



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 529**

51 Int. Cl.:

A61K 31/728 (2006.01)

A61K 31/715 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 36/48 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08835989 .8**

96 Fecha de presentación : **02.10.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2197456**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.06.2010**

54

Título: **Composiciones oftálmicas basadas en un polisacárido de la semilla de tamarindo y ácido hialurónico.**

30

Prioridad: **02.10.2007 IT RM07A0510**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.06.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.06.2011

73

Titular/es:
HMFRA Hungary Korlátolt Felelősségű Társaság
Villányi út 47. Fsz 1
1118 Budapest, HU

72

Inventor/es: **Del Prete, Antonio y**
Sanso, Marco

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 361 529 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones oftálmicas a base de polisacárido de la semilla de tamarindo y ácido hialurónico.

5 La presente invención se refiere a composiciones oftálmicas a base de polisacárido de la semilla del tamarindo y ácido hialurónico. Más particularmente, la invención se refiere a soluciones oftálmicas indicadas para su utilización como sustitutos de lágrima, que contienen una combinación de ácido hialurónico y un polisacárido conocido como PST (polisacárido de la semilla de *Tamarindus indica*) que, cuando se administra junto en una combinación, puede actuar sinérgicamente estimulando el retorno a la normalidad en la mucosa conjuntiva afectada por el síndrome del ojo seco, produciendo de este modo una mejora notable en el número y morfología de las microvellosidades de la conjuntiva.

10 Como es sabido, la superficie del ojo se mantiene constantemente húmeda por la presencia de la película de lágrima precorneal, que es una estructura líquida organizada que cubre la conjuntiva y la superficie expuesta del globo del ojo. Es fundamentalmente importante que la estructura sea adecuada cuantitativa y cualitativamente con objeto de obtener una limpieza y protección apropiada. Además, la película de lágrima contiene sustancias con gran poder bactericida como lisozima y anticuerpos, que protegen los ojos del ataque de muchos antígenos.

15 En condiciones normales, las lágrimas que son el resultado de una serie de soluciones excretadas por diferentes lágrimas en el saco de la conjuntiva, se disponen en capas sobre la superficie de la córnea y de la conjuntiva por los movimientos de los párpados, construyendo de este modo una estructura compleja en tres capas, que comprende:

- 20 • una capa interna de mucosidad, que está constituida por una mezcla de glucoproteínas (mucina) producida por células especializadas (es decir, las células caliciformes de la conjuntiva) que están presentes en el epitelio de la conjuntiva, dicha capa es adsorbida en la córnea, transformando de este modo el epitelio de la córnea en una superficie hidrófila: si falta la mucina las células epiteliales son hidrófobas y no pueden ser hidratadas por las lágrimas;
- 25 • una capa acuosa intermedia gruesa (segregada por las glándulas lacrimales principales y accesorias) que consta esencialmente de agua, electrolitos, proteínas, enzimas y mucina; esta capa se extiende sobre dicha superficie hidrófila, y tiene la función de proporcionar oxígeno atmosférico al epitelio de la córnea, de ejercer una actividad antibacteriana y de lavar cualquier residuo;
- 30 • una capa fina de lípido externa (segregada por las glándulas sebáceas del tarso palpebral o glándulas de Meibomio), que tienen las siguientes funciones: retardar la evaporación de la capa de agua subyacente, aumentando la tensión superficial para estabilizar la película que impide su escape de la piel y lubricar las pestañas.

35 El movimiento de las pestañas deja limpia la mucosidad de las células de la conjuntiva y la introduce dentro de los fórnix de la conjuntiva, y desde donde se distribuye uniformemente en toda la superficie de la córnea mediante los movimientos de parpadeo de los ojos.

40 La estructura en tres capas descrita anteriormente constituye un complejo sistema fisiológico, que tiene las principales funciones de proteger la superficie del ojo, manteniendo la hidratación, la lubricación y la limpieza de la superficie de la córnea, y de cooperar en la producción de una visión correcta. El perfecto equilibrio y la renovación continua de dicho sistema fisiológico es una condición necesaria para que pueda realizar dichas funciones. Para que dicho equilibrio y renovación se realice, puede tener lugar una evaporación de agua constante pero no excesiva de fluido lacrimal, para mantener la osmolaridad del mismo al nivel fisiológico de aproximadamente 300 mOsm/l, y la película de lágrima puede redistribuirse continuamente en la superficie de la córnea como resultado del parpadeo.

45 No solamente la estructura estratificada de los diferentes componentes es importante, sino también los solutos presentes en la misma son importantes. Los lípidos de la capa externa se colocan en una doble fase: una fase polar, adyacente a la capa intermedia, y una fase más gruesa en la interfase con el aire. La fase acuosa presenta en su lugar concentraciones iónicas fijas: principalmente sodio, potasio, calcio, magnesio, zinc, cloro y bicarbonato son importantes para mantener la osmolaridad de las lágrimas.

50 La integridad de la capa interna de mucina representa uno de los elementos esenciales del mantenimiento de la estabilidad de la película de lágrima. Esto debido a que la mucina aumenta la humectabilidad de la superficie de la córnea, permite que la película acuosa se mantenga adhiriéndose a la superficie expuesta de manera continua y homogénea, salvaguardando de este modo su estabilidad, y aumenta la estabilidad del fluido lacrimal, impidiéndole que se deslice demasiado rápidamente en el saco de la conjuntiva. Como ya se indicó, cuando la mucina falta o es insuficiente la córnea se vuelve no humectable y, como consecuencia del desequilibrio entre los electrolitos y las glucoproteínas presentes, la película de lágrima se vuelve inestable y se expone a la rotura con formación de áreas anhidras.

60 Varias enfermedades o condiciones anormales del ojo se manifiestan con las discontinuidades de la película de lágrima, como resultado, p. ej., de una frecuencia de parpadeo insuficiente, de la utilización prolongada de lentes de contacto, de la administración de algunos fármacos generales, o más frecuentemente, de una hiposecreción senil. Más

frecuentemente, el deterioro del lubricante eficaz y del sistema protector descrito anteriormente aparece en el “**síndrome del ojo seco**”, cuya velocidad aumenta en gran medida, principalmente debido a la polución atmosférica y a la consiguiente aparición de nuevos tipos de alergias. Realmente, el síndrome del ojo seco es la patología más frecuente en oftalmología, con una tasa entre el 10 y el 15% de la población general. En relación con esto, la expresión “ojos secos” se utiliza normalmente para referirse a las condiciones oftálmicas procedentes de la reducción o de la inestabilidad de la película de lágrima (forma caracterizada desde un punto de vista subjetivo, por una serie de síntomas molestos que comprenden la sensación de ardor, sensación del cuerpo extraño, fotofobia y visión borrosa, sensación ocular pesada, fácil irritación debida al viento, humo y polvo y trastornos visuales, mientras que las alteraciones típicas de la superficie de la córnea que ocurren en relación con esto se denominan generalmente con la terminología “**queratoconjuntivitis seca**”).

En dichas situaciones se produce una degeneración de las células de la conjuntiva, dando como resultado un aumento de descamación, pérdida de las microplacas de la superficie celular, destrucción de la membrana de las células epiteliales y reducción del número de células calciformes productoras de mucina. Las células epiteliales de la córnea y la conjuntiva parecen estar sufriendo y con un número reducido de microvellosidades, hasta su completa desaparición. La reducción del número de microvellosidades es con una buena aproximación proporcional a la gravedad de la afección y a la gravedad de la sintomatología. Esta situación anatomo-patológica está acompañada, en varios grados, por una infiltración de las células inflamatorias al nivel de las células conjuntivas. (Cennamo G.L., Del Prete A., Forte R., Cafiero G., Del Prete S., Marasco D., *Impression cytology with scanning electron microscopy: a new method in the study of conjunctival microvilli*, *Eye* (2007), 1-6).

Además de esto, el síndrome del ojo seco, que carece de un efecto protector de la película de lágrima, predispone a otras condiciones patológicas tales como la queratoconjuntivitis actínica, bacteriana, vírica y alérgica.

Ya que en los estudios en las patologías humanas presentaron todos los cambios que ocurren en un ojo seco, el estudio preclínico en un modelo animal de queratoconjuntivitis seca ayudó a comprender la causa natural de estos cambios. (Gilbard J.P., Rossi S.R., Gray K.L.: A new rabbit model for keratoconjunctivitis sicca, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **28**(2):225-228, (1987); Gilbard J.P., Rossi S.R., Gray K.L.; Hanninen L.A.: Natural history of disease in a rabbit model for keratoconjunctivitis sicca, *Acta Ophthalmol. (Suppl.)* 192:95-101, (1989). Se conoce ahora que el ojo seco se desarrolla a través de cuatro fases distintas:

1. pérdida de agua de la película de lágrima con un aumento de osmolaridad de la propia película;
2. disminución de la densidad de las células calciformes y disminución del glucógeno de la córnea (fuente energética para la cicatrización de posibles lesiones corneales);
3. aumento de la descamación de la córnea (debido al aumento del gradiente osmótico entre la película de lágrima y la superficie ocular, y a la disminución de las células calciformes, que retienen el agua de las células epiteliales de la conjuntiva);
4. desestabilización de la interfase córnea-película de lágrima.

Desde un punto de vista de diagnóstico, el síndrome del ojo seco puede detectarse y seguirse no solamente por medio de la evaluación de los síntomas típicos del mismo, sino también por medio de procedimientos muy demostrados, incluyendo, como el más frecuente, la evaluación de la secreción lacrimal (prueba de Schirmer), la evaluación del tiempo necesario para que la película de lágrima se rompa después de un parpadeo completo (tiempo de rotura, de BUT), y la evaluación del color de la superficie de la cornea en la tinción con rosa de Bengala o fluoresceína.

Otro fenómeno que se considera unánimemente que es señal de una película de lágrima irregularmente estructurada es la reducción de la **crystalización en helecho de la mucosidad**. En condiciones normales, la mucosidad se caracteriza por la cristalización en un modelo de helecho cuando se hace evaporar a temperatura ambiente en solución acuosa. El fenómeno de cristalización en helecho, que se cree que resulta de la interacción de los electrolitos con las glucoproteínas de alto peso molecular de la mucosidad, se pone de manifiesto después de un corto periodo desde la recolección de la mucosidad de la lágrima procedente del fórnix de la conjuntiva. Se ha determinado que varios modelos diferentes de dicho fenómeno, puestos de manifiesto por el ensayo de cristalización en helecho (es decir, cristalización en helecho uniforme de Tipo I; Tipo II, gran cantidad de cristalización en helecho con helechos de tamaño reducido y espacios vacíos; Tipo III; cristalización en helecho solamente presente en parte, Tipo IV, sin cristalización en helecho) están relacionados con el estado normal o patológico del fluido lacrimal. Una cristalización en helecho densa, por ejemplo, se considera que es la expresión de un perfecto equilibrio entre la mucina y los electrolitos, mientras que la presencia parcial o la ausencia de cristalización en helecho de la lágrima, que se detecta en los ojos afectados por queratoconjuntivitis seca, indica una falta cuantitativa de mucosidad de la lágrima o una alteración cualitativa de las glucoproteínas o de su medio (es decir, pH, hidratación, equilibrio electrolítico).

La queratoconjuntivitis seca se trata generalmente con preparados oftálmicos líquidos generalmente conocidos como “lágrimas artificiales”, que deben instilarse en gotas con objeto de sustituir o complementar la producción de lágrima natural. En el caso más sencillo dichas preparaciones tienen solamente un efecto humectante, ya que consisten en soluciones salinas fisiológicas, neutras e isotónicas con la película lacrimonal, a base de cloruro sódico solamente o en mezclas equilibradas de varios electrolitos.

Con el objeto de superar el inconveniente de la retención reducida dentro del saco de la conjuntiva, que es típica de dichas soluciones salinas, se han introducido las preparaciones de lágrima artificial, las cuales se vuelven viscosas por adición de agentes de alto peso molecular, tales como, habitualmente, los polímeros solubles en agua de origen sintético, semisintético o natural. Sin embargo, se ha observado que, para que dichos mejoradores de viscosidad confieran propiedades ventajosas a una composición para su utilización como lágrima artificial, no es suficiente que dichos mejoradores de viscosidad aumenten genéricamente la viscosidad del producto, sino que es necesario también que las dispersiones formadas de este modo tengan propiedades tan próximas como sea posible a las de las dispersiones de mucina. Esto es, dichas dispersiones pueden comportarse tanto como sea posible como sustancias mucomiméticas. Esto requiere, ante todo, un comportamiento reológico específico, es decir, no newtoniano (específicamente pseudoplástico) similar al comportamiento reológico de las lágrimas naturales. En efecto, únicamente pocos de los productos macromoleculares que pueden utilizarse como generadores de viscosidad para lágrimas artificiales son de hecho capaces de presentar un comportamiento similar.

Ejemplos de composiciones para su utilización como lágrimas artificiales que tienen un comportamiento reológico no newtoniano son aquellos que contienen polímeros de carboxivinilo tales como Carbopol®, los ésteres de celulosa, tales como metilcelulosa y los derivados alcohólicos de la misma (p. ej., hidroxipropilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa) y ácido hialurónico. Este último es un polisacárido de origen en muchos tejidos y fluidos, tanto humanos como animales, y empleado en gran medida en preparaciones oftálmicas, debido al comportamiento pseudoplástico marcado de sus soluciones acuosas, y debido a su buena capacidad para unirse tanto con el agua como con las paredes de las células epiteliales.

Un polímero de polisacárido natural que puede considerarse incluido en la categoría citada es el polisacárido obtenido de las semillas del tamarindo, el *Tamarindus indica*, una planta de hoja perenne que puede alcanzar 15 m de altura, que produce un fruto leguminoso y que está extendido en la India, en África y en todo el lejano Este donde se cultiva principalmente para la producción de alimentos. El fruto contiene semillas grandes que tienen un alto porcentaje de polisacáridos, que desempeñan la función de acumular y conservar sustancias energéticas vitales.

La semilla, que se consideró al principio un subproducto, ha hallado varias aplicaciones, una vez molida hasta la forma en polvo (conocida como “goma de tamarindo” o “polvo de la cáscara de tamarindo”). La más importante de dichas aplicaciones están en la industria textil y en la industria papelera, en las que se emplea la goma de tamarindo respectivamente como agente de apresto, y en la industria alimentaria, en la que se utiliza como agente espesante, gelificante, estabilizante y aglutinante en cualquier clase de productos, como lo hacen otros productos polisacáridos tales como los alginatos, pectinas, goma guar o goma de la semilla del algarrobo. El polvo de la cáscara de tamarindo en bruto, que está comercialmente disponible como tal, contiene del 65 al 73% en peso de polisacárido, del 15 al 23% de material proteico, del 3 al 8% de grasas y aceite y del 2 al 4% de cenizas, además de cantidades menores de fibra en bruto, taninos y otras impurezas.

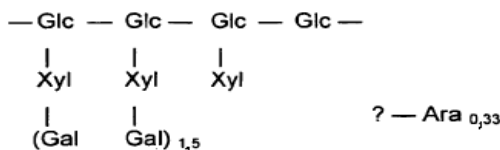
En el campo farmacéutico, la fracción polisacárido de la goma de tamarindo (polisacárido de la semilla del tamarindo, en lo sucesivo denominada también **PST**) ha hallado una utilización válida como componente activo de sustitutos de lágrima y como vehículo para fármacos oftálmicos tópicos de liberación controlada, en particular, en la Patente Europea EP 0892636 (Farmigea) y en la correspondiente patente de EE.UU. nº 6.056.950. Entre las propiedades mucomiméticas que la fracción de polisacárido de la goma de tamarindo parece tener debe ponerse de manifiesto la capacidad de “cristalización en helechito” descrita anteriormente. Por consiguiente, de manera similar al ácido hialurónico, dicha fracción de polisacárido puede proporcionar, por evaporación, productos cristalinos que tienen morfología completamente similar a la de la mucosidad de la lágrima cristalizada.

En vista de lo anterior, un objetivo de la presente invención consiste en definir un tratamiento farmacológico para la terapia del síndrome del ojo seco en la que el sustituto de la lágrima no es únicamente capaz de permanecer largo tiempo en la superficie ocular y de integrarse en la superficie de los epitelios, ejerciendo una función protectora sobre ellos, sino también puede ayudar al restablecimiento de su integridad, particularmente para ayudar a un rápido retorno a la normalidad en la mucosa de la conjuntiva, en general con respecto al número y a la morfología de las microvellosidades.

En el marco de los estudios que conducen a la invención se consideró que tanto las soluciones oftálmicas conocidas a base de PST como las más ampliamente difundidas a base de ácido hialurónico demostraron ser capaces de producir una mejora en la sintomatología del ojo seco, mejora que está en la base de su éxito comercial en el tratamiento de esta enfermedad, pero ambas de dichas soluciones produjeron beneficios relativamente modestos en cuanto se refiere a una eficacia y recuperación rápida de los daños histológicos que son típicos de la patología considerada, en particular con respecto de la estructura superficial microscópica del epitelio de la conjuntiva.

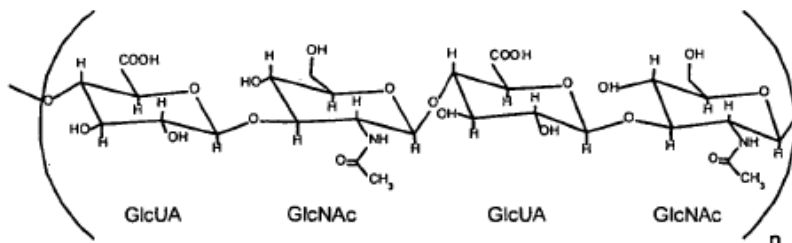
Basándose en las consideraciones anteriores se ha descubierto, según la presente invención, que la combinación específica de los ingredientes activos PST y ácido hialurónico, aplicada en la superficie ocular en un solo producto oftálmico, adquiere nuevas propiedades terapéuticas que los dos productos considerados por separado no tienen, particularmente en la ayuda a un retorno más rápido a la normalidad de la mucosa de la conjuntiva, especialmente con respecto al número y morfología de las microvellosidades. El restablecimiento de la integridad normal de las microvellosidades está asociado a un efecto de mayor duración en la mejora de las señales y síntomas que acompañan al síndrome del ojo seco.

Según varios estudios realizados sobre la estructura de la fracción de polisacárido de la goma del tamarindo, se verifica que el polisacárido de la semilla del tamarindo consta de una cadena principal de unidades de glucopiranosilo unidas unas a otras por enlaces (1→4), con cadenas laterales cortas constituidas por unidades de xilopiranosilo unidas a la cadena principal mediante enlaces (1→6). Dichas unidades de xilopiranosilo están aisladas, o pueden unirse, a su vez, a unidades individuales de galactopiranosilo mediante un enlace (1→2). Se publicó también la presencia adicional de unidades de arabinofuranosilo. Por consiguiente, la estructura del polisacárido de la semilla de tamarindo (PST) puede representarse de la forma siguiente



El procedimiento para la extracción, filtración y purificación del polímero procedente de la materia prima de partida requiere una alta especialización tecnológica para mantener inalteradas las características funcionales, en vista además del alto peso molecular, que oscila, en un producto correctamente purificado, entre 600.000 y 750.000 Da.

El ácido hialurónico se puede definir químicamente como un glucosaminoglucano no ramificado, constituido por unidades alternas de ácido D-glucurónico (GlcUA) y N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), cuya estructura puede representarse por la fórmula siguiente:



que presenta dos unidades de disacáridos distintas en la secuencia, y en la que el número n de parejas que se repiten de unidades es tal que el peso molecular del polisacárido está comprendido entre 50.000 y varios millones de daltons. El peso molecular medio del ácido hialurónico utilizado en oftalmología (en forma de la correspondiente sal sódica) para las soluciones de lágrima artificial está comprendido normalmente entre 700.000 y 1 millón de Da.

In vivo, todos los grupos carbonilo del ácido hialurónico y de la N-acetilglucosamina están completamente ionizados, proporcionando alta polaridad a la molécula de ácido hialurónico y por consiguiente alta solubilidad en agua. En virtud de su buena capacidad para unirse tanto con el agua como con la pared celular del epitelio, el ácido hialurónico se utiliza como principal componente en muchos sustitutos de lágrima en el tratamiento de la patología del ojo seco. BMC Ophthalmology, 2007, 7:5 (M. Rolando, C. Valente: Establishing the tolerability and performance of tamarind seed polysaccharide (TSP) in treating dry eye syndrome: results of a clinical study), da a conocer una comparación de las actividades de PST y del ácido hialurónico en el tratamiento del síndrome del ojo seco en un estudio clínico abierto, en un solo centro al azar.

En el campo de los estudios relacionados con la presente invención, algunos ensayos de laboratorio basados en el empleo de técnicas de resonancia magnética, que se describirán con más detalle a continuación, demostraron que PST puede interactuar en la solución con el ácido hialurónico (AH) provocando cambios de configuración que principalmente interesan las unidades internas de glucosa y galactosa de la PST y a los grupos acetilo del AH. Este hecho produce efecto sobre la capacidad de la mezcla para retener el agua que, para algunas relaciones de concentración, vuelve a ser notablemente mayor que la mostrada por los dos polímeros en forma no mezclada.

Debido a que la capacidad para retener el agua es fundamental para las características adhesivas y de biocompatibilidad de un polímero que va a utilizarse para el tratamiento del ojo seco, la investigación sobre la mezcla

5 PST-AH se ha extendido más, por medio de ensayos preclínicos sobre un modelo de ojo seco provocado en la rata con atropina, con objeto de evaluar la seguridad y la tolerancia de la mezcla. Basándose en los resultados obtenidos sobre dicho modelo (descrito también sintéticamente a continuación) es posible confirmar que la mezcla de PST y AH no presenta interacciones negativas entre los dos productos y que favorece una mejor recuperación de los daños histofisiológicos subsiguientes a la reducción aguda de la producción de lágrima.

10 Un ensayo clínico ulterior realizado como estudio piloto en un número relativamente limitado de pacientes (descrito a continuación), ha confirmado la eficacia del tratamiento propuesto, destacando un efecto sinérgico notable de la combinación de PST y AH.

15 Por consiguiente, la presente invención proporciona específicamente una preparación oftálmica para su utilización como sustituto de la lágrima que contiene, en combinación, del 0,05 al 2% en peso de polisacárido de la semilla de tamarindo y del 0,05 al 1% en peso de ácido hialurónico en solución acuosa.

20 La expresión "**polisacárido de la semilla de tamarindo**" (polisacárido de la semilla de *Tamarindus indica* o PST, a veces denominado también genéricamente con el término "**xiloglucano**") tal como se utiliza en la presente solicitud, significa cualquier fracción enriquecida con polisacárido que puede obtenerse de la goma de tamarindo (es decir polvo de cáscara de tamarindo), siendo este último el producto en bruto disponible en el mercado. Una fracción de polisacárido parcialmente purificada de goma de tamarindo está comercializada, por ejemplo, por Dai-nippon Pharmaceutical Co. LTD de Osaka, Japón, bajo la denominación comercial Glyloid[®]. En aras de la presente invención, sin embargo, la fracción de polisacárido referida se purifica preferentemente más para dar un polisacárido de la semilla del tamarindo prácticamente puro.

25 La expresión "ácido hialurónico", tal como se utiliza en la presente solicitud, significa el polisacárido descrito anteriormente (generalmente denominado también "glucosaminoglucano"), en particular en forma salina comúnmente utilizada para la formulación de lágrimas artificiales, es decir hialuronato sódico.

30 Preferentemente la preparación oftálmica según la invención contiene, en combinación en la solución acuosa, del 0,1 al 1% en peso del polisacárido de la semilla de tamarindo y del 0,1 al 0,5% en peso de ácido hialurónico.

35 Preferentemente, las concentraciones en peso en la preparación oftálmica según la invención están comprendidas entre 0,1 y 1 % de polisacárido de la semilla de tamarindo y entre el 0,1 y el 0,5% en peso de ácido hialurónico. Una realización que ha sido estudiada específicamente en el trabajo experimental proporcionado a continuación, y que proporciona superiores rendimientos clínicos con respecto a la capacidad de los dos agentes activos para cooperar en el restablecimiento de la normalidad del epitelio de la conjuntiva, contiene en solución acuosa, 0,2% en peso de polisacárido de la semilla de tamarindo y 0,4% en peso de ácido hialurónico.

40 Preferentemente, el polisacárido de la semilla de tamarindo en las preparaciones de la invención tiene un peso molecular comprendido en el intervalo entre 450.000 Da y 750.000 Da (preferentemente entre 600.000 y 750.000 Da) y el ácido hialurónico tiene un peso molecular comprendido en el intervalo entre 600.000 Da y 1.000.000 Da (preferentemente entre 700.000 y 1.000.000 Da).

45 En las formulaciones de lágrima artificial según la invención uno o más agentes para ajuste de tonicidad deberían añadirse, a fin de dar a la solución un valor correcto de osmolaridad. Para este objetivo, pueden utilizarse cualquiera de los productos actualmente empleados en la técnica como agentes de tonicidad, tales como, por ejemplo, cloruro sódico, cloruro potásico, manitol, dextrosa, ácido bórico, sorbitol o propilenglicol.

50 Otros ingredientes que pueden incluirse en la formulación, según la técnica conocida, son los ácidos o bases como agentes para ajuste de pH, así como tampones, tales como, p. ej., el tampón fosfato (fosfato sódico monobásico y el fosfato sódico dibásico) o tampón acetato (sistema acetato-ácido acético). Otros tampones que pueden utilizarse son los tampones borato, citrato, bicarbonato y trizma (triptófano-hidroximetil-aminometano).

55 La composición puede comprender además conservantes y agentes antimicrobianos, tales como cloruro de benzalconio, mertiolato sódico o timerosal, metil-, etil- y propil-parabeno, clorobutanol, nitrato o acetato de fenilmercurio, alcohol feniletílico, acetato o gluconato de clorhexidina, así como agentes quelantes tales como los edetatos o EDTA. Debido a los problemas de tolerancia de los conservantes, es preferible no incluir dichos ingredientes en las formulaciones para su utilización como lágrimas artificiales. Esto es obviamente posible cuando el producto se envasa en recipientes de dosis unitaria. En algunos casos, sin embargo, y especialmente cuando el producto está en recipientes de dosis múltiple, es necesaria la adición de conservantes.

60 Según un aspecto adicional de la misma, la presente invención se refiere a la utilización de una combinación de polisacárido de la semilla de tamarindo y de ácido hialurónico en solución acuosa para la producción de un preparado destinado al tratamiento del síndrome del ojo seco.

Como ya se indicó, dicho sustituto o preparado de lágrima comprende preferentemente del 0,05 al 2% en peso de polisacárido de la semilla de tamarindo y del 0,05 al 1% en peso de ácido hialurónico, y más preferentemente comprende del 0,1 al 15 en peso de polisacárido de semilla de tamarindo y del 0,1 al 0,5% en peso de ácido hialurónico.

5 El polisacárido de la semilla de tamarindo del preparado propuesto para la utilización descrita a continuación de manera apropiada tiene un peso molecular comprendido entre 600.000 Da y 750.000 Da, mientras que el peso molecular del ácido hialurónico está comprendido preferentemente entre 700.000 y 1.000.000 Da.

10 La presente invención se da a conocer además por los siguientes ejemplos no restrictivos, según algunas realizaciones específicas de la misma, que ilustran ejemplos de formulaciones a base de xiloglucano y ácido hialurónico empleadas como sustitutos de lágrimas, con una actividad protectora y re-epiteliente, según lo que se ha determinado experimentalmente y publicado en la declaración experimental siguiente.

15 **Ejemplos de formulaciones de lágrimas artificiales**

Ejemplo 1

Ingredientes	% en peso
PST	0,1
Ácido hialurónico	0,1
Manitol	2,00
Agua desionizada	c.s.p. 100
Fosfatos de sodio monobásico y de sodio dibásico	c.s.p. pH 7,0 ± 0,5

20 El producto se prepara mediante las etapas siguientes:

- PST y AH se pesan en un recipiente de vidrio adecuado;
- el 90% del agua disponible se añade con una ligera agitación hasta la disolución completa del producto;
- se añade la cantidad de manitol manteniendo la agitación, y se deja en agitación la mezcla hasta la disolución completa del producto;
- 25 • se añade agua desionizada hasta el peso final (100%);
- se añaden fosfatos sódico monobásico y sódico dibásico hasta alcanzar el pH deseado;
- la solución obtenida de este modo se esteriliza en autoclave o como alternativa se esteriliza por filtración con un filtro de 0,22 micras.

30 **Ejemplo 2**

Ingredientes	% en peso
PST	0,1
Ácido hialurónico	0,4
Manitol	2,00
Agua desionizada	c.s.p. 100
Fosfatos de sodio monobásico y de sodio dibásico	c.s.p. pH 7,0 ± 0,5

El producto se prepara de la misma manera que en el Ejemplo 1.

35 **Ejemplo 3**

Ingredientes	% en peso
PST	0,2
Ácido hialurónico	0,1
Manitol	2,00
Agua desionizada	c.s.p. 100
Fosfatos de sodio monobásico y de sodio dibásico	c.s.p. pH 7,0 ± 0,5

El producto se prepara de la misma manera que en el Ejemplo 1.

Ejemplo 4

Ingredientes	% en peso
PST	0,2
Ácido hialurónico	0,2
Manitol	2,00
Agua desionizada	c.s.p. 100
Fosfatos de sodio monobásico y de sodio dibásico	c.s.p. pH 7,0 ± 0,5

El producto se prepara de la misma manera que en el Ejemplo 1.

5 **Ejemplo 5**

Ingredientes	% en peso
PST	0,2
Ácido hialurónico	0,4
Manitol	2,00
Agua desionizada	c.s.p. 100
Fosfatos de sodio monobásico y de sodio dibásico	c.s.p. pH 7,0 ± 0,5

El producto se prepara de la misma manera que en el Ejemplo 1.

10 **Ejemplo 6**

Ingredientes	% en peso
PST	0,4
Ácido hialurónico	0,1
Manitol	2,00
Agua desionizada	c.s.p. 100
Fosfatos de sodio monobásico y de sodio dibásico	c.s.p. pH 7,0 ± 0,5

El producto se prepara de la misma manera que en el Ejemplo 1.

15 **Ejemplo 7**

Ingredientes	% en peso
PST	0,4
Ácido hialurónico	0,2
Manitol	2,00
Agua desionizada	c.s.p. 100
Fosfatos de sodio monobásico y de sodio dibásico	c.s.p. pH 7,0 ± 0,5

El producto se prepara de la misma manera que en el Ejemplo 1.

20 **Ejemplo 8**

Ingredientes	% en peso
PST	1,0
Ácido hialurónico	0,1
Manitol	2,00
Agua desionizada	c.s.p. 100
Fosfatos de sodio monobásico y de sodio dibásico	c.s.p. pH 7,0 ± 0,5

El producto se prepara de la misma manera que en el Ejemplo 1.

Ejemplo 9

Ingredientes	% en peso
PST	1,0
Ácido hialurónico	0,4
Manitol	2,00
Agua desionizada	c.s.p. 100
Fosfatos de sodio monobásico y de sodio dibásico	c.s.p. pH 7,0 ± 0,5

El producto se prepara de la misma manera que en el Ejemplo 1.

5 Algunos resultados experimentales que muestran las propiedades de las combinaciones de polisacáridos según la invención y el rendimiento de las preparaciones que contienen las mismas se proporcionan a continuación, junto con algunos gráficos y fotografías mostradas en los dibujos adjuntos, en los que:

10 La **Figura 1** presenta, en forma de histograma, los resultados de un estudio piloto sobre la eficacia de la composición según la invención en el tratamiento del síndrome del ojo seco, como concierne a la evaluación de las microvellosidades de la conjuntiva, en relación con los valores absolutos;

15 La **Figura 2** presenta los resultados, en el mismo estudio piloto de la evaluación de las microvellosidades de la conjuntiva, en relación con la variación de los valores iniciales;

La **Figura 3** presenta una imagen SEM a 7500x de un epitelio de la conjuntiva del ojo izquierdo de una paciente del mismo estudio piloto, perteneciendo dicha paciente al grupo PST+AH, antes del tratamiento;

20 La **Figura 4** presenta una imagen SEM a 7500x de un epitelio de la conjuntiva del ojo izquierdo de la misma paciente de la Figura 3, después de 60 días de tratamiento con PST+AH;

La **Figura 5** presenta en forma de histograma los resultados del mismo estudio piloto de la Figura 1, en cuanto concierne a la evaluación de los efectos sobre la sintomatología subjetiva, en relación con los valores absolutos;

25 La **Figura 6** presenta los resultados, en el estudio piloto, de la evaluación de los efectos de la sintomatología subjetiva, en relación con los valores iniciales.

30 La **Figura 7** presenta, en forma de histograma, los resultados del mismo estudio piloto de la Figura 1, en cuanto concierne a la evaluación de los efectos sobre la sintomatología subjetiva, en relación con los valores absolutos;

La **Figura 8** presenta los resultados, en el mismo estudio piloto, de las evaluaciones de los efectos de la sintomatología subjetiva, en relación con los valores iniciales.

35 La **Figura 9** presenta, en forma de histograma, los resultados del mismo estudio piloto de la Figura 1, en cuanto concierne a la evaluación del efecto sobre la citología subjetiva, en valores absolutos;

La **Figura 10** presenta los resultados, en el mismo estudio piloto, de la evaluación de los efectos sobre la citología, en relación con la variación con respecto a los valores iniciales.

40 La **Figura 11** presenta, en forma de histograma, los resultados del mismo estudio piloto de la Figura 1, en cuanto concierne a la puntuación total (puntuación combinada) de la evaluación previa, en relación con los valores absolutos; y

45 La **Figura 12** presenta los resultados, en el mismo estudio piloto, de la puntuación combinada de las evaluaciones anteriores, en relación con la variación con respecto de los valores iniciales.

Investigación por RMN sobre la mezcla de ácido hialurónico (AH) y PST en solución acuosa

50 Se proporcionan hidrogeles de polisacárido de una estructura tridimensional muy complicada, dentro de los cuales puede estar incorporada el agua. El contenido en agua, el tipo de interacción que se produce entre el agua y los materiales poliméricos, así como la distribución del agua internamente por el propio polímero tienen una influencia crítica sobre las propiedades mecánicas, la mucoadhesividad y están en la base del alto grado de biocompatibilidad. Normalmente se distinguen tres tipos de agua en el gel de polisacárido: agua ligada, agua intermedia y agua libre.

55 La espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) representa una de las técnicas más útiles para el estudio de la estructura, de la movilidad y de las propiedades de hidratación de los sistemas poliméricos. En particular, parece muy útil la medición del tiempo de relajación spin-spin (T_2) o spin-grid (T_1) de los núcleos de los protones del agua. El

tiempo de relajación T_2 representa el tiempo constante que describe la disminución de la magnetización transversal a lo largo del tiempo, mientras que el tiempo de relajación T_1 describe el proceso de recuperación de la magnetización longitudinal.

5 Cuando se disuelve un polisacárido en agua, las moléculas de agua forman enlaces de hidrógeno con éste y por consiguiente se reduce su movilidad, conduciendo a una reducción tanto de T_1 como de T_2 . Normalmente, sin embargo, no se detectan distintas señales para el agua combinada y el agua libre, pero una sola señal que representa el peso promedio de las contribuciones procedentes de las dos clases de agua. Como consecuencia, el parámetro RMN medido (T_1 y/o T_2) representa el promedio en peso de este parámetro en el estado libre y enlazado, según la siguiente ecuación (ecuación 1):

$$\frac{1}{T_{obs}} = X_b \frac{1}{T_b} + X_f \frac{1}{T_f} \quad (1)$$

10 en la que $\frac{1}{T_{abs}}$ describe el índice de velocidad de relajación (recíproco del tiempo T_1 o T_2) medido para el agua en la solución de interés, $\frac{1}{T_b}$ es el índice de velocidad de relajación del agua enlazada y $\frac{1}{T_f}$ es el índice de velocidad de relajación del agua libre, igual al medido en una solución que carece del material polimérico. X_b y X_f son, respectivamente, la fracción molar del agua combinada y libre.

15 El número de moléculas de agua combinada puede expresarse de la siguiente manera, dependiendo de la superficie S del polímero, o de los espesores K de la capa superficial de agua combinada y del volumen total de agua V (ecuación 2):

$$X_b = K \times \frac{C}{V} \quad (2)$$

20 Cuando la concentración de polímero aumenta, tanto T_1 como T_2 disminuyen como consecuencia del incremento de la superficie polimérica y, por consiguiente, del número de moléculas de agua combinadas, a menos que ocurran variaciones de configuración o fenómenos autorreguladores dependiendo de la variación de la propia concentración, sin embargo, el efecto sobre la velocidad de relajación transversal ($\frac{1}{T_2}$) es mucho más marcado que el indicado sobre la velocidad de relajación longitudinal ($\frac{1}{T_1}$).

25 En estas moliendas, se realizaron los experimentos siguientes de medición de la velocidad de relajación transversal ($\frac{1}{T_2}$) en los núcleos de protones de agua se realizaron en las soluciones siguientes:

- a) Soluciones de PST que tienen concentración variable, desde 0,1% (p/p) hasta 1%;
- b) soluciones de AH que tienen concentración variable, desde 0,1% (p/p) hasta 1%;
- c) mezclas que contienen concentraciones variables de AH y PST, con concentración total constante igual al 0,5%, obtenidas mezclando volúmenes adecuados de soluciones madre con concentración total de 0,5%; y
- d) mezclas que contienen concentraciones variables de AH y PST, con concentración total constante igual al 1%, obtenidas mezclando volúmenes adecuados de soluciones madre con la concentración total del 1%.

30 Con objeto de obtener información sobre la naturaleza de la interacción que se produce entre los dos materiales poliméricos, se han comparado también los parámetros espectrales de los dos polímeros AH y PST en las diferentes concentraciones y en sus mezclas. Los parámetros espectrales considerados son los siguientes:

- 1. Desplazamiento químico de ^{23}Na de AH;
- 2. mediciones de relajación de spin-grid selectiva en protones anoméricos de PST y en protones de acetilo de AH;
- 3. mediciones de relajación spin-spin en protones de AH y PST;
- 4. mediciones DOSY (del inglés, Diffusion Ordered Spectroscopy) para determinar la difusión de H_2O (determinación del agua incorporada en el polímero).

35 Las mediciones de desplazamiento químico de ^{23}Na y las realizadas en el grupo acetilo del ácido hialurónico van dirigidas a determinar si la interacción entre los dos materiales poliméricos implica los grupos polares ionizados del ácido hialurónico o de su grupo acetilo.

Las mediciones realizadas en los protones anoméricos van dirigidas a determinar qué tipos de unidades PST están implicadas con frecuencia en la interacción con AH.

Preparación de muestras para el análisis RMN y procedimientos de medición

Se prepararon soluciones madre disolviendo polímeros sólidos en D₂O a las concentraciones deseadas. Se prepararon dos series de soluciones, la primera obtenida después de agitar a temperatura ambiente durante 12 h y la segunda después de agitar durante 12 h a temperatura ambiente y agitación bajo calentamiento a 80°C durante aproximadamente 60 min. Los resultados obtenidos de las dos series de soluciones coincidieron completamente; por consiguiente en la siguiente exposición no se hará ninguna distinción entre ellos.

Se realizaron estudios por RMN en un espectrómetro de RMN INOVA 600 14T de Varian, operando a 600 MHz para ¹H y 158,6 MHz para ²³Na, suministrados por una sonda de resonancia triple inversa de 5 mm y una sonda de banda ancha de 5 mm para examen directo. El espectrómetro se equipa con un sistema de control de temperatura de ± 0,1°C.

Los tiempos spin-spin T₁ de relajación de protón selectivos son los obtenidos con la recuperación de la inversión de la secuencia estándar (180°-τ-90°-adquisición) para aplicación selectiva de un impulso de inversión de la frecuencia deseada.

Los tiempos spin-spin T₂ de relajación se midieron utilizando la secuencia Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) (90°-τ-(180°-2τ)_n).

Se registraron cartografías DOSY (del inglés, Diffusion Ordered SpectroscopY) utilizando un tiempo de relajación de 3 s con un número de transitorios igual a 4. Se utilizaron 30 gradientes y se optimizaron los parámetros δ y Δ (1 ms y 80 ms, respectivamente) para obtener un descenso hasta 10-5% de la señal inicial.

Medición del tiempo de relajación ($R_2 = \frac{1}{T_2}$) del agua

Ante todo, se tomaron medidas del tiempo de relajación T₂ del agua en soluciones que contenían los dos polímeros puros con concentraciones variables desde 0,1% a 1%.

Para PST, se miden valores incrementando desde 0,90 s⁻¹ en la solución más diluida (0,1% p/p) hasta 3,08 s⁻¹ en la solución que tiene la concentración del 1%. El aumento de la velocidad de relajación spin-spin está de acuerdo con lo que era de esperar basándose en el aumento de la fracción molar del agua combinada, que sigue al aumento de la concentración de polímero.

Para el ácido hialurónico puro se observa un aumento similar del parámetro de relajación del agua al aumentar la concentración de polímero. No solamente los valores medidos son notablemente inferiores con respecto a los observados para PST a la misma concentración, sino también la variación total es significativamente inferior. Teniendo en cuenta que los pesos moleculares de los dos polímeros son ambos muy altos, dicha diferencia puede correlacionarse razonablemente con la tendencia diferente a la autoagregación de los dos polímeros: probablemente PST tiene una tendencia menor a autoasociarse a concentraciones crecientes con respecto de AH y como consecuencia de los fenómenos de autoagregación se produce un aumento de la fracción de agua combinada con respecto al agua libre.

A continuación, se miden las velocidades de relajación del agua en las mezclas PST-AH que tienen una concentración total constante igual al 0,5% (solución c), pero con velocidades variables entre los dos componentes. Los valores medidos se comparan con los obtenidos para los dos polímeros puros a la misma concentración de la mezcla o a su concentración total. Los resultados obtenidos con relaciones en peso variables entre PST y AH permiten concluir que con las relaciones PST/AH variables entre 3:2 y 4:1 la interacción entre los dos materiales poliméricos se vuelve muy cooperativa, conduciendo de este modo a un aumento repentino de la fracción molar del agua combinada con respecto a la típica de los polímeros individuales a la máxima concentración.

En las soluciones que tienen una concentración total igual al 1% (solución d) se reproduce el comportamiento, esto es, para las relaciones PST/AH comprendidas entre 6,4 y 8,2 la velocidad de relajación del agua en la mezcla presenta un aumento repentino hasta una valor que es mayor que el valor medido para PST y para AH, tanto a la misma concentración en la que cada uno de ellos está presente en la mezcla como la concentración correspondiente al volumen total (1%). El comportamiento cooperativo de los dos polímeros se confirma por lo tanto; este comportamiento que parece ser más crítico depende de la relación entre los dos polímeros que de su concentración total.

Medición de la velocidad de relajación longitudinal ($R_1 = \frac{1}{T_1}$) del grupo acetilo del ácido hialurónico

La velocidad de relajación longitudinal R₁ de los protones acetílicos del ácido hialurónico se midió en las mezclas que tienen una concentración total constante igual al 0,5% y unas relaciones PST/AH variables. El comportamiento de la velocidad R₁ de relajación del grupo acetilo es particularmente interesante en las mezclas AH/PST que tienen una

5 concentración total del 0,5%, en las que se observa una vez más una disminución de la velocidad de la relajación R_1 al aumentar la concentración de AH, pero con valores absolutos que son todavía menores que los medidos en ausencia de PST a la misma concentración. La cantidad de la reducción producida en la velocidad de relajación en el grupo acetilo como consecuencia de la presencia de PST se hace mayor a las relaciones variables desde 3:2 a 4:1; en este hueco se confirma el efecto sinérgico notable de los dos polímeros.

10 También la velocidad de relajación spin-spin R_2 de los protones acetilo sigue el mismo comportamiento, tanto en el polímero puro como en su mezcla con PST; esto es al aumentar la concentración de AH se obtiene una disminución del parámetro de relajación, pero las velocidades de relajación en la mezcla son menores, y la disminución en la mezcla con respecto del componente puro aumenta con las relaciones altas de PST/AH.

Medición de la velocidad de relajación spin-spin R_2 de los protones seleccionados de PST en presencia y ausencia del ácido hialurónico a la concentración total del 0,5%

15 En el espectro de las mezclas, los protones anoméricos de PST a 5,06 ppm, 4,85 ppm y 4,45 ppm resulta no estar solapada para las señales del ácido hialurónico y, como tal, se consideran una base con el objetivo de obtener información de los protones de PST implicados en la interacción con AH.

20 En particular, el protón a 4,45 ppm correspondiente a las unidades de glucosa y galactosa se comporta de forma completamente diferente con respecto a los demás protones. De hecho, su valor es escasamente dependiente de la concentración de la solución del componente puro. Los mismos cambios en una manera significativa en presencia de AH; en particular, al contrario que los demás protones, experimenta una disminución significativa cuando aumenta el contenido de AH. Este comportamiento debe ser atribuido a las variaciones de configuración producidas en PST como consecuencia de la interacción con AH.

25 Conclusiones

30 Los resultados de los estudios por RMN sintetizados anteriormente demuestran claramente que la interacción entre PST y AH se vuelve cooperativa en función de la relación en peso entre los dos polímeros. Dicha interacción conduce a variaciones de configuración que interesan principalmente a las unidades internas de glucosa y galactosa de PST y a los grupos acetilo de AH. Los grupos carboxilo del propio AH, por el contrario, parecen no estar influidos. Estos último, probablemente, que están presentes en forma iónica, tienden siempre a colocarse mirando la fase en lugar de PST con la que AH interactúa. Esta última conclusión está apoyada por el escaso efecto del desplazamiento químico del sodio consecuente con las variaciones de la concentración total y de la relación entre los dos polímeros.

35 El efecto de la interacción sobre la capacidad de los dos polímeros para unirse al agua es muy importante: éste es más marcado en las mezclas con respecto a los polímeros puros. Los estudios realizados han demostrado claramente la existencia de un intervalo de la relación PST/AH comprendido entre 3:2 y 4:1, en los que la capacidad de las mezclas para incorporar el agua llega a ser muy alta. Dicha propiedad parece ser fundamental para las características adhesivas y de biocompatibilidad de la mezcla polimérica resultante.

40 Evaluación de la eficacia de las mezclas de AH y PST en un modelo animal, en comparación con la preparación en el mercado como lágrima artificial

45 Una de las suposiciones para la aplicación de lágrimas artificiales es un estado normal de la película de lágrima. Los ojos presentan cada vez con más frecuencia problemas de lagrimeo, debidos también a la utilización de terminales de video, a la polución atmosférica, a la alimentación y a las alergias ambientales que afectan la calidad y la cantidad de la lagrimeo, y, por consiguiente, la posibilidad de aplicar lentes de contacto. A este respecto, habría que señalar que una alteración de la película de lágrima conduce inevitablemente a una reutilización definitiva de la terapia con lágrimas artificiales.

50 En vista de la administración prolongada de un producto para administración tópica tal como las lágrimas artificiales, es particularmente importante tener pruebas disponibles que puedan garantizar la ausencia de efectos secundarios graves, tales como la opacificación de la lente y la tolerancia de la retina.

55 En la primera sección de las pruebas preclínicas realizadas, la eficacia y los posibles efectos secundarios del producto propuesto según la invención se evaluaron en comparación con los otros cinco productos ya en el mercado en un modelo de animal sano; la segunda sección, en su lugar, aprovecha un modelo patológico adecuado para investigar más a fondo las ventajas reales implicadas en el tratamiento con lágrimas artificiales.

60 Prueba de lagrimeo

La **prueba I de Schirmer** consiste en la introducción de una tira de papel secante, de material y tamaño normal, en el fórnix inferior de la conjuntiva, hacia el canto externo. La tira se deja *in situ* durante un periodo predeterminado de tiempo (3 min.) y después de dicho periodo se mide la parte empapada, excluyendo la parte doblada. El tiempo

empleado por el líquido de la lágrima en ascender y la longitud en mm de la parte del papel empapada por las lágrimas proporciona el tamaño de la secreción de la lágrima.

5 En la práctica diaria es posible realizar la prueba durante un periodo de 1 min. y multiplicar por 3 el valor obtenido. A continuación (el resultado que está menos afectado por la lagrimeo reflejo) se compara con los valores definidos por Schirmer. Una porción empapada inferior a 5 mm (en 5 minutos) se considera patológica.

10 La **evaluación del pH**, que se realiza mediante la utilización de un papel de tornasol adecuado, es una prueba importante para poner de manifiesto algunos cambios patológicos en el epitelio. Los valores normales del pH de las lágrimas en el hombre oscilan entre 6,8 y 7,4, mientras que en la rata dicho intervalo se mueve a través de valores superiores (desde 7 a 8). Sin embargo, en un estado patológico, el líquido de la lágrima se vuelve básico.

La prueba de cristalización en helechó fue descrita en sus generalidades en la sección de introducción.

15 El **examen de la córnea** comprende el **marcado con fluoresceína sódica**, tras lo cual la superficie de la córnea se examina al microscopio de fluorescencia. Un marcado con mancha pone de manifiesto la presencia de zonas secas en la superficie del ocular, síntoma de sequedad de la córnea. El **marcado con verde de lisamina**, en su lugar, permite poner de manifiesto la presencia de zonas ulceradas o necróticas en la superficie del ocular.

20 Ejecución de los experimentos

La experimentación incluía el establecimiento de los siguientes grupos experimentales, compuestos cada uno de 3 ratas albinas (= 6 ojos).

- 25
1. grupo de referencia
 2. composición según la invención (ácido hialurónico al 0,4% + PST al 0,2%):(PST + AH)
 3. mezcla de glicoles e hidroxipropil-guar (botella multidosis de Systane, Alcon):(goma guar)
 4. ácido hialurónico al 0,15% (monodosis de Blu Yal, Sooft):(AH al 0,15%)
 5. ácido hialurónico al 0,4% (monodosis de Dropstar, Farmigea):(AH al 0,4%)
 - 30 6. galactoxiloglucano (monodosis al 0,2% de PST, Farmigea):(PST al 2%)
 7. carboximetilcelulosa sódica al 0,5 % (monodosis de Celluvisc, Allergan):(CMC al 0,5%)
 8. ácido hialurónico al 0,2% (Hyalistil al 0,2%, Sifi):(AH al 0,2%)

35 Fase 1

Durante la primera fase experimental, se evaluó la calidad de los productos en un modelo de animales sanos; se trataron los animales con las soluciones respectivas 3 veces al día durante 5 días. Se realizaron pruebas con las siguientes modalidades.

40 Se realizó la **prueba I de Schirmer** después de 2, 3, 4 y 5 días, tras la administración de atropina, en ambos ojos de todos los animales, manteniendo durante 3 min. las tiras de papel secante en el tercio externo del fórnix de la conjuntiva. Se realizó la **medición de pH** el día 0 y el día 5 utilizando el papel de tornasol adecuado. Se realizó la **prueba de cristalización en helechó** en muestras de película de lágrima procedente de los animales tratados con las diferentes formulaciones el día 5, mezclando 10 µl de cada formulación con 2 µl de lágrimas artificiales. Se examinó la muestra al microscopio, a temperatura ambiente (20 ± 1°C). Se realizó el examen de la córnea después de 3, 4 y 5 días, tras la administración de atropina. Después del marcaje con fluoresceína y con verde de lisamina, se observó la superficie de la córnea utilizando una lámpara con filtros adecuados.

50 Los resultados de la prueba de Schirmer no presentaban diferencias cuantitativas en el volumen de lágrima después del tratamiento de los animales con la composición de la invención y con los demás productos ya disponibles en el mercado. Además, la evaluación del pH de la lágrima no presentó variaciones patológicas ni para el producto según la invención ni para ninguno de los demás productos a examen. Ni el examen de la córnea después del marcado con fluoresceína ni con verde de lisamina presentó alteraciones patológicas de la córnea después del tratamiento con el producto según la invención, de manera análoga a lo que se observa para las demás sustancias disponibles en el mercado. Las pruebas de cristalización en helechó produjeron imágenes de las lágrimas cristalizadas que no presentan diferencias esenciales entre los diversos tratamientos a comparación.

60 Por consiguiente, las pruebas de la Fase 1 demostraron la ausencia de interacciones negativas entre la composición propuesta y el estado fisiológico de la conjuntiva-córnea, de la misma manera que otras formulaciones de lágrima artificial ya en el mercado.

Fase 2

65 En esta fase experimental se evaluaron diferentes modelos de animal posibles, y se montó un modelo de ojo seco en la rata albina, lo que implica la utilización de tres ciclos de 2,5 h compuestos de la forma siguiente:

T0 (0 min): inyección intraperitoneal de 4 mg/kg de atropina y aplicación tópica de atropina al 1%.

T1 (40 min): anestesia con cloralium al 8,5% hidratado y exposición a un caudal continuo y constante de aire seco durante 1 h.

T2 (100 min): fin de la circulación de aire.

T3 (130 min): atropina tópica al 1%.

T4 (150 min): final del ciclo.

Los animales tratados con lágrimas a estudio recibieron una administración tópica de la formulación después de 30 min. desde T0 y a T2.

La evaluación de la prueba de Schirmer muestra hiperlagrimeo al final de los tres ciclos como respuesta de tipo inflamatorio-exudativo principalmente. Incluso si es imposible detectar diferencias significativas de la alta variabilidad encontrada entre los animales, una tendencia reducida debida a la composición (PST + AH) según la invención y a la PST al 0,5% es evidente. Esto último apunta a una mejor protección de las estimulaciones potentes. La evaluación del pH de la lágrima no presentó cambios patológicos después de tres ciclos para cualquiera de los grupos experimentales.

En relación con la prueba de cristalización en helechito, incluso si es posible detectar diferencias significativas a causa de la alta variabilidad encontrada entre los animales, es evidente una tendencia reducida debida a la composición (PST+AH) según la invención y a la PST al 5%. Esto último apunta a una mejor protección de las estimulaciones potentes. La evaluación del pH de la lágrima no presentaba cambios patológicos después de tres ciclos para ninguno de los grupos experimentales.

En cuanto a la prueba del helechito, aunque no se detectaron diferencias significativas entre los grupos a prueba, es posible confirmar la presencia de propiedades protectoras en algunos productos, incluyendo la composición de la invención, en comparación con el grupo de referencia.

El resultado de la **prueba en la córnea** con fluoresceína y verde de lisamina, evaluada en porcentaje de la superficie corneal afectada por la lesión ulcerosa o necrótica, presentaba una protección similar en las diversas formulaciones del daño producido por la ejecución de los tres ciclos descritos anteriormente.

En conclusión, las pruebas publicadas anteriormente han puesto de manifiesto no solamente la ausencia de interacciones negativas entre la composición según la invención y el estado fisiológico de la conjuntiva-córnea (Fase 1), sino también una mejor recuperación de los daños histofisiológicos después de una fuerte reducción de la lagrimeo. Dichas pruebas permiten demostrar que la combinación propuesta presenta las propiedades adecuadas para su utilización válida como lágrima artificial y en el tratamiento del síndrome del ojo seco.

Estudio clínico piloto sobre la eficacia de las mezclas de una combinación de PST al 0,2% y AH al 0,4% en el tratamiento del síndrome del ojo seco

Para evaluar la eficacia de una combinación de PST y AH en el tratamiento del síndrome del ojo seco se llevó a cabo una prueba clínica preliminar en veintidós (21) pacientes de ambos sexos (42 ojos). Los criterios de inclusión en el experimento fueron la ausencia de infecciones oculares, la ausencia de cualquier patología ocular diferente del ojo seco (con la excepción de las alteraciones de la refracción) y la ausencia de utilización de lentes de contacto.

La prueba consistía en un estudio abierto al azar controlado en tres grupos paralelos, con evaluación a ciegas, sin etapa de lavado, en el que los productos administrados como lágrima artificial fueron los siguientes:

- Grupo de estudio: Mezcla de proporciones iguales en peso de solución oftálmica de PST (PST al 0,2%) y solución oftálmica de AH (0,4% de AH), referida a continuación como "**PST+AH**";
- 1^{er} grupo de referencia: Solución oftálmica de PST al 0,2% (PST, Farmigea), denominada a continuación "**PST**";
- 2^o grupo de referencia: Solución oftálmica de AH al 0,4% (Dropstar, Farmigea), denominada a continuación "**AH**".

En el momento de la distribución al azar, el oculista instruyó a los pacientes para suministrar la auto-instilación, dos gotas dos veces al día directamente en el saco de la conjuntiva, de cada uno de los tres productos anteriores en comparación.

Como **punto final primario** de la prueba se determinó la variación de la puntuación del número de microvellosidades de la conjuntiva en el comienzo y final del tratamiento. Como **puntos finales secundarios**, se determinaron la variación de

la puntuación de la sintomatología subjetiva, de la sintomatología objetiva, del modelo citológico de conjuntiva (raspado) de la puntuación del compuesto (como se define a continuación) y de la tolerancia y seguridad del producto.

5 Las evaluaciones de la sintomatología subjetiva, de la sintomatología objetiva, de la tolerancia y seguridad se realizaron en abierto, mientras que la evaluación de la citología de la conjuntiva y de las microvellosidades se realizaron a ciegas, por un observador que ignoraba el tratamiento asociado a cada paciente.

La duración total del tratamiento fue de 60 días (\pm 8 días) para los tres grupos de pacientes.

10 Evaluaciones

15 Evaluación de microvellosidades – Los efectos del tratamiento sobre las microvellosidades se evaluaron con el microscopio electrónico de barrido (SEM). Para cada ojo examinado se identificaron los puntos de referencia utilizando la cuadrícula vascular, con objeto de operar las privaciones iniciales y finales en la misma área. Se tomó una muestra de epitelio, por separado en cada ojo, de la conjuntiva bulbar temporal superior utilizando la técnica de "citología de impresión".

20 La privación se realizó desde un mínimo de 48 horas hasta un máximo de 7 días después del examen oftalmoscópico. En la misma sesión cuando se tomó la muestra para el estudio de las microvellosidades, unos pocos minutos antes, se realizó un raspado de la conjuntiva para la evaluación citológica.

Se trataron las muestras a continuación y se fijaron para un examen al SEM y se midieron utilizando una escala de 4 puntos (del 1 al 4).

25 Sintomatología subjetiva – Éste fue el primero de los parámetros evaluados durante cada visita (básica o final), cuando se invitó al paciente a clasificar el grado subjetivo de molestia sufrido durante la última semana durante los siguientes síntomas oculares: prurito, sensación de ardor, irritación, lagrimeo. Basándose en la información directa suministrada por el paciente, el médico del experimento convirtió la intensidad total de la molestia ocular en una escala analógica de 4 puntos (del 1 al 4), en la que el grado 1 representaba la ausencia de síntomas, el grado 2 una sintomatología ligera, el grado 3 una sintomatología moderada y el grado 4 representaba la sintomatología más grave.

35 Sintomatología objetiva – Se determinó la tolerancia epitelial y la posible extensión de las lesiones queratoconjuntivas tras la evaluación subjetiva. El oculista la evaluó, después de la determinación de la sintomatología subjetiva, con una lámpara de hendidura y fluoresceína y la midió con una escala analógica de 4 puntos (del 1 al 4) basándose en los criterios siguientes: grado 1, ausencia de tolerancia epitelial o limitada a solamente un cuadrante; grado 2, tolerancia epitelial limitada a dos cuadrantes; grado 3, tolerancia epitelial que afecta claramente dos cuadrantes con señales adicionales de tolerancia en los demás cuadrantes; grado 4, la tolerancia epitelial se extiende a toda la superficie ocular.

40 Citología de la conjuntiva – El componente celular inflamatorio se quitó de la conjuntiva raspando y sin anestesia, se fijó con solución de May-Grunwald (eosinato azul de metileno) encontrado en el mercado.

El raspado se realizó en 2º y 7º días después del examen oftalmológico, durante la misma sesión cuando se programó la toma de la muestra del estudio de las microvellosidades.

45 La extensión se coloreó en el laboratorio y se observó al microscopio óptico. La evaluación se realizó a ciegas basándose en la escala de 4 puntos: 1 = solamente células epiteliales y linfocitos (+); 2 = linfocitos (+), neutrófilos (+); 3 = linfocitos (++) , neutrófilos (++) , 4 = linfocitos (++) , neutrófilos (++) y/o eosinófilos (+).

50 Puntuación del compuesto – Representa la suma de las 4 parámetros descritos anteriormente y se evaluó como un índice sustituto de una eficacia global.

Seguridad y tolerancia – Se determinaron la seguridad y la tolerancia de los productos objeto del estudio con preguntas directas del médico al paciente.

55 Efectos sobre las microvellosidades

60 Como se ha constatado, los efectos del tratamiento en las microvellosidades fotografiadas con microscopio de barrido se determinaron evaluando en una escala de 4 puntos. Antes de la distribución aleatoria, los tres grupos eran completamente homogéneos, el grupo "PST" que tiene una puntuación media de 3,0, y los grupos "PST+AH" y "AH", que tiene una puntuación media de 3,3. Además la dispersión de los datos parecía moderada, siendo el coeficiente de variación de 26% frente a 22% frente a 22%, para PST, PST+AH y AH, respectivamente.

TABLA 1

Comparación de microvellosidades antes y después en valores medios

	PST		PST+AH		AH	
	Inicial	Día 60	Inicial	Día 60	Inicial	Día 60
N	14	14	14	14	14	14
Min.	2	1	2	1	2	2
Máx.	4	4	4	3	4	4
Promedio	3,0	2,7	3,3	1,4	3,3	3,0
Desv. Est.	0,8	0,9	0,7	0,6	0,7	0,8
Coef. Var.	0,26	0,34	0,22	0,45	0,22	0,26
p (Wilcoxon)	0,602		< 0,0001		0,219	

5

10

Tal como se ilustra en la Tabla 1 y en los histogramas de las Figuras 1 y 2, después de 60 días de tratamiento en el grupo PST, se observó una ligera mejora del número de microvellosidades de la conjuntiva (- 0,3 puntos), igual a - 9,5% con respecto del valor inicial (NS en la prueba de Wilcoxon). Asimismo en el comportamiento en el grupo tratado con AH en el que, después de 60 días, se observó una mejora media de 0,3 puntos, igual a - 8,7% con respecto al valor inicial (NS en la prueba de Wilcoxon).

15

En el grupo tratado con PST+AH se observó, en su lugar, una mejora media superior a más de 5 veces, con una puntuación que se movió hacia la normalidad de 1,9 puntos, igual a una mejora en porcentaje de 56,5% con respecto al valor inicial ($p < 0,0001$ en la prueba de Wilcoxon).

20

Como se muestra en la Tabla 2 siguiente, contrariamente a lo que ocurrió para los ojos tratados con PST solamente o con AH solamente, los 14 ojos tratados con PST+AH, han tenido, después de 60 días una mejora de la puntuación (de 1 a 3 puntos).

TABLA 2

	PST al 0,2%		PST al 0,2% / AH al 0,4%		AH al 0,4%	
3	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
2	1	7,1%	0	0,0%	0	0,0%
1	2	14,3%	0	0,0%	1	7,1%
0	5	35,7%	0	0,0%	8	57,1%
-1	4	28,6%	6	42,9%	5	35,7%
-2	2	14,3%	4	28,6%	0	0,0%
-3	0	0,0%	4	28,6%	0	0,0%

25

Para el análisis estadístico, se aplicó la prueba de significación de Kruskal-Wallis a los valores absolutos de las diferencias entre las observaciones iniciales y finales. Aunque el número de muestras examinadas fue relativamente limitado, el análisis mostró una diferencia estadísticamente muy significativa en los grupos de tratamiento ($p < 0,0001$).

30

Las Figuras 3 y 4 adjuntas muestran, utilizando un microscopio de barrido electrónico, el desarrollo de la presencia de microvellosidades en el epitelio de la conjuntiva en una paciente de 64 años de edad tratado durante 60 días con PST+AH. La Figura 3 permite apreciar una superficie epitelial lampiña debida a la casi completa ausencia de microvellosidades; basándose en los criterios descritos anteriormente, para este marco histológico se ha asignado una puntuación de 4 (reducción máxima de la presencia de microvellosidades). En la misma paciente y en la misma zona de la conjuntiva del mismo ojo, la Figura 4 presenta una vegetación rica de microvellosidades, que permite asignar a este marco una puntuación de 1, sustancialmente típica de un estado normal.

35

Como se señala en la Tabla 2, en el grupo tratado con PST+AH, 4 ojos (28,6%), en 3 personas, presentaban una mejora de la puntuación de las microvellosidades igual a 3, mientras que el mismo número de ojos presentó una mejora en la puntuación igual a 2 puntos. Seis ojos (42,9%) presentó una mejora en la puntuación igual a solamente un punto.

40

Efectos sobre la sintomatología subjetiva

45

La intensidad de la sintomatología subjetiva se determinó con una escala analógica de 4 puntos en forma de intensidad de la molestia ocular, tal como se describió anteriormente. En el valor inicial, los tres grupos presentaron homogeneidad relativa, tanto desde el punto de vista de los valores absolutos de las puntuaciones (con un hueco medio máximo de 0,3 puntos), y como valores de dispersión medidos en forma de coeficiente de variación (33% frente a 12% frente a 29%, para PST, PST+AH y AH, respectivamente).

TABLA 3

Sintomatología subjetiva - Comparación antes y después en valores medios

	PST		PST+AH		AH	
	Inicial	Día 60	Inicial	Día 60	Inicial	Día 60
N	14	14	14	14	14	14
Min.	1	1	2	1	1	2
Máx.	4	4	3	4	4	4
Promedio	2,6	2,6	2,9	1,9	2,8	2,6
Desv. Est.	0,9	0,9	0,4	1,1	0,8	0,6
Coef. Var.	0,33	0,33	0,13	0,59	0,29	0,25
p (Wilcoxon)	1,000		0,014		0,375	

5

Después de 60 días de tratamiento, tal como se ilustra en los histogramas de las **Figuras 5 y 6**, no se observó ninguna variación de la sintomatología subjetiva en el grupo PST, con una puntuación que permaneció en el valor de 2,6, aunque en el grupo tratado con AH se observó una ligera mejora, no estadísticamente relevante, igual a - 0,2 puntos de la puntuación media (-7,7%).

10

La mejora del grupo tratado con PST + AH fue sensiblemente más evidente, y estadísticamente relevante en la prueba de Wilcoxon, que presenta una puntuación media reducida de 1,0 puntos, igual al 35,0% con respecto al valor inicial.

15

Como se muestra en la siguiente Tabla 4, solamente dos ojos de los 14 en tratamiento con PST+AH presentaron una puntuación que peor de la sintomatología subjetiva y uno continuó sin variación, mientras que para 6 y 5 ojos se registraron mejoras, de 1 y 2 puntos respectivamente.

TABLA 4

	PST al 0,2%		PST al 0,2% / AH al 0,4%		AH al 0,4%	
3	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
2	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
1	3	14,3%	2	14,3%	1	7,1%
0	8	57,1%	1	7,1%	9	64,3%
-1	3	21,4%	6	42,9%	4	28,6%
-2	0	0,0%	5	35,7%	0	0,0%
-3	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%

20

El análisis estadístico se realizó aplicando la prueba de Kruskal-Wallis a los valores absolutos de las diferencias entre las observaciones inicial y final y presentó una diferencia estadísticamente significativa entre los tres grupos ($p = 0,005$).

25

Efectos sobre la sintomatología objetiva

Se midió la sintomatología objetiva con una escala de 4 puntos evaluando el grado de afección de los sectores de la córnea y de la conjuntiva utilizando una lámpara de hendidura como se describió anteriormente. En los valores iniciales, los tres grupos presentaban un pequeño grado de falta de homogeneidad, no estadísticamente relevante, estando el grupo PST + AH en una puntuación media de 2,8, superior en 0,3 puntos a la de la puntuación del grupo PST y de 0,1 puntos de la puntuación del grupo AH. Los resultados de la dispersión de datos relativamente altos para los tres grupos, con un coeficiente de variación de 4,1% frente al 29% frente al 34%, para PST, para PST + AH y para AH, respectivamente.

30

35

TABLA 5

Sintomatología objetiva - Comparación antes y después en valores medios

	PST		PST+AH		AH	
	Inicial	Día 60	Inicial	Día 60	Inicial	Día 60
N	14	14	14	14	14	14
Min.	1	1	1	1	1	1

Máx.	4	4	4	3	4	4
Promedio	2,5	2,2	2,8	1,9	2,7	2,6
Desv. Est.	1,0	1,0	0,8	0,8	0,9	0,8
Coef. Var.	0,41	0,44	0,29	0,41	0,34	0,29
p (Wilcoxon)	0,125		0,006		0,347	

Como se muestra mejor en los histogramas de las **Figuras 7 y 8**, así como en la Tabla 5, después de 60 días de tratamiento, se observó una mejoría ligera de la sintomatología objetiva (- 0,3 puntos) igual a 11,4% con respecto al valor inicial en el grupo PST. La evolución en el grupo tratado con AH fue más pequeña, presentando este grupo, después de 60 días, una reducción de la puntuación media igual a - 0,1 puntos (- 5,3%). En ambos casos las diferencias no fueron estadísticamente relevantes para la prueba de Wilcoxon.

En el grupo tratado con PST+AH se observó, en su lugar, después de 60 días de tratamiento, la puntuación media más baja, con 1,9, aunque el punto de partida fue ligeramente superior a los valores iniciales. Esto es equivalente a una mejora de -0.9 puntos, estadísticamente relevante, lo que representaba una variación de 33,3% con respecto al valor inicial.

Como se muestra en la siguiente Tabla 6, solamente uno de los 14 ojos tratados con PST + AH presentó un empeoramiento en la puntuación de la sintomatología objetiva, uno permaneció sin variación y 12 tuvieron una mejora.

TABLA 6

	PST al 0,2%		PST al 0,2% / AH al 0,4%		AH al 0,4%	
3	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
2	0	0,0%	0	0,0%	1	7,1%
1	0	0,0%	1	7,1%	0	0,0%
0	10	71,4%	1	7,1%	9	64,3%
-1	4	28,6%	10	71,4%	4	28,6%
-2	0	0,0%	2	14,3%	0	0,0%
-3	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%

Se realizó el análisis estadístico aplicando la prueba de Kruskal-Wallis a los valores absolutos de las diferencias entre las observaciones inicial y final. En cuanto a la sintomatología objetivo es posible confirmar que las diferencias observadas en los tres grupo de pacientes son estadísticamente relevantes ($p = 0,02$).

Efectos sobre la citología

Se evaluó la presencia de células inflamatorias con una escala de 4 puntos, según la descrita anteriormente. En los valores iniciales, antes de la distribución aleatoria, los tres grupos eran muy heterogéneos, incluso si no estaban en una forma estadísticamente relevante. De hecho, en el grupo AH, que era el menos grave, una puntuación media de 1,9 se determinó, en el grupo PST la puntuación era de 2,1 y en el grupo PST + AH, el más grave, se detectó la puntuación media de 2,7, con un hueco entre los extremos de 0,9. Además la dispersión de los datos parecía sensible con un coeficiente de variación de 44% frente al 37% frente al 55%, para PST, PST+AH y AH, respectivamente.

TABLA 7

Citología - Comparación antes y después en valores medios

	PST		PST+AH		AH	
	Inicial	Día 60	Inicial	Día 60	Inicial	Día 60
N	14	14	14	14	14	14
Min.	1	1	1	1	1	1
Máx.	4	3	4	3	4	3
Promedio	2,1	2,3	2,7	1,9	1,9	2,0
Desv. Est.	0,9	0,9	1,0	0,8	1,0	0,6
Coef. Var.	0,44	0,40	0,37	0,43	0,55	0,28
p (Wilcoxon)	0,688		0,094		1,000	

La Tabla 7 y las **Figuras 9 y 10** adjuntas demuestran que, después de 60 días de tratamiento tanto en el grupo PST como en el grupo AH, se observó un ligero empeoramiento del perfil citológico. Por el contrario, en el grupo tratado con PST + AH se observó una fuerte mejora en el perfil citológico, incluso si no estadísticamente relevante, con un paso de la puntuación media de 2,7 hasta un valor de 1,9, con un porcentaje de mejora del 28,9% con respecto al valor inicial.

Como se muestra en la Tabla 8 siguiente, 7 ojos de los 14 tratados con PST+AH han presentado una mejora en la puntuación después de 60 días, mientras que 6 permanecieron inalterados, y uno había empeorado.

TABLA 8

	PST al 0,2%		PST al 0,2% / AH al 0,4%		AH al 0,4%	
3	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
2	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
1	4	28,6%	1	7,1%	5	35,7%
0	8	57,1%	6	42,9%	6	42,9%
-1	2	14,3%	4	28,6%	3	21,4%
-2	0	0,0%	1	7,1%	0	0,0%
-3	0	0,0%	2	14,3%	0	0,0%

Análogamente a los demás parámetros, para el análisis estadístico se aplicó la prueba de significación de Kruskal-Wallis en los valores absolutos de las diferencias entre las observaciones inicial y final. Este análisis demostró una diferencia estadísticamente relevante entre los grupos ($p = 0,031$).

Puntuación compuesta

Como se ha constatado, la puntuación compuesta representa la suma de los cuatro parámetros descritos anteriormente (microvellosidades, sintomatología subjetiva, sintomatología objetiva, citología) y es un índice sustituto de la eficacia global. Su valor máximo teórico es 16. A pesar de la fuente de posibles desbalances entre los grupos, debidos principalmente a la citología, después de la distribución aleatoria, en el valor inicial, los dos grupos eran suficientemente homogéneos, como resulta de la siguiente tabla.

TABLA 9

Citología - Comparación antes y después en valores medios

	PST		PST+AH		AH	
	Inicial	Día 60	Inicial	Día 60	Inicial	Día 60
N	14	14	14	14	14	14
Min.	6	4	8	4	5	6
Máx.	16	13	14	11	15	14
Promedio	10,2	9,8	11,6	7,1	10,6	10,1
Dev. Est.	2,8	2,8	2,0	2,3	2,7	2,2
Coef. Var.	0,27	0,29	0,17	0,32	0,26	0,21
p (Wilcoxon)	0,555		<0,0001		0,197	

Después de 60 días de tratamiento, como se muestra en las **Figuras 11 y 12**, en el grupo PST no se observaron variaciones sustanciales frente a la referencia. Se observó un comportamiento análogo en el grupo tratado con AH, en el que, después de 60 días, se produjo una mejora de 0,5 puntos, igual a -4,7% con respecto al valor inicial (NS).

La mejora observada en el grupo tratado con PST + AH, fue aproximadamente 10 veces mayor y estadísticamente muy relevante, con -4,5 puntos igual a 39,3% con respecto al valor inicial. La mejora fue muy significativa para la prueba de Wilcoxon.

Además para la puntuación del compuesto, para el análisis estadístico se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis en los valores absolutos de las diferencias entre las observaciones inicial y final, lo que resultó muy significativo ($p < 0,0001$).

Seguridad y tolerancia

5 En ningún tratamiento utilizado en el estudio piloto descrito se comunicaron problemas ligados a la tolerancia o a la seguridad local o general, a excepción de la rara retroalimentación relacionada con la visión nebulosa asociada a la instilación de productos y que normalmente duraba unos pocos minutos. Dichos efectos, conocidos también en relación con otros sustitutos de lágrima, no presentaban diferencias en los tres grupos.

Conclusiones

10 Basándose en los resultados del estudio, es posible concluir que existen suficientes pruebas clínicas, apoyadas además por las evaluaciones realizadas con microscopía electrónica de barrido, que la combinación de PST y ácido hialurónico en el mismo producto oftálmico produce un efecto sinérgico, que presenta resultados que no pueden obtenerse cuando los dos productos se administran individualmente.

15 Dichas pruebas microscópicas indican que en la base del efecto sinérgico existe una rápida mejora del estado del epitelio de la conjuntiva que, expuesta a AH y a PST en combinación, produce una regeneración de las microvellosidades. A su vez, los efectos sobre el epitelio de la conjuntiva producen una mejora de los síntomas objetivos y subjetivos que caracterizan el síndrome del ojo seco.

20 La presente invención se ha descrito con referencia específica a algunas de sus realizaciones específicas, pero debería sobreentenderse que los expertos en la materia pueden hacer modificaciones y cambios sin apartarse del alcance de la invención definido en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una preparación oftálmica para su utilización como sustituto de lágrimas que contiene, en combinación, del 0,05 al 2% en peso de polisacárido de la semilla de tamarindo y del 0,05 al 1% en peso de ácido hialurónico en solución acuosa.
2. Una preparación oftálmica según la reivindicación 1, que comprende del 0,1 al 1% en peso del polisacárido de la semilla de tamarindo y del 0,1 al 0,5% en peso de ácido hialurónico.
- 10 3. Una preparación oftálmica según las reivindicaciones 1 ó 2, en la que dicho polisacárido de la semilla de tamarindo tiene un peso molecular comprendido en el intervalo entre 450.000 Da y 750.000 Da.
4. Una preparación oftálmica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho ácido hialurónico tiene un peso molecular comprendido en el intervalo entre 600.000 Da y 1.000.000 Da.
- 15 5. Una preparación oftálmica según la reivindicación 1, que comprende en solución acuosa, 0,2% en peso de polisacárido de la semilla de tamarindo y 0,4% en peso de ácido hialurónico.
- 20 6. Una preparación oftálmica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además uno o más agentes reguladores de tonicidad.
7. Una preparación oftálmica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además uno o más ácidos o bases oftalmológicamente aceptables, como correctores de pH.
- 25 8. Una preparación oftálmica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además uno o más tampones.
9. Una preparación oftálmica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además uno o más agentes conservantes.
- 30 10. Una preparación oftálmica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además uno o más agentes quelantes
- 35 11. Utilización de una combinación de polisacárido de la semilla de tamarindo y ácido hialurónico en solución acuosa para la producción de un medicamento destinado a sustituir las lágrimas.
12. Utilización de una combinación de polisacárido de la semilla de tamarindo y ácido hialurónico en solución acuosa para la producción de un medicamento destinado al tratamiento del síndrome del ojo seco.
- 40 13. Utilización según las reivindicaciones 11 ó 12, en la que dicho producto comprende del 0,05 al 2% en peso de polisacárido de la semilla de tamarindo y del 0,05 al 1% en peso de ácido hialurónico.
- 45 14. Utilización según la reivindicación 13, en la que dicho producto comprende del 0,1 al 1% en peso de polisacárido de la semilla de tamarindo y del 0,1 al 0,5% en peso de ácido hialurónico.
15. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en la que dicho polisacárido de la semilla de tamarindo tiene un peso molecular comprendido en el intervalo entre 450.000 Da y 750.000 Da.
- 50 16. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 en la que dicho ácido hialurónico tiene un peso molecular comprendido en el intervalo entre 600.000 Da y 1.000.000 Da.

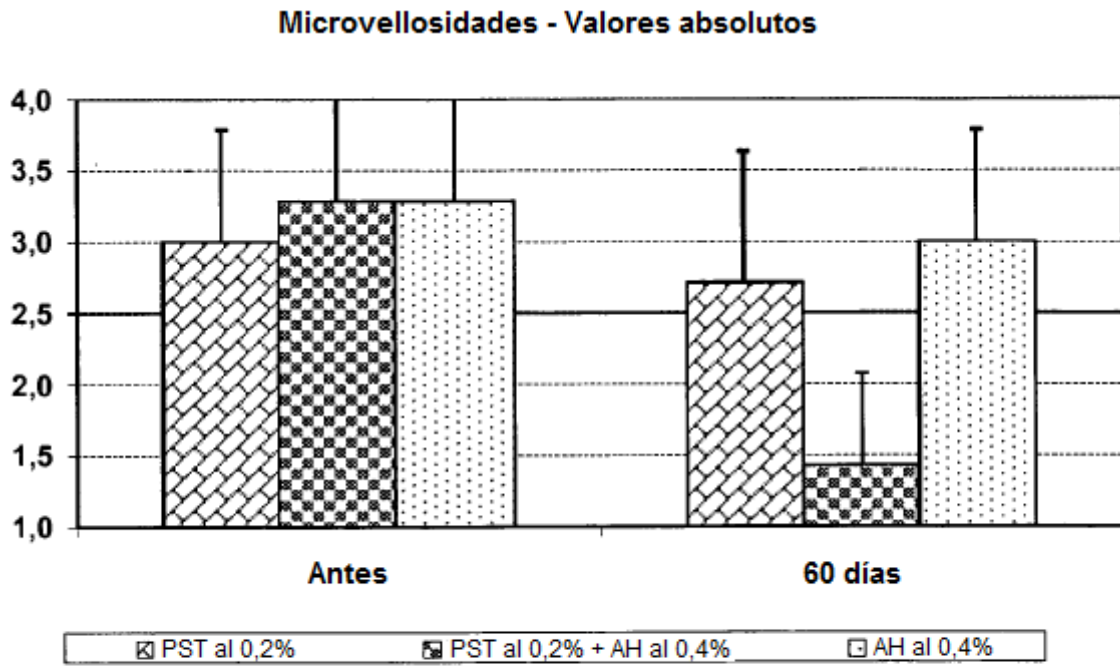


FIG. 1

Microvellosidades - Delta absoluta (inicial frente a 60)

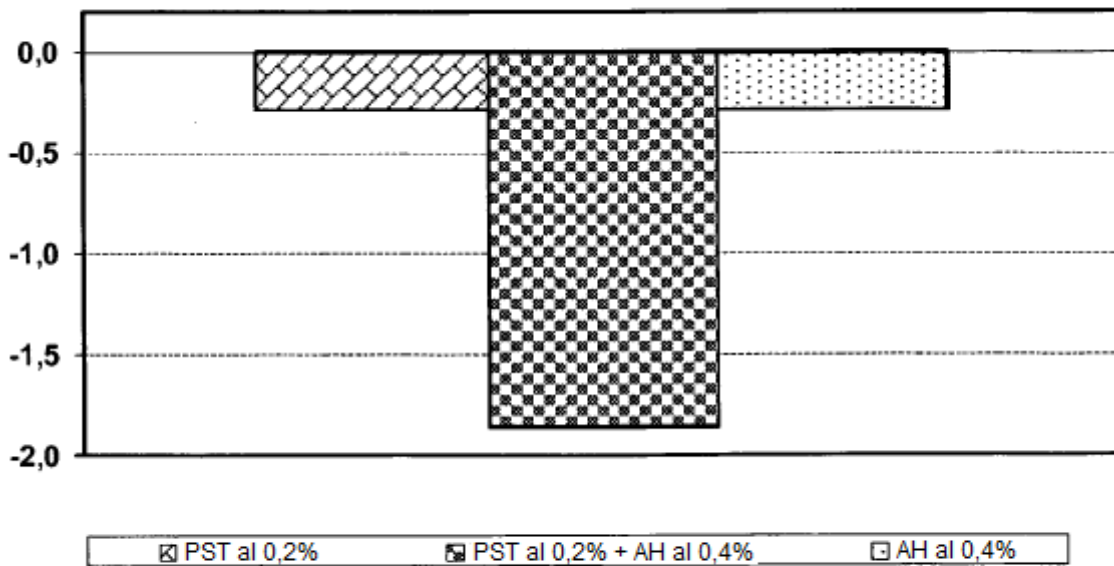


FIG. 2

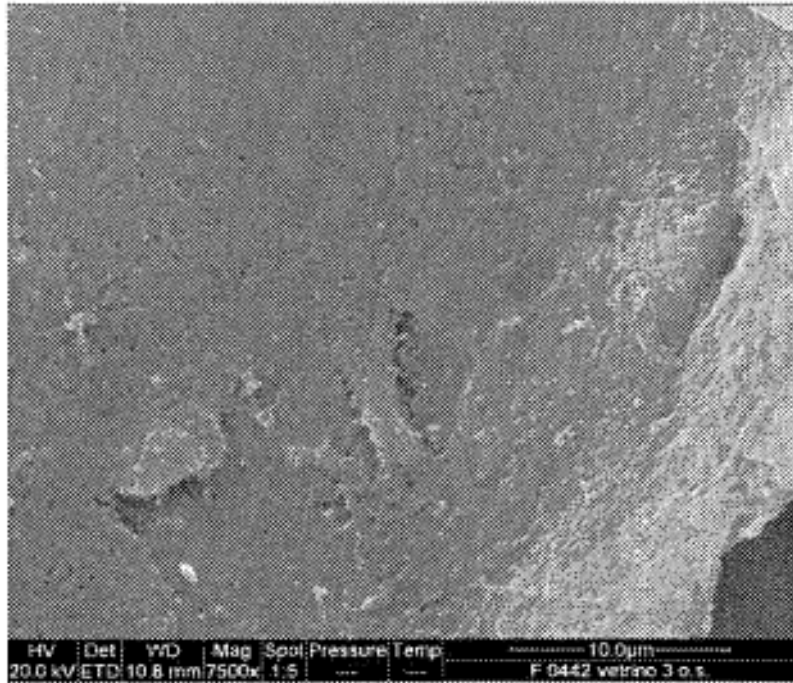


FIG. 3

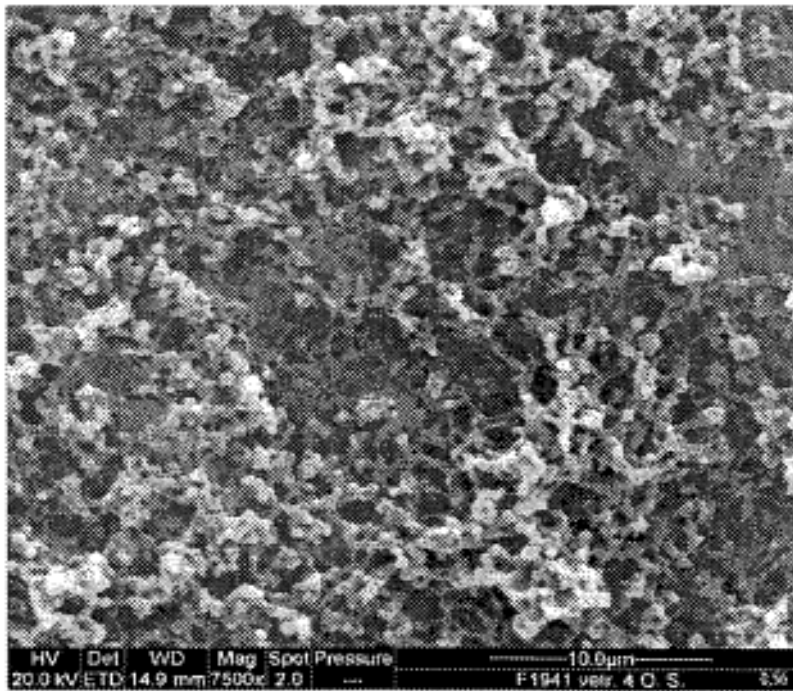


FIG. 4

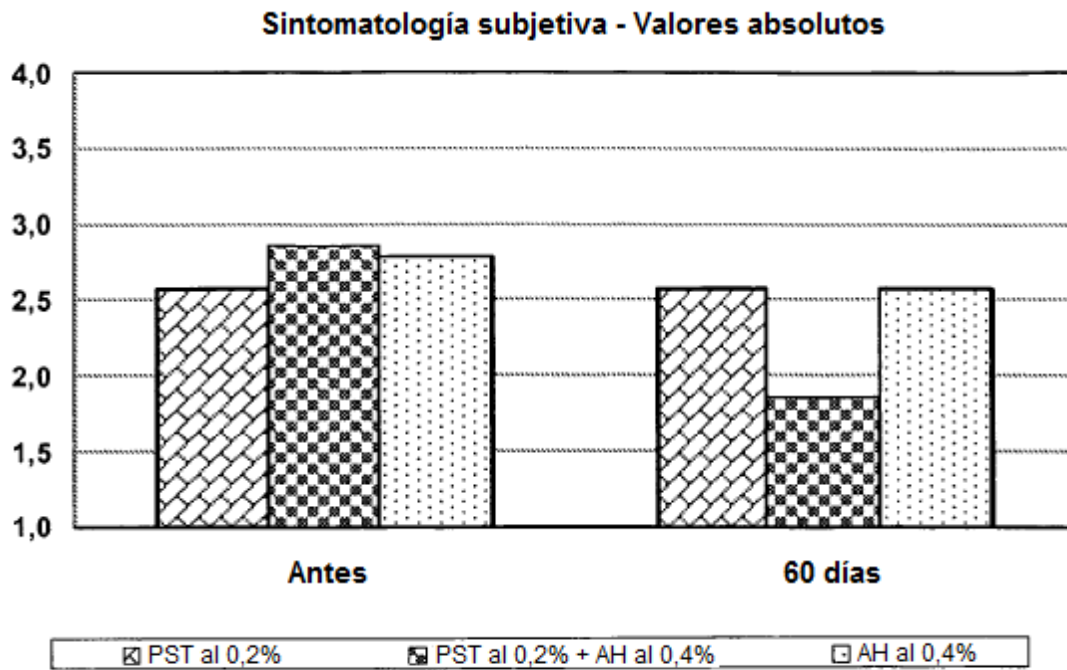


FIG. 5

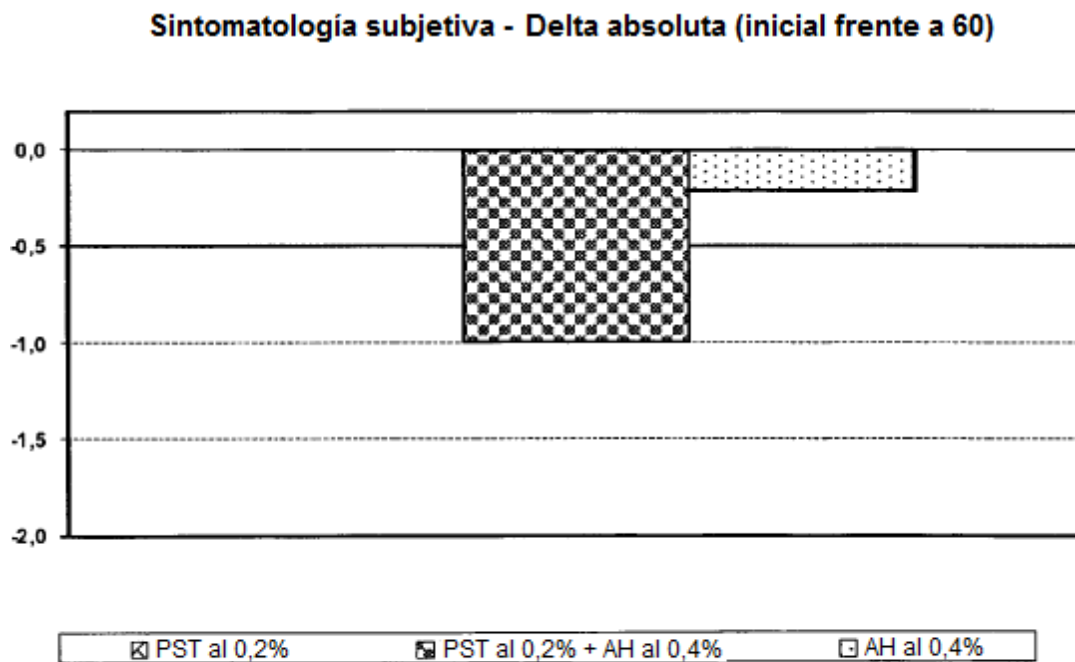


FIG. 6

Sintomatología objetiva - Valores absolutos

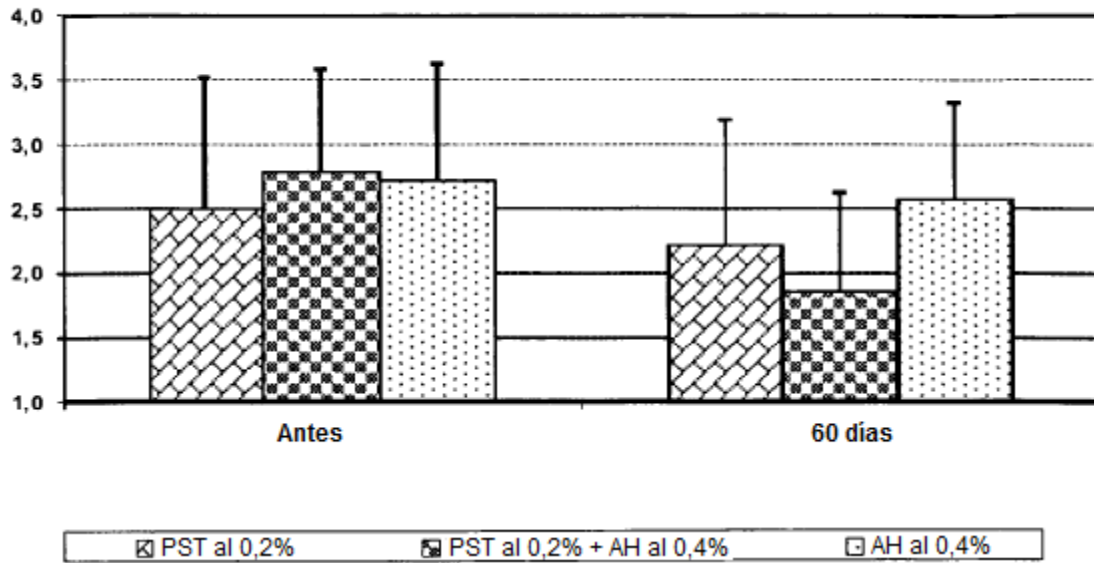


FIG. 7

Sintomatología objetiva - Delta absoluta (inicial frente a 60)

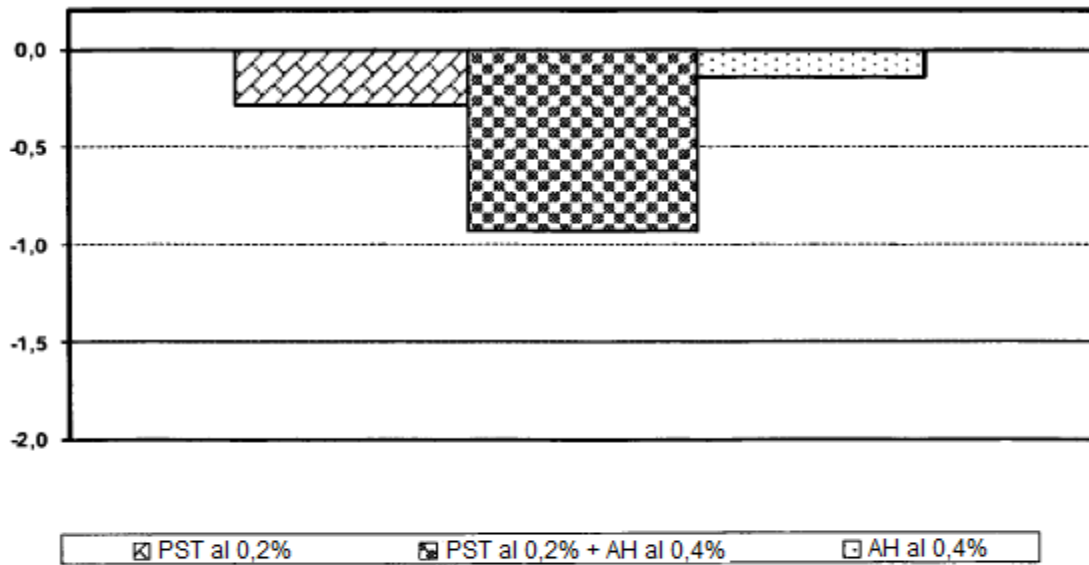


FIG. 8

Citología - Valores absolutos

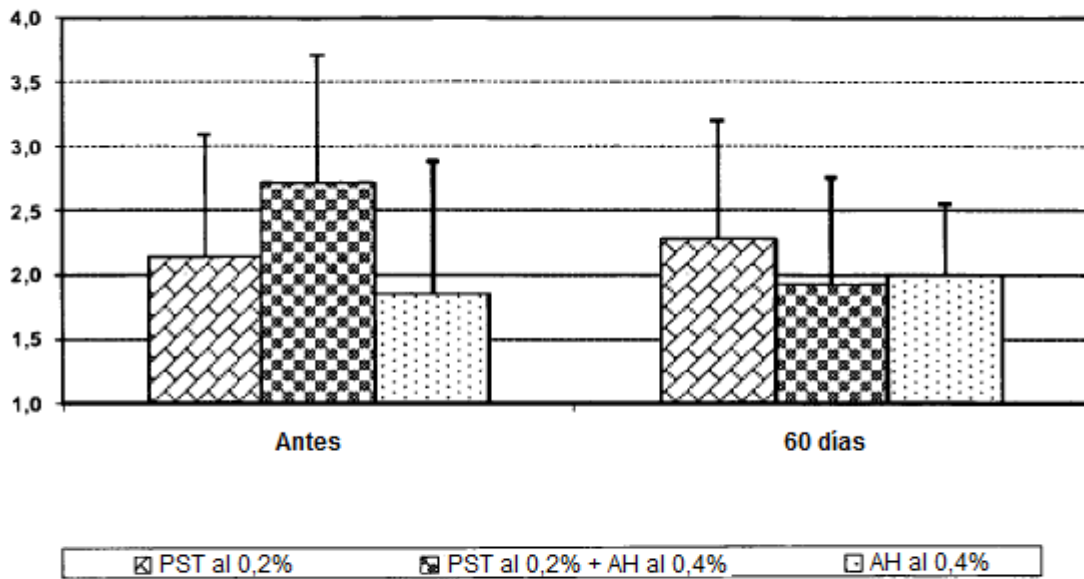


FIG. 9

Citología - Delta absoluta (inicial frente a 60)

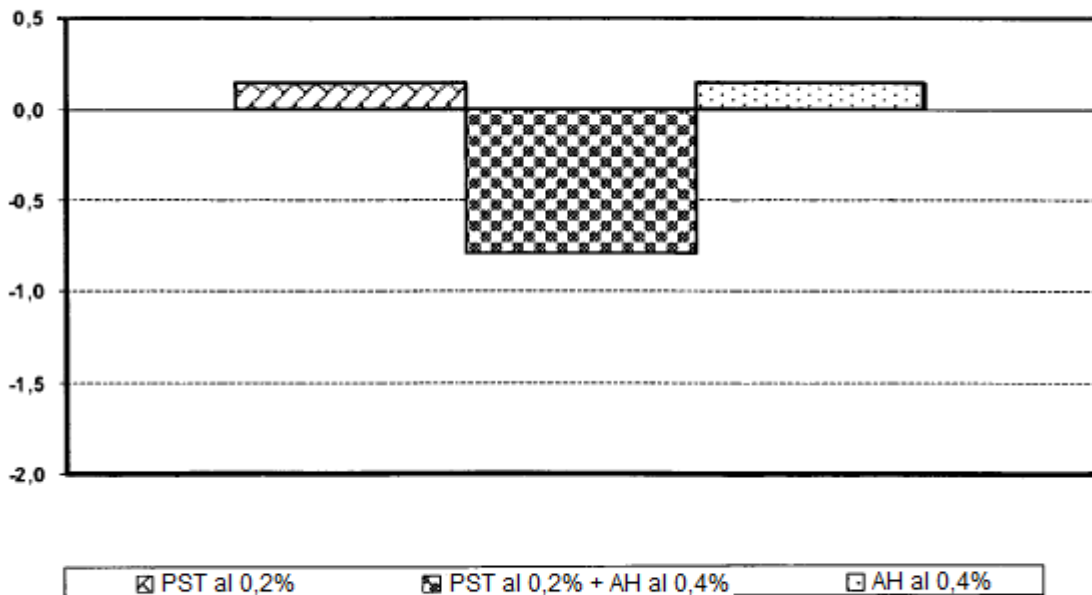


FIG. 10

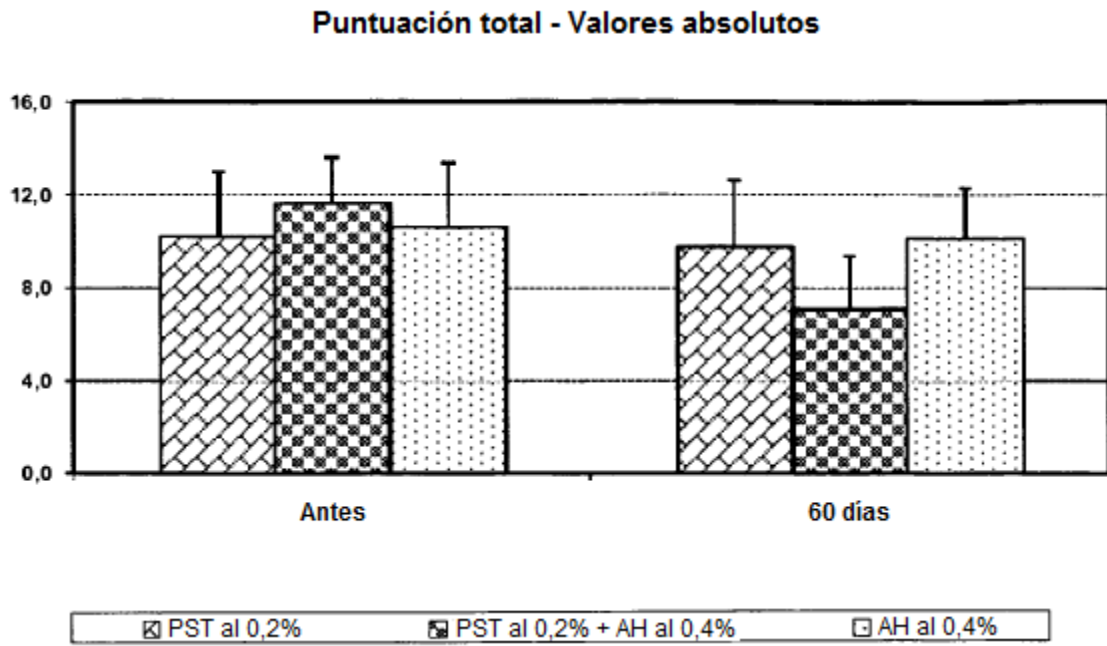


FIG. 11

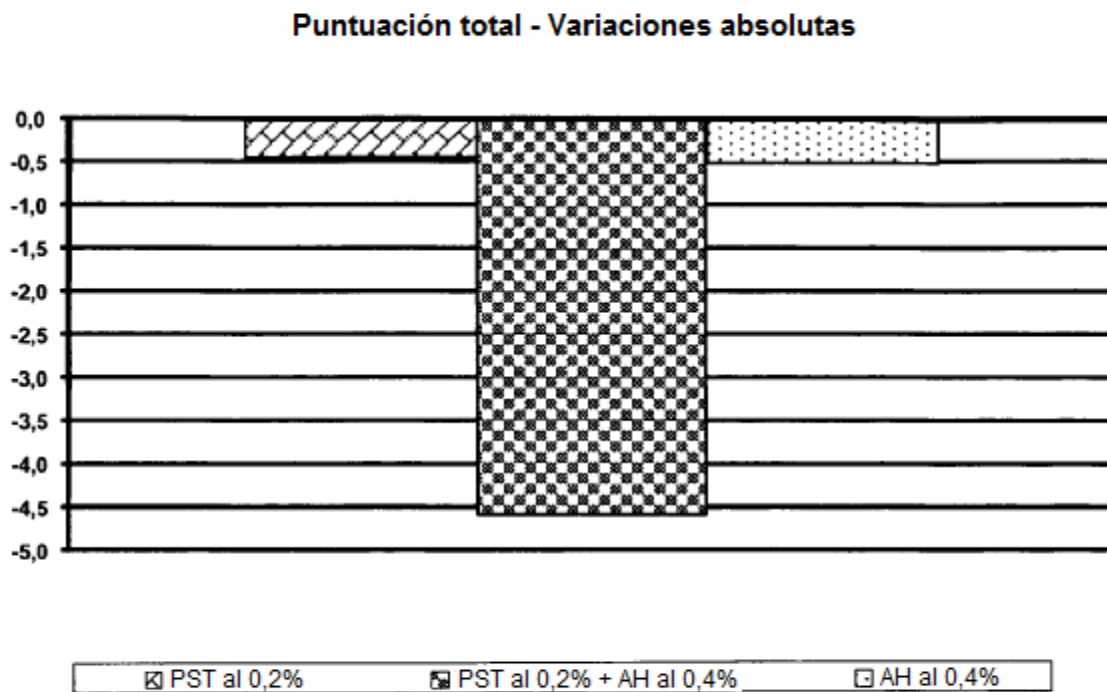


FIG. 12