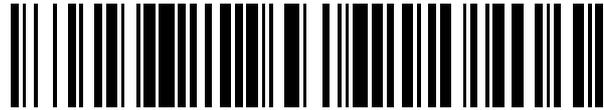


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 746**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/7028** (2006.01)

**A61P 27/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06780614 .1**

96 Fecha de presentación: **11.08.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1928474**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.06.2008**

54 Título: **Uso de hidroxiestilbenos glucosilados para la prevención y tratamiento de patologías oculares**

30 Prioridad:

**19.08.2005 IT RM20050446**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

**27.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**27.12.2012**

73 Titular/es:

**TUBILUX PHARMA S.P.A (100.0%)  
Via Costarica 20/22  
I-00040 Pomezia , IT**

72 Inventor/es:

**FALCHETTI, ROBERTO**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 393 746 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

Uso de hidroxiestilbenos glucosilados para la prevención y tratamiento de patologías oculares

5 La presente invención se refiere al uso de hidroxiestilbenos glucosilados para la prevención y el tratamiento de patologías oculares. Más específicamente, la invención se refiere al uso de compuestos de origen natural que son extraíbles de los tejidos de algunas especies de plantas (pero también son obtenibles por síntesis química), que incluyen, en particular, piceido o resveratrol-3-O-β-mono-D-glucósido, para la preparación de composiciones farmacéuticas y/o nutricionales que resultaron ser eficaces en administración oral, intravenosa, intramuscular y ocular tópica en preservar y restaurar las características estructurales y funcionales de tejidos oculares en diversas patologías oftálmicas.

15 Como se sabe, el ojo es un órgano lleno de líquido hueco dividido en dos segmentos por el cristalino. El segmento anterior está delimitado en la parte delantera por la córnea y en la trasera por el complejo iris-cuerpo ciliar-cristalino. La cavidad resultante está llena de un líquido transparente, el humor acuoso, producido por procesos ciliares. El segmento posterior, que representa cuatro quintos del volumen del globo ocular entero, está delimitado en la parte delantera por el cristalino y en la trasera por el complejo esclerótica-coroides-retina. La cavidad resultante está llena de un gel transparente, el humor vítreo.

20 La retina es el tejido nervioso responsable de convertir los estímulos de la luz en señales eléctricas. Tiene una estructura compleja constituida por fotorreceptores, células bipolares, células de soporte y células ganglionares. Los axones de las últimas células revisten la superficie interna de la retina y se reúnen juntas en una vaina, el nervio óptico, que es el responsable de transportar la señal eléctrica a las regiones visuales del cerebro (cuerpos geniculados y corteza visual). El nervio óptico, que consiste en aproximadamente un millón de axones, empieza en el globo ocular en la papila óptica.

30 Debido a su estructura, los diversos componentes anatómicos del ojo (en particular, la córnea, cristalino y retina) están continuamente expuestos a reacciones fotooxidantes producidas por la luz y así están expuestos a la acción perjudicial de los radicales libres que se generan continuamente dentro de las células. Algunos radicales libres que son más dañinos para los tejidos del cuerpo humano se derivan del oxígeno: como se sabe, el término "especies reactivas del oxígeno" (ERO) se usa para referirse conjuntamente a los radicales libres y especies químicas no radicálicas que actualmente participan en los procesos biológicos oxidativos y cuyo excedente con respecto a condiciones de equilibrio naturales se considera que es la causa de un número creciente de fenómenos degenerativos y patológicos. Más específicamente, el término ERO incluye el radical superóxido aniónico,  $O_2^-$ , el radical hidroxilo,  $OH^\cdot$ , el oxígeno único,  $^1O_2$ , peróxido de hidrógeno,  $H_2O_2$ , además de los radicales alcohol,  $RO^\cdot$ , y radicales peroxi  $ROO^\cdot$ , que se forman por moléculas orgánicas durante los procesos oxidativos.

40 Las especies reactivas del oxígeno se producen, por ejemplo, por macrófagos activados y su liberación representa un mecanismo de defensa importante por parte del organismo huésped. Sin embargo, debido a su alta reactividad, las ERO pueden tener importantes efectos tóxicos sobre otras moléculas y pueden producir disfunciones de células y algunas veces incluso muerte celular. Por tanto, su formación en tejidos puede dar lugar a diversas patologías tales como algunos tipos de neoplasia, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas. En particular, los resultados de una amplia serie de estudios indican que los radicales libres (especialmente el radical superóxido y los radicales hidroxilo) son mediadores de inflamación aguda y crónica.

45 En el cuerpo hay un conjunto de mecanismos de defensa moleculares contra radicales libres. En general, las moléculas y procesos denominados antioxidantes que, en conjunto, forman un sistema de defensa antioxidante, neutralizan directamente los radicales libres o sirven para liberar las células de ERO. Diversos agentes naturalmente presentes en tejidos de células pueden llevar a cabo la actividad anteriormente dicha, actuando en la práctica de secuestrantes. Entre estos, los más conocidos son las vitaminas E ( $\alpha$ -tocoferol) y C (ácido ascórbico), las enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), catalasa, peroxidasa y glutatión reductasa, y diversas sustancias de bajo peso molecular, que incluyen glutatión (GSH) y tirosina. En condiciones fisiológicas hay un equilibrio entre los niveles de ERO producidos durante el metabolismo de las células normales y los niveles de antioxidante endógeno, que protege a los tejidos de la lesión oxidativa. La rotura de este equilibrio, tanto debido a un aumento en la producción de ERO como debido a una disminución en los niveles de antioxidante, produce una condición globalmente conocida como estrés oxidativo, que puede conducir a la aparición de diferentes afecciones patológicas, que también afecta los tejidos del aparato visual.

60 La córnea, que es un tejido avascular transparente que permite el paso de la luz incidente a las partes posteriores del ojo, absorbe aproximadamente el 80% de los rayos de luz ultravioleta B (UV-B) y así está continuamente expuesta a estrés oxidativo. Una córnea sana posee normalmente diversos mecanismos de defensa que pueden reducir el riesgo de lesión por estrés oxidativo, tales como la presencia de una isoenzima de aldehído deshidrogenasa (ALDH3) que puede absorber rayos UV y eliminar los aldehídos producidos por la peroxidación de lípidos producida por los rayos UV, o la presencia de las enzimas antioxidantes anteriormente dichas, que pueden eliminar los radicales libres generados tras una absorción continua de luz UV. Sin embargo, en el caso de algunas patologías de la córnea, estas defensas se debilitan y así el estrés oxidativo puede dar lugar a procesos

inflamatorios y conducir a muerte celular, mediante mecanismos necróticos y apoptóticos.

Esquemáticamente, los efectos perjudiciales del estrés oxidativo pueden ocurrir tanto por la hiperoxidación de lípidos (lipoperoxidación) producida por un aumento en ERO, con la resultante liberación de sustancias tóxicas, como por la estimulación de la liberación de óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) por parte de las células de la córnea, con la posterior síntesis de NO. El monóxido de nitrógeno es una molécula extremadamente reactiva que, en condiciones de producción en exceso, contribuye a dañar los tejidos. También tiene la capacidad de regular la expresión de proteínas inflamatorias, en particular aumentar la expresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2), una enzima que regula la producción de prostaglandina pro-inflamatoria, y de TNF- $\alpha$ , una citocina que también es pro-inflamatoria.

Otro efecto del estrés oxidativo en la córnea, además de en otras estructuras oculares, es la inducción de apoptosis (es decir, el proceso de muerte celular programada caracterizado por la condensación de cromatina celular, contracción celular, formación de cuerpos apoptóticos y rotura del ADN celular en numerosos fragmentos), alterando la actividad de la caspasa mitocondrial y de Bcl<sub>2</sub>, una proteína antiapoptótica situada en las mitocondrias.

El estrés oxidativo puede conducir a patologías agudas de la córnea tales como fotoqueratitis y patologías de exposición crónica tales como pingüéculas y pterigión. Además, contribuye al desarrollo y/o agravamiento de patologías de alta incidencia en la población normal tal como el síndrome del ojo seco.

El ojo seco (también conocido como queratoconjuntivitis seca, de una de sus manifestaciones más comunes) es un término que incluye diversas patologías oculares muy comunes que afectan a millones de personas en todo el mundo, particularmente del sexo femenino. Hay muchas causas del ojo seco que incluyen, por ejemplo, ciertos trastornos sistémicos (tales como artritis reumatoide y lupus eritematoso), condiciones fisiológicas particulares (tales como menopausia), enfermedades oculares (tales como blefaritis, patologías de las glándulas meibomianas), condiciones medioambientales (tales como estrés oxidativo por UV-B) o incluso el uso de lentes y el amplio uso de pantallas de ordenadores.

Las diversas manifestaciones patológicas del síndrome del ojo seco tienen algunos denominadores comunes, tales como epiteliopatía de la superficie ocular, la hiperosmolaridad del líquido lagrimal, la inestabilidad de la película lagrimal, síntomas como sensaciones de escozor, enrojecimiento, sensaciones de cuerpos extraños y sequedad del ojo. Estos son principalmente debidos a inflamación crónica que afecta a diferentes estructuras de la superficie del ojo, tales como la córnea, conjuntiva, las glándulas lagrimales accesorias y las glándulas meibomianas. Se ha encontrado que los sujetos que padecen queratoconjuntivitis seca tienen la expresión de marcadores de inflamación específicos y de apoptosis en las células epiteliales de la superficie ocular, indicando así una fuerte correlación entre la aparición de procesos inflamatorios y apoptóticos y el desarrollo de la patología. Algunos investigadores también plantean la hipótesis de que la apoptosis de las células de la córnea puede producirse por señales pro-apoptóticas inducidas por el secado de la superficie del ojo, una característica siempre ligada al ojo seco.

Las terapias más comunes para pacientes con ojo seco prevén principalmente usar lágrimas artificiales con el fin de restaurar la cantidad y calidad correcta de líquido lagrimal, pero estos tratamientos no actúan sobre el proceso patológico que subyace al trastorno.

Considerando la importancia determinada por ahora de la inflamación en la aparición y protracción del ojo seco, se estima que los resultados más esperanzadores y duraderos pueden obtenerse usando tratamientos antiinflamatorios. Ligados a estos, debe darse importancia considerable a terapias que pueden inhibir los procesos apoptóticos que afectan las células de la córnea.

Volviendo de nuevo a considerar otros aspectos ligados a las patologías oculares, la preservación de la transparencia de la córnea es un requisito esencial de los procesos fisiológicos reparadores, tanto con respecto al epitelio como al estroma de la córnea. Esta necesidad también es importante en operaciones de remodelado de la córnea para fines de refracción, en particular usando técnicas de láser excimérico conocidas como queratectomía fotorrefractiva, o PRK, y LASIK (queratomileusis intraestromal láser), para corregir diversas formas de ametropía que incluyen, antes que nada, miopía. Aunque estos tratamientos son una alternativa menos traumática a la cirugía oftálmica convencional, el proceso reparador después de la fotoablación no carece de inconvenientes más o menos molestos o debilitantes transitorios para el paciente, tales como problemas de cicatrización de la córnea, opacidad subepitelial conocida como "neblina", que reduce la eficiencia visual como resultado del fenómeno de "dispersión de la luz" y, en algunos casos, puede conducir a la regresión de los valores de refracción obtenidos con la operación. La bibliografía del campo aparece unánime en atribuir, al menos en parte, la aparición de estos efectos a la formación de radicales libres y, en general, a ERO, que se ha encontrado que es un efecto secundario de la radiación UV y del aumento de temperatura creado en los tejidos en cuestión. También se considera que estos efectos pueden ser incluso debidos en parte a procesos inflamatorios tras el tratamiento y cirugía con láser.

Un mecanismo que guarda relación con los procesos de reparación es, en una etapa temprana del proceso, la estimulación de algunos fibroblastos de la córnea para convertirlos en miofibroblastos (Jester V.J. y col., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2003, **44**, 1850-1858). Lo último expresa  $\alpha$ -actina del tipo músculo liso ( $\alpha$ -SMA) y forma una malla de células que puede ejercer una fuerza mecánica por un mecanismo contráctil de tipo músculo liso que actúa

dando lugar a la contracción de la lesión y a la organización de la matriz.

En algunos casos, los miofibroblastos pueden reproducirse en cantidades mayores que aquellas fisiológicamente necesarias, o pueden permanecer más tiempo del necesario en la región que va a repararse. Cuando esto ocurre, hay una reparación incorrecta de la lesión, con la presencia sobre la córnea de lesión fibrótica y áreas de transparencia reducida. Incluso este fenómeno ha guardado relación con condiciones de estrés oxidativo.

Estudios recientes indican que la apoptosis también desempeña una función homeostática importante en los mecanismos de reparación del epitelio de la córnea lesionado por procesos de erosión o por radiación UV, ya que contribuye a regular las diversas poblaciones de células. En este caso también, una alteración del proceso apoptótico puede producir un patrón de regeneración incorrecto y así conducir a una reparación incorrecta de la córnea.

El cristalino consiste en una única capa de células epiteliales que incorpora capas concéntricas de células fibrosas alargadas que constituyen la capa cortical y el núcleo del cristalino. Estas células no son renovadas y así en los casos en los que los sistemas de defensa antioxidantes fisiológicos presentes no sean completamente eficientes, la lesión oxidativa se forma con los años, conduciendo a cambios irreversibles en las propiedades ópticas del cristalino. La formación de esta lesión puede conducir a cataratas, una patología relacionada con la edad, que consiste en un nublamiento del cristalino, y es la causa más frecuente de ceguera en el mundo. Entre los diversos factores que participan en la etiología de las cataratas, el que desempeña la función más importante es el estrés oxidativo, ya que produce la oxidación y formación de proteínas en el cristalino, en particular de metionina, que es oxidada a sulfóxido de metionina. En las cataratas, aproximadamente el 60% de la metionina ligada a la membrana resultó estar oxidada.

Volviendo de nuevo a la córnea, la facoemulsificación que se lleva a cabo durante las operaciones de cataratas, usando ultrasonidos de alta energía, produce radicales libres, que pueden producir lesión a las células endoteliales de la córnea. Este mecanismo, junto con otros (tal como la liberación de sustancias pro-inflamatorias), puede considerarse que es una causa importante de pérdida de células endoteliales no renovables durante una operación de cataratas.

El estrés oxidativo también se considera que es una de las causas más importantes de aparición de degeneración macular senil (DMS), una patología que puede conducir a alteraciones graves de la vista. Ocurre como una lesión a los fotorreceptores de la mácula, acompañada por alteraciones anatómicas y funcionales que afectan el epitelio pigmentario retiniano (EPR) y la membrana de Bruch.

Las células de la retina externa, y particularmente el segmento externo de fotorreceptores, contienen, en su membrana, altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), que son extremadamente susceptibles a la oxidación en presencia de oxígeno o ERO. Los primeros signos de senescencia de la capa retiniana externa es la presencia, en el EPR, de lipofuscina, un nombre genérico que indica un grupo heterogéneo de lípidos/proteínas agregadas que se acumulan en diversos tipos de células y tejidos. En el ojo, el sustrato más abundante para la formación de lipofuscina que se acumula en el EPR está representado por un producto no que se deriva de fagocitosis de los fotorreceptores del segmento externo. Este producto se considera que es el resultado de la peroxidación de lípidos que tiene lugar debido a la auto-oxidación o exposición a ERO debido a la exposición continua a luz visible (400-700 nm) y a alta presión de oxígeno (70 mm de Hg).

Un segundo sitio en la retina en el que los radicales libres pueden dar lugar a fotosensibilización que guarda relación con DMS es la coriocapilaridad, según un mecanismo que prevé la fotoactivación de precursores de la hemoglobina presente en la sangre de capilares, con la posterior generación de ERO que a su vez puede lesionar el EPR y la membrana de Bruch.

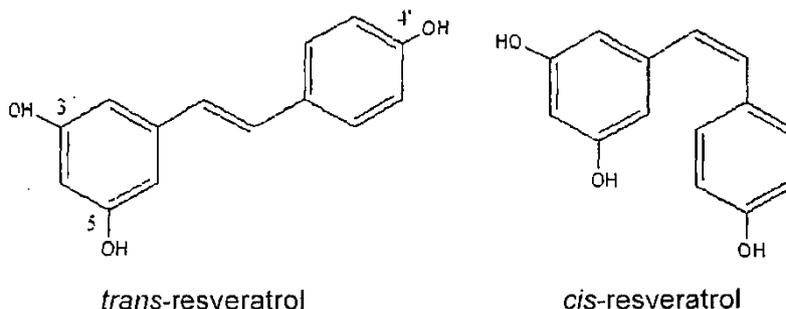
Una de las complicaciones más importantes de la DMS es la neovascularización de la retina, producida por las células de la retina que liberan el factor de crecimiento vascular llamado "factor de crecimiento endotelial vascular", VEGF. Este hecho también es importante en la etiología de otra patología: neovascularización coroidea (NVC).

Otras patologías retinianas que se han asociado, al menos en parte, al estrés oxidativo son retinopatía diabética y vitreoretinopatía proliferativa (VRP), que es una variedad proliferativa de la primera, caracterizada por la neovascularización de la retina y del disco óptico, que puede diseminarse al humor vítreo, la proliferación de tejido fibroso y hemorragias puntiformes retinianas.

Pasando, finalmente, a una patología oftálmica degenerativa que sólo es responsable de al menos el 15% de los casos de ceguera en las personas ancianas, concretamente el glaucoma, esta patología se considera que es producida por un aumento en la presión intraocular en el 90-95% de los casos. En el 5-10% restante de los casos se cree que la etiología de la patología implica factores neurotóxicos que incluyen formación de especies reactivas de nitrógeno, particularmente NO. Algunos investigadores sugieren que la presencia de este hecho también tiene cierta importancia cuando el glaucoma es producido por un aumento en la presión intraocular.

Hay muchísimas moléculas con actividad antioxidante presentes en la naturaleza que pertenecen a diferentes clases químicas. Entre las moléculas más pequeñas con actividad antioxidante encontradas en la naturaleza, algunas, tales como  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico, carotenoides, coenzima Q, vitamina A, ciertos flavonoides y polifenoles, han sido ampliamente experimentadas para su actividad farmacológica y terapéutica.

Los resultados de muchos estudios han destacado que los polifenoles poseen una serie de propiedades fisiofarmacológicas mediante las cuales pueden tener muchos efectos terapéuticos en el hombre. Por ejemplo, se ha encontrado que el resveratrol, un polifenol de origen natural que pertenece a la familia del estilbeno ( $\alpha,\beta$ -difeniletileno o dibencilideno, en la forma *cis* o *trans* con respecto al doble enlace), y que es más precisamente un hidroxiestilbeno (3,4,5'-trihidroxiestilbeno, cuyas formas *cis* y *trans* se muestran a continuación), tiene propiedades antiinflamatorias, cardioprotectoras y quimioprotectoras.



Como se sabe, el resveratrol y otros compuestos del estilbeno naturales relacionados se han incluido en las fitoalexinas, una clase heterogénea de antibióticos de origen vegetal, debido a que parece que su función en la fisiología vegetal es principalmente inhibir la propagación de infecciones fúngicas. Estos compuestos están presentes en un pequeño grupo de especies de plantas, entre ellas, en particular, *polygonaceae* y *vitaceae*. De la primera, y particularmente de las raíces secadas de *Polygonum cuspidatum*, se obtiene un producto usado en la medicina china tradicional cuya actividad se atribuye en realidad a la presencia de resveratrol y sus compuestos relacionados. De *vitaceae* se obtienen uvas y vino que, gracias a la presencia de resveratrol, actualmente se consideran responsables de efectos beneficiosos sobre enfermedades cardiovasculares y arteriosclerosis cuando se incluyen en la dieta en las cantidades apropiadas.

La actividad antiinflamatoria del resveratrol es principalmente debida a la capacidad de esta molécula para interaccionar con las prostaglandinas  $H_2$ -sintetas (llamadas COX-1 y COX-2) que participan en la síntesis de prostaglandina. Esta actividad también guarda relación con actividad cardioprotectora y, en parte, con actividad quimioprotectora. Los resultados de muchos estudios atribuyen estas propiedades biológicas a la poderosa actividad antioxidante del resveratrol, y esta actividad también se atribuye a su capacidad para modular el metabolismo de los lípidos protegiendo las lipoproteínas de baja densidad (LDL), y particularmente los AGPI, de la oxidación. Además, protegiendo los lípidos de la membrana celular, el resveratrol reduce los efectos perjudiciales del estrés oxidativo sobre las células y tejidos.

La familia de compuestos de origen natural que tiene resveratrol como su principal exponente ha sido objeto de muchos estudios que tienen como objetivo identificar los diversos compuestos presentes en los extractos de plantas de las plantas espermatofitas que los contienen y determinar su actividad biológica y posible uso en el campo farmacológico. Entre los muchos documentos de bibliografía científica y de patente, por ejemplo, patente europea EP 1292319 (Istituto di Medicina Sperimentale of CNR e Istituto Agrario de S. Michele *all'Adige*), uno de los autores del cual es el presente inventor, cubre un trímero de resveratrol, H-gnetina, y dos tetrámeros del mismo, r-viniferina y r-2-viniferina, que son nuevos compuestos aislados del vino o de los extractos de *Polygonum*. La patente también cubre el uso de un grupo más amplio de estos estilbenos y estilbenoides (dímeros, trímeros y tetrámeros de *cis*- y *trans*-resveratrol, además del derivado glucosilado relativo, conocido con el nombre de piceído o resveratrol-3-O- $\beta$ -mono-D-glucósido) para el tratamiento de carcinoma colorrectal y melanoma. Similarmente, la patente europea EP 1292320, de los mismos propietarios y autores, cubre el uso del mismo grupo más amplio de compuestos para el tratamiento de algunas inmunodeficiencias y enfermedades autoinmunitarias.

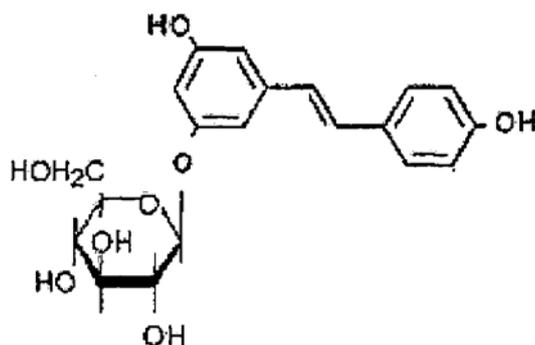
A pesar de la amplia bibliografía disponible, el uso de resveratrol y sus compuestos relacionados en el campo oftálmico no ha sido estudiado en tan gran profundidad. Un documento que puede relacionarse con este tópico es la patente de EE.UU. nº 6573299 (E. J. Petrus, asignada a Advanced Medical Instruments), que describe procedimientos y composiciones para el tratamiento de envejecimiento (fisiológico y patológico) del ojo. Este documento, en realidad, describe un copioso conjunto de agentes biológicamente activos útiles como antioxidantes que incluyen resveratrol (pero no caracterizando todos sus otros compuestos extractivos naturales relacionados) que pueden incluirse junto con un promotor de la permeación transdérmica en una preparación con funciones que son en parte cosméticas y en parte terapéuticas, para ser aplicados sobre los párpados. Según el documento anteriormente dicho, la preparación antioxidante propuesta no sólo atenúa las arrugas e imperfecciones sobre los párpados, sino que también penetra en los tejidos de alrededor, tratando también la formación de cataratas, glaucoma, retinopatía

diabética y degeneración macular.

Otro documento de la técnica anterior dedicado a resveratrol en el campo oftálmico es la publicación por King y col. en *Chemico-Biological Interactions* de 2005 (King R.E., Kent K.D., Bomser J.A., Resveratrol reduces oxidation and proliferation of human retinal pigment epithelial cells via extracellular signal regulated kinase inhibition, *Chemico-Biological Interactions*, **151**, 2005, 143-149), en el cual se demuestra con ensayos *in vitro* que el resveratrol puede tener efectos beneficiosos sobre las patologías retinianas asociadas a estrés oxidativo tales como DMS y VRP. Aquí también, el estudio sólo trata *trans*-resveratrol.

Así, basándose en este estado de la materia, la presente invención tiene como objetivo proporcionar una preparación, preferentemente basada en agentes antioxidantes de origen natural, para administración oftálmica tópica, oral o parenteral, que tanto puede preservar como restaurar las características estructurales y funcionales de tejidos oculares en patologías oftálmicas que implican diferentes estructuras del ojo, y concretamente de la córnea (tal como ojo seco, erosiones y lesiones de la córnea, desenlaces de operaciones quirúrgicas como PRK y LASIK, y facoemulsificación), cristalino (tal como cataratas), retina (tal como degeneración macular senil, retinopatía diabética) y nervio óptico (tal como glaucoma).

Para este fin, la presente invención propone el uso, en la formulación propuesta, de un hidroxiestilbeno glucosilado como principio activo, y en particular piceido (o resveratrol-3-O- $\beta$ -mono-D-glucósido, también conocido como polidatina). Por tanto, este compuesto, que puede representarse en la forma *trans* por la estructura de fórmula (I)

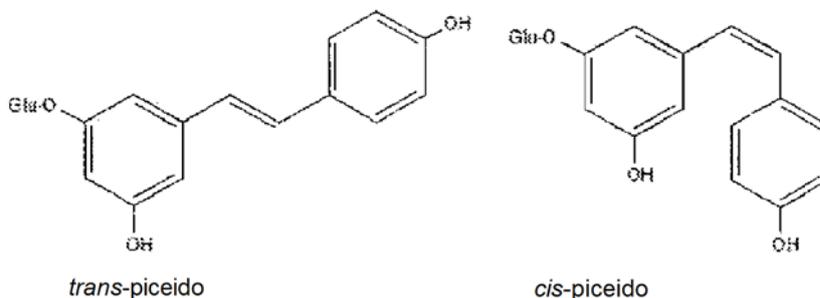


*trans*-piceido

se encuentra en abundancia en plantas espermatofitas de las familias *polygonaceae* y *vitaceae*, además de en *cyperaceae*, *gnetales* y *leguminosae*. En particular, en *Vitis vinifera* en la que, junto con el resveratrol, el piceido es el principal 3,5-dihidroxiestilbeno-4'-O- $\beta$ -mono-D-glucósido (resveratrolósido), 3',4',5-trihidroxiestilbeno-3-O- $\beta$ -monoglucósido (astringina), 4'-hidroxiestilbeno-3,5-O- $\beta$ -diglucósido, 5-hidroxiestilbeno-3,4'-O- $\beta$ -diglucósido, 3-hidroxiestilbeno-4',5-O- $\beta$ -diglucósido, estilbeno-3,4',5-O- $\beta$ -triglucósido, todos tanto en formas *trans* como *cis*.

La presente invención proporciona específicamente el uso de resveratrol-3-O- $\beta$ -mono-D-glucósido (piceido) para la producción de una preparación farmacéutica/nutricional para la prevención y el tratamiento de la formación de neblina de la córnea y cicatrización epitelial de la córnea retrasada tras cirugía refractiva y para el tratamiento de erosiones y lesiones de la córnea en las cuales dichas afecciones del ojo implican un desequilibrio en la producción de TGF- $\beta$  en el sitio afectado.

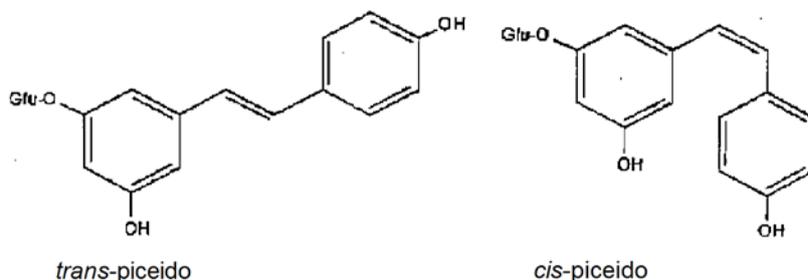
Preferentemente, el compuesto usado en las preparaciones farmacéuticas y/o nutricionales según la presente invención está seleccionado de *trans*-resveratrol-3-O- $\beta$ -mono-D-glucósido (*trans*-piceido) y *cis*-resveratrol-3-O- $\beta$ -mono-D-glucósido (*cis*-piceido), que también pueden representarse, respectivamente, por las dos siguientes fórmulas estructurales, en las cuales el anillo de glucosa se facilita simbólicamente como Glu-.



Según algunas realizaciones preferidas de la presente invención, dicha preparación farmacéutica/nutricional propuesta puede ser una preparación para administración oftálmica tópica, en particular en forma de colirios o disolución oftálmica, crema o gel, o soportada en macro-, micro- o nano-grupo que consiste en:

- 5 resveratrol-3-O-β-mono-D-glucósido (piceido),  
 3,5-dihidroxiestilbeno-4'-O-β-mono-D-glucósido (resveratrolósido),  
 3',4',5-trihidroxiestilbeno-3-O-β-monoglucósido (astringina),  
 4'-hidroxiestilbeno-3,5-O-β-diglucósido,  
 10 5-hidroxiestilbeno-3,4'-O-β-diglucósido,  
 3-hidroxiestilbeno-4',5-O-β-diglucósido,  
 estilbeno-3,4',5-O-β-triglucósido,  
 todos tanto en formas *trans* como *cis*.

- 15 Preferentemente, los compuestos usados en las preparaciones farmacéuticas y/o nutricionales según la presente invención están seleccionados del grupo que consiste en *trans*-resveratrol-3-O-β-mono-D-glucósido (*trans*-piceido) y *cis*-resveratrol-3-O-β-mono-D-glucósido (*cis*-piceido), que también pueden representarse, respectivamente, por las dos siguientes fórmulas estructurales, en las cuales el anillo de glucosa se facilita simbólicamente como Glu-.



Según algunas realizaciones preferidas de la presente invención, dicha preparación farmacéutica/nutricional propuesta puede ser una preparación para administración oftálmica tópica, en particular en forma de colirios o disolución oftálmica, crema o gel, o soportada en macro-, micro- o nanopartículas, en liposomas o en macro- y micro-emulsiones. Alternativamente, la preparación propuesta puede ser para administración por vía oral, en particular en forma de comprimidos, cápsulas, jarabe, disolución bebible, gránulo o preparaciones para administración sublingual, o puede ser un producto para administración parenteral, en particular por inyección intramuscular o intravenosa.

- 30 Los efectos de la administración o ingesta de piceido y de otros compuestos según la presente invención sobre las estructuras individuales y/o patologías pueden desearse para fines de prevención o de tratamiento, y pueden ser debidos a diferentes mecanismos de acción.

- 35 Las manifestaciones patológicas de la córnea son principalmente debidas a procesos inflamatorios. Como ya se ha observado, una de las causas de la aparición de los procesos inflamatorios anteriormente dichos es la estimulación, producida por un aumento en ERO, de la liberación de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) por células de la córnea, con la posterior síntesis de NO, conduciendo así a procesos inflamatorios y citotoxicidad.

- 40 Como se ilustrará en mayor detalle en la sección experimental más adelante, el piceido, a niveles no tóxicos, bloquea la producción de iNOS y su actividad guarda relación con la dosis. Comparando las respuestas de dosis/efecto de piceido y resveratrol es posible destacar cómo, con dosis iguales, el primero es sorprendentemente más eficaz que el último en inhibir la producción de iNOS por fibroblastos de origen de córnea normal y por

fibroblastos de origen de córnea inmortalizados por telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT), estimulada con interleucina-1 (IL-1). Esta actividad diferente es probablemente debida a la diferente estructura química de las dos moléculas y a las consecuentes características biológicas diferentes, entre las que es importante la mayor biodisponibilidad de piceido al nivel de célula. Otro efecto antiinflamatorio del piceido, ligado a lo que se ha dicho anteriormente, se basa en su capacidad para inhibir la síntesis de ciclooxigenasa y así la síntesis y liberación de prostaglandinas pro-inflamatorias.

La integridad de la superficie del ojo y la reparación de las lesiones de la córnea depende de un equilibrio delicado entre la proliferación, diferenciación, migración y apoptosis de diferentes tipos de células (Klenkler B. & Sheardown H., *Exp. Eye Res.*, 2004, **79**, 677-688). Estas funciones están reguladas por diferentes factores de crecimiento que pueden producirse por el epitelio de la córnea, estroma y endotelio. Incluso la película lagrimal adyacente a la córnea y el humor acuoso son una fuente de factores de crecimiento. Como se sabe, los factores de crecimiento son un grupo heterogéneo de péptidos hidrosolubles producidos por diferentes tipos de células, y su acción puede ser autocrina y/o paracrina, pudiendo desencadenar o inhibir las diversas funciones de células. Actúan uniéndose a sus receptores de célula respectivos, glucoproteínas transmembrana que pertenecen a la familia de los receptores de tirosina cinasas (TKR) o receptores acoplados a proteína G (GPCR). Los efectos de los diversos factores de crecimiento sobre un cierto tipo de célula dependen de diversos elementos, tales como el entorno extracelular en el que estos factores se ponen en contacto con las células, la concentración de factores de crecimiento, la interacción entre los diversos factores presentes según sus concentraciones.

Un factor crecimiento y regulador importante es el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Este factor es sintetizado por muchos tipos de células que incluyen los queratinocitos, macrófagos y fibroblastos activados y tiene muchísimos efectos biológicos importantes, y algunas veces contradictorios, sobre procesos celulares. TGF- $\beta$ , por ejemplo, inhibe el crecimiento celular epitelial, pero produce mitosis en células mesenquimatosas como fibroblastos. También se ha mostrado que TGF- $\beta$  tiene importantes funciones en los procesos de reparación de lesiones de la córnea. En realidad, durante la reparación, hay una regulación por incremento de receptores específicos de TGF- $\beta$  sobre células epiteliales de la córnea, y se ha demostrado que durante este proceso el factor regula la expresión de algunos componentes de la matriz extracelular (MEC) y la respuesta antiinflamatoria. Además, TGF- $\beta$  regula la transformación de queratocitos en fibroblastos migratorios y en miofibroblastos, una población de células que son esenciales en el proceso de re-cicatrización de la córnea.

El procedimiento de reparación de la córnea puede resumirse brevemente del siguiente modo:

12-24 horas después de una lesión hay la liberación de TGF- $\beta$  producido por las células epiteliales en el estroma, con la estimulación resultante de los citoblastos. Así, los queratocitos quiescentes son activados para diferenciarse en fibroblastos migrantes y posteriormente en miofibroblastos, que son células caracterizadas por la expresión dentro de ellas de haces de filamentos de actina de la isoforma llamada  $\alpha$ -SMA (actina de músculo liso  $\alpha$ ) ya que sólo se encuentra en músculo liso. Como ya se ha observado, estas células desempeñan una función fundamental en lesiones de reparación debido a que forman una malla de células que puede ejercer una fuerza mecánica mediante un mecanismo de tipo contráctil de un tipo de músculo liso que actúa dando lugar a la contracción de la lesión. Además, como ya se ha descrito, la liberación de TGF- $\beta$  estimula la organización de la matriz.

Todavía dentro de un periodo de tiempo de 12-24 horas después de la lesión, en la córnea hay un flujo de células inflamatorias, es decir, monocitos, macrófagos o incluso fibroblastos, procedentes de vasos limbares. En este caso también, el TGF- $\beta$  desempeña una función fundamental debido a que activa las células inflamatorias para alcanzar el sitio de inflamación.

Globalmente, semanas (o algunas veces meses) después de la lesión y su posterior reparación, la córnea vuelve a un estado normal, eliminando los miofibroblastos y células inflamatorias, o gracias al retorno a niveles de pre-lesión de los factores de crecimiento, recobrando así sus características ópticas normales propias. El éxito de este proceso depende mucho de la correcta combinación de factores de crecimiento presentes, en particular de TGF- $\beta$ .

Es importante considerar que, cuando este factor está presente en el sitio de lesión en concentraciones apropiadas y en el momento apropiado, es un regulador esencial del funcionamiento de la córnea normal y del mecanismo de reparación. Sin embargo, un desequilibrio de este factor puede conducir a situaciones patológicas tales como una recuperación incompleta de la lesión, seguida de una patología de la córnea, con la pérdida asociada en la capacidad visual. En realidad, una producción excesiva de TGF- $\beta$  durante afecciones traumáticas o infecciosas puede conducir a una producción excesiva de matriz extracelular, a una infiltración excesiva de células inflamatorias (y así a una afección inflamatoria patológica), o a una estimulación de la producción de citocinas pro-angiogénicas (VEG, FGF) y así a neovascularización de la córnea. Estas acciones patológicas de TGF- $\beta$  conducen a edema de la córnea, y el nublamiento y pérdida de calidad óptica de la córnea. Además, la estimulación excesiva de la formación de miofibroblastos o su preservación durante periodos de tiempo no fisiológicos por parte de TGF- $\beta$  conduce a la neblina de la córnea anteriormente dicha. Como ya se ha observado, también se ha demostrado recientemente (Ivarsen A. y col., *Br. J. Ophthalmol.* 2003, **87**, 1272-1278) que el margen fibrótico que se forma durante periodos de tiempo más o menos largos tras una operación de LASIK en la córnea y que produce cambios de refractividad en

ella es debido a la estimulación de la producción de TGF- $\beta$  y así a la formación de miofibroblastos.

Como se ha informado en detalle en la sección experimental más adelante, el piceido ha demostrado inesperadamente ser capaz de modular, a diferencia del resveratrol, la capacidad de TGF- $\beta$  para producir diferenciación de fibroblasto en miofibroblastos. En realidad, cuando se añaden a cultivos de fibroblastos de origen de córnea normal o a fibroblastos de hTERT estimulados con una concentración inferior a la óptima de TGF- $\beta$ , que no puede producir la diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos, se ha encontrado que el piceido aumenta la actividad del factor de crecimiento, restaurando así su capacidad biológica, evaluada determinando la expresión de  $\alpha$ -SMA. Por otra parte, si se añade piceido a cultivos de fibroblastos normales o fibroblastos de hTERT estimulados con una concentración superior a la óptima de TGF- $\beta$ , produce una disminución en la expresión de  $\alpha$ -SMA, demostrándose así que tiene la capacidad para modular el efecto del factor de crecimiento. Además, a dosis no citotóxicas o citostáticas, el piceido no tiene actividad significativa en ningún tipo de célula.

Es evidente que esta actividad del piceido tiene un importante efecto terapéutico debido a que estimula la reparación de córnea apropiada y fisiológica en aquellos casos en los que hay un retraso establecido en los procesos reparadores, pero previene la formación de neblina en aquellos casos, no poco frecuentes, por ejemplo, en cirugía refractiva, en la que hay un crecimiento y/o permanencia anormal de miofibroblastos en el sitio de lesión.

Debe observarse que esta actividad descrita dentro de la presente invención contrasta con lo que se ha publicado para miofibroblastos de origen hepático, en los que el piceido, a diferencia del resveratrol, no mostró ningún efecto significativo (Godichaud S. y col., Deactivation of cultured human liver myofibroblasts by trans-resveratrol, a grapevine-derived polyphenol, *Hepatology*, 2000, **31**, 922-931). Según la referencia citada, el *trans*-resveratrol produce una reducción de la expresión de  $\alpha$ -SMA y ha demostrado poder desactivar miofibroblastos de hígado humano, que se consideran que son los más responsables de la fibrosis hepática humana y tumores hepáticos. Por otra parte, ni el *trans*-piceido ni otro hidroxiestilbeno, *trans*-piceatannol (*trans*-3,4',3',5-tetrahidroxiestilbeno), han mostrado ningún efecto sobre los miofibroblastos del hígado. Esta diferencia, encontrada por primera vez dentro del marco de la presente invención, es probablemente debida al diferente mecanismo de transporte de células entre las dos sustancias, y al diferente tipo de células en cuestión.

La actividad de secuestrantes de radicales libres del piceido es la base de su efecto terapéutico en relación con la lesión de la córnea producida por facoemulsificación, y esta actividad también es la base de su capacidad para prevenir el desarrollo de cataratas contrastando los efectos de lesión oxidativa repetida producida por rayos de luz durante la vida del individuo. En realidad, la oxidación de la proteína del cristalino es un factor patofisiológico importante de las cataratas y así la poderosa acción antioxidante del piceido es una protección particularmente eficiente a este respecto.

También se ha encontrado un debilitamiento del sistema de defensa antioxidante con ciertos pacientes con glaucoma, y particularmente sus niveles de GSH y así el uso de piceido también puede considerarse una terapia preventiva sustituta.

Como ya se ha informado, incluso en degeneración macular, la lesión por radical libres debida a exposición a la luz desempeña una función patogénica importante. Los antioxidantes endógenos están normalmente presentes al nivel retiniano y se asume que su reducción contribuye a la aparición de la patología. Tratamientos prolongados con antioxidantes también han demostrado ser útiles en retrasar o incluso prevenir la aparición de la patología. En este caso también, el uso de piceido, gracias a sus propiedades antioxidantes, puede considerarse un tratamiento preventivo y curativo, porque evita o retrasa la aparición de la patología.

Finalmente, como el TGF- $\beta$  es un poderoso inductor de la secreción de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y, como ya se ha observado, este factor es importante en la etiología de la neovascularización coroidea (NVC) y neovascularización por DMS, el piceido, gracias a su capacidad para modular la actividad de TGF- $\beta$ , también es un agente terapéutico eficaz para estas dos patologías oftálmicas.

El (Los) principio(s) activo(s) en la preparación según la presente invención están preferentemente presentes en la formulación en una cantidad total que oscila del 0,001% al 10% en peso. Como se ha observado, dicho principio activo es resveratrol-3-O- $\beta$ -mono-D-glucósido (piceido), y preferentemente *trans*-piceido.

En particular, la preparación según la presente invención puede estar en forma de colirios, y puede contener del 0,001% al 10% peso de *trans*-piceido en una disolución acuosa. Según ciertas realizaciones de la formulación, la preparación también puede incluir ácido hialurónico, en particular, en plazos que oscilan entre el 0,01% y el 2% en peso.

Otros componentes posibles que van a añadirse en una formulación según la presente invención, en lugar de ácido hialurónico, son, por ejemplo, diversos derivados de celulosa (tales como hidroxipropilmetilcelulosa y carboximetilcelulosa), otros polisacáridos, poli(alcohol vinílico), microemulsiones basadas en fosfolípidos y polivinilpirrolidona (PVP, povidona).

Obviamente, una formulación líquida basada en los principios activos anteriormente dichos puede contener, como excipientes, diversos otros componentes muy conocidos en el campo farmacéutico tales como agentes reguladores del pH y tampones, agentes conservantes, agentes quelantes y uno o más agentes de ajuste de la tonicidad que pueden dar a la disolución el valor de osmolaridad deseado. Como la disolución oftálmica propuesta debe ser isotónica o ligeramente hipotónica con respecto al líquido lagrimal, estos agentes de ajuste de la tonicidad estarán presentes en la preparación en cantidades adecuadas para proporcionar una disolución con un osmolaridad entre 170 y 350 mOsm/l.

En otras realizaciones de la presente invención, la preparación oftálmica basada en piceido, y preferentemente *trans*-piceido, puede estar en una forma de gel o crema. En este caso, la preparación puede contener del 0,001% al 1% en peso de *trans*-piceido.

Como ya se ha observado, el uso del principio activo propuesto por la presente invención también es posible en una forma adecuada para administración oral, tal como en forma de cápsulas que contienen de 0,1 mg a 500 mg de *trans*-piceido por cápsula. En ciertos casos puede ser ventajoso formular la preparación con la adición de ácidos grasos poliinsaturados, preferentemente en cantidades que oscilan de 50 mg a 5000 mg por cápsula.

Finalmente, cuando la preparación de actividad antioxidante y antiinflamatorio, según la presente invención, es para administración parenteral, en particular por inyección intramuscular o intravenosa, una disolución conveniente es la de un vial para inyección intramuscular que contiene de 0,1 mg a 500 mg de *trans*-piceido por vial.

Las características específicas de la presente invención, además de sus ventajas y modalidades operativas relativas, serán más evidentes con referencia a una descripción detallada presentada simplemente para fines de ejemplificación más adelante, junto con los resultados de los experimentos llevados a cabo en ella y los datos para comparación con la técnica anterior. Algunos resultados experimentales también se ilustran en las figuras adjuntas, en las cuales:

La Figura 1 muestra la tendencia del porcentaje de fibroblastos hTERT de la córnea positivos para iNOS en el caso de su pre-incubación con *trans*-resveratrol y con *trans*-piceido;

la Figura 2 muestra el efecto del piceido sobre la diferenciación de fibroblastos hTERT de la córnea estimulados con dosis inferiores a la óptima de TGF- $\beta$ , evaluado examinando si  $\alpha$ -SMA está presente;

la Figura 3 muestra el efecto de piceido sobre la diferenciación de fibroblastos hTERT de la córnea estimulados con dosis óptimas de TGF- $\beta$ , evaluado examinando si  $\alpha$ -SMA está presente; y

la Figura 4 muestra el efecto de piceido sobre la diferenciación de fibroblastos hTERT de la córnea estimulados con dosis superiores a la óptima TGF- $\beta$ , todavía evaluado examinando si  $\alpha$ -SMA está presente.

Algunas realizaciones específicas de las preparaciones para la terapia y prevención de diversas afecciones oftálmicas según la invención se informan más adelante simplemente para fines de ejemplificación.

### Ejemplo 1

#### Preparación de colirio para ojo seco

La composición de un colirio basado en piceido que va a usarse para administración tópica en el ojo como un sustituto de líquido lagrimal se informa a continuación.

Componente	Concentración (%)
piceido	0,10
ácido hialurónico	0,15
PEG 8000	0,50
bisulfato de sodio (NaHSO <sub>3</sub> )	0,075
cloruro de benzalconio	0,005
EDTA	0,125
tampón fosfato	c.s.p. hasta pH 6,0 - 7,5
NaCl	c.s.p. hasta 270 mOsm/l

La preparación, que debe usarse como lágrimas artificiales corrientes en una dosificación de 1-2 gotas por ojo entre

1 y 4 veces al día, puede aliviar la sensación de ojo seco gracias a la presencia combinada de piceido y ácido hialurónico, formulada con excipientes adecuados, y también tiene una actividad antioxidante y antiinflamatoria.

### Ejemplo 2

#### Preparación de colirio para ojo seco

Como una alternativa a la preparación precedente, aquí sigue otra preparación de colirio útil como líquido lagrimal artificial basado en piceido, que en este caso va a envasarse en matraces de monodosis debido a la ausencia de conservante.

Componente	Concentración (%)
piceido	0,10
microemulsión de fosfolípido	c.s.p. hasta 100

Como la microemulsión anteriormente dicha ya está estabilizada no son necesarios otros componentes.

Las dosis y procedimientos de administración de la preparación son los mismos que en el ejemplo previo.

### Ejemplo 3

#### Preparación de gel para ojo seco

En los casos más graves de ojo seco puede ser más apropiado emplear una preparación de gel basada en piceido para su uso como un sustituto de líquido lagrimal, con la siguiente composición indicativa.

Componente	Concentración (%)
piceido	0,10
carbopol	0,20
sorbitol	4,00
cetrimida	0,01
NaOH	c.s.p. hasta pH 7,2

El gel debe aplicarse a las dosis y frecuencia facilitadas para los colirios del Ejemplo 1.

### Ejemplo 4

#### Preparación de crema para ojo seco

Todavía en los casos más graves de ojo seco puede usarse una forma en la cual el agente antioxidante y antiinflamatorio está en una crema. Una formulación ejemplificativa se facilita a continuación.

Componente	Concentración (%)
piceido	0,10
parafina líquida	20,0
lanolina	10,0
vaselina	c.s.p. hasta 100 ml

En este caso, la preparación debe aplicarse una vez a día, por la tarde, para tratamiento por la noche, ya que su espesor particular puede nublar la visión.

### Ejemplo 5

#### Preparación de cápsulas para maculopatías

Un producto para uso oral que emplea las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias del piceido, en combinación con otros componentes de propiedades protectoras y antioxidantes ya experimentadas, y también con una serie de oligoelementos útiles en el caso de patologías degenerativas y del envejecimiento, puede ser de la siguiente composición.

<b>Componente</b>	<b>Concentración (por cápsula)</b>
piceido	10,0 mg
AGPI (ácidos grasos poliinsaturados)	500 mg
Omega-3 (DHA, EPA)	
ácidos $\alpha$ -linoleico y $\gamma$ -linoleico	
Omega-6	
ácido linolenico	
ácido lipoico	300 mg
L-glutatión	1500 mg
selenio	0,04 mg
cobre	0,60 mg
cinc	15,0 mg
luteína	6,0 mg

Para una acción protectora apropiada, la preparación debe tomarse en dosis que oscilan entre 1 y 4 cápsulas por día.

5

#### **Ejemplo 6**

##### Preparación de cápsulas para ojo seco

10 Otro producto para administración por vía oral que, a diferencia del producto del Ejemplo 5, se indica como un antiinflamatorio y antioxidante para ojo seco, puede tener la siguiente composición.

<b>Componente</b>	<b>Concentración (por cápsula)</b>
piceido	10,0 mg
AGPI (ácidos grasos poliinsaturados)	500 mg
Omega-3 (DHA, EPA)	
ácidos $\alpha$ -linoleico y $\gamma$ -linoleico	
Omega-6	
ácido linolenico	
N-acetilcisteína (NAC)	600 mg
vitamina C	750 mg

La dosificación es la misma que la facilitada en el Ejemplo 5.

15

#### **Ejemplo 7**

##### Preparación de cápsulas para oclusiones y maculopatías vasculares

20 Un producto según la presente invención para administración por vía oral, particularmente recomendado para la prevención de oclusiones vasculares y en el tratamiento de maculopatías secas o húmedas relacionadas con la edad, puede tener la siguiente composición.

<b>Componente</b>	<b>Concentración (por cápsula)</b>
piceido	10,0 mg
betaína	1000 mg
ácido fólico	0,40 mg
vitamina B <sub>12</sub>	0,0024 mg
vitamina B <sub>6</sub>	1,70 mg

La combinación de los productos anteriormente dichos, además de tener un efecto antiinflamatorio y antioxidante, contrasta con la formación de homocisteína, un catabolito natural cuya formación en el cuerpo puede conducir a problemas del corazón y vasculares.

5 En este caso también, el producto debe tomarse en dosis que oscilan de 1 a 4 cápsulas por día.

### Ejemplo 8

#### Preparación inyectable para ojo seco

10 Cuando las condiciones ligadas a la patología oftálmica son tales como para justificarla, la preparación antioxidante y antiinflamatoria basada en piceido según la presente invención también puede prever la administración por medio de inyección intramuscular, en cuyo caso el producto puede tener la siguiente composición.

Componente	Concentración (por cápsula)
piceido	10,0 mg
agua para inyectables	c.s.p. hasta 5 ml

15 En este caso, los límites de dosificación recomendados oscilan de 1 a 4 viales por día.

#### **Efectos del piceido sobre la producción de iNOS por fibroblastos hTERT estimulados con citocinas**

##### *Objetivo del estudio*

El estudio tuvo como objetivo determinar los efectos del tratamiento con piceido y resveratrol sobre la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) por fibroblastos de la córnea inmortalizados con telomerasa transcriptasa inversa humana (fibroblastos hTERT), estimulados con interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e interleucina-1 (IL-1).

##### *Procedimiento*

##### *Células y tratamiento*

30 Algunos fibroblastos hTERT se mantuvieron en un medio DMEM de cultivo. Se resuspendieron posteriormente a una concentración de  $1 \times 10^6$  y se dispusieron sobre placas de pocillos de 24 mm. Las células se incubaron a una temperatura de 37°C con piceido o resveratrol a dosis de 1,25 - 2,5 - 5  $\mu\text{g/ml}$ . Después de 15 minutos, lo siguiente se añadió a los pocillos que contenían las células: IL-1 a una concentración de 3 ng/ml, e IFN- $\gamma$  a una concentración de 250 U/ml. Después de otras 48 h de incubación, los fibroblastos se lavaron y se re-suspendieron en PBS a una concentración de  $1 \times 10^6$  con el fin de determinar las células positivas para iNOS por medio de citometría de flujo.

##### *Citometría de flujo*

40 Las células tratadas en la forma anteriormente dicha se permeabilizaron mediante tratamiento con 70% de etanol y luego se marcaron con 5  $\mu\text{g/ml}$  de un anticuerpo anti-iNOS humano marcado con FITC. Después de la coloración las células se fijaron en paraformaldehído y se analizaron por medio de un citofluorímetro FACScan.

##### *Resultados y conclusiones*

45 Como se ilustra gráficamente en la Figura 1, los resultados muestran que la estimulación con IL-1+ IFN- $\gamma$  produce la producción de iNOS en aprox. el 60% de los fibroblastos hTERT. La pre-incubación con piceido produjo una disminución dependiente de la dosis en el número de fibroblastos positivos para iNOS. Esta disminución es mayor en comparación con la obtenida con una pre-incubación con resveratrol. Las diferencias entre piceido y resveratrol son estadísticamente significativas en cada punto a lo largo de la curva experimental.

50 A las dosis examinadas en el presente estudio, ambos compuestos resultaron no tóxicos (datos no mostrados).

55 A partir de los resultados anteriormente dichos es posible llegar a la conclusión de que el piceido produce una disminución significativa en el porcentaje de fibroblastos que pueden producir iNOS después de la estimulación de citocinas. Esta actividad indica que el compuesto tiene propiedades antiinflamatorias para células humanas de origen de córnea. Los resultados anteriormente dichos también indican que la eficacia del piceido es estadísticamente mayor que la del resveratrol.

#### **Efectos del piceido sobre la diferenciación de fibroblastos**

##### *Objetivo del estudio*

El estudio tuvo como objetivo determinar los efectos del tratamiento con piceido sobre la diferenciación de fibroblastos de la córnea inmortalizados con telomerasa transcriptasa inversa humana (fibroblastos hTERT) estimulados con dosis inferiores a la óptima, óptimas o superiores a la óptima de TGF- $\beta$ . La diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos se determinó examinando si había alguna  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA).

#### *Procedimiento*

##### *Células y tratamiento*

Algunos fibroblastos hTERT mantenidos en un cultivo DMEM se re-suspendieron a una concentración de  $1 \times 10^6$  y se dispusieron sobre placas de pocillos de 24 mm. Las células se incubaron a una temperatura de 37°C con piceido o resveratrol a dosis de 5  $\mu\text{g/ml}$ . Después de 24 h las células se estimularon con dosis óptimas (1 ng/ml), inferiores a la óptima (0,1 ng/ml) y superiores a la óptima (10 ng/ml) de TGF- $\beta$ . Después de 3, 5 y 10 días de incubación, los fibroblastos se lavaron y se re-suspendieron en PBS a una concentración de  $1 \times 10^6$  con el fin de determinar las células positivas para  $\alpha$ -SMA por medio de citometría de flujo.

##### *Citometría de flujo*

Las células tratadas en la forma anteriormente dicha se permeabilizaron mediante tratamiento con 70% de etanol y luego se marcaron con 5  $\mu\text{g/ml}$  de un anticuerpo anti- $\alpha$ -SMA humano marcado con FITC. Después de la coloración las células se fijaron en paraformaldehído y se analizaron por medio de un citofluorímetro FACScan.

##### *Resultados y conclusiones*

Como se ilustra gráficamente en la Figura 2, los resultados experimentales muestran que la adición de 5  $\mu\text{g/ml}$  de piceido a los cultivos estimulados con la dosis inferior a la óptima (0,1 ng/ml) de TGF- $\beta$  determina, después de 3 días de incubación, un aumento estadísticamente significativo, en comparación con los no tratados, del porcentaje de células que pueden expresar  $\alpha$ -SMA (es decir, miofibroblastos). Este aumento disminuyó, aunque todavía permanecía estadísticamente significativo, el 5º día, mientras que el 10º día ya no hubo ningún porcentaje significativo de células capaces de expresar  $\alpha$ -SMA.

Por otra parte, como se muestra en la Figura 3, cuando se añadieron 5  $\mu\text{g/ml}$  de piceido a los cultivos estimulados con una dosis óptima (1 ng/ml) de TGF- $\beta$ , no condujo a ninguna variación de porcentaje significativa de células positivas para  $\alpha$ -SMA en los tres intervalos de tiempo considerados.

La estimulación de los cultivos con TGF- $\beta$  a una dosis superior a la óptima de 10 ng/ml condujo a un aumento en el número de miofibroblastos (células  $\alpha$ -SMA+) como se muestra en la Figura 4. Este aumento siguió siendo significativo durante los 10 días examinados. La adición de 5  $\mu\text{g/ml}$  de piceido condujo a una disminución en el porcentaje en fibroblastos que ya fue significativo en el 5º día, y en el 10º día llevó el número de fibroblastos de nuevo a condiciones fisiológicas, con valores de porcentaje de células  $\alpha$ -SMA+ que no fueron estadísticamente diferentes de los registrados a intervalos del mismo tiempo con la dosis óptima.

Cuando 5  $\mu\text{g/ml}$  de resveratrol se añadieron a los cultivos estimulados con la dosis inferior a la óptima, óptima y superior a la óptima de TGF- $\beta$ , no condujo a ninguna variación estadísticamente significativa en el porcentaje de células  $\alpha$ -SMA+.

En conclusión, es evidente que el piceido ha demostrado tener la capacidad para modular el efecto de TGF- $\beta$  en provocar la diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos. El piceido ha demostrado por sí mismo que puede tanto aumentar la capacidad de TGF- $\beta$ , a una dosis inferior a la óptima, para producir la diferenciación en miofibroblastos, como también restaurar a condiciones normales el número de miofibroblastos, que había permanecido alto en el 10º día después de la estimulación con una dosis superior a la óptima de TGF- $\beta$ . Este efecto muestra la capacidad del piceido para modular y normalizar la producción de miofibroblastos, asegurándose así una reparación apropiada de la lesión de la córnea y una mejor preservación de las calidades ópticas de la córnea. A las dosis ensayadas, el piceido no parece tóxico para esta línea celular.

Los resultados de la experimentación llevados a cabo también indican que el resveratrol no muestra una eficacia similar en modular la actividad de TGF- $\beta$ .

De la presentación anterior parece evidente que, gracias a su actividad secuestrante sobre radicales libres, el piceido puede prevenir la lesión oxidativa no obstante causada a la córnea y puede tratar el proceso inflamatorio si éste se produce.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de resveratrol-3-O-β-mono-D-glucósido (piceido) para la producción de una preparación farmacéutica/nutricional para la prevención y tratamiento de formación de neblina en la córnea y cicatrización epitelial de la córnea retrasada tras cirugía refractiva y para el tratamiento de erosiones y lesiones de la córnea, en el cual dichas afecciones del ojo implican un desequilibrio en la producción de TGF-β en el sitio afectado.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, en el cual dicho resveratrol-3-O-β-mono-D-glucósido se elige de *trans*-resveratrol-3-O-β-mono-D-glucósido y *cis*-resveratrol-3-O-β-mono-D-glucósido.
3. Uso según la reivindicación 2, en el cual dicha preparación farmacéutica/nutricional contiene *trans*-resveratrol-3-O-β-mono-D-glucósido como principio activo.
- 15 4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el cual dicha preparación es un producto en una forma adecuada para administración oftálmica tópica, administración por vía oral o administración parenteral.
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el cual dicho piceido está presente en dicha preparación en una cantidad total que oscila del 0,001% al 10% en peso.
- 20 6. Uso según la reivindicación 5, en el cual dicho piceido es *trans*-resveratrol-3-O-β-mono-D-glucósido, es decir, *trans*-piceido.
- 25 7. Uso según la reivindicación 6, en el cual dicha preparación está en una forma adecuada para administración por vía oral.
8. Uso según la reivindicación 7, en el cual dicha preparación está en forma de cápsulas que contienen de 0,1 mg a 500 mg de *trans*-piceido por cápsula.
- 30 9. Uso según la reivindicación 8, en el cual dicha preparación también contiene de 50 mg a 5000 mg de ácidos grasos poliinsaturados por cápsula.
10. Uso según la reivindicación 6, en el cual dicha preparación está en una forma adecuada para administración parenteral.
- 35 11. Uso según la reivindicación 6, en el cual dicha preparación está en forma de un vial para inyección intramuscular y que contiene de 0,1 mg a 500 mg de *trans*-piceido por vial.

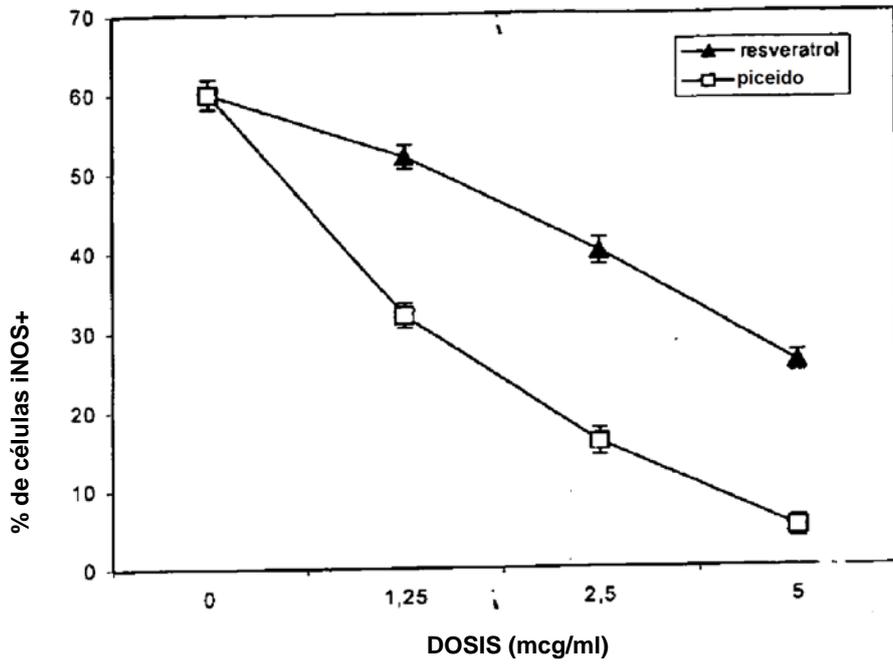


Fig. 1

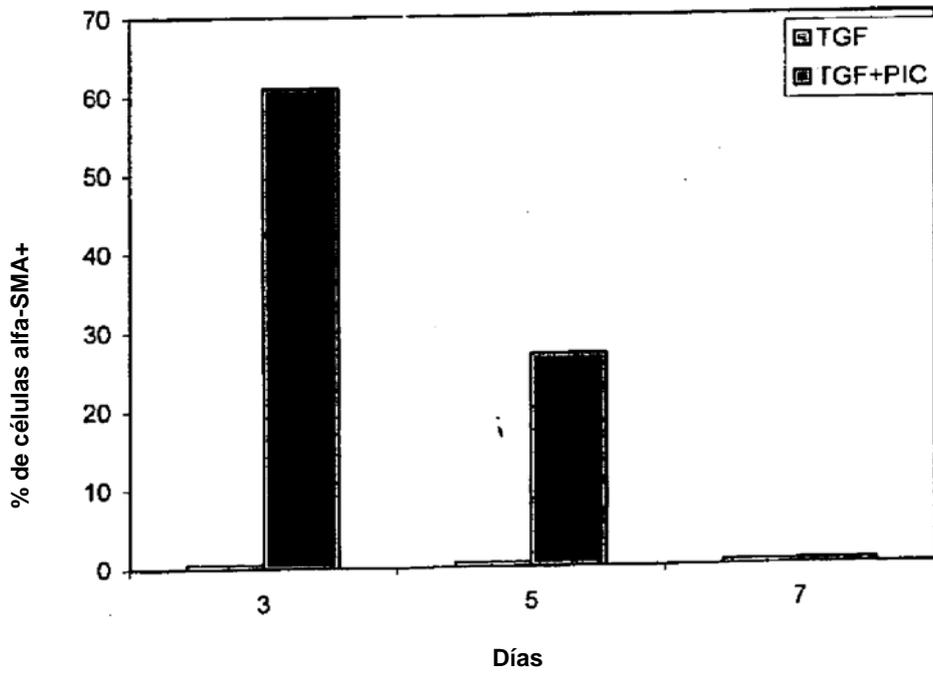


Fig. 2

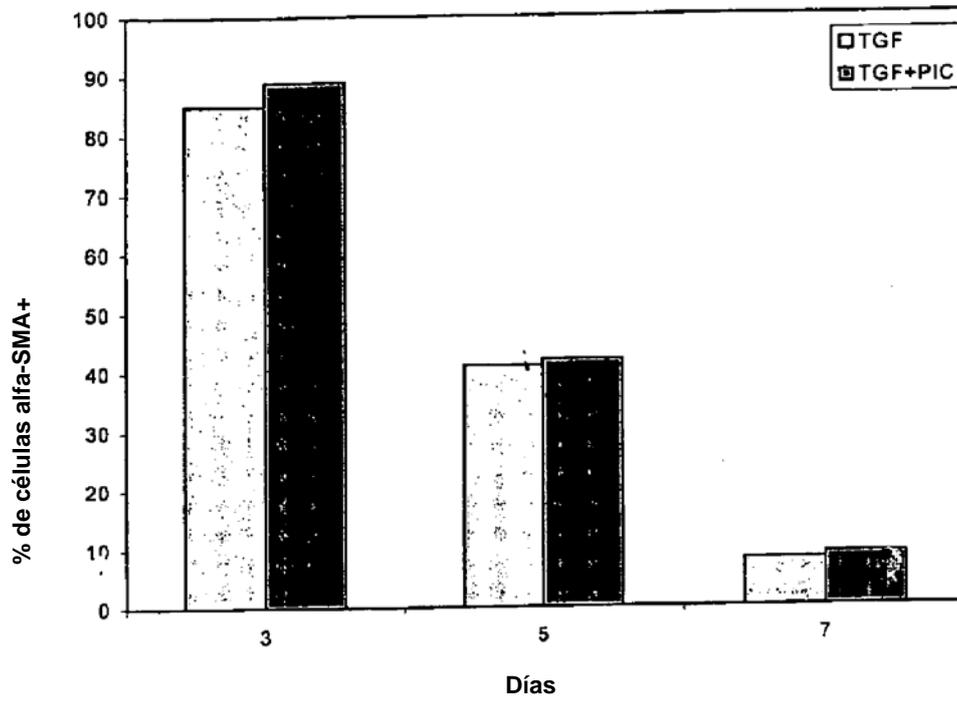


Fig. 3

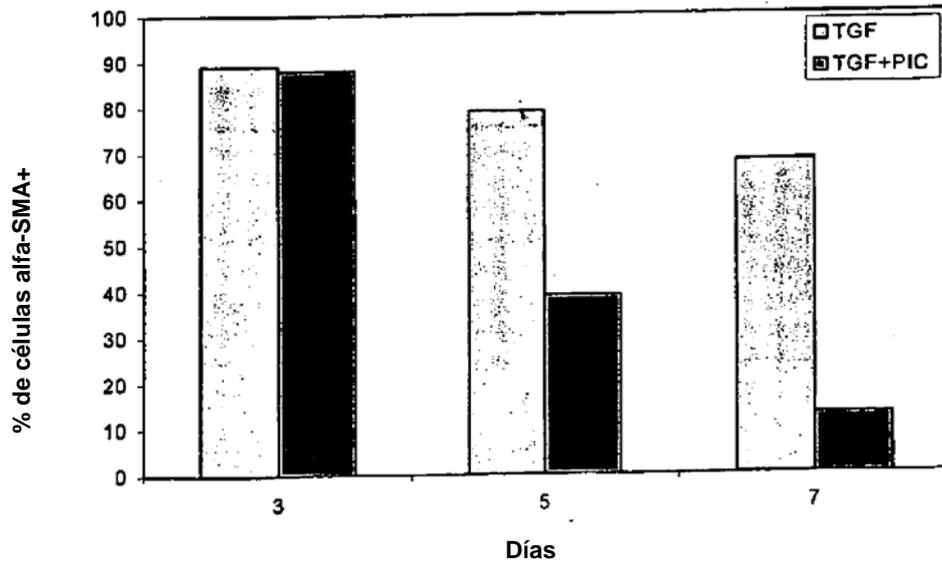


Fig. 4