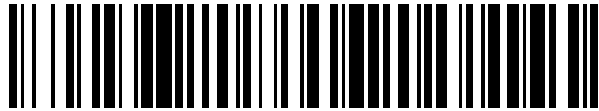


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 462**

51 Int. Cl.:

A61L 27/54 (2006.01)

A61L 31/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2010 E 10704129 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2393525**

54 Título: **Lentes intraoculares tratadas con alquilfosfocolinas para la profilaxis farmacológica de la catarata secundaria**

30 Prioridad:

06.02.2009 DE 102009007853

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

23.04.2015

73 Titular/es:

**LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN
(50.0%)
Geschwister-Scholl-Platz 1
80539 München, DE y
MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**EIBL-LINDNER, KIRSTEN;
KAMPIK, ANSELM y
EIBL, HANSJÖRG**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 534 462 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

Lentes intraoculares tratadas con alquilfosfocolinas para la profilaxis farmacológica de la catarata secundaria

La invención se refiere a materiales médicos y, en particular, a implantes oftalmológicos que contienen alquilfosfocolinas (APC). Implantes de este tipo pueden emplearse ventajosamente, en particular, para la profilaxis de la catarata secundaria.

El documento US 5.342.621 describe una superficie antitrombógena. En el documento US 5.342.621 se describen dispositivos médicos que contienen heparina-fosfatidilcolina (HPTC) o que están revestidos con un material de este tipo.

Shigeta et al., J. Cataract. Refract. Surg., Vol. 32, mayo de 2006, 859-864 describe la prevención de la adherencia de fibroblastos y bacterias a lentes intraoculares acrílicas por medio de un revestimiento de MPC. En el caso de MPC se trata de poli(metacrilato de 2-metacriloiloxietilfosfocolin-co-n-butilo).

El documento US 2003/0219909 A1 describe materiales, en particular dispositivos oftálmicos, que contienen un revestimiento a base de vesículas. En el caso de las vesículas se puede tratar de liposomas. Materiales adecuados para la formación de los liposomas pueden ser fosfolípidos conforme al documento US 2003/0219909.

El documento US 2008/0090781 A1 describe formulaciones que contienen alquilfosfocolinas utilizando nuevos soportes de carga negativos.

La estrella gris o la catarata es el origen más frecuente de una ceguera evitable con la edad y/o ligada a diabetes mellitus (Klein et al.; Ophthalmology 1984; 91: 1-9) en todo el mundo (48%; WHO Global Initiative to Eliminate Avoidable Blindness, "Vision 2020: The Right to Sight"). Se forma por una opacificación del cristalino, con la cual se reduce la transmisión de luz a través del ojo hasta la retina (opacificación del medio). Mediante una operación relativamente sencilla, la retirada de la lente opacificada con implantación de una lente artificial (lente intraocular; IOL) en el saco capsular remanente puede posibilitar al paciente, en el caso de una retina intacta, inmediatamente de nuevo una buena agudeza visual.

En Alemania, según estimaciones de la industria se llevan a cabo al año aprox. 520.000 operaciones de cataratas (según "Derzeitiger Stand der Katarakt- und refraktiven Chirurgie – Ergebnisse der Deutschen Gesellschaft für Intraokularlinsenimplantation, Interventionelle und Refraktive Chirurgie DGII sowie des Bundesverbands der Augenärzte BVA – Umfrage 1999" ("Estado Actual de la Cirugía de Cataratas y Refractaria – Resultados de la Sociedad Alemana para Implantes de Lentes Intraoculares, Cirugía Intervencionista y Refractaria DGII así como de la Asociación Federal de Oftalmólogos BVA – Encuesta 1999"; son de esperar resultados de la encuesta actual en diciembre de 2008). En los EE.UU. se llevan a cabo anualmente aprox. 1,5 millones de operaciones de cataratas (Schein et al. N Engl J Med 2000). En todo el mundo se practican aproximadamente 10 millones de operaciones de cataratas al año.

La complicación más frecuente después de practicada una cirugía de cataratas es la así denominada fibrosis de la cápsula posterior o la catarata secundaria (opacificación de la cápsula posterior, también denominada catarata secundaria), que provoca una disminución renovada de la agudeza visual central. La catarata secundaria se manifiesta en el 11,8% de todos los pacientes en el espacio de un año después de la retirada mediante operación de la lente y la implantación de una IOL, y en hasta el 28,4% de todos los pacientes operados después de 5 años. La mayor incidencia se observa en niños después de operación de una catarata innata (catarata congénita) con más del 90% (Kugelberg et al. J Cat Refract Surg 2005, 31: 757-762).

La incidencia depende, además, del material de la lente y del diseño de la lente: lentes de PMMA muestran una tasa de catarata secundaria de hasta 55%, lentes de acrilato/silicona hidrófobas, de sólo 2,2%. Las IOLs acomodativas tales como la lente 1-CU (HumanOptics AG, Erlangen) están, sin embargo, actualmente mermadas en su función por la tasa extremadamente elevada de catarata secundaria de 100% o bien están fuertemente mermadas en su función por la eliminación entonces necesaria (Mastropasqua et al. Acta Ophthalmol Scand 2007, 85: 409-414). Se han descrito también para IOLs multifocales (meta-análisis) tasas relativamente elevadas de catarata secundaria de 20%. También lentes de hidrogel están lastradas con elevadas tasas de catarata secundaria.

La causa de la formación de catarata secundaria son células epiteliales de la lente ecuatorial residuales que migran desde la región ecuatorial del saco capsular remanente después de la retirada del cristalino hacia el centro del eje óptico (migración), se multiplican (proliferan) y se adhieren a la superficie de la lente artificial (fijación) con la consecuencia de una disminución significativa de la agudeza visual central. El material de la superficie de la IOL

parece estimular las células epiteliales de la lente, con lo cual se producen citoquinas (IL-1 y 6; PGE2) que, junto a la reacción celular arriba mencionada, resultan en un trastorno de la barrera hemato-acuosa (inducida por PGE2) con reacción inflamatoria.

5 Como regla de oro de la terapia de la catarata secundaria constituida sirve la capsulometría con láser de Nd:YAG. Esta es una intervención ambulatoria sencilla de realizar, en la que por medio de un láser de Nd:YAG se abre la cápsula de la lente posterior fibrilada y tiene lugar un aumento significativo de la visión. No obstante, los costes anuales en los EE.UU. para este tipo de terapia ascienden por sí solos a aprox. 250 millones de dólares US. Además, las IOLs modernas tales como las lentes acomodativas y multifocales están fuertemente mermadas en su capacidad funcional por parte de la intervención con láser: las IOLs acomodativas pierden su capacidad de
10 acomodación (Mastropasqua et al. Acta Ophthalmol Scand 2007, 85: 409-414), y las IOLs multifocales pueden padecer en su calidad de imagen por un descentrado de la lente en el saco capsular. Además, el acceso a una capsulotomía de Nd:YAG no se garantiza de igual manera en todas las partes del mundo.

Además, se manifiestan a menudo complicaciones en el tratamiento con láser tales como, p. ej., un deterioro de la IOL por parte del láser (12%), un aumento secundario de la presión (glaucoma secundario; 8,5%) o una lesión de la retina (aprox. 1%) así como una subluxación o dislocación de la IOL (0,10%).
15

Para la calidad del abastecimiento oftalmológico en todo el mundo, así como por motivos de la eficacia de costes sería deseable, por lo tanto, una medida profiláctica que no permitiera ni siquiera la formación de una catarata secundaria. Como se ha comprobado, hasta ahora, según el meta-análisis sólo es profilácticamente eficaz un diseño óptico de la IOL con un borde óptico afilado ("sharp edge design"; Findl et al. Cochrane Database of Systematic
20 Reviews 2007) en comparación con lentes con un borde óptico redondo.

A pesar del uso de IOLs con un borde óptico afilado, de acuerdo con la evaluación estadística actual de los datos de sociedades aseguradoras de EE.UU. y de sus distribuciones, no ha resultado la reducción en costes esperada por parte de este diseño de lente (Cleary y Spalton, ESCRS Eurotimes 2008, 115: 1308-1314). El motivo de ello podrían ser los hasta ahora cortos tiempos de observación posteriores de, en parte, sólo tres años después de la operación de cataratas/implantación de la lente (Kohnen et al. Ophthalmology 2008). Además, es dudoso en qué medida se han de implementar técnicamente las premisas técnicas arriba mencionadas en relación con el material y diseño de la lente para reducir la incidencia de la catarata secundaria también para la concepción de IOLs de nueva generación, es decir, IOLs acomodativas y multifocales.
25

Modificaciones de la técnica quirúrgica, así como la aplicación intra-operativa o peri-operativa de un medicamento para la profilaxis farmacológica de la catarata secundaria se han manifestado hasta ahora como no significativas sobre el desarrollo de la catarata secundaria.
30

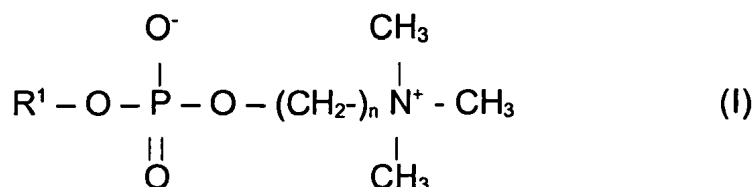
Los enfoques farmacológicos para la profilaxis de la catarata secundaria son numerosos, pero hasta ahora no han tenido éxito en un contexto clínico. Hasta la fecha se han sometido a ensayo las siguientes sustancias farmacológicas: mitomicina C (MMC; Chung et al. J Cataract Refract Surg 2000), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA; Nishi et al. J Cataract Refract Surg 1999), 5-fluorouracilo (5-FU; Ruiz et al. Ophthalmic Res 1990) y daunomicina (Power et al. J Cataract Refract Surg 1994), así como una pluralidad de otras tales como, p. ej., citostáticos, entre ellos antimetabolitos tales como metotrexato o 5-FU, antibióticos tales como daunomicina o mitomicina, antimetabólicos tales como colchicina; NSAR tales como indometazina o diclofenaco y otras tales como heparina, sumarina o transferrina. En virtud de una carente eficacia o bien de efectos secundarios tóxicos, el empleo clínico de estas sustancias está limitado (estudios piloto). Sustancias eficaces tales como mitomicina C (Kim et al. Clin Exp Ophthalmol 2007), taspigargina / 5-fluorouracilo (Abdelwahab et al. Eye 2008) y Triton X-100/agua destilada (Maloof et al. Arch Ophthalmol 2005) requieren durante la aplicación en el ojo el uso de un sistema de irrigación en la cápsula cerrada ("sealed-capsule irrigation device") con el fin de impedir los significativos efectos secundarios tóxicos de las sustancias. Esto significa una clara complejidad adicional operativa, así como tiempos de operación más prolongados. El agua destilada (aplicada en el "sealed-capsule device" arriba mencionado) por sí sola no se ha manifestado sin embargo como eficaz tal como pudo demostrarse en 17 pacientes después de un tiempo de tratamiento posterior de dos años (Rabsilber et al. Br J. Ophthalmol 2007). Sustancias tales como heparina sobre IOLs acrílicas hidrófilas modificadas en la superficie (BioVue®, Oll, Ontario, CA, EE.UU.) son ineficaces en relación con su efecto profiláctico sobre la formación de catarata secundaria en comparación con IOLs acrílicas hidrófobas (sensor®, AR 40e, AMO, Santa Ana, CA, EE.UU.), tal como se demostró en un estudio clínico aleatorizado actual en cien pacientes (Kang et al. Eur J Ophthalmol 2008). Además, en el caso de la aplicación intraocular de heparina se ha de contar, en virtud de sus propiedades diluyentes de la sangre, con un riesgo de hemorragia.
35
40
45
50

En el caso de las sustancias empleadas hasta ahora para la profilaxis de la catarata secundaria se trata, a menudo, de agentes antitumorales con efectos secundarios desagradables y no deseados que están bien descritos y bien caracterizados farmacéuticamente. Además, las sustancias empleadas hasta ahora son la mayoría de las veces muy
55

bien solubles en agua y no se adhieren, en virtud de su buena solubilidad en agua, ni a materiales hidrófilos ni tampoco a hidrófobos.

Por lo tanto, una misión de la presente invención consistía en proporcionar materiales médicos con una influencia favorable sobre el proceso de cicatrización.

- 5 Este problema se resuelve, de acuerdo con la invención, mediante un material médico el cual se caracteriza por que contiene un compuesto de alquilfosfocolina de la fórmula (I)



en donde

R¹ es un radical hidrocarbonado C₁₆-C₂₄ que contiene eventualmente heteroátomos, y

- 10 n representa un número entero de 1 a 5.

Se comprobó que el material médico de acuerdo con la invención que contiene un compuesto de alquilfosfocolina, en virtud de sus propiedades superficiales y de su biocompatibilidad, determina una mejora de la reacción de cicatrización y una reducción de reacciones de cuerpos extraños. El material médico está revestido en este caso preferiblemente con el compuesto de alquilfosfocolina. Sin embargo, también es posible añadir por mezcladura el compuesto de alquilfosfocolina al material base del material médico.

15

En una forma de realización preferida, el compuesto de alquilfosfocolina se aplica mediante inmersión del material médico en una disolución del compuesto de alquilfosfocolina.

Conforme a la invención se comprobó, de manera sorprendente, que materiales médicos pueden ser revestidos con compuestos de alquilfosfocolina. En este caso, el revestimiento puede aplicarse directamente de manera sencilla sin que sean necesarias sustancias auxiliares, enlazadores, demás sustancias de enlace ni revestimientos previos.

20

En el caso del material médico de acuerdo con la invención se trata, en particular, de un material biocompatible inerte, preferiblemente de un material sólido biocompatible inerte. Materiales médicos preferidos son, por ejemplo, implantes o dispositivos médicos.

En el caso del material médico de acuerdo con la invención se trata, en particular, de un material polimérico a partir del cual pueden formarse entonces dispositivos o implantes médicos. Materiales poliméricos adecuados son, por ejemplo, polímeros hidrófilos o hidrófobos, siendo preferidos polímeros hidrófilos. Ejemplos de materiales poliméricos de este tipo son, entre otros, acrilatos, en particular acrilato hidrófobo o acrilato hidrófilo, metacrilatos, en particular poli(metacrilato de metilo) (PMMA) o silicona.

25

En el caso del material se puede tratar, sin embargo, también de un metal o de una aleación de metales, que comprende, p. ej., titanio, hierro y/o cobalto.

30

El material médico de acuerdo con la invención puede utilizarse, en particular, para la producción de dispositivos o implantes médicos. Por lo tanto, la invención comprende también implantes médicos o materiales médicos empleados en el diagnóstico, terapia, profilaxis y/o para la mejora de estados indeseados, que están formados, al menos en parte, por el material médico de acuerdo con la invención. Preferiblemente, al menos la parte que entra en contacto con el cuerpo o fluidos corporales se forma a partir del material médico de acuerdo con la invención. Sin embargo, también es posible proporcionar un implante o material médico completo a base del material médico de acuerdo con la invención.

35

Materiales que se forman, al menos en parte, a partir del material médico de acuerdo con la invención son, por ejemplo, estents, válvulas aórticas, catéteres permanentes, prótesis, implantes y/o materiales de sutura y/o lentes de contacto.

40

En virtud de las propiedades tensioactivas de las fosfocolinas y de su tendencia de formar películas monomoleculares en superficies límites, los más diversos materiales pueden ser revestidos con fosfocolinas.

Una misión de la presente invención consistía, en particular, en proporcionar implantes oftalmológicos mediante los cuales se impida o al menos se reduzca la formación de catarata secundaria.

- 5 Este problema se resuelve de acuerdo con la invención mediante un implante oftalmológico, el cual se caracteriza por que contiene una alquilfosfocolina.

Se comprobó que los implantes oftalmológicos de acuerdo con la invención proporcionan una posibilidad efectiva no tóxica de la profilaxis farmacológica de la catarata secundaria. A diferencia de muchos enfoques hasta ahora practicados, de acuerdo con la invención el principio activo no sólo se administra por separado, por ejemplo mediante aplicación tópica, sino que representa un componente del implante oftalmológico. En este caso, el principio activo puede estar incorporado en el material del implante. Sin embargo, a menudo es particularmente ventajoso proporcionar implantes con un revestimiento en la superficie a base de alquilfosfocolinas. Se comprobó que con alquilfosfocolinas se pueden modificar las superficies de implantes oftalmológicos, en particular de lentes intraoculares. Esto era sorprendente, dado que no es posible con muchas sustancias un revestimiento de implantes oftalmológicos, en particular de lentes intraoculares.

Se pudo entonces demostrar que implantes oftalmológicos y, en particular, lentes intraoculares pueden ser revestidos con alquilfosfocolinas. Esto facilita claramente la aplicación. En particular, en el caso de este modo de proceder no resultan tiempos de operación prolongados mediante una aplicación intraocular de una sustancia activa. Más bien, el implante modificado en la superficie ya con las alquilfosfocolinas (APC), en particular una lente intraocular, puede ser directamente implantado como es por lo demás habitual, también sin medidas quirúrgicas adicionales.

Sorprendentemente, se comprobó ahora que mediante implantes oftalmológicos que contienen alquilfosfocolinas, en particular mediante lentes intraoculares revestidas con alquilfosfocolinas se puede reducir con éxito la aparición de la catarata secundaria. Esto está en contraposición a otros principios activos inhibidores de la proliferación, previamente sometidos a ensayo in vitro, que no muestran efecto profiláctico alguno como revestimiento sobre lentes intraoculares.

Además, conforme a la invención se comprobó que las APCs también son bien compatibles en el tramo posterior del ojo y, en particular, no inducen toxicidad retinal alguna. Esto es importante, ya que en el caso de la retirada quirúrgica de un cristalino, también se puede producir una fisura en la cápsula de la lente posterior y, de esta manera, puede formarse una unión entre el tramo anterior y el posterior del ojo (debido a la eliminación de la barrera de difusión).

En una forma de realización particularmente preferida, en el caso del implante oftalmológico de acuerdo con la invención se trata de una lente intraocular. Sin embargo, también se puede tratar de otros implantes, por ejemplo de un polímero refractario deformable tal como pasa a emplearse en la cirugía refractiva de la lente, la denominada "lens refilling" ("recarga de la lente") (Nishi et al., J. Cat. Refract. Surg. 1998 y 2008; Koopmans et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 2003 y 2006). En este sector de aplicación, el polímero se mezcla preferiblemente con la alquilfosfocolina.

Mediante la incorporación o bien el revestimiento de un implante oftalmológico con una alquilfosfocolina se modifica la superficie del implante.

- 40 De manera particularmente preferida, de acuerdo con la invención, la superficie de un implante oftalmológico, en particular la superficie de lentes intraoculares, se reviste con una alquilfosfocolina, en particular oleilfosfocolina, erucilfosfocolina (ErPC) o erucilfosfohomocolina (erufosina; ErPC₃), en particular bajo la formación de una película en superficie monomolecular.

45 En el caso de los compuestos de alquilfosfocolina empleables de acuerdo con la invención se trata, en particular, de compuestos de alquilfosfocolina lipófilos. Compuestos de alquilfosfocolina lipófilos de este tipo presentan preferiblemente al menos un radical hidrocarbonado, en particular un radical alquilo saturado o un radical hidrocarbonado que contiene uno o varios dobles enlaces, con al menos 16 átomos de C. Mediante el empleo de alquilfosfocolinas lipófilas se posibilita un revestimiento sencillo de materiales médicos, en particular de implantes oftalmológicos.

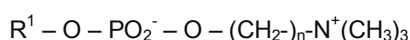
Preferiblemente, se emplea un compuesto de fosfocolina que es tensioactivo y, en particular, posee un efecto farmacéutico, y de manera particularmente preferida actúa de forma antiproliferativa, antiparasitaria, antimicótica y/o antibacteriana. Preferiblemente, se emplea un compuesto de alquilfosfocolina con efecto antiproliferativo.

De acuerdo con la invención, el compuesto de alquilfosfocolina presenta preferiblemente la fórmula (I)



en donde R^1 es un radical hidrocarbonado $C_{16}-C_{24}$ que contiene eventualmente heteroátomos, y n representa un número entero de 1 a 5. De manera particularmente preferida, n es 2 ó 3. R^1 es en particular un radical hidrocarbonado $C_{16}-C_{24}$. R^1 puede ser un radical alquilo saturado, pero también puede contener uno, dos, tres o más enlaces insaturados, en particular dobles enlaces cis. Particularmente preferidos son radicales hidrocarbonados que contienen al menos un doble enlace cis, tratándose en el caso del radical R^1 de manera particularmente preferida de un radical erucilo ($C_{22:1-cis;\omega-9}$ -radical) – o un radical oleilo ($C_{18:1-cis;\omega-9}$ -radical).

De acuerdo con la invención, el compuesto de fosfocolina es una alquilfosfocolina de la fórmula (I)



en donde R^1 es un radical hidrocarbonado $C_{16}-C_{24}$ y n representa un número entero de 1 a 5. De manera particularmente preferida, n es 2 ó 3.

Más preferiblemente, R^1 es un radical hidrocarbonado $C_{18}-C_{24}$. Este radical puede ser un radical alquilo, pero también puede contener uno o varios enlaces insaturados. Particularmente preferidos son radicales hidrocarbonados que contienen al menos un doble enlace cis. De manera particularmente preferida, en el caso del radical R^1 se trata de un radical erucilo (C_{22}) o un radical oleilo (C_{18}).

En el caso del compuesto de fosfolina se trata de una alquilfosfocolina. Preferiblemente, no se trata de una lecitina.

De la manera más preferida, en el caso del compuesto de fosfocolina se trata de erucilfosfocolina, erucilfosfocolina u oleilfosfocolina.

Las sustancias empleadas preferiblemente de acuerdo con la invención con una longitud de cadena de 16 a 24 átomos de carbono no están disueltas en agua ni están distribuidas de manera monodispersa. Más bien, en el agua forman superestructuras y se depositan fácilmente en las superficies límites o membranas. Por consiguiente, compuestos de fosfocolina forman un revestimiento sobre materiales, en particular sobre materiales médicos tales como implantes médicos, preferiblemente sobre implantes oftalmológicos y, en particular, sobre lentes intraoculares. Además, fosfocolinas se depositan fácilmente en polímeros con superficies límites hidrófobas o superficies.

El revestimiento de materiales médicos, en particular de implantes oftalmológicos, con un compuesto de alquilfosfocolina tiene lugar preferiblemente bajo formación de una película en superficie monomolecular.

Las alquilfosfocolinas (APCs) son inhibidores eficaces de la proliferación celular ocular, la migración y la adherencia en concentraciones no tóxicas. Como derivados de fosfolípidos sintéticos representan una nueva clase de sustancias farmacológicamente activas (Eibl H et al. Cancer Treat Rev 1990) y en virtud de sus buenas propiedades antitumorales (Leonard et al. J Clin Oncol 2001; Miltex®, Zentaris GmbH, Frankfurt) y antiparasitarias (Sundar et al. N Engl J Med 2002; Impavido®, Zentaris GmbH, Frankfurt) se encuentran con éxito en uso clínico.

Estudios avanzados *in vivo* en modelos de animales correspondientes en el ojo han mostrado una buena eficacia y tolerancia en el caso de la administración local por medio de aplicación intravitreal (inyección en el espacio del cuerpo vítreo, es decir, en el tramo posterior del ojo). Así, en el ojo de rata no pudo detectarse, siete días después de inyección única de erucilfosfocolina (ErPC) en el espacio del cuerpo vítreo ni morfológicamente mediante microscopía óptica y electrónica ni funcionalmente después de derivación a un electrorretinograma (ERG), merma alguna de la función de la retina (Schüttauf et al. Curr Eye Res 2005). En el ojo de conejo pudo demostrarse que ErPC liposomal así como ErPC₃ libre, administradas una vez por vía intravitreal después del desprendimiento de retina inducido de manera experimental, consiguen una inhibición significativa de la proliferación intrarretinal de las células gliales de Müller así como de células epiteliales pigmentarias subretinales sin efectos secundarios tóxicos morfológicamente detectables (Eibl et al. IOVS 2007 y Der Ophthalmologe 2007).

Ensayos a largo plazo en cuanto a la tolerancia de ErPC en el ojo de gato no han proporcionado, 28 días después de la administración intravitreal, asimismo indicio alguno sobre una toxicidad retinal. Análisis funcionales en un

5 modelo de retina *ex vivo*, hasta una concentración de 25 μM en la disolución total, no han proporcionado variaciones algunas en el electroretinograma de retina de rata incubada con ErPC₃ (véase también el Ejemplo 5 en esta memoria). Análisis comparativos en este modelo han demostrado para otras sustancias intraoculares tales como triamcinolona, una toxicidad retinal en dosificaciones clínicamente aplicadas (4 mg/ml) (Lüke et al. Exp Eye Res 2008).

De acuerdo con la invención, se comprobó entonces que, adicionalmente a la elevada eficacia y a la ausencia de efectos secundarios tóxicos, las APCs son adecuadas para ser incorporadas en implantes oftalmológicos o bien para revestir con ellas implantes oftalmológicos.

10 La posibilidad de revestir una lente intraocular con APCs es la realización técnica ideal de los conocimientos previos arriba mencionados en el contexto clínico y, por lo tanto, de relevancia clínica.

15 Otra posibilidad de la aplicación se encuentra en el sector de la denominada "lens refilling". En este caso, la lente ocular se retira quirúrgicamente y en el saco capsular se introduce un polímero de diferente composición. Este polímero sirve como un reemplazo elástico y potencialmente deformable para la lente "rígida" opacificada del paciente de edad que ha perdido su capacidad de deformación (capacidad de acomodación) y, por consiguiente, la capacidad de lectura. En el caso de muchos pacientes, esta denominada vista cansada (presbiopía) comienza ya con el 45° año de edad, de modo que éstos no pueden prescindir de unas gafas para leer. Mediante un intercambio de la lente refractiva y la implantación de una lente acomodativa o bien una lente multifocal o el nuevo enfoque de la "lens refilling" estos pacientes pueden evitar las gafas para leer, lo cual es considerado por muchos como un defecto. El polímero inyectado tiene propiedades ópticas similares a las de la lente natural deformable de una persona joven. El problema principal es, sin embargo, la formación de una catarata secundaria en el transcurso post-operativo, con lo que de nuevo empeora la agudeza visual. Las APCs ofrecen, en virtud de su estructura química, la posibilidad de ser mezcladas con el polímero y, de esta forma, ser introducidas en el ojo como componente de la nueva lente y de permanecer en el mismo.

25 Los implantes oftalmológicos se componen la mayoría de las veces de materiales tales como materiales de acrilato, materiales de silicona o hidrogeles, en particular acrilatos hidrófobos, acrilatos hidrófilos, silicona, y preferiblemente PMMA.

De acuerdo con la invención, se prefieren, por ejemplo, lentes intraoculares hidrófobas que pueden estar formadas por acrilato o silicona, o lentes intraoculares hidrófilas que están formadas por acrilato.

30 Un revestimiento de materiales de este tipo se presenta de manera extremadamente difícil. Un motivo de ello es la elevada solubilidad en agua de los principios activos utilizados tales como, por ejemplo, 5-fluorouracilo, metotrexato, Triton-X-100. En particular, a menudo tiene lugar un desprendimiento de los principios activos, tan pronto como las lentes intraoculares entran en contacto con un medio acuoso tal como se presenta en el ojo.

Se ha comprobado ahora que materiales de implantes de este tipo pueden ser revestidos de manera extraordinaria con alquilfosfocolinas o bien que alquilfosfocolinas pueden ser incorporadas sin más en materiales de implante.

35 En particular, compuestos lipófilos de alquilfosfocolina se adecuan extraordinariamente para el revestimiento de materiales de implantes. En este caso, los compuestos de alquilfosfocolina pueden ser aplicados directamente como revestimiento sobre los materiales de implantes sin sustancias auxiliares, sin enlazadores y sin la necesidad de un revestimiento previo ni de otras medidas.

40 Las alquilfosfocolinas, tal como se describen en esta memoria, poseen propiedades particulares y forman en agua superestructuras, las denominadas micelas, que pueden ser bien caracterizadas por la concentración crítica de las micelas. Estas micelas se depositan espontáneamente en superficies lipófilas y superficies límites y no pueden o sólo pueden ser separadas de nuevo con dificultad mediante medios acuosos, a diferencia de sustancias activas solubles en agua que pueden ser desprendidas fácilmente.

45 Conforme a la invención se ha comprobado que puede llevarse a cabo de manera sencilla un revestimiento de materiales médicos y, en particular, de implantes oftalmológicos con alquilfosfocolinas.

50 Se comprobó, en particular, que para el revestimiento de implantes intraoculares con APCs no son necesarias sustancias auxiliares adicionales, enlazadores u otras modificaciones de las superficies o del material, por ejemplo de lentes. Más bien, las APCs pueden aplicarse directamente sobre la superficie del material médico como revestimiento, p. ej., directamente a partir de la disolución, por ejemplo de una disolución acuosa, p. ej., de una solución salina fisiológica o de agua, o a partir de una disolución alcohólica, en particular una disolución etanólica o metanólica, o pueden ser incorporadas en el material médico. Incluso en el caso de múltiples lavados con

disoluciones acuosas, por ejemplo con solución salina fisiológica, las APCs permanecen adheridas sobre la superficie del implante oftalmológico.

5 La cantidad de compuesto de APC incorporado o bien aplicado sobre la superficie asciende en este caso ventajosamente a 0,1 hasta 200 μM , en particular de 1 a 100 μM de APC, referido a la masa del implante oftalmológico, o bien a 1 hasta 600 pmol, preferiblemente a 2 hasta 100 pmol, y en particular a 4 hasta 8 pmol de APC por mm^2 de superficie del implante médico, p. ej., de un implante oftalmológico, en particular una capa monomolecular de APC.

10 Además, se comprobó que implantes oftalmológicos revestidos con APCs, por ejemplo lentes intraoculares, presentan una actividad extraordinaria para la profilaxis de la catarata secundaria. Los implantes intraoculares despliegan su efecto farmacológico en particular no sólo inmediatamente después de la implantación, sino que presentan un efecto profiláctico más prolongado, en particular sobre la proliferación celular, migración y adherencia, es decir sobre el proceso de cicatrización en conjunto. Esta es precisamente de máxima relevancia para evitar la formación de la catarata secundaria, dado que este proceso puede desarrollarse lentamente a lo largo de hasta 5 años después de la operación. En este caso, los epitelios de la lente que permanecen en el saco capsular avanzan lentamente hacia el eje óptico y conducen, a menudo sólo después de meses o años de la operación, a correspondientes molestias por parte del paciente tales como, por ejemplo, vista nublada, vista más oscura o no nítida, sensación de deslumbramiento o molestias al leer. Mediante lentes intraoculares revestidas de acuerdo con la invención puede evitarse de manera eficaz también a largo plazo la formación de una catarata secundaria.

20 Resumiendo, se puede comprobar que alquilfosfocolinas, en virtud de sus propiedades antiproliferativas, su buena tolerancia así como su compatibilidad con materiales de implante oftalmológicos, son extraordinariamente adecuadas para la aplicación en la profilaxis farmacológica de la catarata secundaria. Las lentes intraoculares no se pueden diferenciar a simple vista de lentes intraoculares de control no revestidas de la misma carga. De particular interés es la modificación en superficie de lentes intraoculares con alquilfosfocolinas.

25 En virtud de la buena tolerancia, en el caso de las alquilfosfocolinas no son necesarias medidas adicionales operativas tales como, por ejemplo, el uso de un sistema de "cápsula sellada".

Como compuestos de fosfocolina se emplean las alquilfosfocolinas $\text{C}_{16}\text{-C}_{24}$ ya explicadas previamente en esta memoria.

Se comprobó que compuestos de fosfocolina se adecuan extraordinariamente, en particular, para el tratamiento de las siguientes enfermedades oftalmológicas:

- 30 - anexos de pestañas u oculares, en particular en el caso de infección, inflamación, estados post-operativos, cicatrices, traumas, indicaciones cosméticas, malignancia, enfermedades proliferativas, lesiones de la piel.
- Enfermedades de la conjuntiva y/o de la superficie ocular, en particular infección, inflamación, estados post-operativos, cicatrices, traumas, indicaciones cosméticas, malignancia, enfermedades proliferativas, estados provocados por las lentes de contacto, lubricación.
- 35 - Enfermedades de la córnea y/o de la superficie ocular, en particular infección, inflamación, estados post-operativos, cicatrices, traumas, indicaciones cosméticas, malignancia, enfermedades proliferativas, estados provocados por las lentes de contacto, lubricación, síndrome de Sicca.
- Uso como agentes de post-trabeculectomía, en particular como agentes anti- cicatrices.
- 40 - Para el tratamiento médico de glaucoma, para disminuir la IOD (presión interna del ojo) y/o para facilitar la evacuación del humor acuoso.
- En el caso de operaciones de catarata para evitar la catarata secundaria.
- En el caso de enfermedades de la retina, vitreorretinopatía proliferativa, desprendimiento de retina, retinopatía diabética (NPDR; PRD; maculopatía), degeneración macular condicionada por la edad, enfermedad macular (RCS; CNV).
- 45 - En el caso de uveítis, en el caso de infección intraocular, en el caso de inflamación intraocular, en el caso de malignancia intraocular y/o en el caso de traumas.

50 El empleo de compuestos de fosfocolina en el caso de enfermedades oftalmológicas puede tener lugar de diferente manera, preferiblemente mediante modificación de la superficie y lentes intraoculares, como agente de revestimiento y/o componente de lentes de contacto, como adición a polímeros para el uso intraocular (p. ej. recarga de la lente), como adición o revestimiento de dispositivos intraoculares o como adición o revestimiento de sistemas con liberación retardada.

Otro problema que se manifiesta a menudo después de una operación de cataratas es el denominado "Lens Glistening", es decir, efectos de reflejos sobre la lente. Efectos de reflejos perturbadores de este tipo aparecen en

- aproximadamente el 40 a 67% de todos los pacientes a los que, en el caso de una operación de cataratas, se les ha implantado una lente acrílica plegable hidrófoba. Se ha comprobado ahora que mediante el revestimiento de este tipo de lentes con alquifosfocolinas se evita, o al menos se reduce la formación de estos efectos de reflejos o bien burbujitas de reflejos. Con ello, se puede mejorar la biocompatibilidad de este tipo de lentes. Por lo tanto, otro objeto de la invención es el uso de compuestos de fosfocolina para reducir los efectos de reflejos en lentes intraoculares. Se parte del hecho de que las alquifosfocolinas pueden debilitar los efectos de reflejos que se forman mediante el contacto de la superficie hidrófoba de la lente con el humor acuoso hidrófilo.
- 5 La invención se explica adicionalmente mediante las Figuras adjuntas y los siguientes Ejemplos.
- 10 La **Figura 1** muestra esquemáticamente la patogénesis de la catarata secundaria (Nishi et al., J Cat Refract Surg 1996).
- La **Figura 2** muestra los resultados del examen de viabilidad celular determinado por el ensayo por exclusión del azul de tripano y el ensayo de vivo-muerto, no pudiendo determinarse diferencia alguna entre células tratadas con APC y células control.
- 15 La **Figura 3** muestra la inhibición dependiente de la concentración de la proliferación de células del epitelio de la lente humana mediante APCs.
- La **Figura 4** muestra la inhibición dependiente de la dosis de la adherencia celular de células del epitelio de la lente humana mediante APCs.
- La **Figura 5** muestra la inhibición dependiente de la dosis de la migración de células del epitelio de la lente humana.
- 20 La **Figura 6** muestra la inhibición de la proliferación del epitelio de la lente humana mediante lentes intraoculares revestidas con oleilfosfocolina en forma de un diagrama de barras.
- Se demuestra que lentes intraoculares de diversos materiales (acrilatos hidrófobos, acrilatos hidrófilos y silicona) con diseños hápticos y diámetros ópticos diferentes, revestidas con alquifosfocolinas (OIPC) pueden inhibir el desarrollo celular de células del epitelio de la lente ya proliferantes.
- 25 Para la determinación del número de células se llevó a cabo un ensayo de reducción con tetrazolio [MTT (bromuro de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio)); (Sigma – Aldrich). Se retiró la lente intraocular, las células se lavaron con PBS y se incubaron con el reactivo MTT durante 1 hora a 37°C. Sólo las células vitales metabolizan la disolución. A continuación, se desprendió la membrana celular mediante DMSO (dimetilsulfóxido) y se midió la densidad óptica en el lector ELISA a 550 nm. La densidad óptica se correlaciona en este caso con el número de células proliferantes.
- 30 La **Figura 7** muestra la inhibición de la proliferación del epitelio de la lente humano mediante lentes intraoculares revestidas con erucil-fosfocolina (ErPC3) en forma de un diagrama de barras.
- Se demuestra que lentes intraoculares de diferentes materiales (acrilatos hidrófobos, acrilatos hidrófilos y silicona) con diseños hápticos y diámetros ópticos diferentes, revestidas con alquifosfocolinas (ErPC₃) pueden inhibir el desarrollo celular de células del epitelio de la lente ya proliferantes. La determinación tuvo lugar tal como se describe en la Figura 6.
- 35 La **Figura 8** muestra células del epitelio de la lente humanas en el cultivo celular. Las fotografías se realizaron con un aumento de 100 veces en el microscopio de contraste de fases.
- La **Figura 8a** muestra células del epitelio de la lente junto a una IOL de control no revestida (izquierda) y junto a una IOL revestida con APC (derecha) después de 48 horas.
- 40 La **Figura 8b** muestra células del epitelio de la lente junto a una IOL de control no revestida (izquierda) y junto a una IOL revestida con APC (derecha) después de 48 horas.
- La **Figura 8c** y la **Figura 8d** muestran los efectos, en cada caso después de 72 horas.
- Una lente intraocular revestida con alquifosfocolina conduce, cuando se incorpora en el cultivo, a una inhibición de la propagación celular y del desarrollo de las células, tanto junto con como también bajo la lente intraocular. El efecto

queda reforzado a lo largo del tiempo (aumento del efecto de 48 a 72 h después de la incorporación en el cultivo celular de las lentes intraoculares revestidas con alquilfosfocolina).

La **Figura 9** muestra la biocompatibilidad de las alquilfosfocolinas en el endotelio de la córnea humana en el tramo anterior del ojo.

- 5 Después de llevar a cabo una tinción de viva/muerta, no se pueden observar, a concentraciones de alquilfosfocolina de hasta 1 mM, células endoteliales muertas (tinción en rojo de las células mediante yoduro de propidio).

10 Se llevó a cabo un ensayo de vivo/muerto. En este caso, los núcleos celulares de células no vitales se tiñeron de rojo, dado que yoduro de propidio sólo puede penetrar en células muertas. Los núcleos celulares de células vitales se tiñen de azul con el colorante habitual para membranas Hoechst 33342 (Intergen). Previamente, las células se sembraron en soportes de cuatro cámaras y se incubaron con las concentraciones de APC 100 µM (concentración baja de APC), 1 mM (concentración media de APC) y 10 mM (concentración máxima de APC) a lo largo de 24 h a 37°C bajo condiciones estándares de cultivos celulares. La relación de células vitales a no vitales se determinó mediante recuento bajo el microscopio de epifluorescencia (Leica DMR).

Ejemplos

15 **Ejemplo 1**

Revestimiento monomolecular de una lente intraocular con una alquilfosfocolina

1.1. Cálculos teóricos

20 Para el cálculo de la posibilidad de la "Modificación de la superficie de lentes intraoculares con alquilfosfocolinas, en particular erucilfosfocolina (ErPC) y erucilfosfohomocolina (erufosina; ErPC₃), bajo la suposición de la formación de una película en superficie monomolecular" se cumple lo siguiente:

Como superficie total de la lente intraocular (d = 4 mm, r = 2 mm) se considera una superficie esférica (S):

$$\begin{aligned}
 s &= 4 * \pi * r^2 \\
 &= 4 * 3,14 * 2. \\
 &= 50 \text{ mm}^2 \\
 &= 50 * 10^{-6} [\text{m}^2] \text{ (superficie total de la IOL)}
 \end{aligned}$$

25 Si se recurre a la sollicitación superficial de las alquilfosfocolinas en la superficie límite agua-aire (Langmuir-Trog), entonces resulta un valor de aproximadamente $25 \text{ \AA}^2 / \text{molécula} = 25 * 10^{-20} [\text{m}^2]$.

Quando se inhibe entonces la superficie total de la lente por la sollicitación superficial de una molécula individual, resulta el número de moléculas (Z) que pueden acumularse en la superficie límite de la lente:

$$Z = \frac{50 * 10^{-6} [\text{m}^2]}{25 * 10^{-20} [\text{m}^2]}$$

$$Z = 2 * 10^{14}$$

30

Para erufosina con un PM 503,75, se cumple:

$$1 \text{ mol} = 504 \text{ g} = 6 * 10^{23} \text{ moléculas}$$

Sobre una lente se encuentran $2 * 10^{14}$ moléculas. Con ello, para erufosina resulta:

$$1 \text{ molécula} = \frac{504}{6 \cdot 10^{23}} [\text{g}] = 84 \cdot 10^{-23} [\text{g}]$$

El peso de una molécula individual de erufosina es, por consiguiente: $84 \cdot 10^{-23}$ [g].

Sobre la lente se encuentran

$$\begin{aligned}
 2 \cdot 10^{14} \text{ moléculas} &= 2 \cdot 10^{14} \cdot 84 \cdot 10^{-23} \\
 5 \quad &= 1680 \cdot 10^{-10} [\text{g}] \text{ (mediante PM} = 504; \text{ transformación de g en mol)} \\
 &\cong 3 \cdot 10^{-10} [\text{mol}] \\
 &= 0,3 [\text{nmol}] = 300 [\text{pmol}]
 \end{aligned}$$

Estas consideraciones demuestran que las moléculas de ErPC₃ incorporadas en una superficie de la lente son suficientes como para determinar cuantitativamente con espectroscopía de masas la cantidad de ErPC₃

10 1.2. Revestimiento experimental de lentes intraoculares

10 lentes intraoculares se incubaron en cada caso por separado en un tubo de ensayo con 200 µl de disolución patrón de erufosina muy concentrada (EcPC₃ 10 mM en metanol o agua). A continuación, la lente se transfirió a un nuevo tubo de ensayo y se secó. Para la extracción de la erufosina adherida a la lente, ésta se aclaró con metanol/acetronitrilo (en la relación 9:1). La erufosina es bien soluble en esta mezcla de disolventes y las moléculas de erufosina que se adhieren a la lente se desprenden en el caso de esta etapa de extracción. La cantidad de erufosina se determina a continuación cuantitativamente mediante espectrometría de masas. En este caso, se midió una cantidad de ErPC por lente entre 280 y 330 pmol. La cantidad experimentalmente determinada corresponde precisamente a la cantidad teóricamente calculada para una película monomolecular a base de un revestimiento consistente en erufosina.

20 Del mismo modo pueden también revestirse con fosfocolinas otros materiales médicos.

1.3. Estabilidad del revestimiento

10 lentes intraoculares se revistieron con erufosina tal como se describe en el Ejemplo 1.2. A continuación, las lentes se transfirieron en cada caso por separado a nuevos tubos de ensayo y se sometieron a cuatro etapas de lavado con solución salina fisiológica. En otra etapa de extracción, utilizando metanol/acetronitrilo (relación 9:1), la erufosina adherida a las lentes se desprendió y se determinó por espectroscopía de masas.

La cantidad determinada de erufosina por lente oscilaba entre 280 y 330 pmol. También en el caso de un lavado o bien aclarado múltiple con solución salina fisiológica no se comprobó, por consiguiente, desprendimiento notorio alguno del revestimiento de erufosina de las lentes.

Ejemplo 2

30 Influencia de alquilfosfocolinas sobre células epiteliales de lentes humanas

2.1 Cultivo celular de células epiteliales de lentes humanas

La línea celular epitelial de lentes humanas HLE-B3 se cultivó en medio esencial modificado por Eagle (MEM; Biochrom, Berlín, Alemania), suplementado con FCS, 50 UI de penicilina/ml y 50 µg de estreptomina/ml a 37°C en una incubadora en una atmósfera de dióxido de carbono al 5%. El medio fue sustituido cada tres días. Tripsina-EDTA se utilizó para el subcultivo de células después de confluencia al cabo de 5 a 7 días. El crecimiento celular se observó diariamente bajo un microscopio de contraste de fases Leica.

Con el fin de determinar las características de proliferación, se midió el desarrollo mediante el recuento de células utilizando una cámara de Neubauer y un contador de células automatizado (CASY 1, Innovation, Karlsruhe, Alemania) en diferentes instantes. La proliferación máxima se midió al cabo de 72 horas.

2.2 Alquilfosfocolinas

- 5 Se emplearon las alquilfosfocolinas erucil-fosfocolina, así como erucilhomo-fosfocolina (erucil-(N,N,N-trimetil)-propilamonio).

Las alquilfosfocolinas se disolvieron en PBS y se almacenaron a 4°C. Con ayuda de una serie de dilución en PBS se obtuvieron concentraciones finales de APC en volúmenes iguales de PBS. Como control se utilizaron los mismos volúmenes de PBS sin la adición de APCs en todos los experimentos.

10 2.3 Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad celular de células HLE-B3 se evaluó según dos métodos diferentes: el ensayo de exclusión con azul de tripano y el ensayo de vivo/muerto. El ensayo de exclusión con azul de tripano se llevó a cabo como sigue: después del período de incubación, se hizo un recuento de muestras de células HLE-B3 en una cámara del homocitómetro mediante el procedimiento de exclusión con azul de tripano, y se calculó la proporción de células muertas.

- 15 El ensayo de vivo/muerto, un ensayo de fluorescencia de dos colores, se utilizó para cuantificar la viabilidad celular. Núcleos de células no viables aparecen en rojo en virtud de la tinción por el colorante impermeable a la membrana yoduro de propidio (Sigma-Aldrich), mientras que, por el contrario, los núcleos de todas las células se tiñeron con el colorante permeable a la membrana Hoechst 33342 (Intergen, Purchase, NY). Cultivos casi confluentes de células HLE-B3, cultivadas en cuatro cámaras, se trataron con tres concentraciones diferentes de APCs durante 24 horas.
- 20 Con el fin de evaluar la viabilidad celular, las células se lavaron con PBS y se incubaron con 2,0 µg/ml de yoduro de propidio y 1,0 µg/ml de Hoechst 33342 durante 20 minutos a 37°C. A continuación, las células se analizaron con un microscopio de epifluorescencia (Leica DMR, Bensheim, Alemania). Superficies representativas se fotodocumentaron entonces de manera digital (capturador de imágenes Leica, Bensheim, Alemania). Los núcleos marcados se recontaron en fotomicrografías de fluorescencia. Las células muertas se indicaron como porcentaje de los núcleos totales en el campo. Los datos se basan en recuentos en tres experimentos, llevados a cabo en cada caso en pocillos duplicados, con cuatro campos representativos documentados por pocillo.
- 25

Las concentraciones de APC empleadas ascendieron a 0,01 mM, 0,1 mM así como 1 mM. Este intervalo se eligió con el fin de cubrir la concentración CI_{50} estimada y determinar in vitro la viabilidad celular en el caso de concentraciones potencialmente eficaces en relación con la inhibición de la proliferación, adherencia y migración.

- 30 Para ninguna de las concentraciones analizadas se pudieron observar variaciones morfológicas de las células en el microscopio de contraste de fases. La citotoxicidad mediante el ensayo de exclusión por azul de tripano y el ensayo de vivo/muerto no se diferenciaba de células tratadas con APC y las células control (véase la Figura 2).

2.4 Ensayo de proliferación celular

- 35 Se utilizó el ensayo de reducción con colorante tetrazolio (MTT, bromuro de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) con el fin de determinar la supervivencia de las células. Células HLE-B3 (150 µl/pocillo con una densidad de 5×10^4 células/pocillo) se emplearon en placas de 96 pocillos y se trataron con diferentes concentraciones de APCs a lo largo de 24 horas. Las distintas concentraciones de 0,01 nM, 0,1 mM y 1 mM cubrían el 50% de la concentración de inhibición (CI_{50}) tal como se determina mediante ensayos preparativos. La CI_{50} se define como la concentración de un principio activo que conduce a una reducción del 50% del número de células en el caso de concentraciones no tóxicas.
- 40

- El ensayo MTT se llevó a cabo, tal como se describe por Mosmann, con algunas modificaciones. Después de retirar el medio, las células se lavaron con PBS y se añadió la disolución de MTT. Las células se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Después de tres etapas de lavado con PBS (pH 7,4), los cristales de formazan insolubles se disolvieron en dimetilsulfóxido. La densidad óptica en los pocillos se determinó utilizando un aparato de lectura de microplacas a 45 550 nm (Molecular Probes, Garching, Alemania). Los resultados de los "pocillos" se indicaron como el porcentaje medio de la proliferación control. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y se repitieron tres veces. Células HLE-B3 del mismo paso, que sólo fueron incubadas con PBS, servían como control.

- Las lentes intraoculares revestidas con alquilfosfocolinas se incorporan en un volumen del cultivo celular de 500 µl que corresponde al volumen del saco capsular de la lente humana en el que se implantan las lentes intraoculares en el caso de la operación de cataratas en el hombre. Además, las lentes intraoculares revestidas se incorporan in vitro
- 50

en un cultivo celular con células epiteliales de la lente humanas ya proliferantes. Estas son condiciones dificultadas en comparación con la situación in vivo, ya que se trata de células ya activadas.

- 5 La proliferación de HLE-B3 se redujo de manera significativa después de un único tratamiento de las células con APCs que se añadieron al medio de cultivo en presencia de suero. Las siguientes concentraciones eran adecuadas para inhibir la proliferación: 0,01 mM ($p = 0,0048$); 0,1 mM ($p < 0,001$) y 1 mM ($p < 0,001$) (véase la Figura 3). El efecto observado era dependiente de la concentración y la concentración CI_{50} se determinó próxima a 0,1 mM.

2.5 Ensayo de adherencia celular

- 10 Placas de 96 pocillos (Nunc, Wiesbaden, Alemania) se revistieron con 70 μ l/pocillo de fibronectina (50 μ g/mL en PBS [pH 7,4]; Sigma-Aldrich) durante 16 horas a 4°C. La unión no específica se bloqueó mediante 2 mg/mL de ovoalbúmina (Sigma-Aldrich) en PBS durante una hora a 37°C. Células HLE-B3 se introdujeron en placas de 96 pocillos (Nunc) con una densidad de 1×10^5 células/pocillo en 1 ml de MEM, FCS al 20%. Se añadieron APCs a tres concentraciones diferentes (0,01 mM, 0,1 mM así como 1 mM). Al cabo de cuatro horas, las células se lavaron cuidadosamente tres veces utilizando un dispositivo lavador de placas automatizado (Molecular Devices, Garching, Alemania).

- 15 Con el ensayo de reducción con colorante de tetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich) se determinó el número de células adherentes después de la etapa de lavado, tal como se describe arriba. El número de las células viables adherentes se correlacionaba con la absorbancia (densidad óptica DO), medida mediante el ensayo MTT a 550 nm. Los resultados de los pocillos se expresaron como porcentaje medio de los controles (DO control a 550 nm designada como 100%).

- 20 Después de un único tratamiento de células HLE-B3, las APCs estaban en condiciones de inducir una inhibición significativa de la adherencia celular de una manera dependiente de la dosis (véase la Figura 4). Próxima a la concentración CI_{50} , tal como se determinó previamente mediante el ensayo MTT, las APCs reducían la adherencia celular de manera muy eficaz hasta 66,5% ($p < 0,001$ a 0,1 mM), comparado con controles. La inhibición máxima de la adherencia celular se alcanzó con una concentración de APC de 1 mM (54,1%).

25 2.6 Ensayo de migración celular

- La migración se determinó mediante una modificación del método de la cámara de Boyden utilizando cámaras de microquimiotaxia (Neuroprobe, Gaithersburg, MD, EE.UU.) y filtros de policarbonato (Nucleoprobe, Karlsruhe, Alemania) con un tamaño de poros de 8,0 μ m. Un filtro revestido con fibronectina se dispuso en la parte superior sobre la mitad inferior de la cámara que contenía 180 μ l de MEM con un factor de crecimiento epidermal (EGF-BB, Peptrotech, Londres) en una concentración de 20 mg/ml. La mitad superior de la cámara se llenó con una suspensión de células HEL-B3 a una densidad de 2×10^5 células/ml en MEM y 1% en FCS (500 μ l). Las APCs se añadieron a dos concentraciones diferentes, a saber 0,1 mM y 1 mM. Las células se incubaron durante seis horas a 37°C en 5% de CO_2 . Con el fin de eliminar células que no habían migrado a través del filtro, la cara superior del filtro se raspó con una punta de algodón. Después se retiró el filtro y se fijó en metanol y, a continuación se tiñó con hematoxilina y eosina. El número de células se determinó en cinco zonas elegidas al azar a un aumento de 200 veces utilizando un microscopio de contraste de fases (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania). Células HLE-B3 del mismo paso, incubadas con el mismo volumen de PBS sin la adición de APCs servían como control.

La migración de HLE-B3 fue inhibida eficazmente mediante APCs (véase la Figura 5).

- 40 Próximas a su concentración CI_{50} , las APCs estaban en condiciones de inducir una reducción de la migración celular hasta 43,1% (0,1 mM) de las células, comparadas con los controles. Una concentración de APC de 1 mM estaba en condiciones de inducir una inhibición de la migración máxima de 95%.

Ejemplo 3

Eficacia de una lente intraocular revestida con APCs para la profilaxis de la catarata secundaria

- 45 Como se explica en el Ejemplo 1, lentes intraoculares se revisten con APC y se guardan en condiciones estériles a temperatura ambiente. Células epiteliales de la lente humanas se cultivan, tal como en el Ejemplo 2.1, en placas de Petri bajo condiciones de cultivo de células estándares. Tan pronto se alcanza una semiconfluencia de las células en la placa respectiva, se coloca en el centro de la placa una lente intraocular revestida con APC. Como control sirven lentes intraoculares no tratadas con APC. Al cabo de 3, 5 y 7 días se retiran las lentes y se determina el número de células de las células remanentes en las placas de cultivo celular tal como se describe en 2.1 mediante un contador

de células y mediante el ensayo MTT. Se manifestó un número claramente reducido de células epiteliales de las lentes en las placas de cultivo celular en las que se incorporó una lente intraocular revestida con APC.

5 En la Figura 6 (diagrama de barras para la inhibición de la proliferación del epitelio de la lente humana mediante lentes intraoculares revestidas con oleil-fosfocolina) se demuestra que lentes intraoculares de diferentes materiales (acrilatos hidrófobos, acrilatos hidrófilos y silicona) con diseños hápticos y diámetros ópticos diferentes revestidas con alquilfosfocolinas (OIPC) pueden inhibir el desarrollo celular de células epiteliales de la lente ya proliferantes.

10 Para la determinación del número de células se llevó a cabo un ensayo de reducción con tetrazolio [MTT bromuro de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio); (Sigma-Aldrich). Se retiró la lente intraocular, las células se lavaron con PBS y se incubaron con el reactivo MTT durante 1 hora a 37°C. Sólo células vitales metabolizan la disolución. A continuación, la membrana celular se disolvió mediante DMSO (dimetilsulfóxido) y se midió la densidad óptica en el lector ELISA a 550 nm. La densidad óptica se correlaciona en este caso con el número de las células proliferantes.

15 En la Figura 7 (diagrama de barras para la inhibición de la proliferación del epitelio de lente humana mediante lentes intraoculares revestidas con erucil-fosfocolina) también se muestra esto para lentes intraoculares de diferentes materiales (acrilatos hidrófobos, acrilatos hidrófilos y silicona) con diferentes diseños hápticos y diámetros ópticos que fueron revestidas con ErPC₃

Ejemplo 4

Perfil de seguridad de la clase de sustancias de las alquilfosfocolinas en el modelo de la retina bovina perfundida aislada

20 Se investigó la seguridad de alquilfosfocolinas (APC) en el modelo ex vivo de la retina bovina perfundida. Para ello, preparados de la retina bovina se perfundieron con una disolución patrón pre-equilibrada con oxígeno. El electroretinograma (ERG) se registró utilizando electrodos de Ag/AgCl. Después de anotar amplitudes de onda b estables, se añadió a la disolución nutritiva alquilfosfocolina con las concentraciones, 0,25 µM, 2,5 µM y 25 µM. Con el fin de determinar los efectos de alquilfosfocolinas sobre la función del fotorreceptor, se llevó a cabo una serie de ensayos con las mismas concentraciones, en la que se valoraron los efectos de alquilfosfocolinas sobre la amplitud de onda a. Para ello, se añadió a la disolución nutritiva aspartato en una concentración de 1 µM, con el fin de obtener amplitudes de onda a estables. Después se añadió a la disolución nutritiva alquilfosfocolina con las mismas concentraciones. Las amplitudes del EGR se observaron durante 75 minutos.

30 No se observaron en las series de ensayo reducciones algunas de las amplitudes de ondas a y b al final del tratamiento con alquilfosfocolina. No se comprobaron diferencias algunas entre las amplitudes del ERG antes y después del tratamiento con alquilfosfocolina.

Ejemplo 5

Revestimiento de lentes intraoculares con APCs

35 En una placa de 6 pocillos, el pocillo 1 se llena con 1,5 ml de disolución patrón de APC y el pocillo 3 se llena con 1,5 ml de una solución salina fisiológica. Una lente intraocular (IOL) se incorpora en el pocillo 1 en la disolución patrón de APC (APC 10 mM en solución salina fisiológica) y se incuba durante una noche a la temperatura ambiente. A continuación, se retira la lente intraocular y se coloca en el pocillo 2 vacío y se incuba durante 3 horas a 4°C. Después, la lente intraocular se transfiere al pocillo 3 (solución salina fisiológica) y se incuba durante 1 hora a 37°C. Después de la retirada de la lente intraocular, la placa de revestimiento de 6 pocillos se enrolla con una película y se almacena a 4°C.

40 La lente intraocular revestida con APC (APC-IOL) se coloca sobre células HLE-B3 proliferantes (placa de 6 pocillos, aprox. 60% de confluencia) (volumen 1,5 ml de MEM/FCS al 5%). Como control servía una lente intraocular del mismo tipo sin revestimiento de APC.

Las células se examinaron y fotodocumentaron cada dos días en cuanto al crecimiento/crecimiento excesivo de la IOL o bien la migración a la IOL.

45 Al cabo de 10 a 14 días se retiran las IOLs y las células se desprenden y se determina y compara el número de células. La determinación del número de células tuvo lugar en una cámara de recuento de Neubauer o bien en un contador de células Casy).

Ejemplo 6**Prevención de la formación de catarata secundaria en lentes intraoculares revestidas con alquilfosfocolinas**

5 En este ejemplo se investigó la capacidad de lentes intraoculares revestidas con APC de inhibir la proliferación de células epiteliales de la lente humanas. Para ello, lentes intraoculares (IOLs) de diferente diseño (IOLs de tres piezas y de una pieza) se incorporaron en una disolución de reserva de APC, se lavaron con PBS y se secaron durante una noche. Las IOLs no revestidas con los mismos diseños servían como control. Las IOLs se añadieron en cada caso a un pocillo de una placa de 24 pocillos que contenía células epiteliales de la lente humana proliferantes (HLE-B3) y se cultivaron durante tres días bajo condiciones de cultivo celular estándares. Después se llevó a cabo el ensayo MTT y se calculó el número de células por pocillo. Los días 2 y 3 se fotodocumentaron las células junto con y bajo la lente intraocular (Figura 8). Se demuestra que las lentes intraoculares revestidas con alquilfosfocolina, cuando los días 2 y 3 se fotodocumentaron las células junto con y bajo la lente intraocular (Figura 8). Se demuestra que las lentes intraoculares revestidas con alquilfosfocolina, cuando se incorporan en el cultivo, conducen a una inhibición de la expansión celular y del crecimiento de las células tanto junto como también bajo la lente intraocular. El efecto se refuerza con el tiempo (aumento del efecto de 48 a 72 h después de la incorporación de las lentes intraoculares revestidas con alquilfosfocolina en el cultivo celular).

Las investigaciones dieron como resultado que la proliferación de células epiteliales de la lente humanas fue inhibida por lentes intraoculares revestidas con APC. Los resultados, indicados en porcentaje referido a los controles, eran como sigue:

20 $39\% \pm 25$ para IOLs de una sola pieza
y
 $79\% \pm 10$ para IOLs de tres piezas.

Esto demostró que la proliferación celular en IOLs de una sola pieza fue inhibida de manera más eficaz que la proliferación celular en IOLs de tres piezas.

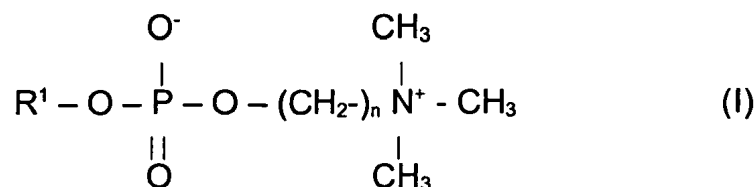
25 Se demuestra que, en particular, lentes intraoculares de una sola pieza se benefician del revestimiento con alquilfosfocolinas.

Los ensayos demostraron que APCs son agentes de revestimiento adecuados para lentes intraoculares con las que se puede inhibir de manera significativa la proliferación de células epiteliales de la lente humanas. Lentes de este tipo pueden emplearse, por consiguiente, para la profilaxis farmacológica frente a una formación de catarata secundaria (opacificación de la cápsula posterior).

30

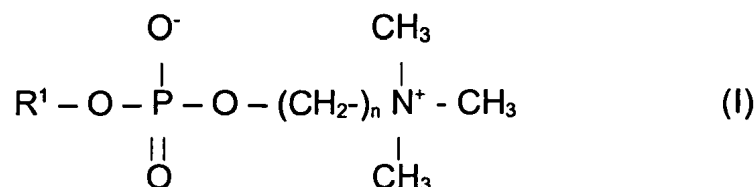
REIVINDICACIONES

1. Material médico, caracterizado por que contiene un compuesto de alquifosfocolina de la fórmula (I)



en donde

- 5 R¹ es un radical hidrocarbonado C₁₆-C₂₄ que puede contener uno o varios enlaces insaturados, y n representa un número entero de 1 a 5.
2. Material médico según la reivindicación 1, caracterizado por que está revestido con un compuesto de alquifosfocolina y/o al material base está añadido por mezclado un compuesto de alquifosfocolina.
- 10 3. Material médico según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que es al menos parte de un implante oftalmológico y/o por que es al menos parte de una lente intraocular.
4. Material médico según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por que es al menos parte de un implante médico y/o al menos parte de un material médico empleado en el diagnóstico, terapia, profilaxis y/o para la mejora de estados indeseados.
- 15 5. Material médico según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por que es al menos parte de un estent, una válvula aórtica, un catéter permanente, una prótesis, un implante y/o un material de sutura y/o una lente de contacto.
6. Material médico según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que se elige de acrilatos hidrófobos, acrilatos hidrófilos y silicona.
7. Material médico según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el compuesto de alquifosfocolina es erucilfosfocolina o erucilhomofosfocolina u oleilfosfocolina.
- 20 8. Material médico según una de las reivindicaciones precedentes, para la mejora de la reacción de cicatrización y/o para reducir reacciones de cuerpos extraños.
9. Material médico según una de las reivindicaciones precedentes, al menos como parte de un implante oftalmológico para la profilaxis y/o la prevención de catarata secundaria.
- 10 Uso de un compuesto de alquifosfocolina de la fórmula (I)



25

en donde

R¹ es un radical hidrocarbonado C₁₆-C₂₄ que puede contener uno o varios enlaces insaturados, y n representa un número entero de 1 a 5, en la producción de un material médico.

11. Uso según la reivindicación 10, en la producción de un implante oftalmológico para la profilaxis y/o la prevención de catarata secundaria.

Figura 1

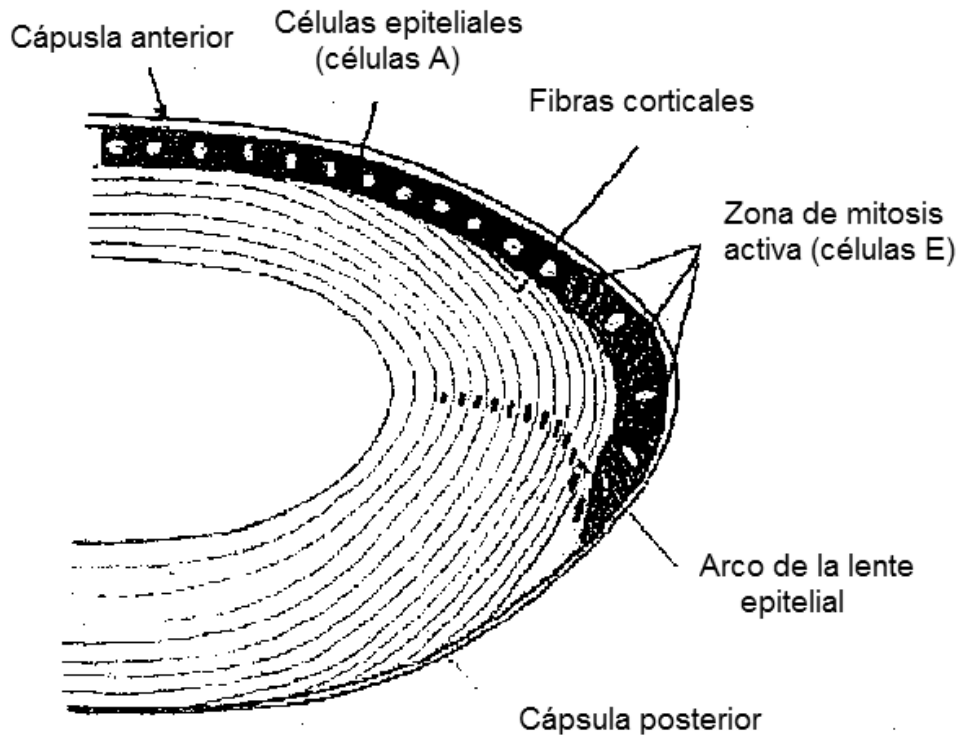


Figura 2

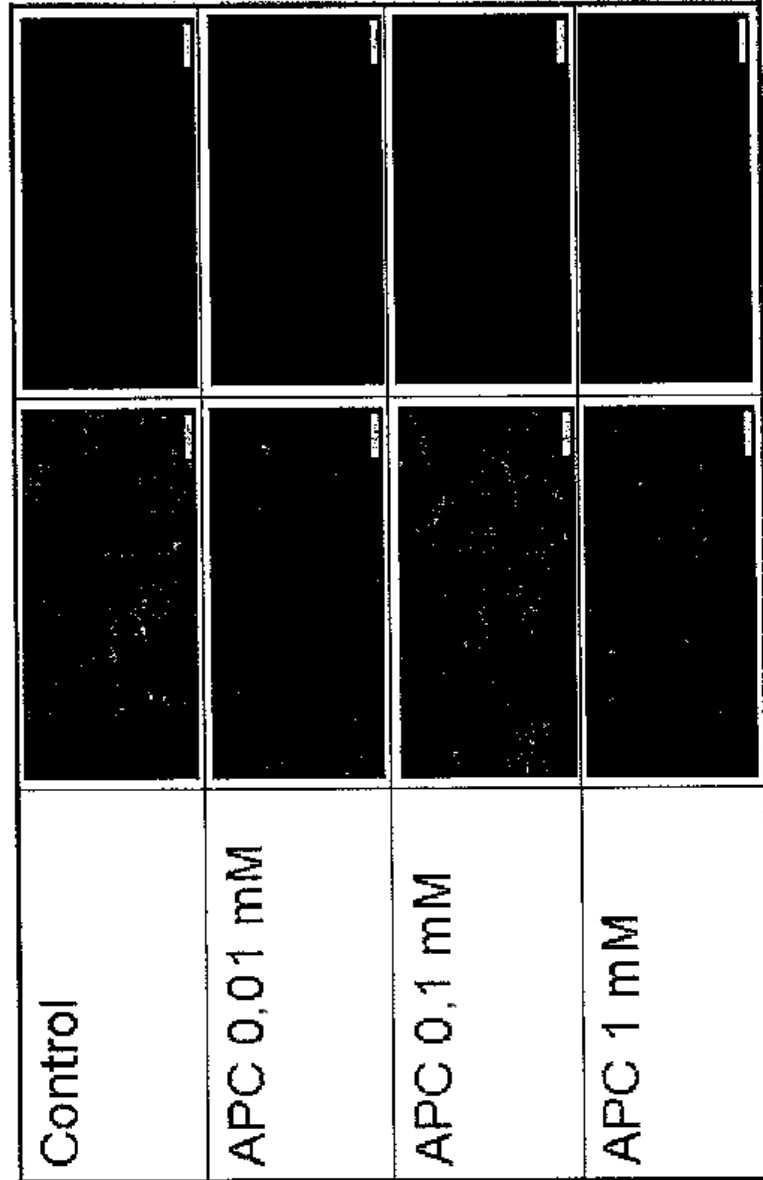


Figura 3

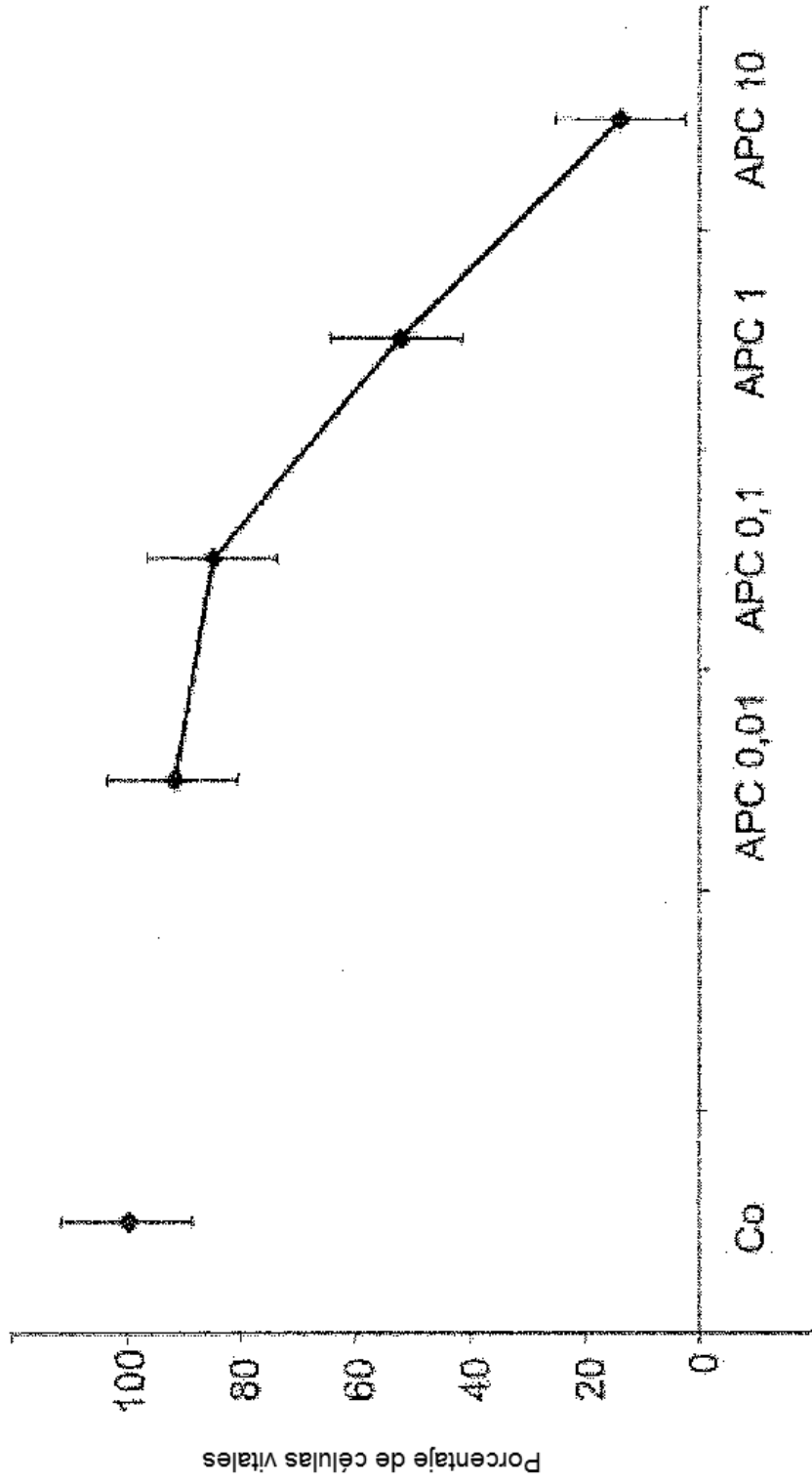


Figura 4

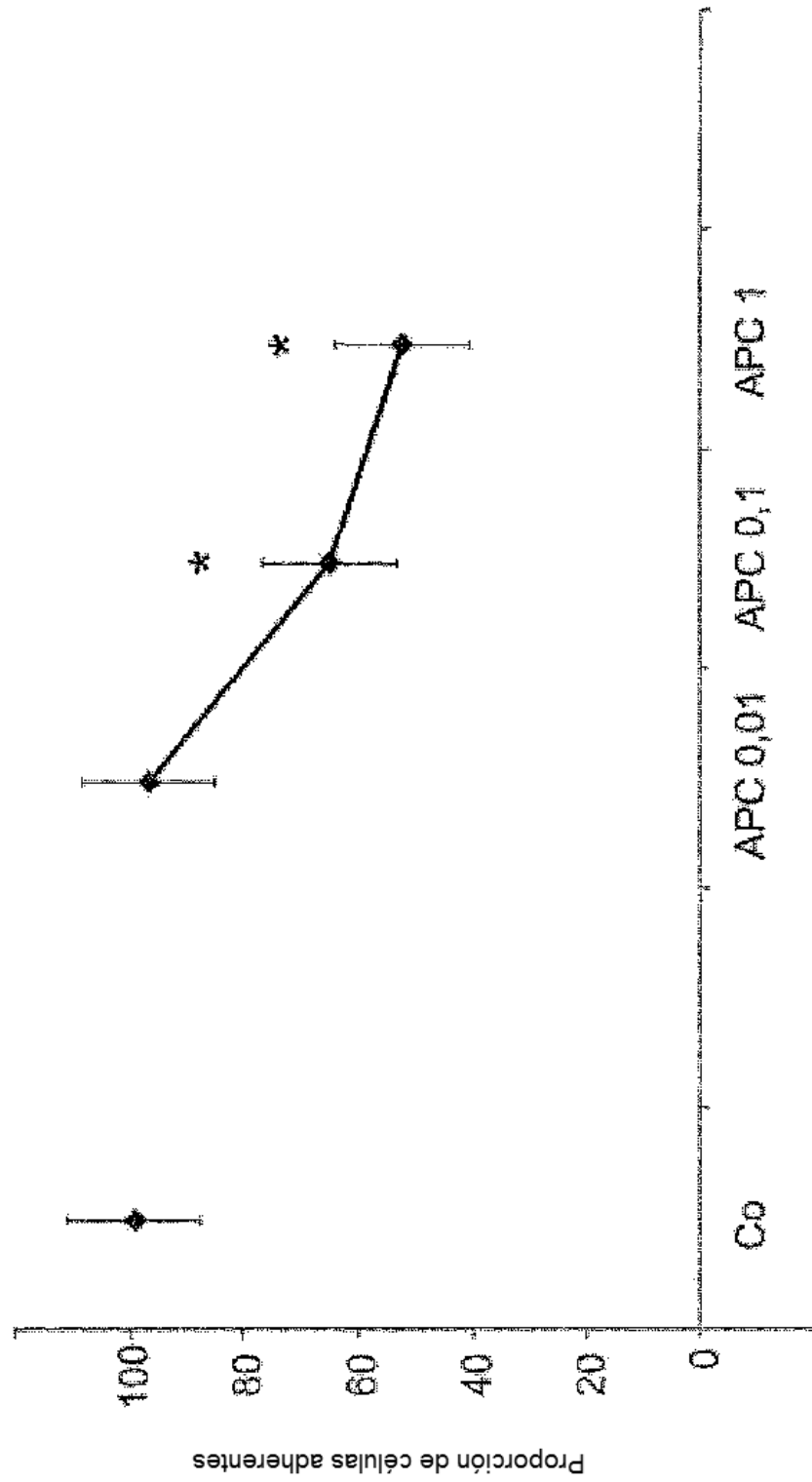
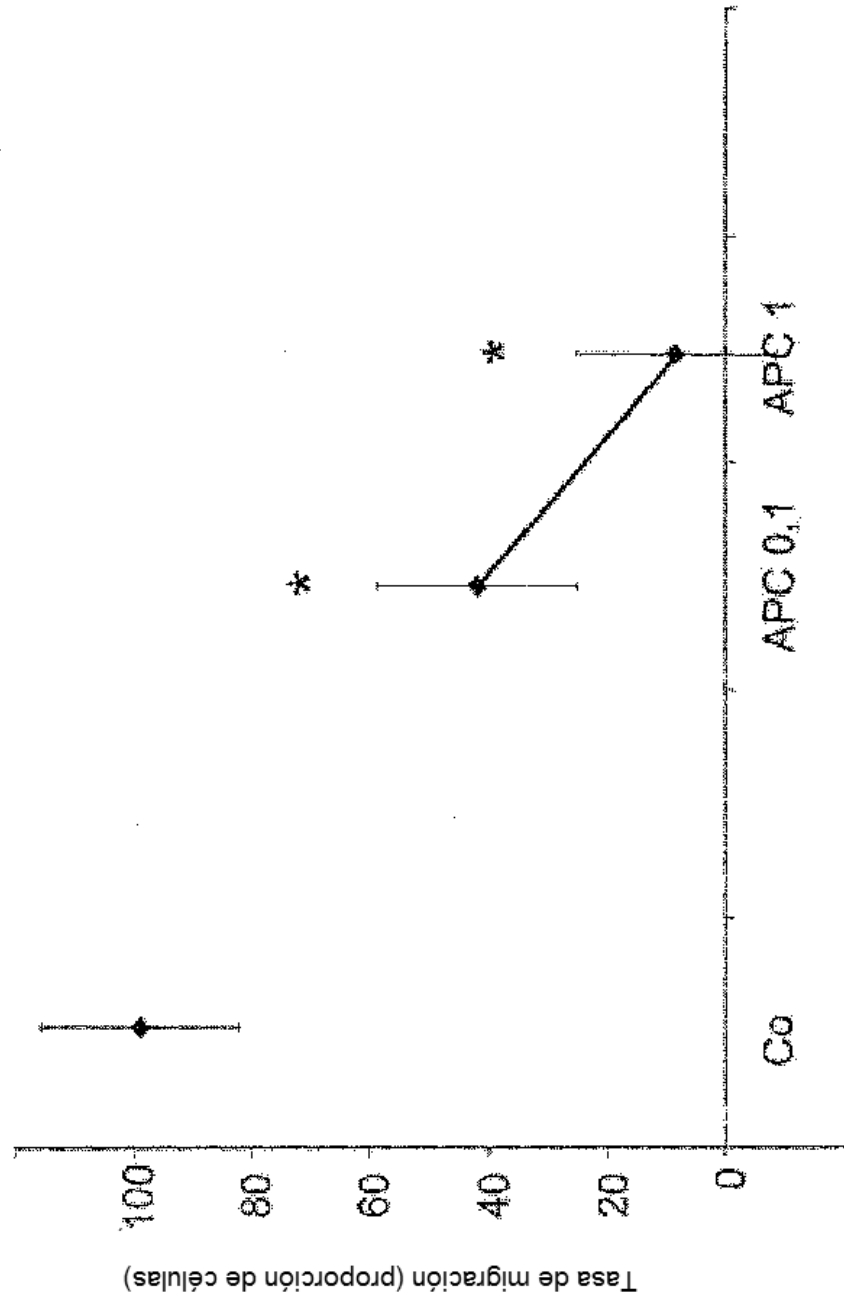


Figura 5



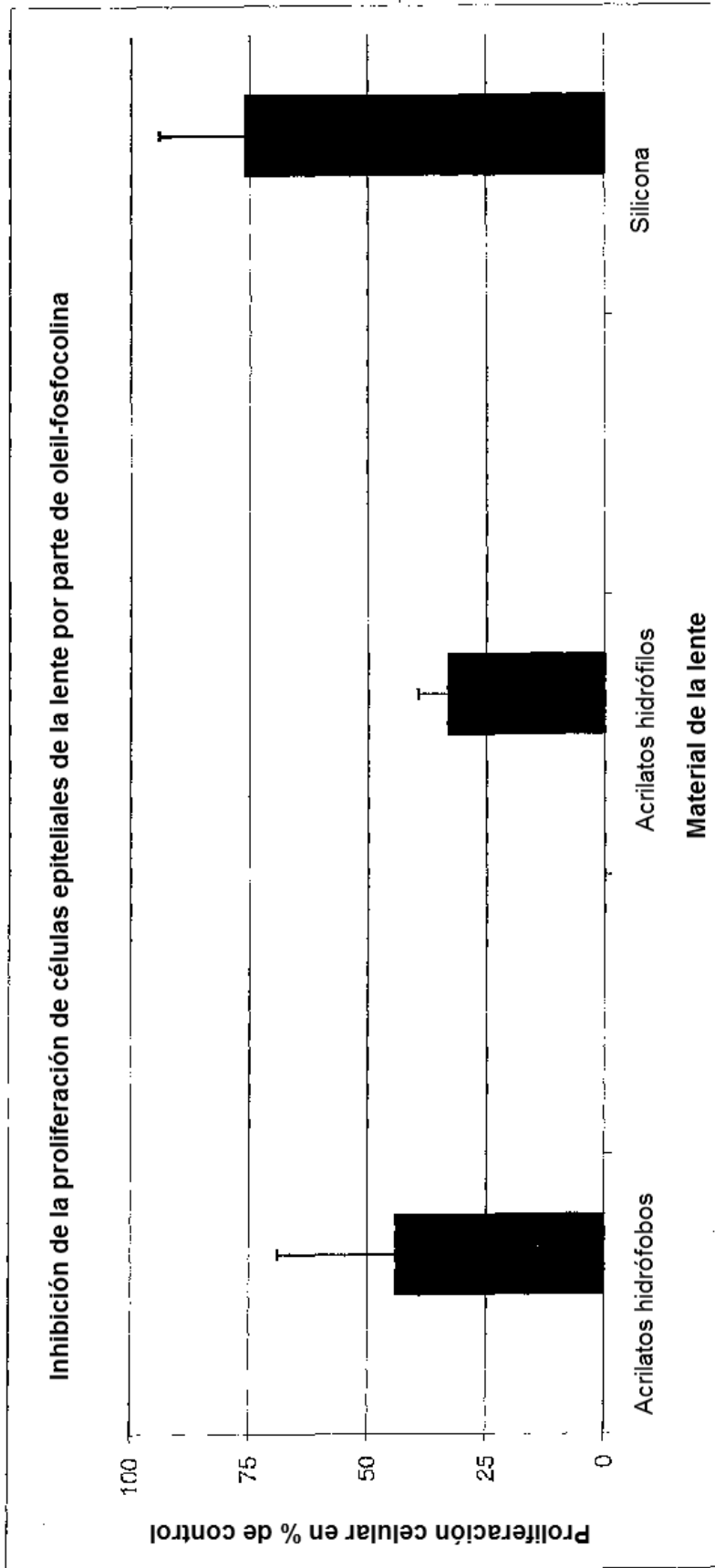
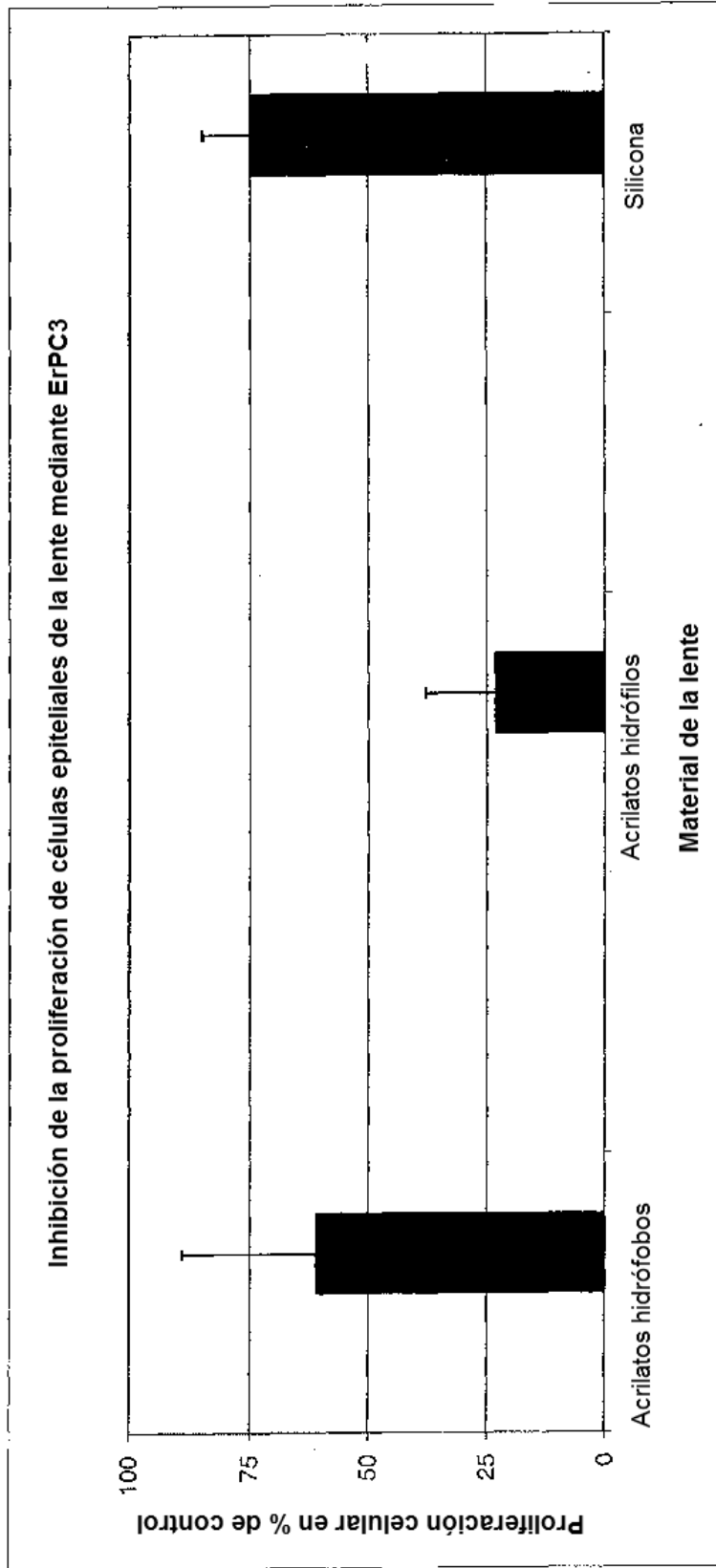
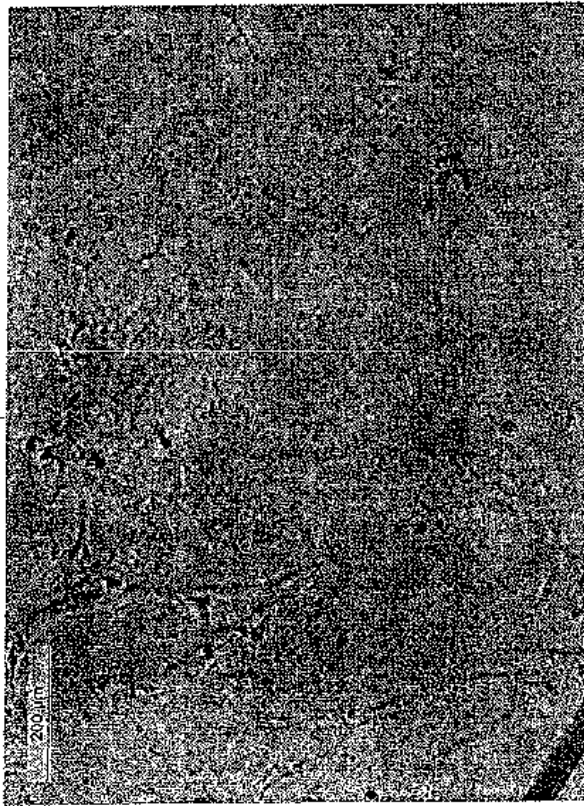


Figura 6

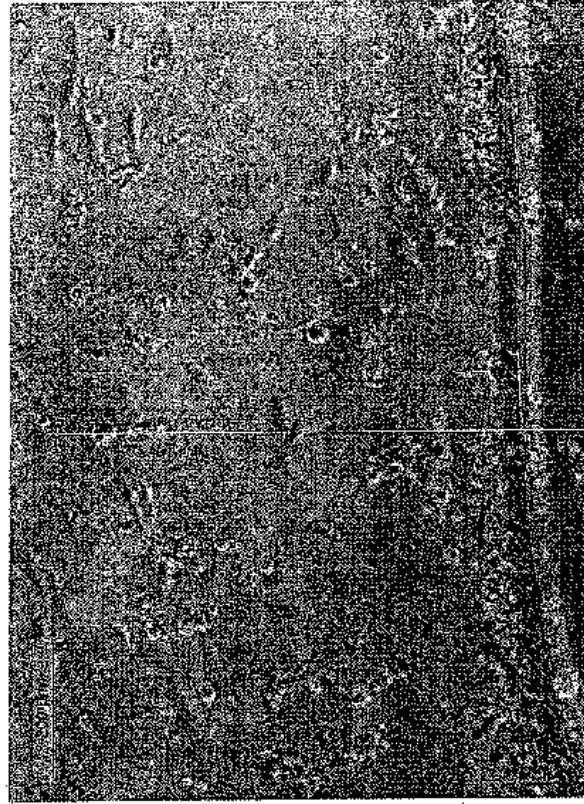
Figura 7



Lente intraocular revestida con APC después de 48 h



Células junto a IOL de control



Células junto a IOL de APC

Figura 8a

Lente intraocular revestida con APC después de 48 h



Células bajo IOL de control



Figura 8b

Células bajo IOL de APC

Lente intraocular revestida con APC después de 72 h

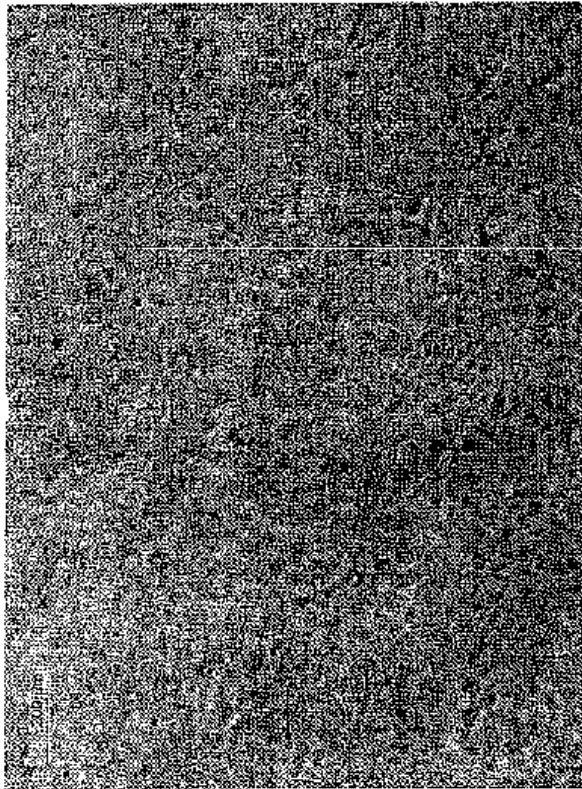
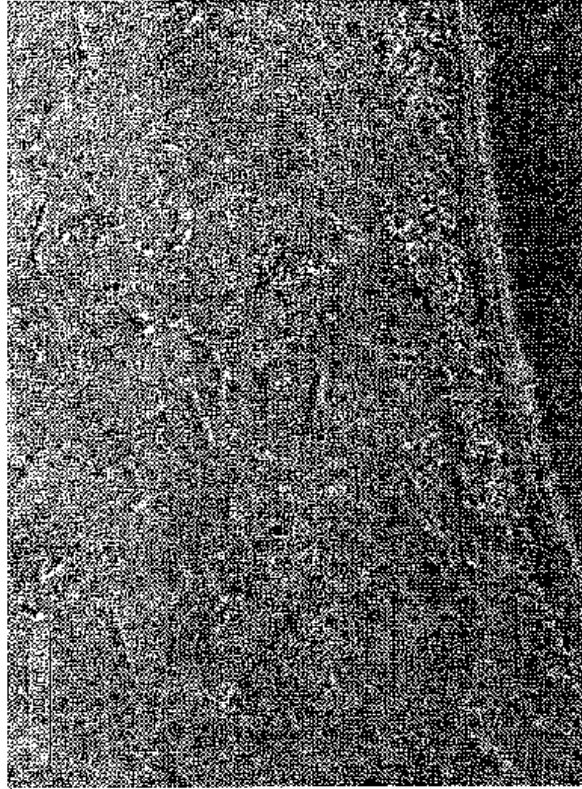
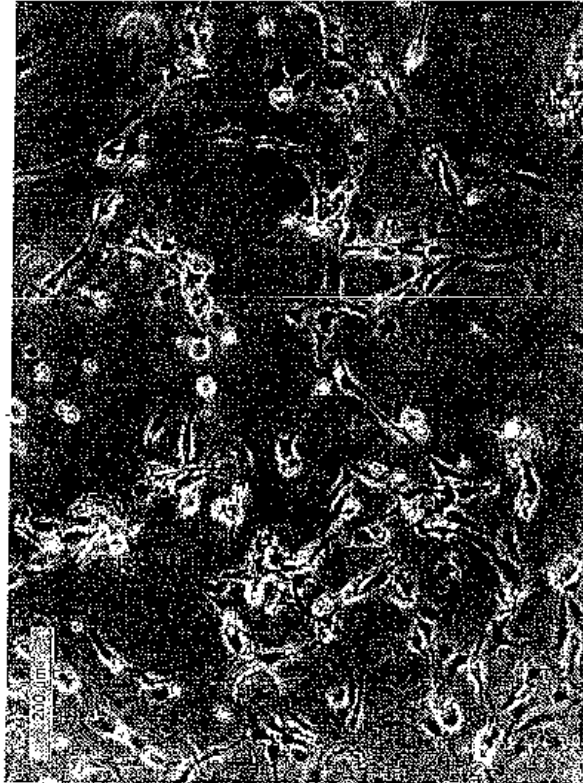


Figura 8c

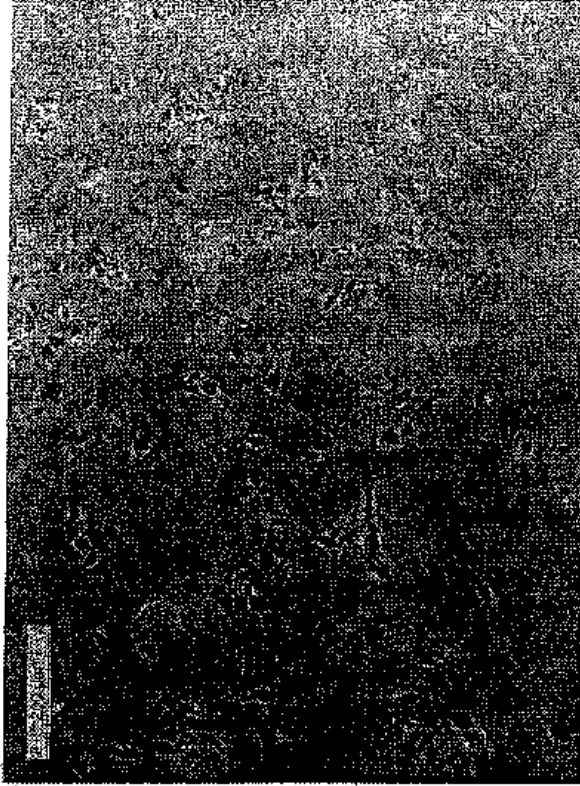
Células junto a IOL de APC

Células junto a IOL de control

Lente intraocular revestida con APC después de 72 h



Células bajo IOL de control



Células bajo IOL de APC

Figura 8d

Buena tolerancia de APCs en el endotelio de la córnea humana

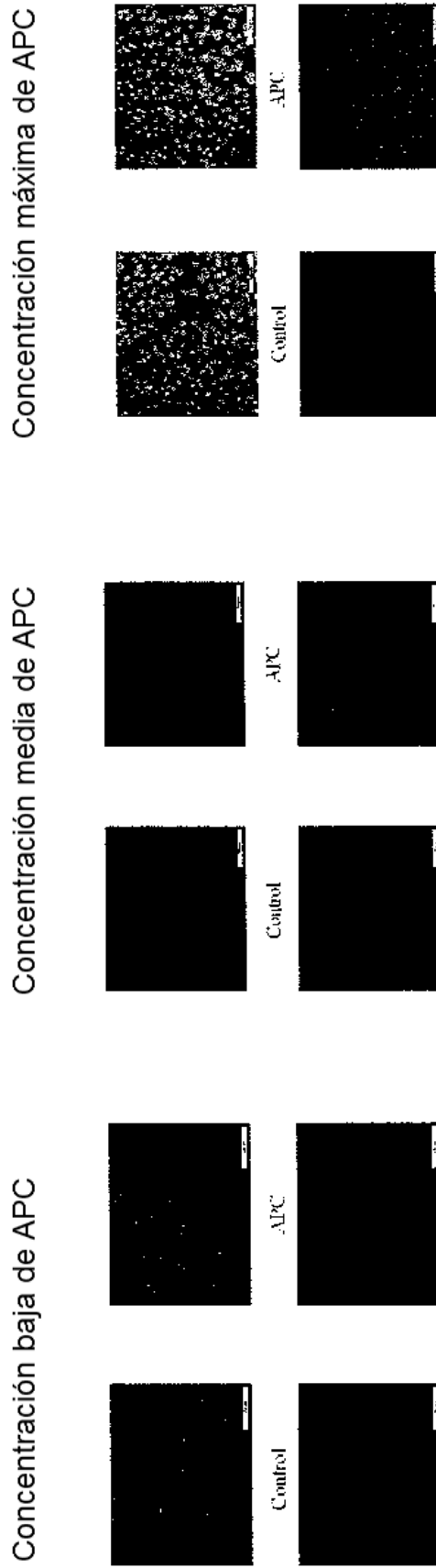


Figura 9