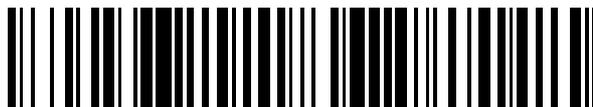


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 665**

21 Número de solicitud: 201230664

51 Int. Cl.:

A61K 31/05 (2006.01)

A61K 31/353 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

04.05.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

08.11.2013

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (50.0%)
IOBA, Paseo de Belén, 17
47011 Valladolid ES y
ALLERGAN INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GONZÁLEZ GARCÍA, María Jesús;
CALONGE CANO, Margarita;
ENRÍQUEZ DE SALAMANCA ALADRO, Amalia;
STERN, Michael E. y
ABENGÓZAR VELA, Antonio**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Composición para su uso en el tratamiento y/o prevención de la inflamación, el estrés oxidativo y la neovascularización ocular**

57 Resumen:

Composición para su uso en el tratamiento y/o prevención de la inflamación, el estrés oxidativo y la neovascularización ocular.

La presente invención se refiere al uso de la quercetina (QCT) o de una composición que comprende QCT y al menos otro compuesto polifenólico, preferiblemente resveratrol (RES), para el tratamiento y/o prevención de lesiones o enfermedades que cursan con inflamación, estrés oxidativo y/o neovascularización ocular, preferiblemente del segmento anterior, más preferiblemente de la superficie ocular y aun más preferiblemente del epitelio corneal. La invención también se refiere al uso de la QCT y de dicha composición como agente antimicrobiano, antioxidante y antiinflamatorio en soluciones de limpieza y mantenimiento de lentes de contacto.

ES 2 428 665 A1

DESCRIPCIÓN

Composición para su uso en el tratamiento y/o prevención de la inflamación, el estrés oxidativo y la neovascularización ocular

5 La presente invención se encuadra en el campo de la oftalmología, específicamente dentro de las composiciones oftálmicas útiles para el tratamiento y/o prevención de lesiones o enfermedades que cursan con inflamación, estrés oxidativo y/o neovascularización ocular, preferiblemente del sistema lagrimal (secretor y excretor), anejos oculares (párpados, incluyendo las glándulas de Meibomio) y del segmento anterior del ojo, el cual comprende conjuntiva (incluyendo las células productoras de mucinas y las glándulas del sistema lagrimal secundario), córnea, limbo esclero-corneal, iris, pupila, cristalino, zónula de Zinn, cuerpo ciliar, cámara anterior, humor acuoso, cámara posterior; y más preferiblemente de la superficie ocular, que comprende los epitelios de la córnea, limbo esclero-corneal y conjuntiva, la película lagrimal suprayacente y el estroma subyacente a estas estructuras.

15 **ESTADO DE LA TÉCNICA**

La inflamación ocular es uno de los problemas de mayor incidencia en la patología oftalmológica. El tratamiento de esta afección se puede realizar de forma específica, atacando la etiología, de forma inespecífica, reduciendo los síntomas inflamatorios, o uniendo ambas cosas. En este sentido, los corticosteroides se han utilizado como fármacos de elección en el tratamiento inespecífico de la inflamación ocular, pero los efectos adversos que presentan han planteado la necesidad de incrementar el uso de otros fármacos como los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) (Thadani SM., Foster CS., 2004, *Pediatr Drugs*, 6: 289-301). La actividad antiinflamatoria de estos últimos agentes radica en la inhibición reversible de la actividad de la enzima ciclooxigenasa (COX) en sus isoformas COX-1 y COX-2, impidiendo la formación de prostaglandinas, sustancias mediadoras de la inflamación.

25 La inflamación ocular puede deberse a diversas causas y tener unas características u otras dependiendo de la zona del ojo en la que se desencadene. Puede estar provocada, por ejemplo, por una intervención quirúrgica, sin embargo, ésta es solo una de las causas de la patología, la cual debe tratarse con antiinflamatorios en cualquiera de sus manifestaciones para paliar los síntomas y evitar las graves complicaciones que puede acarrear y que pueden empeorar la calidad de vida de los pacientes. Dichas complicaciones dependen de la localización de la inflamación y pueden ir desde la pérdida de las pestañas, si se da en los párpados, empeoramiento del pronóstico de los traumatismos oculares e incluso ceguera en el caso de uveítis o patología inflamatoria intraocular.

35 La inflamación puede darse en todas las estructuras de la anatomía ocular. Así, serían susceptibles de verse afectados tanto los anejos oculares como el globo ocular o el nervio óptico, pudiéndose encontrar inflamación tanto de origen infeccioso como no infeccioso. Y así, se hablará de inflamaciones orbitarias, palpebrales, intraoculares (uveítis, también denominadas, según las partes a las que afecte predominantemente, retinitis, coroiditis, papilitis o vasculitis) o inflamaciones de la superficie ocular (blefaritis, conjuntivitis, queratitis, afecciones del limbo esclero-corneal y patología lagrimal, el síndrome de ojo seco (SOS) incluido).

40 Se estima que alrededor del 7% de las personas jóvenes padece algún fenómeno de inflamación ocular en España, mientras que en la edad adulta la aparición de otras enfermedades que provocan este fenómeno, como el SOS, hace que su prevalencia aumente hasta el 30% a partir de los 60 años.

45 El SOS es una enfermedad inflamatoria inmune, crónica, de origen multifactorial que podría originarse en cualquiera de los componentes de la unidad funcional lagrimal, formada por la superficie ocular, las glándulas lagrimales principal y accesorias y la inervación de interconexión entre ellas -ramas aferentes y eferentes-, y que, en algún momento, provoca daño en la superficie ocular (epitelios de córnea, limbo esclero-corneal y conjuntiva, película lagrimal suprayacente y estroma subyacente a estas estructuras) que se detectan con las pruebas convenientes.

50 En cuanto a la neovascularización ocular, ésta se encuentra ligada directamente al estímulo de la hipoxia, a la necrosis tisular y a la activación de complejas cascadas de interacción entre citoquinas/quimioquinas (Ej: IL-8) y factores de crecimiento estimuladores de la formación de neovasos (VEGF, bFGF, TGF- α , PDGF, IGF). Todos estos eventos son desencadenados, más frecuentemente, por inflamación intensa y/o prolongada y/o recurrente, independientemente de la causa que la origine. Por ejemplo, un evento agudo y muy intenso como una causticación (quemadura química) o un evento menos intenso pero recurrente (queratitis herpética) o prolongado (SOS severo) podrán ser el origen de una neovascularización corneal. En los últimos años, estudios de investigación en neovascularización han demostrado una interrelación directa entre citoquinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión celular (integrinas) y metaloproteinasas (MMP). Dichas MMP cumplen un rol esencial en la invasión tisular por neovasos en diferentes enfermedades corneales (inflamatorias, autoinmunes, infecciosas), por lo que la inhibición de las MMP por los inhibidores naturales (o TIMPs) y por drogas inhibitoras de MMP, resultaría en la inhibición de la neovascularización.

Uno de los casos en que puede aparecer neovascularización es, por ejemplo, cuando se produce la destrucción extensa de la superficie corneal, y en especial de las células madre pluripotenciales localizadas a nivel del limbo esclero-corneal,

lo que llevaría a la pérdida de la re-epitelización corneal normal y finalmente a una conjuntivalización o pannus corneal con una invasión por neovasos. Este proceso, en la actualidad, se define como Síndrome de Insuficiencia Límica (SIL).

5 Los hallazgos experimentales (*in vitro* e *in vivo*), que permiten una mejor comprensión de la biología molecular de la neovascularización y cicatrización, han ayudado a realizar nuevos tratamientos médicos con drogas que inhiben factores de crecimiento angiogénicos o MMP, así como con el uso de nuevos factores de crecimiento que inhiben la neovascularización ("Pigment Epithelium Derived Factor" o PEDF), y mediante tratamientos quirúrgicos tales como el trasplante de células limbares y membrana amniótica.

10 En lo que se refiere al estrés oxidativo, las especies de oxígeno reactivas (ROS), que producen efectos adversos a nivel celular, se generan por múltiples mecanismos endógenos, como por ejemplo, las reacciones inflamatorias o la isquemia; y exógenos, como por ejemplo, la exposición a la luz ultravioleta. A nivel ocular, cabe destacar por ejemplo el proceso inflamatorio de la unidad funcional lagrimal que se produce en el SOS, el cual tiene asociado un proceso oxidativo que tiene lugar en la superficie ocular.

15 En referencia a la película lagrimal, la capa lipídica está formada por ésteres de colesterol y fosfolípidos. Si tenemos en cuenta que la capa lipídica está en contacto directo con el aire y los procesos de oxidación que sufren los lípidos en presencia de moléculas radicalarias, la generación de ROS en el proceso oxidativo inflamatorio puede degradar los ácidos grasos, aumentando la evaporación de la capa acuosa de la película lagrimal. Esto se corrobora con el aumento de la concentración de peroxidasa lipídica en la superficie ocular.

20 Además de las ROS, existe también la formación de especies oxidantes relativas al nitrógeno. El óxido nítrico y las especies oxidantes relativas al nitrógeno pueden tener un papel muy importante en el SOS. La expresión de la óxido nítrico sintasa 2 y 3 (NOS2, NOS3) en el epitelio conjuntival está aumentada en el SOS respecto al epitelio conjuntival de ojos sanos, lo que agrava la sintomatología.

25 Este proceso oxidativo produce una elevada concentración, y por ello una elevada actividad, de mieloperoxidasa (MPO) y xantina oxidoreductasa/xantina oxidasa en el epitelio conjuntival, entre otras. Dichas enzimas generan especies radicalarias que podrían estar implicadas en los procesos oxidativos que ocurren en el SOS. Además, la concentración de las enzimas antioxidantes, encargadas de neutralizar las moléculas radicalarias, se encuentra disminuida en el ojo seco, lo que podría contribuir aun más al daño oxidativo producido en el proceso inflamatorio.

30 Por otro lado, los compuestos polifenólicos, dentro de los cuales se encuentran los polifenoles flavonoides y no flavonoides, son compuestos cuya característica principal es la presencia de grupos bencilo e hidroxilo en su estructura y cuyas propiedades antioxidantes han sido ampliamente estudiadas. Dentro de los compuestos polifenólicos flavonoides destaca la molécula quercetina (QCT), 3,3',4',5,7-pentahidroxi-2-fenilcromen-4-ona. Es el compuesto flavonoide más abundante, con muchos efectos potencialmente beneficiosos para la salud humana (Kelly GS, 2011, *Alternative Medicine Review*, 16(2):172-194). Del mismo modo, dentro de los compuestos polifenólicos no flavonoides, dentro de los cuales se encuentran los estilbenoides que son compuestos cuya característica principal es la presencia de grupos bencilo e hidroxilo en su estructura, cabe destacar una molécula cuya importancia ha aumentado en los últimos años debido también a sus múltiples cualidades, usos y beneficios para la salud (Frémon L., 2000, *Life Sciences*, 66(8): 663-673), la molécula resveratrol (RES), 5-[(E)-2-(4-hidroxifenil)etenil]benzen-1,3-diol. Ambos compuestos se pueden obtener sintéticamente pero se encuentran de forma natural en más de 70 especies de plantas, frutas y verduras.

45 En cuanto a su aplicación clínica, tanto los polifenoles en general como los derivados del estilbeno o estilbenoides en particular son moléculas utilizadas para diferentes tratamientos. En este sentido, algunos estudios indican que RES presenta varios beneficios para la salud, tales como la prevención de problemas cardiovasculares, oncológicos e inflamatorios (Das S., Das D. K., 2007, *Inflamm Allergy Drug Targets*, 6(3):168-173). Por estos motivos, se han descrito algunas composiciones oftálmicas que comprenden compuestos polifenólicos para el tratamiento de la inflamación ocular, como por ejemplo, la que se describe en US20060127505.

50 Sin embargo, debido a que un gran número de patologías y lesiones oculares cursan frecuentemente con procesos inflamatorios, estrés oxidativo y/o neovascularización ocular, continúa existiendo como objetivo en el campo de la oftalmología la identificación de compuestos y composiciones oftálmicas que permitan tratar y/o prevenir eficientemente dichos procesos patológicos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

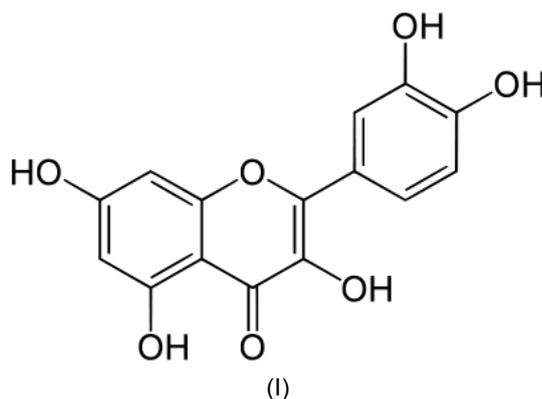
60 La presente invención propone el uso de la quercetina (QCT), o de cualquiera de sus sales o derivados, para el tratamiento y/o prevención de la inflamación, del estrés oxidativo y/o de la neovascularización ocular, preferiblemente del segmento anterior, más preferiblemente de la superficie ocular, y aun más preferiblemente del epitelio corneal. Además, la presente invención proporciona una composición, de ahora en adelante "composición de la invención", que

comprende QCT, o cualquiera de sus sales o derivados, y al menos otro compuesto polifenólico, o cualquiera de sus sales o derivados, preferiblemente resveratrol (RES), la cual también es de utilidad en dicha aplicación clínica.

5 La QCT, o cualquiera de sus sales o derivados, así como la composición de la invención, son por tanto útiles para el tratamiento y/o prevención de la inflamación, del estrés oxidativo y de la neovascularización ocular, preferiblemente del segmento anterior, más preferiblemente de la superficie ocular, y aun más preferiblemente del epitelio corneal. Como demuestran los ejemplos de la presente invención, tanto la QCT sola como dicha composición son capaces de reducir los niveles de, por ejemplo, aunque sin limitarnos, citoquinas, quimioquinas, ciclooxigenasa 2 (COX-2) y especies oxidativas en, por ejemplo, aunque sin limitarnos, células de epitelio corneal humano (HCE) estimuladas con TNF- α o irradiadas con luz ultravioleta. También son capaces de disminuir significativamente la cantidad de linfocitos CD4+ en conjuntiva en modelos animales de síndrome de ojo seco (SOS).

15 Por ello, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de la QCT, o de cualquiera de sus sales o derivados, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de la inflamación ocular, preferiblemente de la superficie ocular, más preferiblemente del epitelio corneal. Alternativamente, este aspecto de la invención se refiere a la QCT, o a cualquiera de sus sales o derivados, para su uso como medicamento en el tratamiento y/o prevención de la inflamación ocular, preferiblemente de la superficie ocular, más preferiblemente del epitelio corneal.

20 La "quercetina" o "QCT" o "3,3',4',5,7-pentahidroxi-2-fenilcromen-4-ona" es un compuesto polifenólico flavonoide y natural, que se encuentra en altas concentraciones en una gran variedad de especies vegetales y, por tanto, en alimentos tales como, por ejemplo aunque sin limitarnos, fruta, verduras, cereales, té o vino tinto; aunque también puede ser sintetizada químicamente. Su fórmula molecular es C₁₅H₁₀O₇ y su estructura química (I) es la que se indica a continuación:



25 Así, el medicamento que comprende QCT, o cualquiera de sus sales o derivados, es de utilidad para el tratamiento y/o prevención de enfermedades o lesiones que cursan con inflamación ocular.

30 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la QCT, o de cualquiera de sus sales o derivados, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención del estrés oxidativo ocular, preferiblemente de la superficie ocular, más preferiblemente del epitelio corneal. Alternativamente, este aspecto de la invención se refiere a la QCT, o a cualquiera de sus sales o derivados, para su uso como medicamento en el tratamiento y/o prevención del estrés oxidativo ocular, preferiblemente de la superficie ocular, más preferiblemente del epitelio corneal.

35 Así, el medicamento que comprende QCT, o cualquiera de sus sales o derivados, es de utilidad para el tratamiento y/o prevención de enfermedades o lesiones que cursan con estrés oxidativo ocular.

40 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la QCT, o de cualquiera de sus sales o derivados, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de la neovascularización ocular, preferiblemente del segmento anterior, más preferiblemente de la superficie ocular, aun más preferiblemente de la córnea. Alternativamente, este aspecto de la invención se refiere a la QCT, o a cualquiera de sus sales o derivados, para su uso como medicamento en el tratamiento y/o prevención de la neovascularización ocular, preferiblemente del segmento anterior, más preferiblemente de la superficie ocular, aun más preferiblemente de la córnea.

45 Así, el medicamento que comprende QCT, o cualquiera de sus sales o derivados, es de utilidad para el tratamiento y/o prevención de enfermedades o lesiones que cursan con neovascularización ocular.

50 En otra realización preferida, el medicamento que comprende QCT, o cualquiera de sus sales o derivados, es para el tratamiento y/o prevención de síndrome de ojo seco (SOS), blefaritis, disfunción de las glándulas de Meibomio, meibomitis, procesos alérgicos oculares, distrofias corneales, conjuntivitis, alteración de la superficie ocular por el uso

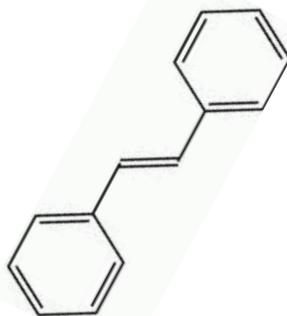
de lentes de contacto, enfermedades autoinmunes que afecten al segmento anterior del ojo, postcirugía del segmento anterior, quemaduras (tanto químicas o “causticaciones” como térmicas) o lesiones o patologías oculares producidas por radiación ultravioleta. Más preferiblemente, el medicamento que comprende QCT, o cualquiera de sus sales o derivados, es para el tratamiento y/o prevención de SOS.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la QCT, o de cualquiera de sus sales o derivados, como agente antimicrobiano, antioxidante y antiinflamatorio en soluciones de limpieza y mantenimiento de lentes de contacto. Otro aspecto de la invención se refiere a una solución para la limpieza y mantenimiento de lentes de contacto que comprende QCT o cualquiera de sus sales o derivados.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a una composición, “composición de la invención”, que comprende QCT, o cualquiera de sus sales o derivados, y al menos otro compuesto polifenólico, o cualquiera de sus sales o derivados.

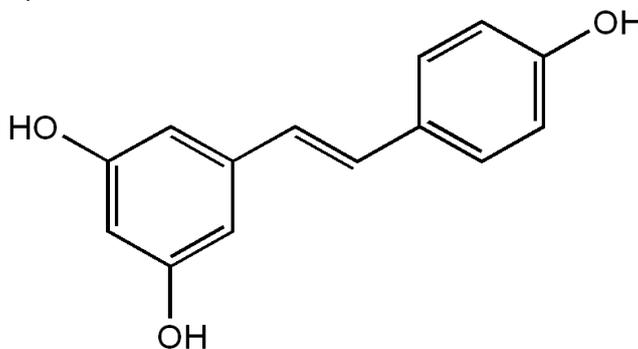
El término “otro compuesto polifenólico” empleado en la presente invención, hace referencia a un metabolito secundario biosintetizado por, aunque sin limitarnos, organismos del reino vegetal que se puede encontrar en, por ejemplo, alimentos derivados de fuentes vegetales, pero que también se puede obtener sintéticamente, y que posee más de un grupo fenol. Los polifenoles son un grupo de moléculas cuya característica principal es la presencia de grupos bencilo e hidroxilo en su estructura. Estos polifenoles se pueden clasificar de forma general como: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos. A su vez, los compuestos flavonoides se pueden subclasificar como chalconas, flavonoles, flavonas, flavanonas, antocianidinas e isoflavonoides. El otro compuesto polifenólico de la composición de la invención puede ser, aunque sin limitarnos, cualquier compuesto polifenólico dentro de las cuatro familias. Por ello, en una realización preferida, el otro compuesto polifenólico comprendido en la composición de la invención es un estilbenoide, más preferiblemente el RES, o cualquiera de sus sales o derivados.

Un “compuesto estilbenoide” es cualquier compuesto cuya estructura principal sea la molécula de estilbeno (II), tales como por ejemplo, aunque sin limitarnos, resveratrol, piceid piceatanol, oxiresveratrol, rhapontigenin o pterostilbeno.



(II)

El “resveratrol”, “RES” ó “5-[(E)-2-(4-hidroxifenil)etenil]benzen-1,3-diol” se encuentra en una gran variedad de plantas, aunque también puede ser sintetizado químicamente. Su número CAS es 501-36-0, su fórmula molecular es $C_{14}H_{12}O_3$ y su estructura química (III) es la que se indica a continuación:



(III)

Tal como aquí se utiliza, el término “derivado” incluye a compuestos farmacéuticamente aceptables, es decir, derivados de la QCT o del otro compuesto polifenólico comprendido en la composición de la invención, preferiblemente RES, que

pueden ser utilizados en la elaboración de la composición de la invención, y a derivados farmacéuticamente no aceptables, ya que éstos pueden ser útiles en la preparación de derivados farmacéuticamente aceptables.

5 En una realización más preferida, la composición de la invención además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, dicha composición puede comprender uno o más excipientes.

10 El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de los elementos de la composición de la invención, estabiliza dichos elementos, activa o ayuda a la preparación de la composición en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que la hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos, como por ejemplo es el caso de almidones, azúcares o celulosas, la función de endulzar, la función de colorante, la función de protección de la composición, como por ejemplo, para aislarla del aire y/o la humedad, la función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación, la función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

15 El "vehículo farmacéuticamente aceptable", al igual que el excipiente, es una sustancia que se emplea en la composición para diluir cualquiera de los componentes comprendidos en ella hasta un volumen o peso determinado. El vehículo farmacéuticamente aceptable es una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los elementos comprendidos en la composición de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros elementos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición.

20 Preferiblemente, la composición de la invención comprende QCT, o cualquiera de sus sales o derivados, y al menos otro compuesto polifenólico, o cualquiera de sus sales o derivados, preferiblemente RES, en una cantidad terapéuticamente efectiva, entendiéndose por "cantidad terapéuticamente efectiva" el nivel, cantidad o concentración de QCT, o de cualquiera de sus sales o derivados, y de al menos otro compuesto polifenólico, o de cualquiera de sus sales o derivados, preferiblemente de RES, que produzca el efecto deseado tratando y/o previniendo la inflamación, el estrés oxidativo y/o la neovascularización ocular, sin causar efectos adversos. La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo o tolerancia del individuo al que le va a ser administrada la composición de la invención.

25 La composición de la presente invención puede formularse para su administración en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Como ejemplos de preparaciones se incluye cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (soluciones, suspensiones o emulsiones) para administración oral, tópica o parenteral. La composición de la presente invención también puede estar en forma de formulaciones de liberación sostenida de drogas o de cualquier otro sistema convencional de liberación, así puede estar contenida, aunque sin limitarnos, en nanopartículas, liposomas o nanosferas, en un material polimérico, en un implante biodegradable o no biodegradable o en micropartículas biodegradables, como por ejemplo, microesferas biodegradables.

30 Tal composición y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, intraespinal, intraestromal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intramuscular, intranasal, intracraneal, subcutánea, intraorbital, intracapsular, tópica, mediante parches transdérmicos, percutánea, espray nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna o bomba de infusión.

35 En una realización aun más preferida, la composición de la invención se encuentra formulada para su administración oftálmica. La expresión "formulada para su administración oftálmica" se refiere a una formulación que permita que la composición de la invención pueda ser administrada ocularmente, por ejemplo aunque sin limitarnos, de manera tópica o de manera intraocular, sin que dicha administración afecte negativamente a las propiedades, por ejemplo ópticas y/o fisiológicas, del ojo. Ejemplos de la composición de la invención formulada para su administración oftálmica son, aunque sin limitarnos, dicha composición asociada a agua, a sales, a un vehículo líquido polimérico o semi-sólido, a un tampón fosfato o a cualquier otro vehículo líquido oftálmicamente aceptable de los conocidos en el estado de la técnica.

40 Como se ha explicado anteriormente, la composición de la invención es capaz de reducir los niveles de, por ejemplo, aunque sin limitarnos, citoquinas, quimioquinas y COX-2, factores implicados en el proceso inflamatorio, en células oculares que presentan un fenotipo inflamado, así como de especies oxidativas en células oculares que han sido inducidas a sufrir estrés oxidativo. Por ello, la composición de la invención es útil para el tratamiento y/o prevención de la inflamación, del estrés oxidativo y de la neovascularización ocular, preferiblemente del segmento anterior, más preferiblemente de la superficie ocular, y aun más preferiblemente del epitelio corneal.

45 Así, otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención para la elaboración de un medicamento o, alternativamente, a la composición de la invención para su uso como medicamento, de ahora en adelante, "medicamento de la invención".

Los “medicamentos” a los que se refiere la presente invención pueden ser de uso humano o veterinario. El “medicamento de uso humano” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico. El “medicamento de uso veterinario” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de la inflamación ocular.

Se entiende por “inflamación ocular” la inflamación producida en cualquier estructura ocular, incluidas todas las estructuras del segmento anterior, del segmento posterior del ojo y los anejos oculares, por ejemplo, aunque sin limitarnos, en el nervio óptico, párpados, glándula lagrimal principal, conducto hialoideo, retina, coroides, esclera, musculatura ocular o en cualquier estructura que forme parte del segmento anterior, incluyendo la superficie ocular. Se entiende por “segmento anterior” cualquier estructura seleccionada de la lista que comprende: conjuntiva, cornea, limbo esclerocorneal, iris, pupila, cristalino, zónula de Zinn, cuerpo ciliar, cámara anterior, humor acuoso, cámara posterior, glándulas de Meibomio, glándulas mucosas o aparato lagrimal (glándulas lagrimales, a excepción de la glándula lagrimal principal, conducto nasolagrimal y saco lagrimal). La inflamación ocular cursa con síntomas tales como por ejemplo, aunque sin limitarnos, dolor, enrojecimiento e hinchazón del tejido afectado, así como con la sobreexpresión de factores implicados en el proceso inflamatorio tales como, por ejemplo aunque sin limitarnos, IL-6, IL-8, IP-10, VEGF, TNF- α , COX-1 o COX-2.

En una realización más preferida, el medicamento de la invención es para el tratamiento y/o prevención de la inflamación del segmento anterior y/o de la glándula lagrimal principal y/o párpados. En una realización aun más preferida, el medicamento de la invención es para el tratamiento y/o prevención de la inflamación de la superficie ocular. Se entiende por “superficie ocular” cualquier estructura seleccionada de la lista que comprende: epitelios de la córnea, limbo esclero-corneal o conjuntiva, película lagrimal suprayacente o estroma subyacente a estas estructuras. En una realización aun más preferida, el medicamento de la invención es para el tratamiento y/o prevención de la inflamación del epitelio corneal.

La inflamación ocular está asociada a una diversidad de enfermedades y lesiones oculares, tales como por ejemplo, aunque sin limitarnos, Síndrome de Insuficiencia Límica (SIL), SOS, blefaritis, disfunción de las glándulas de Meibomio, meibomitis, procesos alérgicos oculares, conjuntivitis, alteración de la superficie ocular, preferiblemente del epitelio corneal, provocada por el uso de lentes de contacto y de sus sistemas de limpieza y mantenimiento, enfermedades autoinmunes, preferiblemente que afectan al segmento anterior del ojo, como por ejemplo aunque sin limitarnos, síndrome de Sjögren, postcirugía, preferiblemente del segmento anterior del ojo, quemaduras (tanto químicas o causticaciones, como térmicas) o lesiones o patologías oculares producidas por radiación ultravioleta. Por ello, el medicamento de la invención es de utilidad para el tratamiento y/o prevención de enfermedades o lesiones que cursan con inflamación ocular, preferiblemente, de las indicadas en este párrafo.

En otra realización preferida, el medicamento de la invención es para el tratamiento y/o prevención del estrés oxidativo ocular.

Se entiende por “estrés oxidativo ocular” la condición de citotoxicidad que es consecuencia de un desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad de la célula de defenderse contra ellos, por lo que está causada por un incremento en la formación de dichos radicales libres o por una disminución de los agentes que actúan como antioxidantes, o por ambos motivos conjuntamente. El estrés oxidativo ocular puede producirse en cualquier estructura ocular, incluidas todas las estructuras del segmento anterior, del segmento posterior del ojo y los anejos oculares, por ejemplo, aunque sin limitarnos, en el nervio óptico, glándula lagrimal principal, conducto hialoideo, retina, coroides, esclera, musculatura ocular o en cualquier estructura que forme parte del segmento anterior, incluyendo la superficie ocular. En una realización más preferida, el medicamento de la invención es para el tratamiento y/o prevención del estrés oxidativo del segmento anterior. En una realización aun más preferida, el medicamento de la invención es para el tratamiento y/o prevención del estrés oxidativo de la superficie ocular. En una realización aun más preferida, el medicamento de la invención es para el tratamiento y/o prevención del estrés oxidativo del epitelio corneal.

El estrés oxidativo ocular está asociado a una diversidad de lesiones y enfermedades oculares, tales como por ejemplo, aunque sin limitarnos, pterigium, cataratas, distrofias corneales, glaucoma, retinopatía diabética, degeneración macular, SOS, SIL, blefaritis, disfunción de las glándulas de Meibomio, meibomitis, procesos alérgicos oculares, conjuntivitis, alteración de la superficie ocular, preferiblemente del epitelio corneal, provocada por el uso de lentes de contacto y de sus sistemas de limpieza y mantenimiento, enfermedades autoinmunes, preferiblemente que afectan al segmento anterior del ojo, como por ejemplo aunque sin limitarnos, síndrome de Sjögren, postcirugía, preferiblemente del

5 segmento anterior del ojo, quemaduras (tanto químicas o causticaciones, como térmicas) o lesiones o patologías oculares producidas por radiación ultravioleta o por cualquier otro factor endógeno, como por ejemplo aunque sin limitarnos, reacciones inflamatorias, o exógeno, como por ejemplo aunque sin limitarnos, humo del tabaco o contaminantes ambientales, capaz de inducir formación de especies radicalarias. Por ello, el medicamento de la invención es de utilidad para el tratamiento y/o prevención de enfermedades o lesiones que cursan con estrés oxidativo ocular, preferiblemente, de las indicadas en este párrafo.

En otra realización preferida, el medicamento de la invención es para el tratamiento y/o prevención de la neovascularización ocular.

10 Se entiende por "neovascularización ocular" la formación de nuevos vasos sanguíneos en las estructuras oculares, por ejemplo aunque sin limitarnos, en la retina, papila óptica, coroides o en cualquier estructura que forme parte del segmento anterior, incluyendo la superficie ocular, preferiblemente en córnea, conjuntiva, limbo esclerocorneal o iris. En una realización más preferida, el medicamento de la invención es para el tratamiento y/o prevención de la neovascularización del segmento anterior. En una realización aun más preferida, el medicamento de la invención es para el tratamiento y/o prevención de la neovascularización de la superficie ocular. En una realización aun más preferida, el medicamento de la invención es para el tratamiento y/o prevención de la neovascularización de la córnea.

20 La neovascularización ocular está asociada a una diversidad de lesiones y enfermedades oculares, tales como por ejemplo, aunque sin limitarnos, conjuntivitis, alteración de la superficie ocular, preferiblemente del epitelio corneal, provocada por el uso de lentes de contacto y de sus sistemas de limpieza y mantenimiento, enfermedades autoinmunes (como síndrome de Stevens-Johnson, Lyell, penfigoide de las membranas mucosas, etc.), preferiblemente que afectan al segmento anterior, postcirugía, preferiblemente del segmento anterior, quemaduras (tanto químicas o causticaciones, como térmicas) o lesiones o patologías oculares producidas por radiación ultravioleta. Por ello, el medicamento de la invención es de utilidad para el tratamiento y/o prevención de enfermedades o lesiones que cursan con neovascularización ocular, preferiblemente, de las indicadas en este párrafo.

30 En una realización aun más preferida, el medicamento de la invención es para el tratamiento y/o prevención de SOS, blefaritis, disfunción de las glándulas de Meibomio, meibomitis, procesos alérgicos oculares, distrofias corneales, conjuntivitis, alteración de la superficie ocular por el uso de lentes de contacto, enfermedades autoinmunes que afectan al segmento anterior del ojo, postcirugía del segmento anterior, quemaduras (tanto químicas o "causticaciones" como térmicas) o lesiones o patologías oculares producidas por radiación ultravioleta. Aun más preferiblemente, el medicamento de la invención es para el tratamiento y/o prevención de SOS (queratoconjuntivitis seca, queratitis seca o xeroftalmia), el cual se ha definido como una enfermedad multifactorial de la superficie ocular, incluyendo la película lagrimal, que causa síntomas de incomodidad, perturbación visual e inestabilidad lagrimal, con un daño potencial a la superficie ocular, acompañado de un aumento de la osmolaridad de la película lagrimal e inflamación de la superficie ocular. Dicho síndrome se puede diagnosticar por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante un examen con lámpara de hendidura de la película lagrimal, durante el cual se puede colocar un colorante en el ojo, como la fluoresceína, para hacer que dicha película sea más visible y así poder evaluar su estabilidad, o bien mediante la prueba del test de Schirmer, la cual mide la tasa de producción de lágrimas usando una tira de papel de filtro que se coloca en el extremo del párpado y mide la cantidad de lágrima que produce el ojo.

45 Por otro lado, la limpieza y mantenimiento de las lentes de contacto es fundamental para evitar posibles patologías oculares derivadas de su uso. Los sistemas de limpieza y mantenimiento deben cumplir una serie de requisitos como son no alterar ni irritar los tejidos oculares, no alterar ni interferir en la fisiología normal del ojo, no alterar ni dañar las lentes de contacto, evitar la contaminación por microorganismos de las lentes de contacto y mantener éstas lo más limpias posible. Tanto la QCT sola como la composición de la invención cumplen todos estos requisitos, y además presentan las características que debe cumplir un agente desinfectante de este tipo: pH y tonicidad similares a la lágrima, bacteriostático y/o bactericida, soluble en agua y estable en solución acuosa y en frascos de plástico.

50 Por todo ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención como agente antimicrobiano, antioxidante y antiinflamatorio en soluciones de limpieza y mantenimiento de lentes de contacto. Otro aspecto de la invención se refiere a una solución para la limpieza y mantenimiento de lentes de contacto que comprende la composición de la invención.

55 Un "agente antimicrobiano" es aquel compuesto químico, o mezcla de compuestos, que inhibe el crecimiento o mata a los microorganismos. El agente antimicrobiano, tal y como se entiende en la presente invención, puede ser, aunque sin limitarnos, antibacteriano (dirigido contra bacterias), antifúngico (dirigido contra hongos) o antivírico (dirigido contra virus) y puede ser estático, que inhibe el crecimiento del microorganismo sin llegar a provocar su muerte, por ejemplo, bacteriostático o fungistático, o puede destruir a los microorganismos, por ejemplo, bactericida o fungicida.

60 Dentro de las "soluciones de limpieza y mantenimiento de lentes de contacto" se incluyen, aunque sin limitarnos, las soluciones limpiadoras, las soluciones conservadoras o humectantes, cuya función es guardar y almacenar las lentes de contacto cuando no están en uso, las soluciones acondicionadoras, los sistemas de peróxidos y los sistemas de

solución única, que realizan una limpieza mecánica y desinfectante y a su vez actúan como conservantes y humectantes de las lentes.

5 Tal y como se utiliza en la presente invención, el término "lentes de contacto" se refiere tanto a las lentes de contacto duras, incluyendo las rígidas y las gas permeable o semirrígidas, como a las blandas o hidrofílicas.

10 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos o componentes. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15 **Fig. 1. Muestra la cantidad de IL-6 producida en células de epitelio corneal humano (HCE) estimuladas con 25 ng/mL de TNF- α y tratadas con vehículo (0,5% de etanol (EtOH)), 50 μ M de resveratrol (RES), 25 μ M de quercetina (QCT), 25 μ M de RES + 25 μ M de QCT o 50 μ M de RES + 25 μ M de QCT, durante 24 horas. NOTA: las células fueron tratadas previamente a su estimulación durante 2 horas con el tratamiento correspondiente. Control: células de HCE no estimuladas con TNF- α y tratadas con vehículo. *: p<0,05.**

20 **Fig. 2. Muestra la cantidad de IL-8 producida en células de epitelio corneal humano (HCE) estimuladas con 25 ng/mL de TNF- α y tratadas con vehículo (0,5% de etanol (EtOH)), 50 μ M de resveratrol (RES), 25 μ M de quercetina (QCT), 25 μ M de RES + 25 μ M de QCT o 50 μ M de RES + 25 μ M de QCT, durante 24 horas. NOTA: las células fueron tratadas previamente a su estimulación durante 2 horas con el tratamiento correspondiente. Control: células de HCE no estimuladas con TNF- α y tratadas con vehículo. *: p<0,05.**

25 **Fig. 3. Muestra la cantidad de IP-10 producida en células de epitelio corneal humano (HCE) estimuladas con 25 ng/mL de TNF- α y tratadas con vehículo (0,5% de etanol (EtOH)), 50 μ M de resveratrol (RES), 25 μ M de quercetina (QCT), 25 μ M de RES + 25 μ M de QCT o 50 μ M de RES + 25 μ M de QCT, durante 24 horas. NOTA: las células fueron tratadas previamente a su estimulación durante 2 horas con el tratamiento correspondiente. Control: células de HCE no estimuladas con TNF- α y tratadas con vehículo. *: p<0,05.**

30 **Fig. 4. Muestra la cantidad de VEGF producida en células de epitelio corneal humano (HCE) estimuladas con 25 ng/mL de TNF- α y tratadas con vehículo (0,5% de etanol (EtOH)), 50 μ M de resveratrol (RES), 25 μ M de quercetina (QCT), 25 μ M de RES + 25 μ M de QCT o 50 μ M de RES + 25 μ M de QCT, durante 24 horas. NOTA: las células fueron tratadas previamente a su estimulación durante 2 horas con el tratamiento correspondiente. Control: células de HCE no estimuladas con TNF- α y tratadas con vehículo. *: p<0,05.**

35 **Fig. 5. Muestra la cantidad de ciclooxigenasa 2 (COX-2), en unidades normalizadas, producida en células de epitelio corneal humano (HCE) estimuladas con 25 ng/mL de TNF- α y tratadas con vehículo (0,5% de etanol (EtOH)), 50 μ M de resveratrol (RES), 25 μ M de quercetina (QCT), 25 μ M de RES + 25 μ M de QCT o 50 μ M de RES + 25 μ M de QCT, durante 24 horas. NOTA: las células fueron tratadas previamente a su estimulación durante 2 horas con el tratamiento correspondiente. Control: células de HCE no estimuladas con TNF- α y tratadas con vehículo. *: p<0,05.**

40 **Fig. 6. Muestra la cantidad de fluorescencia en unidades normalizadas a la cantidad total de proteína de la sonda H2DCF-DA oxidada, como medida de la generación intracelular de especies relativas de oxígeno, en células de epitelio corneal humano (HCE) expuestas a radiación UVB y tratadas con vehículo (0,5% de etanol (EtOH)), 50 μ M de resveratrol (RES), 25 μ M de quercetina (QCT), 25 μ M de RES + 25 μ M de QCT o 50 μ M de RES + 25 μ M de QCT, durante una hora. NOTA: las células fueron tratadas previamente a su estimulación durante 1 hora con el tratamiento correspondiente. Control: células de HCE no irradiadas con UVB y tratadas con vehículo. *: p<0,05.**

45 **Fig. 7. Muestra el promedio de células T CD4 + en la conjuntiva de ratones C57BL/6 en un modelo de SOS en ratón (Dursun *et al.*, 2002, *Invest Ophthalmol Vis Sci.*; 43(3):632-638) y tratados con vehículo, 0,01% resveratrol (RES), 0,01% quercetina (QCT) y 0,01% QCT + 0,01% RES. Control: ratones no expuestos a ojo seco inducido (OSI) y no tratados tópicamente. Sin tratamiento: ratones expuestos a OSI y no tratados tópicamente. *: p<0,05.**

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

60 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad de la composición de la invención, así como de la quercetina (QCT) y del resveratrol (RES) individualmente, en la prevención y/o tratamiento de la inflamación, del estrés oxidativo y de la neovascularización ocular. Estos ejemplos específicos que se proporcionan sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se

incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

5 **EJEMPLO 1. Efecto antiinflamatorio de la quercetina (QCT), del resveratrol (RES) y de su mezcla sobre una línea celular de epitelio corneal humano estimulada con TNF- α .**

Cultivo celular

10 Para todos los experimentos se utilizó una línea celular (HCE) derivada de epitelio corneal humano. Las células fueron cultivadas en medio DMEM/F12 suplementado con 15% de suero fetal bovino (FBS), 0,5% de DMSO, 0,1 mg/mL de toxina colérica, 10 ng/mL de EGF, 5 mg/mL de insulina obtenida de páncreas bovino y antibióticos (100 U/mL de penicilina y 0,1 mg/mL de estreptomina). Para la realización de los experimentos, se reemplazó el medio de cultivo por medio DMEM libre de NaHCO₃, rojo fenol y piruvato.

15 RES, QCT y su mezcla se disolvieron en etanol (EtOH). Las disoluciones stock fueron preparadas para tener una concentración constante de vehículo en todos los pocillos.

Estimulación celular con TNF- α

20 Las células se plantaron en placas de cultivo de 24 pocillos y se dejaron crecer hasta preconfluencia. Posteriormente, se pretrataron con 50 μ M de RES, 25 μ M de QCT, 25 μ M de RES + 25 μ M de QCT o 50 μ M de RES + 25 μ M de QCT, durante 2 horas. Pasado este tiempo, se eliminaron los sobrenadantes y se estimularon las células durante 24 horas con 25 ng/mL de TNF- α en presencia de RES, QCT o QCT+RES (se volvieron a añadir). Como controles se utilizaron
25 células no estimuladas con TNF- α y células estimuladas y tratadas ambas solo con vehículo. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los sobrenadantes se recogieron, se centrifugaron y se congelaron a -80 °C para su posterior análisis. Las células adheridas a las placas de cultivo también se congelaron a -80 °C para su posterior análisis.

Determinación de la producción de citoquinas y quimioquinas

30 Se llevó a cabo el análisis de la producción de las citoquinas IL-6 y VEGF y de las quimioquinas IL-8 e IP-10 en los sobrenadantes recogidos tras la estimulación con TNF- α . Este análisis se llevó a cabo mediante tecnología X-MAP en un Luminex IS-100 con un ensayo multianálisis comercial (Milliplex, Millipore), siguiendo las indicaciones del fabricante. Los valores de producción, en pg/mL, de citoquinas/quimioquinas (obtenidos tras la interpolación de los valores de
35 fluorescencia en curvas estándares generadas en el ensayo) se normalizaron posteriormente respecto a la cantidad de proteína total correspondiente en cada muestra, determinada mediante un ensayo de BCA comercial (Pierce, USA) en las células adheridas al pocillo.

Determinación de la producción de ciclooxigenasa 2 (COX-2)

40 Para este ensayo se utilizó un ensayo comercial "Cell-based ELISA" (R&D, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. En este ensayo, se determinan simultáneamente las cantidades de COX-2 y de GAPDH de cada pocillo. Las células se plantaron en la placa del ensayo y se trataron y estimularon de la misma manera que se describió anteriormente. Finalizado el tiempo de incubación, se midieron los valores de fluorescencia correspondientes a la
45 cantidad de COX-2 y de GAPDH en un espectrofotómetro (SpectraMAX M5, Molecular Devices, Inc. USA). Los valores de COX-2 en cada pocillo se normalizaron a la cantidad de GAPDH correspondiente.

Resultados de la producción de citoquinas y quimioquinas

50 La figura 1 muestra la cantidad de IL-6 estimulada con TNF- α y su variación respecto a los tratamientos con QCT, RES y QCT+RES. Se puede ver cómo la estimulación de las células HCE con TNF- α aumentó significativamente la producción de IL-6 ($p < 0,05$). QCT, RES y QCT+RES disminuyeron drásticamente los valores de IL-6 ($p < 0,05$). Los compuestos estudiados y su vehículo, en las concentraciones testadas, no fueron citotóxicos.

55 La figura 2 muestra la cantidad de IL-8 estimulada con TNF- α y su variación respecto a los tratamientos con QCT, RES y QCT+RES. La estimulación de las células HCE con TNF- α aumentó significativamente la producción de IL-8 ($p < 0,05$). QCT, RES y QCT+RES disminuyeron significativamente los valores de IL-8 ($p < 0,05$).

60 La figura 3 muestra la cantidad de IP-10 estimulada con TNF- α y su variación respecto a los tratamientos con QCT, RES y QCT+RES. La estimulación de las células HCE con TNF- α aumentó significativamente la producción de IP-10 ($p < 0,05$). QCT, RES y QCT+RES disminuyeron significativamente los valores de IP-10 hasta niveles basales ($p < 0,05$).

La figura 4 muestra la cantidad de VEGF estimulada con TNF- α y su variación respecto a los tratamientos con QCT, RES y QCT+RES. La estimulación de las células HCE con TNF- α aumentó significativamente la producción de VEGF ($p < 0,05$). QCT, RES y QCT+RES disminuyeron significativamente los valores de VEGF hasta niveles basales ($p < 0,05$).

Resultados de la producción de COX-2

5 La figura 5 muestra la cantidad total de COX-2 (normalizada con GAPDH) estimulada con TNF- α y su variación respecto a los tratamientos con QCT, RES y QCT+RES. La estimulación de las células HCE con TNF- α aumentó significativamente la producción de COX-2 ($p < 0,05$). QCT, RES y QCT+RES disminuyeron significativamente la cantidad de COX-2 estimulada por TNF- α ($p < 0,05$).

10 **EJEMPLO 2. Efecto antioxidante del resveratrol (RES), de la quercetina (QCT) y de su mezcla sobre una línea celular de epitelio corneal humano estimulada con radiación ultravioleta.**

Cultivo celular

15 Como en el ejemplo anterior, se utilizó la línea celular HCE derivada de epitelio corneal humano. Las células fueron cultivadas en medio DMEM/F12 suplementado con 15% de suero fetal bovino (FBS), 0,5% de DMSO, 0,1 mg/mL de toxina colérica, 10 ng/mL de EGF, 5 mg/mL de insulina obtenida de páncreas bovino y antibióticos (100 U/mL de penicilina y 0,1 mg/mL de estreptomina). Para la realización de los experimentos, se reemplazó el medio de cultivo por medio DMEM libre de NaHCO₃, rojo fenol y piruvato.

20 QCT, RES y su mezcla se disolvieron en etanol (EtOH). Las disoluciones stock fueron preparadas para tener una concentración constante de vehículo en todos los pocillos.

Estrés oxidativo intracelular provocado por estimulación con luz ultravioleta

25 Las células se plantaron en placas de cultivo de 24 pocillos y se dejaron crecer hasta preconfluencia. Posteriormente, se pretrataron con 50 μ M de RES, 25 μ M de QCT, 25 μ M de RES + 25 μ M de QCT o 50 μ M de RES + 25 μ M de QCT, durante 1 hora. Seguidamente, se cargaron las células con 1 μ M de diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H2DCF-DA) durante 30 minutos. A continuación, se trataron las células con QCT, RES o QCT+RES, se expusieron a luz UVB (302 nm; 107 mJ/cm²) y se dejaron en incubación a 37 °C durante 1 hora. Como controles se utilizaron células
30 no irradiadas y células irradiadas, y tratadas ambas solo con vehículo. Finalmente, se leyó la fluorescencia a 522 nm. Los valores de fluorescencia se normalizaron respecto a la cantidad de proteína total en cada muestra, determinada mediante un ensayo de BCA comercial (Pierce, USA) en las células adheridas al pocillo.

Resultados del estrés oxidativo provocado por radiación UVB

35 La figura 6 muestra la cantidad de fluorescencia relativa producida por la exposición a la radiación UVB y su variación respecto a los tratamientos con QCT, RES y QCT+RES. La estimulación de las células HCE con radiación UVB produjo un aumento significativo de especies oxidativas ($p < 0,05$). QCT, RES y QCT+RES actuaron como antioxidantes disminuyendo los niveles de especies oxidativas generadas por la exposición a la radiación UVB, disminución que en el
40 caso de la QCT y de la QCT+RES fue significativa ($p < 0,05$).

EJEMPLO 3. Efecto antiinflamatorio de la quercetina (QCT), del resveratrol (RES) y de su mezcla, administrados en forma tópica, en un modelo animal de ojo seco.

Modelo animal de ojo seco

45 El ojo seco inducido (OSI) se provocó en ratones C57BL/6 mediante la inyección subcutánea de 200 μ L de escopolamina (5mg/mL) tres veces al día durante 10 días, y la exposición a un flujo de aire constante durante 24 horas. La humedad en la sala se mantuvo entre el 30% y 35%, a una temperatura constante de 25 °C (Dursun et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43(3):632-8).

Ratones y tratamientos tópicos

Los ratones C57BL/6 se dividieron en 6 grupos de acuerdo con el tratamiento seguido:

- 55 a) Grupo control: ratones no expuestos a OSI y no tratados tópicamente.
b) Grupo OSI: ratones expuestos a OSI y no tratados tópicamente.
c) Grupo OSI+vehículo: ratones expuestos a OSI y tratados tópicamente con el vehículo.
d) Grupo OSI+RES: ratones expuestos a OSI y tratados tópicamente con 0,01% RES.
e) Grupo OSI+QCT: ratones expuestos a OSI y tratados tópicamente con 0,01% QCT.
60 f) Grupo OSI+QCT+RES: ratones expuestos a OSI y tratados tópicamente con 0,01% QCT + 0,01% RES.

Los tratamientos tópicos comenzaron 1 día antes de inducir el ojo seco, instilando en ambos ojos 5 μ L del tratamiento correspondiente para cada grupo tres veces al día.

Determinación de linfocitos T CD4+ en conjuntiva

5 Los ojos embebidos en OCT se seccionaron en un criostato. Las muestras se fijaron con acetona fría a -20 °C. Posteriormente, se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno. Después, se bloquearon las uniones no específicas con suero y se incubaron las muestras con el anticuerpo primario a temperatura ambiente. Consecutivamente, se utilizó un anticuerpo secundario biotinilado seguido de reactivo ABC. Finalmente, se utilizó el cromógeno vector NovaRed para colorear el marcaje de la IMQ, seguido de contratinción nuclear con hematoxilina. Se examinaron tres secciones de cada ratón al microscopio óptico y los resultados se expresaron como el promedio de células T CD4+ en conjuntiva.

10

Resultados de las propiedades antiinflamatorias de QCT, RES y su mezcla en un modelo animal de ojo seco

15 La figura 7 muestra el promedio de linfocitos T CD4+ en conjuntiva respecto a los tratamientos tópicos con vehículo, QCT, RES y QCT+RES. El modelo de ojo seco produjo un aumento en la cantidad de células CD4+ en conjuntiva respecto al grupo control ($p < 0,05$). RES mostró una disminución no significativa ($p > 0,05$) de linfocitos CD4+, comparada con el grupo OSI+vehículo. QCT y QCT+RES disminuyeron significativamente la cantidad de células CD4+ en conjuntiva producida por OSI en ratones, comparado con el grupo OSI+vehículo ($p < 0,05$).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende quercetina, o cualquiera de sus sales o derivados, y al menos otro compuesto estilbenoide, o cualquiera de sus sales o derivados.
2. Composición según la reivindicación 1 donde el otro compuesto estilbenoide es resveratrol, o cualquiera de sus sales o derivados.
- 10 3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
4. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la elaboración de un medicamento.
- 15 5. Uso de la composición según la reivindicación 4 donde el medicamento está formulado para su administración oftálmica.
6. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5 donde el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de la inflamación ocular.
- 20 7. Uso de la composición según la reivindicación 6 donde el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de la inflamación del segmento anterior y/o de la glándula lagrimal principal.
8. Uso de la composición según la reivindicación 7 donde el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de la inflamación de la superficie ocular.
- 25 9. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5 donde el medicamento es para el tratamiento y/o prevención del estrés oxidativo ocular.
- 30 10. Uso de la composición según la reivindicación 9 donde el medicamento es para el tratamiento y/o prevención del estrés oxidativo del segmento anterior.
11. Uso de la composición según la reivindicación 10 donde el medicamento es para el tratamiento y/o prevención del estrés oxidativo de la superficie ocular.
- 35 12. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5 donde el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de la neovascularización ocular.
13. Uso de la composición según la reivindicación 12 donde el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de la neovascularización del segmento anterior.
- 40 14. Uso de la composición según la reivindicación 13 donde el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de la neovascularización de la córnea.
- 45 15. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 14 donde el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de síndrome de ojo seco, blefaritis, disfunción de las glándulas de Meibomio, meibomitis, procesos alérgicos oculares, distrofias corneales, conjuntivitis, alteración de la superficie ocular por el uso de lentes de contacto, enfermedades autoinmunes que afecten al segmento anterior del ojo, postcirugía del segmento anterior, quemaduras o lesiones o patologías oculares producidas por radiación ultravioleta.
- 50

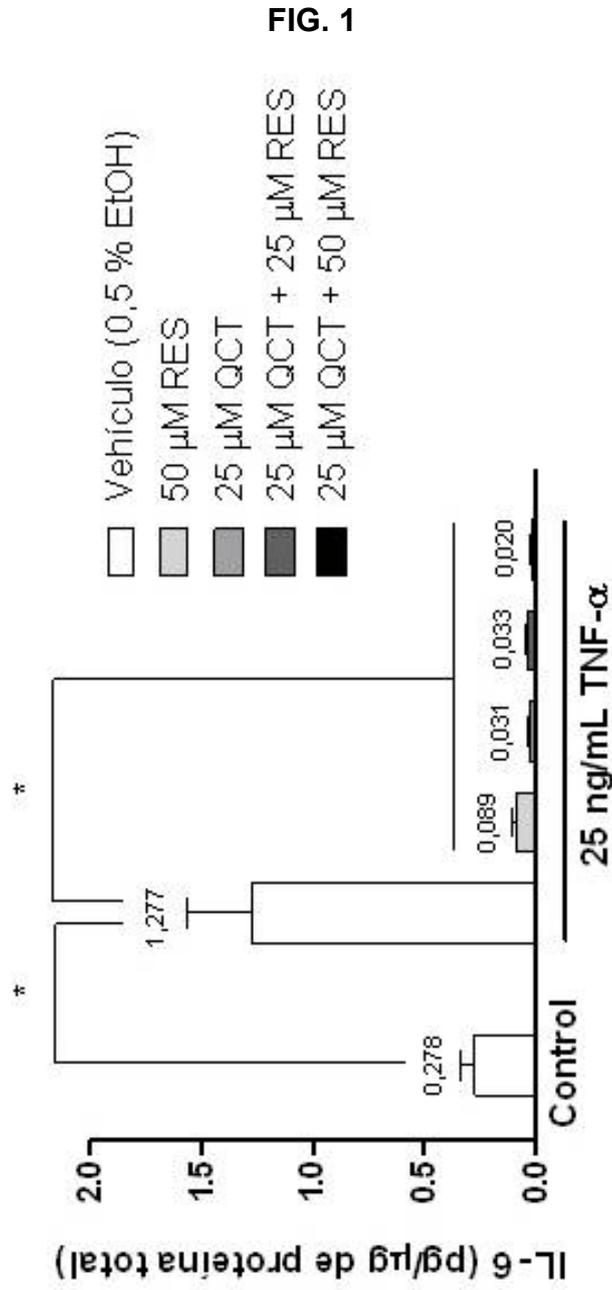


FIG. 2

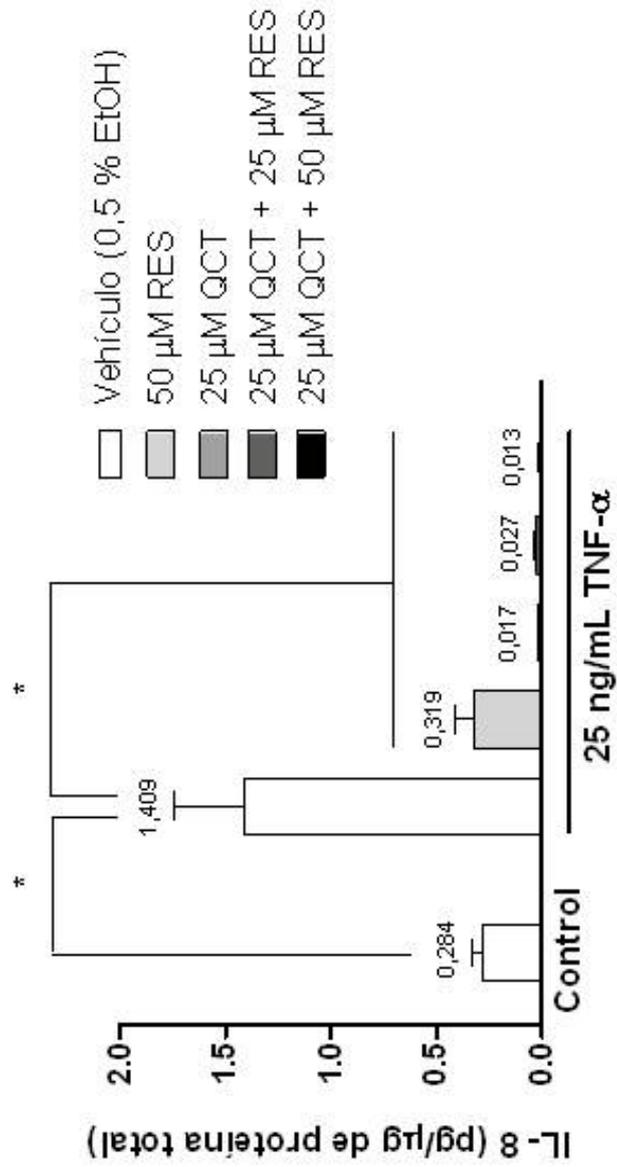


FIG. 3

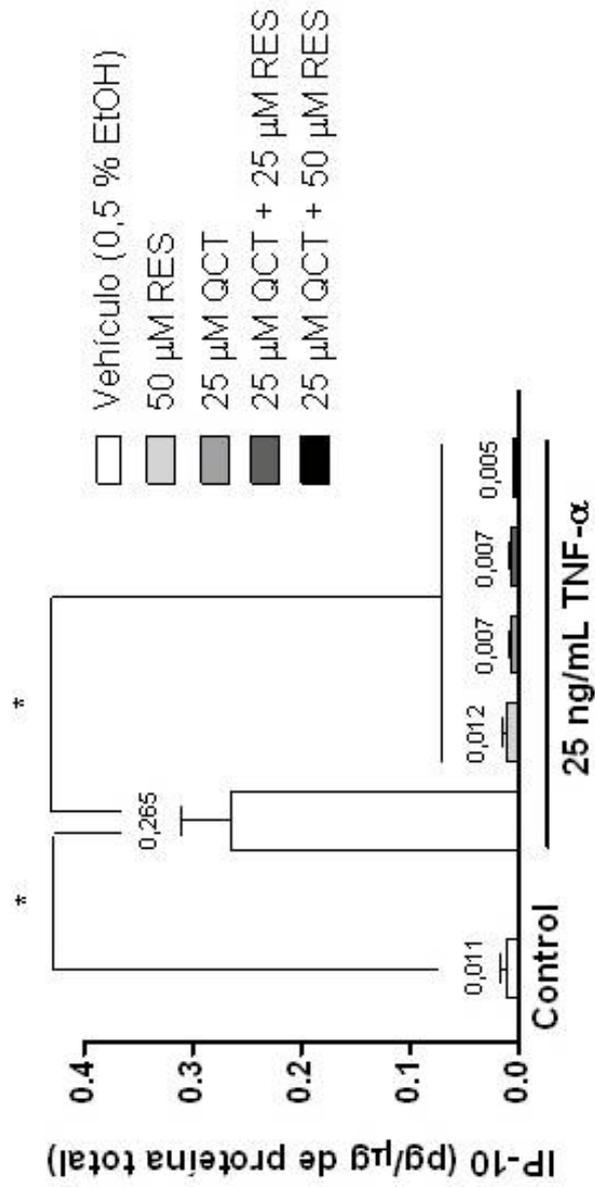


FIG. 4

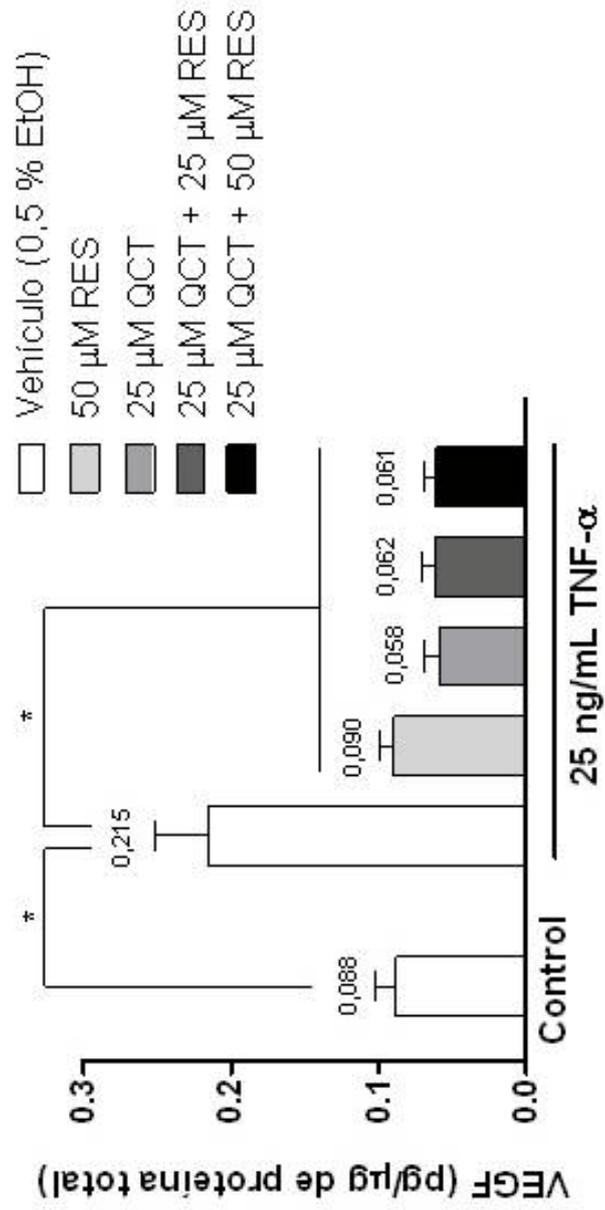


FIG. 5

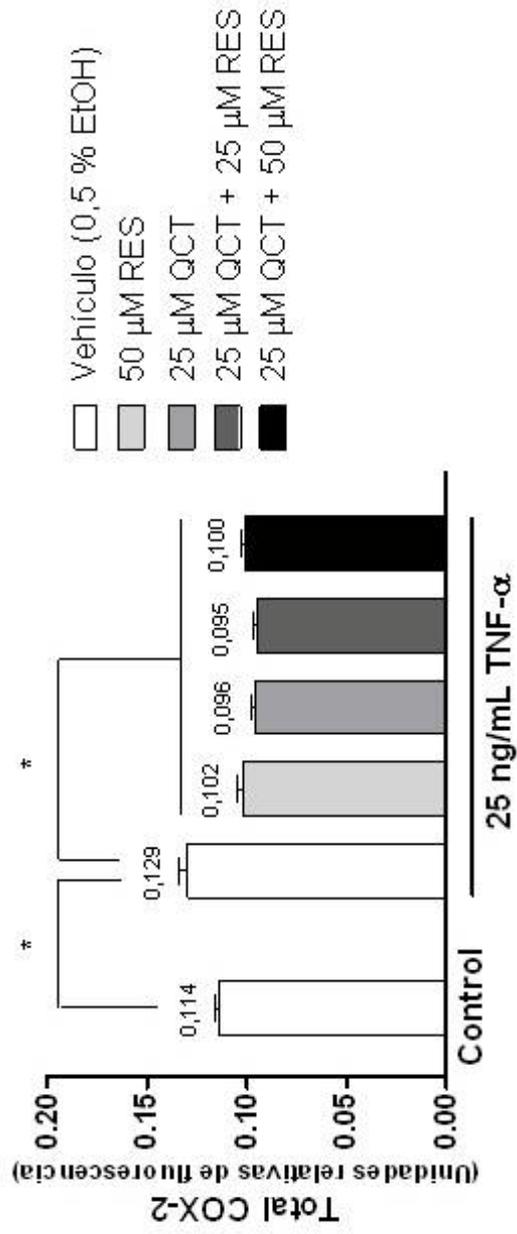


FIG. 6

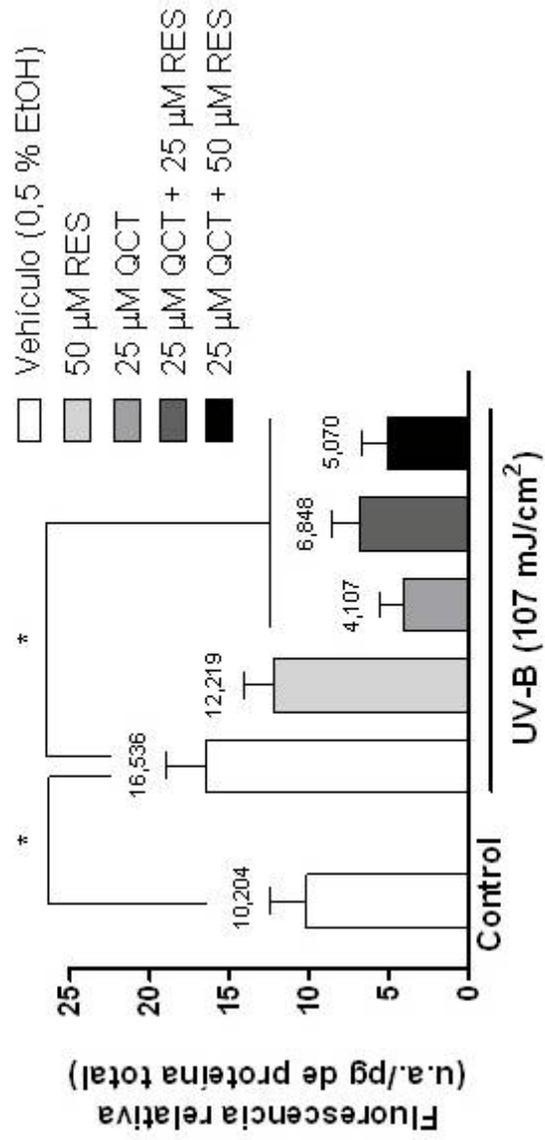
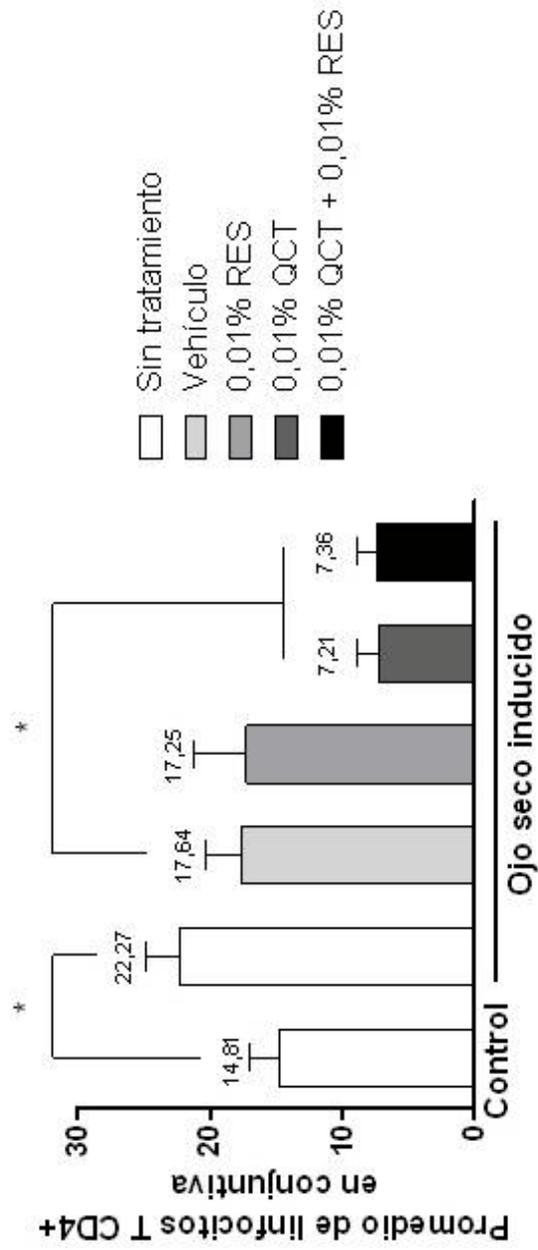


FIG. 7





- ②¹ N.º solicitud: 201230664
 ②² Fecha de presentación de la solicitud: 04.05.2012
 ③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2007103960 A1 (ALLERGAN INC) 13.09.2007, todo el documento.	1-15
X Y	WO 2005099721 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 27.10.2005	1-4 5-15
Y	LIU Q. et al. Oxidative Stress Is an Early Event in Hydrostatic Pressure-Induced Retinal Ganglion Cell Damage. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 10.2007, Vol. 48, No. 10, páginas 4580-4589, todo el documento.	5-15
A	TSUBOTA K et al. The Era of Antiaging Ophthalmology Comes of Age: Antiaging Approach for Dry Eye Treatment. Ophthalmic Res. 09.09.2010, Vol. 44, páginas 146-154, todo el documento.	1-15
A	CHUNG S et al. Regulation of SIRT1 in cellular functions: Role of polyphenols. Archives of Biochemistry and Biophysics. 01.09.2010, Vol. 501(1), páginas 79-90, todo el documento.	1-15
A	MIYAMOTO N et al. Quercetin Induces the Expression of Peroxiredoxins 3 and 5 via the Nrf2/NRF1 Transcription Pathway. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 02.2011, Vol. 52, No. 2, páginas 1055-1063, todo el documento.	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 29.04.2013	Examinador M. Cumbreño Galindo	Página 1/5
---	--	----------------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/05 (2006.01)

A61K31/353 (2006.01)

A61P27/02 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.04.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 7, 8, 10, 11 y 13-15	SI
	Reivindicaciones 1-6, 9 y 12	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-15	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2007103960 A1	13.09.2007
D02	WO 2005099721 A2	27.10.2005
D03	LIU Q. et al. Investigative Ophthalmology & Visual Science. Vol. 48, No. 10, páginas 4580-4589.	10.2007
D04	TSUBOTA K et al. Ophthalmic Res. Vol. 44, páginas 146-154.	09.09.2010
D05	CHUNG S et al. Archives of Biochemistry and Biophysics. Vol. 501(1), páginas 79-90.	01.09.2010
D06	MIYAMOTO N et al. Investigative Ophthalmology & Visual Science. Vol. 52, No. 2, páginas 1055-1063.	02.2011

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención tiene por objeto una composición que comprende quercetina y un compuesto estilbenoide, en concreto resveratrol, así como su uso en la prevención y/o tratamiento de la inflamación, del estrés oxidativo y de la neovascularización ocular (reivindicaciones 1 a 15).

D01 divulga un implante intraocular para el tratamiento de enfermedades oculares que comprende una composición oftálmica.

D02 anticipa composiciones que comprenden compuestos polifenólicos e inhibidores de las especies reactivas de oxígeno para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y del cáncer.

D03 demuestra el uso potencial de antioxidantes como el resveratrol y la quercetina en la inhibición del daño oxidativo que tiene lugar en el ojo previo al desarrollo de glaucoma.

D04 expone el papel de la restricción calórica así como de las especies reactivas de oxígeno en el envejecimiento y analiza cómo pueden aplicarse en la prevención y tratamiento de las enfermedades oculares, especialmente en el caso de ojo seco. Menciona que el resveratrol estimula la actividad de las sirtuinas en el ojo suprimiendo la inflamación en la retina y que el empleo de resveratrol en el tratamiento del síndrome de ojo seco puede resultar útil por esa capacidad anti-inflamatoria pudiendo combinarse con otro compuesto antiinflamatorio.

D05 revisa las funciones de la sirtuina 1 (SIRT1) y como es regulada por los polifenoles. La determinación del papel y mecanismo de éstos puede ayudar a identificar agentes farmacológicos para su posible uso como nutracéuticos en el tratamiento de enfermedades crónicas. Así, polifenoles como el resveratrol o la quercetina actúan inhibiendo la inflamación y el estrés oxidativo por su actividad como antioxidantes.

D06 comprueba que la quercetina, gracias a su capacidad antioxidante, protege frente al estrés oxidativo causante de diversas enfermedades oculares.

NOVEDAD

D01 divulga un implante intraocular para el tratamiento de enfermedades oculares que comprende una composición oftálmica. Dicha composición comprende agentes activadores de sirtuinas como es el resveratrol que reduce la neovascularización y la inflamación y, además, puede contener otro agente terapéutico activador de sirtuinas, la quercetina, en combinación con el resveratrol. Por tanto, las reivindicaciones 1-6, 9 y 12 no se pueden considerar nuevas a la vista del estado de la técnica ni presentan actividad inventiva.

D02 anticipa composiciones que comprenden compuestos polifenólicos e inhibidores de las especies reactivas de oxígeno para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y del cáncer. Demuestra que la combinación de quercetina con resveratrol origina un efecto sinérgico en la activación de la caspasa-3 y en la liberación de citocromo c dando lugar a una actividad antioxidante. En el caso de que se requiera la administración ocular de la composición de la invención se empleará un vehículo oftálmico que permita el contacto con la superficie del ojo durante un tiempo suficiente para que la composición penetre en la córnea, así como en la cámara anterior o posterior del ojo. Por tanto, las reivindicaciones 1-4 no se pueden considerar nuevas a la vista del estado de la técnica ni presentan actividad inventiva.

ACTIVIDAD INVENTIVA

D01 divulga un implante intraocular para el tratamiento de enfermedades oculares que comprende una composición oftálmica. Dicha composición comprende agentes activadores de sirtuinas como es el resveratrol que reduce la neovascularización y la inflamación y, además, puede contener otro agente terapéutico activador de sirtuinas, la quercetina, en combinación con el resveratrol. La composición sirve para tratar enfermedades del segmento posterior del ojo.

Así pues, este documento anticipa composiciones que comprenden quercetina y resveratrol y su uso en la elaboración de un medicamento para tratar enfermedades del segmento posterior ocular. Además, es perfectamente conocido en el estado de la técnica la actividad de ambos compuestos como antioxidantes, anti-inflamatorios e inhibidores de la neovascularización y su empleo en el tratamiento de diversas enfermedades oculares como el síndrome de ojo seco. Por tanto, las reivindicaciones 7, 8, 10, 11 y 13-15 son nuevas pero no presentan actividad inventiva.

D02 anticipa composiciones que comprenden compuestos polifenólicos e inhibidores de las especies reactivas de oxígeno para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y del cáncer. Demuestra que la combinación de quercetina con resveratrol produce un efecto sinérgico en la activación de la caspasa-3 y en la liberación de citocromo c dando lugar a una actividad antioxidante. En el caso de que se requiera la administración ocular de la composición de la invención se empleará un vehículo oftálmico que permita en contacto con la superficie del ojo durante un tiempo suficiente de manera que la composición penetre en la córnea así como en la cámara anterior o posterior del ojo.

La diferencia entre D02 y la presente invención es que no se menciona el uso de quercetina y resveratrol en el tratamiento de enfermedades oculares.

D03 demuestra el uso potencial de antioxidantes como el resveratrol y la quercetina en la inhibición del daño oxidativo que tiene lugar en el ojo previo al desarrollo de glaucoma.

Para un experto en la materia sería evidente utilizar para el tratamiento de enfermedades oculares (D03) el uso combinado de quercetina y resveratrol (D02) siendo además perfectamente conocido en el estado de la técnica la actividad de ambos compuestos como antioxidantes, anti-inflamatorios e inhibidores de la neovascularización. Por tanto, las reivindicaciones 5-15 no presentan actividad inventiva.