



УКРАЇНА

(19) UA (11) 61899 (13) C2

(51) 7 C12P23/00, A61K9/20, A61P9/48,
A61P27/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЧИСТИЙ 3R-3'R СТЕРЕОІЗОМЕР ЗЕАКСАНТИНУ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ДЕГЕНЕРАЦІЇ ЖОВТОЇ ПЛЯМИ У ЛЮДИНИ

1

(21) 98052815
(22) 30 10 1996
(24) 15 12 2003
(86) PCT/US96/17563, 30 10 1996
(31) 08/551,153
(32) 31 10 1995
(33) US
(31) 08/551,166
(32) 31 10 1995
(33) US
(46) 15 12 2003, Бюл. № 12, 2003 р
(72) Гарнетт Кевін М., US, Гірхарт Денніс Л., US, Гуерра-Сантос Луїс Х., US
(73) АППЛАЙД ФУД БІОТЕХНОЛОДЖІ, ІНК., US
(56) US, А, 5 308 759, 03 05 1994
(57) 1 Застосування 3R-3'R-стереоізомеру зеаксантину як інгредієнта лікарського засобу для лікування дегенерації жовтої плями у людей
2 Застосування за п. 1 як інгредієнта лікарського засобу у вигляді дозованої форми, придатної для введення людям та такої, що містить зеаксантин у кількості, достатній для забезпечення сприятливого терапевтичного впливу на людину, яка страждає дегенерацією жовтої плями, а також містить фізіологічно прийнятний ексципієнт, розчинник або носій
3 Застосування за п. 2 як інгредієнта лікарського засобу у вигляді дозованої форми, що містить щонайменше приблизно 1 мг 3R-3'R-стереоізомеру зеаксантину
4 Застосування 3R-3'R-стереоізомеру зеаксантину як інгредієнта харчової добавки, придатної для перорального приймання людиною, для зниження ризику виникнення дегенерації жовтої плями
5 Застосування за п. 4 як інгредієнта харчової добавки для лікування пацієнтів, що страждають на хворобу Старгарта, хворобу Беста, хворобу Баттона, синдром Шегрена-Ларссона, дистрофію колбочок-паличок, овечий воскоподібний ліпофусциноз, якесь захворювання, зумовлене проблемами накопичування в лізосомах або підвищеною генетичною вразливістю до дегенерації жовтої плями
6 Застосування за п. 4 або 5 як інгредієнта харчової добавки у вигляді дозованої форми, яка містить щонайменше приблизно 0,1 мг 3R-3'R-стереоізомеру зеаксантину

2

7 Композиція, що містить 3R-3'R-стереоізомер зеаксантину в кількості, яка є терапевтично корисною для людей, причому цей 3R-3'R-стереоізомер зеаксантину складає щонайменше приблизно 90% від загальної кількості зеаксантину в цій композиції, а S-S- та S-R-стереоізомери складають менше приблизно 10% від загальної кількості зеаксантину в цій композиції
8 Композиція за п. 7 у вигляді дозованої форми, причому кожна дозована форма містить щонайменше приблизно 0,1 мг 3R-3'R-стереоізомеру зеаксантину
9 Композиція за п. 7 у вигляді дозованої форми, причому кожна дозована форма містить щонайменше приблизно 1 мг 3R-3'R-стереоізомеру зеаксантину
10 Композиція за п. 7, яка відрізняється тим, що носій являє собою харчовий продукт, що може прийматися всередину людьми
11 Композиція за будь-яким з пп. 7-10, яка відрізняється тим, що зеаксантин має захисну оболонку, призначену для уповільнення розкладу зеаксантину в шлунку
12 Композиція за будь-яким з пп. 7-10, яка відрізняється тим, що містить непатогенні мікробні клітини, які містять 3R-3'R-стереоізомер зеаксантину в концентрації щонайменше 2% (мас.), у вигляді фракції мікробної клітинної маси
13 Композиція, що містить 3R-3'R-стереоізомер зеаксантину в носії або розчиннику, призначеному для перорального приймання людиною, в кількості, яка є терапевтично ефективною для застосування при лікуванні або для попередження дегенерації жовтої плями у людей
14 Композиція за п. 13, яка відрізняється тим, що 3R-3'R-стереоізомер зеаксантину складає щонайменше приблизно 90% від загальної кількості зеаксантину в цій композиції, а S-S- та S-R-стереоізомери складають менше приблизно 10% від загальної кількості зеаксантину в цій композиції
15 Композиція за п. 13, яка відрізняється тим, що практично не містить ані S-S-, ані R-S-стереоізомерів зеаксантину
16 Композиція за будь-яким з пп. 13-15 у вигляді дозованої форми, причому кожна дозована форма містить щонайменше приблизно 0,1 мг 3R-3'R-

(13) C2

(11) 61899

(19) UA

стереоізомеру зеаксантину

17 Композиція за будь-яким з пп 13-15 у вигляді дозованої форми, причому кожна дозована форма містить щонайменше приблизно 1 мг 3R-3'R-стереоізомеру зеаксантину

18 Композиція за будь-яким з пп 13-15, яка відрізняється тим, що носій являє собою харчовий продукт, що може прийматися всередину людьми

19 Композиція за будь-яким з пп 13-18, яка відрізняється тим, що зеаксантин має захисну оболонку, призначену для уповільнення розкладу зеаксантину в шлунку

20 Композиція за будь-яким з пп 13-18, яка відрізняється тим, що містить непатогенні мікробні клітини, які містять 3R-3'R-стереоізомер зеаксантину в концентрації щонайменше 2% (мас), у вигляді фракції мікробної клітинної маси

21 Застосування 3R-3'R-стереоізомеру зеаксантину як інгредієнта харчової добавки, придатної для лікування людей, у вигляді дозованої форми, придатної для перорального введення людям та

такої, що містить 3R-3'R-стереоізомер зеаксантину в кількості, достатній для того, щоб зумовити відкладення на сітківці такої кількості додаткового зеаксантину при прийманні однієї дозованої форми на добу, що може бути виявленою, причому цей 3R-3'R-стереоізомер зеаксантину складає щонайменше приблизно 90% від загальної кількості зеаксантину в зазначеній харчовій добавці, а 3S-3'S- та 3S-3'R-стереоізомери складають менше приблизно 10% від загальної кількості зеаксантину в зазначеній харчовій добавці

22 Харчова добавка у вигляді дозованої форми, придатної для використання людиною, яка містить 3R-3'R-стереоізомер зеаксантину і фізіологічне прийнятний носій, причому одна дозована форма містить 3R-3'R-стереоізомер зеаксантину в кількості, достатній для того, щоб зумовити таке підвищення концентрації зеаксантину на сітківці при прийманні однієї дозованої форми на добу, що може бути виявленим

Даний винахід відноситься до біохімії, зокрема до певного ізомеру жовтого пігменту, який називається зеаксантином (скорочено ZX) При введенні людям як ліки або вітаміну цей пігмент може лікувати або відвертати захворювання, яке називається дегенерацією жовтої плями, що пошкоджує сітківку і може призводити до сліпоти

Сітківка являє собою тканину, яка виступає задню стінку очного яблука Вона має складну будову і складається з безлічі різноманітних шарів Вона описана і проілюстрована в багатьох медичних посібниках, таких, як Gittinger, 1988 та Vaughn і Asbury, 1992 (повний перелік посилань наведений нижче в кінці опису)

В центрі сітківки у людей знаходиться особлива округла ділянка, що має діаметр приблизно 1-1,5мм і називається жовтою плямою Жовта пляма має дві характерні особливості, що відрізняють її від іншої частини сітківки По-перше, жовта пляма містить відносно небагато паличок, більша частина її фоторецепторів має форму колбочок (в ямці, розташований в самому центрі жовтої плями, палички повністю відсутні) По-друге, жовта пляма має чітко виражений жовтий колір, якого надають йому два пігменти, котрі називаються лютеїном та зеаксантином Обидва цих пігменти відносяться до класу молекул, які називаються "каротиноїдами" Хімія цих каротиноїдних пігментів описана нижче, після стислого викладення особливостей дегенерації жовтої плями

Дегенерація жовтої плями

Поняття "дегенерація жовтої плями" відноситься до будь-якого стану, який включає прогресуюче пошкодження клітин сітківки або фоторецепторних колбочок в ділянці жовтої плями в центрі сітківки Воно описане та проілюстроване в багатьох публікаціях і посібниках, таких, як Taylor, 1993, Gittinger, 1988 та Vaughn і Asbury, 1992

Існує декілька типів дегенерації жовтої плями Тип, що зустрічається найбільш часто, називається "віковою дегенерацією жовтої плями", що звичайно скорочено називається в англійській літературі AMD (або в деяких публікаціях ARMD) AMD може викликати порушення зору в діапазоні від слабкої втрати зору до повної сліпоти

Існує дві форми AMD, які часто називаються "вологою" та "сухою" формами При вологій формі відбувається інтенсивне зростання капілярів та інших кровоносних судин в сітківці аж до того, що кровоносні судини порушують і руйнують відповідну будову шарів сітківки Хоча інколи ця форма AMD піддається лікуванню з використанням лазеру, що дозволяє закупорювати знов утворені кровоносні судини, таке лікування може лише уповільнити на деякий час зростання кровоносних судин і звичайно не може відвернути з часом майже повну втрату зору, волога AMD майже завжди призводить до повної або майже повної сліпоти Волога форма зустрічається тільки у приблизно 5-10 відсотків пацієнтів, що страждають від AMD

Інша форма AMD називається "сухою" формою AMD Оскільки вона зустрічається щонайменше в 90% всіх випадків захворювання, її часто називають просто AMD Хоча ця форма AMD звичайно не призводить до повної сліпоти, вона може призвести до серйозного порушення зору пацієнта і до того, що пацієнт виявляється нездатним читати або розпізнавати добре відомі предмети або обличчя людей, наприклад, обличчя друзів або родичів В цьому випадку хвороба часто призводить до функціональної сліпоти, роблячи людей неспроможними керувати автомобілем або впевнено здійснювати прогулянки в громадських місцях та неспроможними вести нормальний активний спосіб життя

Також відомо декілька захворювань, при яких

як симптом виявляється дегенерація жовтої плями, включаючи хворобу Старгарта, хворобу Беста, хворобу Баттона, синдром Шегрена-Ларссона, дистрофію копбочок-паличок і овечий воскоподібний ліпофусциноз. Посилання на статті, в яких описане кожне з цих захворювань, наведені у Dorey та ін., 1993. Крім того інші захворювання, які зумовлені проблемами накопичування в лізосомах (наприклад, хвороба Тея-Сакса), або прогресивна дегенерація нервових клітин (наприклад, хвороба Альцгеймера), також пов'язані з дегенерацією жовтої плями.

Багато з цих захворювань мають генетичні складові, що доводиться спадкоємністю, були виділені декілька генів, викликаючих ці захворювання, і за допомогою тестів, що ґрунтуються на генетичному скринінгу, можна встановити, чи має пацієнт дефектний ген. Кожна людина, котра має або напевно може мати такий ген, що встановлюється на основі генетичного тестування або родинного анамнезу, наражається на підвищений ризик дегенерації жовтої плями.

В результаті поступового погіршення зору AMD завдає сильні страждання. Це коштує мільярди доларів кожного року, що виражається як у вигляді втрати продуктивності, так і у важкому тягарі, що лягає на членів родини, страхові агентства, соціальні служби та інших, хто повинен забезпечувати або допомагати оплачувати медичний догляд й інші види допомоги людям, які страждають від сліпоти або серйозного порушення зору.

У світлі проблем, що викликаються AMD, вчені й лікарі протягом десятиліть шукали способи лікування або запобігання сліпоти та інших порушень зору, викликаних дегенерацією жовтої плями. Однак незважаючи на всі ці зусилля протягом більш ніж половини сторіччя, в нинішній час відсутні ефективні засоби лікування.

Діагноз друзів та ліпофусцин

Звичайно дегенерацію жовтої плями виявляють за допомогою спеціальних фотографій сітківки. При проведенні однієї з діагностичних процедур пацієнту ін'єкують флуоресцентні ліки, після цього протягом деякого проміжку часу лікам дають проникнути в кровоносну систему пацієнта і роблять збільшений фотографічний знімок сітківки, який називається ангіограмою. Після цього фотографічний знімок аналізують для визначення наявності та концентрації якогось одного або обох типів клітинного дєбриса.

Один тип клітинного дєбриса, який відомий і піддавався вивченню протягом декількох десятиріч, називається друзами. Він зустрічається у двох різних формах. Звичайно в очах будь-якої людини старше 40 років є невелика кількість твердих друзів (малих часток діаметром менше 63мкм). До тих пір, доки їхня кількість не перевищує нормальний рівень, наявність твердих друзів не свідчить про пошкодження сітківки.

На відміну від цього утворення значної кількості більших м'яких друзів (які також називаються вологими друзами) свідчить про те, що відбулося або відбувається істотне, пошкодження сітківки, оскільки більші утворення м'яких друзів можуть руйнувати і порушувати організацію шарів сітківки та перешкоджати отриманню клітинами сітківки

потрібної кількості харчових речовин з крові. Пацієнт, сітківка якого містить значну кількість м'яких друзів, звичайно відноситься до страждаючих від дегенерації жовтої плями.

Інший тип дєбриса сітківки, який звичайно присутній у пацієнтів, що страждають від дегенерації жовтої плями, називається ліпофусцином. Кореляція між ліпофусцином і AMD стала очевидно лише нещодавно (див., наприклад, Weiter та ін., і Dorey та ін., 1993).

Хімія каротиноїдів

"Каротиноїди" включають великий клас молекул, в природі було виявлено понад 600 каротиноїдів. Ці молекули володіють декількома характерними особливостями, якими є наступні:

1 Каротиноїди утворюються шляхом злиття молекул ізопрену, що містять 5 атомів вуглецю. Оскільки "будівельний блок" містить 5 атомів вуглецю, більшість каротиноїдів містить багато блоків, що складаються з 5 атомів вуглецю.

2 Каротиноїди мають багато ненасичених зв'язків. Це дозволяє їм поглинати високоенергетичні світлові хвилі в блакитній та близькій до ультрафіолетової частинах спектра.

3 Оскільки каротиноїди поглинають хвилі з довжиною хвилі, що відповідає блакитній та близькій до ультрафіолетової частинам спектра, не поглинаючи більш довгі хвилі в інших частинах спектра, звичайно каротиноїди мають жовтий, оранжевий, коричневий або червоний колір. Назва "каротиноїд" утворилася від слова "морква" (carrot), першими відомими каротиноїдами, що були виявлені як пігменти, є такі, які надають моркві оранжевий колір. Колір, який каротиноїди надають розчину, може залежати від різних чинників, в тому числі від концентрації та присутності інших хімічних сполук.

4 Каротиноїди мають "кон'юговані" подвійні зв'язки. Це означає, що подвійні зв'язки чергуються з простими зв'язками, тому кожний атом вуглецю в ланцюзі сполучений подвійним зв'язком з одним іншим атомом вуглецю, але жоден атом вуглецю не сполучений подвійним зв'язком з двома іншими атомами вуглецю. Таке розміщення показано на фіг. 1, де наведені будови β -каротину, ZX та лютеїну.

Різноманітні каротиноїди мають різні рівні кон'югації, а більш високо кон'юговані молекули в цілому забезпечують кращий захист від "фототоксичного" пошкодження високоенергетичним світловим випромінюванням. Наприклад, в трьох каротиноїдах, наведених на фіг. 1, вся частина прямого ланцюга кон'югована наперемінно за допомогою подвійних та простих зв'язків. В β -каротині і ZX кон'югація сягає перших зв'язків на обох кінцях кільця. На противагу цьому лютеїн має менший рівень кон'югації, оскільки подвійний зв'язок в одному з його кінцевих кілець не розміщений таким чином, щоб забезпечити повну кон'югацію. Єдина відмінність між ZX і лютеїном полягає в розташуванні подвійного зв'язку в одному (а не в обох) з кінцевих кілець.

Оскільки каротиноїди утворюються і піддаються селекції (шляхом еволюції) таким чином, щоб поглинати потенційно шкідливу енергію блакитного і близького до ультрафіолетового світла, в при-

родних умовах вони використовуються як захисні пігменти. Їх виявляють у великій кількості в рослинах, оскільки одна з основних функцій рослин полягає в максимально можливому поглинанні сонячного світла, мінімізуючи при цьому пошкодження клітин блакитним, ультрафіолетовим і близьким до ультрафіолетового випромінюванням. Пошкодження ультрафіолетовим випромінюванням рослин являє собою важливу проблему, і каротиноїди допомагають мінімізувати таке пошкодження.

Оскільки каротиноїди добре пристосовані для захисту від фототоксичного пошкодження, тварини також придбали певні здатності (в процесі еволюції) використовувати каротиноїди як світлозахисні пігменти. Тварини не можуть синтезувати каротиноїди в своїх організмах, тому вони повинні поглинати каротиноїди (або попередників каротиноїдів) з рослинних джерел. Одним з прикладів є β -каротин, ссавці мають одержувати його з рослин або з їжі. Потрапивши до організму ссавця, β -каротин перетворюється в інші молекулярні форми, у тому числі у вітамін А (ретинол), який утворюється в результаті розщеплення β -каротину на дві половини.

Каротиноїди поділяють на два основних класи каротини і ксантофіли. Каротини не містять атомів кисню і являють собою справжні вуглеводи, що складаються тільки з вуглецю і водню. На відміну від цього ксантофіли (такі, як ZX і лютеїн) містять також і кисень.

На фіг. 1 показана нумерація атомів вуглецю в лівому та правому кінцевих кільцях ZX. Атомам вуглецю в лівому кінцевому кільці прийнято присвоювати номери від 1 до 6, а в правому кінцевому кільці їм присвоюють номери "зі штрихом", наприклад, 3'-атом вуглецю (читається "три штрих"). Оскільки ZX повністю симетричний по відношенню до лівого і правого кінців, поняття "лівий" і "правий" є чисто умовними і служать для спрощення опису. Однак слід відзначити, що лютеїн не є симетричним: положення подвійного зв'язку в "лівому" кільці не таке ж, як положення подвійного зв'язку в "правому" кільці.

Оскільки ZX утворюється шляхом додання в структуру β -каротину двох гідроксильних груп до атомів вуглецю в положенні 3 на обох кінцях, то він має хімічну назву 3,3'-дигідрокси- β -каротин, деякі хіміки називають його каротиндіолом. Цій молекулі була дана назва "зеаксантин", тому що первісно вона була ідентифікована як пігмент, що надає кукурудзі її жовтий колір, а наукова назва кукурудзи *Zea mays*.

Як було відзначено вище, в природі було виявлено понад 600 каротиноїдів. Деякі з них мають важливе біохімічне і комерційне значення. Для даного винаходу особливо важливі ZX і лютеїн, оскільки вони присутні в сітківках ссавців та більшості інших тварин.

Лютеїн є комерційно важливим, оскільки його широко використовують як кормову добавку (у вигляді рослинних екстрактів, в основному на основі календули) для курчат, що надає їхній шкірі і яєчному жовтку більш жовте забарвлення, що приваблює продавців і споживачів.

ZX може справляти такий самий ефект, до того ж він є більш сильним в порівнянні з лютеїном,

однак джерела ZX занадто дорогі для застосування в кормах для домашньої птиці. Патенти США 5308759 і 5427783 (на ім'я Gierhart, передані Applied Food Biotechnology, Inc., тієї ж самої компанії, яка є правонаступником і заявником по даній заявці) були спрямовані на вирішення проблеми, яка полягає в тому, що ZX є надто дорогим для застосування в кормах для тварин. Ці патенти пов'язані із застосуванням бактерій для виробництва ZX в промислових кількостях, щоб його можна було додавати в корм для домашньої птиці та риби.

Окрім рослин, деякі каротиноїди синтезуються певними бактеріями. Еволюція цих бактерій відбувалася в місцях, підпадаючих під пряме сонячне світло, і їхні каротиноїди виконують ту ж саму світлозахисну функцію, що і в рослинах. Публікації, в яких описані каротиноїди з бактерій, включають McDermott та ін., 1972, патент США 5429939 (Misawa та ін., 1995) та інші статті, вказані в цих посиланнях.

В патенті США 5429939 (Misawa та ін., 1995) перелічені послідовності ДНК великої кількості генів, які кодують ферменти, що беруть участь в біосинтезі різноманітних каротиноїдів, включаючи ZX. Також описана роль кожного з основних генів (включаючи *crtE*, *crtB*, *crtI*, *crtY* і *crtZ*) у створенні ZX. Клітини, що містять плазмід, які несуть ці гени, були депоновані в Американській колекції типів культур (такі, як *Erwinia uredovora*, ATCC 19321, і *Erwinia herbicola*, ATCC 39368) та в Fermentation Research Institute в Японії (наприклад, *E. coli* PERM BP 2377).

Стереохімія та ізомери зеаксантину

Важливими поняттями в хімії каротиноїдів є "стереохімія" та "стереоізомери". Вони пояснюються в будь-якому підручнику з органічної хімії.

Якщо органічна молекула має атом вуглецю, до якого приєднані чотири різноманітних типи атомів або молекулярних груп, то такий атом вуглецю називається "хіральним" атомом вуглецю.

Якщо в органічній молекулі присутній хіральний атом вуглецю, то чотири різних групи, що приєднані до такого хірального атома вуглецю, можуть бути розміщені за будь-який з двох схем. Ці дві різні схеми називаються стереоізомерами. Один з цих стереоізомерів буде повертати площину поляризації світла "за годинниковою стрілкою", а інший стереоізомер буде повертати площину поляризації світла "проти годинникової стрілки". Ізомер, що викликає обертання за годинниковою стрілкою, називається R-стереоізомером (він також називається D-стереоізомером). Ізомер, що викликає обертання проти годинникової стрілки, називається S-стереоізомером (він також називається L-стереоізомером).

Оскільки обидва атоми вуглецю в положенні 3 і 3' в ZX є хіральними, існує чотири можливих стереоізомери. В 3R-3'R-ізомері обидва атоми вуглецю в положенні 3 і 3' мають R-конфігурацію. В 3S-3'S-ізомері обидва атоми вуглецю в положенні 3 і 3' мають L-конфігурацію. Для зручності ці два стереоізомери в даному описі називаються R-R-ізомером і S-S-ізомером.

Третій і четвертий ізомери являють собою "змішані" або "мезо"- (один R- і один S-)-ізомери 3R-3'S-ізомер і 3S-3'R-ізомер. Оскільки ZX повніс-

тію симетричний відносно своєї середини, ці два ізомери ідентичні в усіх відношеннях, якщо 3R-3'S-ізомер намалювати на аркуші паперу, то, перевертаючи аркуш паперу, його можна перетворити в 3S-3'R-ізомер. Фактично простий "мезо"-ізомер складається як з S-R-, так і з R-S-ізомерів.

Якщо для отримання ZX використовуються стандартні методи хімічного синтезу, то вміст кожного з чотирьох можливих ізомерів буде складати приблизно 25% від загальної кількості. Однак, оскільки S-R- і R-S-ізомери в дійсності ідентичні, їхній "мезо"-ізомер буде становити 50% від загальної кількості, тоді як на частку кожного з R-R- і S-S-ізомерів буде припадати приблизно по 25%. Суміш всіх трьох стереоізомерів називають "рацемічною" сумішшю.

Однак специфічність каротиноїдів по відношенню до клітини і ферменту в тканині сітківки є настільки точною, що різноманітні ізомери або стереоізомери не є взаємозамінними. Лютеїн і ZX сприймаються клітинами сітківки як абсолютно різні і різноманітні молекули, незважаючи на те, що за звичайною хімічною термінологією вони можуть розглядатися як ізомери один одного (оскільки вони мають однакову кількість атомів вуглецю, водню і кисню).

Внаслідок наявності біологічних чинників єдиними ізомерами, що розглядаються в даному описі, є стереоізомери. Будь-яке посилання в даному описі на "ізомер" зеаксантину відноситься до конкретного стереоізомеру ZX і не включає лютеїн. Лютеїн та ZX розглядаються як абсолютно різні каротиноїди.

Стереоізомерні відмінності каротиноїдів, що можуть показатися малими, ледь помітними і незначними, фактично виявляються виключно важливими, якщо це стосується тканини сітківки. Певно, єдиним стереоізомером ZX, що відповідним чином сприймається та використовується клітинами сітківки людини, є R-R-ізомер (3R-3'R-стереоізомер).

В літературі є повідомлення, що в тканині сітківки були виявлені слідові кількості мезо-ізомеру (R-S-ізомеру) ZX. Однак ці слідові кількості, напевне, зумовлені певними молекулярними перетвореннями, що можуть відбуватися спонтанно в деяких умовах, призводячи до утворення мезо-зеаксантину з попередників лютеїну (Bone та ін., 1993 і 1994).

В лабораторних умовах стереоізомери ZX можуть бути відділені один від одного з використанням таких методів, як хіральна хроматографія на колонках (Bone та ін., 1993) або аналіз кругового дихроїзму (Britton, 1994).

Зеаксантин і лютеїн в жовтій плямі

До 1970 року роль каротиноїдів в захисті рослин від фототоксичного пошкодження була добре відома. Було також відомо, що каротиноїди присутні в тканині тварин і що всі каротиноїди, присутні в організмі тварин, мають походження з рослин, оскільки тварини не можуть синтезувати каротиноїди. На основі цієї інформації в різних публікаціях відзначалася схожість між каротиноїдами в організмі тварин та в рослинах і був зроблений висновок про те, що каротиноїди захищають тварин від фототоксичного пошкодження.

Після того, як була встановлена фотозахисна роль каротиноїдів у тварин, почалося вивчення хімії та ролі каротиноїдів в сітківці. В одній серії експериментів проводили тести, в яких тваринам давали корм, який не містив жодних каротиноїдів і був приготований із зерен або насіння, що не містили жодних каротиноїдів (таких, як насіння проса). Результати показали, що в сітківці лабораторних тварин, позбавлених каротиноїдів, не утворювалися ділянки жовтої плями, а ці сітківки мали аномально високі рівні м'яких друзів, що свідчило про пошкодження сітківки (Malinow та ін., 1980, Kirschfeld, 1982, Ham та ін., 1984 і Snodderly та ін., 1984). В світлі цих відкриттів було висловлено припущення, що каротиноїди, напевне, мають істотне значення для здорової сітківки. Було одержано підтвердження на молекулярному рівні старої істини, що морква та зелені овочі корисні для очей. Однак до даного часу не відомо, повинні жовті пігменти в сітківці бути одержані з їжею в остаточній формі чи вони можуть бути синтезовані в організмі тварин з інших попередників, таких, як β -каротин або лікопен.

Лютеїн був ідентифікований в 1949р. як один із жовтих пігментів жовтої плями (Wald, 1949). ZX ідентифікували як другий пігмент жовтої плями лише через багато років (Bone та ін., 1985). Публікації, в яких узагальнені відомі знання про пігмент жовтої плями до середини або до кінця 80-х років, включають Handelman і Dratz, 1986, Werner та ін., 1987, Pease та ін., 1987, Haegerstrom-Portnoy, 1988, і Handelman та ін., 1988. Крім того, згідно з цими публікаціями було встановлено, що ZX (який є повністю кон'югованим, а отже, забезпечує дещо більш кращий захист від пошкодження, викликаного світловим випромінюванням, ніж лютеїн) є домінуючим пігментом в ямці, малій ділянці в самому центрі жовтої плями. Кількість ZX поступово зменшується, а кількість лютеїну збільшується у міру віддалення в радіальному напрямі від ямки до зовнішніх країв жовтої плями, тому на зовнішній периферії жовтої плями лютеїн є домінуючим жовтим пігментом. До більш сучасних публікацій, що присвячені різноманітним аспектам старіння і пошкодження сітківки і в яких спеціально обговорюється роль каротиноїдів як захисних агентів в сітківці, відносяться роботи Sperduto та ін., 1990, Gerster, 1991, Schalch, 1992 і Seddon та ін., 1994.

В цілому вже понад 10 років відомо, що лютеїн і ZX являють собою два пігменти, присутні в жовтій плямі, і понад десять років в науковому середовищі обговорюється питання про те, що ці пігменти можуть сприяти захисту жовтої плями від фототоксичного пошкодження.

Однак незважаючи на те, що ці відкриття були зроблені, а гіпотези висловлені понад 10 років тому, до цього часу не розроблено жодного типу ліків, харчової добавки або добавки до харчового раціону чи іншої форми лікування, які виявилися б ефективними для дійового попередження або уповільнення (не кажучи вже про реверсії) поступового розвитку дегенерації жовтої плями.

Попередня фраза потребує деякого уточнення, оскільки відомо, що і β -каротин, і вітамін А, і вітамін Е можуть чинити деякий сприятливий вплив, сприяючи захисту тканини сітківки (див.,

наприклад, патент США 5310764, Baranowitz та ін., 1994 і дві статті Eye Disease Case Control Study Group, зазначені нижче). В цих патентах і статтях говориться, відповідно припускається, що і β -каротин, і вітамін А, і вітамін Е можуть справляти помітну дію щодо попередження або зменшення пошкодження, пов'язаного з дегенерацією жовтої плями.

Такі ствердження можуть бути правильними, зважаючи на загальну антиоксидантну роль каротиноїдів, вітаміну А і вітаміну Е. Однак, на жаль, також вірним є й те, що корисний вплив, що чиниться β -каротином, вітаміном А і вітаміном Е на співку, є дуже обмеженим і не досягає рівня, відповідного ефективному лікуванню. В усіх практичних ситуаціях дегенерацію жовтої плями не можна відвернути, зупинити і повернути. Будь-які антиоксиданти широкого спектра (такі, як β -каротин, вітамін А і вітамін Е) є лише паліативними засобами. Оскільки в розпорядженні не малося дійсно ефективних ліків, застосовували ці вітаміни (з дуже обмеженим і незадовільним успіхом), щоб спробувати уповільнити неминуче пошкодження, що викликається дегенерацією жовтої плями.

Відповідно до відомого рівня техніки слід також відзначити, що продається багато каротиноїдних препаратів з маркуванням, вказуючим, що вони корисні для очей і зору. Таке маркування на каротиноїдних сумішах може бути допустимим, оскільки (як вказано вище) відомо, що β -каротин і вітамін А в цілому корисні як загальні антиоксиданти. Однак жодна з наявних в продажу каротиноїдних сумішей не містить ZX в кількостях, більших, ніж виключно малі "слідові" кількості. Величезна більшість каротиноїдів в каротиноїдних сумішах, наявних в продажу, є каротиноїдами не зеаксантинового типу (в основному β -каротин і вітамін А).

Пильної уваги також заслуговують позиція і дослідні цілі деяких важливих урядових агентств і дослідних консорціумів. В Сполучених Штатах Америки Національними інститутами здоров'я (National Institutes of Health), (діючими через Національний інститут ока (National Eye Institute (NEI)) та Національну консультативну раду з ока (National Advisory Eye Council)), нещодавно були опубліковані два звіти під назвою "Vision Research: A National Plan 1994-1998", NIH Publication №93-3186 (1994) (див зокрема стор 55-65) та "Age related eye disease study", NIH Publication 93-2910 (1993). В обох публікаціях і описаних в них дослідженнях увагу сконцентровано на β -каротині (а не на ZX) як сполуці, якій віддається найбільша перевага при лікуванні AMD. За відомостями, які має заявник, після обговорення питання з офіційними особами з NEI, ані NEI, ані будь-яка інша організація, пов'язана з Національними інститутами здоров'я, не бажає фінансувати або не фінансувала в недавньому часі жодних досліджень зеаксантину як потенційних ліків для AMD. Замість цього NIH та інші державні організації асигнують мільйони доларів на проведення досліджень β -каротину як найбільш багатообіцяючого потенційного агента для лікування або попередження AMD.

Інші визнані дослідники, котрі заслуговують особливої уваги, входять в організацію "Eye Disease Case Control Study Group". Ця група не-

щодавно опублікувала дві статті, названі "Antioxidant status and neovascular age-related macular degeneration", Arch. Ophthalmol., 11 104-109 (1993) та "Risk factors for neovascular age-related macular degeneration", Arch. Ophthalmol., 10 1701-1708 (1992). Як і в офіційних звітах NIH, в жодній з цих статей не обговорюється і не пропонується використання зеаксантину як ліків для лікування AMD, і цей консорціум також припинив або відмовився фінансувати будь-які дослідження ZX як потенційного агента для лікування або попередження AMD.

Слід також відзначити, що каротиноїди являють великий інтерес для лікування або попередження раку (починаючи з робіт Peto та ін., 1981) і для попередження утворення холестерину та зменшення відкладень бляшок в артеріях (Jialal та ін., 1991). Є величезна кількість наукової літератури, де досліджуються різноманітні види активності каротиноїдів, і існує великий інтерес в розробці засобів хімічного синтезу каротиноїдів, включаючи лютеїн і ZX. Однак незважаючи на всі дослідження в галузі каротиноїдів і зусилля по розробці синтезу, зроблені в останні десятиріччя, досі не було опубліковано жодного ефективного засобу лікування або попередження дегенерації жовтої плями. Зважаючи на величезні видатки і страждання, що завдаються людям і суспільству захворюванням, пов'язаним з дегенерацією жовтої плями, його слід визнати величезною проблемою, що потребує свого вирішення.

Отже, даний винахід дозволяє зробити істотний крок вперед у створенні як (1) безпечних та ефективних ліків для лікування пацієнтів, у яких було діагностовано дегенерацію жовтої плями, так і (2) харчової добавки типу пілюлей з вітамінами, які можуть вживатися кожною людиною, бажаною знизити ризик дегенерації жовтої плями по досягненні або при перевищенні середнього віку.

Синтез лютеїну і зеаксантину прототипи.

В різноманітних роботах, що відносяться до рівня техніки, описані способи одержання ZX. Ці роботи можуть бути згруповані у дві категорії: ферментативні способи, в яких мікроби відіграють ключову роль в процесі виробництва, і неферментативні способи синтезу, в яких використовуються чисто хімічні реакції. В більшості таких робіт припускається, що ZX повинен використовуватися з відомою метою, наприклад, у вигляді кормових добавок для домашньої птиці або риби з метою надати більш темного кольору м'ясу і зробити його більш привабливим. Очевидно, що жоден з цих способів не призвів до виробництва або продажу ZX в промислових кількостях.

Ще в жовтні 1995р. єдиний спосіб придбання ZX або в очищеній формі, або в напівконцентрованій формі, де ZX становить більше приблизно 5мас. %, полягав в придбанні міліграмових кількостей ZX у спеціалізованих хімічних компаній, таких, як Atomergic Chemicals Corporation (Farmingdale, NY) або Spectrum Chemical Manufacturing Company (Gardena, CA). В 1995р. ціни у цих спеціалізованих виробників на очищений ZX у вигляді синтезованих рацемічних сумішей, що містять небажані S-S- та S-R-ізомери, складали від 90\$ до 125\$ за міліграм. Це відповідає приблизно 100000\$ (в дола-

рах США) за грам ZX у вигляді рацемічної суміші. Очевидно, що такі препарати потенційно не мають реальної можливості для їхнього використання як ліків або харчових добавок як внаслідок їхньої вартості, так і внаслідок того, що вони містять більш кількості небажаних і можливо небезпечних S-S - та мезо-ізомерів. До даного винаходу очищений або напівочищений R-R-зеаксантин просто не був доступний в будь-якому його вигляді.

Серед відомих публікацій, в яких описано одержання ZX з використанням мікробної ферментації, слід назвати наступні:

(1) Courington і Goodwin, 1955, найбільш ранню відому роботу, в якій описано одержання ZX за допомогою бактерій з роду *Flavobacter*.

(2) Патент США 3891504 (Schocher і Wiss, 1975, переданий фірмі Hoffman LaRoche), в якому також описано одержання ZX за допомогою клітин *Flavobacter*. Ці клітини, що містять ZX, додавали в корм курчатам, викликаючи потрібне забарвлення.

(3) Патент США 3841967 (Dasek та ін., 1974) та патент США 3951743 (Shepherd та ін., 1976). Обидва патенти передані фірмі Nestle. В них описані способи та харчові речовини, що можуть бути використані для збільшення кількості ZX, продукovanого бактеріями.

(4) Два більш сучасних патенти США (США 5308759 та 5427783, обидва на ім'я Gierhart), передані Applied Food Biotechnology, Inc., тому ж правонаступнику і заявнику, що і у випадку даної заявки. В цих патентах описаний штам бактерій (*Flavobacterium multivorum*), виділений з русла ріки Міссурі. Було виявлено, що ці бактерії продукують ZX, не продукуючи при цьому значних кількостей інших каротиноїдів. Це було важливим при створенні корму для домашньої птиці і риби, який дозволяв би одержувати м'ясо і яєчний жовток більш темного кольору, оскільки каротиноїди конкурують один з одним при надходженні в кровотік після потрапляння до організму тварин. Тому відсутність інших каротиноїдів, продукованих штамом *F. multivorum*, що було встановлено Gierhart, може зробити ZX більш придатним як пігмент для тканин тварин і, отже, збільшити його потенційні можливості та продуктивність.

В патенті США 5308759 описані способи одержання ZX для корму домашньої птиці і риби з використанням *F. multivorum* фірми AFB. В патенті США 5427783 описані кормові суміші. В обох патентах застосування ZX обмежене його використанням в кормі для домашньої птиці або риби і в жодному з них не зроблено ніяких пропозицій з використання ZX для лікування людей.

В жодному з патентів, автором яких є Gierhart, не висловлено ніяких міркувань з приводу специфічних стереоізомерів ZX з двох причин: (1) характеристики стереоізомерів ZX, продукованих *F. multivorum* фірми AFB, не були відомі в 1989р., коли були подані заявки, та (2) оскільки в патентах розглядається виключно продукovanі ZX для застосування в кормі для домашньої птиці або риби, не було видимої причини для розгляду різноманітних стереоізомерів.

Штам дикого типу *F. multivorum* фірми AFB був депонований в ATCC і йому був присвоєний реєстраційний номер ATCC 55238. Оскільки ці бакте-

рії продукують певний тип ліпідів, що називаються сфінголіпідами, ATCC перекласифікувала ці бактерії як *Sphingobacterium multivorum* і внесла ці клітини в свій каталог під цією назвою. Назва *Sphingo-bacterium* яка фігурує в каталозі ATCC, досі не з'явилася в жодній з цитованих робіт, що відносяться до офіційних посібників з таксономії мікроорганізмів *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, доповнене та переглянute в *International Journal of Systematic Bacteriology*.

Про роботи по одержанню ZX шляхом стандартного-хімічного синтезу (без використання мікроорганізмів) повідомлялося протягом останніх 20 років, в тому числі в патентах США 4153615 (Sausy, 1979), 4952716 (Lukas та ін., 1990) і 5227507 (Lukas та ін., 1993). Однак ці способи мають серйозні недоліки.

Звичайно вони потребують численних стадій реакції і на кожній стадії досягається вихід менше 100%, тому залишковий вихід ZX в кінці багатостадійного процесу виявляється відносно малим. Крім того, хімічний синтез звичайно дає небажані S-S - і S-R-стереоізомери ZX, а також різноманітні продукти перетворення або розкладу, такі, як окиснений зеаксантин і молекули зеаксантину, що втратили один або більше подвійних зв'язків в прямому ланцюзі і/або в кінцевих кільцях.

В цілому до створення даного винаходу не було відоме джерело очищеного R-R-зеаксантину, придатного для споживання людиною або як ліків, або як харчової добавки.

Отже, одним з об'єктів даного винаходу є відкриття того факту, що штам *F. multivorum* фірми AFB (реєстраційний номер ATCC 55238) і його мутовані нащадки продукують R-R-стереоізомер ZX у вигляді єдиного ізомеру, що виявляється, без кількостей, що виявляються, небажаних S-S- або S-R-стереоізомерів.

Іншим об'єктом даного винаходу є спосіб приготування лікарського засобу для лікування пацієнтів, у яких було діагностовано дегенерацію жовтої плями, зокрема вікова, заснований на використанні клітин, що походять з штаму *F. multivorum* фірми AFB (реєстраційний номер ATCC 55238).

Ще одним об'єктом даного винаходу є спосіб виготовлення харчової добавки для людей в формах типу пілюлей з вітамінами або у вигляді добавки до продуктів харчування, таких, як маргарин, для зменшення ризику виникнення дегенерації жовтої плями в більш пізньому віці, заснований на використанні клітин, що походять з штаму *F. multivorum* фірми AFB (реєстраційний номер ATCC 55238).

Далі, об'єктом даного винаходу є препарати на основі зеаксантину, що містять R-R-стереоізомер як єдиний або виразно домінуючий ізомер, у вигляді композицій, призначених для орального прийому людиною або як ліків для лікування захворювань чи дегенерації сітківки, або як харчової добавки для зменшення ризику втрати зору в пізньому віці.

Ці та інші об'єкти більш докладно пояснюються в наведених нижче розділах "Стислий виклад" та "Опис винаходу".

Стислий виклад суті винаходу

Згідно з даним винаходом пропонується спосіб

одержання зеаксантину, що містить 3R-3'R-стереоізомер зеаксантину (також називається R-R-ізомером або R-R-зеаксантином) як такий, що єдиним виявляється, або виразно домінуючий ізомер, призначений для прийому всередину людиною як ліки або харчова добавка ZX, жовтуватий пігмент, що міститься в клітинах жовтої плями в сітківці людини, поглинає блакитне і близьке до ультрафіолетового світлове випромінювання, захищаючи завдяки цьому сітківку від фототоксичного пошкодження. Препарати ZX, що містять тільки потрібний R-R-ізомер, продукуються штамом клітин *Flavobacterium multivorum* (реєстраційний номер ATCC 55238). Ці бактерії не продукують ніяких помітних кількостей небажаних S-S - або S-R-стереоізомерів і не синтезують значних кількостей інших каротиноїдів, таких, як β -каротин або лютеїн, які можуть конкурувати з ZX щодо аліментарного поглинання після орального введення. Після синтезу з використанням цих бактерій ZX може бути очищений такими методами, як екстракція розчинником, і його можуть вживати орально або як терапевтичний лікарський засіб пацієнти, котрі страждають від дегенерації жовтої плями, або як харчову добавку людиною, котра хоче зменшити ризик вікової дегенерації жовтої плями, яка дуже поширена серед людей у віці від приблизно 50 або 60 років. Також пропонуються призначені для прийому всередину композиції, такі, як (1) водонепроникні капсули, що містять R-R-зеаксантин, змішаний з носієм, таким, як рослинна олія, (2) різноманітні харчові продукти (такі, як маргарин, молочні продукти, сироп, тісто для домашнього випікання і м'ясні напівфабрикати, які не піддають сильній тепловій обробці), що містять R-R-зеаксантин як добавку, та (3) гранульовані композиції, які можна додавати в супи, салати, напої або в іншу їжу.

На фіг 1 подані будови молекул β -каротину, лютеїну і зеаксантину, показані будови всіх трьох каротиноїдів і система нумерації для кінцевих кілець. Ці будови відомі з аналогів.

На фіг 2 подана технологічна схема, що описує стадії ферментації і очищення ZX, продукovanого мікроорганізмами, що синтезують чистий 3R-3'R-стереоізомер зеаксантину.

Опис більш прийнятних варіантів здійснення винаходу.

В даній заявці описаний спосіб виготовлення лікарського засобу або харчової композиції, призначеної для введення людям для попередження або зменшення дегенерації жовтої плями, хворобливого стану, яка порушує зір і може призвести до сліпоты. Препарати на основі зеаксантину, призначені для прийому всередину людьми, повинні містити 3R-3'R-стереоізомер ZX (що також називається для зручності R-R-ізомером або R-R-зеаксантином) як "виразно домінуючий" ізомер. В контексті даного опису "виразно домінуючий ізомер" відноситься до препарату, що містить щонайменше 90% або більше R-R-ізомеру, а небажані S-S- або S-R-ізомери складають менше 10% всієї кількості зеаксантину в препараті. Більш прийнятно будь-які препарати, призначені для використання людиною, повинні містити R-R-ізомер ZX як єдиний ізомер, що виявляється, та не містити помітних кількостей небажаних S-S - або S-R-

ізомерів. Такі препарати подані в даному описі.

Нині з використанням аналізу на основі хіральної хроматографії на колонках (як описано у Bone та ін., 1993) було підтверджено, що штам бактерії *F. multivorum* (реєстраційний номер ATCC 55238), виділений фірмою Applied Food Biotechnology (AFB), продукує R-R-ізомер у вигляді єдиного ізомеру ZX, що виявляється, при ферментації, як описано в прикладах. Відповідно до прикладу 4 аналіз, зроблений професором Landrum, показав, що в препаратах ZX, одержаних шляхом ферментації з використанням цих клітин із зазначеного штаму *F. multivorum*, не виявлено помітних кількостей ані S-S-ізомеру, ані R-S-мезоізомеру.

Відмінності між R-R -, R-S - або S-S-ізомерами зеаксантину можуть бути дуже важливими, якщо препарати на основі ZX вводять людям як лікарський засіб або харчову добавку, оскільки єдиний ізомер ZX, який присутній в природних умовах в сітківці людини, є R-R-ізомер. Напевне, введення всередину значних кількостей R-S - і S-S-ізомерів буде дуже небажаним і шкідливим з медичної точки зору, оскільки (1) R-S - і S-S-ізомери не зустрічаються в природних умовах в сітківці ока людини за винятком можливості їхньої присутності в надзвичайно незначних слідових кількостях як побічних продуктів, які утворюються при розкладі лютеїну всередині клітин сітківки, та (2) R-S - і S-S-ізомери можуть конкурентно заміщати потрібний R-R-ізомер в тканині сітківки, певно, призводячи до серйозного пошкодження клітин та медичних ускладнень.

Сtereoізомерно чисті препарати ZX, одержані шляхом ферментації з використанням штаму *F. multivorum* відповідно до даного опису, є виключно цінними, оскільки розподіл стереоізомерів ZX, одержаного шляхом хімічного синтезу, є дуже складним і дорогим. Хоча розподіл стереоізомерів може бути здійснений в невеликих кількостях на лабораторних установках, він виявляється надмірно дорогим при виробництві в промислових обсягах.

Застосування як ліки, що призначаються пацієнтам, страждаючим AMD.

Відповідно до першого об'єкта даного винаходу препарат на основі R-R-зеаксантину, наведений в даному описі, може бути виготовлений і застосовуватися як ліки, тобто як лікарський засіб, який може бути призначений лікуючими лікарями для лікування пацієнтів, у яких було діагностовано дегенерацію жовтої плями або захворювання, що може викликати дегенерацію жовтої плями як симптом або проявлення, наприклад, такі захворювання, як хвороба Старгарта, хвороба Беста, хвороба Баттона, синдром Шегрена-Ларссона, дистрофія колбочок-паличок, овечий воскоподібний піофусциноз, або захворювання, пов'язане з накопичуванням в лізосомах, наприклад, хвороба Тея-Сакса.

При використанні для такого лікування препарат на основі ZX повинен включати достатню кількість R-R-ізомеру ZX для досягнення рівня терапевтичного агента в носії або в формі (такій, як капсула), придатній для введення людям, як описано нижче. В більш прийнятному варіанті ZX, призначений для медичного лікування, упаковують у ви-

гляді стандартної дозованої форми, такої, як капсули або таблетки, при цьому кожна доза більш прийнятно повинна містити принаймні приблизно 1 міліграм (мг) R-R-зеаксантину і може при необхідності для досягнення кращої терапевтичної ефективності містити зеаксантин в діапазоні від приблизно 3мг до приблизно 10мг

Відповідно до другого об'єкта даного винаходу препарат на основі R-R-зеаксантину, наведений в даному описі, може бути виготовлений і застосовуватися як профілактичний лікарський засіб для пацієнтів, у яких було діагностовано підвищену чутливість до дегенерації жовтої плями внаслідок як родинного анамнезу, так і генетичної діагностики будь-якого з перерахованих вище захворювань. Стандартні дози, приготовані для введення таким пацієнтам, для яких характерний підвищений ризик захворювання AMD, але які ще не страждають гострою формою AMD, можуть містити менші кількості, такі, як від приблизно 0,1мг до приблизно 2мг на дозу

З використанням даного опису будь-які з цих доз можуть мати доступну комерційну ціну. Капсули, що містять 25 міліграмів (або будь-яку меншу кількість) в олійному рідкому носії, можуть бути виготовлені економічним способом з використанням мікробної ферментації в поєднанні зі стадією екстракції розчинником. Порошкоподібні композиції, що містять навіть більш високі кількості (наприклад, 100мг або більше на дозу) також можуть бути виготовлені при використанні більш екстенсивного очищення, наприклад, за допомогою методів, описаних в прикладі 4

Застосування як вітамінну або харчову добавку

Відповідно до третього об'єкта даного винаходу ZX може бути виготовлений і упакований у вигляді вітамінної чи харчової добавки або добавки до харчових продуктів для прийому людьми, які в даний час не страждають від дегенерації жовтої плями, але хочуть зменшити ризик виникнення у них дегенерації жовтої плями в більш старшому віці. При прийомі всередину з цією метою відповідні дози повинні істотно перевищувати слідові кількості, що містяться в порошках, які нині широко продаються, але вони повинні бути нижче, ніж у тому випадку, коли ZX застосовують як терапевтичні ліки для людини, щодо якої було встановлено, що вона страждає AMD. Такі дози, що рекомендувалися для прийому всередину як добові дози, певно, повинні перебувати в діапазоні від приблизно 0,05мг до приблизно 5мг. Наприклад, доза від 0,05 до 1,0мг може виявитися прийнятною, коли R-R-зеаксантин є одним з десятка або більшого числа агентів в мультивітамінній капсулі або таблетці, тоді як доза від 1 до 5мг може бути прийнятною з метою роздрібного продажу людям, що бажають одержати більш високу дозу

Безвідносно до того, чи використовується він як терапевтичні ліки або харчова добавка, препарат на основі ZX, призначений для використання людиною, повинен містити R-R-ізомер як єдиний або "виразно домінуючий стереоізомер" ZX. В контексті даного опису поняття "виразно домінуючий ізомер" використовують для опису препарату на основі ZX, в якому потрібний R-R-ізомер ZX скла-

дає щонайменше приблизно 90% від всієї кількості ZX в суміші, а небажані S-S- або S-R-ізомери складають менше приблизно 10%

Більш прийнятно R-R-ізомер повинен бути єдиним ізомером ZX, що виявляється, в будь-якому препараті, призначеному для прийому всередину людиною. При здійсненні даного винаходу це стало можливим в промислових обсягах і за доступною ціною, оскільки лінія бактерії *F. multivorum*, наведена в даному описі, продукує R-R-ізомер у вигляді єдиного стереоізомеру ZX, що виявляється. Якщо будь-який з S-S- або S-R-ізомерів присутній в підданих ферментації сумішах після очистки, їх кількість виявляється занадто малою, щоб їх можна було виявити методами, описаними в прикладі 4

Крім того, на відміну від більшості бактеріальних штамів клітини *F. multivorum*, наведені в даному описі, не продукують суміш каротиноїдів, ці клітини утворюють R-R-зеаксантин як єдиний каротиноїд, що виявляється. Оскільки ZX повинен конкурувати з іншими каротиноїдами при аліментарному поглинанні і накопичуванні в тканині, це може виявитися корисним для збільшення поглинання ZX та відкладення в сітківці після орального введення, особливо у випадках, коли ZX застосовують як ліки для лікування діагностованих випадків дегенерації жовтої плями

Промислове виробництво за допомогою бактеріальної ферментації

Як відомо фахівцям з даної галузі техніки, способи, які використовуються для бактеріальної ферментації в лабораторних умовах, можуть бути дуже дорогими і погано піддаються контролю при їхній адаптації до великомасштабного виробництва. Тому згідно з винаходом були розроблені поліпшені живильні середовища та способи промислового застосування виявлених авторами клітин *F. multivorum*. Поліпшені живильні середовища та способи істотно легше застосовувати, і вони істотно більш дешеві в перерахунку на один грам одержаного ZX порівняно із середовищами і умовами, описаними раніше в патентах США 5308759 і 5427783. Більш прийнятні живильні середовища та умови описані в прикладі 1

Після ферментації одна або декілька стабілізуючих сполук можуть бути додані до клітин з метою відвернути розклад ZX в процесі очистки. Стабілізатори можуть бути додані в той час, коли клітини ще перебувають в судині для ферментації, до початку пастеризації або інших процесів. Заявниками були вивчені різноманітні потенційні стабілізатори. В даний час найкращі результати одержані з використанням комбінації стабілізаторів, зазначених в прикладі 2

Після додання стабілізаторів бактерії можуть бути піддані пастеризації шляхом нагрівання до 55°C протягом 25хв з метою вбити бактерії, не пошкоджуючи ZX. Після цього культури охолоджують до кімнатної температури і механічними способами, такими, як мікрофільтрація з поперечним потоком, випускають рідину з клітинної культури. Це може збільшити концентрацію клітин і твердих часток від початкової величини, що складає приблизно 10об % до приблизно 60-80об % в фільтраті. Цей процес дозволяє одержати клітинну пас-

ту

Певно, інтактні і такі, що перебувають в життєздатному стані, клітини *F. multivorum* можуть бути придатні для безпосереднього прийому всередину людьми так само, як і інші продукти харчування (сир, йогурт, пиво і т. п.), що містять життєздатні або вбиті, але неушкоджені клітини мікроорганізмів. Для клітин *F. multivorum* відсутні дані про їхню патогенність. Вони були виділені з холодної водотоку і, оскільки вони пристосовані до життя в холодній воді, не можуть нормально виживати або розмножуватися при температурі людського тіла. Крім того, ці клітини не мають ніяких відомих токсичних складових, вони є грамнегативними і не мають будови стінок клітини, характерних для грампозитивних бактерій. При їх безпосередньому скормлюванні птахам або риbam у формі клітинної пасти бактеріальні клітини, певно, є прийнятними як добрі носії ZH вивільнювався при попинанні клітин тваринами та абсорбувався в кровотік і відкладався у відповідних місцях в різноманітних тканинах (включаючи сітківку).

Таким чином, інтактні клітини *F. multivorum*, що містять R-R-зеаксантин, можуть бути придатні для безпосереднього прийому людиною при необхідності у вигляді будь-якої з трьох форм: (1) у вигляді інтактноі життєздатноі форми, (2) у вигляді інтактноі мертвоі форми після пастеризації або (3) у вигляді композиції, в якій бактеріальні клітини були знищені і їхні мембрани були зруйновані з метою відкрити клітини і зробити ZH більш доступним. Це може бути здійснене такими способами, як опромінення ультразвуком (з використанням високочастотних звукових хвиль), обробка високим тиском або подрібнення. В іншому варіанті ця стадія може бути пропущена, якщо використовують процес екстракції розчинником, що руйнує клітинні мембрани.

При необхідності спосіб одержання ZH може включати стадію промивання клітин, під час якої після ферментації випускають залишки живильного середовища та відходи, що утворюються в результаті метаболізму, шляхом промивання клітин розчином, що містить будь-які потрібні інгредієнти, такі, як стабілізатори, консерванти, коригенти і т. д.

Очистка

При необхідності клітинна паста (що складається або з інтактних, або зі зруйнованих клітин) може бути висушена з метою подальшого концентрування клітин і збільшення концентрації ZH в сухій масі. Це може бути здійснене механічними способами, такими, як сушіння при розпорошенні (з використанням нагрівання) або ліофілізація (сушіння шляхом заморожування під вакуумом). Якщо застосовують сушіння, то твердий залишок, що утворився, звичайно називають висушеною біомасою, і вона звичайно містить приблизно 1-10% мас % ZH поряд з іншими твердими частками клітин, залишковими твердими частками середовища для ферментації та описаними вище стабілізаторами.

Для концентрування ZH, який в основному накопичується в клітинних мембранах, перед або після (або замість) зруйнування або сушіння може бути проведена стадія екстракції. Прийнятні розчинники для екстракції звичайно включають поля-

рні органічні розчинники. Відповідно до одержаних даних найкращим розчинником є тетрагідрофуран (ТГФ), що справляє активний вплив на клітини і робить зайвою окрему стадію руйнування мембран. Хоча перемішування не є необхідним у випадку використання ТГФ при здійсненні процесу в лабораторних умовах, напевне, при промисловому виробництві перемішування під час стадії змішування з розчинником є необхідним.

Також були досліджені інші розчинники, і вони продовжують вивчатися і оцінюватися, але до даного часу не виявлений більш прийнятний розчинник, ніж ТГФ. Досліджені до нинішнього часу органічні розчинники, які не мають циклічної будови (такі, як ацетон і діетиловий ефір), мали більш низький рівень розчинності в них ZH, а інші розчинники, такі, як метанол, етанол і гексан, мали ще більш низький рівень розчинності в них ZH.

Розчинник змішують з клітинною пастою або з висушеною біомасою в умовах, за яких розчинник здатний розчинити максимально можливу кількість ZH. Розчинену рідку фракцію після цього відділяють від твердих часток, використовуючи такі способи, як центрифугування або фільтрація. Тверді частки можуть бути відкинуті або можуть використовуватися як вихідний матеріал для інших стадій процесу (включаючи при необхідності повторні цикли екстракції розчинником). Рідку фракцію обробляють для вилучення розчинника звичайно шляхом упарювання. Після цього залишається в'язке масло, що містить R-R-зеаксантин, а також інші розчинні компоненти, проекстраговані з клітинної пасти розчинником. Коли для однократної екстракції клітин, що містять 1-3 мас % ZH, використовують ТГФ і коли далі ТГФ випаровують випарюванням, утворена рідина містить приблизно від 5 до 20 мас % ZH.

Інший тип екстракції розчинником, для якого одержано попередні добрі результати, включає застосування суперкритичної рідини (тобто сполуки, яка звичайно при атмосферному тиску являє собою газ, але при підвищеному тиску перетворюється в рідину, діючи як розчинник). Двоокис вуглецю є найбільш широко застосовуваним розчинником для суперкритичної екстракції, а системи екстракції, засновані на застосуванні CO₂ в промислових масштабах, є найбільш доступними. В таких системах зріджений двоокис вуглецю змішують з клітинною пастою або з висушеною біомасою в реакційній судині високого тиску. Після цього рідину пропускають через серію камер, в яких тиск знижується ступінчастим способом. ZH осаджується з розчину при досить високому тиску, тому він може бути зібраний на ранній стадії зниження тиску, в той час як основна частина домішок залишається розчиненою в двоокисі вуглецю і повинна йти в інші реакційні камери з ще більш низьким тиском. Ефективність екстракції суперкритичним розчинником може бути додатково збільшена з використанням виборчо захоплюючих агентів (таких, як етанол, пропіленгліколь або етилацетат). Деякі з цих виборчо захоплюючих агентів були заздалегідь досліджені і було показано, що вони істотно збільшують розчинність ZH в суперкритичному розчиннику - двоокисі вуглецю.

Хоча двоокис вуглецю широко використовують

для суперкритичної екстракції, також застосовують й інші сполуки (включаючи різноманітні азот- або хлорфторвуглецевмісні сполуки). В принципі можна досліджувати будь-який розчинник, що має газоподібний або рідкий стан в залежності від тиску, з метою визначити, чи є він придатним для очищення ZX з бактерій відповідно до даного опису.

При необхідності масляниста рідина, що містить ZX, одержана після екстракції розчинником або за допомогою суперкритичної екстракції, може бути змішана з носієм, таким, як рослинна олія, і після цього включена в капсулу, призначену для прийому всередину людиною, що не потребує ніякого додаткового очищення ZX. Такий спосіб є економічно вигідним способом одержання напівочищеної легко засвоюваної форми R-R-зеаксантину, придатної для прийому людиною, або як лікарський засіб, призначений для страждаючих дегенерацією жовтої плями, або як харчова добавка для тих, хто хоче знизити ризик виникнення дегенерації жовтої плями в більш старшому віці.

В альтернативному варіанті R-R-зеаксантин в напівочищеній маслянистій рідині може бути додатково очищений з метою підвищити концентрацію ZX та вилучити будь-які домішки. Це може бути здійснене такими способами, як (1) застосування систем двох розчинників, в яких використовують комбінацію двох різних розчинників, (2) адсорбція на субстраті (такому, як фільтрувальний шар тканини), яка сприяє кристалізації ZX, або (3) хроматографія в протиточи. Метод хроматографії, що застосовується для очищення ZX та який дозволяє одержати ZX з чистотою приблизно 98%, описаний в прикладі 4.

Способи очищення інших каротиноїдів описані в патентах США 5382714 (Khachik, 1995) та 4851339 (Hills, 1989). Враховуючи їхню хімічну схожість, будь-який метод, придатний для очищення β -каротину або лютеїну, напевне, може дати добрі результати при очищенні ZX.

Способи введення

Оральне введення є більш прийнятним способом введення ZX людям для захисту зірківки з використанням таких форм орального введення, як капсули, призначені для щоденного або щотижневого прийому, або застосування ZX у вигляді продуктів харчування з доданням ZX чи добавок до продуктів харчування, як описано нижче. Лікування не вимагає регулярного прийому всередину через певні інтервали часу (як у випадку пілюль, призначених для щоденного або щотижневого прийому), але замість цього припускає випадковий переривчастий прийом всередину, при якому між прийомами доз повинен минути певний період часу (наприклад, один або декілька днів, більш прийнятно менше тижня), що дозволяє поступово накопичуватися невеликим кількостям ZX в тканині жовтої плями. Як і у випадку будь-якої вітамінної добавки, також може виявитися прийнятною одноразова доза, однак прийом у вигляді одноразової дози не буде настільки ж ефективний, як періодичний прийом невеликих доз при прийомі протягом ряду років. Дослідження всмоктування каротиноїдів ссавцями показали, що щоденний прийом всередину більш прийнятний у порівнянні з щотижневим

або іншими випадковими прийомами завдяки чинникам "завантаження", які підтверджуються концентраціями в крові.

Оскільки засвоєння каротиноїдів після орального введення звичайно є відносно низьким для пацієнтів, що страждають серйозною формою дегенерації жовтої плями, може виникнути необхідність застосовувати інші форми введення, такі, як внутрішньом'язова або внутрішньовенна ін'єкція або імплантація пристрою з повільним вивільненням ліків. Носії для композицій, призначених для ін'єкцій, можуть включати воду, забуферуючий агент і органічну сполуку, що має декілька гідроксильних груп, наприклад, такі сполуки, як пропіленгліколь, декстран або циклодекстрин.

Для орального введення можуть застосовуватися різноманітні упаковки, що дозволяють тривалий час захищати ZX від окиснення і відповідні маслянистості природи ZX. Прикладами прийнятних композицій для орального введення є наступні:

(а) Легко засвоювана водонепроникна капсула з вміщеною в ній рідиною, причому капсула і рідина мають розмір, який дозволяє проковтувати їх, не пошкоджуючи, вони є фармакологічно прийнятними, і рідина містить R-R-зеаксантин, змішаний з придатним носієм або розчинником, таким, як рослинна олія. При необхідності псевдосозрілий ZX може бути мікрокапсульований або включений в міцели, як описано в прикладах 9 або 10, з метою захисту ZX від розкладу в шлунку. Такі капсули можуть бути виготовлені з відносно твердого, нееластичного матеріалу або з пластичного матеріалу, який звичайно використовують для капсул, що містять вітамін E. Якщо капсула виготовлена з матеріалу, який є стійким до дії кислого середовища шлунка і переварюється ферментами кишечника, ZX може бути захищений від розкладу в шлунку, а біологічна доступність ZX може бути збільшена. Однак відомо, що принаймні частина ZX, що потрапляє до шлунка у вигляді компонента прожованої рослинної маси, може проходити через шлунок без зміни, отже, захист ZX від кислого середовища шлунка не має вирішального значення, і вибір матеріалу капсули насамперед повинен бути економічно вигідним, а не науково обґрунтованим.

(б) Таблетка, призначена для орального введення людиною, причому таблетка містить R-R-зеаксантин і здатна до пресування зв'язувану речовину, сумісну з зеаксантином, і яка дозволяє таблетці зберігати свою форму після пресування під відповідним тиском, при цьому таблетка є фармакологічно прийнятною і має розмір, що дозволяє проковтувати її без пошкодження. При необхідності таблетка може мати покриття, сприятливе захисту ZX від кислого середовища шлунка.

(в) Композиція, що містить харчовий продукт, призначений для споживання людиною та який є прийнятним для використання як їжа і приємним на смак, а також придатний як носій зеаксантину і містить R-R-зеаксантин як добавку. ZX являє собою жовто-оранжевий пігмент з такими ж загальними гідрофобними характеристиками, що і рослинна олія, шортенінг (комбіжир для хлібопекарської промисловості) або курячий жир, він також аналогічний іншим каротиноїдним харчовим заба-

рвникам, таким, як β -каротин

Таким чином, він може бути доданий як харчовий забарвник до різноманітних харчових продуктів, таких, як маргарин, молочні продукти, сироп, печені вироби, тісто для домашнього випікання, обжарене тісто, м'ясні напівфабрикати, які не піддаються високотемпературній тепловій обробці, та інгредієнти для супів. Інші прийнятні харчові продукти можуть включати гранульовані композиції, такі, як суміші речовин для підсолювання або надання запаху прянощів, що застосовуються як добавки до супів, салатів, печива тощо. Гранульовані композиції можуть при необхідності мати захисне покриття для зниження розкладу ZX кислим середовищем шлунка. Відомі численні приклади застосування β -каротину та інших каротиноїдів як харчових забарвників і харчових добавок, вони описані у Klau і ін., 1970, Klau і Bauernfeind, 1981, Colombo і Gerber, 1991, та в патентах США 4522743 (Horn та ін., 1985), 5180747 (Matsuda та ін., 1993), 5350773 (Schweikert та ін., 1994) і 5356636 (Schneider та ін., 1994). Внаслідок їхніх однакових хімічних характеристик будь-який метод додання β -каротину або лютеїну в харчовий продукт, призначений для людей, напевне, також може безпосередньо застосовуватися і для R-R-зеаксантину.

(г) Композиція, що містить харчовий продукт, призначений для споживання людьми, причому харчовий продукт включає клітини мікроорганізму, які безпечні для людей та які містять R-R-ізомер зеаксантину. Харчові продукти можуть бути вибрані з сиру, йогурту, молока і пива. При необхідності клітини мікроорганізму можуть бути життєздатними, або вони можуть бути знищені такими методами, як пастеризація або фрагментація.

Також можуть використовуватися інші форми пакування, і вони можуть виявитися більш прийнятними для різноманітних цілей.

Тестування R-R-зеаксантину на тваринах

ZX , який синтезували, використовуючи клітини *F. multivorum*, одержані з лінії ATCC 55238, тестували щодо спроможності захищати сітківку у птахів виду *Coturnix coturnix japonica*, яких звичайно називають японською куріпкою. Ці види є зручною тваринною моделлю для вивчення дегенерації жовтої плями у людей внаслідок ряду чинників, вказаних нижче.

(1) Уся сітківка японських куріпок схожа на жовту пляму людини з цілого ряду важливих параметрів. Наприклад, сітківка куріпки містить як ZX , так і лютеїн і подібно жовтій плямі людини в ній більше фоторецепторів у вигляді колбочок, ніж у вигляді паличок.

(2) Для сітківки японської куріпки характерні деякі вияви патології, властиві сітківці людини, наприклад, сітківка японської куріпки накопичує м'які друзи та ліпофусцин, що значною мірою корелює з початковими проявами AMD у людей.

(3) Хоча сітківка куріпки істотно менша за розмірами, ніж сітківка у людей, уся сітківка куріпки забарвлена в жовтий колір внаслідок присутності ZX та лютеїну. Це дозволяє ефективно використовувати усю сітківку куріпки як модель невеликої ділянки жовтої плями в центрі сітківки людини, що істотно полегшує аналіз та спостереження.

(4) Сітківка японської куріпки не містить судин і має будову, схожу із зоною ямки сітківки людини.

(5) Тривалість життя самок японської куріпки складає приблизно 1-1,5 року, а самців - 3-4 роки. Це дозволяє вивчити процеси старіння, що може бути дуже ускладнене для інших видів, які мають більшу тривалість життя.

Ці чинники більш докладно обговорюються у Fite та ін., 1991 та у Fite та ін., 1993.

Ці дослідні описані в прикладах 5-8. Отримано чудові результати, які ясно показують, що R-R-зеаксантин, продукований клітинами *F. multivorum*, (1) потрібним чином відкладається в сітківці після орального введення і (2) має високу ефективність щодо захисту клітин сітківки від фототоксичного пошкодження.

Крім того, як це описано в прикладі 8, попередні результати показують, що R-R-зеаксантин є істотно більш сильнодіючим і ефективним у порівнянні з β -каротином відносно до захисту сітківки від фототоксичного пошкодження. Коли β -каротин скормлюють дослідним тваринам у високій дозі, незначна захисна дія β -каротину не досягає навіть рівня статистичної вірогідності. На відміну від цього, коли R-R-зеаксантин скормлюють дослідним тваринам в такій самій дозі, він повністю блокує і відвертає прояви пошкодження сітківки, що піддаються виміру.

Мікробні джерела R-R-зеаксантину

Клітини *Flavobacterium multivorum* наведені в даному описі, депоновані в ATCC (реєстраційний номер ATCC 55238, як відзначалося вище, в реєстраційному каталозі вони відповідають *Sphingobacterium multivorum*, однак їхня назва не була змінена в Bergy's Manual). Ця лінія клітин надає фахівцям в даній галузі декілька шляхів мікробіологічного синтезу ізомерно чистого R-R-зеаксантину.

По-перше, безпосередні і немодифіковані нащадки цих клітин можуть застосовуватися для синтезу R-R-зеаксантину без помітних кількостей інших небажаних стереоізомерів. З усієї кількості каротиноїдів, продукованих цими клітинами, більше 90% припадає на частку потрібного каротиноїду ZX .

По-друге, потомство штаму ATCC 55238 може застосовуватися після його модифікації способами, які збільшують виробництво R-R-ізомеру ZX . Мутанти або інші змінені лінії клітин можуть бути створені за допомогою будь-якого з декількох методів, таких, як (1) обробка потомства штаму дикого типу ATCC 55238 мутагенними агентами, такими, як ультрафіолетове опромінення або опромінення рентгенівськими променями, або відомими хімічними мутагенами, такими, як N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин, (2) одержання статевих комбінацій шляхом змішування клітин *F. multivorum* з іншими типами бактерій, що активно посилює кон'югацію та обмін ДНК між бактеріальними клітинами, (3) обробка клітин *F. multivorum* бактеріальними транспозонами або вірусами, які можуть викликати перебудову відносно великих ділянок ДНК. Ці методи дозволяють внести випадкові зміни в клітини потомства, а після цього потомство аналізують з використанням методів скринінгу з метою ідентифікації та виділення клітин.

потомства, які продукують більш високі рівні ZX

Методи скринінгу можуть бути полегшені за допомогою хімічних речовин (таких, як дифеніламін, нікотин або повастатин), які приглушують один або декілька ферментів, що беруть участь в процесі біосинтезу, в результаті якого утворюється ZX. Для нефахівця слід пояснити, що ці отрути-супресори створюють перешкоди або завади, які можуть переборюватися тільки мутантними клітинами, продукуючими аномально високі кількості ZX. Однак досліди, які можуть використовуватися для виявлення високопродуктивних мутантів або варіантів, є простими, швидкими і легкими в здійсненні. Оскільки ZX являє собою жовтий пігмент, просте візуальне дослідження культурального планшета може застосовуватися для виявлення колоній мутантів, які мають потрібні ознаки (1) високої швидкості клітинного зростання та (2) здатності продукувати аномально високі кількості жовтого пігменту. В методах скринінгу після обробки мутагеном при необхідності може також використовуватися автоматичне пристосування (таке, як автоматичний планшет-ридер або пристрій для автоматичного сортування клітин, сполучені з цитометрами потоку).

Ці методи мутагенезу і скринінгу є загальноприйнятими і добре відомі в даній галузі. Будь-які клітини, що є прямими нащадками штаму дикого типу ATCC 55238, розглядаються як потомство цих клітин, навіть якщо вони були модифіковані, піддані мутації або статевому об'єднанню з іншими лініями клітин будь-яким з перерахованих вище способів.

В третьому альтернативному підході можуть бути створені мікробні клітини, що не є потомством та які містять гени, виділені або такі, що походять з лінії клітин ATCC 55238, які експресують ферменти, що сприяють синтезу R-R-зеаксантину. Такі гени можуть бути виділені та ідентифіковані з використанням відомих методів. Наприклад, послідовності ДНК генів продукуючого каротиноїди штаму "crt", вказані в патенті США 5429939 (Misawa та ін., 1995, описано вище), можуть використовуватися як зонди гібридизації для пошуку продукуючих каротиноїди генів, що мають гомологічні послідовності ДНК, в геномі клітин лінії ATCC 55238. Продукуючі каротиноїди гени, виділені з цих клітин, після цього можуть вбудовуватися в плазмиди, косміди, фаги або інші прийнятні вектори, які можуть використовуватися для генетичної трансформації будь-якого потрібного типу клітин-господаря, такої, як клітини *E. coli*, клітини дріжджів, клітини комах або клітини ссавців. Контрольована генетична інженерія такого типу може забезпечити продукування трансформованими клітинами R-R-зеаксантину, використовуючи гени, одержані з клітин ATCC 55238.

Крім того, протеїнокодуючі частини генів, продукуючих ZX з клітин ATCC 55238 (тобто частини генів, які транскрибуються в матричний РНК, а після цього транслюються в ферменти, синтезуючі ZX), можуть бути вміщені під контроль сильних і/або таких, що індукуються, промоторів. Такі "хімерні" гени, що містять промотори генів, одержані з різних генів, можуть застосовуватися для різноманітних цілей, таких, як (1) приглушення вироб-

ництва ZX під час зростання та репродукції клітин, а після цього різке збільшення виробництва ZX клітинами під час ферментації та (2) вбудовування (інсерція) генів в нові типи клітин-господарів, які можуть виявитися більш прийнятними для промислового застосування, такі, як клітини *E. coli* або клітини дріжджів, які можуть застосовуватися для добре відомих та значною мірою оптимізованих методів ферментації, виготовлення та очищення.

Гени, продукуючі ZX та виділені з клітин лінії ATCC 55238, також можуть бути посилені за допомогою інших добре відомих методів. Наприклад, гени бактерій часто використовують "непереважні" кодони, які знижують і регулюють кількість протеїну, синтезованого геном. З метою зниження цих обмежувальних механізмів непереважні коди в гені, синтезуючому ZX, в клітинах лінії ATCC 55238 можуть бути заміщені "переважними" кодами, які можуть збільшувати експресію ферменту, продукуючого ZX, в обраній клітині-господарі.

В іншому прикладі залишки цистеїну можуть перешкоджати активності або стабільності ферменту, утворюючи непотрібні дисульфідні місточки з іншими залишками цистеїну або в цій самій, або в інших молекулах протеїну. Отже, активність або стабільність ферменту може бути інколи збільшена шляхом заміщення одного або декількох залишків цистеїну залишками інших амінокислот (наприклад, див. патент США 4737462 на ім'я Mark). Крім того, експресія протеїну часто може бути збільшена шляхом вбудовування кодонів для загальних амінокислот, таких, як гліцин, замість кодонів, які кодують метіонін і триптофан, які є менш поширеними та які мають тенденцію уповільнювати і знижувати експресію протеїну. Після створення синтетичного гена, який призводить до заміщення амінокислоти такої природи, модифікований протеїн можна досліджувати з метою визначити, чи зберігає він потрібну ферментативну активність, чи експресується в більших кількостях або в більш стабільній формі.

Вище перелічені приклади відомих методів генетичної інженерії, які можуть бути оцінені на генах, продукуючих ZX, виділених з клітин лінії ATCC 55238, з метою визначити, чи буде будь-яка інша модифікація посилювати вироблення ZX клітинами *F. multivorum* або іншими типами клітин-господарів.

Використовуване в формулі винаходу поняття "клітини, які були піддані генетичній інженерії для створення принаймні одного гена, синтезуючого зеаксантин та який містить послідовність ДНК, одержану з штаму *Flavobacterium multivorum*, якому був присвоєний реєстраційний ATCC 55238", включає клітини, що містять гени, які мають послідовності ДНК, синтезовані хімічним шляхом з використанням послідовності ДНК або мРНК, які були визначені шляхом аналізу клітин лінії ATCC 55238 або їхнього потомства. Пристрої для автоматичного синтезу ДНК добре відомі і можуть використовуватися для копіювання будь-якої відомої послідовності гена без необхідності здійснювати реплікацію вихідної клітини-господаря. Поняття "гени, синтезуючі зеаксантин" включає будь-які гени, експресуючі фермент або інший протеїн, який бере участь в шляху біосинтезу ZX та який

може застосовуватися для збільшення виробництва ZX при вбудовуванні в придатні клітини-господарі незалежно від того, який конкретний фермент в шляху біосинтезу ZX кодує цей ген

Приклад 1 Ферментація в промислових масштабах

Живильне середовище, яке на думку заявників було більш прийнятним для початкового маломаштабного тестування *Flavobacterium multivorum* в лабораторних умовах, являє собою живильне середовище E, описане в прикладі 3 в патентах США 5308759 (Gierhart, 1994) та 5427783 (Gierhart, 1995). Це живильне середовище містило декілька інгредієнтів, які були дорогими і з якими було важко працювати. Для зниження вартості і для підвищення зручності після дати подачі цих заявок було проведено широке дослідження з метою створити живильне середовище, більш придатне для промислових масштабів. З живильних середовищ, які в даний час є більш прийнятними для ферментації в промислових масштабах, були виключені кукурудзяне борошно і декілька інших інгредієнтів. Ці більш прийнятні середовища містять або кукурудзяний сироп з високим вмістом мальтози, або бурякоцукрову меласу в діапазоні концентрацій від 1 до 10% мас/об поряд з екстрактом замоченої кукурудзи в концентрації 0,5-4% мас/об, гептагідрат сульфату амонію в концентрації 0,5% мас/об, хлорид натрію в концентрації 0,5% мас/об, гептагідрат сульфату магнію в концентрації 0,1% мас/об, ацетат натрію в концентрації 0,1% мас/об, гептагідрат сульфату заліза в концентрації 0,001% мас/об, дріжджовий екстракт в концентрації 0,2% мас/об, тіамін-HCl в концентрації 0,01% мас/об, від 1 до 8% мас/об гідролізованого казеїну (наприклад, марки NZ Amine HD, що постачається фірмою Sheffield Products, Division of Quest International, Norwich, NY), та рослинна олія в концентрації 1 об %. Після змішування цих інгредієнтів додають таку кількість NaOH, яка є достатньою для підвищення значення pH до 6,5, на противагу цьому, коли значення pH живильного середовища доводили до 7,5, як це описано для лабораторних експериментів в патентах США 5308759 та 5427783, з екстракту замоченої кукурудзи осаджувалося занадто багато твердих часток.

Культуральне середовище стерилізують автоклавуванням при 121°C протягом 30хв, після цього його охолоджують до 27°C й инокулюють за допомогою 5-10 об % "рідкої попередкультури", що містить штам *F. multivorum*, який продукує R-R-зеаксантин та не продукує S-S- або R-R-стереоізомери. Клітини, що застосовуються для одержання рідкої попередкультури, вирощують у пробірці зі скошеним агаром, призначеним для визначення кількості мікроорганізмів. Ці культури, одержані на скошеному агарі, инокулюють клональними колоніями *F. multivorum*, отриманими з штаму, депонованого заявниками в ATCC (реєстраційний номер ATCC 55238). Після інкубації протягом 48 год при 28°C вихідні культури на скошеному агарі зберігають в холодильнику при 4°C до їх використання як инокуляту для рідкого середовища. Життєздатні клітини також можуть бути заморожені для тривалого зберігання з використанням звичайних камер заморожування, сухого льоду

або рідкого азоту.

Рідку попередкультуру одержують, використовуючи клітини, взяті зі скошеного агару, для инокуляції 30мл рідкого середовища, одержаного за описаною вище методикою та яке міститься в колбі з перегородкою об'ємом 300мл. Використовують наступні умови для зростання: 28°C, значення pH від 7,2 до 7,6, аерація шляхом перемішування при 250 об/хв та культивування протягом 24 год. Після початкових 24 год інкубації клітини, що містяться в одній або декількох колбах для попереднього культивування об'ємом 30мл, використовують для инокуляції в десять разів більшу кількість живильного середовища в судині для ферментації відповідного розміру. Після цього клітини інкубують протягом 48-72 год при 28°C. Значення pH підтримують на рівні 6,80-7,20, використовуючи NaOH і/або фосфорну кислоту. Концентрацію розчиненого кисню підтримують на рівні 30-40% від насичувальної концентрації шляхом барботування відфільтрованого повітря через судину зі швидкістю 1 об'єм повітря на 1 об'єм рідини за хвилину при струшуванні судини на мішалці зі швидкістю 400-1000 об/хв. Досліди з використанням періодичного відбору зразків та рідинної хроматографії високого розрешення показали, що максимальні кількості ZX звичайно продукуються протягом приблизно 72 год при ферментації клітин в зазначених умовах.

Приклад 2 Додання стабілізаторів

Утворюваний в процесі ферментації відповідно до прикладу 1 ZX потребує стабілізації для того, щоб полегшити наступне очищення і виготовлення композиції, та для гарантії чистоти. Стабілізуючі сполуки можуть бути додані до клітин *F. multivorum* (або до клітинного екстракту, що містить ZX) в будь-який момент часу в процесі одержання або очищення, звичайно один або декілька первинних стабілізаторів можуть бути додані до клітин, коли вони ще перебувають в судині для ферментації. Заявниками були виявлені різноманітні потенційні стабілізатори. До цього часу найкращі результати одержані з використанням комбінації стабілізаторів, які перед доданням до клітин змішують в невеликій кількості прийнятного розчинника (наприклад, з приблизно 2мл етанолу в судині для ферментації об'ємом 20л). Більш прийнятна суміш стабілізаторів містить трет-бутилгідроксидон (скорочено ТБГХ, що також називається 2-(1,1-диметилетил)-1,4-бензолдіолом) в кількості, яка дозволяє після змішування з клітинами одержати кінцеву концентрацію від приблизно 250мкг/л (мікрограмів на літр) до приблизно 50мг/л, етоксикін, концентрація якого після змішування перебуває в діапазоні від приблизно 250мкг/л до приблизно 250мг/л, α -токоферол в концентрації від приблизно 250 мкг/л до приблизно 250 мг/л, та ЕДТК (етиленадіамінтетраоцтова кислота) в концентрації від приблизно 500мкг/л до приблизно 500мг/л. Прийнятні концентрації можуть істотно варіюватися і повинні залежати від різноманітних чинників, таких, як стадія наступного очищення та передбачуваний спосіб пакування і шлях уведення. Більш прийнятні концентрації цих стабілізаторів, що застосовуються при використанні однократної екстракції ТГФ з наступним змішуванням з рослинною

олією та капсулюванням у водонепроникну пліюлю, аналогічну такій, що застосовується для вітамінів, складають приблизно 25-50мг/л ТБГХ, 250-500мкг/л етоксигіну, 250-500мкг/л α -токоферолу та 500-1000мкг/л ЕДТК

Після додання стабілізаторів клітинну культуру пастеризують, нагріваючи до 55°C протягом 25-50хв. Ця процедура знищує бактерії, не пошкоджуючи ZX, який вони продукували. Після цього культуру охолоджують до кімнатної температури і клітини, що містять ZX, та інші тверді частки, присутні в культуральному бульйоні, відділяють від рідкої фази за допомогою системи мікрофільтрації з поперечним потоком, яка підвищує концентрацію клітин/тверді частки від початкового значення приблизно 10-15об % до концентрації в фільтраті приблизно 60-80об %. Цей процес призводить до одержання клітинної пасти, яка також містить деяку залишкову кількість твердих часток з живильного середовища.

Для одержання препаратів на основі ZX, що скормлювали японській куріпці для дослідження стійкості, як описано в прикладах 5-7, клітинну пасту заморожують до -70°C, після цього висушують за допомогою ліофілізації при 25°C в глибокому вакуумі, одержуючи висушену біомасу, що містить приблизно 1-10мас % ZX. У вищезазначених дослідках кількість ZX в кожній порції оцінювали окремо і порції, які мали різні концентрації, об'єднували та змішували, щоб в дослідках на японській куріпці забезпечити використання співставних концентрацій.

Для одержання ZX, призначеного для прийому всередину людиною, застосовують екстракцію розчинниками для одержання в'язкої маслянистої рідини, як описано в прикладі 3.

Приклад 3. Неповне очищення маслянистої рідини.

Після одержання клітинної пасти аналогічно прикладу 2 вона може бути оброблена будь-яким з численних способів. Як вказано вище, при необхідності клітинні мембрани можуть бути зруйновані з тією метою, щоб відкрити клітини і зробити ZX більш доступним, за допомогою таких способів, як опромінення ультразвуком (з використанням високочастотних звукових хвиль), обробка високим тиском або подрібнення, підтримуючи температуру клітин нижче приблизно 30°C для запобігання окиснення. Однак ця стадія не є необхідною, коли на стадії екстракції розчинником застосовують тетрагідрофуран (ТГФ), оскільки ТГФ дуже ефективно руйнує клітинні мембрани без механічного втручання. Перемішування не є необхідним, коли в лабораторних дослідках застосовують ТГФ, однак, певно, при промисловому виробництві перемішування під час стадії змішування з розчинником може виявитися доцільним.

В дослідках, що проводилися, екстракція ТГФ включала змішування приблизно 8-20 об'ємів очищеного відфільтрованого ТГФ з одним об'ємом клітинної пасти, що містить 60-80% твердих часток, при температурі нижче 25°C протягом 2-24год. ТГФ активно впливає на клітини, призводячи до одержання рідини, в якій суспендовані пластичні частки. Після центрифугування при 20000g протягом декількох хвилин більша частина ТГФ

може бути вилучена шляхом декантації ТГФ, що залишився, може бути випарений під вакуумом, в результаті чого утворюється в'язке масло. Коли клітинну пасту, що містить 1-3% ZX, обробляли за допомогою однократної екстракції ТГФ, утворене масло звичайно містило приблизно 5-20мас % ZX.

Приклад 4. Одержання високоочищеного зеаксантину в сухій порошкоподібній формі зі 100%-ним вмістом R-R-ізомеру.

Препарат на основі високоочищеного ZX в сухій порошкоподібній формі одержували шляхом обробки підданої екстракції ТГФ маслянистої рідини, описаної в прикладі 3, за допомогою рідинної хроматографії наступним чином. Маслянисту рідину, що містить ZX, розчиняли в гексані, після цього пропускали через хроматографічну колонку, що містить нейтральний алюмінієвий порошок. З метою вилучення домішок каротиноїдів, таких, як β -каротин та лікопен, а також ліпідів та інших забруднювачів для промивки колонки використовували гексан в обсязі, дорівнюючому двом об'ємам колонки. Після цього для виділення ZX через колонку пропускали суміш гексан/ацетон у співвідношенні 80/20. Отриманий розчинений ZX сушили під вакуумом. Хроматографічний аналіз показав, що він являє собою ZX з чистотою щонайменше 98%, були виявлені лише слідові кількості будь-яких домішок.

Після зберігання протягом приблизно шести місяців у відносно незахищеному стані (як правило, при звичайному заморожуванні з середньою частотою взяття зразків та без використання будь-яких антиоксидантів і без вжиття будь-яких запобіжних заходів для недопущення контакту з атмосферним киснем) зразок цього препарату ZX відсилали для стереоізомерного аналізу професору John Landrum (одному з співавторів статей Bone, Landrum та ін.) в університет Florida International University, Майамі, шт. Флорида. Виконаний ним аналіз з використанням хіральної хроматографії на колонках з дикарбаматною дериватизацією показав, що незахищений препарат, що зберігався протягом шести місяців, містив 92% ZX. Домішки, напевне, являли собою в основному кетокаротиноїди, що елювалися раніше ZX, кетокаротиноїди мають додатковий атом кисню, приєднаний до каротиноїду в будь-якому з положень, і вони є звичайними побічними продуктами, що з'являються при зберіганні каротиноїдів без захисту від окиснення. Хіральний аналіз, проведений професором Landrum, показав, що потрібний R-R-ізомер складав 100% від загальної кількості ZX в препараті. Не було виявлено помітних кількостей небажаних S-S- або S-R-стереоізомерів.

Встановлено, що описане вище хроматографічне очищення, хоча воно є повністю здійсненним і високоефективним, не є ідеально придатним для одержання високоочищеного ZX в промислових кількостях. Як метод, потенційно прийнятний для промислового виробництва, можна назвати альтернативний метод, розроблений для очищення лютеїну і описаний в патенті США 5382714 (Khachik, 1995, також див. у Khachik та ін., 1991), в якому використовується суміш холодний етанол/вода в системі екстракції, що складається з двох розчинників, з наступною ліофілізацією.

Приклад 5 Дослідження зеаксантину з використанням як модель груп японської куріпки з різним раціоном харчування

Усі дослідження з використанням японської куріпки проведені в Schepens Eye Research Institute of Harvard Medical School (Boston, Massachusetts) за контрактом з Applied Food Biotechnology, Inc (правонаступником по даній заявці) Кількість птахів в усіх підданих обробці або в контрольних групах була такою, яка необхідна для одержання статистично вірогідних даних В більшості випадків кількість птахів в контрольних групах відповідала кількості птахів в підданих обробці групах

Корми для птахів з дефіцитом каротиноїдів одержували від фірми Purina Mills (St Louis, Missouri) Такі корми для птахів продавали виключно для експериментального використання і одержували з зерна (такого, як насіння проса), в якому в природних умовах відсутні каротиноїди

Всі препарати на основі ZX, якими кормили японських куріпок, являли собою висушену біомасу клітин *F. multivorum*, яку ферментували, стабілізували агентами відповідно до прикладу 2, піддавали пастеризації з метою знищення клітини та висушували за допомогою ліофілізації Ці стадії ферментації та виготовлення препарату здійснювалися фірмою Applied Food Biotechnology, Inc на її обладнанні в O'Fallon, Missouri

Всіх дослідних птахів виводили з яєць з дефіцитом каротиноїдів Їх одержували шляхом викормлювання батьківської генерації (позначеної як птахи генерації P1) по досягненні птахами статевої зрілості виключно з використанням раціону з дефіцитом каротиноїдів Їхні яйця розбивали і аналізували на вміст каротиноїдів до тих пір, доки в яйцях не виявлявся дефіцит каротиноїдів Яйця, що після цього відкладалися птахами батьківської генерації з дефіцитом каротиноїдів, використовували для виведення птахів усіх дослідних та контрольних груп

Дослідних та контрольних птахів поділяли на чотири основні групи, які утримували на різних раціонах Ці групи позначали як група C+, група C-, група BC+, група ZX (+5) та група ZX (+50) в залежності від того, які каротиноїди вони одержували в своєму раціоні

Птахів групи C+ утримували на стандартному харчовому раціоні, що надходить в продаж, включаючому декілька каротиноїдів, цей харчовий раціон також містив як добавку синтетичний α -токоферол (вітамін E)

Птахів групи C- утримували на харчовому раціоні, в якому були відсутні практично всі каротиноїди, як описано вище Однак цей харчовий раціон включав всі інші необхідні харчові речовини, і він як добавку мав синтетичні вітаміни A та E

Птахів групи BC+ утримували на харчовому раціоні, в якому були відсутні всі каротиноїди, але як добавку в нього вводили β -каротин в такій самій дозі, яку застосовували для групи, що перебувала на раціоні з високим вмістом ZX (тобто додавали 50мг β -каротину на кілограм корму) Птахів групи BC+ переводили на харчовий раціон, що містив β -каротин, за сім (7) днів до початку процедури пошкодження сітківки світлом Ця група дозволяє провести безпосереднє порівняння між групою, що перебувала на раціоні з добавкою β -каротину, і однією з підгруп птахів, що перебувала на раціоні з доданням ZX, яку також переводили з харчового раціону з дефіцитом каротиноїдів на раціон з доданням ZX за сім днів до початку пошкодження сітківки світлом Як описано в прикладі 8, це безпосереднє порівняння показало, що ZX має високу ефективність щодо попередження фототоксичного пошкодження, тоді як захисні дії β -каротину виявилися настільки слабкими, що одержані результати не досягли статистично вірогідного рівня

Птахів групи ZX+ утримували на харчовому раціоні, в якому були відсутні всі інші каротиноїди, але який включав висушену біомасу, що містила R-R-зеаксантин з клітин *F. multivorum* фірми AFB Харчовий раціон цих птахів включав дві різних дози ZX, що дозволяє оцінити залежність дії від дози і виявити кореляцію з різноманітними проявами пошкодження сітківки Птахів групи ZX (+5) утримували на харчовому раціоні з відносно невеликою кількістю ZX, в середньому додаючи 5мг ZX на кілограм корму Оскільки японська куріпка з'їдає приблизно 25-35г корму на день, в групі з низькою дозою ZX на птаха в день припадало приблизно 0,125-0,175мг ZX Птахів групи ZX (+50) утримували на харчовому раціоні з десятиразовою збільшеною кількістю ZX (50мг ZX на кілограм корму), при цьому кожен з птахів з'їдав приблизно 1,25-1,75мг ZX на день

Концентрації каротиноїдів в контрольному кормі, в кормі з дефіцитом каротиноїдів та в кормі для групи ZX+ аналізували за допомогою рідинної хроматографії високого розрішення (PXBP) з використанням методів, описаних у Stacewicz-Sapuntzakis та ін., 1993 Результати наведені в таблиці 1

Таблиця 1

Харчовий раціон	Концентрація каротиноїдів (мкг/г)					
	ZX	лютеїн	β -крип	β -кар	кантокс	лікоп
Контроль (C+)	0,59	1,55*	0,11	0,24	0,00	0,00
Дефіцит (C-)	0,26	0,59*	0,00	0,00	0,00	0,00
Зеаксантин (ZX+50)	87,60	0,59*	1,90	3,00	0,00	2,90
Зеаксантин (ZX+5)	6,74	0,06*	0,20	0,28	0,00	0,27

Пояснення ZX означає 3R-3'R-зеаксантин, β -крип означає β -криптоксантин, β -кар означає β -каротин, кантокс означає кантоксантин, лікоп означає лікопін, "*" означає попереднє визначення, також може являти собою цис-ізомер зеаксантину

Усіх птахів вирощували і утримували в звичайних брудерних клітках. За винятком зазначених нижче випадків, їх утримували при звичайному освітленні з широким спектром хвиль, тривалість якого складала від 10 до 14 год на добу.

Приклад 6. Відкладення в сітківці зеаксантину, уведеного орально шляхом

Хімічним шляхом аналізували концентрації ZX (та інших каротиноїдів), накопичені в сітківках птахів в кожній з груп, що утримувалися на різних харчових раціонах, описаних в прикладі 5.

Для здійснення цих аналізів птахів, що вилупилися з яєць з дефіцитом каротиноїдів і яких утримували на відповідному харчовому раціоні протягом принаймні 6 місяців, умертвляли шляхом скручування шиї. Тканину сітківки вилучали шляхом розсікання енуклеюваного ока, і тканину окремої сітківки розтирали до практично гомогенного стану в 250 мл дистильованої деіонізованої води, використовуючи скляний пестик або пестик з політетрафторетилену (TEFLON®). З цього гомогенату відбирали 10 мл і використовували для аналізу вмісту протеїнів в гомогенаті з метою стандартизувати результати, одержані для різних зразків сітківки. До 240 мл суспензії тканини сітківки, що залишилися, додавали 250 мл метанолу, що містив 2% мас/об пірогалолу та 50 мл гідроксиду калію в концентрації 60% мас/об. Суміш витримували у водяній бані при 70°C протягом

1 год, після цього додавали 500 мл 50 об %-ного етанолу, а після цього 2 мл гексану. Суміш інтенсивно перемішували для ретельного змішування, потім залишали відстоюватися для розподілу при 5°C. Вилучали епіфазу (тобто більш легку фазу, яка спливала на поверхню рідини, що залишилася), що містила гексан та проекстраговані каротиноїди, токоферолі і ретинолі. До гомогенату тканини додатково додавали 2 мл гексану і суміш інтенсивно перемішували та знов давали поділитися. Цю епіфазу вилучали і об'єднували з першою. Цей процес повторювали ще раз, використовуючи третій цикл екстракції, з метою забезпечити повну екстракцію каротиноїдів, токоферолів і ретиноїдів.

Об'єднані гексанові екстракти після цього промивали 1 мл води для вилучення залишкових кількостей гідроксиду калію. До суміші гексан-вода додатково додавали 1 мл гексану, після цього гексановий шар (епіфазу) обережно вилучали піпеткою. Після цього гексан випарювали в постійному потоці газоподібного азоту. Отриманий залишок містив каротиноїди, токоферолі і ретинолі та інші неідентифіковані екстраговані гексаном сполуки. Далі цей залишок розчиняли в розчиннику (метанол-хлороформ-триетиламін) і аналізували за допомогою РХВР, як описано вище.

Результати наведені нижче в таблиці 2, в якій також показані рівні пошкодження після світлового опромінення з високою інтенсивністю.

Таблиця 2

Тип дієти	Середні значення (n=6)			
	Каротиноїди сітківки (нг/мг протеїну)		Кількість апоптозних ядер колбочок в центральній ділянці сітківки (400-кратне збільшення поля зору)	
	зеаксантин	лютеїн	пошкоджені неслітвовими чинниками	пошкоджені світлом
Контроль (C+)	30,18	10,41	0	60
Дефіцит (C-)	10,29	8,03	0	120
β-кар (+50)	10,01	7,83	0	109
Зеаксантин (ZX+5)	31,00	3,64	0	15
Зеаксантин (ZX+50)	104,17	n в	0	0

n в = не визначено в цих зразках. Було виявлено лютеїн-подібну сполуку, яка, напевне, не є лютеїном, що було визначено за часом витримання при РХВР і скануванням піка, що розглядається, з використанням набору фотодіодів.

Слід відзначити, що β-каротин не був виявлений в усіх сітківках, взятих у птахів, що перебували на будь-якому з описуваних харчових раціонів.

Наведені в таблиці 2 концентрації каротиноїдів в сітківці свідчать про те, що при оральному введенні R-R-зеаксантин, одержаний при ферментації клітин, які є нащадками *Flavobacterium multivorum* (реєстраційний номер ATCC 55238), справді відкладається в сітківках дослідних тварин, які одержували R-R-зеаксантин в харчовому раціоні у вигляді харчової добавки. Це є важливим відкриттям, оскільки ZX повинен бути переварений звичайним чином, повинен подолати кишковий бар'єр, потрапити до кровотоку і повинен бути поглинений клітинами сітківки очей птахів в достатній кількості, щоб забезпечити захист тканин сітківки від фототоксичного пошкодження. Усі ці бар'єри були по-

долані при використанні наведених в даному описі препаратів R-R-зеаксантину, одержаного шляхом бактеріальної ферментації.

Приклад 7. Захист сітківки R-R-зеаксантином

Частина птахів в кожній з груп, що перебували на різному харчовому раціоні, піддавали високоінтенсивному опроміненню світлом видимої частини спектра при 2000-3000 люкс протягом 28 год, використовуючи цикли, що складалися з одногодинного світлового періоду з наступним двогодинним періодом практично повної темряви. Після періоду циклічного освітлення птахів вміщували в практично повну темряву на 14 год, після чого умертвляли. Таке високоінтенсивне світлове опромінення, як було встановлено в попередніх дослідках, викликає вірогідне серйозне пошкодження у птахів групи з дефіцитом каротиноїдів і пошкодження

середньої тяжкості у птахів контрольної групи (яких утримували на нормальному харчовому раціоні). В попередніх досвідах також було встановлено, що після опромінення світлом потрібний 14-годинний період, щоб зм'ярати максимальну кількість апоптозних ядер колбочок у незахищених (з дефіцитом каротиноїдів) птахів.

У птахів, яких утримували на контрольному харчовому раціоні, максимальний апоптоз виявлено приблизно через 24 год після опромінення, в той час як у птахів, яких утримували на харчовому раціоні з доданням ZX, максимальний апоптоз виявлено через істотно більш тривалий період часу, ніж 24 год. Збільшення проміжку часу перед тим, як пошкодження може бути виявлене, є надійним показником захисних дій ZX.

Стійкість цих птахів вилучали шляхом мікророзсікання, фіксували в ксилолі та обезводнювали в етанолі перед включенням в парашар (Oxford, 56°C). Після цього робили зрізи тканин стійкості, що перебували в парашарі, і забарвлювали за способом Gallias, 1990 або пропідійодидом для візуалізації пікнозних ядер, характерних для апоптозу. Підраховували кількість пікнозних ядер, яка може бути виявлена в одному полі зору мікроскопу при 400-кратному (лінійному) збільшенні. Для кожної дослідної групи підраховували ядра принаймні в 6-8 окремих полях зору і одержані значення усереднювали.

Результати, наведені в таблиці 2, ясно показують, що загибель і пошкодження клітин стійкості (1) дуже знижувалися і/або уповільнювалися за допомогою синтезованого бактеріями R-R-зеаксантину навіть при низькій дозі ZX (+5) у порівнянні з птахами, які утримувалися на нормальному контрольному харчовому раціоні, та (2) вони зменшувалися в ще більшій мірі при використанні більш високої дози ZX (+50). Повна відсутність будь-яких пікнозних ядер в стійкості групи, обробленої ZX (+50), є безумовним доказом того, що R-R-зеаксантин з клітин лінії F. multivirum (реєстраційний номер ATCC 55238) являє собою значний крок вперед в галузі захисту клітин стійкості від фототоксичного пошкодження. За відомостями, які мають заявники, та по їхньому переконанню жоден інший з будь-коли вивчених агентів не дозволяв досягнути цього рівня захисту або хоча б наблизитися до нього.

Приклад 8. Пряме порівняння ефективності R-R-зеаксантину та β -каротину щодо захисту тканини стійкості.

Як вказано вище, птахи, які утримувалися на харчовому раціоні BC+, одержували дозу β -каротину (50 мг на кілограм корму), яка є еквівалентною дозі зеаксантину в групі ZX (+50). Це дозволяє провести пряме порівняння ефективності β -каротину і ZX щодо захисту тканини стійкості від фототоксичного пошкодження.

Отримані результати показали, що фототоксичне пошкодження в групі BC+ було знижене тільки в дуже незначній мірі (в середньому приблизно на 10% або менше). Порівняно зі стандартними відхиленнями в контрольній групі це зниження виявилось статистично невірнопдним, імовірність того, що невеликі зниження були зумовлені виключно випадковими коливаннями, складала 0,12-0,14.

Ця неспроможність β -каротину здійснювати більш надійний захист від фототоксичного пошкодження тканини стійкості в той час, як R-R-зеаксантин в такій же дозі викликав практично 100%-не зниження того ж самого показника пошкодження та загибелі клітин, ясно демонструє важливість даного відкриття. R-R-зеаксантин, синтезований за допомогою мікробної ферментації, є істотним досягненням, переважаючим будь-які раніше відомі агенти.

Приклад 9. Одержання підсилювачів абсорбції "міцели", що містять зеаксантин, діаметром менше 1 мкм, які включають тільки потрібний R-R-ізомер зеаксантину, можуть бути одержані або з екстракту біомаси, одержаного за допомогою розчинника, або з маслянистої рідини, описаної в прикладі 3, з використанням певних типів солей жовчних кислот, як описано у Olson, 1994. Масляниста рідина, що містить R-R-зеаксантин, може бути змішана з прийнятною сіллю жовчної кислоти, такою, як фосфатні солі гліко- або таурохолату, які постачаються фірмою Marcor Development Company of Hackensack, New Jersey, або з використанням екстрактів жовчного міхура, що містять солі жовчних кислот, які постачаються фірмою Salzman Corporation of Davenport, Iowa. Цей продукт жовчного міхура може бути змішаний або з екстрактом, одержаним за допомогою розчинника, або з маслянистою масою та з іншими певними солями, включаючими хлорид натрію, хлорид кальцію або хлорид калію. Цю суміш після цього піддають обробці в механічному гомогенізаторі, що містить пристосування для змішування, такі, як обертальні лопаті, швидкість і тривалість обертання яких можуть бути оптимізовані за допомогою стандартного експерименту шляхом аналізу діапазону розміру міцел, одержаних з використанням різноманітних комбінацій розмірів та форми лопатей, швидкості і тривалості обертання. При необхідності утворені міцели висушують, вивільняючи від розчинника, після цього розбавляють до будь-якої потрібної концентрації з використанням носія або рідини для розрідження, такої, як рослинна олія. Після цього ця суміш може бути включена в капсулу або інше пристосування, яке повинно сприяти ковтанню і захисту утворених міцел від розкладу в кислому середовищі шлунка.

Для одержання емульсій з невеликими розмірами часток можуть також бути використані інші емульгатори та ліпіди. Можуть застосовуватися неіоногенні поверхнево-активні речовини, такі, як твіни та спани, як описано у Olson, 1994, а також ліпідні матеріали, такі, як фосфоліпіди та сфінголіпіди, які можуть утворювати ліпідні пухирці невеликого (менше 1 мкм) розміру.

Приклад 9. Мікрокапсулований зеаксантин

В цьому прикладі описано одержання зеаксантину в мікрокапсулованій формі. Мікрокапсули являють собою тверді частки розміром 10-1000 мкм, що складаються з матеріалу ядра (такого, як R-R-зеаксантин), капсулованого за допомогою матеріалу покриття або оболонки, який може бути одержаний з різноманітних сполук, таких, як желатин, гуміарабік, крохмаль, зеїн (протеїн з кукурудзи) і т.п. В процесі виготовлення матеріалу оболонки також можуть додаватися інші сполуки, сприяючи

збереженню форми, структури, стабільності або інших необхідних характеристик одержуваного препарату. Такі сполуки можуть включати емульгатори, сорбіти, антиоксиданти, такі, як ТБГХ або 2-(1,1-диметилетил)-1,4-бензолдіол, або гелеутворюючі агенти, такі, як караппан.

Чистий або частково очищений зеаксантин розчиняють у відповідному розчиннику, такому, як етанол, ацетон або ТГФ. В розчині при додаванні розчиненого зеаксантину у воду утворюються мікрористали діаметром менше 10 мкм. Цей процес поліпшується, якщо в процесі додавання воду і кристали зеаксантину в розчиннику обробляють ультразвуком з високою частотою в присутності емульгаторів, таких, як твін 80.

Після утворення мікрористалів до суміші води, зеаксантину та розчинника додають матеріал оболонки. Для деяких матеріалів оболонки, таких, як желатин, необхідно підтримувати температуру на рівні 60°C протягом приблизно 2 год. Після повного розчинення матеріалу оболонки всю суміш вміщують в пристрій для ультразвукового опромінення (сонікатор) на 5-10 хв з метою повторно емульгувати кристали.

Формування мікрокапсул здійснюють шляхом сушіння суміші ядра та матеріалу оболонки з використанням будь-якого прийнятного методу сушіння, такого, як сушіння при розпорошенні, або з використанням обертового диска відповідно до способу Sparks та ін., описаному в патенті США 4675140. Розпорошувальні сушарки широко використовуються в харчовій промисловості та при виробництві кормів. Обертальний диск являє собою пристрій, який складається з диска (діаметром приблизно 4 дюйма), який може витримуватися при певній температурі в контрольованих умовах. Він може працювати при різних швидкостях в діапазоні від 1000 до 10000 об/хв. Суміш матеріалів ядра і оболонки додають в центр диска при його обертанні зі швидкістю, наприклад, 4000 об/хв. Мікрокапсули утворюються при контактуванні рідини з нагрітим обертальним диском. Мікрокапсули відкидаються від центру диска під дією відцентрової сили і збираються на рівній поверхні, яку заздалегідь покривають "збиральним" або "уповільнювальним" агентом, таким, як гідрофобний крохмаль або декстрин. Після цього мікрокапсули відділяють від уповільнюального агента шляхом просіювання через калібрувальне сито. Мікрокапсули вміщують в контейнер для їх захисту від світла та повітря і зберігають в охолодженому стані до їх розфасування в капсули для орального введення.

Таким чином, вище описані нові способи створення лікарських засобів, які містять R-R-зеаксантин, призначених для прийому всередину людиною, а також композицій, що містять синтезований мікроорганізмами R-R-зеаксантин та які призначені для запобігання або лікування дегенерації жовтої плями. Хоча даний винахід пояснений на конкретних прикладах та описаний з посиланням на певні конкретні варіанти здійснення, для фахівців з даної галузі техніки очевидно, що можливі різні модифікації, зміни та еквівалентні заміни ілюстративних прикладів. Припускається, що будь-які такі зміни, що впливають безпосередньо з даного опису та які не відхиляються від суті і обся-

гу винаходу, підпадають під обсяг винаходу.

Бібліографія

1. Bauernfeind J C (ред.) Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors Technological and Nutritional Applications, (Academic Press, New York, 1981)
2. Bone R A, "The role of the macular pigment in the detection of polarized light", Vision Research 20 213-220 (1980)
3. Bone R A та ін., "Preliminary identification of the human macular pigment", Vision Res, 25 1531-1535 (1985)
4. Bone R A та ін., "Analysis of the macular pigment by HPLC: retinal distribution and age study", Invest Ophthalmol Vis Sci 29 843-849 (1988)
5. Bone R A та ін., "Stereochemistry of the macular carotenoids", Invest Ophthalmol Vis Sci 34 2033-2040 (1993)
6. Bone R A та ін., "Distribution of macular pigment stereoisomers in individual eyes, including those with age-related macular degeneration (AMD)", ARVO Abstracts Invest Ophthalmol Vis Sci 35 1502 (1994)
7. di Mascio P та ін., "Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher", Archives of Biochemistry and Biophysics, 274 532-538 (1989)
8. Dorey C K та ін., "Lipofuscin in aged and AMD eyes", в Retinal Degeneration (ред. Hollyfield та ін., Plenum Press, New York, 1993)
9. Eye Disease Case Control Study Group, "Antioxidant status and neovascular age-related macular degeneration", Arch Ophthalmol, 11 104-109 (1993)
10. Eye Disease Case Control Study Group, "Risk factors for neovascular age-related macular degeneration", Arch Ophthalmol, 10 1701-1708 (1992)
11. Foote C S та ін., "Chemistry of singlet oxygen. XI. Cis-Trans isomerization of carotenoids by singlet oxygen and a probable quenching mechanism", J Amer Chem Soc 92 5218-5219 (1970)
12. Foote C S та ін., "Chemistry of singlet oxygen. X. Carotenoid quenching parallels biological protection", J Amer Chem Soc 92 5216-5218 (1970)
13. Gallyas F, Acta Neuropathologica 79 820 (1990)
14. Gerster H, "Review: antioxidant protection of the ageing macula", Age and Aging 20 60-69 (1991)
15. Gittinger J W, Manual of Clinical and Problem Ophthalmology (Little-Brown, Boston, 1988)
16. Haegerstrom-Portnoy G, "Short-wavelength-sensitive-cone sensitivity loss with aging: a protective role for macular pigment?", J Opt Soc Am A5 2140-2144 (1988)
17. Ham W T, Jr, та ін., "Basic mechanisms underlying the production of photochemical lesions in mammalian retina", Current Eye Research 3 165-174 (1984)
18. Handelman G J та Dratz E A, "The role of antioxidants in the retina and retinal pigment epithelium and the nature of prooxidant-induced damage", Adv in Free Radical Biology & Medicine 2 1-89 (1986)
19. Handelman G J та ін., "Carotenoids in the human macula and whole retina", Invest Ophthalmol Vis Sci 29 850-855 (1988)

- 20 Jialal I та ін, "β-Carotene inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein", *Biochimica et Biophysica Acta* 1086 134-138 (1991)
- 21 Khachik та ін, "Separation, identification and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by high performance liquid chromatography", *Pure and Applied Chemistry* 63 71-80 (1991)
- 22 Kirschfeld K "Carotenoid pigments: their possible role in protecting against photooxidation in eyes and photoreceptor cell", *Proc R Soc Lond B* 216 71-85 (1982)
- 23 Malinow M R та ін, "Diet-related macular anomalies in monkeys", *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19 857-863 (1980)
- 24 Pease P L та ін, "Optical density of human macular pigment", *Vision Res* 27 705-710 (1987)
- 25 Peto R та ін, "Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates?", *Nature* 290 201-208 (1981)
- 26 Schalch W, "Carotenoids in the retina -- a review of their possible role in preventing or limiting damage caused by light and oxygen", *EXS* 62 280-298 (1992)
- 27 Seddon J M та ін, "Dietary carotenoids, vitamins

- A, C and E, and advanced age-related macular degeneration", *JAMA* 272 1413-1420 (1994)
- 28 Snodderly D M та ін, "The macular pigment I Absorbance spectra, localization and discrimination from other yellow pigments in primate retinas", *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 25 660-673 (1984)
- 29 Sperduto R D та ін, "Do we have a nutritional treatment for age-related cataract or macular degeneration?" *Arch Ophthalmol* 108 1403-1405 (1990)
- 30 Taylor A та ін, "Oxidation and aging impact on vision", *Journal of Toxicology and Industrial Health*, 9 349-371, (1993)
- 31 Vaughn D та Asbury T. *General Ophthalmology*, 13-е вид (Appleton and Lange, Norwalk, CT, 1992)
- 32 Wald G, "The photochemistry of vision", *Doc Ophthalmol* 3 94 (1949)
- 33 Walter J J та ін, "Central sparing in annular macular degeneration", *Am J Ophthalmol* 106 286-292 (1988)
- 34 Werner J S та ін, "Aging and human macular pigment density", *Vision Res* 27 257-268 (1987)

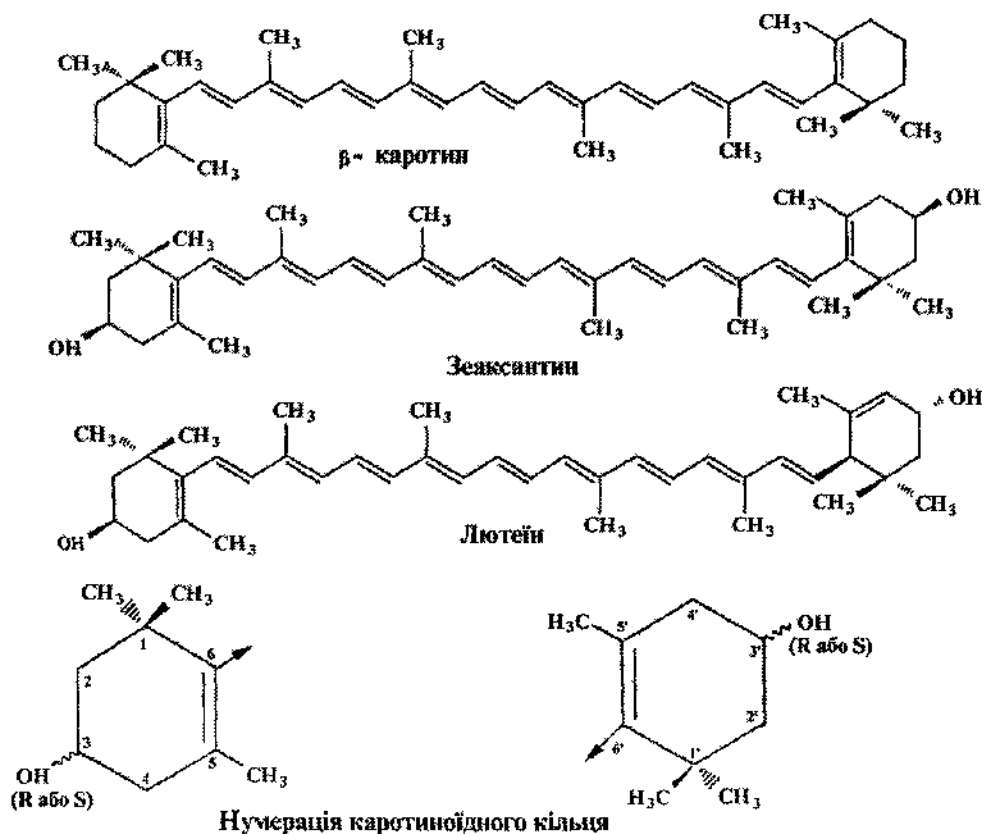
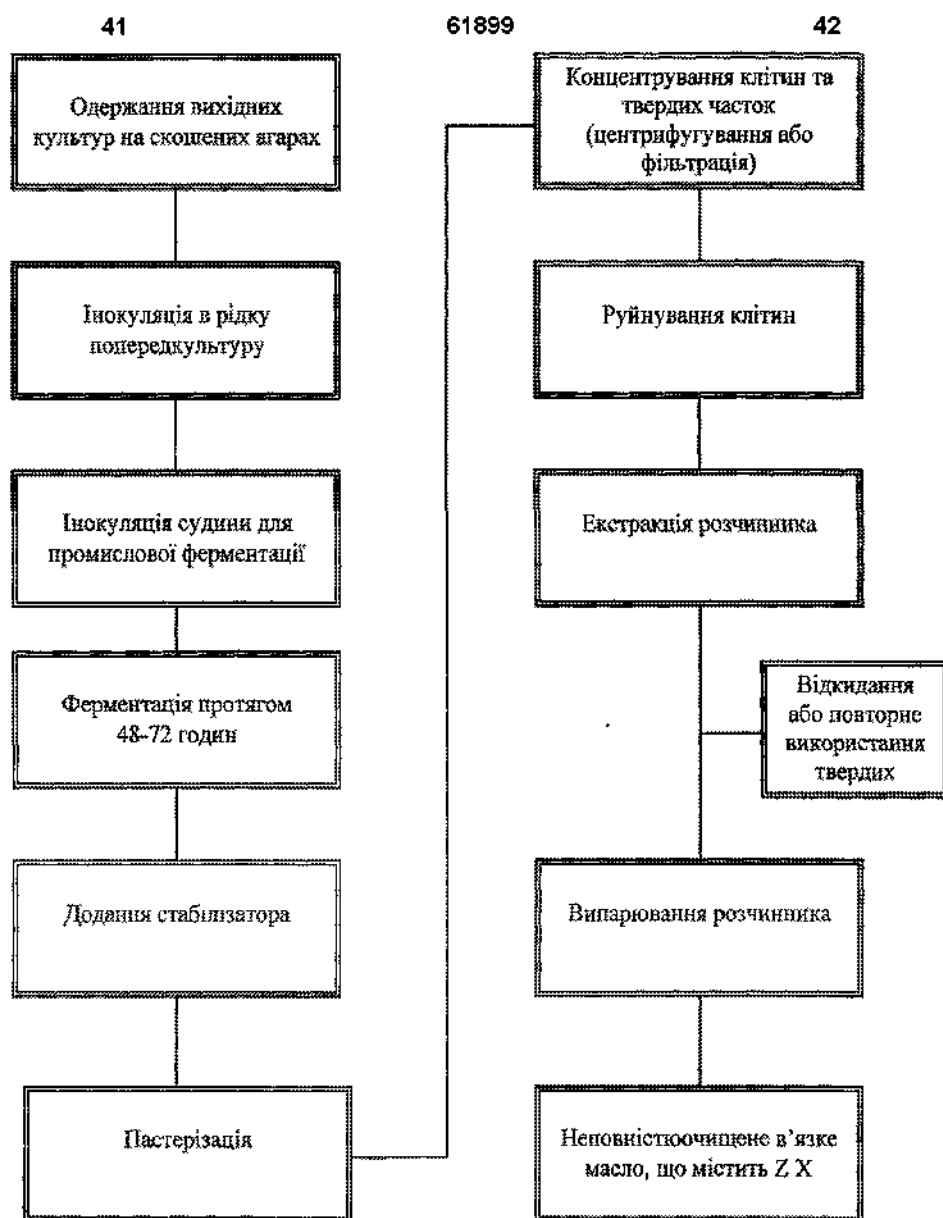


Fig. 1



Фіг. 2