклоспорин А рассматривался как превосходный изначальный кандидат для оценки потенциала катионной эмульсии Novasorb в улучшении эффективности данного препарата. Поэтому основной проблемой разработки катионной эмульсии, содержащей Циклоспорин А, было создание оптимальной композиции [53] для местного применения. На сегодняшний день Novagali Pharma разработала два продукта, основанных на технологии Novasorb и содержащих циклоспорин А: Cylokate для лечения синдрома сухого глаза и Vekacia для лечения весеннего кератоконъюнктивита.

Латанопрост, липофильный аналог простагландина, – это эффективный лекарственный препарат для снижения внутриглазного давления, поставляемый на рынок под названием Ксалатан (Pfizer) для лечения глаукомы и офтальмогипертензии. В препарате Ксалатан активный ингредиент 0,005% латанопрост растворен в воде в присутствии 0,02% БАХ. Не смотря на то, что этот препарат занимал лидирующее место среди противоглаукомных лекарственных средств, у него есть два недостатка, которые возможно повлияли на его коммерческий успех: (1) рецептура была нестабильна при комнатной температуре, требуя хранения при 5°C, и (2) БАХ, как консервант и вещество, способствующее лучшей растворимости активного ингредиента, оказывал токсическое воздействие на глазную поверхность, что приводило к ухудшению переносимости и, возможно, к плохому соблюдению назначений. Так как патент, защищавший эту молекулу, истек в 2011 году, появилась возможность улучшить Ксалатан. В результате, Novagali начало разработку препарата Catioprost – содержащей латанопрост катионной эмульсии без консервантов, для лечения пациентов с повышенным внутриглазным давлением (ВГД) и одновременной защитой глазной поверхности.

#### **4. Доклиническая разработка**

Доклиническая разработка делится на оценку безопасности и фармакокинетические исследования.

*4.1 Безопасность.* Установление безопасности новой нанотехнологии было важной целью программы доклинической разработки. В первую очередь беспокойство вызывала возможная токсичность, так как поведение нано объектов тяжело предугадать [4]. По этой причине было проведено множество исследований по оценке глазной безопасности катионной наноэмульсии.

Так как активные ингредиенты, включенные компанией Novagali в состав эмульсий (циклоспорин А и латанопрост), уже использовались в других лекарственных препаратах, оценивались только токсичность носителя и конечного продукта.

По мере разработки технологии Novasorb уже были доступны предварительные данные в отношении глазной безопасности некоторых катионных эмульсий [54]. Исследование субхронической токсичности, произведенное на кроликах, продемонстрировало, что катионная наноэмульсия, содержащая стериламин в концентрации 3 мг/мл, оказалась безопасной для глаз и имела хорошую переносимость после повторных местных инстилляций [54]. Кроме того, исследование местной переносимости на глазах кроликов показало, что офтальмологическая эмульсия, содержащая олейламин в концентрации 1 мг/мл и инстиллировавшаяся 8 раз в день в течение 28 дней, относительно хорошо переносилась [21]. Несмотря на эти обнадеживающие данные, их было не достаточно для поддержки технологии Novasorb, поскольку в последней на этапах её разработки использовались другие катионные агенты (ЦКХ и БАХ), которые, как известно, в более высоких концентрациях применяются в качестве консервантов. Профиль безопасности катионной эмульсии Novasorb, использующей БАХ в роли катионного агента, был оценен как *in vitro*, так и *in vivo* (Таблица 7).

*4.1.1. Безопасность Novasorb как носителя.* На протяжении работы над композицией, прототипы эмульсии оценивались в тесте Draize, который, несмотря на некоторые ограничения, позволял идентифицировать наименее раздражающие наноэмульсии. Этот тест заключается в инстилляциях от 30 до 50 мкл продукта в один глаз шестерым новозеландским белым кроликам и мониторинга за ними для выявления любых абнормальных клинических признаков, таких как гиперемия конъюнктивы, отек или учащение мигания, что может указывать на раздражение. Тест не дает объективных показателей, так как его результат зависит от наблюдателя, но позволяет сделать предположение, как продукт будет переноситься.

Были использованы и другие тесты *in vitro* и *in vivo*. В частности, в культуре клеток эпителия роговицы человека *in vitro* катионная эмульсия с содержанием 0,02% БАХ в качестве катионного агента демонстрировала хорошую переносимость клетками, как и раствор натрий-фосфатного буфера, в то время как водный раствор 0,02% БАХ оказался токсичным.

На модели кроликов был проведен тест острой токсичности, который позволил охарактеризовать механизм токсических проявлений, наблюдаемых во время традиционного теста Draize [55]. В этом эксперименте производилось 15 инстилляций тестовых глазных капель с интервалом в 5 минут при наблюдении в течение 96 часов. Для определения профиля безопасности различных катионных эмульсий с БАХ или ЦКХ в роли катионных агентов производилась оценка клинических симптомов, результатов конфокальной микроскопии *in vivo* и импрессионная цитология конъюнктивы. В этом исследовании было продемонстрировано, что катионные эмульсии на основе БАХ или ЦКХ очень хорошо переносятся, в то время как 0,02% раствор БАХ был ответственным за гибель клеток эпителия роговицы, связанную с провоспалительной и проапоптозной активностью БАХ.



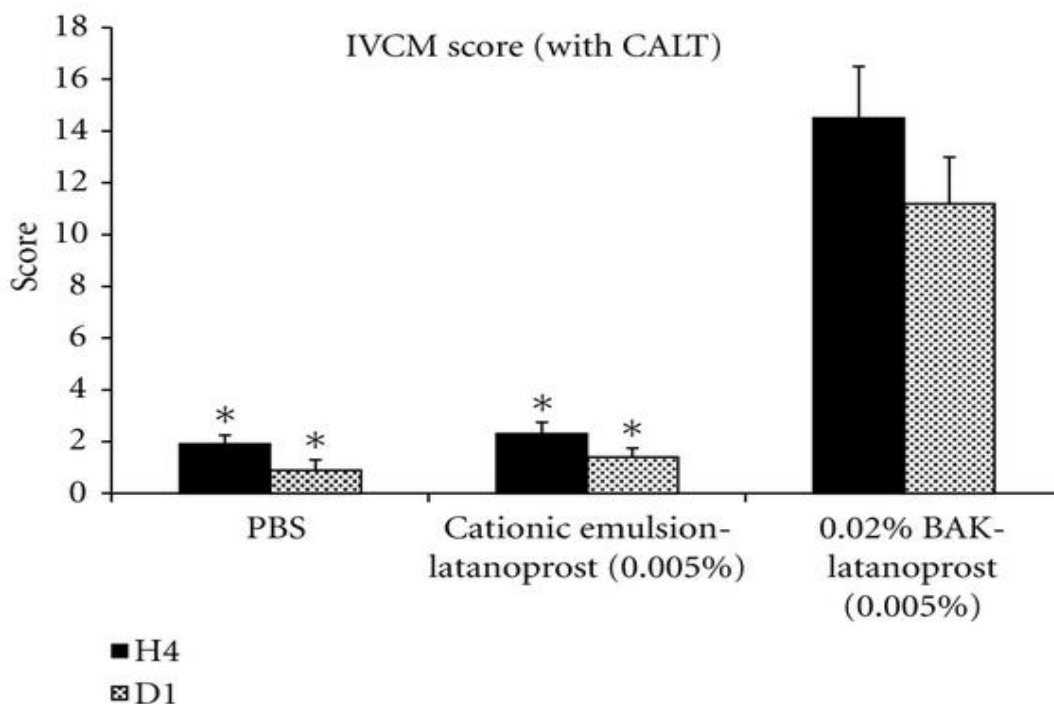
Таблица 7: Список тестов безопасности и нормативных исследований токсичности, выполненных на этапе доклинического тестирования технологии Novasorb.

Тип доклинического исследования	Исследования безопасности эмульсии Novasorb и эмульсии Novasorb с активным ингредиентом
Тесты безопасности	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Тест Draize.</li> <li>2. Тест острой токсичности на модели кроликов показал, что эмульсия, содержащая БАХ и ЦКХ, хорошо переносится.</li> <li>3. Оценка глазной безопасности на недавно разработанной модели заживления повреждения роговицы <i>in vitro</i> и на кроликах <i>in vivo</i>.</li> <li>4. Оценка токсичности катионной эмульсии латанопроста <i>in vivo</i> (на кроликах).</li> </ol>
Нормативные исследования токсичности	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Оценка цитотоксического потенциала <i>in vitro</i> путем непрямого контакта.</li> <li>2. Оценка гиперчувствительности замедленного типа на морских свинках.</li> <li>3. Краткосрочный тест (72 часа) на глазное раздражение у кроликов после однократного применения.</li> <li>4. Определение физической совместимости эмульсии Novasorb с контактными линзами.</li> <li>5. 28-дневная оценка глазной переносимости на кроликах.</li> <li>6. Оценка потенциала индуцирования отсроченной контактной гиперчувствительности (анализ локального лимфоузла).</li> <li>7. Оценка чувствительности роговицы после повторных применений у кроликов альбиносов.</li> <li>8. Оценка фототоксического и фотоаллергического потенциала после местного применения у морских свинок.</li> <li>9. 6-месячная оценка глазной токсичности на собаках и кроликах.</li> </ol>

#### 4.1.2. Безопасность эмульсии Novasorb, содержащей активные ингредиенты.

Профиль безопасности эмульсии Novasorb, используемой как носитель для липофильных лекарств, таких как циклоспорин (Vekacia/Cycloklat) и латанопрост (Catioprost) оценивался на животных [56]. Полученные результаты показали, что ни один из этих двух активных ингредиентов не влияет на безопасность катионной эмульсии, поскольку в обоих случаях катионные эмульсии, содержащие данные действующие вещества, обладали хорошей переносимостью, не уступавшей таковой катионной эмульсии в чистом виде (Рис.3). Например, на модели теста острой токсичности у кроликов повторяющиеся инстилляции препаратов Vekacia и Cycloklat (катионные эмульсии, содержащие циклоспорин А в концентрации 0,05 и 0,1%) переносились также хорошо, как и Restasis (анионная эмульсия 0,05% циклоспорина), а препарат Catioprost (не содержащая консервантов катионная эмульсия 0,005% латанопроста) имел лучшую переносимость, чем Ксалатан с 0,02% БАХ в качестве консерванта. Исследования местной переносимости, проведенные на кроликах, подтвердили, что повторяющиеся инстилляции (4-6 раз в день, в течение 28 дней)

препаратов Cyslokate и Vekacia и инстилляций дважды в день препарата Catioprost имели прекрасную переносимость.



**Рис. 3:** Оценка поверхности глаз кроликов после повторных инстилляций содержащей латанопрост катионной эмульсии Novasorb при помощи конфокальной микроскопии *in vivo* (IVCM). Полученные при IVCM изображения глазной поверхности кролика и лимфоидной ткани связанной с конъюнктивой (CALT) использовались для оценки безопасности катионной эмульсии латанопроста путем оценки наблюдаемых изменений после повторных инстилляций. Заметьте, что чем ниже значение, тем лучше переносимость. Натрий-фосфатный буфер (PBS) использовался для отрицательного контроля. (\*)  $P < 0,0001$  по сравнению с 0,02% бензалкония хлорид-содержащим раствором 0,005% латанопроста. Адаптировано из Liang и др. [56].

Все предыдущие данные *in vivo* были получены у кроликов со здоровой глазной поверхностью. Несмотря на это, представляла интерес оценка воздействия препарата Catioprost на поврежденную роговицу, для имитации условий, более приближенных к клинической ситуации, когда пожилые пациенты начинают терапию глаукомы. С этой целью использовалась модель крысы со скарифицированной роговицей для определения влияния препарата Catioprost, его носителя-эмульсии, и препарата Ксалатан (доступного на рынке препарата латанопроста) на процессы заживления глазной поверхности. Данные, полученные *in vivo*, показали, что Ксалатан замедлял процессы заживления роговицы, в то время как и Catioprost, и его носитель катионная эмульсия (без латанопроста в составе) способствовали заживлению глазной поверхности и восстановлению функции поврежденного эпителия, тем самым подтверждая лучший профиль безопасности катионной эмульсии Novasorb, а также то, что Novasorb может ускорять заживление повреждений поверхности глаза. Таким

образом, катионная эмульсия, созданная по технологии Novasorb, показала свою безопасность, но перед началом клинических исследований нужно было провести и другие исследования по оценке безопасности, удовлетворяющие европейским и американским стандартам. Эти исследования перечислены в Таблице 7 и включали оценку цитотоксического потенциала *in vitro* путем непрямого контакта; оценку гиперчувствительности замедленного типа у морских свинок; краткосрочный тест (72 часа) на глазное раздражение у кроликов после однократного применения; определение физической совместимости эмульсии Novasorb с контактными линзами; 28-дневную оценку глазной переносимости у кроликов; оценку потенциала индуцирования отсроченной контактной гиперчувствительности (анализ локального лимфоузла); оценку чувствительности роговицы после повторных применений у кроликов альбиносов; оценку фототоксического и фотоаллергического потенциала после местного применения у морских свинок и, наконец, 6-месячную оценку глазной токсичности у собак и кроликов. Полное описание всех этих исследований может быть найдено в различных нормативных рекомендациях.

*4.2. Исследования для подтверждения концепции и фармакокинетика.* Параллельно с оценкой безопасности были проведены исследования, подтверждающие концепцию о возможности использования технологии катионной наноэмульсии для доставки активных молекул в ткани глаза.

Для оценки воздействия катионного заряда на глазную поверхность компания Novagali Pharma произвела измерение статического и динамического контактного угла и исследование поверхностного натяжения на отобранных для анализа глазах кроликов в соответствии с методом, заимствованном у Tiffani [57]. Этот эксперимент показал, что катионные эмульсии, созданные по технологии Novasorb, имеют лучший коэффициент распределения по поверхности роговицы и конъюнктивы по сравнению с традиционными глазными каплями и анионной эмульсией. Более высокий коэффициент распределения ведет к лучшей смачиваемости глазной поверхности. Оптимальное распределение катионной эмульсии обеспечивает защитные пленкообразующие свойства и уменьшает вымывание. На Рисунке 4 проиллюстрировано поведение катионной эмульсии, которая распространяется по поверхности глаза гораздо быстрее, чем другие лекарственные формы. Было описано, что эмульсия типа «масло в воде» улучшает абсорбцию лекарств, содействуя роговичной или конъюнктивальной абсорбции за счет продления контакта с поверхностью глаза и, таким образом, улучшая доставку лекарств в ткани [58].

Для оценки абсорбции циклоспорина А после инстилляций экспериментальных катионной и анионной эмульсий 0,2% циклоспорина А были проведены ранние фармакокинетические исследования [19]. Они показали, что катионная эмульсия оказалась почти в два раза лучше анионной в вопросе доставки циклоспорина А в ткани глаза, не смотря на то, что последняя содержала 0,01% БАХ и 0,2% дезоксихолевою кислоту в качестве умеренных детергентов, которые могут вызывать повреждение клеточных мембран и служить усилителями проникающей способности.

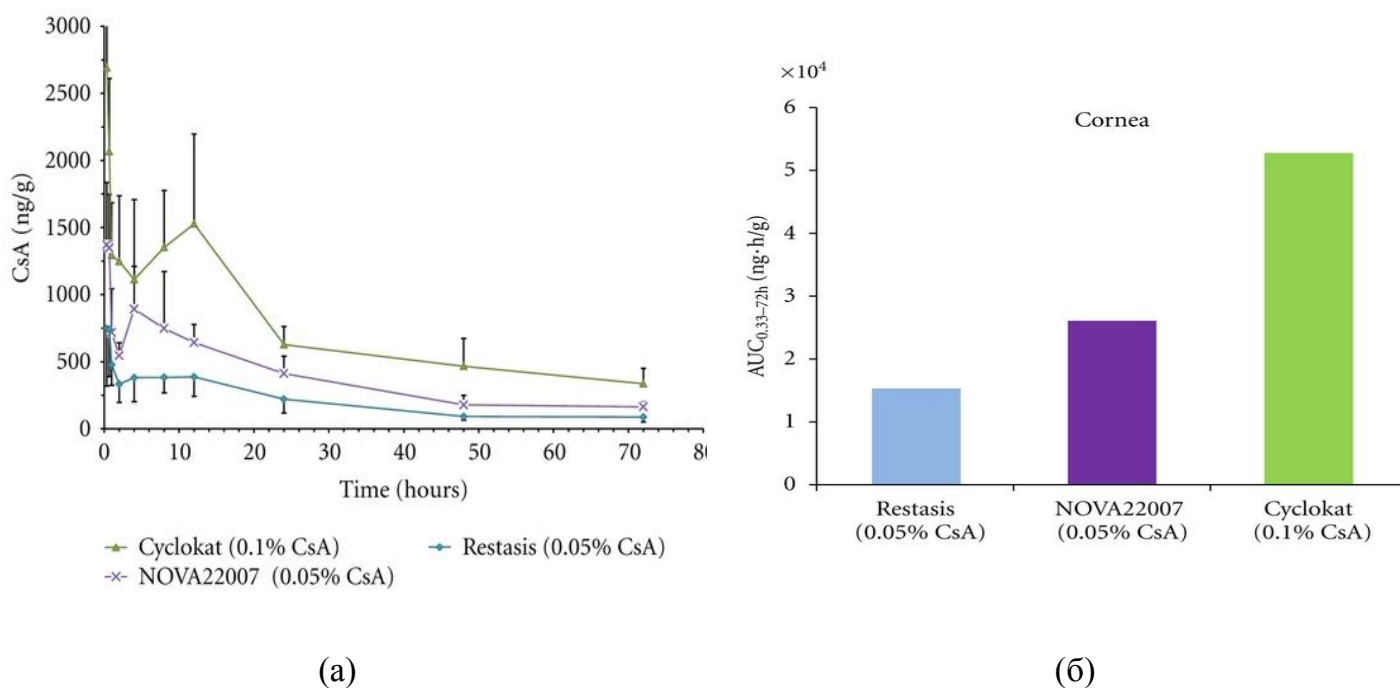


**Рис. 4:** Измерение динамического контактного угла и ширины основания глазной капли, закапанной в глаз кролика. Фотографии сделаны через 0; 0,66; 1,33; 3,32 сек. после инстилляцией гидрогеля гиалуроната натрия (Хило-КОМОД), анионной эмульсии (Refresh Endura) и катионной эмульсии (Катионорм). Величины контактного угла и ширины основания подтверждают оптимальное и более быстрое распространение по поверхности глаза катионных эмульсий по сравнению с анионной эмульсией и продуктом на основе гиалуроново́й кислоты.

Restasis (Allergan) – это анионная эмульсия 0,05% циклоспорина А, которая, как было показано, легко проникает в ткани глаза без значительной системной абсорбции [59,60]. Фармакокинетические исследования, предназначенные для оценки глазного и системного распределения циклоспорина А после однократного или многократного применения катионной эмульсии NOVA22007 (катионная эмульсия 0,05% циклоспорина) или препарата Cyclokate (катионная эмульсия 0,1% циклоспорина) по сравнению с препаратом Restasis в качестве контроля подтвердили значимую роль катионного заряда в улучшении проникновения циклоспорина А в ткани глаза [61] из катионных эмульсий, изготовленных по технологии Novasorb.

Исследования фармакокинетики после однократного применения показали, что 0,05% катионная эмульсия циклоспорина А была эффективней, чем Restasis по доставке циклоспорина в роговицу ( $C_{\max}$ : 1372 против 748 нг/г; AUC: 26477 против 14210 нг/г.ч., соответственно). Кроме того, фармакокинетические исследования после многократного применения катионной эмульсии циклоспорина А подтвердили, что системной абсорбции препарата не наблюдалось: показатели были ниже порога определения (LOD, 0,1 нг/мл) (см. Рис. 5). Применение 3Н-циклоспорина А также продемонстрировало, что его системное распределение после многократных инстилляций было действительно низким и сравнимым как для катионной эмульсии

циклоспорина А, так и для препарата Restasis, и подтвердило, что улучшение локальной абсорбции циклоспорина из катионной эмульсии не связано с увеличением его системной концентрации.



**Рис.5:** (а) Изменение концентрации циклоспорина А в роговице после однократного местного применения у кроликов. Планки погрешности представляют собой стандартные погрешности. (б) Абсорбция роговицей (AUC) у кроликов после однократной инстилляции.

Кроме того, электростатическое притяжение между положительно заряженными масляными капельками катионной эмульсии и отрицательно заряженными клетками эпителия глазной поверхности может объяснить на 50% меньший контактный угол, наблюдаемый у катионной эмульсии по сравнению с анионной (отрицательно заряженной) эмульсией и её более высокий коэффициент распространения [18]. Низкий контактный угол, лучший коэффициент распространения и пролонгированное время контакта катионной эмульсии с глазной поверхностью могут привести к лучшей абсорбции липофильных лекарств, растворенных в катионной эмульсии.

Катионные эмульсии, разработанные для лечения синдрома сухого глаза (Cyclokat) и весеннего кератоконъюнктивита (Vekacia), не тестировались на фармакодинамических моделях, поскольку не существует надежных экспериментальных моделей для этих патологий. Тем не менее, фармакокинетические исследования катионных эмульсий циклоспорина А на животных (см. выше) показали, что тканевая концентрация циклоспорина превышала терапевтическую концентрацию и в роговице, и в конъюнктиве (50-300 нг/г ткани согласно Kaswan [62]). Поэтому безопасность и эффективность этих циклоспорин-содержащих катионных эмульсий впервые были

продемонстрированы во время фаз II и III клинических испытаний (см. следующий раздел).

Таблица 8: Перечень исследований для подтверждения концепции и нормативные фармакокинетические исследования, выполненные на доклиническом этапе тестирования технологии Novasorb.

Тип доклинических исследований	Исследования только эмульсии Novasorb и эмульсии Novasorb с активным ингредиентом
Подтверждение концепции	(I) Измерение контактного угла и поверхностного натяжения <i>ex vivo</i> на глазах кролика.
	(II) Оценка и сравнение возможности катионной эмульсии для заживления повреждения по сравнению со слезозаменителем на модели кролика с абразией роговицы.
	(III) Оценка эффективности катионной эмульсии 0,1% циклоспорина А при лечении сухого кератоконъюнктивита у собак.
	(IV) Оценка эффективности катионной эмульсии 0,005% латанопроста для снижения повышенного ВГД у обезьян с глаукомой.
	(V) Оценка не содержащей консервантов катионной эмульсии латанопроста <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> на моделях заживления повреждения роговицы.
Нормативные фармакокинетические исследования	(I) Фармакокинетика однократных и многократных доз.
	(II) Оценка системного воздействия и токсикокинетики после повторяющихся инстилляций катионной эмульсии циклоспорина, содержащей БАХ или ЦКХ.

В противоположность этому, безопасность и эффективность препарата Catioprost (не содержащей консерванта катионной эмульсии 0,005% латанопроста) изначально оценивались на модели яванской макаки с глазной гипертензией [63] и сравнивались с таковыми препарата Ксалатан. Оба латанопрост-содержащих препарата имели одинаковый профиль эффективности: гипотензивный эффект продолжался 24 часа. В дополнение к этому, сравнение местной переносимости препаратов Catioprost и Ксалатан продемонстрировало тот факт, что после их инстилляций кроликам два раза в день в течение 28 дней, хотя оба продукта в целом имели хорошую переносимость, у кроликов, которые получали Catioprost, наблюдалась на 42% меньшая частота гиперемии конъюнктивы. В общем, результаты, полученные на доклинических моделях, свидетельствовали, что Catioprost настолько же эффективен для снижения внутриглазного давления, как и Ксалатан, но с лучшим профилем безопасности.

Как перечислено в Таблице 8, некоторые фармакокинетические исследования обязательны к проведению перед испытаниями на людях. Они включают в себя оценку фармакокинетики после однократного и многократных поступлений препарата, определение системного воздействия, а также токсикокинетические исследования

после повторяющихся инстилляций. Полный пакет доклинических исследований придал уверенности в том, что технология Novasorb сама по себе или с введенными активными ингредиентами оказалась полностью безопасной и может обеспечить высокую концентрацию активного ингредиента в тканях глаза. Следующим шагом разработки было клиническое тестирование на людях.

## 5. Клиническая разработка

Было подготовлено досье Нового Исследуемого Препарата (IND), позволяющее провести первое клиническое испытание на людях. Данное досье было подготовлено в соответствии с рекомендациями, полученными посредством регуляторного взаимодействия с контролирующими организациями здравоохранения (FDA, EMA). Действительно, заблаговременный контакт с организациями здравоохранения позволяет обсудить конкретные технологические требования (эффективность, безопасность) и способствует ускорению программ клинической разработки и регистрации.

Таблица 9 описывает различные клинические исследования, проведенные для оценки технологии Novasorb при наличии и отсутствии активного ингредиента. Вначале была осуществлена клиническая оценка препарата катионной эмульсии (носителя), не содержащего активного вещества. Первое клиническое исследование проводилось с первым поколением катионной эмульсии при участии 16 здоровых добровольцев. Во время 7-дневного лечения оценивались безопасность и переносимость четырехразовых ежедневных инстилляций. Была продемонстрирована безопасность и хорошая переносимость продукта. Поскольку носителю присущи свойства защиты глазной поверхности, его протестировали в двух клинических исследованиях второй фазы клинических испытаний, которые были нацелены на оценку эффективности, переносимости и безопасности препарата Катионорм® у пациентов с лёгким и умеренно выраженным синдромом сухого глаза (результаты приведены в следующем разделе).

Катионная эмульсия, содержащая циклоспорин А, впоследствии была оценена у пациентов с болезнью сухого глаза и у пациентов с весенним кератоконъюнктивитом. Основные клинические результаты в свете стоявших задач описаны ниже, включая оценку эффективности препарата-сравнения, в качестве которого выступала катионная эмульсия-носитель, изменчивость конечных точек, а также несоответствие между признаками и симптомами патологии поверхности глаз.

И наконец, для препарата Catioprost, катионной эмульсии, содержащей латанопрост, была начата программа фазы II клинических испытаний. Поскольку исследования фазы II продолжаются, эти данные пока отсутствуют.

Таблица 9: Клинические исследования, проведенные для оценки технологии Novasorb

Год	Тип фазы	Препарат	Цель	Показания	Кол-во пациентов
2003	Фаза I	Носитель №1	Переносимость и безопасность	Отсутствуют	16
2004	Фаза II	Катионорм® (Носитель №2)	Переносимость и безопасность, поисковая эффективность	Сухой глаз	50
2005	Фаза II		Эффективность, переносимость и безопасность	Сухой глаз	79
2010	Фаза II		Эффективность, переносимость и безопасность	Сухой глаз	71
2005	Фаза IIa	Cycloklat	Переносимость и безопасность, поисковая эффективность	Болезнь сухого глаза	48
2008	Фаза IIб	Vekacia	Поисковая эффективность, переносимость и безопасность	Болезнь сухого глаза	132
2009	Фаза III “Siccanove”		Эффективность, переносимость и безопасность	Болезнь сухого глаза	496
2011	Фаза III “Sansika”		Эффективность, переносимость и безопасность	Болезнь сухого глаза	252
2006	Фаза IIб/III	Vekacia	Эффективность, переносимость и безопасность	Активный весенний кератоконъюнктивит	118
2009	Фаза IIб		Эффективность, переносимость и безопасность	Неактивный весенний кератоконъюнктивит	34
2011	Фаза II	Catioprost	Поисковая эффективность, открытое исследование	Глаукома	Н/Д
2011	Фаза IIб	Catioprost	Поисковая эффективность, переносимость и безопасность	Глаукома	100

5.1. *Клиническая оценка препарата Катионорм.* В отчете рабочей группы по синдрому сухого глаза (DEWS) 2007 г. это состояние определено как многофакторное заболевание слезы и поверхности глаза, которое выражается в симптомах дискомфорта, нарушении зрения, нестабильности слезной пленки с возможным повреждением глазной поверхности. В настоящее время симптоматическое лечение при помощи искусственных лубрикантов является первой линией терапии для пациентов с сухим глазом. Однако, недостаток большинства традиционных растворов слезозаменителей – это то, что большая часть инстиллируемого лекарства утрачивается в течение первых



15-30 секунд после инстилляции из-за рефлекторного слезоотделения и дренирования через носослезный канал. Пролонгированное время контакта катионной эмульсии с поверхностью глаза благодаря электростатическому притяжению между положительно заряженными липидными наночастицами и отрицательно заряженной глазной поверхностью, а также восстановление слоев слезной пленки при помощи липидной и водной фазы эмульсии свидетельствуют, что технология Novasorb, по сути, могла бы быть полезна для глазной поверхности даже в отсутствие активного ингредиента.

В результате, во время мультицентрового открытого рандомизированного исследования фазы II, продолжавшегося в параллельных группах в течение одного месяца, была произведена оценка и сравнение переносимости и эффективности Катионорма, не содержащей консервантов катионной эмульсии, с таковыми препарата Refresh Tears (Allergan) у пациентов со слабо выраженными или умеренными клиническими признаками и симптомами синдрома сухого глаза (ССГ). Взрослые пациенты с анамнезом двустороннего ССГ прошли период отмывки от предшествовавшего лечения ССГ, включавшего согласно критериям включения только препараты искусственной слезы. Во время визита включения в исследование пациентов отбирали случайным образом в группы для лечения либо Катионормом ( $n = 44$ ), либо Refresh Tears ( $n = 35$ ), назначавшимися ежедневно 4 раза в день в оба глаза. В последующем пациенты обследовались на 7-й и 28-й дни. Переносимость и эффективность оценивались через один месяц терапии. В исследование было включено 79 пациентов, 86% из которых были женщины со средним возрастом 61,6 лет. Через 1 неделю и через один месяц лечения среднее уменьшение выраженности индивидуальных симптомов сухого глаза и общей выраженности симптомов сухого глаза в группе было выше у пациентов, проходивших лечение Катионормом, чем у пациентов, получавших Refresh Tears (36% в сравнении с 21% на 7-й день и 49% в сравнении с 30% на 28-й день, соответственно), что продемонстрировало более значительное улучшение при применении Катионорма. В то время как общая местная переносимость обоих препаратов была примерно одинаковой, общая клиническая эффективность Катионорма по оценке исследователей оказалась статистически более высокой, чем Refresh Tears ( $P < 0,001$ ). Кроме того, у пациентов, прошедших лечение Катионормом, наблюдалось более значимое улучшение показателей теста Ширмера (увеличение на 1,88 по сравнению с 1,27 мм у пациентов, получавших Refresh Tears), времени разрыва слезной пленки (увеличение на 2,00 сек. по сравнению с 1,16 сек., соответственно;  $P = 0,015$ ), интенсивности окрашивания флюоресцеином роговицы (-0,61 по сравнению с -0,59, соответственно), а также интенсивности окрашивания лиссаминовым зеленым (-1,42 по сравнению с -0,91, соответственно;  $P = 0,046$ ). В целом результаты продемонстрировали, что Катионорм был также безопасен, но более эффективен, чем Refresh Tears у пациентов со слабовыраженными и умеренными симптомами ССГ.

Во время последующего 3-х месячного рандомизированного слепого исследования, проходившего в Италии, эффективность Катионорма оценивалась у взрослых с умеренно выраженным ССГ. Случайным образом пациенты ( $n = 71$ ) были

распределены в группы, в которых они ежедневно 4 раза в день получали Катионорм, Optive (Allergan) или анионную эмульсию Emustil (SIFI). Оценка эффективности производилась через один и через три месяца. После первого месяца лечения у пациентов, получавших Optive и Катионорм, наблюдалось статистически значимое улучшение симптомов сухого глаза по сравнению с исходными данными. Улучшение симптоматики также было очевидным через три месяца терапии в каждой из трех сравниваемых групп. Кроме того, через три месяца увеличилось время разрыва слезной пленки и уменьшилась интенсивность окрашивания флюоресцеином в группах Катионорма и Optive, но не в группе Emustil. И хотя и Катионорм, и Optive привели к уменьшению осмолярности слезной пленки, только Катионорм продемонстрировал значимые изменения этого показателя по сравнению с препаратом Emustil. Данное исследование продемонстрировало, что у пациентов с умеренно выраженным ССГ Катионорм был явно более эффективен, чем анионная эмульсия Emustil. Кроме того, у пациентов, получавших Катионорм, наблюдалось более выраженное улучшение симптомов и клинических признаков ССГ по сравнению с Optive, но эти различия не достигли статистической значимости.

Результаты доклинических исследований (заживление роговицы при ожогах щелочью и при дезэпителизации роговицы у кроликов) и клинических испытаний, оценивавших Катионорм у пациентов с ССГ, подтвердили безопасность и эффективность этого препарата для коррекции симптомов сухого глаза и продемонстрировали положительное воздействие катионной эмульсии, созданной по технологии Novasorb, на глазную поверхность при отсутствии явного активного ингредиента. Однако, как мы увидим далее, эффективность в устранении симптомов патологии поверхности глаз, свойственная не содержащей консервантов катионной эмульсии, представила неожиданную проблему при оценке эффективности применения у пациентов с ССГ не содержащей консервантов катионной эмульсии с циклоспорином А в качестве активного ингредиента.

*5.2. Клиническая оценка препарата Cyclokat.* В определении синдрома сухого глаза, данном в отчёте рабочей группы по сухому глазу (DEWS) 2007 г. указано, что ССГ сопровождается повышенной осмолярностью слезной пленки и воспалением глазной поверхности. По существу, ССГ может считаться состоянием хронического двустороннего воспаления, при котором адекватное лечение, особенно пациентов, не реагирующих на симптоматическую терапию слезозаменителями, должно включать противовоспалительный агент. В то время как Restasis, анионная эмульсия 0,05% циклоспорина А, доступна для лечения ССГ в США, и несмотря на широко распространенное применение приготовленных *ex-tempore* больничными аптеками глазных капель циклоспорина А и даже костикостероидов, в ЕС не было одобренного противовоспалительного препарата, показанного для лечения пациентов с ССГ. Основываясь на доклинических данных, демонстрирующих преимущества катионной эмульсии над анионной, и неудовлетворённых потребностях медицины в одобренной в

ЕС лекарственной форме циклоспорина А для офтальмологического применения, компания Novagalí приступила к разработке препарата Cyclokát для лечения ССГ.

Первое клиническое испытание препарата Cyclokát представляло собой трехмесячное, рандомизированное двойное слепое плацебо контролируемое исследование фазы II для подбора оптимальной дозировки. В нем принимали участие 53 пациента с синдромом Шегрена с умеренно выраженным или тяжелым ССГ. Первичной целью была оценка глазной переносимости и системной безопасности катионной эмульсии, содержащей циклоспорин А в концентрации 0,025%; 0,05% и 0,1% по сравнению с катионной эмульсией-носителем, не содержащей активного ингредиента. Поисковая оценка эффективности была вторичной целью. Исходно 62% включенных в исследование пациентов имели показатель теста Ширмера  $\leq 1$  мм (через 5 минут), и у 49% показатель окрашивания флюоресцеином роговицы составлял  $\geq 3$  баллов. В течение 3-х месячного периода лечения не регистрировалось проблем безопасности и не было признаков системной абсорбции циклоспорина А после местного применения любой из сравниваемых концентраций препарата Cyclokát. Пациенты, получавшие лечение препаратом 0,1% Cyclokát, через 3 месяца продемонстрировали наибольшее улучшение показателя окрашивания роговицы и конъюнктивы. Через 3 месяца наблюдался дозозависимый эффект уменьшения продукции конъюнктивной биомаркера воспаления глазной поверхности HLA-DR по сравнению с исходным уровнем (носитель: -10%; 0,025% циклоспорин А: -8%; 0,05% циклоспорин А: -23% и 0,01% циклоспорин А: -50%).

Во втором трехмесячном двойном слепом плацебо контролируемом исследовании фазы II сравнивались катионные эмульсии циклоспорина А в концентрации 0,05% и 0,1% и катионная эмульсия-носитель при участии 132 пациентов со слабовыраженным или умеренным ССГ при использовании камеры, имитирующей неблагоприятные условия среды. В данном исследовании эффективность и безопасность препарата Cyclokát оценивались посредством анализа составных первичных точек эффективности (окрашивание роговицы флюоресцеином в качестве клинического признака и глазной дискомфорт в качестве симптома) спустя 3 месяца терапии и во время воздействия камеры, имитирующей неблагоприятные условия среды, соответственно. И хотя превосходство для составных первичных конечных точек не было достигнуто, был продемонстрирован общий положительный профиль безопасности и эффективности препарата для улучшения некоторых вторичных конечных точек (другие признаки и симптомы ССГ), и эти результаты свидетельствовали в пользу выбора 0,1% концентрации для последующей клинической разработки.

Исследование *Siccanove* представляло собой шести месячное многоцентровое рандомизированное контролируемое двойное слепое клиническое испытание фазы III препарата Cyclokát 0,1%, который применялся один раз в день, в сравнении с катионной эмульсией-носителем при участии 492 пациентов с умеренным или сильно выраженным ССГ. Первичной целью исследования было продемонстрировать преимущества препарата Cyclokát как в устранении клинических признаков ССГ

(изменение показателя окрашивания роговицы флюоресцеином с использованием модифицированной Оксфордской шкалы), так и симптомов ССГ (среднее изменение общего показателя глазного дискомфорта с использованием Визуальной Аналоговой Шкалы (ВАШ)). После периода отмывки, во время которого разрешалось применять только искусственные слёзы, пациенты были случайным образом распределены в группы, в которых они получали либо Суслокат ( $n = 242$ ), либо катионную эмульсию-носитель ( $n = 250$ ) и обследовались во время визитов через 1, 3 и 6 месяцев. Уже через 1 месяц лечения ( $P = 0,002$ ) пациенты, получавшие Суслокат показали статистически значимое улучшение показателя окрашивания роговицы флюоресцеином (первичной конечной точки оценки эффективности) по сравнению с эмульсией-носителем и исходными данными. Этот показатель продолжал улучшаться через 3 месяца ( $P = 0,030$ ) и через 6 месяцев. Статистически значимое улучшение показателя окрашивания роговицы флюоресцеином через 6 месяцев терапии ( $P = 0,009$ ) было дополнено статистически значимым улучшением при окрашивании лиссаминовым зеленым ( $P = 0,048$ ) и уменьшением экспрессии HLA-DR ( $P = 0,022$ ) [65]. В дополнение к этому, последующий анализ данных исследования *Siccanove* показал, что при лечении препаратом Суслокат наибольший положительный эффект наблюдался у пациентов с исходно более выраженной кератопатией (по данным окрашивания флюоресцеином) (дельта в среднем изменении показателя окрашивания роговицы флюоресцеином по сравнению с исходным уровнем 2-4 балла – 0,22,  $P = 0,009$ ; 3-4 балла – 0,32,  $P = 0,005$ ; 4 балла – 0,77,  $P = 0,001$ ) [66]. Несмотря на то, что имело место клинически значимое улучшение симптомов ССГ по сравнению с исходным уровнем и в группе препарата Суслокат и в группе катионной эмульсии-носителя, через 6 месяцев терапии не наблюдалось статистически значимых различий между этими группами по среднему изменению общего показателя глазного дискомфорта, другой первичной точки оценки эффективности. Однако наблюдались статистически значимые различия в пользу препарата Суслокат, выражающиеся в более чем на 25% выраженном улучшении показателей ВАШ (50,21% по сравнению с 41,94% для эмульсии-носителя,  $P = 0,048$ ). Трудность в демонстрации преимуществ препарата Суслокат по сравнению с его катионной эмульсией-носителем частично объясняется эффективностью самого носителя в улучшении симптомов ССГ, как это было показано ранее в клинических испытаниях препарата Катионорм. Кроме того, этот результат может быть связан со слабой корреляцией между признаками и симптомами ССГ. Исходно в исследовании *Siccanove*, когда, в целом, средние показатели ВАШ возрастали с увеличением степени окрашивания роговицы флюоресцеином, корреляция между величиной показателя ВАШ, как выражением симптомов ССГ, и степенью окрашивания роговицы флюоресцеином, как выражением клинического признака ССГ, оставалась низкой (коэффициент корреляции Спирмена = 0,23) из-за большой вариации степени выраженности симптомов, о которых сообщали пациенты. Аналогичным образом, через 6 месяцев терапии статистическая корреляция между средним изменением степени окрашивания роговицы флюоресцеином и изменением величины показателя ВАШ была низкой (коэффициент корреляции Спирмена = 0,094), и всего лишь около

68% пациентов демонстрировали согласованность в изменении окрашивания роговицы флюоресцеином и симптомов ССГ [63]. И несмотря на то, что плохая согласованность между признаками и симптомами ССГ общепризнана в литературе, улучшение и в признаках, и в симптомах является ожидаемым результатом при рандомизированных клинических испытаниях новых препаратов для лечения ССГ. Поэтому несколько препаратов, имевших перспективы для коррекции ССГ, не оказались успешными из-за неспособности продемонстрировать статистически значимое улучшение признаков и симптомов ССГ, как первичных конечных точек оценки эффективности.

К счастью, комбинированные конечные точки, используемые в предрегистрационных исследованиях для получения разрешения на маркетинг новых средств лечения хронических воспалительных заболеваний, обеспечивают альтернативный способ удовлетворения требований контролирующих органов. Методологический подход к комплексному анализу предотвращает проблемы, связанные с изменчивостью признаков и симптомов как дискретных переменных. Фокусируясь только на положительных результатах со стороны пациента, комплексный подход может решить проблемы, связанные с плохой корреляцией между признаками и симптомами при оценке эффективности нового метода лечения ССГ. В качестве такого базового исследования фазы III, исследования *Sansika*, с использованием комплексного анализа через 6 месяцев терапии была начата работа по оценке эффективности препарата *Cyclokat* у пациентов с тяжелым синдромом сухого глаза.

## 6. Заключение

Технология *Novasorb* является типичным примером революционной технологии, первоначально разработанной командой ученых и успешно перенесенной на пациента. Потребовалось 8 лет, чтобы первый продукт появился на рынке. С тремя препаратами, находящимися на заключительных этапах клинической разработки, и одним препаратом, уже вышедшим на мировые рынки, технология *Novasorb* доказала концепцию, согласно которой катионная наноэмульсия может эффективно применяться для лечения глазных заболеваний, не оказывая токсического эффекта (успешно протестирована при участии более чем 1000 пациентов) и имея ряд преимуществ (Таб. 10). Катинорм (Рис. 6) был выпущен на французский рынок в апреле 2008, и к тому времени, когда была написана эта статья, было реализовано более 550 тысяч упаковок препарата в примерно 10 странах без каких-либо проблем со стороны фармакологического надзора. Препараты *Cyclokat*, *Vekacia* и *Catioprost* смогут выйти на рынок в течение ближайших нескольких лет после успешного окончания базовых исследований. Причин для успеха технологии *Novasorb* множество. С самого начала работы над составом компания уделяла первостепенное внимание поиску офтальмологически приемлемых компонентов и расширяемому производственному процессу. В итоге были разработаны модели и экспериментальные протоколы для тщательной проверки и отбора компонентов препарата с наибольшей вероятностью демонстрации его клинической безопасности и эффективности.

История успеха технологии Novasorb также доказывает, что контролируемые органы, в частности, контролируемые органы стран евросоюза относительно открыты к новым подходам по доставке лекарственных веществ в ткани и новым технологиям при условии, что их эффективность и безопасность могут быть убедительно показаны в соответствии с хорошо построенными протоколами и исследованиями. Компания Novagali Pharma в настоящее время осуществляет разработку следующего поколения катионных наноэмульсий, которые будут иметь улучшенные фармакокинетические свойства, и новых оригинальных лекарственных средств, чтобы расширить их применение по офтальмологическим показаниям. Некоторые другие усовершенствования, такие как разработка новых катионных агентов, будут оказывать непрерывную поддержку этим перспективным и эффективным средствам доставки активных молекул.

Таблица 10. Ключевые движущие силы технологии катионной эмульсии Novasorb

- |        |  |
|--------|--|
| (I)    | Растворимость больших доз липофильных лекарств и/или больших молекул   |
| (II)   | Лучшее проникновение через мембраны, ведущее к лучшей биодоступности   |
| (III)  | Возможность контролируемого высвобождения лекарства                    |
| (IV)   | Стабильность и возможность стерилизации                                |
| (V)    | Эффективные новые пути введения для уже существующих на рынке лекарств |
| (VI)   | Расширение рынков и показаний для применения                           |
| (VII)  | Увеличение жизненного цикла препарата                                  |
| (VIII) | Формирование новых возможностей  |
| (IX)   | Низкая стоимость производства  |



**Рис. 6:** Катіонорм является первым зарегистрированным препаратом, основанным на технологии катионной эмульсии

### Благодарности

Авторы хотели бы поблагодарить S.Cadillon. Все авторы данной статьи имеют финансовые отношения с компанией Novagali Pharma и продуктами, описанными в публикации.

## Список литературы

- [1] J.W.Shell, "Ophthalmic drug delivery systems," *Survey of Ophthalmology*, vol. 29, no.2, pp. 117-128, 1984.
- [2] C. Bucolo, A. Maltese, and F. Drago, "When nanotechnology meets the ocular surface," *Expert Review of Ophthalmology*, vol. 3, no. 3, pp. 325-332, 2008.
- [3] J.Vandervoort and A. Ludwig, "Preparation and evaluation of drug-loaded gelatin nanoparticles for topical ophthalmic use," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 57, no. 2, pp. 251-261, 2004.
- [4] T. W. Prow, "Toxicity of nanomaterials to the eye," *Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 2, no. 4, pp. 317-333, 2010.
- [5] L.C. Du Toit, V. Pillay, Y. E. Choonara, T. Govender, and T. Carmichael, "Ocular drug delivery – A look towards nanobioadhesives," *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 8, no. 1, pp. 71-94, 2011.
- [6] I. P. Kauf and M. Kanwat, "Ocular preparations: the formulation approach," *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 28, no. 5, pp. 473-493, 2002.
- [7] M. de la Fuente, M. Raviña, P. Paolicelli, A. Sanchez, B. Seijo, and M. J. Alonso, "Chitosan-based nanostructures: a delivery platform for ocular therapeutics," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 62, no. 1, pp. 100-117, 2010.
- [8] E. Lavik, M. H. Kuehn, and Y. H. Kwon, "Novel drug delivery systems for glaucoma," *Eye*, vol. 25, no. 5, pp. 578-586, 2011.
- [9] R. Srivastava and K. Pathak, "An updated patent review on ocular drug delivery systems with potential for commercial viability," *Recent Patents on Drug Delivery and Formulation*, vol. 5, no. 2, pp. 146-162, 2011.
- [10] K. Kesavan, J. Balasubramaniam, S. Kant, P. N. Singh, and J.K. Pandit, "Newer approaches for optimal bioavailability of ocularly delivered drugs: review," *Current Drug Delivery*, vol.8, no. 2, pp. 172-193, 2011.
- [11] C. Gupta and A. Chauhan, "Ophthalmic delivery of cyclosporine A by punctal plugs," *Journal of Controlled Release*, vol. 150, no. 1, pp. 70-76, 2011.
- [12] G. W. Lu, "Recent advances in developing ophthalmic formulations: a patent review," *Recent Patents on Drug Delivery and Formulation*, vol. 4, no. 1, pp. 49-57, 2010.
- [13] B. R. Conway, "Recent patents on ocular drug delivery systems," *Recent Patents on Drug Delivery and Formulation*, vol. 2, no. 1, pp. 1-8, 2008.
- [14] S. Muchtar, S. Almog, M. T. Torracca, M. F. Saettone, and S. Benita, "A submicron emulsion as ocular vehicle for delta-8-tetrahydrocannabinol: effect on intraocular pressure in rabbits," *Ophthalmic Research*, vol. 24, no. 3, pp. 142-149, 1992.
- [15] N. Naveh, C. Weissman, S. Muchtar, S. Benita, and R. Mechoulam, "A submicron emulsion of HU-211, a synthetic cannabinoid, reduces intraocular pressure in rabbits," *Graefes's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, vol. 238, no. 4, pp. 334-338, 2000.
- [16] Y. Rojanasakul and J. R. Robinson, "Transport mechanisms of the cornea: characterization of barrier permselectivity," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 55, no. 2-3, pp. 237-246, 1989.
- [17] T. Gershanik and S. Benita, "Positively charged selfemulsifying oil formulation for improving oral bioavailability of progesterone," *Pharmaceutical Development and Technology*, vol. 1, no. 2, pp. 147-157, 1996.
- [18] S. Klang, M. Abdulrazik, and S. Benita, "Influence of emulsion droplet surface charge on indomethacin ocular tissue distribution," *Pharmaceutical Development and Technology*, vol. 5, no. 4, pp. 521-532, 2000.
- [19] M. Abdulrazik, S. Tamilvanan, K. Khoury, and S. Benita, "Ocular delivery of cyclosporin A II. Effect of submicron emulsion's surface charge on ocular distribution of topical cyclosporin A," *S.T.P. Pharma Sciences*, vol. 11, no. 6, pp. 427-432, 2001.
- [20] S. Tamilvanan and S. Benita, "The potential of lipid emulsion for ocular delivery of lipophilic drugs," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 58, no. 2, pp. 357-368, 2004.
- [21] L. Rabinovich-Guilatt, P. Couvreur, G. Lambert, and C. Dubernet, "Cationic vectors in ocular drug delivery," *Journal of Drug Targeting*, vol. 12, no. 9-10, pp. 623-633, 2004.
- [22] S. Benita and G. Lambert, "Ocular drug delivery by cationic emulsions," in *Proceedings of the International Symposium on Ocular Pharmacology and Therapeutics*, Monaco, France, 2004.
- [23] S. Benita and E. Elbaz, "Oil-in-water emulsions of positively charged particles," US patent 6,007,826, Yisum Research Development Company of the Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem, Israel, 1999.
- [24] L. Rabinovich, G. Lambert, F. Lallemand, and B. Philips, "Emulsion compositions containing quaternary ammonium compounds," US patent 7973081, Novagali Pharma, Evry, France, 2007.
- [25] S. Bague, B. Philips, J. S. Garrigue, L. Rabinovich, and G. Lambert, "Oil-in-water type emulsion with low concentration of cationic agent and positive zeta potential," EP1655021, Novagali Pharma, Evry, France, 2008.
- [26] S. Benita, "Prevention of topical and ocular oxidative stress by positively charged submicron emulsion," *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 53, no. 4, pp. 193-206, 1999.
- [27] P. Calvo, J. L. Vila-Jato, and M. J. Alonso, "Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 153, no. 1, pp. 41-50, 1997.
- [28] N. J. Van Abbe, "Eye irritation: studies relating to responses in man and laboratory animals," *Journal of the Society of Cosmetic Chemists of Japan*, vol. 24, no. 11, pp. 685-692, 1973.
- [29] A. Manosroi, K. Podjanasoonthon, and J. Manosroi, "Development of novel topical tranexamic acid liposome formulations," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 235, no. 1-2, pp. 61-70, 2002.
- [30] L. Rabinovich-Guilatt, P. Couvreur, G. Lambert, D. Goldstein, S. Benita, and C. Dubernet, "Extensive surface studies help to analyse zeta potential data: the case of cationic emulsions," *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 131, no. 1, pp. 1-13, 2004.
- [31] O. Boussif, F. LezoualC'H, M. A. Zanta et al., "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no. 16, pp. 7297-7301, 1995.
- [32] W.-T. Kuo, H.-Y. Huang, and Y.-Y. Huang, "Polymeric micelles comprising stearic acid-grafted polyethyleneimine as nonviral gene carriers," *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol.10, no. 9, pp. 5540-5547, 2010.
- [33] J. Wang, S. S. Feng, S. Wang, and Z. Y. Chen, "Evaluation of cationic nanoparticles of biodegradable copolymers as siRNA delivery system for hepatitis B treatment," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 400, no. 1-2, pp. 194-200, 2010.
- [34] S. Zhang, G. Wang, X. Lin et al., "Polyethylenimine-coated albumin nanoparticles for BMP-2 delivery," *Biotechnology Progress*, vol. 24, no. 4, pp. 945-956, 2008.
- [35] A. Masotti, F. Moretti, F. Mancini et al., "Physicochemical and biological study of selected hydrophobic polyethyleniminebased polycationic liposomes and their complexes with DNA," *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 15, no. 3, pp. 1504-1515, 2007.
- [36] S. V. Vinogradov, T. K. Bronich, and A. V. Kabanov, "Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 54, no. 1, pp. 135-147, 2002.
- [37] A. C. Hunter, "Molecular hurdles in polyfectin design and mechanistic background to polycation induced cytotoxicity," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 58, no. 14, pp. 1523-1531, 2006.

- [38] M. K. Yeh, J. L. Chen, C. H. Chiang, and Z. Y. Chang, "The preparation of sustained release erythropoietin-microparticle," *Journal of Microencapsulation*, vol. 24, no. 1, pp. 82–93, 2007.
- [39] E. Moreau, M. Domurado, P. Chapon, M. Vert, and D. Domurado, "Biocompatibility of polycations: in vitro agglutination and lysis of red blood cells and in vivo toxicity," *Journal of Drug Targeting*, vol. 10, no. 2, pp. 161–173, 2002.
- [40] T. W. Kim, H. Chung, I. C. Kwon, H. C. Sung, and S. Y. Jeong, "Optimization of lipid composition in cationic emulsion as In Vitro and In Vivo transfection agents," *Pharmaceutical Research*, vol. 18, no. 1, pp. 54–60, 2001.
- [41] D. Doroud, A. Vatanara, F. Zahedifard et al., "Cationic solid lipid nanoparticles loaded by cysteine proteinase genes as a novel anti-leishmaniasis DNA vaccine delivery system: characterization and in vitro evaluations," *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 13, no. 3, pp. 320–335, 2010.
- [42] T. Hagigit, T. Nassar, F. Behar-Cohen, G. Lambert, and S. Benita, "The influence of cationic lipid type on in-vitro release kinetic profiles of antisense oligonucleotide from cationic nanoemulsions," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 70, no. 1, pp. 248–259, 2008.
- [43] T. Hagigit, M. Abdulrazik, F. Orucov et al., "Topical and intravitreal administration of cationic nanoemulsions to deliver antisense oligonucleotides directed towards VEGF KDR receptors to the eye," *Journal of Controlled Release*, vol. 145, no. 3, pp. 297–305, 2010.
- [44] M. Sznitowska, S. Janicki, E. A. Dabrowska, and M. Gajewska, "Physicochemical screening of antimicrobial agents as potential preservatives for submicron emulsions," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 15, no. 5, pp. 489–495, 2002.
- [45] S. Bague, B. Philips, L. Rabinovich-Guilatt, G. Lambert, and J. S. Garrigue, "Ophthalmic oil-in-water type emulsion with stable positive zeta potential," US patent 20070248645, EP1809237, Novagali Pharma, Evry, France, 2007.
- [46] B. Philips, S. Bague, L. Rabinovich-Guilatt, and G. Lambert, "Ophthalmic emulsions containing an immunosuppressive agent," EP 1809238, Novagali Pharma, Evry, France, 2008.
- [47] S. Bague, B. Philips, L. Rabinovich, and G. Lambert, "Ophthalmic emulsions containing prostaglandins," EP1827373, Novagali Pharma, Evry, France, 2007.
- [48] M. S. Norn, "Tear fluid pH in normals, contact lens wearers, and pathological cases," *Acta Ophthalmologica*, vol. 66, no. 5, pp. 485–489, 1988.
- [49] M. Yamada, M. Kawai, H. Mochizuki, Y. Hata, and Y. Mashima, "Fluorophotometric measurement of the buffering action of human tears in vivo," *Current Eye Research*, vol. 17, no. 10, pp. 1005–1009, 1998.
- [50] G. Hecht, "Ophthalmic preparations characteristics," in *The Science and Practice of Pharmacy*, Remington, Ed., pp. 821–835, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa, USA, 20<sup>th</sup> edition, 2000.
- [51] T. R. R. Kurup, L. S. C. Wan, and L. W. Chan, "Preservative requirements in emulsions," *Pharmaceutica Acta Helveticae*, vol. 67, no. 7, pp. 204–208, 1992.
- [52] J. S. Garrigue and G. Lambert, "Self-emulsifying oral lipid based formulations for improved delivery of lipophilic drugs," in *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*, S. Benita, Ed., pp. 429–480, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 2006.
- [53] F. Lallemand, O. Felt-Baeyens, K. Besseghir, F. Behar-Cohen, and R. Gurny, "Cyclosporine A delivery to the eye: a pharmaceutical challenge," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 56, no. 3, pp. 307–318, 2003.
- [54] S. H. Klang, J. Frucht-Pery, A. Hoffman, and S. Benita, "Physicochemical characterization and acute toxicity evaluation of a positively-charged submicron emulsion vehicle," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 46, no. 12, pp. 986–993, 1994.
- [55] H. Liang, F. Brignole-Baudouin, L. Rabinovich-Guilatt et al., "Reduction of quaternary ammonium-induced ocular surface toxicity by emulsions: an in vivo study in rabbits," in *Proceedings of the International Symposium on Ocular Pharmacology and Therapeutics*, Budapest, Hungary, 2008.
- [56] H. Liang, C. Baudouin, M. O. Faure, G. Lambert, and F. Brignole-Baudouin, "Comparison of the ocular tolerability of a latanoprost cationic emulsion versus conventional formulations of prostaglandins: an in vivo toxicity assay," *Molecular Vision*, vol. 15, pp. 1690–1699, 2009.
- [57] J. M. Tiffany, "Measurement of wettability of the corneal epithelium. II. Contact angle method," *Acta Ophthalmologica*, vol. 68, no. 2, pp. 182–187, 1990.
- [58] J. M. Aiache, S. El Meski, E. Beyssac, and G. Serpin, "The formulation of drug for ocular administration," *Journal of Biomaterials Applications*, vol. 11, no. 3, pp. 329–348, 1997.
- [59] A. A. Acheampong, M. Shackleton, D. D. S. Tang-Liu, S. Ding, M. E. Stern, and R. Decker, "Distribution of cyclosporin A in ocular tissues after topical administration to albino rabbits and beagle dogs," *Current Eye Research*, vol. 18, no. 2, pp. 91–103, 1999.
- [60] A. Acheampong, M. Shackleton, S. Lam, P. Rudewicz, and D. Tang-Liu, "Cyclosporine distribution into the conjunctiva, cornea, lacrimal gland, and systemic blood following topical dosing of cyclosporine to rabbit, dog, and human eyes," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 438, pp. 1001–1004, 1998.
- [61] P. Daull, F. Lallemand, B. Philips, G. Lambert, R. Buggage, and J. S. Garrigue, "Distribution of cyclosporine A in ocular tissues after topical administration of cyclosporine A-cationic emulsion to pigmented rabbits," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 186, p. 376, 2011.
- [62] R. L. Kaswan, "Intraocular penetration of topically applied cyclosporine," *Transplantation Proceedings*, vol. 20, no. 2, supplement, pp. 650–655, 1988.
- [63] J. B. Serle, S. M. Podos, Y. Kitazawa, and R. F. Wang, "A comparative study of latanoprost (Xalatan) and isopropyl unoprostone (Rescula) in normal and glaucomatous monkey eyes," *Japanese Journal of Ophthalmology*, vol. 42, no. 2, pp. 95–100, 1998.
- [64] P. Aragona, R. Spinella, L. Rania et al., "Assessment of the efficacy of cationic emulsion in patients with moderate dry eye compared with Optive and Emustil eye drops," *Acta Ophthalmologica*, vol. 89, no. 246, 2011.
- [65] M. Lemp, C. Baudouin, M. Amrane, D. Ismail, J. S. Garrigue, and R. Buggage, "Poor correlation between dry eye disease (DED) signs and symptoms in a phase III randomized clinical trial," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 52, abstract 3821, 2011.
- [66] R. Buggage, M. Amrane, D. Ismail, M. Lemp, A. Leonardi, and C. Baudouin, "The effect of Cyclokate (unpreserved 0.1% cyclosporine cationic emulsion) on corneal involvement in patients with moderate to severe dry eye disease participating in a phase III, multicenter, randomized, controlled, doublemasked, clinical trial," *European Journal of Ophthalmology*, RFCOR-115, SOE, Geneva, Switzerland, 2011.