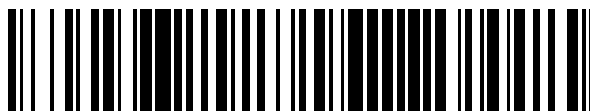


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 227**

51 Int. Cl.:

A61K 31/203 (2006.01)

A61K 31/4415 (2006.01)

A61K 31/51 (2006.01)

A61K 31/525 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2010 E 10737873 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013 EP 2459186**

54 Título: **Disolución oftálmica para la protección de las estructuras internas del globo ocular frente a los rayos UV-A o para el tratamiento del queratocono con una técnica de entrecruzamiento transepitelial**

30 Prioridad:

27.07.2009 IT VA20090052

20.05.2010 IT VA20100044

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.02.2014

73 Titular/es:

TROISI, SALVATORE (25.0%)

Via Trieste 37

84085 Mercato San Severino, IT;

DEL PRETE, ANTONIO (25.0%);

CARUSO, CIRO (25.0%) y

SANSEVERINO, RENATO (25.0%)

72 Inventor/es:

SANSEVERINO, RENATO;

TROISI, SALVATORE;

DEL PRETE, ANTONIO y

CARUSO, CIRO

74 Agente/Representante:

ÁLVAREZ LÓPEZ, Fernando

ES 2 441 227 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

Disolución oftálmica para la protección de las estructuras internas del globo ocular frente a los rayos UV-A o para el tratamiento del queratocono con una técnica de entrecruzamiento transepitelial

5 CAMPO TÉCNICO

Esta invención se refiere en general a composiciones para el tratamiento del queratocono y, más en particular, a una disolución adecuada para su uso para la protección de las estructuras internas del globo ocular frente a los rayos UV-A o en un tratamiento de entrecruzamiento corneal.

ANTECEDENTES

El libro [18] proporciona una revisión de los problemas y las técnicas para la administración y la asimilación de disoluciones oftálmicas.

El entrecruzamiento corneal (C3) con riboflavina (vitamina B2), abreviado como C3-riboflavina, es una técnica innovadora para el tratamiento de pacientes afectados por queratocono y ectasia corneal y consiste en la administración de riboflavina y radiación ultravioleta (UV-A) para el fortalecimiento del tejido corneal [1] [2].

El tratamiento de entrecruzamiento es relativamente sencillo: la riboflavina se instila en el ojo y la córnea se irradia con una cantidad dosificada adecuadamente de rayos UV-A durante cinco minutos; el procedimiento se repite seis veces sucesivas hasta alcanzar una exposición total a los rayos UV-A de 30 minutos.

El parámetro clínico más importante que ha de tenerse en consideración para establecer la idoneidad para el tratamiento de entrecruzamiento es el espesor de la córnea, que no debe ser inferior a 400 µm.

El objetivo de este tratamiento conservador del queratocono es retrasar o, esperanzadoramente, eliminar la necesidad de un trasplante de córnea a la vez que mejorar el rendimiento visual de los pacientes mejorando su calidad de vida [6] [7].

La técnica del entrecruzamiento se ha usado para el tratamiento del queratocono, una patología caracterizada por un debilitamiento progresivo de la córnea por una laxitud anómala del parénquima corneal debida a una reducida cohesión de las laminillas de colágeno de que se compone. Al usar rayos UV-A y riboflavina, se crean nuevos enlaces entre moléculas de colágeno corneal adyacentes y las córneas tratadas son más gruesas y rígidas [3]. Las córneas tienen numerosas capas de fibras de colágeno en el espesor del parénquima; los enlaces transversales, los denominados "entrecruzamientos" que unen las diversas capas de colágeno entre sí, contribuyen de manera determinante a la rigidez de la córnea. El objetivo del tratamiento de entrecruzamiento corneal es aumentar el grado de rigidez del tejido corneal a través de la generación de un mayor número de estos enlaces transversales.

La administración tópica de riboflavina sobre la córnea desepitelizada, con una penetración de aproximadamente 200 µm, y la irradiación de las moléculas de riboflavina con rayos UV-A determinan la pérdida del equilibrio químico de las moléculas de riboflavina, con la consiguiente generación de radicales libres. Las moléculas de riboflavina se vuelven inestables y se estabilizan por sí mismas al enlazarse con dos fibrillas de colágeno. De este modo, se forman una serie de "puentes" entre las fibrillas de colágeno (es decir, entrecruzamientos) que producen un fortalecimiento general de la córnea [3].

En realidad, el tratamiento se lleva a cabo después de haber eliminado la capa más externa de la córnea (es decir, el epitelio corneal). Este modo de ejecución del tratamiento con entrecruzamiento (C3-R) del queratocono y la ectasia corneal contempla la previa eliminación del epitelio corneal para favorecer la penetración de la disolución estándar de riboflavina en dextrano al 0,1% (por ejemplo, la disolución comercializada por SOOFT ITALIA S. r. l. bajo la marca comercial RICROLIN™) en el estroma subyacente y el tratamiento se ha estandarizado en estas condiciones. De acuerdo con los partidarios de esta técnica, la eliminación de la capa epitelial sería necesaria para asegurar la mejor absorción posible de la disolución de riboflavina en el interior del estroma corneal y, por lo tanto, la máxima eficacia del tratamiento.

Desafortunadamente, la eliminación del epitelio corneal puede causar picor o quemazón ocular el día posterior al tratamiento y en los días inmediatamente sucesivos, a la vez que una visión borrosa transitoria; estos síntomas son bien conocidos y persisten hasta la recuperación del epitelio corneal y se tratan normalmente en los días posteriores

[4-7] al tratamiento C3-R con colirios antiinflamatorios no esteroideos (AINE), con colirios a base de lágrimas artificiales y analgésicos y con la aplicación de una lente de contacto terapéutica sobre la córnea.

Varios autores sostienen que podría ser posible ejecutar el tratamiento C3-R mediante la aplicación de la metodología estándar sin una eliminación previa del epitelio corneal y que un tratamiento tal sería eficaz y seguro, según demuestran los datos clínicos observados. De acuerdo con esta técnica, el tratamiento debería ejecutarse sin eliminar previamente el epitelio de la córnea (desepitelización). El objetivo es evitar que los pacientes sufran enfermedades debidas a la eliminación del epitelio, intrínsecas al primer procedimiento, llevar a cabo el tratamiento en un ambulatorio y, en particular, evitar cualquier riesgo de infecciones postoperatorias, intrínsecas al tratamiento que contempla la eliminación del epitelio con la consiguiente exposición de las capas subyacentes de la córnea. Los partidarios de este modo de ejecución del tratamiento sugieren la administración de la riboflavina al ojo durante un mayor intervalo de tiempo para permitir una mejor absorción de dicha riboflavina en el estroma antes de la irradiación con los rayos UV-A [8].

En la bibliografía se encuentran opiniones contradictorias con respecto a la eliminación o no del epitelio en el tratamiento con entrecruzamiento del queratocono y la ectasia corneal en general. El tratamiento C3-R se ha estudiado e implementado después de haber eliminado el epitelio corneal para favorecer la penetración de la riboflavina en el estroma. Según el conocimiento de los autores, no hay ningún estudio disponible en la bibliografía para determinar si la riboflavina penetra o no y en qué medida en el estroma corneal [9] al eliminar o no el epitelio corneal.

La ejecución del entrecruzamiento sin una previa desepitelización ha sido criticada por numerosos autores, que sostienen que de esta manera la riboflavina no pasaría a través del epitelio y que no se ha demostrado todavía si la disolución estándar de riboflavina en dextrano al 0,1% penetra eficazmente o no y en qué medida en el estroma corneal sin eliminar el epitelio y si un tratamiento con rayos UV-A de forma transepitelial resulta igualmente eficaz que cuando se lleva a cabo después de eliminar el epitelio corneal.

En un intento de proporcionar sustancias eficaces para el tratamiento del queratocono con la técnica del entrecruzamiento sin eliminación del epitelio corneal, el Dr. Spörl ha sugerido [17] el uso de cloruro de benzalconio para aumentar la permeabilidad del epitelio y el Dr. Pinelli ha sugerido el uso de tensioactivos mezclados con la riboflavina.

La solicitud de patente italiana n° MI2007A002162 [16] desvela una nueva disolución que contiene riboflavina y cloruro de benzalconio para el tratamiento del queratocono con una técnica de entrecruzamiento transepitelial.

Los experimentos realizados por los solicitantes en córneas humanas, cuyos resultados se ilustran más adelante en este documento, conducen a la conclusión de que la segunda técnica, llevada a cabo con la disolución estándar o la composición propuesta por el Dr. Pinelli [16], no superaría los problemas debidos a la eliminación del epitelio corneal, ya éste quedaría destruido y dejaría expuestas las capas subyacentes, con el consiguiente riesgo de infecciones y alteraciones de los mecanismos de reparación.

Sería deseable disponer de una composición con riboflavina para la ejecución del entrecruzamiento corneal que fuera capaz de atravesar el epitelio corneal en relativamente poco tiempo y que no produjera daños en dicho epitelio corneal, que son la causa de molestos síntomas postoperatorios.

RESUMEN

Los solicitantes han llevado a cabo intensos estudios con el objetivo de determinar la cantidad de riboflavina que penetra por sí sola o mezclada con otros productos ("potenciadores de la penetración") a través de córneas humanas con y sin eliminación previa del epitelio corneal, así como la eficacia y seguridad del tratamiento posterior con rayos UV-A.

Se han identificado varias sustancias útiles, elegidas del grupo compuesto por aminoácidos esenciales y condicionalmente esenciales (como arginina, cisteína, glicina, glutamina, histidina, prolina, serina y tirosina), coenzima Q, vitamina E, L-prolina, glicina, clorhidrato de lisina, L-leucina, L-arginina y compuestos destinados a estimular la producción de metaloproteínasa MMP9, identificados de manera más precisa a continuación en este documento, que pueden usarse eficazmente como vehículos ("potenciadores de la penetración") en disoluciones oftálmicas adecuadas para la administración de riboflavina, en particular, la disolución estándar de riboflavina en dextrano, a través del epitelio corneal. Las disoluciones oftálmicas así obtenidas, que pueden comercializarse, por

ejemplo, en forma de colirios o geles o de disoluciones o emulsiones acuosas o aplicarse sobre lentes de contacto terapéuticas pueden usarse para el tratamiento del queratocono con una técnica de entrecruzamiento transepitelial y, por lo tanto, con preservación del epitelio corneal. Solamente los compuestos reivindicados son parte de la invención.

5

Eventualmente, las disoluciones oftálmicas pueden contener excipientes como, por ejemplo, ácido acético, o las sustancias mencionadas anteriormente pueden tratarse con ácido acético o con otro excipiente antes de mezclarlas con la riboflavina.

- 10 Esta invención propone además el uso de al menos una sustancia elegida del grupo compuesto por coenzima Q, vitamina E, L-prolina, glicina, clorhidrato de lisina, L-leucina, L-arginina, para la preparación de una disolución oftálmica con riboflavina destinada a proteger las estructuras internas del globo ocular frente a los rayos UV-A o a tratar el queratocono con una técnica de entrecruzamiento transepitelial y una disolución oftálmica con riboflavina correspondiente y como vehículo ("potenciador de la penetración") en una composición adecuada para la
- 15 administración de la riboflavina a través del epitelio corneal.

Esta invención desvela además un procedimiento para la preparación de una disolución oftálmica tal, que consiste en la adición de al menos uno de los vehículos identificados anteriormente a una disolución de riboflavina.

- 20 Cada una de las sustancias propuestas como vehículo puede añadirse a una disolución que contiene riboflavina en solitario o en combinación con otros de los vehículos propuestos en concentraciones elegidas en los intervalos indicados en la descripción subsiguiente de las realizaciones ejemplares.

La invención se define en las reivindicaciones.

25

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **figura 1** muestra una escala de evaluación visual, fluorimétrica y colorimétrica, adoptada para valorar el paso de una disolución de riboflavina al 0,1% a través de la córnea después de su administración de forma transepitelial.

30

La **figura 2a** es una imagen fluoroscópica de una sección de una córnea a la que se ha administrado la cuarta composición de prueba de forma transepitelial, después de 15 minutos.

- La **figura 2b** es una imagen fluoroscópica de una sección de una córnea a la que se ha administrado la cuarta
- 35 composición de prueba de forma transepitelial, después de 30 minutos.

La **figura 2c** es una imagen fluoroscópica de una sección de una córnea tratada con entrecruzamiento transepitelial con el uso de la cuarta nueva disolución, en la que puede observarse una intensa fluorescencia debida al paso de la cuarta composición y la considerable rigidez del tejido después del tratamiento.

40

La **figura 3a** muestra el grado de flexión de una córnea tratada con entrecruzamiento transepitelial con el uso de la disolución estándar.

- La **figura 3b** muestra el grado de flexión de una córnea tratada con entrecruzamiento transepitelial con el uso de la
- 45 cuarta de las nuevas disoluciones de prueba.

La **figura 4** es una imagen de microscopio electrónico de barrido que muestra las laminillas en una sección de una córnea afectada por queratocono.

- La **figura 5** es una imagen de microscopio electrónico de barrido que muestra una vista ampliada de la córnea de la
- 50 figura 4.

- La **figura 6** es una imagen de microscopio electrónico de barrido que muestra las laminillas en una sección de una
- 55 córnea afectada por queratocono después de un entrecruzamiento transepitelial llevado a cabo con el uso de la cuarta nueva composición de prueba.

La **figura 7** es una imagen de microscopio electrónico de barrido que muestra la morfología de las microvellosidades y de las capas superficiales del epitelio en una córnea normal.

La **figura 8** es una imagen de microscopio electrónico de barrido de una córnea tratada con una dosis estándar de rayos UV-A después de habersele administrado de forma transepitelial la disolución estándar de riboflavina en dextrano al 0,1%.

- 5 La **figura 9** es una imagen de microscopio electrónico de barrido de una córnea tratada con una dosis estándar de rayos UV-A después de habersele administrado de forma transepitelial la cuarta nueva composición de prueba.

La **figura 10** es una imagen de microscopio electrónico de barrido de una córnea tratada con una dosis estándar de rayos UV-A después de habersele administrado una disolución fisiológica de forma transepitelial.

10

DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES EJEMPLARES

Todas las pruebas se realizaron con córneas humanas de donantes, procedentes del Banco de Ojos de la región de la Campania, Nápoles, Italia (Azienda Ospedaliera Napoli 1 - Banca Occhi - Regione Campania - Ospedale dei Pellegrini), después del consenso según se contempla en el protocolo de explantación y de conformidad con el permiso del Comité Ético - certificado n° 0009304/2009 - decisión n° 1269.

15

- Se observó la penetración de las composiciones probadas a través de córneas humanas íntegras, es decir, sin eliminación previa del epitelio, en que las córneas tenían un espesor de entre 500 y 600 µm, las composiciones fueron la disolución estándar de riboflavina en dextrano, la composición preparada con riboflavina en dextrano más cloruro de benzalconio sugerida en [16] y [17] y las nuevas composiciones de prueba obtenidas por mezcla de la riboflavina con al menos una sustancia elegida del grupo que comprende vitamina E, coenzima Q, L-prolina, glicina, clorhidrato de lisina y L-leucina, en concentraciones determinadas.

20

- 25 Las concentraciones de las sustancias usadas para preparar las nuevas composiciones de prueba están comprendidas en los intervalos siguientes:

Vitamina E: concentración de 0,0001 mg/100 ml a 2.000 mg/100 ml. De acuerdo con una realización más preferida, la concentración varía de 0,01 mg a 1.500 mg/100 ml. De acuerdo con una realización aún más preferida, la concentración varía de 10 mg/100 ml a 1.000 mg/100 ml. De acuerdo con una realización aún más preferida, la concentración es de aproximadamente 500 mg/100 ml.

30

Vitamina Q: concentración de 0,0001 mg/100 ml a 2.000 mg/100 ml. De acuerdo con una realización más preferida, la concentración varía de 0,01 mg a 1.500 mg/100 ml. De acuerdo con una realización aún más preferida, la concentración varía de 1 mg/100 ml a 1.000 mg/100 ml. De acuerdo con una realización aún más preferida, la concentración es de aproximadamente 100 mg/100 ml.

35

L-prolina: concentración de 0,0001 mg/100 ml a 2.000 mg/100 ml. De acuerdo con una realización más preferida, la concentración varía de 0,001 mg a 100 mg/100 ml. De acuerdo con una realización aún más preferida, la concentración varía de 0,005 mg/100 ml a 10 mg/100 ml. De acuerdo con una realización aún más preferida, la concentración varía de 0,01 mg/100 ml a 1 mg/100 ml. De acuerdo con una realización aún más preferida, la concentración es de aproximadamente 0,1 mg/100 ml.

40

Glicina: concentración de 0,0001 mg/100 ml a 2.000 mg/100 ml. De acuerdo con una realización más preferida, la concentración varía de 0,001 mg a 100 mg/100 ml. De acuerdo con una realización aún más preferida, la concentración varía de 0,005 mg/100 ml a 10 mg/100 ml. De acuerdo con una realización aún más preferida, la concentración varía de 0,01 mg/100 ml a 1 mg/100 ml. De acuerdo con una realización aún más preferida, la concentración es de aproximadamente 0,1 mg/100 ml.

45

Clorhidrato de lisina: concentración de 0,0001 mg/100 ml a 2.000 mg/100 ml. De acuerdo con una realización más preferida, la concentración varía de 0,001 mg a 100 mg/100 ml. De acuerdo con una realización aún más preferida, la concentración varía de 0,005 mg/100 ml a 10 mg/100 ml. De acuerdo con una realización aún más preferida, la concentración varía de 0,01 mg/100 ml a 1 mg/100 ml. De acuerdo con una realización aún más preferida, la concentración es de aproximadamente 0,05 mg/100 ml.

50

55

L-leucina: concentración de 0,0001 mg/100 ml a 2.000 mg/100 ml. De acuerdo con una realización más preferida, la concentración varía de 0,001 mg a 100 mg/100 ml. De acuerdo con una realización aún más preferida, la concentración varía de 0,005 mg/100 ml a 10 mg/100 ml. De acuerdo con una realización aún más preferida, la concentración varía de 0,01 mg/100 ml a 1 mg/100 ml. De acuerdo con una realización aún más preferida, la concentración es de aproximadamente 0,1 mg/100 ml.

concentración es de aproximadamente 0,08 mg/100 ml.

Las disoluciones nuevas adecuadas para el tratamiento del queratocono por entrecruzamiento transepitelial o para la protección de los globos oculares frente a los rayos UV-A se obtuvieron por mezcla de una o varias de las sustancias mencionadas anteriormente, en concentraciones comprendidas en los intervalos indicados, con una disolución que contenía riboflavina, por ejemplo, con una disolución de riboflavina en dextrano en una concentración elegida en el intervalo del 0,0001 al 0,5%. De acuerdo con una realización más preferida, la concentración de la disolución de riboflavina en dextrano varía del 0,001% al 0,4%. De acuerdo con una realización aún más preferida, la concentración varía del 0,005% al 0,3%. De acuerdo con una realización aún más preferida, la concentración varía de aproximadamente el 0,01% al 0,2%. De acuerdo con una realización aún más preferida, la concentración es de aproximadamente el 0,1%.

Los resultados de las pruebas han demostrado que todas las sustancias del grupo identificado son adecuadas para favorecer la penetración de la riboflavina y, en particular, de la disolución estándar de riboflavina en dextrano, a través del epitelio corneal y de proteger la córnea frente a los rayos UV-A.

Las córneas consideradas para la prueba, descartadas del banco de ojos por no ser utilizables para trasplantes, se mantuvieron en disoluciones apropiadas y antes de las pruebas se evaluaron de nuevo por microscopía óptica y examen de las células endoteliales.

Solo se usaron córneas con buena transparencia, de un espesor en el intervalo de 500 a 600 μm y con un buen mosaico endotelial, de acuerdo con lo sugerido en [10-15].

Las córneas se colocaron de manera que cerraran una cámara cilíndrica que contenía una disolución predeterminada de hialuronato de sodio y goma de xantano, 0,4 ml. Sobre la superficie de la córnea se aplicó un anillo metálico con el mismo diámetro de la caja cilíndrica como cierre hermético. A continuación se administraron sobre las córneas las composiciones de prueba que contenían una sustancia fluorescente (riboflavina). Mediante la medida de la fluorescencia en el interior de la caja en diversos instantes, fue posible determinar la cantidad de las nuevas disoluciones que penetra en la córnea y el tiempo necesario para ello.

La eficacia de las sustancias indicadas como vehículo en las composiciones para la administración de riboflavina de forma transepitelial y de las composiciones obtenidas por mezcla de la riboflavina con al menos una de las sustancias indicadas se describe mediante los ejemplos de prueba siguientes, solo con fines ilustrativos.

Por razones de brevedad, solo se indican los resultados obtenidos en las pruebas de tratamiento de las córneas con las composiciones siguientes:

- 1) disolución estándar de riboflavina en dextrano al 0,1%;
- 2) disolución estándar de riboflavina en dextrano al 0,1% + cloruro de benzalconio al 0,01%, de acuerdo con [16];
- 3) primera nueva composición de prueba con riboflavina en dextrano al 0,1% + vitamina E TPGS (succinato de D- α -tocoferilpolietilenglicol 1.000) en una concentración de 500 mg/100 ml;
- 4) segunda nueva composición de prueba con riboflavina en dextrano al 0,1% + 100 mg/100 ml de vitamina Q;
- 5) tercera nueva composición de prueba con riboflavina en dextrano al 0,1% + 0,1 mg/100 ml de L-prolina + 0,1 mg/100 ml de glicina + 0,05 mg/100 ml de clorhidrato de lisina + 0,08 mg/100 ml de L-leucina;
- 6) cuarta nueva composición de prueba con riboflavina en dextrano al 0,1% + 500 mg/100 ml de vitamina E TPGS (succinato de D- α -tocoferilpolietilenglicol 1.000) + 100 mg/100 ml de vitamina Q + 0,1 mg/100 ml de L-prolina + 0,1 mg/100 ml de glicina + 0,05 mg/100 ml de clorhidrato de lisina + 0,08 mg/100 ml de L-leucina.

Cada una de las seis composiciones mencionadas se administró sobre la superficie de las córneas seleccionadas y colocadas según se describe anteriormente y después de 15 minutos y después de 30 minutos se evaluó el empapamiento del estroma corneal, junto con la presencia de la sustancia fluorescente en la disolución de hialuronato de sodio y goma de xantano, 0,4 ml, situada en el recipiente por debajo de la córnea tratada. La evaluación de la penetración de la riboflavina en el estroma corneal se llevó a cabo por sección de la córnea y evaluación subsiguiente con un microscopio de fluorescencia.

La presencia de la riboflavina en la disolución de hialuronato de sodio y goma de xantano, 0,4 ml, que demuestra su paso a través de la córnea, se evaluó cualitativamente, mediante una escala visual y fluoroscópica, según se representa en la figura 1, y cuantitativamente, mediante una escala colorimétrica. Los dos números próximos a cada muestra de color representan respectivamente el número de partes de la disolución estándar de riboflavina que causan el color mostrado y el número de partes de la disolución de goma de xantano y hialuronato de sodio. La escala de referencia se definió mediante la preparación de diluciones de la disolución de riboflavina en dextrano al 0,1% con goma de xantano y hialuronato de sodio en las proporciones siguientes (unidades/ml): 50/0, 40/10, 30/20, 20/30, 10/40, 0/50. Se preparó una escala visual y una escala fluorimétrica correspondientes a los valores definidos de unidades/ml y se asignó una puntuación de 10 a 0 a cada razón de dilución. La escala colorimétrica contempla un valor mínimo del porcentaje de amarillo igual al 20% en ausencia de riboflavina, correspondiente al espectro colorimétrico de la sustancia elegida como disolvente.

La evaluación mediante la escala visual se llevó a cabo en condiciones de iluminación estándar por comparación directa de las muestras obtenidas en las pruebas con la muestra predefinida y mediante técnicas fotográficas digitales. La evaluación fluorimétrica se llevó a cabo con un microscopio de fluorescencia equipado con una cámara fotográfica digital en una cámara oscura. La puntuación correspondiente a la evaluación con la escala visual y la escala fluorimétrica fue otorgada por un tercer examinador mediante la obtención de un promedio de los valores obtenidos por los dos procedimientos.

La evaluación colorimétrica se llevó a cabo insertando el material presente al final del experimento dentro de la cámara cilíndrica (y por lo tanto, debajo de la córnea) en una bolsa transparente y con un análisis por ordenador, mediante un barrido de alta definición de las diluciones predefinidas y la evaluación del porcentaje de amarillo con el programa de software PhotoshopTM 7.0 y un filtro monocromático. Con esta técnica fue posible comparar el porcentaje de amarillo detectado en las muestras del experimento con valores de concentración determinados exactamente y expresados en unidades/ml de la disolución estándar de riboflavina al 0,1%, según se muestra en la figura 1.

La figura 2a es una imagen fluoroscópica de una sección de una córnea tratada con entrecruzamiento transepitelial después de haberle administrado la cuarta nueva disolución durante 15 minutos, la figura 2b es una imagen fluoroscópica de una sección de una córnea tratada con entrecruzamiento transepitelial después de haberle administrado la cuarta nueva disolución durante 30 minutos y la figura 2c es una imagen fluoroscópica de una sección de una córnea tratada con entrecruzamiento transepitelial con la cuarta nueva disolución. En esta última figura, es posible observar la penetración de la riboflavina en toda la córnea y el aumento de la rigidez del tejido después del tratamiento de entrecruzamiento.

Las pruebas realizadas demostraron que:

a) después de 15 minutos de administración de la disolución estándar de riboflavina en dextrano al 0,1% de forma transepitelial, el estroma corneal queda parcialmente empapado y la disolución fluorescente no es detectable en la sustancia en el interior del recipiente, ya que el espectro colorimétrico puede superponerse al de la disolución de hialuronato de sodio y goma de xantano, 0,4 ml (puntuación 0 según la figura 1 y porcentaje de amarillo no superior al 20%);

b) después de 30 minutos de administración de la disolución estándar de riboflavina en dextrano al 0,1% de forma transepitelial, el estroma corneal se muestra totalmente empapado de la disolución fluorescente; la fluorescencia en la disolución de hialuronato de sodio y goma de xantano, 0,4 ml, en el recipiente puede detectarse, con una puntuación de 2-3 según la figura 1 y un porcentaje de amarillo determinado con la técnica implementada por ordenador mencionada anteriormente en un intervalo del 75% al 85%;

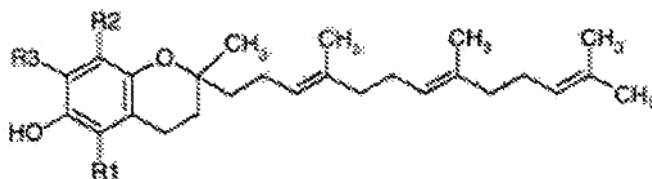
c) después de 15 minutos de administración de forma transepitelial de la primera nueva disolución de prueba con riboflavina al 0,1% más vitamina E TPGS (succinato de D- α -tocoferilpolietilenglicol 1.000) en una concentración de 500 mg/100 ml, la córnea se encuentra totalmente empapada y la disolución fluorescente está presente en el interior del recipiente (puntuación 2-3 según la figura 1, con un porcentaje de amarillo del 72-76%);

d) después de 30 minutos de administración de la primera nueva disolución de prueba, todas las capas de la córnea se encuentran totalmente empapadas y hay una elevada concentración de riboflavina en el interior del recipiente, lo que demuestra una buena permeabilidad del tejido corneal al producto mismo en contacto con la superficie epitelial (puntuación 3-4 según la figura 1, con un porcentaje de amarillo del 79-84%);

- e) la composición propuesta en [16] y las nuevas disoluciones de prueba segunda y tercera que contenían, respectivamente: cloruro de benzalconio al 0,01%; 100 mg/100 ml de vitamina Q; 0,1 mg/100 ml de L-prolina, 0,1 mg/100 ml de glicina, 0,05 mg/100 ml de clorhidrato de lisina y 0,08 mg/100 ml de L-leucina, mostraron, en las mismas condiciones, una mejor penetración de riboflavina, tanto en términos cuantitativos, como de rapidez de penetración, que los resultados correspondientes obtenidos solo con la disolución estándar (riboflavina en dextrano al 0,1%) (una puntuación de 3-4 según la figura 1 después de 15 minutos y una puntuación de 4-6 después de 30 minutos, con un porcentaje de amarillo del 70-79% después de 15 minutos y del 78-86% después de 30 minutos);
- 10 f) la cuarta nueva composición de prueba dio aún mejores resultados que todas las otras composiciones probadas. Las diferentes concentraciones de colorante detectadas de manera fluoroscópica y el análisis implementado por ordenador de la sustancia fluorescente en el interior del recipiente después de 15 minutos y después de 30 minutos de administración del producto sobre la superficie del epitelio mostraron un aumento destacado (una puntuación de 5-6 según la figura 1 después de 15 minutos, con un porcentaje de amarillo del 88-91%; una puntuación de 6-7
- 15 después de 30 minutos, con un porcentaje de amarillo superior al 90%); la mayor concentración de la sustancia fluorescente en la disolución situada debajo de la córnea, obtenida después de la administración transepitelial de la cuarta nueva disolución de prueba, es particularmente evidente después de 15 minutos, especialmente si se compara con los resultados obtenidos con la disolución estándar, que ni siquiera es detectable en la disolución del interior del recipiente después del mismo intervalo de tiempo. Esto puede explicarse suponiendo que existe un
- 20 efecto sinérgico entre los potenciadores de penetración cuando se mezclan entre sí para favorecer el paso de la riboflavina a través del epitelio corneal.

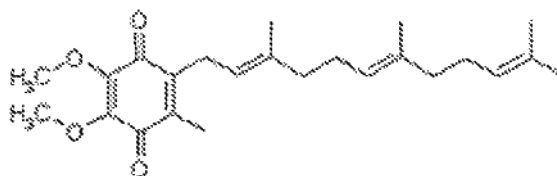
Los resultados ilustrados demuestran que al menos las sustancias siguientes:

25 - vitamina E

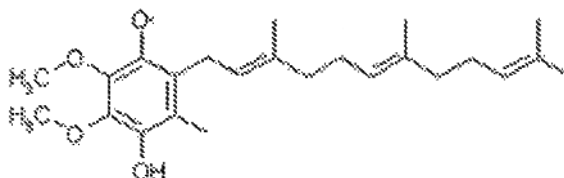


en que R1 = CH₃ o H, R2 = CH₃ o H y R3 = CH₃; solo como ejemplo, puede citarse la vitamina E TPGS (succinato de D- α -tocoferilpolietilenglicol 1.000);

30 - coenzima Q

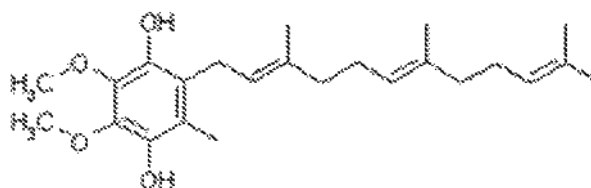


35 en la forma oxidada,



en la forma semiquinónica,

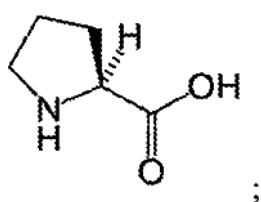
40



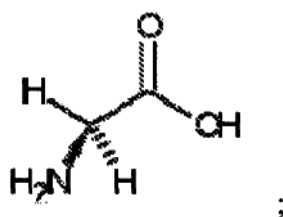
en la forma reducida, cualquiera que sea el número de unidades de isoprenoide de la coenzima Q; solo como ejemplo, puede citarse la coenzima Q 10;

5

- L-prolina

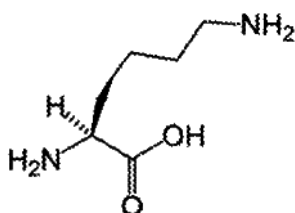


10 - glicina



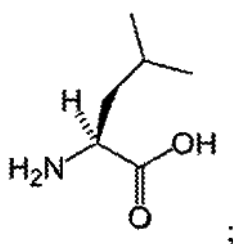
- lisina

15



o clorhidrato de lisina;

20 - L-leucina



en solitario o combinadas entre sí, eventualmente combinadas con excipientes como ácido acético y en concentraciones elegidas en los intervalos mencionados anteriormente, facilitan la penetración de la riboflavina a

través del epitelio corneal en menores intervalos de tiempo que los intervalos de tiempo requeridos por la disolución estándar de riboflavina en dextrano y en cantidades suficientes para el subsiguiente tratamiento de entrecruzamiento.

- 5 La combinación de todos los compuestos mencionados con riboflavina mostró un efecto sinérgico inesperado, al producir mejores resultados desde el punto de vista de la concentración de producto que atraviesa los tejidos corneales y la rapidez de su penetración.

Los solicitantes ensayaron *in vitro* la eficacia del tratamiento de entrecruzamiento transepitelial en córneas humanas mediante la administración de la cuarta nueva composición de prueba y una irradiación con rayos UV-A de 3 mW/cm², de acuerdo con los protocolos estándar. Las córneas probadas se prepararon como en el experimento previo, por fijación en el soporte adecuado, y la disolución estándar de riboflavina en dextrano al 0,1% y la cuarta nueva composición de prueba se administraron sobre la superficie del epitelio (administradas, por lo tanto, de forma transepitelial) de las córneas respectivas durante 30 minutos. A continuación, se llevó a cabo la irradiación estándar con rayos UV-A durante 30 minutos, en etapas de cinco minutos, precedidas por la nueva administración de cada disolución sobre la superficie de la córnea. Al final del experimento, se evaluó el grado de rigidez de la córnea de la manera siguiente: cada una de las córneas se sostuvo por una porción extrema de una longitud de 2 mm con unas pinzas corneales para mantener dicha porción alineada con una línea horizontal y se midió el ángulo formado por el extremo opuesto de dicha córnea con respecto a la línea horizontal.

20 La figura 3a muestra una córnea después de un tratamiento de entrecruzamiento transepitelial llevado a cabo con la disolución estándar de riboflavina en dextrano al 0,1% que se curva hacia abajo en un ángulo de aproximadamente 40° y la figura 3b muestra otra córnea después de un tratamiento de entrecruzamiento llevado a cabo con la cuarta nueva composición de prueba y sin haber eliminado previamente el epitelio corneal. Al comparar las dos figuras, es evidente que el tratamiento de entrecruzamiento transepitelial llevado a cabo con la cuarta nueva composición de prueba fortalece la córnea, según lo deseado, que ahora se curva hacia abajo en un ángulo de solo 25°.

Como confirmación adicional de la eficacia del tratamiento de entrecruzamiento transepitelial con el uso de la cuarta nueva composición de prueba, este tratamiento se implementó *in vitro* en porciones extremas de córneas humanas que pertenecían a pacientes afectados por queratocono, sometidos a queratoplastia perforante; en estos casos, la córnea extirpada del paciente se usó en el laboratorio, en lugar de destruirse, cuidando de evitar el tiempo de la operación correspondiente a la diatermia, para permitir la conservación de los planos de las capas corneales (trasplante de espesor total). Los limbos corneales se fijaron en un soporte adecuado. La disolución estándar de riboflavina en dextrano al 0,1% se administró sobre la primera córnea y la cuarta nueva disolución de prueba se administró sobre la segunda córnea, mediante la aplicación de las disoluciones durante 30 minutos sobre las superficies corneales sin la previa eliminación del epitelio. A continuación, se llevó a cabo el tratamiento estándar con rayos UV-A solamente en la córnea tratada con la cuarta nueva disolución de prueba, con una potencia de 3 mW/cm² durante 30 minutos, en etapas de 5 minutos, precedidas por la nueva administración de la composición sobre la superficie de la córnea. La otra porción extrema con queratocono, fijada sobre el soporte adecuado, se trató solo por deposición sobre la córnea de la disolución estándar de riboflavina en dextrano al 0,1%, sin la irradiación subsiguiente con rayos UV-A. Al final del experimento, se llevó a cabo una inspección del parénquima corneal con un microscópico electrónico de barrido.

La figura 4 ilustra el aspecto al microscopio electrónico de barrido de las laminillas de una sección de una córnea procedente de un paciente afectado con un queratocono sin tratar. La figura 5 es una vista ampliada de una porción de la figura 4. Estas dos figuras muestran un debilitamiento de las laminillas corneales en una porción extrema de la córnea sobre la que se aplicó la disolución estándar de riboflavina en dextrano al 0,1% sin la posterior irradiación con rayos UV-A.

La figura 6 es una imagen de microscopio electrónico de barrido que muestra el aspecto de las laminillas de una sección de una córnea afectada por queratocono después del tratamiento de entrecruzamiento transepitelial con la cuarta nueva disolución de prueba. La porción extrema con queratocono, tratada con la cuarta nueva disolución de prueba, administrada de forma transepitelial, e irradiada con rayos UV-A de acuerdo con el protocolo estándar durante 30 minutos, presentó laminillas corneales compactas, distribuidas muy densamente, lo que demuestra la formación de nuevos entrecruzamientos bioquímicos.

También se obtuvieron buenos resultados con las nuevas composiciones de prueba primera, segunda y tercera.

Los resultados obtenidos con el uso de las nuevas composiciones de prueba superan también las objeciones de

ciertos autores con respecto a una hipotética reducción de los efectos del tratamiento de entrecruzamiento cuando este se realiza de forma transepitelial, porque el epitelio haría de pantalla para los rayos UV-A. La hipótesis de una reducción de la eficacia del tratamiento de entrecruzamiento transepitelial es errónea, como demuestran las muestras histológicas obtenidas, cuando se añade como vehículo (potenciador de penetración) a la riboflavina al menos una de las sustancias propuestas en este documento y la irradiación se ejecuta de acuerdo con el protocolo estándar.

Además, se llevó a cabo un estudio comparativo de los efectos del tratamiento de entrecruzamiento en forma transepitelial sobre la integridad morfológica de las capas epiteliales de la córnea y de las microvellosidades presentes en la superficie de las células epiteliales mediante un microscopio electrónico de barrido (7.500 x). Esto se realizó para evaluar la tolerancia del epitelio corneal al tratamiento de entrecruzamiento llevado a cabo de forma transepitelial con la cuarta nueva composición de prueba, con respecto a la disolución estándar de riboflavina en dextrano al 0,1% y la composición estándar más cloruro de benzalconio al 0,01%, según se propone en [16].

Esta prueba se llevó a cabo porque las células epiteliales son las primeras estructuras orgánicas irradiadas por el flujo de rayos UV-A y podrían sufrir lesiones debido a la absorción de estas radiaciones. Ninguna de las publicaciones disponibles parece considerar este aspecto, ni se encuentran datos al respecto disponibles en la bibliografía.

Los parámetros que se consideran más fiables para evaluar la vitalidad de las células epiteliales son el examen citológico con una técnica de impresión y, en particular, el examen con el microscopio electrónico de las microvellosidades de la capa de células del epitelio superficial de la córnea. La presencia de extroflexiones en la membrana (microvellosidades) de los elementos celulares superficiales íntegros, con una elevada concentración de mucinas transmembranarias y un buen glucocáliz, permiten enlazar de manera óptima la mucina libre que constituye la capa profunda de la película lagrimal precorneal. Por el contrario, una pérdida patológica de las microvellosidades determina una difícil adhesión de la capa de lágrimas a la superficie ocular y fenómenos de padecimiento epitelial inducidos por la disfunción de la película lagrimal precorneal en sí misma y, como consecuencia, inflamaciones.

La morfología de las microvellosidades se evaluó con un microscopio electrónico de barrido después de un tratamiento transepitelial *in vitro* con rayos UV-A de acuerdo con las dosis estándar. Se sometieron córneas humanas de un espesor de entre 500 y 600 μm a incubación durante 30 minutos con una disolución salina equilibrada (BSS), con la disolución estándar de riboflavina en dextrano al 0,1%, con la disolución estándar más cloruro de benzalconio al 0,01% y con la cuarta nueva composición, respectivamente.

Previamente se había estudiado también la morfología de las microvellosidades y de las capas superficiales del epitelio corneal de córneas no sometidas a ningún tratamiento, para resaltar cómo deberían mostrarse las células epiteliales y sus microvellosidades al no ser sometidas a ningún tratamiento fotoquímico.

La figura 7 es una imagen de microscopio electrónico de barrido que muestra la morfología de las microvellosidades y de las capas superficiales del epitelio en una córnea normal y la figura 8 muestra una imagen de microscopio electrónico de barrido de una córnea tratada con rayos UV-A después de haberle administrado la disolución estándar de riboflavina en dextrano al 0,1% de acuerdo con el protocolo estándar. En comparación con la figura 7, es evidente que se han perdido todas las capas epiteliales y que la membrana de Bowman está al descubierto.

Una situación similar se produce también en aquellas córneas tratadas con la composición compuesta por la disolución estándar más cloruro de benzalconio al 0,01%, según se sugiere en [16].

La figura 9 es una imagen de microscopio electrónico de barrido de una córnea tratada con rayos UV-A en una dosis estándar después del tratamiento con la cuarta nueva composición de prueba. En comparación con las figuras 7 y 8, es posible observar la conservación de las capas epiteliales, los núcleos celulares y las uniones comunicantes. Además, hay una reducción significativa de la densidad de microvellosidades, aunque las microvellosidades restantes presentan una morfología íntegra y no existe ningún riesgo para la membrana celular citoplásmica profunda. Unos resultados similares se obtuvieron con las nuevas composiciones de prueba primera, segunda y tercera.

La figura 10 es una imagen de microscopio electrónico de barrido de una córnea tratada con una dosis estándar de rayos UV-A y el uso únicamente de una disolución fisiológica, con fines de comparación. Las capas epiteliales están rotas, numerosas células han perdido el núcleo citoplásmico y se han perdido prácticamente todas las uniones comunicantes y las microvellosidades.

Los resultados obtenidos pueden resumirse de la manera siguiente:

1) Las córneas tratadas con rayos UV-A, con una incubación previa con la disolución estándar de riboflavina en dextrano al 0,1% o con la composición que contiene la disolución estándar más cloruro de benzalconio al 0,01%, de acuerdo con el protocolo estándar, experimentan una pérdida total de todas las capas epiteliales y, como consecuencia, la membrana de Bowman queda al descubierto (figura 8). En la práctica, al usar solo la disolución estándar, eventualmente con la adición de cloruro de benzalconio, el epitelio queda destruido por la radiación UV-A. Esto lleva a pensar que el tratamiento de entrecruzamiento llevado a cabo sin eliminar el epitelio y con el uso de la disolución estándar o de la composición con riboflavina en dextrano más cloruro de benzalconio no evitaría a los pacientes después del tratamiento los molestos síntomas causados por la eliminación quirúrgica del epitelio.

2) Las córneas tratadas con una dosis estándar de rayos UV-A después de la incubación con composiciones que comprendían riboflavina en dextrano y al menos un vehículo elegido entre los mencionados anteriormente y, en particular, después de la incubación con la cuarta nueva composición estándar, mantuvieron las capas epiteliales, los núcleos celulares y las uniones comunicantes. Se observó una reducción significativa de la densidad de las microvellosidades, aunque las microvellosidades restantes muestran una morfología íntegra. La membrana celular citoplásmica profunda de las córneas se muestra íntegra.

3) Las córneas tratadas con una dosis estándar de rayos UV-A después de la incubación con una disolución salina equilibrada (BSS) mostraron una rotura de las capas epiteliales, la pérdida del núcleo citoplásmico de numerosas células y prácticamente todas las uniones comunicantes y microvellosidades.

Se tomaron también numerosas imágenes de microscopio electrónico de las córneas tratadas con las nuevas composiciones de prueba primera, segunda y tercera, pero no se muestran en este documento porque son sustancialmente idénticas a las obtenidas con el uso de la cuarta nueva composición de prueba.

Estos resultados inducen a concluir que al menos la vitamina E, la vitamina Q o coenzima Q y los aminoácidos probados como L-prolina, glicina, clorhidrato de lisina y L-leucina, ayudan a proteger el epitelio corneal y a favorecer la penetración de la riboflavina a través del epitelio corneal. Entre las nuevas disoluciones propuestas en este documento, la cuarta composición mostró el mejor rendimiento, tanto en cuanto al tiempo de penetración, como a la preservación del epitelio corneal.

La razón de por qué las sustancias propuestas permiten obtener estos extraordinarios resultados y de por qué las sustancias usadas en la cuarta composición de prueba muestran un efecto sinérgico no está totalmente aclarada todavía. Sin limitar la invención a una teoría, los solicitantes sugieren que la reducción de los daños detectados en el epitelio corneal después del tratamiento con la cuarta nueva composición de prueba podría deberse probablemente a la acción citorreparadora de la vitamina E, por ejemplo, la vitamina E TPGS, y/o a la presencia en la disolución de al menos un aminoácido esencial o condicionalmente esencial. Probablemente, la vitamina E actuaría sobre la glutatión-oxidasa y la peróxido-dismutasa, que son las enzimas implicadas en la reparación del epitelio, y los aminoácidos esenciales o condicionalmente esenciales tendrían una acción citorreparadora y probablemente favorecerían también el efecto de entrecruzamiento. Además, el mayor empapamiento del tejido por la cuarta nueva disolución probablemente determina no solo un aumento del efecto de entrecruzamiento, sino también una mejor preservación de las capas epiteliales corneales frente a los peligrosos efectos de los rayos UV-A.

Con las nuevas disoluciones de riboflavina en dextrano y al menos un vehículo (potenciador de la penetración) elegido entre los propuestos en este documento, es posible llevar a cabo el tratamiento de entrecruzamiento, por ejemplo, para tratamiento del queratocono, sin la eliminación preventiva del epitelio corneal. Al no eliminar el epitelio corneal se evitan:

1) dolencias debidas a la irritación que se produce típicamente en los primeros días después del tratamiento de entrecruzamiento de acuerdo con el protocolo estándar;

2) la necesidad de aplicar una lente de contacto terapéutica después del tratamiento y, sobre todo,

3) los riesgos de infecciones corneales postoperatorias debidas a la eliminación del epitelio corneal. Además, se evitan intervenciones quirúrgicas en la córnea, por lo que es posible llevar a cabo el tratamiento en un ambulatorio, sin necesidad de un quirófano ni de un microscopio quirúrgico.

Las nuevas disoluciones podrían administrarse también en forma de colirio o gel o aplicarse sobre lentes de contacto terapéuticas antes de la exposición a los rayos solares, especialmente durante el verano, para aumentar el efecto de entrecruzamiento natural debido a la irradiación de la riboflavina con la luz del sol.

- 5 Además, las nuevas disoluciones podrían proteger las estructuras internas del globo ocular frente a los rayos UV-A y usarse, de este modo, para protección frente a la degeneración macular y/o prevención de cataratas en personas de riesgo, expuestas durante muchas horas a la luz del sol.

- Solo con el fin de preservar las nuevas disoluciones durante el mayor tiempo posible en envases que no son de
10 dosis única, puede añadirseles cloruro de benzalconio en una concentración comprendida entre el 0,0001% y el 0,02%, preferentemente en una concentración de aproximadamente el 0,01%. Si las nuevas disoluciones han de producirse y comercializarse en envases desechables de dosis única, la adición de cloruro de benzalconio no es indispensable. Además, a las composiciones pueden añadirse conservantes, agentes antimicrobianos, antimicóticos, excipientes (solo como ejemplo, ácido acético) y, en general, cualquier sustancia usada en el ámbito de la
15 oftalmología para preparar disoluciones oftálmicas estables y estériles y/o favorecer su asimilación.

- Según se ha indicado previamente, los solicitantes creen que el buen rendimiento de la composición obtenida añadiendo a la riboflavina al menos una sustancia elegida de entre vitamina Q, L-prolina, glicina, clorhidrato de lisina y L-leucina se debe parcialmente a que estas últimas sustancias son aminoácidos esenciales o condicionalmente
20 esenciales, por lo que tendrían una función citoreparadora a través de un aumento de la metaloproteína MMP9. Esto lleva a concluir que podría ser posible obtener unos resultados similares a los obtenidos con las nuevas composiciones primera, segunda, tercera y cuarta mediante la adición a una disolución de riboflavina, por ejemplo, a la disolución estándar de riboflavina en dextrano, de al menos una sustancia adaptada al aumento de la metaloproteína MMP9, probablemente en una concentración comprendida entre el 0,00001% y el 0,5%.

- Entre las sustancias anteriores, adaptadas a aumentar la metaloproteína MMP9, es digna de mención la genisteína (5,7-dihidroxi-3-(4-hidroxifenil)cromen-4-ona), fitoestrógenos, citocinas y los denominados fármacos AINE (fármacos antiinflamatorios no esteroideos). Entre los fármacos AINE adaptados para su uso en la preparación de una disolución oftálmica de riboflavina, son dignos de mención:

- 30 ácido acetilsalicílico (ácido 2-acetoxibenzoico), ácido flufenámico (ácido 2-[[3-(trifluorometil)fenil]amino]benzoico), ácido meclofenámico (2-[[2,6-dicloro-3-metilfenil]amino]benzoico), ácido mefenámico (ácido 2-(2,3-dimetilfenil)aminobenzoico), ácido niflúmico (ácido 2-[[3-(trifluorometil)fenil]amino]nicotínico), ácido tolfenámico (ácido 2-[[3-cloro-2-metilfenil]amino]benzoico), benorilato (2-(acetiloxi)benzoato de 4-(acetilamino)fenilo), carprofeno
35 (ácido (RS)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)propanoico), celecoxib (4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)pirazol-1-il]bencenosulfonamida), cinoxicam (cinamato de piroxicam o (E)-3-fenilprop-2-enoato de [9-metil-10,10-dioxo-8-(piridin-2-ilcarbamoil)-10λ⁶-tia-9-azabicyclo[4.4.0]deca-1,3,5,7-tetraen-7-ilo]), diflunisal (ácido 2',4'-difluoro-4-hidroxibifenil-3-carboxílico), diclofenaco (ácido 2-[2-[[2,6-diclorofenil]amino]fenil]acético), droxicam (6,6-dióxido de 5-metil-3-(2-piridinil)-2H,5H-1,3-oxazino(5,6-c)(1,2)benzotiazina-2,4(3H)-diona), etodolaco (ácido (RS)-2-(1,8-dietil-4,9-dihidro-3H-pirano[3,4-b]indol-1-il)acético), etoricoxib (5-cloro-6'-metil-3-[4-(metilsulfonil)fenil]-2,3'-bipiridina),
40 fenoprofeno (ácido 2-(3-fenoxifenil)propanoico), flurbiprofeno (ácido (RS)-2-(2-fluorobifenil-4-il)propanoico), ibufenaco (ácido 4-isobutilfenilacético), ibuprofeno (ácido (RS)-2-(4-(2-metilpropil)fenil)propanoico), indometacina (ácido 2-{1-[(4-clorofenil)carbonil]-5-metoxi-2-metil-1H-indol-3-il}acético), ketoprofeno (ácido (RS)-2-(3-benzoilfenil)propanoico), ketorolaco (ácido (±)-5-benzoil-2,3-dihidro-1H-pirrolizina-1-carboxílico, 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol), lornoxicam (1,1-dióxido de (3E)-6-cloro-3-[hidroxipiridin-2-ilamino]metileno]-2-metil-2,3-dihidro-4H-tieno[2,3-e](1,2)tiazin-4-ona), lumiracoxib (ácido {2-[[2-cloro-6-fluorofenil]amino]-5-metilfenil}acético), meloxicam (1,1-dióxido de 4-hidroxi-2-metil-N-(5-metil-2-tiazolil)-2H-1,2-benzotiazina-3-carboxamida), metamizol
45 ((2,3-dihidro-1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-1H-pirazol-4-il)metilamino)metanosulfonato de sodio), naproxeno (ácido (+)-(S)-2-(6-metoxinaftalen-2-il)propanoico), nimesulida (N-(4-nitro-2-fenoxifenil)metanosulfonamida), oxaprozina (ácido 3-(4,5-difenil-1,3-oxazol-2-il)propanoico), parecoxib (N-[[4-(5-metil-3-fenilisoxazol-4-il)fenil]sulfonil]propanamida), piroxicam ((8E)-8-[hidroxipiridin-2-ilamino]metilideno]-9-metil-10,10-dioxo-10λ⁶-tia-9-azabicyclo[4.4.0]deca-1,3,5-trien-7-ona), rofecoxib (4-(4-metilsulfonilfenil)-3-fenil-5H-furan-2-ona), sulindaco (ácido {(1Z)-5-fluoro-2-metil-1-[4-(metilsulfonil)benzideno]-1H-inden-3-il}acético), sudoxicam (1,1-dióxido de 4-hidroxi-2-metil-N(2)-tiazolil-2H-1,2-benzotiazina-3-carboxamida), tenoxicam (1,1-dióxido de (3E)-3-[hidroxipiridin-2-ilamino]metileno]-2-methyl-2,3-dihidro-4H-tieno[2,3-e][1,2]tiazin-4-ona), valdecocib (4-(5-metil-3-fenilisoxazol-4-il)bencenosulfonamida). Solo los
55 compuestos reivindicados son parte de la invención.

Además, los solicitantes consideran posible la obtención de resultados similares a los de las nuevas composiciones primera, segunda, tercera y cuarta mediante la adición a una disolución de riboflavina, por ejemplo, a una disolución

de riboflavina en dextrano, de al menos un aminoácido esencial o condicionalmente esencial. Entre las sustancias potencialmente útiles, la más prometedora parece ser L-arginina. Esta puede mezclarse con una disolución de riboflavina, por ejemplo, la disolución estándar de riboflavina en dextrano, y eventualmente además con una o más de las sustancias mencionadas anteriormente para la obtención de nuevas disoluciones. Aún cuando todavía no se han probado todas estas sustancias, los solicitantes consideran razonable que todos los aminoácidos esenciales o condicionalmente esenciales pueden usarse de manera válida para facilitar la penetración de la riboflavina a través del epitelio corneal y de este modo proteger la córnea frente a los rayos UV-A y frente a los rayos solares absorbidos por la riboflavina. En particular, parece razonable considerar la L-arginina como un vehículo válido al igual que las sustancias propuestas anteriormente, ya que parece razonable presumir que la L-arginina, que es un precursor aminoácido del óxido de nitrógeno, puede liberar óxido de nitrógeno (NO) a niveles periféricos. El uso de óxido de nitrógeno (NO) para el tratamiento de pacientes afectados por queratocono por administración por vía tópica sobre el epitelio corneal de una sustancia que contiene NO disuelto se ve dificultada por la baja solubilidad del NO.

Todavía ha de determinarse experimentalmente en qué grado la L-arginina y los otros aminoácidos esenciales protegen las microvellosidades del epitelio frente a los rayos UV-A usados en el tratamiento de entrecruzamiento. Si los otros aminoácidos esenciales o condicionalmente esenciales y, en particular, L-arginina, demuestran ser útiles, según lo esperado, para la preparación de disoluciones oftálmicas que permitan un tratamiento de entrecruzamiento transepitelial preservando a la vez el epitelio corneal, según consideran razonable los solicitantes, se añadirán a una disolución de riboflavina, por ejemplo, una disolución estándar de riboflavina en dextrano, en una concentración comprendida entre el 0,0001% y el 0,5%. De acuerdo con una realización más preferida, la concentración de L-arginina o de otro aminoácido esencial o condicionalmente esencial varía entre el 0,001% y el 0,4%. De acuerdo con otra realización aún más preferida, la concentración varía entre el 0,005% y el 0,3%. De acuerdo con otra realización aún más preferida, la concentración varía entre el 0,01% y el 0,2%. De acuerdo con otra realización aún más preferida, la concentración de L-arginina o de otro aminoácido esencial o condicionalmente esencial es de aproximadamente el 0,1%.

Como opción, es posible añadir L-arginina y/o cualquier otro aminoácido esencial o condicionalmente esencial a cualquiera de las nuevas disoluciones propuestas.

La dosis de las nuevas disoluciones oftálmicas depende de la patología diagnosticada y de su gravedad. De forma indicativa, se considera que la dosis puede variar entre una gota en el ojo por día hasta un máximo de una gota en el ojo por hora.

REFERENCIAS

- 1 Seiler T., Spoerl E., Huhle M., Kamouna A. Conservative therapy of keratoconus by enhancement of collagen cross-links. Invest Ophthalmol. Vis. Sci. 1996;37:S1017.
- 2 Seiler T., Quirke AW. Iatrogenic keratectasia after LASIK in a case of forme fruste keratoconus. J Cat Refract Surg. 1998;24:1007-1009.
- 3 Spoerl E., Huhle M., Seiler T. "Induction of cross-links in corneal tissue", Exp Eye Res. 1998;66:97-103.
- 4 Mazzotta C., Traversi C., Baiocchi S., Sergio P., Caporossi T., Caporossi A. "Conservative treatment of keratoconus by riboflavin-uva-induced cross-linking of corneal collagen: qualitative investigation" Eur J Ophthalmol. 2006;16:530-5.
- 5 Caporossi A., Baiocchi S., Mazzotta C., Traversi C., Caporossi T. "Parasurgical therapy for keratoconus by riboflavin-ultraviolet type A rays induced cross-linking of corneal collagen: preliminary refractive results in an Italian study" J Cataract Refract Surg. 2006;32:837-45.
- 6 Spoerl E., Seiler T. "Techniques for stiffening the cornea" J Refract Surg. 1999;15:711-713.
- 7 Hagele G., Boxer Wachler BS. "Corneal Collagen Crosslinking with Riboflavin (C3-R) for corneal stabilization" Presented at the International Congress of Corneal Cross Linking (CCL). December 9-10, 2005. Zurich, Switzerland.
- 8 Pinelli, R. "C3-Riboflavin for the treatment of keratoconus" J Cataract & Refractive Surgery Today Europe. 2006; 1:49-50.

- 9 Pinelli R. "Eyeword", 2007;5:34-40.
- 10 Linda J. Müller, Elisabeth Pels, Gijs F. J. M. Vrensen: "The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature". Br J Ophthalmol 2001;85:437-443 (April).
- 5 11 Mau T. Tran¹, Robert N. Lausch² and John E. Oakes: "Substance P Differentially Stimulates IL-8 Synthesis in Human Corneal Epithelial Cells" Investigative Ophthalmology and Visual Science. 2000;41:3871-3877.
- 10 12 L.J. Muller, L. Pels and GF. Vrensen: "Novel aspects of the ultrastructural organization of human corneal keratocytes" Investigative Ophthalmology & Visual Science, Vol 36, 2557-2567.
- 15 13 G. Perrella, P. Brusini, R. Spelat, P. Hossain, A. Hopkinson, H. S. Dua: "Expression of haematopoietic stem cell markers, CD133 and CD34 on human corneal keratocytes" British Journal of Ophthalmology 2007; 91:94-99.
- 20 14 Tadashi Senoo, and Nancy C. Joyce: "Cell Cycle Kinetics in Corneal Endothelium from Old and Young Donors" Investigative Ophthalmology and Visual Science. 2000; 41:660-667.
- 15 15 L.J. Muller, L. Pels and GF. Vrensen: "Ultrastructural organization of human corneal nerves" Investigative Ophthalmology & Visual Science, Vol 37, 476-488.
- 25 16 Italian patent application No. MI2007A002162, 14 Nov. 2007, R. Pinelli, "Collirio per il trattamento del cheratocono con tecnica cross-linking trans-epiteliale".
- 17 R. Pinelli, A. J. Kannelopoulos, B. S. B. Wachler, E. Spoerl, A. Ertan, S. L. Trokel, "C3-Riboflavin treatments: Where did we come from? Where are we now?", Cataract & Refractive Surgery Today Europe, Summer 2007.
- 18 Ashim K. Mitra, "Ophthalmic Drug Delivery Systems", Second Edition: Revised And Expanded, Marcell Dekker Inc., NY, 2003.

REIVINDICACIONES

1. Una disolución oftálmica que contiene riboflavina y al menos un compuesto elegido del grupo que consta de coenzima Q, L-prolina, glicina, clorhidrato de lisina, L-leucina, L-arginina y vitamina E para uso en la protección de las estructuras internas del globo ocular frente a los rayos UV-A en un paciente o para uso en el tratamiento del queratocono con una técnica de entrecruzamiento transepitelial.
2. La disolución oftálmica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, que contiene riboflavina, vitamina E y al menos un compuesto elegido del grupo que consta de coenzima Q, L-prolina, glicina, clorhidrato de lisina, L-leucina y L-arginina.
3. La disolución oftálmica para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, que comprende una disolución de riboflavina en dextrano con una concentración elegida en el intervalo del 0,0001% al 0,5% y al menos uno de los compuestos siguientes:
 - vitamina E en una concentración elegida en el intervalo de 0,0001 mg/100 ml a 2.000 mg/100 ml;
 - coenzima Q en una concentración elegida en el intervalo de 0,0001 mg/100 ml a 2.000 mg/100 ml;
 - L-prolina en una concentración elegida en el intervalo de 0,0001 mg/100 ml a 2.000 mg/100 ml;
 - glicina en una concentración elegida en el intervalo de 0,0001 mg/100 ml a 2.000 mg/100 ml;
 - clorhidrato de lisina en una concentración elegida en el intervalo de 0,0001 mg/100 ml a 2.000 mg/100 ml;
 - L-leucina en una concentración elegida en el intervalo de 0,0001 mg/100 ml a 2.000 mg/100 ml;
 - L-arginina en una concentración elegida en el intervalo del 0,00001 al 0,5%.
4. La disolución oftálmica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3, que comprende una disolución de riboflavina en dextrano con una concentración de aproximadamente el 0,1% y al menos uno de los compuestos siguientes:
 - vitamina E en una concentración de 500 mg/100 ml;
 - coenzima Q en una concentración de 100 mg/100 ml;
 - L-prolina en una concentración de 0,1 mg/100 ml;
 - glicina en una concentración de 0,1 mg/100 ml;
 - clorhidrato de lisina en una concentración de 0,05 mg/100 ml;
 - L-leucina en una concentración de 0,08 mg/100 ml;
 - L-arginina en una concentración del 0,1%.
5. La disolución oftálmica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende riboflavina al 0,1% en dextrano, 500 mg/100 ml de vitamina E TPGS (succinato de D- α -tocoferilpolietilenglicol 1.000), 100 mg/100 ml de coenzima Q, 0,1 mg/100 ml de L-prolina, 0,1 mg/100 ml de glicina, 0,05 mg/100 ml de clorhidrato de lisina y 0,08 mg/100 ml de L-leucina.
6. La disolución oftálmica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en forma de colirio o de gel oftálmico o en una forma adaptada para su aplicación sobre lentes de contacto terapéuticas.
7. Uso de riboflavina para la preparación de una disolución oftálmica que comprende un compuesto elegido del grupo que consta de coenzima Q, L-prolina, glicina, clorhidrato de lisina, L-leucina, L-arginina y vitamina E para la protección de las estructuras internas del globo ocular frente a los rayos UV-A en un paciente o para el tratamiento del queratocono con un entrecruzamiento transepitelial.

8. Un compuesto elegido del grupo que consta de coenzima Q, L-prolina, glicina, clorhidrato de lisina, L-leucina, L-arginina y vitamina E para uso para potenciar la penetración a través del epitelio corneal de una disolución oftálmica que comprende riboflavina para la protección de las estructuras internas del globo ocular frente a los rayos
- 5 UV-A en un paciente o para el tratamiento del queratocono con una técnica de entrecruzamiento transepitelial.

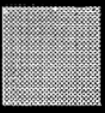
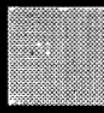
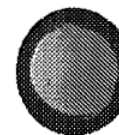
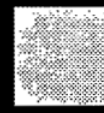
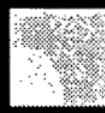
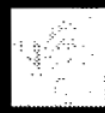
Puntuación	Escala visual estándar	Dilución 0,1% unidades/ μ l	Escala fluorimétrica unidades/ μ l	Escala de color Porcentaje de amarillo
10		50/0		 100%
8		40/10		 96%
6		30/20		 92%
4		20/30		 87%
2		10/40		 73%
0		0/50		 20%

FIG. 1

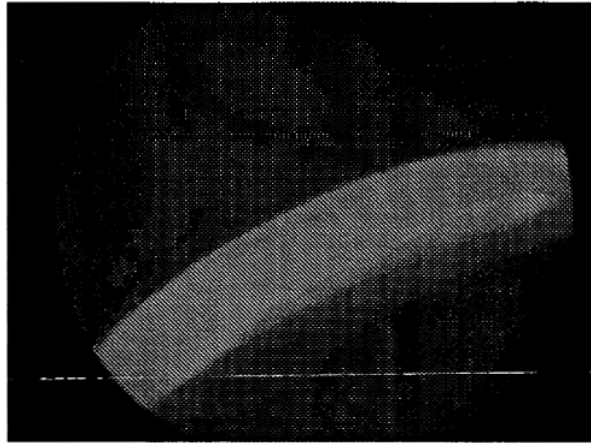


FIG. 2a

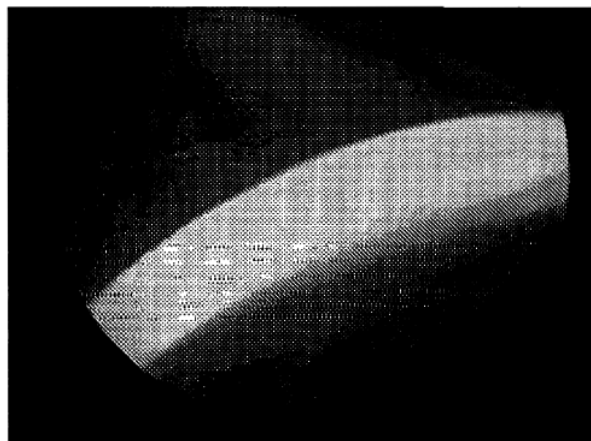


FIG. 2b

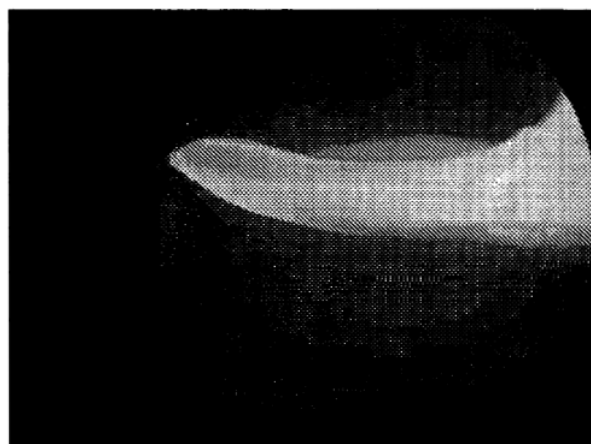


FIG. 2c

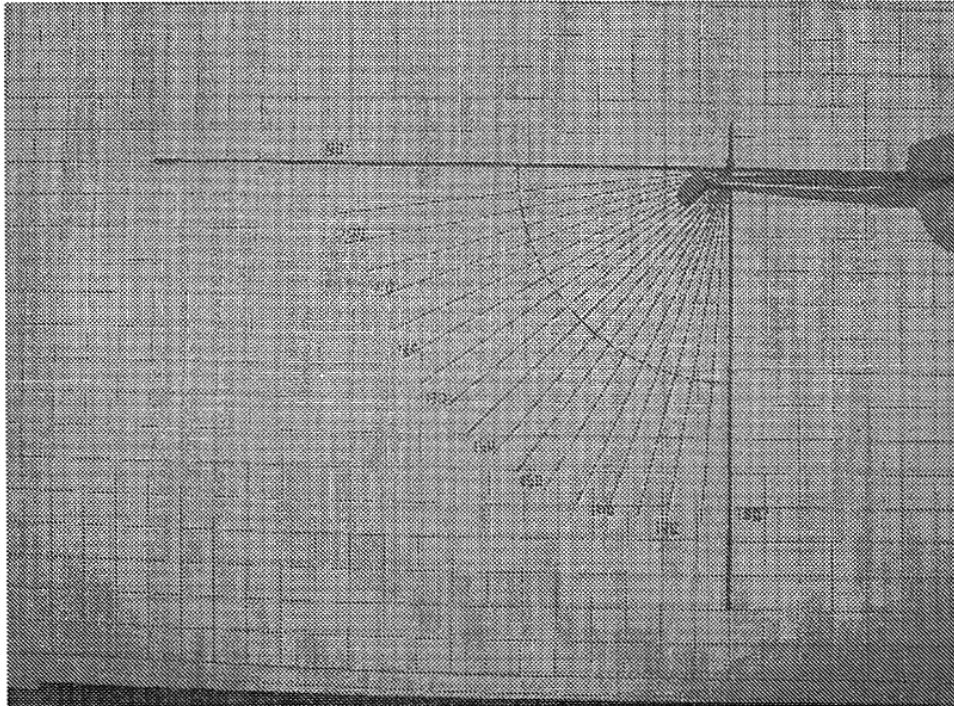


FIG. 3a

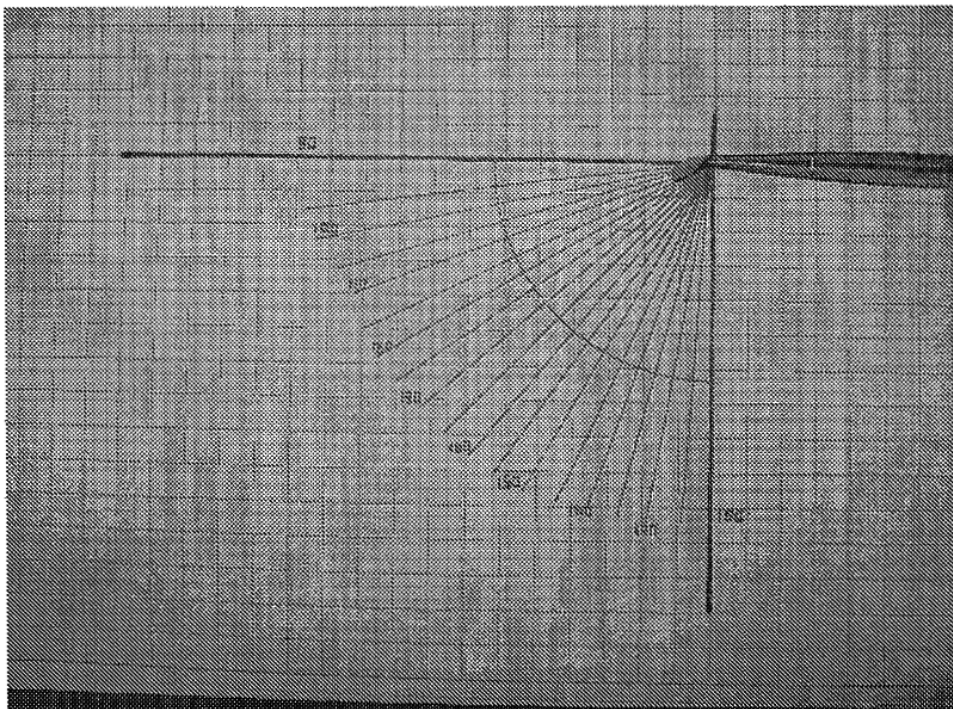


FIG. 3b

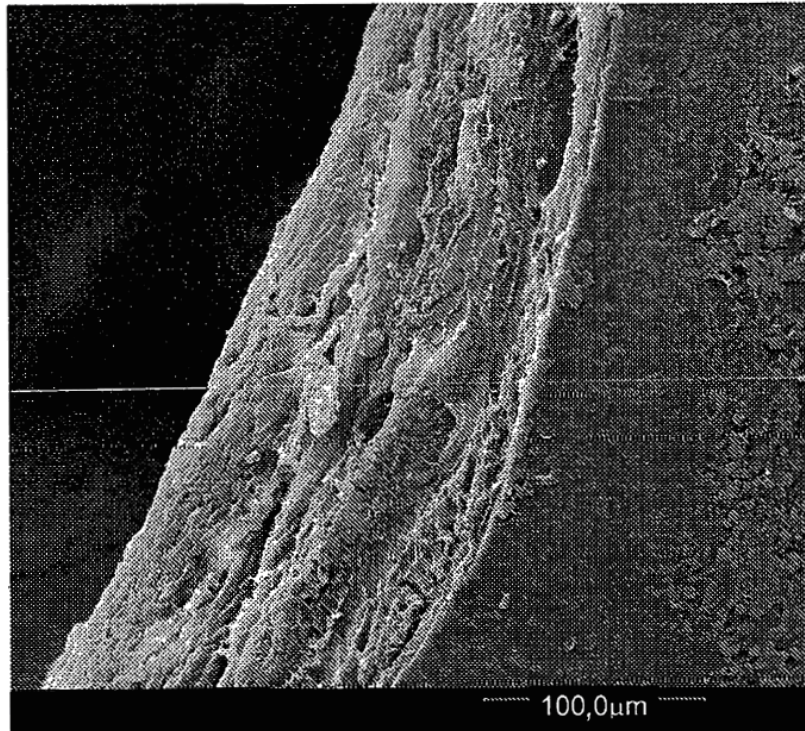


FIG. 4

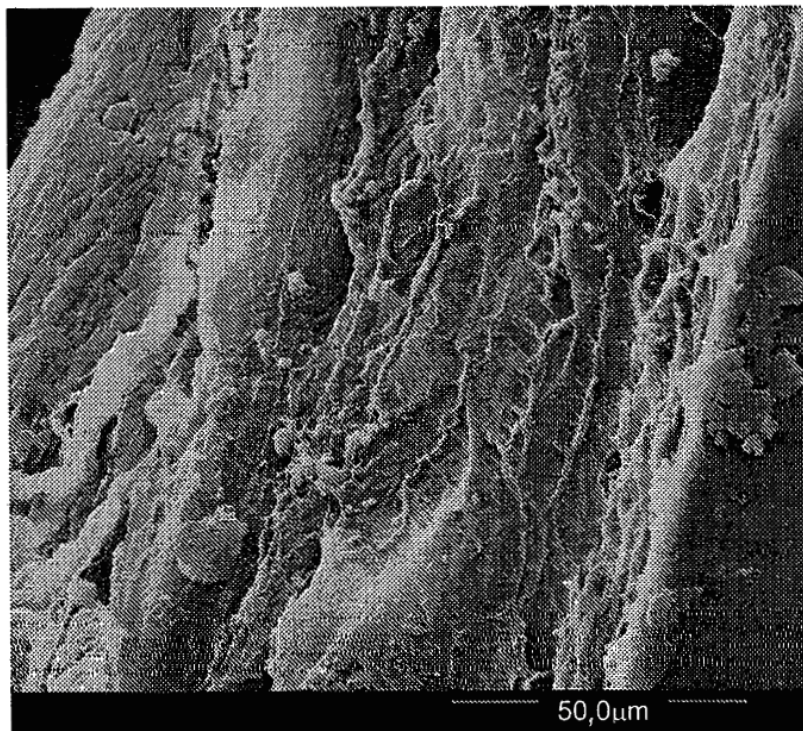


FIG. 5

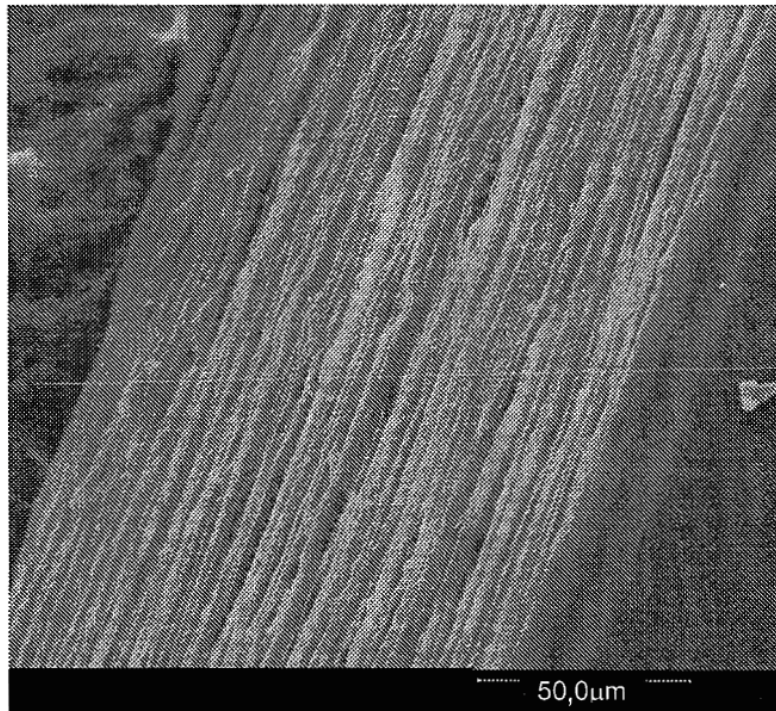


FIG. 6

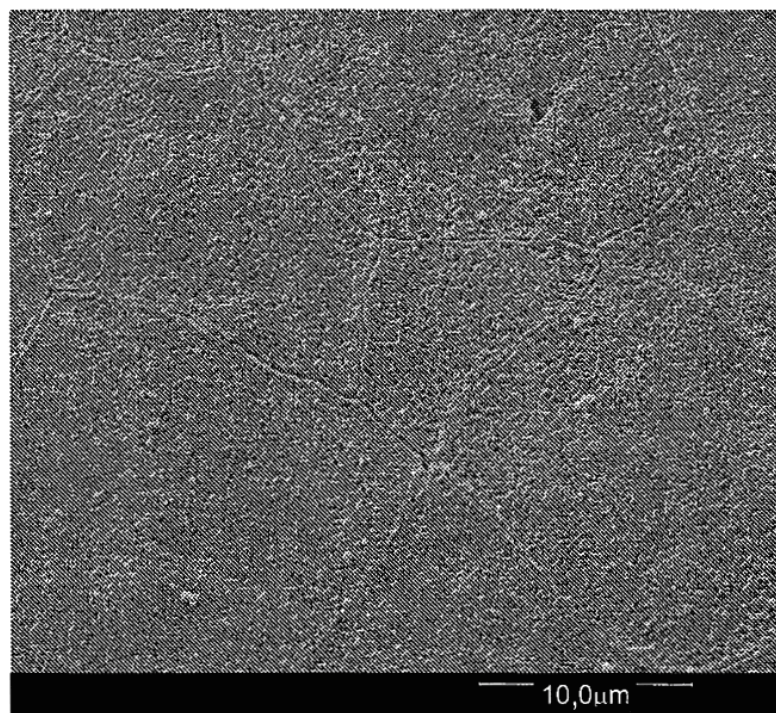


FIG. 7

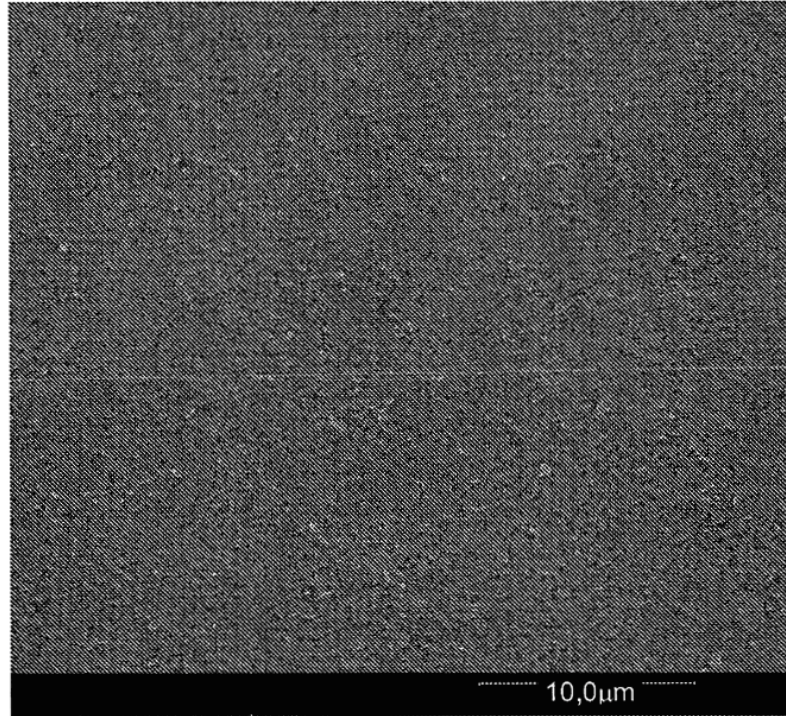


FIG. 8

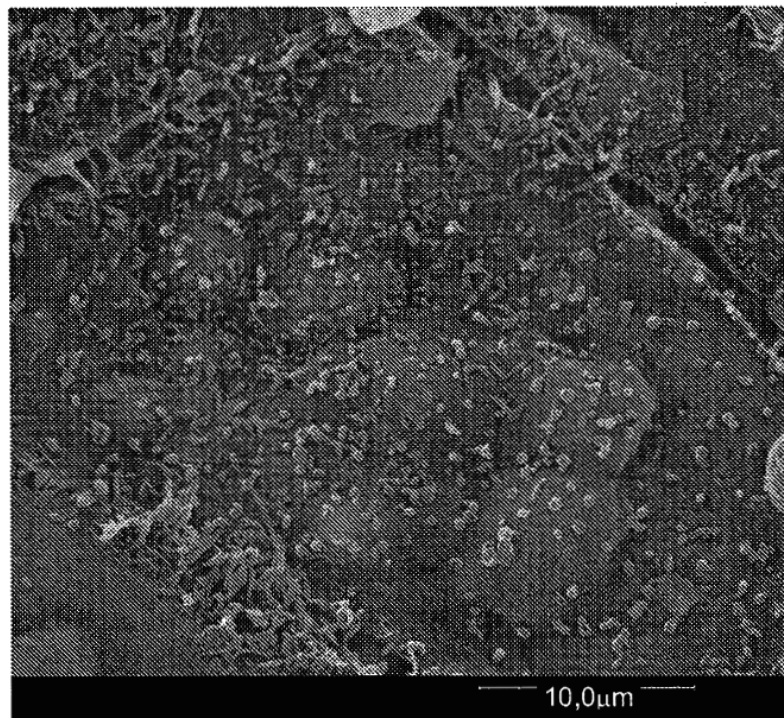


FIG. 9

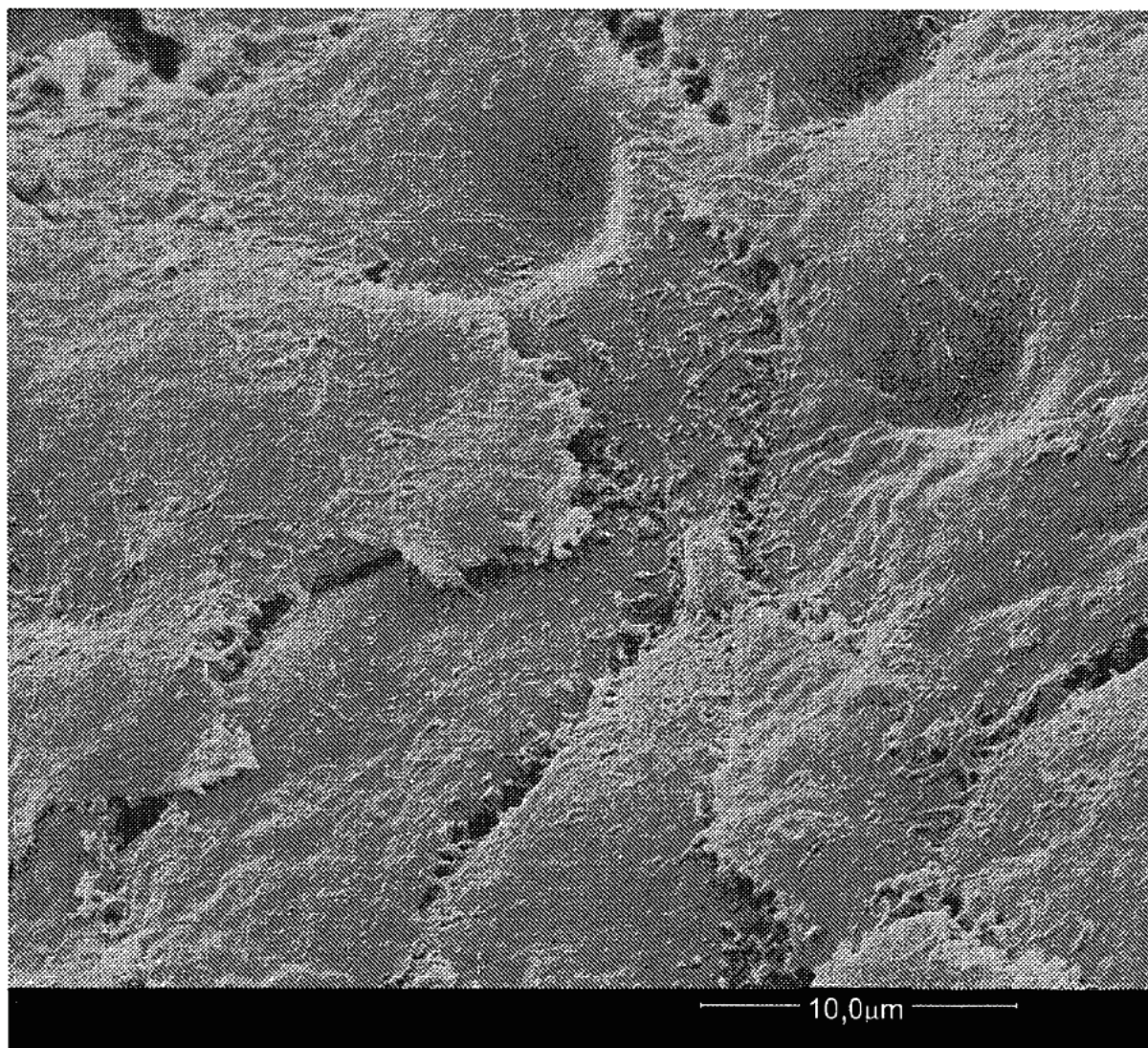


FIG. 10