

# Suvremeni farmaceutski oblici za topikalno liječenje glaukoma

---

Ranteš, Zrinoslav

Professional thesis / Završni specijalistički

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:275589>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

**Zrinoslav Ranteš**

SUVREMENI FARMACEUTSKI OBLICI ZA TOPIKALNO LIJEČENJE

GLAUKOMA

**Specijalistički rad**

Zagreb, 2019.

PSS studij: Poslijediplomski specijalistički studij Razvoj lijekova

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Ivan Pepić

Specijalistički rad obranjen je dana 8. veljače 2019. godine na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, Domagojeva 2, pred povjerenstvom u sastavu:

1. izv. prof. dr. sc. Jasmina Lovrić
2. izv. prof. dr. sc. Ivan Pepić
3. doc. dr. sc. Mia Zorić Geber, dr. med. specijalist oftalmologije

Rad ima 47 listova.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Ivana Pepića.

Zahvaljujem svima koji su sudjelovali u izradi ovog rada, prvenstveno svom mentoru. Također zahvaljujem svojoj obitelji na podršci i strpljenju.

## Sažetak

### Cilj istraživanja

Cilj ovog rada je opisati svojstva i razvoj novih farmaceutskih oblika za topikalno liječenje glaukoma. Shodno tome, opisan će se različite strategije isporuke antiglaukopskih lijekova na ciljna mjesta djelovanja - u prednje i stražnje segmente oka. Bit će navedene prednosti kao i nedostaci svake od tehnika s osvrtom na njihovu eventualnu primjenjivost kao buduće terapije u kliničkom okruženju.

### Materijal/ispitanici i metode

U istraživanju su korišteni podaci dobiveni pretraživanjem literaturnih baza podataka prema tematici relevantnoj za izradu specijalističkog rada od općih prema specijaliziranim člancima. Podaci su proučeni kritički obzirom na problematiku razvoja farmaceutskih oblika za topikalno liječenje glaukoma.

### Rezultati

U cilju povećanja bioraspoloživosti oftalmoloških lijekova razvijene su različite tehnike za produljenje vremena kontakta između oftalmika i očnih tkiva. Neke od tehnika navedenih u nastavku opisane su u ovom radu:

- Povećanje permeabilnosti rožnice kemijskim i farmaceutskim modifikacijama (prolijekovi, pojačivači prijenosa, ionski parovi, iontoforeza, ciklodekstrini)
- Povećanje zadržavanja lijeka u vehikulumu (suspenzije, viskozni sustavi, *in situ* gelovi)
- Povećanje zadržavanja lijeka korištenjem koloidnih disperzijskih sustava (liposomi, emulzije, nanočestice i nanokapsule)

- Povećanje zadržavanja lijeka pomoću čvrstih polimernih matriksa i sustava (razgradljivi i nerazgradljivi matriksi, kolageni štitovi, kontaktne leće)
- Implantabilni sustavi

Također se intenzivno radi na razvoju novih sustava isporuke lijeka čime bi se dodatno povećala učinkovitost terapije glaukoma.

### **Zaključak**

Razvoj novih farmaceutskih oblika za primjenu lijekova u oko je relativno složen i dugotrajan postupak kojim je potrebno potvrditi učinkovitost isporuke lijeka, sigurnost primjene te osigurati prikladnu kakvoću razvijenog farmaceutskog oblika lijeka. Novorazvijene formulacije trebaju biti biokompatibilne, netoksične i sa što je moguće manjim utjecajem na vidno polje oka. Također je potrebno voditi računa o ispravnosti primjene lijeka od strane bolesnika. Sadašnja i buduća istraživanja usmjerena na ove čimbenike doprinjet će razvoju novih sustava za isporuku oftalmoloških lijekova i dovesti do napretka u topikalno liječenju glaukoma.

## Summary

### Objectives

The aim of this paper is to describe the properties and development of new pharmaceutical forms for topical treatment of glaucoma. Accordingly, different strategies for delivering antiglaucoma drugs to the target sites - in the front and back of the eye will be described. The paper will also list the advantages as well as the disadvantages of each technique with reference to their possible applicability as future therapies in the clinical environment.

### Material/Patients and Methods

This research used the data obtained by searching literary databases for the themes relevant to the creation of final paper, ranging from general to specialized articles. The data were studied critically considering the development of pharmaceutical forms for topical treatment of glaucoma.

### Results

In order to increase the bioavailability of ophthalmic drugs, various techniques have been developed to extend the contact time between ophthalmic and ocular tissues. Some of the techniques stated below are described in this paper:

- Improvement of corneal permeability by chemical and pharmaceutical modifications (pro-drugs, transmitters, ion pairs, iontophoresis, cyclodextrins)
- Increase in drug retention by the vehicle (suspensions, viscous systems, in situ gels)
- Improvement in drug retention by using colloidal dispersion systems (liposomes, emulsions, nanoparticles and nanocapsules)

- Increase in drug retention by solid polymeric matrix and devices (degradable and non-degradable matrices, collagen shields, contact lenses)
- Implantable systems

There are intensive investigations in the field of development of new drug delivery systems that would further increase the effectiveness of glaucoma therapy.

### **Conclusion**

The development of new pharmaceutical forms for eye medicines in the treatment of glaucoma is a relatively complex and prolonged process that requires verification of appropriate drug delivery, safety of administration, and the assurance of the adequate quality of the developed pharmaceutical formulation. Newly formulated medicines should be biocompatible, non-toxic and with minimum hindering of field of vision. It is also necessary to take into account the correctness of the administration by patients. Current and future research focused on these factors will contribute to the development of new delivery systems for ophthalmic drugs and lead to progression in topical glaucoma treatment.



Sadržaj

<b>1. Uvod i pregled područja istraživanja .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Cilj istraživanja .....</b>	<b>2</b>
<b>3. Materijali i metode – Sustavni pregled saznanja o temi .....</b>	<b>3</b>
<b>3.1. Kontaktne leće .....</b>	<b>4</b>
<b>3.1.1. Načini uporabe kontaktnih leća u liječenju glaukoma.....</b>	<b>6</b>
<b>3.2. Hidrogelovi.....</b>	<b>17</b>
<b>3.3. Micele.....</b>	<b>22</b>
<b>3.4. Mikročestice .....</b>	<b>27</b>
<b>3.5. Nanočestice.....</b>	<b>30</b>
<b>3.6. Pojačivači prijenosa .....</b>	<b>32</b>
<b>3.7. Genska terapija.....</b>	<b>33</b>
<b>4. Rasprava.....</b>	<b>37</b>
<b>5. Zaključak .....</b>	<b>39</b>
<b>6. Literatura.....</b>	<b>40</b>
<b>7. Životopis.....</b>	<b>46</b>

## 1. Uvod i pregled područja istraživanja

Glaukom je drugi vodeći uzrok sljepoće u svijetu pri čemu povišeni intraokularni tlak predstavlja faktor rizika. Očekuje se da će ukupna prevalencija glaukoma u Sjedinjenim Američkim Državama porasti gotovo trostruko do 2050.g. Najčešće propisivana terapija za glaukom provodi se samostalnim ukapavanjem hipotenzivnih lijekova u obliku kapi za oko. Međutim, nepridržavanje odgovarajućeg rasporeda ove terapije može dovesti do progresije glaukoma s posljedičnim gubitkom vida i sljepoćom. Povećani morbiditet zbog progresije glaukoma rezultira znatnim povećanjem troškova zdravstvene zaštite. Zabilježeno je da samo oko 30% bolesnika ima visoku razinu adherencije propisanoj terapiji kapima za oko. Većina pacijenata, pak, ima nedovoljnu razinu adherencije što se pripisuje učestaloj potrebi kapanja te, u manjoj mjeri, teškoćama kod primjene kapi. Nadalje, ovo vodi do dodavanja više lijekova u terapiju jer liječnik može smatrati da propisani lijek nije učinkovit, a ustvari isti niti ne dopire u oko propisanom učestalošću.

Nažalost, čak i uz ispravnu primjenu kapi ostaje problem da manje od 10% ukupne količine lijeka dospjeva u ciljna tkiva oka. Ostatak primijenjene doze se gubi ispiranjem ili radi sistemske apsorpcije preko nazolakrimalnog sustava. Ova smanjena učinkovitost može dovesti do sistemskih nuspojava odnosno potrebe primjene visokih koncentracija lijeka u kapima da bi se ostvario terapijski učinak. Iz tog razloga danas se istražuje čitav niz alternativnih pristupa terapiji glaukoma koji, između ostalih, uključuju kontaktne leće, očne umetke, injekcije i brojne tvari koje se dodaju kapima za oko za povećanje njihove učinkovitosti.

## 2. Cilj istraživanja

Kapi za oko su trenutno najčešće primjenjivani farmaceutski oblici u terapiji glaukoma. U novije vrijeme se, međutim, intenzivno radi na otkrivanju i unapređenju novih sustava isporuke antiglaukomačkih lijekova u odgovarajuće dijelove oka. Stoga je težište ovog rada stavljeno na osobine i razvoj novih topikalnih farmaceutskih oblika s ciljem opisivanja čimbenika koji se moraju uzeti u obzir tijekom njihovog razvoja te davanja kritičkog osvrta na prednosti i nedostatke svakog od opisanih farmaceutskih oblika.

U tu svrhu provede će se pretraživanje literaturnih baza podataka prema ključnim riječima: *novel glaucoma therapy, contact lenses, micro/nanoparticles, in situ forming gels i sl.*

Izdvojit će se najvažniji rezultati i rasprave povezane s dosadašnjim razvojem navedenih lijekova te osvrnuti na mogućnosti daljnjeg razvoja i unapređenja sustava za isporuku antiglaukomačkih lijekova.

### 3. Materijali i metode – Sustavni pregled saznanja o temi

Ovaj specijalistički rad opisuje saznanja o razvoju farmaceutskih oblika za primjenu lijekova u oko koji se koriste za lokalno liječenje glaukoma.

Procjenjuje se da oko 2,2 milijuna ljudi u Sjedinjenim Američkim Državama i oko 67 milijuna ljudi širom svijeta boluje od glaukoma koji je drugi vodeći uzrok nepovratnog gubitka vida. Glaukom je bolest kod koje degeneriraju aksoni ganglijskih stanica mrežnice što, ukoliko se ne liječi, dovodi do sljepoće.

Učestalost glaukoma raste sa starenjem populacije. Predviđa se da će tijekom sljedećih 15 godina ova bolest pogađati 50% više ljudi. Danas su dostupni brojni lijekovi protiv glaukoma, a glavni izazov predstavlja njihova dostava u oko. S razvojem novih klinički prikladnih platformi za dostavu lijeka postoji dobra mogućnost poboljšanja kliničkih ishoda liječenja (63).

Konvencionalna prva linija terapije glaukoma uključuje primjenu jednog ili više pripravaka u obliku kapi za oko koji su dizajnirani tako da snižavaju intraokularni tlak za najmanje 25% računajući pojedinačne čimbenike rizika i ozbiljnost bolesti. Vrijeme kontakta topikalno primijenjenih lijekova s površinom oka je ograničeno zbog kontinuiranog izlučivanja suzne tekućine što smanjuje bioraspoloživost lijeka. Stoga se manje od 5% lokalno primijenjenog lijeka apsorbira preko rožnice u oko. Drugi nedostaci topikalnih kapi za oko su ograničen kapacitet svoda vežnjače za lijek, problematičan raspored doziranja te poteškoće u primjeni lijeka. Također tu je ispiranje lijeka u nazolakrimalni kanal, vezanje na melatonin ili proteine kao i metabolizam lijeka unutar očnih tkiva. Različiti štetni učinci povezani s lokalnom primjenom lijekova protiv glaukoma mogu imati negativan učinak na pacijentovo pridržavanje liječenja, odnos liječnika i pacijenta te ukupnu kvalitetu života pacijenta. U cilju poboljšanja učinkovitosti liječenja i kliničkih ishoda, nedavna istraživanja su koncentrirana na razvoj novih sustava za postizanje trajne dostave lijeka za liječenje glaukoma (62).

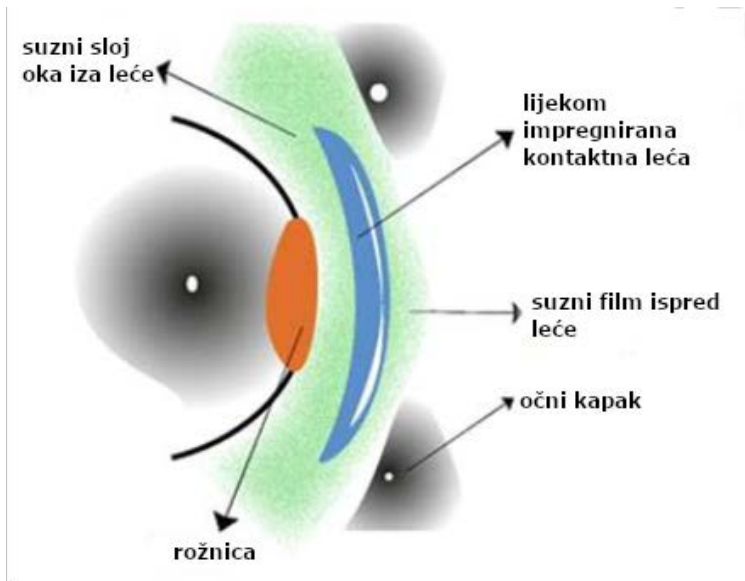
### 3.1. Kontaktne leće

Kontaktne leće za oftalmološku dostavu lijekova postale su vrlo popularne zbog svojih jedinstvenih prednosti poput produljenog nošenja te postizanja više od 50% biodostupnosti. Kako bi se osigurala kontrolirana i stalna isporuka lijeka iz kontaktnih leća, istražuju se različiti sustavi kao što su polimerne nanočestice, mikroemulzije, micelle, liposomi, uporaba vitamina E, itd. Brojni znanstvenici rade na različitim područjima primjene terapijskih kontaktnih leća za liječenje bolesti oka koristeći različite tehnike uklapanja lijeka, poput namakanja (*soaking*), molekularnog utiska (*molecular imprinting*), koloidnih nanočestica, ionskih polimernih sustava s ligandima, superkritičnih fluida itd. Iako je ovim tehnikama postignuto produljeno oslobađanje lijeka iz kontaktnih leća, utjecaj na kritična svojstva kontaktnih leća kao što su sadržaj vode, mehanička svojstva, ionska propusnost/propusnost za kisik te prozirnost ograničava komercijalizaciju terapijske primjene kontaktnih leća. Isto tako, još uvijek postoje problemi vezani uz stabilnost tijekom izrade, sprječavanje naglog oslobađanja lijeka kinetikom nultog reda, oslobađanja lijeka tijekom ekstrakcije monomera nakon proizvodnje (za uklanjanje neizregiranih monomera), vezanja na proteine, oslobađanja lijeka tijekom čuvanja u otopini, stabilnosti kao i analize omjera troškova i koristi i sl. (64).

Površina oka lako je dostupna za djelovanje lijekova što ovaj put primjene čini poželjnim za liječenje očnih poremećaja. Najčešći farmaceutski oblik za topikalnu primjenu su kapi za oči (kao sterilna otopina ili suspenzija) što čini više od 90% svih oftalmoloških formulacija. Međutim, glavno ograničenje navedenih oblika je kratko vrijeme zadržavanja lijeka u rožnici radi brzog uklanjanja i učinka razrjeđenja suzama. Osim toga, zbog činjenice da se 50-100% primijenjene doze uklanja preko nazolakrimalnog kanala, lijek se može apsorbirati u probavnom sustavu i ostvariti sistemski učinak. Stoga ovi lijekovi imaju vrlo nisku biodostupnost (između 1 i 5%) i skraćno vrijeme zadržavanja u suznom filmu, samo 2-3 minute, pa je zato potrebna primjena visokih doza lijeka kako bi se postigao terapijski učinak. Štoviše, primjena kapi za oko zahtijeva određenu razinu spretnosti što nije uvijek lako ostvarivo naročito kod starije populacije. Niska adherencija te posljedični neuspjeh terapije kapima za oko najznačajnije je povezana s nesposobnošću pacijenata za pravilno ukapavanje, a visoka učestalost doziranja dovodi do zaboravljivosti u primjeni lijeka (66).

Pojava kontaktnih leća za korekciju vida otvorila je mogućnost za postizanje kontroliranog i trajnog oslobađanja lijeka u oku bez rizika kompromitiranja optičkih performansi. Leće se sastoje od zakrivljenih plastičnih diskova koji prijanjaju na suzni film rožnice radi svoje površinske napetosti. Mogu se koristiti za ispravljanje problema vida, ali i u kozmetičke ili terapijske svrhe. Kontaktne leće se mogu klasificirati u dvije skupine: krute - uglavnom se sastoje od poli (metilmetakrilata) (PMMA) i meke (želatinozne) - uglavnom su građene od polimera hidroksietil metakrilata (pHEMA). FDA ih također klasificira kao hidrofilne (sufiks *-filcon*) ili hidrofobne (sufiks *-focon*). Zbog svoje visoke sposobnosti zadržavanja vode hidrofilne kontaktne leće mogu se koristiti dulje vrijeme (do 6 noći i 7 dana). Radi potrebe povećanja propusnosti leća za plinove za produljeno nošenje proizvedene su i leće koje omogućuju nošenje 29 noći i 30 dana bez rizika hipoksije oka.

Praktički od nastanka kontaktnih leća više studija pokazalo je kako one mogu biti prikladni sustavi za primjenu lijekova kod liječenja nekoliko kroničnih i akutnih poremećaja oka. Terapijske kontaktne leće sadrže polimerni pHEMA matriks sa ili bez silikona, impregnirane lijekovima različitim tehnikama: namakanje u otopini s lijekom, leće s nanešenim koloidnim česticama lijeka, tehnike molekularnog utiska, ionskih liganada ili gelova s mikroemulzijom. Mehanizam djelovanja ovih sustava uključuje difuziju lijeka u suzni film iza leće, a zatim disperziju u suznoj tekućini i naknadnu apsorpciju u rožnici (Slika 1). Zbog konstantne apsorpcije lijeka kroz rožnicu, koncentracija u suznoj tekućini ostaje niža nego u leći, čime se stvara konstantni i produljeni protok lijeka iz leće u rožnicu (*engl. sink effect*). Ovom metodom postiže se produljenje učinka lijeka (oko 30 minuta) u odnosu na približno 2 minute u slučaju kapi za oko te bioraspoloživost od 50% ili više. U konačnici, dolazi do povećanja terapijskog učinka i smanjenja količine primijenjenog lijeka. Primjena kontaktnih leća smanjuje potrebu za dodavanjem pojačivača propusnosti i konzervansa koji se obično koriste u višedoznim kapima za oko, a koji mogu uzrokovati iritacije.



**Slika 1.** Oslobađanje lijeka na površini oka primjenom kontaktnih leća (prilagođeno prema literaturnom navodu 66)

### 3.1.1. Načini uporabe kontaktnih leća u liječenju glaukoma

#### Namakanje u otopini lijeka

Radi se o konvencionalnom i najjednostavnijem načinu za uklapanja lijeka u kontaktne leće pri čemu se leće namaču u otopini lijeka nakon čega se lijek može osloboditi u suznom filmu ispred odnosno iza leće u oku. Kontaktne leće imaju unutarnje kanale/šupljine kojima primaju molekule lijeka, a njihova sposobnost skladištenja snažno ovisi o sadržaju vode, debljini leće, molekulskoj masi lijeka, vremenu namakanja te koncentraciji lijeka u otopini. Alternativno, kontaktne leće se mogu umetnuti u oko i zatim nanijeti otopina lijeka. Ovim metodama poboljšava se apsorpcija i oslobađanje lijeka u/iz kontaktnih leća.

Uporaba terapijskih kontaktnih leća pripremljenih namakanjem u otopini lijeka opisana je u radovima mnogih istraživača (npr. timolol, (1), pilokarpin (2), deksametazon (3), hijaluronska kiselina (4), brimonidintartarat (5) itd.). Soluri i suradnici istražili su tehnologiju namakanja ketotifenfumarata i utvrdili da su leće s nabijenom površinom (dnevne jednokratne leće) pokazale poboljšanje u unosu i trajanju oslobađanja lijekova. Kontaktne leće premašile su ukupnu koncentraciju lijeka ukapanog dvaput dnevno (0,025% otopina ketotifenfumarata) putem klasičnih kapi za oko. Primjenom leća došlo

je do naglog oslobađanja i postizanja plato koncentracije unutar nekoliko sati (6). Xu i suradnici su u svojem radu procijenili postupak namakanja, za uklapanje ketotifenfumarata u silikon hidrogelne kontaktne leće. Apsorpcija lijeka i *in vitro* kinetika oslobađanja pokazale su se ovisnima o sastavu hidrogela (tj. hidrofilnih/hidrofobnih monomera). Unos lijeka u leće rastao je s povećanjem udjela hidrofilne faze, dok je produljeno oslobađanje zabilježeno povećanjem udjela hidrofobne faze u matriksu kontaktnih leća. U pokusima na životinjama pokazana je stabilnija koncentracija lijeka (<24 sata) u suznoj tekućini u odnosu na terapiju kapima za oko (7).

Ispitivanje *in vitro* oslobađanja timololmaleata i brimonidintartarata namakanjem leća u otopini lijeka pokazalo je naglo oslobađanje uz postizanje platoa unutar 1 h, dok su klinički podaci kod pacijenata oboljelih od glaukoma (nošenje leća 30 minuta na dan tijekom 2 tjedna) ukazali na sniženje intraokularnog tlaka ekvivalentno terapiji kapima za oko u 10 puta nižoj dozi (5).

Za postizanje produljenja oslobađanja, Kim i suradnici variranjem udjela monomera razvili su silikonske leće s mogućnosti produljenog nošenja s ciljem produljene isporuke lijekova (timolol, deksametazon i deksametazon 21-acetat) tijekom tjednog ili mjesečnog perioda (3).

Garcia i suradnici poboljšali su kapacitet unosa triamcinolon acetonida moduliranjem profila oslobađanja lijeka optimiziranjem sastava monomera u hidrogelu i mikrostrukturnim modifikacijama koristeći vodu u proizvodnom postupku za mekane leće (8).

Iako je metoda namakanjem jednostavna i jeftina, postoje određena ograničenja u primjeni. Visoka molekulska masa lijekova ili polimera (npr. hijaluronska kiselina) ograničava uspješnost uklapanja lijeka u vodene kanale kontaktnih leća uzrokujući zadržavanje samo na površini, a što u konačnici rezultira slabijim rezultatima u liječenju sindroma suhog oka (4). Kontaktne leće posjeduju nizak afinitet vezanja za većinu oftalmoloških lijekova te dolazi do slabog zadržavanja u leći i brzog oslobađanja koje prati strmi pad koncentracije što ukazuje da terapijske koncentracije nisu postignute (5; 9). Lijekovi kao prednizolon, pikokarpin, ciprofloksacin, ketotifenfumarat, timolol, hijaluronska kiselina oslobođeni su iz hidrogelnih leća u roku od nekoliko sati (10; 11; 12; 13). Također, manji broj



znanstvenika proučavao je učinke sterilizacije i opremanja lijeka koji mogu utjecati na prijevremeno oslobađanje djelatne tvari.

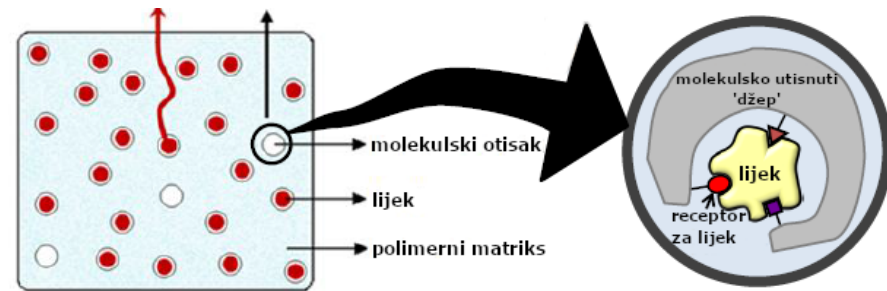
Kontaktne leće načinjene uklapanjem latanoprostu u film poli(laktat-ko-glikolne kiseline) u metafilkonu putem UV polimerizacije, u *in vitro* i *in vivo* studijama pokazale su početno naglo oslobađanje praćeno produljenim oslobađanjem tijekom jednog mjeseca. Pritom je koncentracija latanoprostu u očnoj vodici tijekom tog vremena bila usporediva s koncentracijom nakon primjene kapi za oko s latanoprostom. Uporaba leća pokazala se sigurnom u ispitivanju na kulturama stanica i animalnim studijama. Ovaj put primjene latanoprostu mogao bi poslužiti kao alternativna terapija glaukoma te kao platforma za liječenje drugih bolesti oka (69).

#### **Metoda molekulskih otisaka (*engl. molecular imprinting*)**

U ovoj tehnici, lijek se miješa s funkcionalnim monomerima koji se raspodjeljuju stupanjem u interakcije s molekulama lijeka. Nakon polimerizacije lijek se uklanja iz kontaktne leće pri čemu nastaju prilagođena aktivna mjesta otisnutih 'džepova' koji se nazivaju makromolekulska memorijska mjesta, tj. 3D struktura lijeka zaostaje unutar fleksibilne makromolekulske mreže. Monomeri hidrogelnog matriksa tada su organizirani na takav način da se stvaraju molekularna mjesta s visokim afinitetom za lijek koja oponašaju receptore za lijek ili njihove strukturne analoge. Ovime se postiže povećanje uklapanja lijeka u kontaktne leće (14; 15; 16). Pritom je afinitet i profil oslobađanja lijeka reguliran vrstom funkcionalnog monomera kao i njegovim omjerom u polimernom matriksu. Ovom metodom mogu se stvoriti stabilne utisnute šupljine povećavanjem stupnja umrežavanja (*engl. cross linking*) u hidrogelnom matriksu (17; 18; 20; 19; 21).

Ugradnja MAA (metakrilatna kiselina) kao ko-monomera u hidrogel rezultira povećanjem kapaciteta uklapanja timolola (14). Dvostruko povećanje u trajanju oslobađanja lijeka zabilježeno je uvećanjem omjera MMA/lijek (1:16-1:32) (15). Otisnuti hidrogelovi načinjeni s 1:4 omjerom norfloksacina i akrilatne kiseline pokazali su maksimalno produljeno oslobađanje do 24 sata (17). Korištenjem više monomera pokazan je osam puta veći unos lijeka s produljenim oslobađanjem u odnosu na korištenje samo jednog monomera (19). Ispitivani lijekovi izrađeni metodom molekulskih otisaka korišteni su u liječenju sindroma suhog oka korištenjem 120 kDa hidrokispropilmetilceluloze (HPMC) te je

postignuto produljeno oslobađanje do 60 dana brzinom 16  $\mu\text{g}/\text{dan}$  uz zabilježene značajne varijabilnosti u različitim omjerima monomer/matriks (22).



**Slika 2.** Oslobađanje lijeka iz kontaktnih leća metodom molekuskog otiska (prilagođeno prema literaturnom navodu 66)

### Kontaktne leće s koloidnim nanočesticama

Ova metoda temelji se na svojstvu koloidnih nanočestica (polimerne nanočestice, liposomi, niosomi, mikroemulzije, micelle itd.) da uklapaju lijek kontrolirajući time njegovo oslobađanje iz kontaktnih leća (23; 24; 25). Za proizvodnju kontaktnih leća koristi se formulirani sustav nanočestica (10 do 100 nm) dispergirani u HEMA monomeru i polimerizirani korištenjem etilen glikol-dimetakrilata (EGDMA) i fotoinicijatora (Darocur<sup>®</sup>) (26; 27). Nanočestice s uklopljenim lijekom sprečavaju interakciju lijeka sa smjesom za polimerizaciju te daju dodatnu otpornost na oslobađanje lijeka. Stoga kontaktne leće s nanočesticama mogu isporučiti lijek kontroliranom brzinom tijekom duljeg vremena. Nanočestice s uklopljenim lijekom do neke mjere zaobilaze metabolizam lijekova posredovan lizozomima prisutnima u suzama i epitelnom sloju rožnice (28; 29; 24). U studiji iz 2013. godine timolol dispergirani u PGT nanočesticama (u omjeru 1:1) ugrađeni su u hidrogelne kontaktne leće (u udjelu od 5% čestica) te su ispitani profili oslobađanja i sve osobine važne za produljeno nošenje leća (prozirnost, mehanička svojstva i propusnost za kisik i ione). *In vivo* studijama na Beagle psima potvrđena je sigurnost i učinkovitost ovakve terapije glaukoma. Zaključeno je da čestice timolol-PGT pokazuju produljeno oslobađanje najvjerojatnije radi polagane hidrolize esterskih veza. Proizvedeni hidrogel bio je proziran, a oslobađanje lijeka produljeno je na mjesec dana pri sobnoj temperaturi pri čemu je kumulativno oslobađanje značajno ovisilo o temperaturi što sugerira da je ograničavajući korak brzine hidroliza esterskih veza koje povezuju timolol i PGT čestice. Ukupno, dobiveni rezultati

su vrlo ohrabrujući, ali su potrebna daljnja ispitivanja sigurnosti, farmakokinetike i farmakodinamike na većim životinjama. Također, potrebna su dugoročna ispitivanja stabilnosti u varijabilnim uvjetima čuvanja da bi se razvio sustav s dovoljno dugim rokom valjanosti (68).

Istraživanjima ovom metodom uspješno su razvijene kontaktne leće za produljenu primjenu lijeka istodobnim mijenjanjem optičke transparentnosti, propusnosti za ione i kisik, mehaničkih svojstava i svojstava bubrenja leća u cilju zadržavanja udobnosti nošenja leća.

### Polimerne nanočestice

Mnogi istraživači usredotočili su napore u razvijanju polimernih nanočestica koristeći biorazgradive i nebiorazgradive polimere za lijekove u liječenju glaukoma. Leće proizvedene dispergiranjem timololom uklopljenih propoksiliranih gliceril triacilat (PGT) nanočestica u kontaktnim lećama dobivenim *in vitro* profilima oslobađanja pokazale su prisutnost lijeka i nakon jednog mjeseca, a studije u Beagle pasa potvrdile su snižavanje intraokularnog tlaka. Međutim, došlo je do smanjenja propusnosti za ione i kisik te promjena u mehaničkim svojstvima što ukazuje na ograničenja ove tehnike (24). U drugom istraživanju visoko umrežene nanočestice veličine 3,5 nm s uklopljenim timololom dispergirane su u kontaktnim lećama te je pokazano povećanje oslobađanja lijeka do četiri tjedna. Korišteni su monomeri s multivinilnim svojstvima kao EGDMA (etilen glikol dimetakrilat) i PGT te je predložen mehanizam transporta lijeka koji uključuje hidrolizu esterskih veza timolola i matriksa nanočestica. Dobiveni rezultati ocijenjeni su ohrabrujućima iako je i u ovom slučaju došlo do sniženja sadržaja vode i promjena mehaničkih svojstava (30). Antimikrobno djelovanje srebrnih nanočestica uklopljenih u hidrogelni matriks ispitano je prema sojevima *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus* te je zaključeno da je učinak dovoljan za smanjenje rizika od nuspojava povezanih s mikrobiološkim djelovanjem (31). *In vitro/in vivo* ispitivanjima oslobađanja lijeka iz kontaktnih leća koje sadrže nanočestice s uklopljenim natamicinom pokazano je produljenje oslobađanja do 8 sati kao i značajno pobošljanje AUC profila i srednjeg vremena zadržavanja na površini oka (MRT) u odnosu na ostale pripravke na tržištu (32). Dispergiranjem albuminom obloženih nanokristala meloksikama u kontaktnim lećama za liječenje postkataraktnog endoftalmitisa pokazano je smanjenje iritacije oka te produljeno oslobađanje lijeka tijekom pet dana (33).

### Ciklodekstrini

Ova metoda podrazumijeva korištenje polimera kao što su ciklodekstrini (CD) i njihovih derivata za postizanje produljenog oslobađanja hidrofobnih molekula. Ciklodekstrini u svojoj hidrofobnoj unutrašnjosti prstenaste strukture mogu se prilagoditi mnogim hidrofobnim molekulama čime se postiže njihovo kontrolirano oslobađanje (34).

Razvijeni su pHEMA/ $\beta$ -CD hidrogelovi kopolimerizacijom HEMA i kompleksa purearin- $\beta$ -CD gdje inkorporacija navedenog u hidrogel rezultira povećanjem bubrenja i vlačne čvrstoće. Rezultati studija na životinjama pokazali su produljeno vrijeme zadržavanja lijeka i povećanje njegove koncentracije u suznoj tekućini i staklastom tijelu u odnosu na konvencionalne hidrogel leće i kapi za oko (35). *In vitro* studijama oslobađanja lijeka iz leća načinjenih s poli-CD hidrogelovima s uklopljenim acetazolamidom i umreženom citratnom kiselinom pokazano je povećanje topljivosti lijeka u poli-CD hidrogelu te povećanje koncentracije u rožnici i oslobađanje tijekom više tjedana (36). Hidrogelovi načinjeni kopolimerizacijom glicil metakrilata (GMA) cijepljenog s  $\beta$ -CD pokazali su povećanje unosa diklofenaka za 1300% bez značajnih izmjena fizikalnih i optičkih svojstava hidrogelnog matriksa. Produljeno oslobađanje u suznoj tekućini postignuto je do dva tjedna (37). Antimikrobne kontaktne leće (s 5,6-dimetoksi-1-indanon N-4-alil tiosemikarbazonom) proizvedene su s pHEMA-co- $\beta$ -CD za isporuku lijeka tijekom 2 tjedna. Na profile unosa i oslobađanja lijeka utjecao je odnos  $\beta$ -CD podjedinica, veličina sita i stupanj bubrenja hidrogela (38). Poboljšanje svojstava ovih sustava za isporuku oftalmoloških lijekova iskušano je i korištenjem  $\beta$ -ciklodekstrin funkcionalnih hidrogelova pri čemu je zabilježeno povećanje hidrofilnosti i smanjenje adherencije na proteine (39).

### Liposomi

Liposomi su biokompatibilni te biorazgradivi zbog svoje strukture nalik biološkim membranama te se stoga koriste u brojnim sustavima isporuke lijeka, uključujući i oftalmološku primjenu putem kontaktnih leća.

Liposomi dimiristol fosfatidilkolina s lidokainom uklopljeni su u materijal kontaktnih leća zadržali su prozirnost uz oslobađanje lidokaina tijekom osam dana (29). Unilamelarni liposomi (REL-ovi) i

multilamelarni liposomi (ML-ovi) s uklopljenim ciprofloksacinom pripremljeni su korištenjem metoda reverznog isparavanja i hidracije lipidnog filma. ML liposomi pokazali su značajnije produljeno oslobađanje u odnosu na REL liposome radi prisutnosti više lipidnih dvosloja. Također, količina uklopljenog i oslobođenog lijeka ovisila je o koncentraciji kolesterola.

U istraživanju na levofloksacinu u prvom koraku korišten je polietilenimin kovalentno vezan na hidroksilne skupine prisutne na površini leća, nakon čega je korištenjem karbodiimidne kemije slijedilo vezanje molekula NHS-PEG-biotina na površini aaminskih skupina. U drugom koraku NeutrAvidin je vezan na sloj PEG-biotina i liposomi koji sadrže PEG-biotinilirane lipide vezani su na NeutrAvidin. Naknadnim dodavanjem NeutrAvidina i liposoma postignuto je formiranje višeslojnog sustava (40; 41). Biokompatibilnost kontaktnih leća s liposomima koji sadrže lijek pokazana je studijom citotoksičnosti. Leće s dva sloja liposoma zabilježile su oslobađanje lijeka do 30 sati, dok su one s 10 slojeva imale oslobađanje do 120 sati (42).

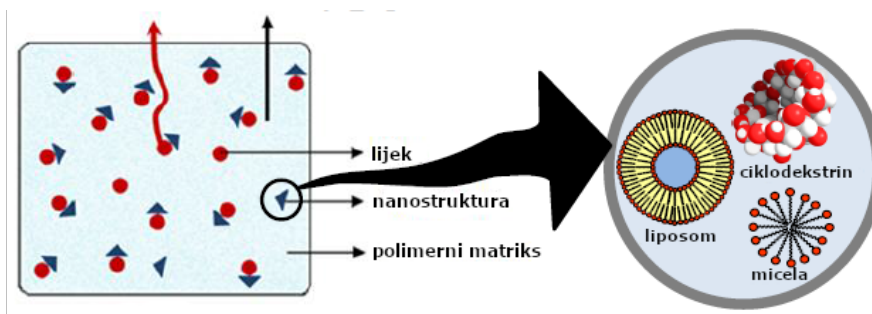
Iako je ova metoda obećavajuća, prisutnost višeslojnih liposoma smanjuje propusnost za kisik i ugljikov dioksid.

### **Mikroemulzije i micelle**

Mikroemulzije s lijekom i terapijske kontaktne leće s micelama pokazale su obećavajuće rezultate zbog svoje termodinamičke stabilnosti, jednostavne pripreme, visokog kapaciteta za lijek, povećane moćivosti (niska adherencija za proteine) i jednostavne optimizacije profila oslobađanja. Zbog nano veličine (<100 nm) optička svojstva hidrogela ostaju nepromijenjena.

Razvijene su kontaktne leće s timololom pomoću mikroemulzije tipa ulje/voda korištenjem etil butirata i Pluronic F127 pri čemu je došlo do kontroliranog oslobađanja timolola radi prisutnosti čvrsto pakiranog surfaktanta na granici ulja i vode (43). ACUVUE® kontaktne leće s ionskim surfaktantima za povećanje afiniteta ionskog deksametazon 21-dinatrijevog fosfata pokazale su povećanje moćivosti (tj. smanjenje adsorpcije proteina na površini leće) uz očuvana optička svojstva. Uz koncentraciju od 10% surfaktanta, oslobađanje lijeka produljeno je s 2 sata na 50 sati (44). Leće s timololom

uklopljenim u mikroemulziju i dodatno stabiliziranog oktadeciltrimetoksisilanom (OTMS) te dispergirano u hidrogelu pokazale su produljeno oslobađanje tijekom osam dana bez negativnog učinka na prozirnost hidrogela (28). Brij 97 mikroemulzije/micela nanostrukture dispergirane u hidrogelu omogućile su produljeno oslobađanje ciklosporina. Pritom je *in vitro* oslobađanje lijeka iz micela i mikroemulzija bilo otprilike jednako. Načinjeni hidrogelovi zadržali su svoja svojstva čak i nakon procesnog uklanjanja neizreagiranih monomera (ekstrakcija), sterilizacije i pakiranja (45). Hidrogelne kontaktne leće s umreženim metoksi(polietilenglikol)-blok-polikaprolakton (MePEG-b-PCL) micelama (morfologije štapića) razvijene su za produljeno oslobađanje deksametazonacetata. *In vitro* ispitivanjem pokazano je oslobađanje tijekom više od mjesec dana bez izmjene u svojstvima materijala (46). Radi povećanja biodostupnosti ciklosporina ispitivani su Brij hidrogelovi za koje je pokazana veća učinkovitost u odnosu na onu za deksametazon i deksametazon 21 acetat radi njihove slabije raspodjele u lećama s uklopljenim surfaktant-agregatima (47). Adsorpcija proteina na materijalu hidrogela uspješno je smanjena sintezom nove vrste trostruko razgranatog PEG-supstituiranog hidrazida (48).

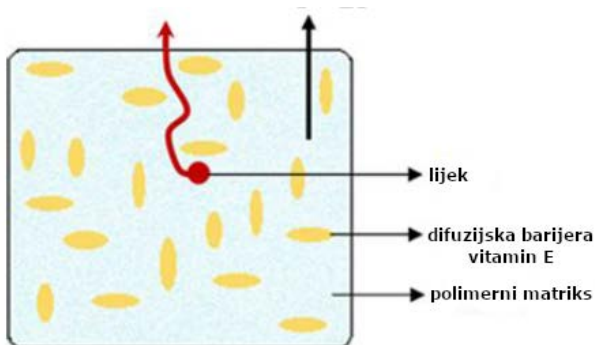


**Slika 3.** Oslobađanje lijeka iz kontaktne leće s nanostrukturama (liposomi, micela, ciklodekstrini) (prilagođeno prema literaturnom navodu 65)

### Uporaba vitamina E

Za dodatno poboljšanje oslobađanja lijeka predložen je način *in situ* stvaranja vitamina E kao barijere prolasku molekula lijeka. Oslobađanje timolola je značajno produljeno porastom koncentracije vitamina E u lećama s 10% na 40% ali je došlo do negativnih utjecaja na propusnost iona i kisika (49). Leće s deksametazonom i 30% vitamina E pokazale su oslobađanje tijekom 9 dana što iznosi

povećanje od 16 puta u odnosu na leće bez vitamina E (50). Silikon hidrogelne leće s ciklosporinom i vitaminom E kao barijerom imale su *in vitro* vrijeme oslobađanja od oko mjesec dana radi visokog koeficijenta raspodjele lijeka u gelu u odnosu na hidrogelne ACUVUE® leće sa samo 24-satnim oslobađanjem (radi svojeg hidrofilnog karaktera) (51). Vitamin E u kontaktne leće ugrađen kao difuzijska barijera, produljio je vrijeme oslobađanja cisteamina s 10 minuta na 3 sata te istovremeno spriječio oksidaciju djelatne tvari (52). Za liječenje postoperacijske boli nakon fotorefraktivne keratektomije razvijene su silikonske kontaktne leće s uklopljenim anestheticima (lidokain, bupivakain, tetrakain) pri fiziološkom pH s nano-hidrofobnim agregatima vitamina E pri čemu je terapijski učinak produljen na 7 dana (53). Ugrađivanjem vitamina E u ACUVUE® True Eye leće zabilježeno je značajno sniženje intraokularnog tlaka u Beagle pasa uz uporabu samo 20% doze lijeka u odnosu na klasičnu terapiju kapima za oko. Korištena je kombinacija djelatnih tvari timolol i dorzolamid te je zahvaljujući fizikalnoj barijeri putem vitamina E postignuto produljeno oslobađanje obje djelatne tvari tijekom oko 2 dana. Pritom je stupanj snižavanja intraokularnog tlaka bio značajno bolji u odnosu na terapiju kapima za oko uz 3-4 puta nižu koncentraciju djelatnih tvari. Produljeno snižavanje tlaka (oko tjedan dana nakon uklanjanja leća) pripisuje se stvaranju depoa s lijekom tijekom nošenja leća te polaganom oslobađanju nakon njihovog skidanja. Ovakvo kontinuirano izlaganje epitelnih stanica lijeku nije dovelo do povećane toksičnosti. Opisani način primjene mogao bi omogućiti značajno bolju suradljivost pacijenata (66).



**Slika 4.** Učinak vitamina E na difuziju hidrofilnog lijeka kroz polimerni matriks hidrofилne kontaktne leće (prilagođeno prema literaturnom navodu 65)

*In vivo* studijom na Beagle psima s timololom uklopljenim u leće ispitivano je oslobađanje vitamina E u suznu tekućinu te su rezultati bili u skladu s ranije dobivenima da se vitamin E ne oslobađa u otopinu PBS (fiziološka otopina fosfatnog pufera) niti nakon 6 mjeseci čuvanja. Prisutnost suznih proteina, mucina i drugih bioloških molekula također nema utjecaj na difuziju vitamina E u suznu tekućinu. Međutim, površinski aktivne djelatne tvari (lidokain i tetrakain) mogu olakšati difuziju vitamina E, ali se radi o niskim koncentracijama i najvjerojatnije netoksičnim, uzimajući u obzir korištenje vitamina E kao dodatka prehrani (67).

Iako je korištenje vitamina E kao biokompatibilni difuzijske barijere za usporavanje oslobađanja mnogih hidrofилnih lijekova obećavajuće, ovom metodom također dolazi do smanjenja propusnosti za ione i zrak te izmjena u mehaničkim svojstvima leća i adsorpcije proteina radi hidrofobnih osobina vitamina E što zajedno donekle ograničava primjenu navedene metode.

### **Metoda superkritičnih tekućina**

Tehnologija superkritične tekućine (SCF) jedna je od najučinkovitijih metoda za uklapanje hidrofилnih i hidrofobnih lijekova u kontaktnim lećama pomoću superkritičnog otapala kao što je CO<sub>2</sub>. Postupak uklapanja uključuje otapanje lijeka u superkritičnom otapalu (pri subkritičnim ili superkritičnim uvjetima) nakon čega slijedi interakcija s hidrogelnim kontaktnim lećama. Pritom količinom uklopljenog lijeka i kinetikom oslobađanja upravljaju procesni parametri kao što je tlak i brzina snižavanja tlaka, temperatura i vrijeme.

Impregniranjem (SSI metodom) acetazolamida i timololmaleata u Balafilcon A kontaktne leće korištenjem diskontinuiranog superkritičnog otapala (CO<sub>2</sub>+EtOH i CO<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O) te modifikacijom sastava i tipa suotapala, omogućeno je optimiranje količine uklopljenog lijeka te profila oslobađanja lijeka iz kontaktnih leća, a bez izmjena u optičkim i fizikalnim svojstvima (54). Razvijena je nova SCF metoda potpomognuta metodom molekulskih otisaka pri čemu su Hilafilcon B kontaktne leće s flurbiprofenom te je u vodenom mediju pokazan veći afinitet za ovu djelatnu tvar u odnosu na ibuprofen i deksametazon što pretpostavlja stvaranje molekulskih udubljenja temeljenih na fizikalno-kemijskim interakcijama. Korištenje SCF tehnike nije dovelo do promjena u funkcionalnim svojstvima



leća te je zabilježen povećan unos i produljeno oslobađanje u odnosu na konvencionalnu metodu molekulskih otisaka (55). Proučavanjem učinka različitih polimera u hidrogelu, procesnog tlaka i vremena trajanja postupka te dodavanja suotapala (etanol) na ukupnu iskoristivost SCF postupka pokazano je da se kontrolom ovih parametara može znatno utjecati na produljeno oslobađanje hidrofилnih i hidrofobnih lijekova (56). Uklapanjem flurbiprofena u poli(metil metakrilat-ko etil heksilakrilat ko- etilenglikol dimetakrilat), P(MMA-EHA-EGDMA) matriks postignuto je oslobađanje lijeka tijekom 3 mjeseca (57). Procjenom utjecaja temperature i tlaka na uklapanje salicilatne kiseline korištenjem SCF CO<sub>2</sub> zabilježeno je da porast temperature i pad tlaka dovodi to produljenog oslobađanja lijeka (58).

### Ostale metode

Kako bi se prevladala ograničenja u oslobađanju lijeka uvjetovana skladištenjem i gubitkom mehaničkih svojstava, timolol u *Nano-Diamond* česticama ugrađen je u kontaktne leće pri čemu je do oslobađanja lijeka došlo samo u prisutnosti enzima (enzim-potaknuta razgradnja kitozana) (59). Zabilježen je porast unosa i oslobađanja gatifloksacina i moksifloksacina iz hidrogelnih kontaktnih leća (anionski monomeri) korištenjem ion-ligandnog mehanizma ukoliko su leće proizvedene s povećanim omjerom anionskih monomera u hidrogelu. Unutar prvog sata sve serije leća imale su naglo oslobađanje koje je bilo praćeno produljenim oslobađanjem tijekom do 72 sata. *In vivo* rezultati pokazali su poboljšanje u prodiranju lijeka u oko kao i u sprečavanju bakterijske proliferacije u odnosu na klasične kapi za oko (60). Leće s vankomicin klorhidratom razvijene su s ciljem prevencije upale nakon umetanja keratoproteze (61).

### 3.2. Hidrogelovi

Primjena lijekova putem lokalnih sustava za isporuku (*engl. local drug delivery - LDD*) predstavlja obećavajući pristup za unapređenje suradljivosti pacijenata i posljedično manje fluktuacije intraokularnog tlaka. Kontinuirana isporuka lijeka smanjuje potrebu za svakodnevnim doziranjem što može povećati adherenciju i poboljšati rezultate liječenja. Istodobno, moguće je ostvariti financijske koristi jer je za postizanje istog učinka potrebno primijeniti manje količine lijeka.

U medicinskoj literaturi navode se različiti pristupi za primjenu topikalnih (na vanjske dijelove oka), implantabilnih i injektibilnih (u unutarnje dijelove oka) LDD sustava.

Razvijeni su biokompatibilni, biorazgradljivi LDD sustavi s uklopljenim lijekom i sastavljenim od dvije komponente: soli natrijevog hijaluronata (HA) i hidrofobnijeg heksametilen diizocijanata (HDI) s funkcionalnim 1,2-etilenglikol bis(dilaktatnom kiselinom) (ELA-NCO). HA dolazi u prirodi kao polisaharid te se uobičajeno koristi u oftalmološkim mikrooperacijskim procedurama radi svojih viskoplastičnih i hidrofilnih svojstava. ELA-NCO sustav je ranije uveden kao u tkivima biorazgradljivi jaki adheziv dobre biokompatibilnosti. Hidrofobni esterski prolijek latanoprost (LA) koji se uspješno koristi u liječenju glaukoma odabran je kao model lijeka i ugrađen u HA/ELA-NCO sustav. *In vitro* ispitivanjem biokompatibilnosti u omjeru HA/ELA-NCO 1:1 nije zabilježeno stvaranje fibrozne kapsule niti pojačane vaskularizacije u oku. Nakon 10 mjeseci biorazgradnja je okončana bez zabilježenog upalnog odgovora. Nije utvrđeno u kojem stupnju su makrofagna fagocitoza i stanični upalni enzimi imali utjecaj na biorazgradnju. U *in vivo* preliminarnom ispitivanju oslobađanje latanoprostna odvijalo se tijekom više od 5 mjeseci uz koncentracije između 5 i 20 ng/ml te je zabilježeno početno naglo oslobađanje unutar 24 sata (179 ng/ml). U studiji su mjerene koncentracije prolijeka latanoprostna (ester), ali ne i slobodne kiseline koja je aktivna molekula. Poznato je da tijekom permeacije latanoprost estera kroz rožnicu dolazi do hidrolize putem kornealnih esteraza. Latanoprost je pritom detektiran u očnoj vodici i krvnom serumu te je zaključeno da na mjestu apsorpcije dolazi i do sistemske apsorpcije. Važna osobitost uporabe LDD je vrijeme razgradnje koje bi trebalo odgovarati vremenu oslobađanja. U ispitivanju je količina latanoprostna

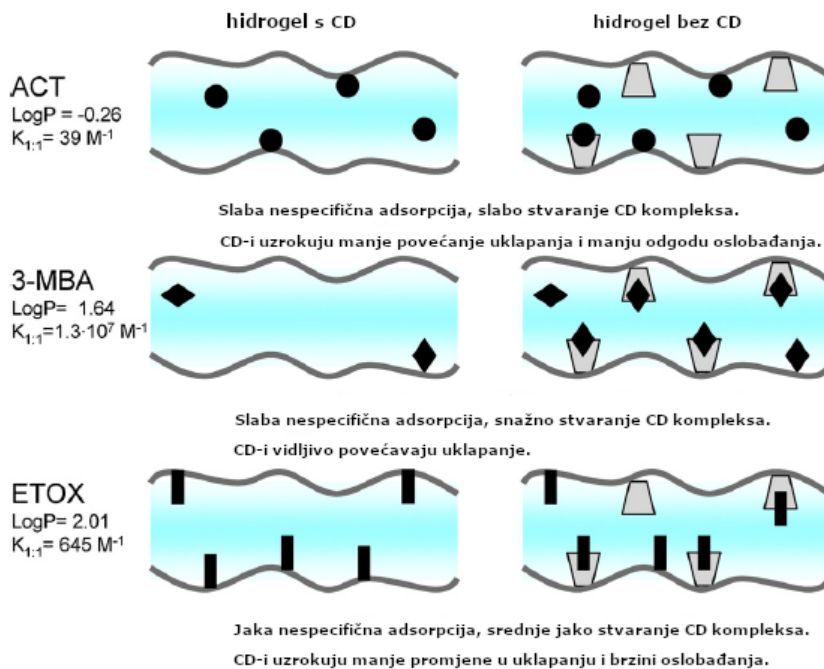
detektirana/kvantificirana tijekom 152 dana, dok je kasnije koncentracija bila ispod granice kvantifikacije (5 ng/ml). Pritom je razgradnja polimera završena tek nakon sljedećih 4 mjeseca kako je pokazano histološkim studijama. Zaključeno je da korelacija *in vivo* oslobađanja lijeka i razgradnje može biti precizno podešena putem omjera HA i ELA-NCO kako bi se skratilo vrijeme razgradnje polimera i umanjilo početno naglo oslobađanje djelatne tvari (70).

Poloksameri (strukturno povezani blok kopolimeri polietilenoksida i polipropilenoksida) ispitivani su kao *in situ* formirajući oftalmološki gelovi radi svoje sposobnosti reverzno-faznog prijelaza iz vodene faze u gel fazu te svojih pseudoplastičnih osobina. Poloksamer 407 (P407) je proučavan pretežno za isporuku lijekova u oko uz dodatak drugih poloksamera kako bi se snizila potrebna koncentracija P407 i prilagodila temperatura geliranja i reološka svojstva ovog *in situ* gela. Poboljšanje biofarmaceutskih svojstava postignuto je dodavanjem poloksamera P188 te kitozana (CS; biorazgradljivi i biokompatibilni polikationski polimer) čime je povećana mehanička otpornost i mukoadhezivna svojstva *in situ* gela. Pristupom kvalitete ugrađene u pripravak (engl. *Quality by design*) određene su minimalne koncentracije P407, P188 i CS potrebne za *in situ* stvaranje gela koji bi osigurao predviđene osobine formulacije. Četiri djelatne tvari (timololmaleat, deksametazon, dorzolamidklorid i tobramicin) različitih fizikalno-kemijskih svojstava uklopljene su u ovaj sustav te je pokazana robusnost uz većinom zabilježeno sniženje temperature geliranja što se pripisuje samouređivanju strukture P407 u prisutnosti hidrofobnih lijekova. Oslobađanje djelatnih tvari iz ovakvih *in situ* gelova primarno je ovisilo o viskoznosti gela, dok je potvrda biokompatibilnosti provedena na 3D modelima dala zadovoljavajuće rezultate (71).

Topikalna primjena inhibitora karboanhidraze prve generacije bila je relativno neuspješna radi niske okularne bioraspoloživosti koja se pripisuje lošem koeficijentu penetracije i niskoj topljivosti u vodi. Navedena ograničenja, barem u nekoj mjeri, mogu biti prevladana pripremom inkluzijskih kompleksa s ciklodekstrinima. Provedeno je ispitivanje utjecaja dvaju prirodnih ciklodekstrina ( $\beta$ -CD i  $\gamma$ -CD) na izmjene unosa i brzinu oslobađanja acetazolamida (ACT) i etokszolamida (ETOX) iz N,N-dimetilakrilamid-co-N-vinilpirolidon (DMA-co-NVP) hidrogela. DMA i NVP su uobičajene sastavnice kontaktnih leća s visokim postotkom vode koje su udobne za nošenje i posjeduju dobru

propusnost za kisik, ali su istodobno nepovoljne za unos hidrofilnih lijekova. Iskušana su dva pristupa unosa lijeka u strukturu leće: (i) sinteza akrilamidometil- $\beta$ -CD i akrilamidometil-  $\gamma$ -CD monomera i kopolimerizacija s DMA i NVP; (ii) usađivanje  $\beta$ -CD i  $\gamma$ -CD u prethodno formirani hidrogel. Ovisno o hidrofobnosti i afinitetu lijeka za ciklodekstrine prepoznata su sljedeća tri scenarija (slika 5.):

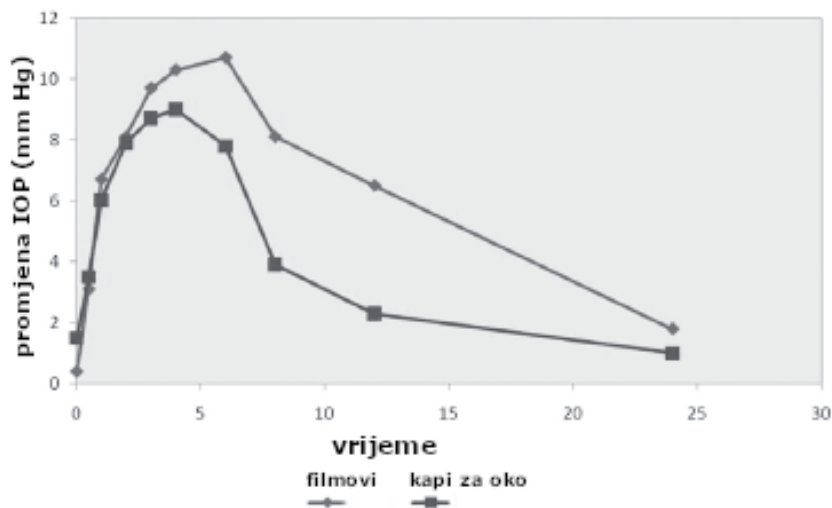
- i. hidrofilne molekule s niskim afinitetom za CD (ACT) se pretežno unose u vodenu fazu hidrogela. Nespecifične interakcije s monomerima hidrogelne okosnice su slabi te stvaranje kompleksa s CD ne igra značajnu ulogu za uklapanje i oslobađanje lijeka,
- ii. hidrofilne molekule srednje veličine s visokim afinitetom za CD (npr. 3-metil benzojeva kiselina, 3-MBA) se uglavnom kompleksacijom ugrađuju u hidrogel te stoga sadržaj CD određuje iskorištenje ovog unosa,
- iii. hidrofobne i slabo u vodi topljive molekule sa srednjim afinitetom za CD (npr. ETOX) se putem snažnih nespecifičnih interakcija vežu za mrežnu strukturu hidrogela što prevladava učinak stvaranja kompleksa s CD-ima. U ovom slučaju sastav monomera okosnice određuje afinitet lijeka za hidrogel, a time uklapanje i oslobađanje.



**Slika 5.** Shematski prikaz utjecaja fizikalno-kemijskih svojstava lijeka na unos/oslobađanje lijeka iz NVP-co-DMA hidrogelova s *pendant* ciklodekstrinima (Supuran, 2008; Fundueanu i sur., 2003) (prilagođeno prema literaturnom navodu 72)

Odnos između navedena tri mehanizma koji ovise o fizikalno-kemijskim svojstvima lijeka i mogućnosti stvaranja kompleksa, određuje ulogu koju CD-i imaju u uklapanju i oslobađanju iz hidrogela. Također, korištenjem ove metode nisu zabilježeni negativni učinci na bubrenje, optičku prozirnost niti na citokompatibilnost (72).

Među prirodnim polimerima, polisaharidni hidrogelovi od posebne su važnosti radi jednostavnosti izolacije, niske cijene, netoksičnosti i biokompatibilnosti. Polisaharid sjemena tamarinda (TSP; *Tamarindus indica*, Leguminosae) je galaktoosiloglukan koji posjeduje visoku viskoznost i toleranciju u širokom pH području. Dokazana mu je i nekarcinogenost, mukoadhezivnost, biokompatibilnost i dobra termalna stabilnost. Stoga je proveden razvoj sustava za okularnu isporuku timololmaleata u kojem je TSP korišten kao agens za stvaranje i održavanje okularnog filma. Dobiveni rezultati na albino kunićima ukazivali su da je potencijal snižavanja očnog tlaka, nakon početnog polaganog rasta, održavan tijekom 24 sata u odnosu na kapi za oko kod kojih je krivulja odnosa sniženja očnog tlaka tijekom vremena bila oštrija i uz kraće vrijeme trajanja (Slika 6.).



**Slika 6.** Promjena očnog tlaka u različitim intervalima nakon primjene kapi za oko i okularnog filma (prilagođeno prema literaturnom navodu 73)

U usporedbi s kapima za oko, zabilježena je značajna razlika ( $p < 0,001$ ) između intraokularnog tlaka u životinja nakon primjene okularnog filma s 1,68 puta povećanim AUC ( $\text{mmHg h}^{-1}$ ) vrijednostima.

Osim toga, u testu sigurnosti primjene u oku, okularni filmovi pokazali su se praktički neiritabilnima (74).

Kitozan je kationski polimer s mukoadhezivnim svojstvima uzrokovanim molekulskim privlačnim silama (elektrostatskim interakcijama) s negativno nabijenim mukusom. Formulacije s kitozonom već se široko primjenjuju kao sustavi za topikalnu isporuku lijekova u oko te je razvijena formulacija kapi za oči na bazi termoosjetljivog kitozan-hidrogela za produljeno oslobađanje latanoprost. Temperatura geliranja iznosila je 34,18°C. *In vitro* i *in vivo* studije oslobađanja latanoprost iz hidrogela potvrdile su profil produljenog oslobađanja, a potvrđena je i biokompatibilnost. U životinjskom modelu glaukoma kod kunića, triamcinolon acetonidom inducirani porast očnog tlaka značajno je snižen primjenom hidrogela tijekom 7 dana te su normalne vrijednosti tlaka održavane primjenom tjednom primjenom 250 µg/ml latanoprost hidrogela. Ovakve formulacije mogle bi u bliskoj budućnosti biti neinvazivna zamjena klasičnim kapima za oko u cilju dugoročne kontrole intraokularnog tlaka (74).

Termoosjetljivi heksanoil glikol kitozan gel (HGC) za okularnu primjenu sintetiziran je iz jednog koraka putem reakcije N-heksanoilacije. Vodena otopina HGC-a ima jaka svojstva termoosjetljivosti, čak i pri niskim koncentracijama polimera, a termoosjetljivost se može modulirati variranjem koncentracije polimera i stupnjem N-heksanoilacije. Također, termoosjetljivost nastale otopine može se koristiti za produljenje zadržavanja brimonidintartarata na preokularnoj površini i samim time povećanje bioraspoloživosti što dovodi do dvostrukog povećanja učinka sniženja intraokularnog tlaka u odnosu na Alphagan P kapi. Zbog svojih jedinstvenih svojstava termoosjetljivosti i niske citotoksičnosti, HGC ima značajan potencijal kao sustav za okularnu isporuku lijeka s povećanom bioraspoloživosti i terapijskim učincima (75).

### 3.3. Micele

Oko se, u smislu isporuke lijekova, može podijeliti u četiri ciljna mjesta: (i) preokularne strukture (npr. konjunktiva, kapak); (ii) rožnica; (iii) prednja i stražnja očna sobica i povezana tkiva i (iv) stražnji segment oka (mrežnica, vitrealna šupljina). Stopa gubitka lijeka s površine oka može biti 500 do 700 puta veća od brzine apsorpcije lijeka u prednju očnu sobicu, a time i manje od 5% primijenjene doze doseže intraokularna tkiva.

Apsorpcija lijeka iz prednjih područja oka pretežno se odvija preko rožnice. Postoje tri sloja rožnice - epitel, stroma i endotel, i svi oni imaju značajnu ulogu u propusnosti rožnice za lijekove. Kornealni epitel predstavlja glavnu barijeru prolasku lijeka kojeg određuju pasivna difuzija, potpomognuta difuzija i aktivni prijenos. Pasivni prijenos lipofilnih lijekova odvija se transcelularnim putem, dok se pasivni prijenos hidrofilnih lijekova odvija paracelularno preko čvrstih međustaničnih veza (engl. *tight junction*). Za razliku od epitela, hidrofilna stroma predstavlja barijeru lipofilnim tvarima koje transcelularnim putem prolaze kroz epitel. Konačno, endotel je lako propusni monosloj koji u manjoj mjeri doprinosi kornealnoj barijeri. Obzirom da su klinički korištene djelatne tvari obično male lipofilne molekule, opisani transkornealni put ima najznačajniju ulogu u unosu lijekova u oko.

Površina ljudske konjunktive je oko 17 puta veća od površine rožnice. Sastavljena je od 2 do 3 sloja stanica s *tight junction* vezama te je propusnost za lijek između 2 i 30 puta veća od propusnosti rožnice uz otprilike 230 puta veći paracelularni prostor. Konjuktivno-skleralni put apsorpcije lijekova je u zadnje vrijeme postao od velike važnosti za intraokularnu isporuku novih biotehnoških lijekova kao što su proteini, peptidi i terapeutici bazirani na nukleinskim kiselinama. Smatra se da je permeabilnost bjeloočnice slična onoj kornealne strome tj. hidrofilni lijekovi difundiraju kroz pore skleralnog matriksa lakše od lipofilnih lijekova. Pritom je permeabilnost obrnuto proporcionalna molekulskom promjeru i lipofilnosti molekule lijeka. Dodatno, pozitivno nabijene molekule imaju slabiju permeabilnost radi svog vezanja na negativno nabijeni skleralni matriks.

Krvno-retinalna barijera (BRB) smještena u anteriornom dijelu oka ograničava unos lijekova iz krvi u očnu vodicu radi slojevite građe mrežnice. Metoda unosa lijekova u ove dijelove oka je invazivnog

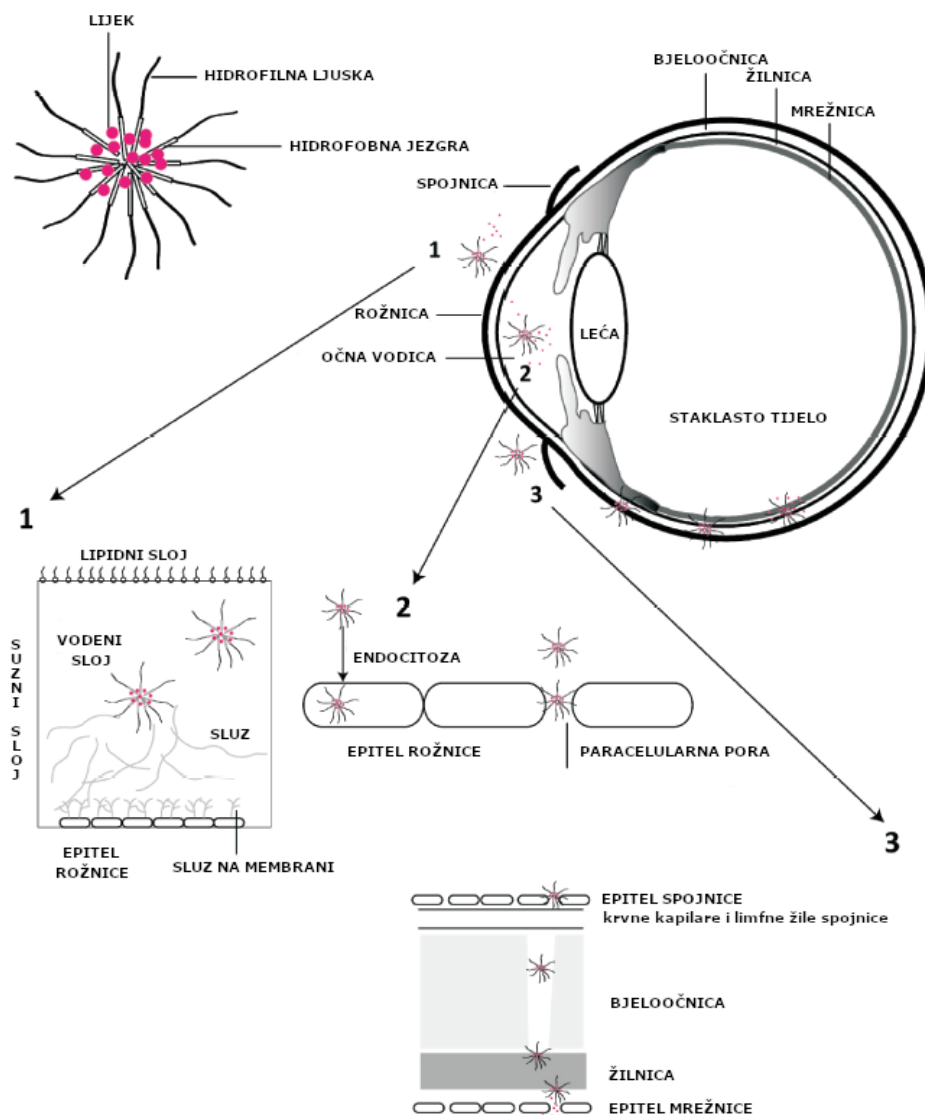
karaktera (intravitrealne i periokularne injekcije). Inovativni putovi isporuke lijekova u oko uključuju nanosustave čime se omogućuje zaobilazanje ili prolazak kroz različite barijere u oku kao i održanje potrebne koncentracije lijeka na ciljnom mjestu djelovanja. Stoga se istražuju brojni sustavi nanonosača među kojima su i polimerne micelle.

Nanosustavi za isporuku lijekova u oko najčešće se pripremaju kao vodene koloidne disperzije koje omogućuju primjenu u farmaceutskom obliku kapi za oči ili očnih injekcija pri čemu se prednost daje kapima za oči zbog jednostavnosti njihovog korištenja i niske interferencije s vidom. Ugradnja lijekova u ovakve nanosustave omogućuje poboljšanje biofarmaceutskih svojstava kao i određene industrijske prednosti npr. relativno jeftina proizvodnja i mogućnosti sterilne filtracije radi veličine čestica koja obično iznosi ispod 100 nm.

Polimerne micelle nastaju spontanom samoorganiziranjem amfifilnih kopolimera u čestice nanovelikine iznad kritične micelizacijske koncentracije (cmc). Tijekom procesa micelizacije, hidrofobni blokovi formiraju jezgru, dok hidrofilni segmenti čine hidrofilni omotač micelle. Amfifilni blok kopolimeri mogu se prilagoditi da imaju jedinstvena svojstva za isporuku lijeka kao što je produljenje stabilnosti micela u očnim tekućinama te modificiranje oslobađanja lijeka. Najčešće korišteni polimeri za stvaranje omotača micela su PEO (polietilen oksid) i PEG (polietilen glikol). Unos lijekova u micelle provodi se kemijskim, fizikalnim ili elektrostatskim načinom pri čemu su najpoželjnije fizikalne procedure uklapanja npr. izravno otapanje, dijaliza, U/V emulzijska metoda, različite modifikacije film metoda i kompleksacija. Oslobađanje lijekova iz polimernih micela ovisi o brzini difuzije iz micelle, stabilnosti micelle i brzini biorazgradnje kopolimera. Ukoliko je stabilnost prikladna a biorazgradnja niska, na brzinu oslobađanja najviše će utjecati snaga interakcije između lijeka i blokova polimera koji čine jezgru. Stabilnost polimernih micela, fizikalna kao i biološka, usko je povezana s njihovom koloidnom veličinom. Veličina micela ima ključnu ulogu i u djelotvornosti endocitoze kao i mehanizmu kojim se nanosustavi unose u stanicu. Isto tako, površinski naboj micela odgovoran je za njihova fizikalno-kemijska i biološka svojstva.



Za micelle s lijekom koje trebaju djelovati na rožnicu ili konjuktivu, potrebno je osigurati njihovo zadržavanje na površini oka dovoljno dugo da se postigne produljeno oslobađanje lijeka u prednje dijelove oka (Slika 7, slučaj 1). Ukoliko su ciljno mjesto djelovanja lijeka tkiva povezana s očnom vodicom, polimerne micelle se moraju apsorbirati kroz rožnicu i osloboditi lijek u prednjoj ili stražnjoj očnoj sobici (Slika 7, slučaj 2). Za terapiju bolesti stražnjeg dijela oka, polimerne micelle trebaju doseći posteriorni dio preko konjunktive, kroz bjeloočnicu i žilnicu i konačno do mrežnice (Slika 7, slučaj 3) (76).



**Slika 7.** Putovi raspodjele polimernih micela lijeka nakon topikalne primjene na oko (prilagođeno prema literaturnom navodu 76)

Melatonin je neurohormon kojeg luči epifiza i koji ima utjecaj na modulaciju intraokularnog tlaka. Kitozan je biokompatibilni i biorazgradivi polikationski polimer koji je ispod pH 6,5 pozitivno nabijen te ulazi u elektrostatske interakcije s negativno nabijenom epitelnom površinom što rezultira mukoadhezijom. Također, kitozan djeluje i kao promotor permeacije lijeka povećanjem paracelularnog transporta. Lecitin je prirodna smjesa biokompatibilnih lipida koja zbog svoje lipofilnosti osigurava relativno dobar unos lipofilnih lijekova osiguravajući pritom produljeno oslobađanje. Pluronic F127 je neionski polioksietilirani surfaktant koji pojačava permeabilnost kornealne epitelne barijere. U vodenim otopinama F127 spontano stvara micelle koje se sastoje od hidrofobne jezgre blokova polipropilenoksida okruženih hidrofilnim omotačem od blokova polietilenoksida.

Cilj istraživanja bio je razviti koloidni nanonosac melatonina s dobrim mukoadhezivnim svojstvima kako bi se zaštitila ova fotosjetljiva djelatna tvar te olakšao prolaz kroz kornealne barijere i produljilo djelovanje lijeka. U tu svrhu istražena su dva koloidna sustava: nanočestice kitozana/lecitina i micelle F127/kitozana. Dokazano je da se melatonin lako apsorbira preko epitelnih barijera rožnice. Međutim, brza i opsežna prekornealna eliminacija uvjetovana dinamikom suzne tekućine, nazolakrimalne drenaže i procesa adsorpcije/apsorpcije rezultira ograničenom bioraspoloživosti melatonina i kratkom farmakološkom učinku melatonina primijenjenog kao vodene otopine. Očekivano pojačavajuće djelovanje F127 na permeaciju melatonina, pokazano ovom studijom, trebalo je osigurati povećanu biodostupnost u oku. Međutim, ovo djelovanje F127 bilo je ometano u prisutnosti kitozana. Nanočestice lecitina/kitozana karakterizirane istaknutim mukoadhezivnim svojstvima omogućile su produljeno oslobađanje melatonina što je pokazano na *in vitro* kornealnom epitelnom modelu. Ovakav nanosustav ima potencijal osigurati produljeno prekornealno zadržavanje melatonina čime se ostvaruje veća biodostupnost lijeka i produljeno sniženje očnog tlaka u odnosu na primjenu vodenih otopina melatonina (77).

Pri niskim koncentracijama F127 u otopini dolazi u obliku pojedinačnih zavojnica (unimera) i povećanjem koncentracije kopolimera formiraju se termodinamički stabilne micelle. U rasponu temperature značajnom za kliničku primjenu tj. na oko 37°C otopina kopolimera dolazi kao izotropna

faza do oko 20% kopolimera, a dalje kao kubična faza. Cilj istraživanja bio je pripremiti najjednostavniji mogući model sustava za okularnu isporuku pilokarpina i istražiti utjecaj korištenog kemijskog oblika pilokarpina koji dolazi kao pilokarpinklorid i kao pilokarpinklorid baza. Naime, ova dva oblika se različito pozicioniraju u micelarnom sustavu radi njihovog drugačijeg koeficijenta raspodjele. Na temelju provedenih ispitivanja zaključeno je da je pilokarpin baza ili: (i) potpuno otopljena u micelama čak i s najmanjim koncentracijama korištenog F127 ili (ii) površinska aktivnost kopolimera u kombinaciji s djelatnom tvari smanjuje izmjerenu površinsku napetost, a bez potpunog uklapanja lijeka u micelama. *In vivo* rezultati za srednju promjenu promjera zjenice za dvije micelarne otopine s 2% kopolimera i 2% pilokarpinklorid soli i 1,7% pilokarpin baze uspoređeni su u odnosu na rezultate s 2%-tnom vodenom otopinom pilokarpinklorida. Zabilježeno vrijeme potrebno da se promjer zjenice vrati u normalnu vrijednost prije tretmana bilo je produljeno na oko 180 minuta ali porast od 10,2 za AUC nije nađen kao farmakokinetički značajan (78).

Etokszolamid (ETOX) je hidrofobni inhibitor karboanhidraze s dobrom kornealnom permeabilnošću (100 puta većom od najčešće korištene djelatne tvari iz ove skupine, acetazolamida). ETOX se može solubilizirati stvaranjem kompleksa s derivatima ciklodekstrina te su pripremljene formulacije s ETOX i timololom. Micele poloksamina (Tetronici) mogu biti nosači relativno hidrofobnih lijekova povećavajući njihovu topljivost i stabilnost. U odnosu na poloksamere koji su linearne građe i termoosjetljivi, poloksamini povezani preko etilendiamin skupine su amfilili s pH- i termoosjetljivim svojstvima.

Ispitivana su svojstva polimera iz skupine tetronika kao nanonosača za okularnu isporuku etokszolamida procjenom učinka na solubilizaciju ETOX, stabilnost micela, iritabilnost tkiva oka te *in vitro* oslobađanje ETOX. Micele T904 poloksamina srednje hidrofilnosti povećale su topljivost lijeka do 50 puta, dok je kombinacija T904 i T1107 ili T1307 (visoko hidrofilni poloksamini) dala miješane micide više topljivosti od korištenih pojedinačnih ovih poloksamina te je zaključeno da ko-micelizacijom poloksamina različite hidrofilnosti nastaju fizikalno stabilniji sustavi s duljim oslobađanjem ETOX. Ugradnja ETOX u micide nije dovela do promjene njihove veličine. HET-CAM

(*Hen's Egg-Chorioallantoic Membrane Test*) ispitivanjem nije zabilježena povećana okularna iritabilnost (79).

### 3.4. Mikročestice

Lijek primijenjen na preokularnoj površini gotovo trenutno se uklanja zbog brze izmjene suzne tekućine i treptanja. Biokompatibilne mikročestice mogu biti dobar sustav za topikalnu primjenu lijeka radi svoje mikroveličine čime se izbjegava iritacija oka te omogućuje produljeno oslobađanje lijeka. Kako bi se dalje poboljšala bioraspoloživost topikalno primijenjenog lijeka, mikročestice je potrebno oblikovati tako da ostanu dulje na površini oka pri čemu vrijeme oslobađanja lijeka treba biti odgovarajuće prilagođeno. Mukoadhezivne mikročestice imaju svojstva prijanjanja za sluznicu koja ovise o inheretnim svojstvima sastavnica mukoadhezivnih materijala. Međutim, ove sastavnice imaju također ulogu posrednika u difuziji lijeka te izmjena sastavnica samo radi poboljšanja mukoadhezivnih svojstava nije uvijek dobra mogućnost. Interakcija između čestica i sluznog sloja može se poboljšati povećanjem specifične površine čestica. U tom smislu, čestice nanoveličine mogu biti korisne; međutim, smanjenje veličine čestica može uzrokovati početno naglo oslobađanje lijeka iz ovih sustava.

U ranijim istraživanjima dizajnirane su mikročestice načinjene pretežno od materijala difuzijskog zida, poli (lakto-ko-glikolne kiseline, PLGA), dok je mukoadhezivni sloj sastavljen od polietilenglikola (PEG). Za poboljšanje mukoadhezije, čestice su oblikovane s nanostrukturnom površinom kako bi se povećala površina i time interakcije s mukoznim slojem. Za procjenu učinka sustava odabrana je djelatna tvar brimonidintartarat koji je uklopljen u mikročestice te je uspoređena *in vivo* farmakokinetika i farmakodinamika u odnosu na kapi za oko s istom djelatnom tvari (Alphagan P). Kako bi se proizvela nanostrukturna površina, mikročestice su pripravljene zamrzavanjem nanofibroznih listova metodom elektrospininga (*engl. electrospinnig*), a nanofibrozna struktura je zadržana u mikročesticama kako bi se proizvela povećana specifična površina. Za mukoadheziju mikročestica korištena je smjesa PLGA i PEG.

U novijem radu čestice lijeka su unesene u vodi brzo topljive tablete biokompatibilnog polimera polivinil alkohola (PVA) pri čemu u suznoj tekućini dolazi do oslobađanja mikročestica i smanjenja suzne drenaže u odnosu na klasične kapi ili suspenzije za oko. Za *in vivo* procjenu učinka pripremljene tablete sadržavale su 2,32-2,51 mg mikročestica (52,5 µg brimonidintartarata) volumena oko 40 µl što odgovara jednoj dozi oftalmičkih kapi. Zabilježeno je oslobađanje djelatne tvari od gotovo 100% unutar 10 minuta radi brzog otapanja u PVA mediju tablete. Ukupno je trajanje sniženja očnog tlaka poboljšano za više od 2 puta u odnosu na postojeće kapi s brimonidintartaratom te se mukoadhezivne nanostrukturirane mikročestice mogu smatrati obećavajućim budućim sustavom za okularnu primjenu lijekova (80).

Supracilijarni prostor je prednji dio suprakoroidnog područja koje se u nedavnim prekliničkim i kliničkim studijama istražuje za isporuku lijekova radi poboljšanja biodostupnosti u odnosu na topikalne kapi. Pripremljene su mikroinjekcije odgovarajuće duljine koje omogućuju primjenu u suprakoroidni prostor procedurom sličnoj onoj za intravitrealnu primjenu u kliničkom okruženju. Ispitivanje je provedeno jednostrukom primjenom mikroinjekcije mikrosfera brimonidintartarata formuliranih s poli-laktatnom kiselinom u supracilijarni prostor čime se smanjuje potrebna doza lijeka radi povećane bioraspodivnosti. Mikrosfere su pripremljene kao U/V emulzijskom metodom isparavanja otapala. Za primjenu u albino kunića korištene su hipodermičke mikroigle duljine oko 1,5 mm. Zabilježeno je oslobađanje lijeka gotovo kinetikom nultog reda uz minimalni *burst* efekt. Primjena PLA formuliranih mikrosfera kojima su obradom uklonjeni kiseli monomeri i oligomeri poboljšala je stabilnost tijekom čuvanja povećanjem molekularne mase PLA. To je rezultiralo gušćim matriksom čime je omogućena bolje uklapanje i polaganost, kontinuirano oslobađanje. Iako životinje nisu pokazivale znakove crvenila oka daljnja ispitivanja su potrebna za dokazivanje biokompatibilnosti materijala unesenog u supracilijarni prostor. Zaključeno je, prvo, da se primjenom mikrosfera u ovaj dio oka omogućuje stvaranje depoa u blizini cilijarnog tijela što omogućuje produljenje učinka lijeka. Drugo, supracilijarni prostor nije u vidnoj osi te bi trebao imati učinak na vid kao što to imaju kapi za oko ili intravitrealne injekcije. Treće, primjena ovakvih injekcija trebala bi biti sigurna čak i izvanbolničkom okruženju. Studije na životinjama i ljudima pokazale su da se

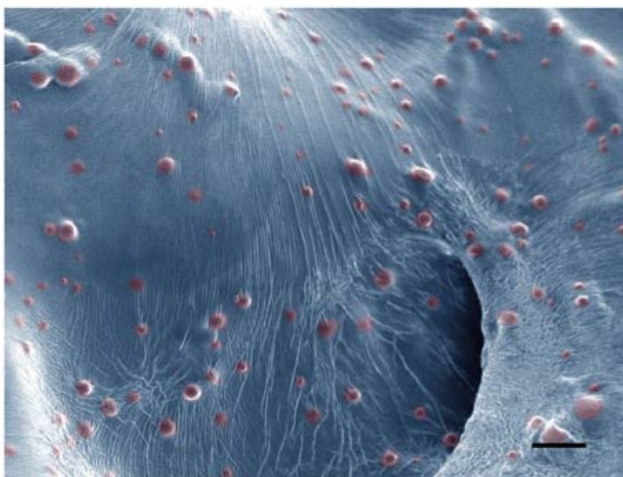
ovakve mikroinjekcije dobro toleriraju. Konačno, supracilijarni prostor se smatra sigurnim za deponiranje lijekova. Žilnica i bjeloočnica nisu čvrsto vezane te se taj prostor može kratkotrajno

proširiti bez vidljivih dugotrajnih posljedica (81).



**Slika 8.** Prikaz mjesta djelovanja supracilijarne injekcije mikročestica brimonidina u odnosu na klasične kapi za oko (prilagođeno prema literaturnom navodu 81)

Još jedan novi sustav isporuke lijeka u oko dizajniran je u obliku neinvazivnih gel/mikrosfernih (GMS) kapi za oko.



**Slika 9.** SEM mikroskopska snimka pNIPAAm gel matriksa (obojena plavo) u kojem su uklopljene PLGA mikrosfere s lijekom (obojene crveno). Pokazana je očuvanost morfologije mikrosfera i homogenost njihove raspodjele u gelu (prilagođeno prema literaturnom navodu 82.)

Reverzni termoosjetljivi akrilamidni hidrogel optimiziran je za dobivanje traženih fizikalnih svojstava tvrdoće i prozirnosti da bi služio kao matriks za produljeno oslobađanje lijeka iz kapi za oko.

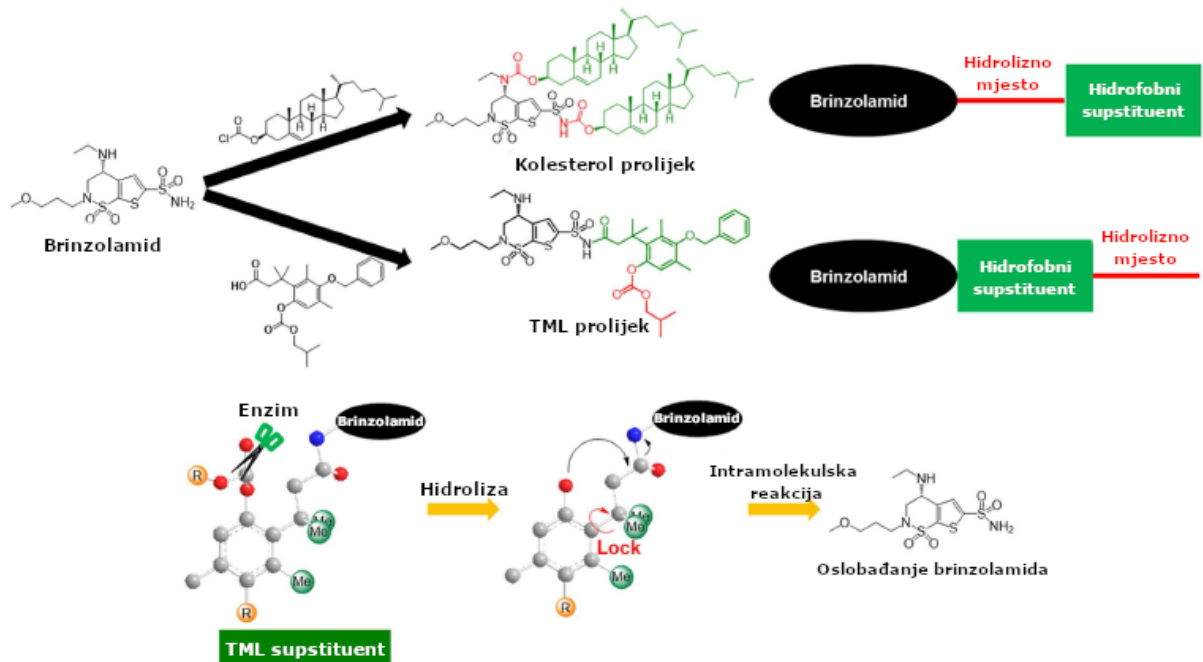
Zajednički, termoosjetljivi hidrogelni nosač s unesenim biorazgradljivim polimernim mikrosferama brimonidintartarata (BT), predstavljaju novi model za isporuku lijeka za sniženje očnog tlaka. *In vitro* ispitivanje je provedeno da bi se procijenila kinetika oslobađanja djelatne tvari, dok je *in vivo* pokusima na kunićima testirano sniženje očnog tlaka u randomiziranim skupinama pri čemu su životinje primale 0,2% klasične BT kapi za oči, GMS BT kapi te GMS kapi s mikrosferama bez djelatne tvari. Tijekom 28 dana pokazana je učinkovitost snižavanja očnog tlaka primjenom samo jedne doze GMS kapi koja je usporediva sa doziranjem klasičnih kapi 2 puta na dan uz vjerojatno nižu sistemsku apsorpciju ovakvog depo preparata (82).

### 3.5. Nanočestice

Normalna rožnica oka ima nekoliko barijera prolasku molekula, uključujući hidrofobni epitel i hidrofilnu stromu. Ti slojevi općenito sprječavaju ulazak u vodi topljivih, hidrofilnih molekula u oko kroz epitel rožnice. Hidrofobne mikročestice koje su relativno velike također su blokirane u fibroznom sloju strome. Ovo navodi na pretpostavku da nanočestice mogu lakše prodrijeti kroz epitel i stromu.

Početno je pokušano proizvesti nanočestice brinzolamida, djelatne tvari učinkovite u snižavanju očnog tlaka koja se koristi u Azopt kapima, koristeći metodu reprecipitacije. Međutim, ovom metodom nastale su samo čestice u mikro- području veličine. Topljivost molekule u otapalima slabije učinkovitosti smatra se blisko povezanom s veličinom čestica dobivenih metodom reprecipitacije. Stoga je bilo potrebno smanjiti topljivost kako bi se proizvele nanočestice te je brinzolamid modificiran pomoću različitih hidrofobnih supstituenata. Prvo je kolesterol odabran kao supstituent radi svoje niske toksičnosti kod čovjeka te je prolijek s kolesterolom sintetiziran reakcijom povezivanja brinzolamida i dva ekvivalenta kolesterolkloroformata preko hidrolizabilnih karbamatnih veza (Slika 10). U oku se takav lijek mora enzimski hidrolizirati da bi se djelatna tvar oslobodila i ostvario hipotenzivni učinak. Druga isprobana metoda bila je s molekulom *trimethyl lock* (TML) u kojoj tri susjedne metilne skupine fiksiraju konformaciju C-C veze sastavljene od aromatskog prstena i alifatskog postraničnog lanca koji nosi brinzolamid za stvaranje karbonatnih i amidnih dijelova.

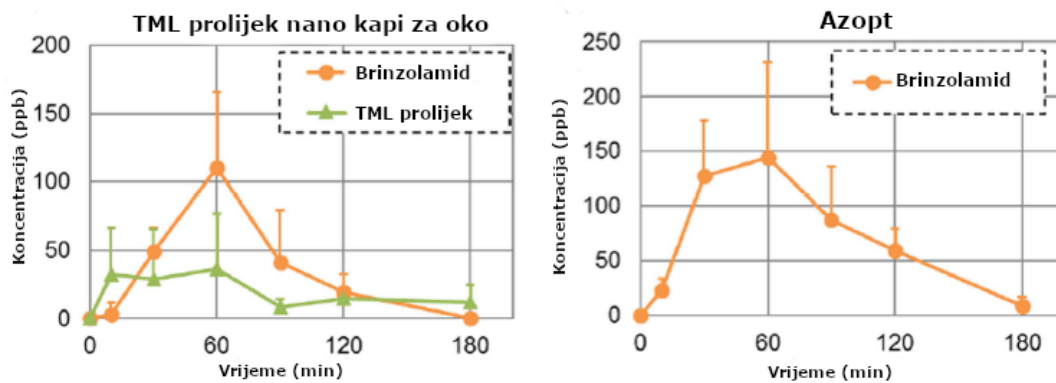
Enzimskom hidrolizom karbonata oslobađa se fenolna hidroksilna skupina što dovodi do intramolekulske ciklizacije u dihidrokumarinski oblik i posljedično oslobađanja brinzolamida (Slika 10).



**Slika 10.** Kemijske strukture brinzolamida te prolijeka s kolesterolom i TML. Hidrolitička mjesta na kolesterol-brinzolamidu locirana su unutar molekule, dok su ona na TML-brinzolamidu locirana na kraju molekule. TML supstituent lako može osloboditi brinzolamid jer tri metilne skupine sprječavaju rotaciju oko C-C veze. Simbol škarica označuje hidrolazne enzime (prilagođeno prema literaturnom navodu 83)

Procijenjena je koncentracija TML brinzolamid prolijeka u očnoj vodici štakora. Nakon primjene kapi, koncentracija brinzolamida rasla je u 60-toj minuti da bi u sljedećem satu bila snižena i konačno pala na nultu vrijednost. Pritom je nehidrolizirani TML također zabilježen u očnoj vodici. Kod Azopt kapi, koncentracija brinzolamida također je dosegla maksimum nakon 60 minuta u otprilike jednakom iznosu kao kod TML brinzolamid kapi (Slika 11).





**Slika 11.** Koncentracija brinzolamida i TML proljeka iz TML nano kapi u odnosu na Azopt kapi (prilagođeno prema literaturnom navodu 83.)

U pokusima je zabilježena dovoljna učinkovitost TML prolijek nanokapi ali uz samo jednu petinu koncentracije djelatne tvari korištene u Azopt kapima. Povrh toga, kada je koncentracija Azopt kapi snižena na jednu petinu originalne (0,2%) nije ostvaren hipotenzivni učinak.

Konačno, primjenom nanokapi nije zabilježen toksični učinak na rožnicu. Transmitancija svjetlosti vodene disperzije TML proljeka bila je visoka (oko 100 puta veća nego za Azopt). Zaključeno je da bi slični pripravci nano kapi mogli biti sljedeća generacija oftalmoloških terapeutika (83).

### 3.6. Pojačivači prijenosa

Kornealni epitel na površini oka predstavlja glavnu barijeru koju hipotenzivni lijekovi moraju proći da bi došlo do ostvarivanja njihovog učinka na ravnotežu očne vodice i posljedično utjecaja na očni tlak. Funkcija navedene barijere ovisi o čvrstim međustaničnim vezama. Na sastavljanje TJ veza i posljedično na formirane barijere može se utjecati različitim sustavima prijenosa signala preko: protein kinaze C, protein kinaze A, MAP kinaze te prijenosnicima poput cAMP,  $\text{Ca}^{2+}$  i diacetilglicerola. Svi ovi signalni putovi djeluju putem različitih mehanizama uključujući regulaciju ekspresije TJ proteina na nivou transkripcije ili, alternativno, mogu modularati TJ proteine posttranslacijskim reakcijama fosforilacije i ubikvitinacije. Stimulacija purinergičnog receptora  $\text{P2Y}_2$  koji se aktivira ATP i UTP nukleotidima te dinukleotidom  $\text{Ap}_4\text{A}$  pokazuje posebnu važnost u oku, utjecajem na različite

biokemijske i fiziološke procese kao što je indukcija izlučivanja suza, proizvodnja lizozima, ubrzanje cijeljenja ozljeda rožnice te modulacija intraokularnog tlaka. Temeljem ovih pretpostavki provedeno je ispitivanje utjecaja  $Ap_4A$  na okularnu isporuku  $\beta$ -adrenergičnih blokatora i  $\alpha$ -adrenergičnih agonista u oko kao posljedicu njegova djelovanja na barijeru rožnice.

Učinak u kojem  $Ap_4A$  olakšava unos adrenergičnih lijekova je posljedica sniženja funkcije TJ stanica na stratificiranim epitelnim stanicama ljudske rožnice na kojima su provedena ispitivanja (stanični model s 3-5 slojeva stanica i površne s *microplcae/microridges* struktrama tipičnim za prirodne epitelne stanice što je određeno elektronskom mikroskopijom). U tim stanicama koje imaju veći transepitelni električni otpor (TEER) nego jednoslojne epitelne stanice rožnice došlo je do značajnog sniženja TEER vrijednost nakon utjecaja na  $Ap_4A$ . Celularni put koji posreduje ovaj učinak pripisan je aktivaciji ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) čija aktivacija može dovesti do povećanja endocitoze TJ proteina i njihove degradacije. Dobivenim rezultatima pokazano je da su razine adrenergičkih hipotenziva više (4 puta u slučaju brimonidina i 3 puta u slučaju timolola) u odnosu na uobičajenu primjenu tih lijekova. Ovakav novi način primjene okularnih hipotenziva omogućio bi snižavanje potrebne doze kao i nuspojava vezanih uz sistemski učinak ovih lijekova. U konačnici, učinak na  $Ap_4A$  otvara mogućnosti poboljšanja okularne isporuke lijekova i veće terapijske djelotvornosti u liječenju glaukoma (84).

### 3.7. Genska terapija

Neurotrofni faktori (NTF) u genetskom inženjeringu mogli bi imati brojne implikacije ne samo za dublje razumijevanje neurodegenerativnih bolesti nego i za poboljšanje učinkovitosti terapeutika. Područja nanomedicine, regenerativne medicine i gensko-stanične terapije revolucionarizirana su razvojem sigurnijih i učinkovitijih neviralnih tehnologija za isporuku gena i uređivanje genoma pomoću modernih tehnika unosa neurotrofnih faktora u klinički značajne stanice za postizanje boljeg farmaceutskog učinka. Smatra se da dugotrajna ekspresija neurotrofnih faktora predstavlja konačni pristup za prevenciju i/ili liječenje neurodegenerativnih bolesti kao što je glaukom u pacijenata koji ne

reagiraju na dostupne terapije ili su u progresivnoj fazi bolesti. Nedavna istraživanja ukazuju da novi neuroprotektivni genski i stanični terapeutici predstavljaju potencijalno dobre kandidate za neinvazivni pristup u smislu neuroprotekcije i obnavljana regenerativnih funkcija u oku. Istražuje se više tipova progenitornih i retinalnih stanica bilo kao ciljevi genske terapije, kao mogućnosti za terapiju zamjene stanica ili kao mediji za isporuku genske terapije.

Nedavni napredak u tehnikama isporuke novih generacija bakterijski sekvencioniranih DNA vektorskih nosača koji prenose samo terapijski transgenski ekspresijski materijal kao i dostupnost modernih metoda editiranja genoma, mogli bi osigurati potrebne alate za ciljanu gensku terapiju. U odnosu na terapiju zamjene stanica kojom se u mrežnicu integriraju aktivne *stem*/progenitorne stanice, neuroprotektivni pristup produljenim lučenjem neurotrofnih faktora (NTF) je jednostavnija strategija za podupiranje odumirućih retinalnih ganglijskih stanica (RGC) u slučaju progresivnog glaukoma. Uz navedeno, neuroprotektivna terapija bi također mogla djelovati kao poticaj preživljavanju retinalnih stanica izravno modificiranjem genske ekspresije u okolnim stanicama u cilju povećanja lučenja NTF na mjestu djelovanja. Za genetski modificirane retinalne progenitorne stanice koje ekspresiraju i luče NTF, pokazan je neuroprotektivni učinak sličan potpornoj ulozi kakvu imaju NSC (neuralne *stem* stanice) i MSC (mezenhimske *stem* stanice) u regeneraciji neurona. Stoga bi genetski modificirane stanice koje luče NTF mogle biti metoda liječenja ireverzibilnog gubitka RGC stanica. Tehnike ne-virusne isporuke gena kao elektroporacija, nukleofekcija kao i alati nanotehnologije poput primjene polisaharidnih nanočesica, kationskih liposomnih nanočestica, nanočestica kalcijeva fosfata kao i metoda nanoiglica u kombinaciji s učinkovitim i sigurnim metodama transgenskog unošenja ( $\Phi$ C31 integraza, TALEN ili CRISPR/Cas9 nukleaza sustav), predstavljaju nove mogućnosti liječenja neurodegenerativnih bolesti poput glaukoma. Korištene stanice moraju pokazati prikladnu sposobnost usađivanja u mrežnicu. Ukoliko se ovakve metode pokažu uspješnima kod ljudi, mogle bi imati višestruke prednosti u odnosu na klasičan farmakološki pristup. Međutim, radi se o multidisciplinarnom polju rada koje zahtijeva suradnju različitih znanstvenih domena da bi se dobiveni preliminarni rezultati mogli dospjeti i u kliničko okruženje (85).

Neurotrofni faktori (NTF) su izlučeni mali proteini koji imaju značajnu ulogu u razvoju i održanju živčanog sustava. Dokle se brojni NTF ekspresiraju kroz centralni i periferni živčani sustav, oni primjenjivi na glaukom pretežno pripadaju skupinama NGF (*nerve growth factor*) i citokina 130 kDa glikoproteina (GP130). NGF skupina neurotrofina sastoji se od NGF, BDNF, NT-3, NT-4 i NT-5. Učinak BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) ekspresiranog u tkivima organizma poznat je i u očuvanju retinalnih ganglijskih stanica. Proizvodnja BDNF odvija se u retinalnim astrocitima te u mozgu.

Objavljeni dokazi upućuju da nedostatak NTF i njihova disfunkcija može igrati važnu ulogu u patofiziologiji glaukoma. Opažanja da povećani očni tlak blokira retrogradni transport BDNF i isporuka BDNF izravno u mrežnicu mogu dati potporu neuroprotektivnoj hipotezi. Međutim, ne smije se zanemariti niti disregulacija drugih NTF, kao i NTF receptora i signalnih putova u mrežnici. Saznanje da gubitak retinalnih ganglijskih stanica može biti smanjen dodatkom NTF podupiru brojne prekliničke studije koje pokazuju neuroprotekciju u modelima glaukoma i mehaničke ozljede živaca. Čini se kako najviše obećavaju strategije isporuke putem intraokularne implantacije sustava s polaganim oslobađanjem NTF, genske terapije za poboljšanje endogene retinalne proizvodnje NTF ili intraokularne transplantacije stanica koje izlučuju NTF. Uspjeh kliničkih testova liječenja drugih bolesti podupire sličan pristup i u terapiji glaukoma. Konačno, preostaje mnogo rada prije nego NTF bazirane terapije uđu u kliničku primjenu osobito za skupinu pacijenata kod kojih bolest nije uspješno tretirana unatoč primjeni najbolje trenutno dostupne hipotenzivne terapije (86).

Isporuka zaštitnih ili anti-apoptičnih gena u stanice mrežnice predstavlja obećavajuću alternativnu terapiju glaukoma koja bi rezultirala ekspresijom ciljnih proteina kroz produljeno vremensko razdoblje. Međutim, najveći problem okularne genske terapije je iznalaženje sigurnih i učinkovitih metoda za dostavu lijekova u područje mrežnice i vidnog živca. Neviralni vektori imaju više prednosti nad viralnim vektorima, uključujući fleksibilnost njihova inženjeringa, smanjena imunogenost radi tvorbe iz biološki inertnih materijala te smanjena cijena proizvodnje. Neviralni sustavi genske dostave obuhvaćaju široku klasu umjetno stvorenih kompleksa sastavljenih od nukleinskih kiselina, tipično plazmida, s različitim 'mekanim' materijalima poput lipida, surfaktanata te bioloških (želatina, kitozan)

i sintetskih polimera. 'Bottom up' dizajn omogućuje prilagođavanje sastava i ugradnju specifičnih skupina prikladnih za okularnu primjenu. Npr., korištenjem poli(etilen oksid oksid)-poli(propilen oksid)-poli(etilen oksid) (PEO-PPO-PEO) polimernih micela izazvana je genska ekspresija oko šarenice, bjeloočnice, očne spojnice i lateralnog ravnog mišića zečjeg oka te u intraokularnom tkivu miševa nakon primjene očnih kapi. U drugim studijama pokazana je uspješna isporuka gena u retinalnim ganglijskim stanicama štakora nakon topikalne primjene liposoma. Nedavno je pokazano da POD (*peptide for ocular delivery*) i nanočestice kitozana uspješno transfektiraju retinalne stanice nakon subretinale, intravitrealne i topikalne primjene.

U citiranom radu razvijena je neviralna platforma za gensku isporuku temeljena na kompozitnim nanočesticama temeljenim na novoj klasi amfifilnih molekula, dvokationskih N,N-bis(dimetilalkil)- $\alpha,\omega$ -alken-diamonijevih surfaktanata, poznatih kao *gemini* surfaktanti. Isti se sastoje od najmanje dva hidrofobna repa (m) i dvije hidrofilne glave povezane razmaknicom (s) što se naziva m-s-m, npr. 12-3-12 (dva 12 C repa povezana s 3 C razmaknicom). Pomoću navedenih sustava može se dizajnirati širok raspon prilagođenih spojeva koji nude ogromnu strukturalnu fleksibilnost. *Gemini* molekule stvaraju stabilne komplekse s nukleinskim kiselinama i poboljšavaju *in vivo* gensku transfekciju. Razvijen je sustav plazmid-*gemini* surfaktant fosfolipidnih nanočestica (PGL-NP) koji ima DNA kondenzirajuća, amfipatska i površinski aktivna svojstva čime se potiče dostava u mrežnicu. Provedena su ispitivanja ovakvog sustava intravitrealnim putem kao i topikalnom primjenom uz studije optimiziranja formulacije, fizikalno-kemijske i transfekcijske karakterizacije te provjeru biokompatibilnosti s tkivom rožnice. Optimizirane GL-NP nanočestice (veličine 150-180 nm) bile su biokompatibilne s retinalnim ganglijskim stanicama oka štakora. Nakon intravitrealne primjene u miševa, GL-NP su bile lokalizirane unutar nervnog fibroznog sloja retine, dok je nakon topikalne primjene lokalizacija bila u više prednjih regija uključujući limbus, šarenicu i konjuktivu. Nanočestice su nakon obje vrste primjene bile termodinamički stabilne u vitrealnoj i suznoj tekućini i prenošene su kao pojedinačne, neagregirane čestice. Ovime je pokazan potencijal korištenja ovakvih čestica za daljnja ispitivanja genske isporuke radi regulacije toka vodenog humora i posljedično sniženja očnog tlaka (87).

## 4. Rasprava

Postojeći lijekovi koji se koriste u liječenju glaukoma jesu učinkoviti ali visok postotak pacijenata propušta primijeniti propisane doze. Zato bi budući lijekovi s produljenim oslobađanjem mogli poništiti komplikacije povezane s nepridržavanjem terapije. Uloga kapi za oko, danas primarno propisivanog farmaceutskog oblika, trebala bi postati sve manja upravo radi razvoja raznolikih sustava za isporuku lijekova u oko koji nude brojne prednosti u odnosu na postojeću terapiju glaukoma.

Prema podacima nađenim na Eyenet<sup>®</sup> Magazine ([www.aaio.org](http://www.aaio.org)) i [www.glaucomatoday.com](http://www.glaucomatoday.com) sljedeći implantabilni sustavi se bliže (ili jesu) u fazi 3 kliničkih ispitivanja te se njihov dolazak na tržište očekuje u sljedećih 3 do 5 godina:

- Bimotorprost SR (Allergan) je erodibilna peleta koja se ubrizgava u prednji segment oka vjerojatno će predstavljati prvi sustav za produljeno oslobađanje antiglaukopskih lijekova. Ova peleta kontinuirano oslobađa lijek tijekom 6 mjeseci prije nego se razgradi.
- iDose (Glaukos) je uređaj od titana koje se kirurški ugrađuje u trabekularni sustav te oslobađa travoprost. Zamjenjuje se svakih 6 do 12 mjeseci.
- Travoprost 515 (Envisia Therapeutic) predstavlja biorazgradljivi nanotehnološki polimerni sustav za isporuku lijeka koji se injektira intrakameralno i produljuje oslobađanje travoprosta.

Vanjski sustavi koji se očekuju na tržištu u sljedećih nekoliko godina:

- OTX-TP (Ocular Therapeutix) i Evolute (Mati Therapeutics) su lijekovi koji se punktiraju u oko te su dizajnirani za oslobađanje analoga prostaglandina u suzni sloj tijekom 3 mjeseca
- Bimatoprost ring (Allergan) je periokularni prsten koji se unosi u spojnički cul-de-sac te se zamjenjuje svakih 3 do 6 mjeseci nakon što se lijek oslobodi.

Unatoč tome što u ovom radu opisani sustavi isporuke oftalmoloških lijekova imaju jasne prednosti u odnosu na postojeće, potrebno je spomenuti i neke očigledne nedostatke. Problem s učinkovitošću – ukoliko se lijek s produljenim oslobađanjem uspoređuje s postojećim lijekovima u studijama neinferiornosti ili ekvivalencije s relativno širokim intervalom pouzdanosti, novi pristup možda neće

dati sasvim prikladne rezultate ali će i dalje ispunjavati propisane kriterije. Sigurnost – ukoliko treba prestati s terapijom (ili je potrebno istu promijeniti) postojat će poteškoće s vađenjem implantata koji aktivno oslobađa lijek. Cijena – sustavi produljenog oslobađanja vjerojatno će biti skupi te se postavlja pitanje daju li isti dodanu vrijednost terapiji. Međutim, moguće je da će neke verzije lijekova s produljenim oslobađanjem biti stvorene tako da se uštedi na troškovima u usporedbi sa standardnim oftalmološkim injekcijama.

U konačnici, nakon prevladavanja navedenih poteškoća izgledno je da će budući oftalmološki lijekovi s produljenim oslobađanjem biti učinkoviti, sigurni i isplativi te će sasvim sigurno pomoći bolesnicima uključujući one oboljele od glaukoma i time dovesti do napretka u ovom području farmakoterapije.

## 5. Zaključak

Opće je prihvaćeno da se glaukom smatra multifaktornom očnom bolesti te je stoga moguće predvidjeti multiterapijski pristup koji bi uz uobičajene metode za snižavanje očnog tlaka mogao spriječiti napredovanje bolesti.

Postojeća terapija glaukoma bazirana na farmaceutskim oblicima kapi za oko kojima se antiglaukomijski lijekovi isporučuju u vanjske dijelove oka ima višestruke nedostatke. Stoga su brojna istraživanja usmjerena na razvoj novih farmaceutskih oblika i sustava isporuke postojećih lijekova kako bi se produljilo vrijeme oslobađanja i time povećala biodostupnost lijekova istobno ograničavajući nuspojave koje ovakvi lijekovi imaju. Međutim, razvoj takvih lijekova je relativno složen, dugotrajan i skup postupak kojim je potrebno oblikovati lijek u skladu sa strogim zahtjevima sigurnosti, učinkovitosti i visoke kakvoće farmaceutika. Također, treba voditi računa o tehnici primjene lijekova kod bolesnika.

Razvijene su brojne strategije primjene antiglaukomijskih lijekova koje sežu od unosa lijeka u kontaktne leće do naprednih sustava gensko-stanične terapije koje bi u budućnosti mogle značajno poboljšati terapiju glaukoma. Mnoga istraživanja provode se i na razvoju umreženih polimera koji obavijaju lijek, protein ali i matične stanice te bi ovakvi sustavi mogli isporučiti lijek bilo gdje u organizmu a ne samo u oku.

Sadašnja i buduća istraživanja na području otkrivanja novih antiglaukomijskih lijekova kao i sustava za njihovu isporuku zasigurno će dovesti do napretka u liječenju ove sve raširenije bolesti.



## 6. Literatura

1. Li C, Chauhan A. (2007). Ocular transport model for ophthalmic delivery of timolol through p-HEMA contact lenses. *J Drug Deliv Sci Technol* 17:69-79.
2. Ruben M, Watkins R. (1975). Pilocarpine dispensation for the soft hydrophilic contact lens. *Br J Ophthalmol* 59:455-8.
3. Kim J, Chauhan A. (2008). Dexamethasone transport and ocular delivery from poly (hydroxyethyl methacrylate) gels. *Int J Pharm* 353:205-22.
4. Maulvi FA, Soni TG, Shah DO. (2015). Extended release of hyaluronic acid from hydrogel contact lenses for dry eye syndrome. *J Biomater Sci Polym Ed* 26:1035-50.
5. Schultz CL, Poling TR, Mint JO. (2009). A medical device/drug delivery system for treatment of glaucoma. *Clin Exp Optom* 92:343-8.
6. Soluri A, Hui A, Jones L. (2012). Delivery of ketotifen fumarate by commercial contact lens materials. *Optom Vis Sci* 89:1140-9.
7. Xu J, Li X, Sun F. (2011). In vitro and in vivo evaluation of ketotifen fumarate-loaded silicone hydrogel contact lenses for ocular drug delivery. *Drug Deliv* 18:150-8.
8. García-Millán E, Koprivnik S, Otero-Espinar FJ. (2015). Drug loading optimization and extended drug delivery of corticoids from pHEMA based soft contact lenses hydrogels via chemical and microstructural modifications. *Int J Pharm* 487:260-9.
9. Maulvi FA, Soni TG, Shah DO. (2014). Effect of timolol maleate concentration on uptake and release from hydrogel contact lenses using soaking method. *J Pharm Appl Sci* 1:17-23.
10. Hull DS, Edelhauser HF, Hyndiuk RA. (1974). Ocular penetration of prednisolone and the hydrophilic contact lens. *Arch Ophthalmol* 92:413-6.
11. Ruben M, Watkins R. (1975). Pilocarpine dispensation for the soft hydrophilic contact lens. *Br J Ophthalmol* 59:455-8.
12. Leshner GA, Gunderson GG. (1993). Continuous drug delivery through the use of disposable contact lenses. *Optom Vis Sci* 70:1012-8.
13. Karlgard C, Wong N, Jones L, Moresoli C. (2003). In vitro uptake and release studies of ocular pharmaceutical agents by silicon-containing and p-HEMA hydrogel contact lens materials. *Int J Pharm* 257: 141-51.
14. Alvarez Lorenzo C, Hiratani H, Gómez Amoza JL, et al. (2002). Soft contact lenses capable of sustained delivery of timolol. *J Pharm Sci* 91:2182-92.
15. Hiratani H, Mizutani Y, Alvarez -Lorenzo C. (2005b). Controlling drug release from imprinted hydrogels by modifying the characteristics of the imprinted cavities. *Macromol Biosci* 5:728-33.
16. White CJ, Byrne ME. (2010). Molecularly imprinted therapeutic contact lenses. *Expert Opin Drug Deliv* 7:765-80.
17. Alvarez-Lorenzo C, Yanez F, Barreiro-Iglesias R, Concheiro A. (2006b) Imprinted soft contact lenses as norfloxacin delivery systems. *J Control Release* 113:236-44.

18. Ali M, Horikawa S, Venkatesh S, et al. (2007). Zero-order therapeutic release from imprinted hydrogel contact lenses within in vitro physiological ocular tear flow. *J Control Release* 124:154-62.
19. Venkatesh S, Saha J, Pass S, Byrne ME. (2008). Transport and structural analysis of molecular imprinted hydrogels for controlled drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 69:852-60.
20. Venkatesh S, Sizemore SP, Byrne ME. (2007). Biomimetic hydrogels for enhanced loading and extended release of ocular therapeutics. *Biomaterials* 28:717-24.
21. Tieppo A, Pate KM, Byrne ME. (2012). In vitro controlled release of an anti-inflammatory from daily disposable therapeutic contact lenses under physiological ocular tear flow. *Eur J Pharm Biopharm* 81:170-7.
22. White CJ, McBride MK, Pate KM, et al. (2011b). Extended release of high molecular weight hydroxypropyl methylcellulose from molecularly imprinted, extended wear silicone hydrogel contact lenses. *Biomaterials* 32:5698-705.
23. Gupta C, Chauhan A. (2010). Drug transport in HEMA conjunctival inserts containing precipitated drug particles. *J Colloid Interface Sci* 347:31-42.
24. Jung HJ, Abou-Jaoude M, Carbia BE, et al. (2013). Glaucoma therapy by extended release of timolol from nanoparticle loaded siliconehydrogel contact lenses. *J Control Release* 165:82-9.
25. Hsu KH, Gause S, Chauhan A. (2014). Review of ophthalmic drug delivery by contact lenses. *J Drug Deliv Sci Technol* 24:123-35.
26. Gulsen D, Chauhan A. (2004). Ophthalmic drug delivery through contact lenses. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 45:2342-7.
27. Bazzaz BSF, Khameneh B, Jalili-Behabadi MM, et al. (2014). Preparation, characterization and antimicrobial study of a hydrogel (soft contact lens) material impregnated with silver nanoparticles. *Cont Lens Anterior Eye* 37:149-52.
28. Gulsen D, Chauhan A. (2005). Dispersion of microemulsion drops in HEMA hydrogel: a potential ophthalmic drug delivery vehicle. *Int J Pharm* 292:95-117.
29. Gulsen D, Li CC, Chauhan A. (2005). Dispersion of DMPC liposomes in contact lenses for ophthalmic drug delivery. *Curr Eye Res* 30: 1071-80.
30. Jung HJ, Chauhan A. (2012). Temperature sensitive contact lenses for triggered ophthalmic drug delivery. *Biomaterials* 33:2289-300.
31. Bazzaz BSF, Khameneh B, Jalili-Behabadi MM, et al. (2014). Preparation, characterization and antimicrobial study of a hydrogel (soft contact lens) material impregnated with silver nanoparticles. *Cont Lens Anterior Eye* 37:149-52.
32. Chandasana H, Prasad YD, Chhonker YS, et al. (2014). Corneal targeted nanoparticles for sustained natamycin delivery and their PK/PD indices: An approach to reduce dose and dosing frequency. *Int J Pharm* 477:317-25.
33. Zhang W, Zu D, Chen J, et al. (2014). Bovine serum albumin–meloxicam nanoaggregates laden contact lenses for ophthalmic drug delivery in treatment of postcataract endophthalmitis. *Int J Pharm* 475:25-34.

34. Loftsson T, Masson M, Brewster ME. (2004). Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *J Pharm Sci* 93:1091-9.
35. Xu J, Li X, Sun F. (2010). Cyclodextrin-containing hydrogels for contact lenses as a platform for drug incorporation and release. *Acta Biomaterialia* 6:486-93.
36. García-Fernández M, Tabary N, Martel B, et al. (2013). Poly-(cyclo) dextrins as ethoxzolamide carriers in ophthalmic solutions and in contact lenses. *Carbohydr Polym* 98:1343-52.
37. Dos Santos JFR, Couceiro R, Concheiro A, et al. (2008). Poly(hydroxyethyl)methacrylate-co-methacrylated- $\beta$ -cyclodextrin hydrogels: Synthesis, cytocompatibility, mechanical properties and drug loading/release properties. *Acta Biomaterialia* 4:745-55.
38. Glisoni RJ, García-Fernández MJ, Pino M, et al. (2013).  $\beta$ -Cyclodextrin hydrogels for the ocular release of antibacterial thiosemicarbazones. *Carbohydr Polym* 93:449-57.
39. Hu X, Tan H, Wang X, Chen P. (2016). Surface functionalization of hydrogel by thiol-yne click chemistry for drug delivery. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 489:297-304.
40. Danion A, Brochu H, Martin Y, Vermette P. (2007b). Fabrication and characterization of contact lenses bearing surface-immobilized layers of intact liposomes. *J Biomed Mater Res A* 82:41-51.
41. Guzman-Aranguez A, Colligris B, Pintor J. (2013). Contact lenses: promising devices for ocular drug delivery. *J Ocul Pharmacol Ther* 29:189-99.
42. Danion A, Arsenault I, Vermette P. (2007a). Antibacterial activity of contact lenses bearing surface-immobilized layers of intact liposomes loaded with levofloxacin. *J Pharm Sci* 96:2350-63.
43. Li CC, Abrahamson M, Kapoor Y, Chauhan A. (2007). Timolol transport from microemulsions trapped in HEMA gels. *J Colloid Interface Sci* 315:297-306.
44. Bengani LC, Chauhan A. (2013). Extended delivery of an anionic drug by contact lens loaded with a cationic surfactant. *Biomaterials* 34:2814-21.
45. Kapoor Y, Chauhan A. (2008b). Ophthalmic delivery of Cyclosporine A from Brij-97 microemulsion and surfactant-laden p-HEMA hydrogels. *Int J Pharm* 361:222-9.
46. Lu C, Yoganathan RB, Kociolek M, Allen C. (2013). Hydrogel containing silica shell cross-linked micelles for ocular drug delivery. *J Pharm Sci* 102:627-37.
47. Kapoor Y, Thomas JC, Tan G, et al. (2009). Surfactant-laden soft contact lenses for extended delivery of ophthalmic drugs. *Biomaterials* 30: 867-78.
48. Cho, YJ, Jee, JP. (2015). Hydrogel lenses functionalized with surface-immobilized PEG layers for reduction of protein adsorption. *Asian J Pharm Sci* 11:149.
49. Peng CC, Kim J, Chauhan A. (2010). Extended delivery of hydrophilic drugs from silicone-hydrogel contact lenses containing vitamin E diffusion barriers. *Biomaterials* 31:4032-47.
50. Kim J, Peng CC, Chauhan A. (2010). Extended release of dexamethasone from silicone-hydrogel contact lenses containing vitamin E. *J Control Release* 148:110-6.

51. Peng CC, Chauhan A. (2011). Extended cyclosporine delivery by silicone-hydrogel contact lenses. *J Control Release* 154:267-74.
52. Hsu KH, Fentzke RC, Chauhan A. (2013). Feasibility of corneal drug delivery of cysteamine using vitamin E modified silicone hydrogel contact lenses. *Eur J Pharm Biopharm* 85:531-40.
53. Peng CC, Burke MT, Chauhan A. (2011). Transport of topical anesthetics in vitamin E loaded silicone hydrogel contact lenses. *Langmuir* 28:1478-87.
54. Costa VP, Braga ME, Duarte CM, et al. (2010a). Anti-glaucoma drugloaded contact lenses prepared using supercritical solvent impregnation. *J Supercrit Fluids* 53:165-73.
55. Yañez F, Martikainen L, Braga ME, et al. (2011). Supercritical fluidassisted preparation of imprinted contact lenses for drug delivery. *Acta Biomaterialia* 7:1019-30.
56. Costa VP, Braga ME, Guerra JP, et al. (2010b). Development of therapeutic contact lenses using a supercritical solvent impregnation method. *J Supercrit Fluids* 52:306-16.
57. Duarte ARC, Simplicio AL, Vega-González A, et al. (2007). Supercritical fluid impregnation of a biocompatible polymer for ophthalmic drug delivery. *J Supercrit Fluids* 42:373-7.
58. Yokozaki Y, Sakabe J, Ng B, Shimoyama Y. (2015). Effect of temperature, pressure and depressurization rate on release profile of salicylic acid from contact lenses prepared by supercritical carbon dioxide impregnation. *Chem Eng Res Des* 100:89-94.
59. Kim HJ, Zhang K, Moore L, Ho D. (2014). Diamond nanogel-embedded contact lenses mediate lysozyme-dependent therapeutic release. *ACS Nano* 8:2998-3005.
60. Kakisu K, Matsunaga T, Kobayakawa S, et al. (2013). Development and efficacy of a drug-releasing soft contact lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54:2551-61.
61. Carreira A, Ferreira P, Ribeiro M, et al. (2014). New drug-eluting lenses to be applied as bandages after keratoprosthesis implantation. *Int J Pharm* 477:218-26.
62. Noha S El-Salamounia, Ragwa M Farida, (2016). Recent Drug Delivery Systems for Treatment of Glaucoma, 1-12.
63. Lavik, E., Kuehn, M.H., Kwon, Y.H., (2011). Novel drug delivery systems for glaucoma. *Eye* 25, 578-86.
64. Maulvi, F.A., Soni, T.G., Shah, D.O., (2016). A review on therapeutic contact lenses for ocular drug delivery. *Drug Deliv* 23, 3017-26.
65. Carvalho, I.M., Marques, C.S., Oliveira, R.S., Coelho, P.B., Costa, P.C., Ferreira, D.C., (2015). Sustained drug release by contact lenses for glaucoma treatment-A review. *J Control Release* 202, 76-82.
66. Hsu, K.H., Carbia, B.E., Plummer, C., Chauhan, A., (2015). Dual drug delivery from vitamin E loaded contact lenses for glaucoma therapy. *Eur J Pharm Biopharm* 94, 312-21.
67. Peng, C.C., Burke, M.T., Carbia, B.E., Plummer, C., Chauhan, A., (2012). Extended drug delivery by contact lenses for glaucoma therapy. *J Control Release* 162, 152-8.

68. Jung, H.J., Abou-Jaoude, M., Carbia, B.E., Plummer, C., Chauhan, A., (2013). Glaucoma therapy by extended release of timolol from nanoparticle loaded silicone-hydrogel contact lenses. *J Control Release* 165, 82-9.
69. Ciolino, J.B., Stefanescu, C.F., Ross, A.E., Salvador-Culla, B., Cortez, P., Ford, E.M., Wymbs, K.A., Sprague, S.L., Mascoop, D.R., Rudina, S.S., Trauger, S.A., Cade, F., Kohane, D.S., (2014). In vivo performance of a drug-eluting contact lens to treat glaucoma for a month. *Biomaterials* 35, 432-9.
70. Voss, K., Falke, K., Bernsdorf, A., Grabow, N., Kastner, C., Sternberg, K., Minrath, I., Eickner, T., Wree, A., Schmitz, K.P., Guthoff, R., Witt, M., Hovakimyan, M., (2015). Development of a novel injectable drug delivery system for subconjunctival glaucoma treatment. *J Control Release* 214, 1-11.
71. Krtalic, I., Radosevic, S., Hafner, A., Grassi, M., Nenadic, M., Cetina-Cizmek, B., Filipovic-Grcic, J., Pepic, I., Lovric, J., (2018). D-Optimal Design in the Development of Rheologically Improved In Situ Forming Ophthalmic Gel. *J Pharm Sci* 2018 Jun;107(6):1562-71.
72. Ribeiro, A., Veiga, F., Santos, D., Torres-Labandeira, J.J., Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C., (2012). Hydrophilic acrylic hydrogels with built-in or pendant cyclodextrins for delivery of anti-glaucoma drugs. *Carbohyd Polym* 88, 977-85.
73. Kulkarni, GT., Sethi N., Awasthi R., Pawar VK., Pahuja V., (2016). Development of Ocular Delivery System for Glaucoma Therapy Using Natural Hydrogel as Film Forming Agent and Release Modifier. *Polim Med.* 46(1), 25-33.
74. Cheng, Y.H., Tsai, T.H., Jhan, Y.Y., Chiu, A.W.H., Tsai, K.L., Chien, C.S., Chiou, S.H., Liu, C.J.L., (2016). Thermosensitive chitosan-based hydrogel as a topical ocular drug delivery system of latanoprost for glaucoma treatment. *Carbohyd Polym* 144, 390-9.
75. Cho, I.S., Park, C.G., Huh, B.K., Cho, M.O., Khatun, Z., Li, Z., Kang, S.W., Choy, Y.B., Huh, K.M., (2016). Thermosensitive hexanoyl glycol chitosan-based ocular delivery system for glaucoma therapy. *Acta Biomater* 39, 124-32.
76. Pepic, I., Lovric, J., Filipovic-Grcic, J., (2012). Polymeric Micelles in Ocular Drug Delivery: Rationale, Strategies and Challenges. *Chem Biochem Eng Q* 26, 365-77.
77. Hafner, A., Lovric, J., Romic, M.D., Juretic, M., Pepic, I., Cetina-Cizmek, B., Filipovic-Grcic, J., (2015). Evaluation of cationic nanosystems with melatonin using an eye-related bioavailability prediction model. *Eur J Pharm Sci* 75, 142-50.
78. Pepic, I., Jalsenjak, N., Jalsenjak, I., (2004). Micellar solutions of triblock copolymer surfactants with pilocarpine. *Int J Pharm* 272, 57-64.
79. Ribeiro, A., Sosnik, A., Chiappetta, D.A., Veiga, F., Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C., (2012). Single and mixed poloxamine micelles as nanocarriers for solubilization and sustained release of ethoxzolamide for topical glaucoma therapy. *J R Soc Interface* 9, 2059-69.
80. Park, C.G., Kim, Y.K., Kim, M.J., Park, M., Kim, M.H., Lee, S.H., Choi, S.Y., Lee, W.S., Chung, Y.J., Jung, Y.E., Park, K.H., Bin Choy, Y., (2015). Mucoadhesive microparticles with a nanostructured surface for enhanced bioavailability of glaucoma drug. *J Control Release* 220, 180-8.

81. Chiang, B., Kim, Y.C., Doty, A.C., Grossniklaus, H.E., Schwendeman, S.P., Prausnitz, M.R., (2016). Sustained reduction of intraocular pressure by supraciliary delivery of brimonidine-loaded poly(lactic acid) microspheres for the treatment of glaucoma. *J Control Release* 228, 48-57.
82. Fedorchak, M.V., Conner, I.P., Schuman, J.S., Cugini, A., Little, S.R., (2017). Long Term Glaucoma Drug Delivery Using a Topically Retained Gel/Microsphere Eye Drop. *Sci Rep-Uk* 7.
83. Ikuta, Y., Aoyagi, S., Tanaka, Y., Sato, K., Inada, S., Koseki, Y., Onodera, T., Oikawa, H., Kasai, H., (2017). Creation of nano eye-drops and effective drug delivery to the interior of the eye. *Sci Rep-Uk* 7.
84. Loma, P., Guzman-Aranguez, A., de Lara, M.J.P., Pintor, J., (2015). Diadenosine tetraphosphate improves adrenergic anti-glaucomatous drug delivery and efficiency. *Experimental Eye Research* 134, 141-7.
85. Nafissi, N., Foldvari, M., (2015). Neuroprotective therapies in glaucoma: II. Genetic nanotechnology tools. *Front Neurosci* 9, 355.
86. Johnson, T.V., Bull, N.D., Martin, K.R., (2011). Neurotrophic factor delivery as a protective treatment for glaucoma. *Experimental Eye Research* 93, 196-203.
87. Alqawlaq, S., Sivak, J.M., Huzil, J.T., Ivanova, M.V., Flanagan, J.G., Beazely, M.A., Foldvari, M., (2014). Preclinical development and ocular biodistribution of gemini-DNA nanoparticles after intravitreal and topical administration: Towards non-invasive glaucoma gene therapy. *Nanomed-Nanotechnol* 10, 1637-47.