

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 472 440**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7016 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2009 E 09822176 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2014 EP 2361627**

54 Título: **Composición para la prevención o tratamiento de enfermedades oculares**

30 Prioridad:

20.10.2008 KR 20080102660

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

01.07.2014

73 Titular/es:

BENEBIOSIS CO., LTD. (50.0%)
911Ho, 923Ho KGIT Sangam Center 1-danji 1601
Sangda-dong Mapo-gu
Seoul 121-270, KR y
SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY FOUNDATION
FOR CORPORATE COLLABORATION (50.0%)

72 Inventor/es:

KANG, SEUNG WOO;
KIM, CHEORL-HO y
KIM, SEOK-JO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 472 440 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

Composición para la prevención o tratamiento de enfermedades oculares.

Campo de la técnica

5 La presente invención se refiere a una composición para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades oculares y una composición de lágrimas artificiales.

Técnica anterior

10 El síndrome del ojo seco es una enfermedad habitual con una tasa de prevalencia del 5,5-15% en función de la población, la edad y el diagnóstico convencional (1,2). La enfermedad se caracteriza por dolor, superficie irregular de la córnea, visión borrosa y fluctuante e incremento del riesgo de úlcera corneana (3,4). Se sabe que el cambio en la permeabilidad de la córnea causado por la sequedad ocular crónica y la queratitis seca resultante de la película lagrimal inestable causa inflamaciones, que se ha demostrado por el aumento de la inflamación mediada por quimioquinas y citoquinas en las lágrimas, aumento de la actividad inmunológica y la expresión de moléculas de adhesión (HLA -DR y la molécula de adhesión intercelular 1 [ICAM-1]) por las células epiteliales de la conjuntiva, y el aumento de los linfocitos T en la conjuntiva (5,6). La úlcera corneal resultante de la queratoconjuntivitis seca (KCS) puede conducir a problemas de visión, pérdida de la visión e incluso ceguera (7,8). Se ha notificado que el nivel y la actividad de las metaloproteinasas de matriz 9 (MMP-9) aumentan considerablemente no sólo en las lágrimas de los pacientes con síndrome de ojo seco (9), sino también en el epitelio corneal y las lágrimas del ojo seco en ratones de investigación (EDE) (10).

20 Recientemente, se ha informado de forma consistente que la inflamación y la apoptosis en la superficie ocular desempeñan un papel importante en el desarrollo del síndrome de ojo seco (11). Se sabe que el estrés hiperosmótico y el aumento de citocinas inflamatorias (es decir, interleucina (IL) -1, factor de necrosis tumoral (TNF)- α y factor transformante de crecimiento (TGF)- β) asociado con el síndrome de ojo seco aumentan la expresión de MMP-9 por las células epiteliales de la córnea (12). Estos entornos inflamatorios crónicos se deben, en parte, a la degeneración patológica característica del epitelio conjuntival, tales como metaplasia escamosa y la pérdida de células caliciformes (13).

30 La angiogénesis, un proceso que implica el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, se conoce como un proceso fundamental en diversas afecciones fisiológicas y patológicas, incluyendo la cicatrización de heridas, el desarrollo embrionario, la inflamación crónica, y el desarrollo y transición de tumores (14,15). Además, se sabe que la angiogénesis participa en varias afecciones que pueden causar pérdida de la visión, como la retinopatía diabética, la degeneración macular, la retinopatía del prematuro y la oclusión venosa de la retina (16). Se sabe que los nuevos vasos sanguíneos crecen a partir de las venas preexistentes a través de una serie de procesos que incluyen la degradación de la membrana basal (MB) y la matriz extracelular (MEC) de las células endoteliales por la acción de proteasas (17,18), la proliferación y migración de células endoteliales (19) y la formación y la oclusión de tubos vasculares (20). Con respecto a la pérdida de la visión causada por daños en la retina asociados con la angiogénesis, se sabe que la supresión de uno o más de los procesos anteriores tiene un potencial valor terapéutico (16). La sialilactosa (NeuSAc α -2, 3-D-Gal β -1, 4-D-Glc) (fig. 1) es un ácido siálico que incluye glicoesfingolípido del gangliósido GM3 y habitualmente se encuentra en el plasma sanguíneo y la membrana celular de los mamíferos (12,22). Sin embargo, no ha habido investigación sobre la acción de sialilactosa sobre el síndrome del ojo seco u otras enfermedades oculares.

40 A lo largo de esta memoria descriptiva, se citan y referencian una serie de bibliografías y documentos de patente. La divulgación de las bibliografías y documentos de patente citados se incorpora en el presente documento como referencia para explicar con mayor claridad la técnica anterior y la presente invención.

Divulgación

45 Los inventores de la presente invención tienen como objetivo desarrollar una sustancia capaz de prevenir o tratar diversas enfermedades oculares. Como resultado, los inventores han encontrado que el sialiloligosacárido inhibe la expresión de MMP-9 y las citocinas inflamatorias (IL-1 β , TNF- α , etc) en el modelo animal de ojo seco e inhibe la activación mediada por VEGF de VEGFR-2 en las células endoteliales de la retina humana y, por lo tanto, es capaz de prevenir o tratar de forma eficaz enfermedadesde oculares, tales como el síndrome de ojo seco, la enfermedad inflamatoria ocular y la enfermedad ocular asociada con la neovascularización y los efectos secundarios asociados con el uso de lentes de contacto.

50 Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar una composición para la profilaxis o tratamiento de una enfermedad ocular.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición de lágrima artificial.

55 Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición para limpiar lentes de contacto, lubricantes o de embalaje.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para limpiar, lubricar o embalar lentes de contacto.

Descripción de las figuras

5 Los objetos, características y ventajas anteriores y adicionales de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción de realizaciones preferidas junto con los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 muestra la estructura de la sialilactosa, un ingrediente activo de la presente invención;
La figura 2 muestra el resultado de la RT-PCR que muestra la expresión de ARN de MMP-9, TNF- α e IL-1 β en las células epiteliales de la córnea en el grupo sin tratar (ST) y el grupo de ojo seco experimental (EDE) [SL significa sialilactosa];

10 La figura. 3 muestra un cimograma que muestra dos bandas de MMP-9 en el grupo sin tratamiento (ST) y el grupo de ojo seco experimental (EDE) [SL es sinónimo de sialilactosa];

La figura 4 muestra el resultado de una SDS-PAGE que muestra el efecto de la inhibición con sialilactosa de la fosforilación de VEGFR-2 inducida por VEGF.

15 La figura 5 muestra micrografías ópticas Nikon que muestran el efecto de inhibición de la formación de tubos inducida por VEGF en células endoteliales de la retina humana (HREC) *in vitro*;

La figura 6 muestra micrografías de fluorescencia que muestran el efecto de la inhibición con sialilactosa del ensamblaje inducido VEGF que tiene adhesiones focales en HREC [las flechas blancas representan puntos de tinción de anti-FAK (B) y anti-paxilina (F), respectivamente.]; y

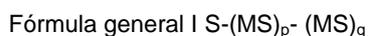
20 La figura 7 muestra micrografías de fluorescencia que muestran el efecto de la inhibición con sialilactosa de la adhesión intercelular inducida por VEGF en HREC [las flechas blancas representan la escisión de la sialilactosa, por la ceramida glicanasa].

Mejor modo

En lo sucesivo en el presente documento, las realizaciones de la presente invención se describirán en detalle con referencia a los dibujos adjuntos.

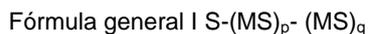
25 A menos que se defina lo contrario, todos los términos (incluyendo términos técnicos y científicos) tienen el significado entendido habitualmente por un experto ordinario en la técnica. En la descripción y dibujos siguientes, los detalles de las características y las técnicas bien conocidas se pueden omitir para evitar oscurecer innecesariamente la presente invención.

30 En una forma de realización, la presente invención proporciona una composición para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad ocular que comprende un compuesto representado por la fórmula general I, una sal del mismo, un hidrato del mismo o un solvato del mismo como un ingrediente activo:



en la que S representa un ácido siálico, y (MS)_p y (MS)_q representan independientemente un residuo monosacárido.

35 En otra forma de realización de la presente invención, la presente invención proporciona un procedimiento para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad ocular que comprende la administración a un sujeto de una composición que comprende un compuesto representado por la fórmula general I, una sal del mismo, un hidrato del mismo o un solvato del mismo como ingrediente activo:



en la que S representa un ácido siálico, y (MS)_p y (MS)_q representan independientemente un residuo monosacárido.

40 Los inventores de la presente invención tenían como objetivo desarrollar una sustancia capaz de prevenir o tratar diversas enfermedades oculares. Como resultado, los inventores han encontrado que el sialiloligosacárido inhibe la expresión de MMP-9 y las citocinas inflamatorias (IL-1 β , TNF- α , etc) en el modelo animal de ojo seco e inhibe la activación de VEGFR-2 mediada por VEGF en las células endoteliales la retina humana (HREC) y, por lo tanto, se pueden utilizar para prevenir o tratar de forma eficaz enfermedades oculares, tales como el síndrome de ojo seco, la enfermedad inflamatoria ocular y la enfermedad ocular asociada con la neovascularización y los efectos secundarios asociados con el uso de lentes de contacto.

45 En la presente invención, el ingrediente activo es un compuesto representado por la fórmula general I. En la fórmula general I, S representa ácido siálico. El ácido siálico puede estar unido a (EM)_p de diversas maneras. Lo más preferentemente, está unido al compuesto monosacárido (MS)_p a través de un enlace α -2, 3. Además del ácido siálico, S puede ser ácido siálico modificado. Por ejemplo, S puede ser ácido siálico modificado con el grupo - OH en la posición C (por ejemplo, alquilo C₁-C₄). Lo más preferentemente, S es ácido siálico sin modificar.

50 Los compuestos de monosacáridos (MS)_p y (MS)_q pueden ser cualquier compuesto monosacárido conocido en la técnica. Por ejemplo, se incluyen tetrosas (por ejemplo, eritrosa y treosa), pentosas (por ejemplo, ribosa, arabinosa,

xilosa y lixosa) y hexosas (alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa y talosa). Los compuestos de monosacáridos (MS)_p y (MS)_q pueden ser, preferentemente, una pentosa o una hexosa, más preferentemente una hexosa, más preferentemente además glucosa, manosa o galactosa, y lo más preferentemente, glucosa o galactosa. Los compuestos de monosacáridos (MS)_p y (MS)_q pueden ser un D- o L-estereoisómero, lo más preferentemente un D-estereoisómero.

(MS)_p y (MS)_q puede ser el mismo compuesto monosacárido o uno diferente. Preferentemente, son compuestos monosacáridos diferentes.

De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, (MS)_p es galactosa o glucosa, y (MS)_q es glucosa o galactosa. Lo más preferentemente, (MS)_p es galactosa y (MS)_q es glucosa. Cuando (MS)_p es galactosa y (MS)_q es glucosa, se obtiene el compuesto disacárido lactosa.

Los compuestos de monosacáridos (MS)_p y (MS)_q pueden estar modificados o sin modificar. Por ejemplo, puede usarse un compuesto monosacárido con el grupo OH unido a acetilo o N-acetilo. Preferentemente, los compuestos de monosacáridos (MS)_p y (MS)_q son compuestos de monosacárido sin modificar.

La realización más preferida del compuesto representado por la fórmula general I, que se utiliza como el ingrediente eficaz en la presente invención, es ácido siálico-galactosa-glucosa. El ácido siálico-galactosa-glucosa se llama sialillactosa.

En la composición de la presente invención, además del compuesto descrito anteriormente en sí, se puede usar una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato o solvato del mismo como el ingrediente eficaz.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal del compuesto que produce el efecto farmacológico deseado, es decir, la inhibición de la expresión de MMP-9 y de citocinas inflamatorias (IL-1 β , TNF- α , etc) en las células epiteliales de la córnea y la inhibición de la activación de VEGFR-2 mediada por VEGF en células endoteliales de la retina. La sal se forma mediante el uso de un ácido inorgánico (por ejemplo, clorhidrato, bromhidrato y yodhidrato) o un ácido orgánico (por ejemplo, acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, benzenosulfoate, *p*-toluenosulfoate, bisulfato, sulfamato, sulfato, naftalato, butirato, citrato, alcanforato, alcanforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftalensulfonato, nicotinato, oxalato, tosilato y undecanoato).

La expresión "hidrato farmacéuticamente aceptable" se refiere a un hidrato del compuesto que produce el efecto farmacológico deseado. La expresión "solvato farmacéuticamente aceptable" se refiere a un solvato del compuesto que produce el efecto farmacológico deseado. El hidrato y el solvato también se pueden preparar usando los ácidos antes mencionados.

La composición de la presente invención que comprende el compuesto representado por la fórmula general I o la sal farmacéuticamente aceptable, hidrato o solvato del mismo como ingrediente activo inhibe la expresión de MMP-9 y las citocinas inflamatorias (IL-1 β , TNF- α , etc) en las células epiteliales de la córnea e inhibe la activación de VEGFR-2 mediada por VEGF en HREC, exhibiendo de ese modo la actividad profiláctica o terapéutica para enfermedades oculares, tales como el síndrome de ojo seco, la enfermedad inflamatoria ocular y la enfermedad ocular asociada con neovascularización.

De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, las enfermedades oculares que pueden prevenirse o tratarse con la composición de la presente invención son el síndrome de ojo seco, enfermedad inflamatoria ocular, enfermedad ocular asociada con neovascularización de la retina y los efectos secundarios asociados con el uso de contacto lentes.

De acuerdo con una forma de realización más preferida de la presente invención, la enfermedad ocular que puede prevenirse o tratarse con la composición de la presente invención es el síndrome de ojo seco.

De acuerdo con otra forma de realización más preferida de la presente invención, las enfermedades inflamatorias oculares que pueden prevenirse o tratarse con la composición de la presente invención es la disfunción de la glándula de Meibomio, el síndrome de Stevens-Johnson, el síndrome de Sjogren, uveítis o queratitis.

De acuerdo con una forma de realización más preferida de la presente invención, la enfermedad ocular asociada con neovascularización de la retina que puede prevenirse o tratarse con la composición de la presente invención es la retinopatía diabética, la degeneración macular, la retinopatía del prematuro, el rechazo de injerto de córnea, la fibroplasia retrolental, el glaucoma neovascular, la neovascularización del iris, la neovascularización de la retina, la hipoxia, tumor ocular o tracoma. Lo más preferentemente, la composición de la presente invención inhibe la activación mediada por VEGF de VEGFR-2 en HREC, y, de ese modo, inhibe la neovascularización de la retina.

De acuerdo con otra forma de realización más preferida de la presente invención, los efectos secundarios asociados con el uso de lentes de contacto que pueden prevenirse o tratarse con la composición de la presente invención son malestar, sequedad, sensación de ardor, sensación de pinchazos e inflamación no bacteriana causada por el uso de

lentes de contacto. La composición de la presente invención se puede preparar en una composición farmacéutica, una composición nutracéutica o una composición alimenticia.

5 De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, la composición de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende (a) una cantidad farmacéuticamente eficaz del compuesto representado por la fórmula general I, la sal del mismo, el hidrato del mismo o el solvato del mismo; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para lograr el efecto o la actividad del compuesto representado por la fórmula general I, la sal del mismo, el hidrato del mismo o el solvato del mismo.

10 Cuando se prepara la composición de la presente invención en una composición farmacéutica, la composición farmacéutica de la presente invención comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable comprendido en la composición farmacéutica de la presente invención es uno de uso habitual en formulaciones e incluye, entre otros lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma arábica, fosfato de calcio, alginato, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, metilcelulosa, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio, aceite mineral, etc. La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además de los ingredientes mencionados anteriormente, un lubricante, un agente humectante, un edulcorante, un aroma, un emulsionante, un agente de suspensión, un conservante, o similar. Vehículos y formulaciones farmacéuticamente aceptables adecuados se describen con detalle en Remington's Pharmaceutical Sciences (19^a ed., 1995).

20 La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por vía oral o parenteral. En caso de administración parenteral, se puede administrar mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, administración transdérmica, administración mucosa, administración ocular, o similares.

25 Una cantidad adecuada de la composición farmacéutica de la presente invención a administrar puede variar dependiendo de varios factores, incluyendo el procedimiento de formulación, el procedimiento de administración, la edad, el peso, el sexo o el estado de la enfermedad del paciente, la dieta, el momento de la administración, la vía de administración, la velocidad de eliminación y la sensibilidad de la respuesta. El ingrediente activo de la presente invención se puede administrar preferentemente, para un adulto, en una cantidad de 0,001-100 mg / kg (peso corporal) al día, más preferentemente de 0,01 a 80 mg / kg (peso corporal), lo más preferentemente 0,1- 60 mg / kg (peso corporal). También, según el juicio del médico o farmacéutico, se puede administrar una vez o varias veces al día. Especialmente, en el caso de la administración ocular, aproximadamente 0,001-3% (p / v, esta es también la misma a continuación en el presente documento), preferentemente de aproximadamente 0,01-1%, de la composición se administra una vez o varias veces al día.

35 La composición farmacéutica o nutracéutica de la presente invención puede prepararse de acuerdo con un procedimiento que pueden llevar a cabo convencionalmente los expertos en la técnica en formas de dosis única o en envases multi-dosis con un vehículo y / o excipiente farmacéuticamente aceptable.

40 De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, una formulación de la composición de la presente invención puede estar en la forma de una solución, suspensión, jarabe, emulsión, liposoma, extracto, polvo, polvo, gránulo, comprimido, formulación de liberación sostenida, gotas para los ojos, cápsula, limpiador de lentes de contacto o lubricante para lentes de contacto, y puede comprender, además, un dispersante o un estabilizador.

45 Más específicamente, de acuerdo con la vía de administración, una formulación sólida para la administración oral puede ser en forma de una cápsula, comprimido, píldora, polvo y gránulo. En la formulación sólida, el compuesto activo se puede mezclar con uno o más excipientes o vehículos inertes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, citrato de sodio o fosfato dicálcico) y / o a) carga o expansor (por ejemplo, almidón, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico), b) aglutinante (por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginato, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábica), c) humectante (por ejemplo, glicerol), d) disgregante (por ejemplo, agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio), e) retardador de la solución (por ejemplo, parafina), f) acelerador de la absorción (por ejemplo, compuesto de amonio cuaternario), g) agentes humectantes (por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol), h) adsorbente (por ejemplo, caolín y bentonita) e i) lubricante (por ejemplo, talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicol sólido, lauril sulfato sódico y mezcla de los mismos). En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la formulación puede comprender además un agente tampón.

55 Adicionalmente, además de un excipiente tal como lactosa o azúcar de la leche, polietilenglicol u otro polímero puede usarse en una cápsula de gelatina blanda o dura como carga.

Las formas de administración sólidas, tales como comprimidos, comprimidos recubiertos de azúcar, cápsula, píldora y gránulos se pueden recubrir con recubrimiento entérico u otro recubrimiento bien conocido en el campo farmacéutico. El recubrimiento puede comprender opcionalmente un opacificante, y la composición se puede

formular de tal manera que sólo el ingrediente activo se libere en un sitio particular en el tracto gastrointestinal de una manera sostenida o preferentemente. También, si es necesario, el compuesto activo se puede preparar en microcápsulas junto con el uno o más excipiente (s).

5 Especialmente, en el caso de la administración ocular, la composición de la presente invención se puede mezclar con agua purificada, agente isotónico (por ejemplo, cloruro de sodio, glicerina, etc), agente tensioactivo (por ejemplo, Polisorbato 80, alquil éter de polioxietileno, etc) , conservante (por ejemplo, edetato de sodio, sorbato de sodio, etc), agente tampón (por ejemplo, fosfato de sodio, etc), regulador de pH (por ejemplo, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, etc) y otros componentes farmacéuticos habituales para prepararse en una gota ocular por el procedimiento ordinario. La propiedad de líquido se prefiere que sea de pH casi neutro (pH 5 a 8), y también se prefiere la presión osmótica para que esté cerca de 1.

10 Las formulaciones líquidas para administración oral incluyen emulsiones farmacéuticamente aceptables, solución, suspensión, jarabe y elixir. Además del compuesto activo, la formulación líquida puede comprender un diluyente inertes usado habitualmente en la técnica tales como, entre otros, agua u otro disolvente, agente y emulsionante (por ejemplo, alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de solubilizar etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceite (en particular, semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, de oliva, de ricino o aceite de sésamo), glicerol, alcohol de tetrahidrofurilo, polietilenglicol y éster de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos. Además del diluyente inerte, la composición oral también puede comprender un adyuvante tal como un agente humectante, un emulsionante, un agente de suspensión, un edulcorante, un sabor y un perfume.

20 Una formulación para la administración rectal o vaginal es, preferentemente, un supositorio que se puede preparar mezclando el compuesto de la presente invención con un adyuvante no irritante adecuado o un vehículo (por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol o cera para supositorios) que sea sólido a temperatura ambiente pero que se licue a temperatura corporal y, por lo tanto, se funda en el recto o en la cavidad vaginal y libere el compuesto activo.

25 Las formulaciones adecuadas para inyección parenteral pueden incluir una solución dispersión, suspensión o emulsión acuosa u oleaginosa fisiológicamente aceptable estéril y polvo estéril que se puede disolver o dispersar para preparar la solución o dispersión inyectable estéril. Ejemplos de transportador diluyente, disolvente o vehículo acuosos u oleaginosos adecuados incluyen agua, etanol, poliol (propilenglicol, polietilenglicol, glicerol, etc), aceite vegetal (aceite de oliva), éster orgánicos inyectables (por ejemplo, oleato de etilo), y mezclas adecuadas de los mismos.

30 Además, la composición de la presente invención puede comprender un adyuvante tal como un conservante, un agente humectante, un emulsionante y un dispersante. La prevención de la acción de microorganismos se puede asegurar mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos (por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, etc). Puede ser también deseable incluir un agente isotónico, tal como azúcar, cloruro de sodio, etc. Además, la absorción prolongada de la formulación inyectable puede lograrse mediante la inclusión de un agente que retrase la absorción (por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina).

35 Una suspensión, además del compuesto activo, puede comprender un agente de suspensión (por ejemplo, etoxilados de alcohol de isoestearilo, sorbitol de polioxietileno y éster de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y goma de tragacanto, y mezclas de los mismos).

40 En algunos casos, con el fin de prolongar el efecto de un fármaco, es deseable ralentizar la absorción del fármaco en la inyección subcutánea o intramuscular .Esto se puede lograr por el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con poca solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y de la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una forma de fármaco administrada parenteralmente se logra disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo oleoso.

45 Una forma de depósito inyectable se hace formando matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables tales como polilactida-poglicólido. La tasa de liberación del fármaco puede determinarse dependiendo de la relación de fármaco a polímero y de la naturaleza del polímero particular empleado.

50 Ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli (ortoéster) y poli (anhídrido). Una formulación depot inyectable también se prepara atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con el tejido corporal.

Una formulación inyectable puede esterilizarse mediante, por ejemplo, filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o mediante la incorporación de un agente esterilizante en forma de una composición sólida estéril que pueda disolverse o dispersarse en agua estéril o en algún otro medio inyectable estéril inmediatamente antes utilizar.

55 De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, la composición de la presente invención es una composición para la administración oral, y está en forma de un liposoma o formulación de liberación sostenida.

De acuerdo con otra forma de realización preferida de la presente invención, la composición de la presente invención es una composición para administración parenteral y está en forma de un liposoma, formulación de liberación sostenida o gotas para los ojos.

5 La composición farmacéutica de la presente invención puede estar encapsulada en un liposoma para proporcionar estabilidad para la administración de fármacos. El liposoma empleado en la presente invención puede prepararse a partir de una mezcla de poliol, tensioactivo, fosfolípidos, ácidos grasos y agua (Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology*, (XIV), p. Ss 33et.(1976)).

10 El poliol usado para preparar el liposoma no está particularmente limitado y preferentemente incluye propilenglicol, dipropilenglicol, 1,3-butilenglicol, glicerina, methylpropanediol, isopreno glicol, glicol pentileno, eritritol, xilitol y sorbitol, más preferentemente propilenglicol.

15 El tensioactivo que puede usarse en la preparación del liposoma puede ser cualquier tensioactivo conocido en la técnica, y sus ejemplos incluyen un tensioactivo aniónico, un tensioactivo catiónico, un tensioactivo anfótero y un tensioactivo no iónico, preferentemente un tensioactivo aniónico y un no iónico tensioactivo. Ejemplos específicos del tensioactivo aniónico incluyen glutamato de alquilo, fosfato de alquilo, lactato de alquilo, fosfato de dialquilo y fosfato de trialquilo. Ejemplos específicos del agente tensioactivo no iónico incluyen éter alcoxilado de alquilo, éster de alquilo alcoxilado, poliglicósido de alquilo, éster de poliglicerina y éster de azúcar. Lo más preferentemente, se usan polisorbatos como agente tensioactivo no iónico.

20 El fosfolípido, otro componente utilizado en la preparación del liposoma, es un lípido anfótero, incluidos los fosfolípidos naturales (por ejemplo, lecitina de huevo, lecitina de soja o esfingomielina) y fosfolípidos sintéticos (por ejemplo, dipalmitoilfosfatidilcolina o lecitina hidrogenada), preferentemente lecitina. Más preferentemente, la lecitina es lecitina de origen natural saturada o insaturada extraída de soja o de yema de huevo. En general, la lecitina de origen natural contiene 23-95% de fosfatidilcolina y no más de 20% de fosfatidiletanolamina.

25 El ácido graso utilizado en la preparación del liposoma es un ácido graso superior, preferentemente un ácido graso saturado o insaturado que tiene una cadena de alquilo C_{12} - C_{22} e incluye, por ejemplo, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico y ácido linoleico. El agua utilizada en la preparación del liposoma es, en general, agua destilada desionizada.

El liposoma se puede preparar mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica. Más preferentemente, se prepara mediante la aplicación de una mezcla que incluye los componentes anteriormente mencionados en un homogeneizador de alta presión.

30 El sistema de liposomas preparado de este modo es ventajoso en cuanto a que puede maximizar la administración de fármacos mediante la disolución de diversos materiales poco solubles y, al mismo tiempo, la estabilización de materiales inestables.

35 La composición farmacéutica de la presente invención se puede preparar en una formulación de liberación sostenida para mantener continuamente un nivel eficaz en sangre del ingrediente activo, reduciendo así el número de la medicación y mejorando el cumplimiento.

La formulación de liberación sostenida se prepara añadiendo, además del ingrediente activo de la presente invención, un vehículo de liberación sostenida y otro adyuvante. El vehículo de liberación sostenida utilizado en la presente invención puede ser diversos vehículos de liberación sostenida conocidos en la técnica, preferentemente óxido de polietileno.

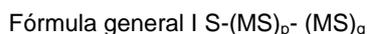
40 El otro adyuvante utilizado para preparar la formulación de liberación sostenida puede ser un vehículo diluyente de uso habitual en el campo farmacéutico. Ejemplos de los vehículos diluyentes usados para este fin incluyen lactosa, dextrina, almidón, celulosa microcristalina, fosfato de hidrógeno de calcio, carbonato de calcio, almidón, dióxido de silicio, etc. Además, puede incluirse un agente de deslizamiento para mejorar la capacidad de flujo, tal como estearato de zinc o estearato de magnesio, u otro adyuvante que se pueda utilizar en el campo farmacéutico.

45 En caso de que la composición de la presente invención se prepare en una composición de alimentos (o la composición de nutraceuticos), además de el compuesto representado por la Fórmula general I como ingrediente activo se pueden incluir ingredientes utilizados convencionalmente en la preparación de alimentos, por ejemplo, proteínas, hidratos de carbono, grasa, nutrientes, sazón y sabor. Ejemplos de hidratos de carbono incluyen monosacáridos, por ejemplo, glucosa, fructosa, etc; disacáridos, por ejemplo, maltosa, sacarosa, oligosacáridos, etc; y polisacáridos, tales como azúcares, por ejemplo, dextrina, ciclodextrina, etc y alcoholes de azúcar, por ejemplo, xilitol, sorbitol, eritritol, etc. El sabor puede ser un sabor natural [taumatina o extracto de stevia (por ejemplo, rebaudiósido A, glicirricina, etc)] o un sabor sintético (sacarina, aspartamo, etc.)

55 En caso de que la composición alimenticia de la presente invención se prepare en una bebida, además del compuesto de la presente invención representado por la Fórmula General I, se pueden incluir también, por ejemplo, ácido cítrico, fructosa líquida, sacarosa, glucosa, ácido acético, ácido málico, fruta jugo, extracto eucommia, extracto de azufaifo, extracto de regaliz, etc.

ES 2 472 440 T3

De acuerdo con otra realización de la presente invención, la presente invención proporciona una composición de lágrima artificial que comprende un compuesto representado por la fórmula general I, una sal del mismo, un hidrato del mismo o un solvato del mismo como un ingrediente eficaz:



5 en la que S representa un ácido siálico, y $(MS)_p$ y $(MS)_q$ representan independientemente un residuo monosacárido.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, la presente invención proporciona un procedimiento para lubricar o hidratar los ojos que comprende la aplicación tópica de una composición de lágrima artificial que comprende un compuesto representado por la fórmula general I, una sal del mismo, un hidrato del mismo o un solvato del mismo como un eficaz ingrediente para los ojos:

10 $\text{Fórmula general I } S-(MS)_p- (MS)_q$

en la que S representa un ácido siálico, y $(MS)_p$ y $(MS)_q$ representan independientemente un residuo monosacárido.

En la composición de lágrima artificial de la presente invención, el compuesto representado por la fórmula general I, la sal del mismo, el hidrato del mismo o el solvato del mismo, que se emplea como ingrediente eficaz, es el mismo como el ingrediente eficaz de la composición de la presente invención para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades oculares. Por lo tanto, se omitirá una descripción del mismo para evitar redundancias innecesarias.

15 De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, el ingrediente eficaz incluido en la composición de lágrima artificial de la presente invención estimula la secreción de lágrimas de la glándula lagrimal, exhibiendo de ese modo actividad profiláctica o terapéutica para el síndrome del ojo seco.

20 Además, la composición de lágrima artificial de la presente invención puede comprender un electrolito, un tensioactivo no iónico, un agente antibacteriano, un complejo de borato/poliol o un aminoácido de bajo peso molecular.

El electrolito que se incluye en la composición de lágrima artificial simula el contenido de sal del fluido de la lágrima natural, e incluye iones contenidos en el fluido de la lágrima natural. Por ejemplo, el electrolito usado en la presente invención puede ser potasio, calcio, magnesio y cinc, y sus concentraciones se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.403.598.

30 El tensioactivo no iónico que se incluye en la composición de la presente invención disminuye la tensión superficial de la composición de la presente invención y mejora la propagación de la composición sobre la de superficie de la córnea. El tensioactivo no iónico puede ser cualquier tensioactivo conocido en la técnica, preferentemente uno que tiene un valor HLB de 15 o superior. Ejemplos de tensioactivos no iónicos adecuados incluyen polisorbatos tales como Polisorbato 80 (Tween 80) y copolímeros de bloque que provienen de la adición de óxido de etileno y óxido de propileno a etilendiamina. La composición de lágrima artificial de la presente invención contendrá el tensioactivo no iónico en una cantidad suficiente para proporcionar la composición con una tensión superficial de aproximadamente 380 a aproximadamente 450 $\mu\text{N/cm}$, que corresponde a la tensión superficial del fluido de la lágrima natural.

35 La composición de lágrima artificial de la presente invención se puede preparar en un producto de una sola dosis o en un producto de dosis múltiples. El producto de una sola dosis no necesita un conservante antibacteriano para mantener la esterilidad de la composición, pero el producto de dosis múltiples puede necesitar el conservante antibacteriano.

40 Un conservante antibacteriano preferente usado en la composición de la presente invención es el policuaternio-1, en una cantidad de 0,1 a 10 ppm. Además, la composición de la presente invención comprende un complejo de borato/poliol o un aminoácido de bajo peso molecular para mejorar la actividad antibacteriana del conservante antibacteriano.

45 El complejo de borato/poliol se incluye en una cantidad de un 0,5 a un 6,0 % en peso, preferentemente de un 1,0 a un 2,5 % en peso, en base al peso total de la composición. La relación molar de borato a polioliol es de 1:0,1 a 1:10, preferentemente de 1:0,25 a 1:2,5. Tal como se usa en el presente documento, el borato se refiere a ácido bórico, sales de ácido bórico y otros boratos farmacéuticamente aceptables, o combinaciones de los mismos, preferentemente ácido bórico, borato sódico, borato potásico, borato cálcico, borato de magnesio y combinaciones de los mismos. El polioliol incluye diversos polioliols conocidos en la técnica, preferentemente azúcares, alcoholes de azúcares y ácidos de azúcar, más preferentemente manitol, sorbitol, propilenglicol y glicerol, y lo más preferentemente glicerol.

50 El aminoácido de bajo peso molecular usado en la composición de la presente invención para potenciar la actividad antibacteriana se puede incluir en una cantidad de un 0,01 a un 2,5 % en p/v, más preferentemente de un 0,1 a un 1,0 % en p/v. El peso molecular del aminoácido de bajo peso molecular es preferentemente de 75 a 250. Más preferentemente, el aminoácido de bajo peso molecular es glicina.

La composición de lágrima artificial de la presente invención se prepara para que tenga un pH y una osmolalidad

compatible con el ojo. Preferentemente, el pH es de 6,8 a 7,8, y la osmolalidad es de 250 a 350 mOsm/kg.

La composición de lágrima artificial de la presente invención se prepara para que tenga una viscosidad elevada, con el fin de aumentar el tiempo de retención de la composición y aumentar la comodidad experimentada por el paciente cuando la composición se aplica al ojo. Preferentemente, la viscosidad es de 0,001 a 0,02 Pa·s, más preferentemente de 0,002 a 0,02 Pa·s, y lo más preferentemente de 0,005 a 0,02 Pa·s.

La composición de lágrima artificial de la presente invención se puede aplicar por vía tópica a la córnea para prevenir o tratar el síndrome del ojo seco. Además, se puede usar como una gota para humedad ocular o un lubricante ocular. La composición se aplica colocando una o dos gotas en la córnea.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, la presente invención proporciona una composición para limpiar, lubricar o envasar lentes de contacto que comprende un compuesto representado por la Fórmula General I, una sal del mismo, un hidrato del mismo o un solvato del mismo:



en la que S representa ácido siálico, y $(MS)_p$ y $(MS)_q$ representan independientemente un resto de monosacárido.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, la presente invención proporciona un procedimiento para limpiar, lubricar o envasar lentes de contacto que comprende poner en contacto una composición que comprende un compuesto representado por la Fórmula General I, una sal del mismo, un hidrato del mismo o un solvato del mismo con lentes de contacto:



en la que S representa ácido siálico, y $(MS)_p$ y $(MS)_q$ representan independientemente un resto de monosacárido.

La composición para limpiar lentes de contacto de la presente invención puede comprender un tensioactivo, como un componente principal, y un compuesto representado por la Fórmula General I, una sal del mismo, un hidrato del mismo o un solvato del mismo, como un componente auxiliar. Como el componente principal, se pueden incluir diversos tensioactivos que tienen una actividad de limpieza conocida en la técnica, incluyendo tensioactivos aniónicos, catiónicos, no iónicos y anfotéricos. Los tensioactivos aniónicos representativos incluyen tensioactivos sulfatados, tensioactivos sulfonados, y sales fisiológicamente aceptables de los mismos que proporcionan una actividad de limpieza superior para lípidos, proteínas y otros depósitos sobre las lentes de contacto. Los ejemplos incluyen lauril sulfato sódico, laureth sulfato sódico (sal sódica sulfatada y etoxilada de alcohol de laurilo), laureth sulfato de amonio (sal de amonio sulfatada y etoxilada de alcohol de laurilo), trideceth sulfato sódico (sal sódica sulfatada y etoxilada de alcohol de tridecilo), dodecilbencenosulfonato sódico, lauril o laureth sulfosuccinato disódico (sal disódica de laurilo o semi éster de alcohol de laurilo etoxilado del ácido sulfosuccínico), oleamido sulfosuccinato disódico, y sulfosuccinato de dioctilo y sodio (sal sódica de diéster de alcohol de 2-etilhexilo y ácido sulfosuccínico).

Los tensioactivos no iónicos que tienen una buena actividad de limpieza incluyen determinados polioxietilenos, tensioactivos de copolímero del bloque de polioxipropileno (poloxámero), que incluyen diversos tensioactivos disponibles con el nombre comercial Pluronic de BASF Corporation (por ejemplo, Pluronic P104 o L64).

La composición de la presente invención puede incluir un tensioactivo catiónico. Los tensioactivos catiónicos representativos incluyen ésteres de fosfato tricuaternario. Además, la composición puede incluir un tensioactivo anfotérico. Los tensioactivos anfotéricos incluyen derivados de imidazolina y pácidos de N-alquilamino.

En la composición para lubricar lentes de contacto de la presente invención, el compuesto representado por la Fórmula General I, la sal del mismo, el hidrato del mismo o el solvato del mismo promueven la secreción de lágrimas de la glándula lagrimal, tal como se ha descrito anteriormente. Las lágrimas segregadas forman una película de lágrimas sobre la superficie de las lentes de contacto y por lo tanto proporcionan un efecto lubricante. Por lo tanto, el compuesto representado por la Fórmula General I, la sal del mismo, el hidrato del mismo o el solvato del mismo se puede usar en la composición lubricante, en particular como un ingrediente eficaz.

La composición para envasar lentes de contacto de la presente invención es una solución acuosa usada para envasar lentes de contacto, y comprende, en general, solución salina, otra solución tampón y agua desionizada, sin estar limitado a lo mismo. Preferentemente, la composición de envasado de la presente invención es una solución salina que contiene una sal seleccionada entre cloruro sódico, borato sódico, fosfato sódico, hidrogenofosfato disódico, dihidrogenofosfato sódico y sales de potasio comparables. Estos componentes se mezclan de modo que una adición de un ácido o de una base den como resultado un cambio relativamente pequeño en el pH, formando de ese modo una solución tampón que consiste en un ácido y una base conjugada del mismo. Además, la solución tampón puede contener ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), hidróxido sódico, 2,2-bis(hidroximetil)-2,2',2"-nitrilotrietanol, ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico, ácido cítrico, citrato sódico, carbonato sódico, bicarbonato sódico, ácido acético, acetato sódico, o mezclas de los mismos.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, la presente invención proporciona lentes de contacto cuya

superficie se reviste con un compuesto representado por la Fórmula General I, una sal del mismo, un hidrato del mismo o un solvato del mismo:



en la que S representa ácido siálico, y $(\text{MS})_p$ y $(\text{MS})_q$ representan independientemente un resto de monosacárido.

5 Tal como se ha descrito anteriormente, dado que el compuesto representado por la Fórmula General I, la sal del mismo, el hidrato del mismo o el solvato del mismo, que se usa como el ingrediente eficaz en la presente invención, tiene un uso para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades oculares, el compuesto se puede revestir en lentes de contacto para evitar o para tratar enfermedades oculares.

10 Las lentes de contacto cuya superficie se reviste con un compuesto representado por la Fórmula General I, una sal del mismo, un hidrato del mismo o un solvato del mismo, como el ingrediente eficaz para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades oculares, incluyen (i) lentes de tipo corneal duras o rígidas permeables a gases fabricadas a partir de la polimerización de un éster acrílico tal como metacrilato de polimetilo (PMMA), acrilato de silicona metacrilato de fluorosilicona y (ii) lentes de tipo gel, de tipo hidrogel o de tipo blando fabricadas a partir de un polímero que tiene unidades de repetición hidrofílicas, preparado a partir de metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) u otro monómero hidrofílico, tal como las lentes que tienen un contenido de agua de un 20 % en peso o superior.

[Modo para la Invención]

Los ejemplos y los experimentos se describirán a continuación. Será evidente para los expertos en la materia que los siguientes ejemplos y experimentos son solamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el ámbito de la presente invención.

20 Materiales de ensayo y procedimientos de ensayo

Cultivo celular

Las células endoteliales de retina humana (HREC) se adquirieron en Sciencell (USA). Las células se cultivaron en medio de células endoteliales esterilizadas (ECM, Sciencell, USA), y se mantuvieron en un incubadora humidificada con CO₂ al 5 % a 37 °C. Los pasos 4 a 6 de las HREC se usaron para el ensayo.

25 Modelo de ratón de ojo seco

En el modelo de ratón para el síndrome del ojo seco, se usaron ratones C57BL/6 de 6 a 8 semanas de edad (Central Lab Animal, Seúl, Corea). Todos los animales se trataron de acuerdo con la Declaración de ARVO para el Uso de Animales en Investigación Oftálmica y Visión. Se indujo ojo seco experimental (EDE) mediante inyección subcutánea de 0,5 mg/0,2 ml de bromhidrato de escopolamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en cuartos traseros alternantes administrada cuatro veces al día (9 AM, 12 AM, 3 PM y 6 PM) y por exposición al aire y una humedad ambiental ≤ 40 % durante 18 horas al día, tal como sea indicado anteriormente (23). Se evaluaron cuatro grupos experimentales: grupo sin tratar (UT), grupo EDE (control), grupo EDE + sialilactosa (1 mg/kg) y grupo EDE + sialilactosa (5 mg/kg).

Medida de la producción de lágrimas

35 La producción de lágrimas se midió con hilo de algodón (Zone-quick; Oasis). El hilo se mantuvo con pinzas de joyero y se aplicó a la superficie ocular en el canto lateral durante 60 segundos. La humectación del hilo se midió en milímetros, usando la escala en el hilo de algodón.

Aislamiento de ARN y RT-PCR

40 Las células epiteliales de córnea y de conjuntiva se toman a partir de seis ojos por cada grupo de ensayo. El ARN total se aisló usando el reactivo Trizol (JBI Co., Corea) y se mantuvo a -80 °C hasta su uso. El ADNc se sintetizó mediante transcriptasa inversa con un cebador oligo dT-adaptador a partir de un kit de PCR para ARN (Bioneer, Corea) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. La síntesis de la primera hebra de ADNc se realizó usando pares de cebadores específicos de ARNm para IL-1β de murino, TNF-α, MMP-9 y GAPDH (Tabla 1). En el ensayo de RT-PCR, el uso de la misma cantidad de ARNm se confirmó mediante el análisis del nivel de expresión de mGAPDH. El producto de PCR se separó por electroforesis sobre gel de agarosa al 2 % que contenía
45 tampón TAE 1x y EtBr.

Tabla 1

Secuencia cebadora de ratón usada para RT-PCR				
Gene	Nº de Registro en Gene Bank	Cebador sentido	Cebador antisentido	Producto de PCR (bp)
IL-1 β	M15131	TGAGCTGAAAGCTCTCCACC	CTGATGTACCAGTTGGGGAA	297
TNF- α	M11731	TCAGCCTCTTCTCATTCTG	TGAAGAGAACCTGGGAGTAG	333
MMP-9	NM_013599	CGACGACGACGAGTTGTG	CTGTGGTGCAGGCCGAATAG	300
GAPDH	M32599	GCCAAGGTCATCCATGACAAC	GTCCACCACCCTGTTGCTGTA	498

Zimografía

5 Para determinar la concentración relativa de gelatinasas en células epiteliales de córnea y de conjuntiva, se realizó zimografía en gelatina por SDS-PAGE usando un procedimiento que se ha indicado anteriormente (24). El tejido se
 10 homogeneizó en un tampón de muestra que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 150 mM, NaN₃ al 0,02 %, 100 mg/ml de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y Triton X-100 al 1 %. El lisado celular se centrifugó a 10.000 x g, a 4 °C durante 10 minutos, y se separó por electroforesis sobre un gel de poliacrilamida al 8 % que contiene gelatina (0,5 mg/ml). El gel se sumergió en Triton X-100 al 0,25 % a temperatura ambiente durante 30 minutos para retirar SDS, y se hizo reaccionar durante la noche a 37 °C en un tampón de lisis que contenía Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 10 mM, 2 ZnSO₄, Brij-35 al 0,01 % y PMSF 5 mM (inhibidor de la serina proteasa) de modo que la proteasa podría descomponerle sustrato. El gel se lavó con agua destilada, se hizo tinción con Azul Brillante de Coomassie R-250 al 0,25 % en isopropanol al 40 % durante 2 horas, y a continuación se eliminó la tinción con ácido acético al 10 %.

15 Ensayo de transferencia de Western

Las HREC se homogeneizaron en un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 150 mM, NaN₃ al 0,02 %, 100 μ g/ml de PMSF, 1 μ g/ml de aprotinina y Triton X-100 al 1 %. La concentración de proteínas se midió usando un ensayo de proteína de Bio-Rad (Bio-Rad, USA). Treinta (30) μ g de la muestra de lisado celular total se separaron por SDS-PAGE en base al tamaño, y se sometieron a migración electroforética hacia una membrana de nitrocelulosa
 20 usando un sistema de electroforesis Hoefer (Amersham Biosciences, Reino Unido). Para la detección de la proteína diana, la membrana se hizo reaccionar con anticuerpos de p-AKT, ERK, p-ERK, VEGFR-2 (flk-1, Q-20), VE-cadherina, FAK, paxilina, vinculina (SantaCruz Biotecnology, USA) y p-VEGFR-2 (Cell Signaling Tech., USA). La detección se realizó usando anticuerpo secundario de IgG anti-conejo unido a peroxidasa de rábano picante, anticuerpo de IgG anti-cabra y anticuerpo de IgG anti-ratón (SantaCruz Biotecnology, USA), y usando el sistema de quimioluminiscencia ECL (Amersham Biosciences, Reino Unido).

25 Microscopia de inmunofluorescencia

Las HREC se inocularon sobre cubreobjetos revestidos con gelatina, n-esterilizados de 12 mm, para placas de cultivo celular de 6 pocillos. En presencia o en ausencia de sialilactosa, las HREC se inmovilizaron con formalina al 3,7 % con o sin tratamiento con VEGF. A continuación, las células se pasaron a través de Triton X-100 0,5x en PBS y se lavaron tres veces con PBS. Los sitios no específicos se bloquearon con albúmina de suero bovino al 1 % que contenía PBS 1, a la vez que se agitaba suavemente a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de sumergir las células en una solución de anticuerpos para FAK, paxilina, vinculina y VE-cadherina, las células se incubaron durante la noche a 4 °C. Después de lavar con PBS, las células se hicieron reaccionar además con IgG de cabra anti-ratón conjugado con Alexa Flour 594 (Molecular Probes, USA) e IgG de cabra anti-conejo conjugado con Alexa Flour 488 (Molecular Probes, USA) a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con PBS, el análisis se realizó por microscopia de fluorescencia. Los anticuerpos primarios unidos previamente a antígenos o a anticuerpos secundarios se usaron como control negativo.

30 Ensayo de formación de conductos

El efecto de la inhibición de la sialilactosa frente a la red de tipo capilar de HREC inducida por VEGF se investigó usando placas de cultivo de 24 pocillos revestidas con Matrigel. El Matrigel (13,9 mg/ml) se fundió durante la noche a 4 °C y se mezcló con medio de ECM a una relación de 1 : 1. Después de añadir 70 μ l de Matrigel (6,95 mg/ml) diluidos con ECM a cada pocillo de la placa de cultivo de 24 pocillos, la polimerización se realizó durante 1 hora a 37 °C. Para la evaluación de la formación de conductos, las HREC se separaron de la placa de cultivo tisular, se lavaron, se volvieron a suspender en medio de ECM que contenía FBS al 1 % (1x10⁴ células/pocillo), y se añadieron

arponcillo revestido con Matrigel en presencia o en ausencia de VEGF junto con sialilactosa a diversas concentraciones. La placa se incubó en una incubadora con CO₂ al 5 % durante 24 horas a 37 °C, y el conducto de tipo capilar formado en cada pocillo de la placa se fotografió usando un microscopio óptico de Nikon.

Resultados del ensayo

5 *Efecto de la sialilactosa en la producción de lágrimas*

La producción de lágrimas en la superficie ocular en el canto lateral del UT, EDE y dos grupos de tratamiento (6 ojos/grupo/experimento, en cuatro conjuntos de experimentos diferentes) se midió con hilo de algodón. Los ratones con EDE inducido por escopolamina mostraron una producción de lágrimas menor que la del grupo UT. Por el contrario, los grupos de ensayo (EDE + sialilactosa) mostraron una mayor producción de lágrimas estadísticamente significativa (Tabla 2).

Tabla 2

Efecto de la sialilactosa en la producción de lágrimas	
Grupo (n = 6)	Producción de lágrimas (mm)*
UT (sin tratamiento para ojo seco)	2,11 ± 0,21
EDE	0,98 ± 0,38
EDE + sialilactosa (1 mg/kg)	1,55 ± 0,48
EDE + sialilactosa (5 mg/kg)	1,45 ± 0,34
* Longitud en húmedo del hilo	

Efecto de la sialilactosa sobre MMP-9 y citoquinas mediadas por inflamación

El nivel de transcritos de ARN que codifican MMP-9, IL-1 β , TNF- α y el gen constitutivo GAPDH se evaluó por RT-PCR usando el ARN total de las células epiteliales de la córnea obtenidas a partir de cada grupo (UT, EDE y EDE + sialilactosa). Cuando el grupo EDE se trató con sialilactosa, el nivel de transcritos de MMP-9, IL-1 β y TNF- α disminuyó (Fig. 2). De los dos grupos de tratamiento, el grupo EDE + sialilactosa (5 mg/kg) mostró una disminución mayor en la expresión de los genes.

Efecto de la sialilactosa, en la expresión de MMP-9 de córnea en EDE

La actividad gelatinolítica (la banda gelatinolítica de 105 kDa corresponde a MMP-9 de murino) se evaluó en células epiteliales de córnea y de conjuntiva tomadas a partir de los grupos UT, EDE y dos grupos de tratamiento. La zimografía mostró que la córnea de los ratones del grupo EDE tenía una actividad gelatinolítica más elevada. Por el contrario, el grupo EDE + sialilactosa (1 mg/kg) y el grupo EDE + sialilactosa (5 mg/kg) mostraron una actividad gelatinolítica disminuida en células epiteliales de la córnea y de la conjuntiva, y el grupo UT no mostró ninguna disminución de la actividad gelatinolítica en absoluto (Fig. 3).

25 *Inhibición de VEGFR-2 y activación de la ruta de señalización mediada por VEGF con sialilactosa en HREC estimuladas con VEGF*

La activación de VEGFR-2 mediada por VEGF desempeña un papel importante en la angiogénesis tumoral a través de la activación de las rutas de señalización corriente abajo de VEGFR-2 en células endoteliales (25). La activación de VEGFR-2 mediada por VEGF activa la migración celular dependiente de PI-3K/AKT (26). Además, la supervivencia celular inducida por VEGF de las Células endoteliales se asocia con la activación de PI-3K/AKT como una activación corriente abajo de VEGFR-2 (27). En consecuencia, los inventores de la presente invención investigaron si la activación de VEGFR-2 en la superficie de las células endoteliales inducidas por VEGF se regulaba con la sialilactosa. Tal como se observa en la Fig. 4, la sialilactosa redujo fuertemente la fosforilación de VEGFR-2 estimulada con VEGF en las células endoteliales de una forma dependiente de la concentración. Además, los inventores de la presente invención investigaron si la activación de la ruta de señalización estimulada con VEGF se regulaba con la sialilactosa. Tal como se observa en la Fig. 4, la sialilactosa redujo de forma pronunciada la activación de AKT inducida por VEGF, que se asocia con la supervivencia, migración y proliferación de las células endoteliales.

Estos resultados muestran que la sialilactosa se asocia con la actividad anti-angiogénica mediante la supresión de diversas señales corriente abajo inducidas por VEGFR-2 potenciada con VEGF y la activación de la señalización mediada por VEGF en HREC.

Efecto de la inhibición de la sialilactosa frente a la formación de conductos inducida por VEGF en HREC

La activación de VEGFR-2 mediada por VEGF está muy asociada con la acción angiogénica de las células endoteliales tal como proliferación, migración, supervivencia y formación de conductos (25). En consecuencia, los inventores de la presente invención investigaron la acción anti-angiogénica de la sialilactosa en el aspecto de la proliferación, migración y formación de conductos de HREC estimuladas con VEGF. Tal como se observa en la Fig. 5, cuando las HREC se colocaron en Matrigel deficiente en factor de crecimiento en presencia de VEGF, VEGF formó estructuras similares a canales largos y fuertes, en muchas más células en comparación con el grupo de control. La sialilactosa redujo significativamente el ancho y la longitud del canal en las HREC estimuladas con VEGF de una forma dependiente de la concentración. Este resultado muestra que la sialilactosa inhibe la angiogénesis in vitro inducida por VEGF en HREC.

Efecto de la inhibición de la sialilactosa frente a unión inducida por VEGF que tiene adherencias focales en HREC

Además, se investigó el efecto de la sialilactosa en las adherencias focales formadas por FAK estimulada con VEGF y la fosforilación de la paxilina tirosina. Las HREC se estimularon con 50 ng/ml de VEGF en presencia o en ausencia de sialilactosa. Los grupos de puntos teñidos con anti-FAK se indicaron como flechas de color blanco. En las HREC inducidas por VEGF, las adherencias focales inmunoteñidas con anti-FAK aumentaron (Fig. 6, B). Sin embargo, la adherencia focal se inhibió de forma notable con la sialilactosa (Fig. 6, C). En las células del grupo de control, la paxilina teñida con inmunofluorescencia fuertemente distribuida se observó en las áreas que se suponía que estaban alrededor de los núcleos. Se observaron estructuras de tipo adherencia focal fuertemente teñidas, pero el número era relativamente pequeño (Fig. 6, F). Por supuesto, la sialilactosa bloqueaba el reclutamiento y el aumento de inmunotinción anti-paxilina de adherencias focales en HREC estimulada con VEGF (Fig. 6, G).

Las monocapas de células endoteliales aumentadas asociadas con el aumento de la fosforilación de tirosina reduce la adherencia intercelular, y aumenta la movilidad y la permeabilidad inducidas por VEGF de células epiteliales en células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) (28-30). En consecuencia, los inventores de la presente invención investigaron si la sialilactosa podría cambiar el nivel de fosforilación y, por lo tanto, cambiar dicho efecto en HUVEC. En monocapas de gran confluencia sin estimular, la señal de la fosfotirosina se propagó bien sobre áreas de células muy superpuestas, y solamente las adherencias focales mostraron una débil tinción (Fig. 7, A). Una hora después de la estimulación con VEGF, el patrón de marcado de fosfotirosina cambio sorprendentemente. La tinción de la VE-cadherina se volvió a distribuir en un patrón en zigzag (Fig. 7, B). Las áreas de contacto intercelular agudas y continuas en la adherencia intercelular estimulada con VEGF en HREC se recuperaron con sialilactosa (Fig. 7, C). Estos resultados muestran que la sialilactosa inhibe de forma eficaz la inmunotinción de anti-paxilina en las adherencias focales y en las adherencias intracelulares en HREC.

Tal como se ha descrito con detalle anteriormente, la presente invención proporciona una composición para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades oculares que comprenden el compuesto representado con la Fórmula General I como un ingrediente eficaz. El compuesto usado como el ingrediente eficaz de la presente invención inhibe la expresión de MMP-9 y de citoquinas mediadas por inflamación (IL-1 β , TNF- α , etc.) en células epiteliales de la córnea e inhibe la activación de VEGFR-2 mediada por VEGF en HREC, presentando de ese modo una actividad profiláctica o terapéutica para enfermedades oculares tales como síndrome del ojo seco, enfermedad ocular inflamatoria, enfermedad ocular asociada con la neovascularización efectos secundarios por el uso de lentes de contacto. Además, ya que no tiene citotoxicidad o efectos secundarios en la piel, la composición de la presente invención se puede usar de forma segura como una composición farmacéutica, una composición nutracéutica o una composición alimentaria. Además, la composición de la presente invención se puede usar como un limpiador o un lubricante para lentes de contacto ya que tiene actividad antiinflamatoria no bacteriana y actividad de lubricación por contacto ocular.

Aunque la presente invención se ha descrito con respecto a las realizaciones específicas, será evidente para los expertos en la materia que se pueden hacer diversos cambios y modificaciones sin apartarse del espíritu y del alcance de la invención tal como se define en las siguientes reivindicaciones.

Referencias

1. K.B. Bjerrum, Keratoconjunctivitis sicca and primary Sjogren's syndrome in a Danish population aged 30-60 years. Acta Ophthalmol, Scand. 1997; 75: 281286.
2. C.A. McCarty, A.K. Bansal, P.M. Livingston, Y.L. Stanislavsky y H.R. Taylor, The epidemiology of dry eye in Melbourne, Australia, Ophthalmology 1998; 105: 11141119.
3. E. Goto, Y. Yagi, Y. Matsumoto y K. Tsubota, Impaired functional visual acuity of dry eye patients, Am. J. Ophthalmol. 2002; 133: 181186.
4. S.C. Pflugfelder, S.C.G. Tseng, O. Sanabria, H. Kell, C.G. Garcia, C. Felix, W. Feuer y B.L. Reis, Evaluation of subjective assessments and objective diagnostic tests for diagnosing tear-film disorders known to cause ocular irritation, Cornea 1998; 17:3856.
5. C. Baudouin, H. Liang, D. Bremond-Gignac, P. Hamard, R. Hreiche, C. Kreuzot-Garcher, J.M. Warnet y F. Brignole-Baudouin, CCR 4 and CCR 5 expression in conjunctival specimens as differential markers of T(H)1/T(H)2 in ocular surface disorders, J. Allergy Clin. Immunol. 2005; 116: 614619.

6. M. Rolando, S. Barabino, C. Mingari, S. Moretti, S. Giuffrida y G. Calabria, Distribution of conjunctival HLA-DR expression and the pathogenesis of damage in early dry eyes, *Cornea* 2005; 24: 951954.
7. R. Kaswan, M. Salisbury, A new perspective on canine keratoconjunctivitis sicca: treatment with ophthalmic cyclosporine, *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1990; 20: 583613.
- 5 8. Jehangir S. Dry eye syndrome in a Pakistani community, *J Pak Med Assoc.* 1990; 40: 6667.
9. L. Sobrin, Z. Liu, D.C. Monroy, A. Solomon, M.G. Selzer, B.L. Lokeshwar y S.C. Pflugfelder, Regulation of MMP-9 activity in human tear fluid and corneal epithelial culture supernatant, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000; 41: 17031709.
- 10 10. S. Pflugfelder, W. Farley, L. Luo, L. Chen, C. de Paiva, L.C. Olmos, D.Q. Li y M.E. Fini, Matrix metalloproteinase-9 knockout confers resistance to corneal epithelial barrier disruption in experimental dry eye, *Am. J. Pathol.* 2005; 166: 6171.
11. Pflugfelder SC. Anti-inflammatory therapy of dry eye, *Am J Ophthalmol.* 2004; 137: 337342.
12. D.-Q. Li, Z. Chen, X.J. Song, W.J. Farley y S.C. Pflugfelder, Hyperosmolarity stimulates production of MMP-9, IL-1 β and TNF- by human corneal epithelial cells via a c-Jun NH2-terminal kinase pathway, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002; 43: 539-549.
- 15 13. S.C. Pflugfelder, S.C. Tseng, K. Yoshino, y col. Correlation of goblet cell density and mucosal epithelial membrane mucin expression with rose bengal staining in patients with ocular irritation. *Ophthalmology* 1997; 104: 223-35.
14. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 1996; 86: 353-364.
- 20 15. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature (Lond.)*, 1997; 386: 671-674.
16. Penn JS, McCollum GW, Barnett JM, Werdich XQ, Koepke KA, Rajaratnam VS. Angiostatic effect of penetrating ocular injury: role of pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 2006; 47: 405-414.
17. Kalebic T, Garbisa S, Glaser B, Liotta LA. Basement membrane collagen: degradation by migrating endothelial cells. *Science.* 1983; 221: 281283.
- 25 18. Bellon G, Martiny L, Robinet A. Matrix metalloproteinases and matrikines in angiogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004; 49: 203220.
19. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.*, 1995, 1: 27-31.
20. Doherty MJ, Canfield AE. Gene expression during vascular pericyte differentiation. *Crit Rev Eukaryot Gene Exp.* 1999; 9: 117.
- 30 21. H. Lis y N. Sharon. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition, *Chem. Rev.* 1998; 98: 637-645.
22. O.T. Eppler, R. Horstkorte, M. Pawlita, C. Schmidt y W. Reutter. Biochemical engineering of the N-acyl side chain of sialic acid: biological implications, *Glycobiology* 2001; 11: 11-18.
- 35 23. L. Luo, D.Q. Li, A. Doshi, W. Farley, R.M. Corrales, S.C. Pflugfelder. Experimental dry eye stimulates production of inflammatory cytokines and MMP-9 and activates MAPK signaling pathways on the ocular surface, *Invest Oph-thalmol Vis Sci.* 2004; 45: 4293-301.
24. L. Sobrin, Z. Liu, D.C. Monroy, A. Solomon, M.G. Selzer, B.L. Lokeshwar, S.C. Pflugfelder. Regulation of MMP-9 activity in human tear fluid and corneal epithelial culture supernatant. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41: 17031709.
- 40 25. Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE.* 2001; 11.
26. Gille H, Kowalski J, Li B, LeCouter J, Moffat B, Zioncheck TF, Pelletier N, Ferrara N. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem.* 2001; 276: 3222-30.
- 45 27. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem.* 1998; 273: 30336-30343.
28. Abedi H, Zachary I. Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *J Biol Chem.* 1997; 272: 15442-15451.
- 50 29. Shibamoto, S., Hayakawa, M., Takeuchi, K., Hori, T., Oku, N., Miyazawa, K., Kitamura, N., Takeichi, M. e Ito, F. Tyrosine phosphorylation of beta-catenin and plakoglobin enhanced by hepatocyte growth factor and epidermal growth factor in human carcinoma cells. *Cell Adhes. Commun.* 1994; 1: 295-305.
30. Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci.* 1998; 111: 1853-65.
- 55 31. L. D. Barber, S. C. Pflugfelder, J. Tauber, G. N. Foulks. Phase III safety evaluation of cyclosporine 0.1% ophthalmic emulsion administered twice daily to dry eye disease patients for up to 3 years. *Ophthalmology* 2005; 112: 1790-4.
32. C.S. de Paiva, J.L. Lindsey y S.C. Pflugfelder, Assessing the severity of keratitis sicca with videokeratoscopic indices, *Ophthalmology* 2003; 110: 11021109.
- 60 33. A.M. Terres, J.M. Pajares, A.M. Hopkins, A. Murphy, A. Moran, A.W. Baird y D. Kelleher, *Helicobacter pylori* disrupts epithelial barrier function in a process inhibited by protein kinase C activators, *Infect. Immun.* 1998; 66: 29432950.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para profilaxis o tratamiento de una enfermedad ocular que comprende un compuesto representado por la Fórmula General I, una sal del mismo, un hidrato del mismo o un solvato del mismo:



en la que S representa ácido siálico, y $(\text{MS})_p$ y $(\text{MS})_q$ representan independientemente un resto de monosacárido.

5 2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que $(\text{MS})_p$ representa galactosa y $(\text{MS})_q$ representa glucosa.

3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la enfermedad ocular es síndrome del ojo seco, enfermedad ocular inflamatoria, enfermedad ocular asociada con la neovascularización de la retina o un efecto secundario asociado con el uso de lentes de contacto.

10 4. La composición de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la enfermedad ocular es síndrome del ojo seco.

5. La composición de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la enfermedad ocular inflamatoria se selecciona entre un grupo que consiste en disfunción de las glándulas de meibomio, síndrome de Stevens-Johnson, síndrome de Sjogren, uveítis y queratitis.

15 6. La composición de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la enfermedad ocular asociada con la neovascularización de la retina se selecciona entre un grupo que consiste en retinopatía diabética, degeneración macular, retinopatía del prematuro, rechazo al injerto de córnea, fibroplasia retrolental, glaucoma neovascular, neovascularización del iris, neovascularización de la retina, hipoxia, tumor ocular y tracoma.

20 7. La composición de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la composición inhibe la neovascularización de la retina mediante la inhibición de la activación de VEGFR-2 mediada por VEGF en células endoteliales de retina humana.

8. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que es una composición farmacéutica.

25 9. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, que está en forma de una solución, suspensión, jarabe, emulsión, liposoma, polvo fino, polvo, gránulo, comprimido, formulación de liberación sostenida, gota ocular, cápsula, limpiador de lente de contacto o lubricantes de lente de contacto.

10. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que es una composición nutracéutica o una composición alimentaria.

11. Una composición de lágrima artificial que comprende un compuesto representado por la Fórmula General I, una sal del mismo, un hidrato del mismo o un solvato del mismo:



en la que S representa ácido siálico, y $(\text{MS})_p$ y $(\text{MS})_q$ representan independientemente un resto de monosacárido.

12. La composición de acuerdo con la reivindicación 11, en la que $(\text{MS})_p$ representa galactosa y $(\text{MS})_q$ representa glucosa.

35 13. La composición de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el principio activo promueve la secreción de lágrimas de la glándula lagrimal.

14. Uso de una composición para limpiar, lubricar o envasar lentes de contacto que comprende un compuesto representado por la Fórmula General I, una sal del mismo, un hidrato del mismo o un solvato del mismo:



en la que S representa ácido siálico, y $(\text{MS})_p$ y $(\text{MS})_q$ representan independientemente un resto de monosacárido.

Figura 1

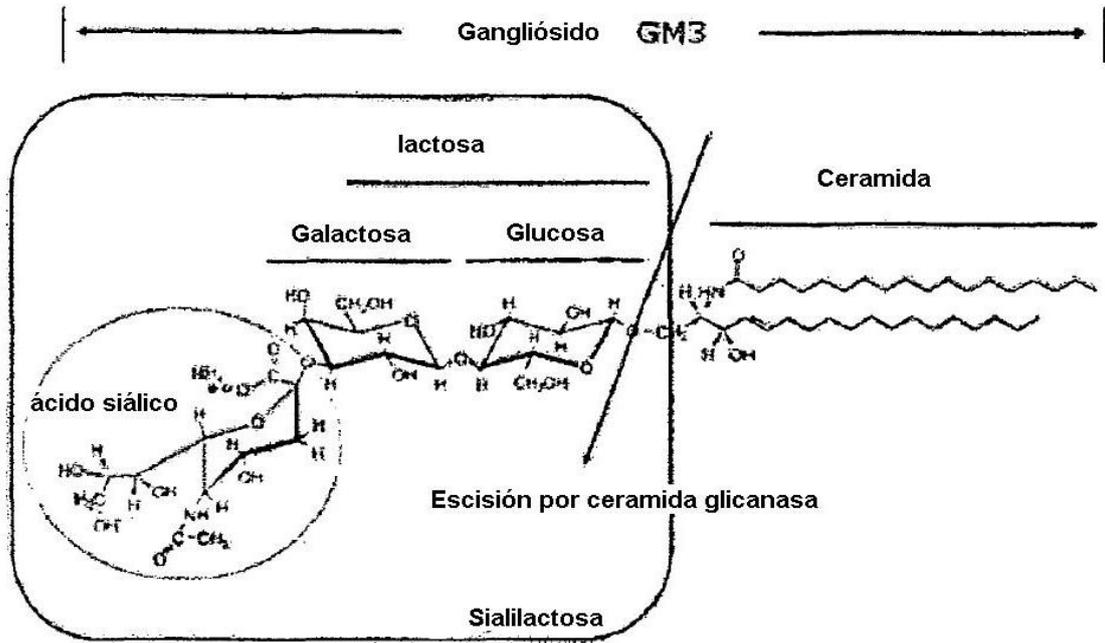


Figura 2

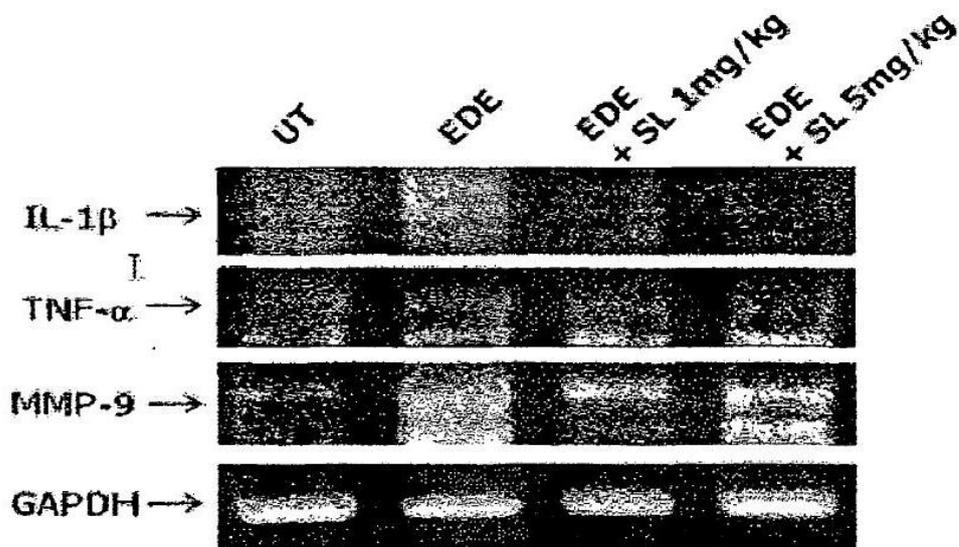


Figura 3

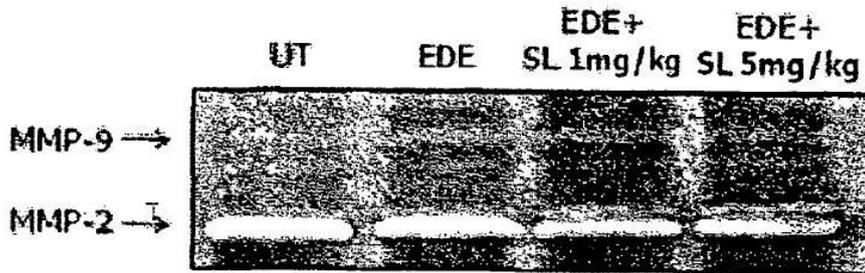


Figura 4

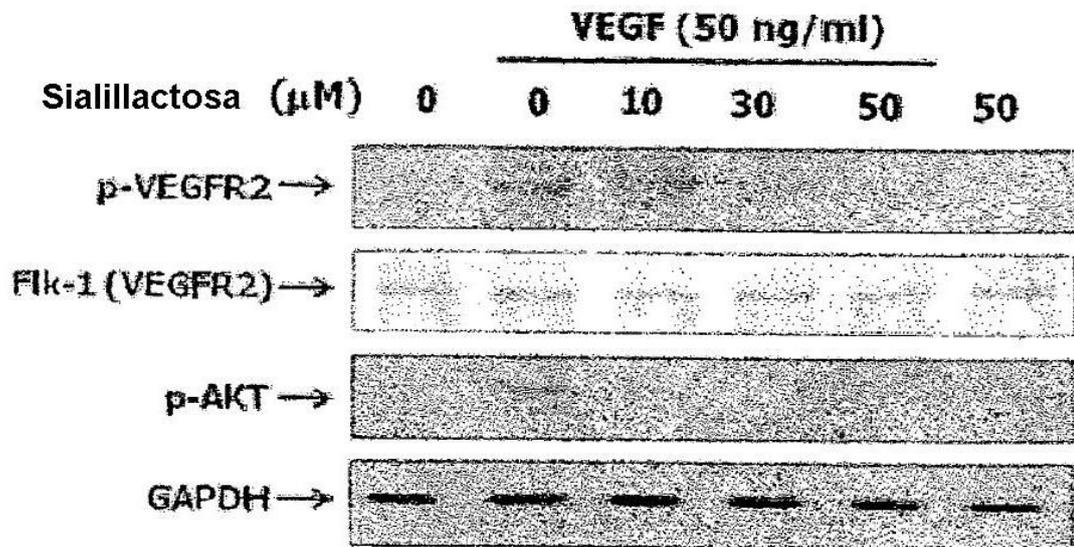


Figura 5

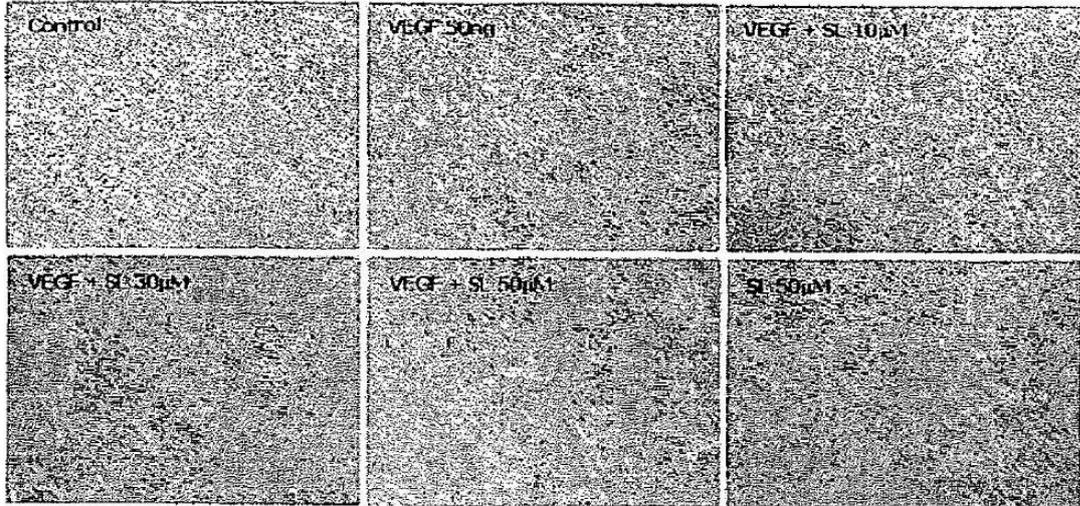


Figura 6

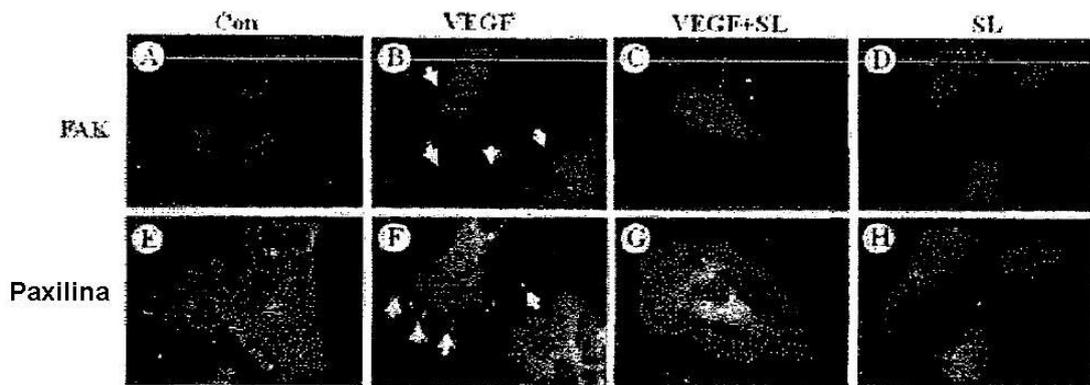


Figura 7

