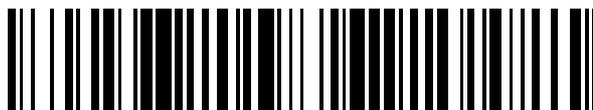


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 688**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/00** (2006.01)

**A61K 9/08** (2006.01)

**A61K 31/715** (2006.01)

**A61K 47/36** (2006.01)

**A61P 27/02** (2006.01)

**A61P 27/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2006 E 06780611 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 1912707**

54 Título: **Composiciones oftálmicas que contienen polisacáridos mucoadhesivos capaces de estimular la reepitelización corneal**

30 Prioridad:

**12.08.2005 IT RM20050443**

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

**18.10.2016**

73 Titular/es:

**OPOCRIN S.P.A. (100.0%)  
VIA PACINOTTI, 3  
41040 CORLO DI FORMIGINE (MODE, IT**

72 Inventor/es:

**CHETONI, PATRIZIA;  
BURGALASSI, SUSI;  
MONTI, DANIELA y  
SAETTONI, MARCO FABRIZIO**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 586 688 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**

Composiciones oftálmicas que contienen polisacáridos mucoadhesivos capaces de estimular la reepitelización corneal

5 La presente invención concierne composiciones oftálmicas que contienen polisacáridos mucoadhesivos capaces de promover la reepitelización corneal. Más específicamente, la invención concierne soluciones oftálmicas que contienen arabinogalactanos que tienen una acción protectora sobre el epitelio corneal, las cuales están particularmente recomendadas para su uso como lágrimas artificiales para estimular la recuperación de lesiones corneales, y particularmente útiles para personas que llevan lentes de contacto.

10 Tal como se sabe, la córnea es la sección anterior de la túnica fibrosa del globo ocular, la cual constituye solamente una sexta parte puesto que la parte restante está compuesta de la esclerótica – estando las dos estructuras en continuidad, así como contigüidad. De hecho, la córnea tiene una curvatura menor en comparación con la de la esclerótica, de manera que parece ligeramente saliente hacia delante. Debido a sus peculiares características de transparencia y avascularidad, y por su forma, que la hace una perfecta lente cóncava-convexa, la córnea constituye un elemento esencial del sistema dióptrico ocular.

15 Su superficie anterior, convexa y elíptica, tiene un diámetro horizontal ligeramente superior que el vertical, y por tanto tiene una diferente curvatura en estas dos direcciones. Esta diferencia causa astigmatismo fisiológico. La superficie posterior es cóncava y circular, y sin embargo tiene el mismo diámetro y radio en todas las direcciones. El espesor corneal oscila entre aproximadamente 0,5 mm en la región central y aproximadamente 0,7 mm en la región periférica.

20 Histológicamente, la córnea está compuesta de cinco capas, las cuales son las siguientes desde el exterior hacia el interior: el epitelio, la membrana de Bowma, el estroma, la membrana de Descemet y el endotelio.

25 La córnea lleva a cabo su función óptica gracias a una transparencia perfecta y a la regularidad de su superficie de contacto con el aire. Esta última característica es debida a la presencia de la película lacrimal (película de lágrima) que cubre el epitelio, el cual en sí mismo es rugoso debido a la presencia de una red de microcapas en la capa externa. La película de lágrima hace al epitelio suave, uniforme y de alta calidad óptica.

30 La película de lágrima, la cual también cubre la conjuntiva bulbar y la conjuntiva palpebral, está compuesta de tres capas superpuestas, que son las siguientes desde la externa hacia la interna: la capa lipídica, la capa acuosa y la capa mucosa. La mucina producida por las células caliciformes del epitelio conjuntival hace a toda la superficie epitelial suave, permitiendo la distribución uniforme del componente acuoso de la película sobre él; la capa lipídica, secretada por las glándulas meibomio y de Zeis, tienen la función de prevenir la evaporación de la película de lágrima.

35 Tal como ya se ha indicado, la transparencia es la propiedad fundamental de la córnea. Se hace posible mediante la avascularidad absoluta de su tejido, las características estructurales del estroma y mediante ciertos procesos fisiológicos específicos que gobiernan la renovación acuosa y la deturgescencia de la córnea en sí misma y previenen su imbibición, manteniendo el índice de hidratación a un valor normal de aproximadamente 78 %.

Otras características fisiológicas de la córnea son su especularidad (reflexión de la luz sobre su superficie), la cual está ligada a la integridad epitelial, y permeabilidad – una función esencial para la renovación acuosa y/o penetración de sustancias extrañas tales como fármacos.

40 La considerable sensibilidad a estímulos de diversas clases está ligada, finalmente, a la gran inervación de la membrana, la cual disminuye en la vejez y en presencia de algunas alteraciones flogísticas y degenerativas distróficas.

45 Las alteraciones corneales más comúnmente encontradas pueden representar los síntomas iniciales de procesos de una naturaleza flogística, distrófica o degenerativa, o un estado evidente de enfermedad. Entre las alteraciones de una naturaleza mecánica-traumática hay: abrasiones corneales, debido a un frotamiento superficial del epitelio corneal o al ponerse en contacto con cuerpos extraños, tales como partículas de metal, cristal o plástico, residuos de madera o planta; laceraciones y perforaciones debidas a objetos que entran en el ojo con particular fuerza y que penetran en alguna profundidad; erosiones corneales recurrentes, que consisten en episodios espontáneos de rotura o descamación de las capas epiteliales corneales; quemaduras causadas por ácidos débiles o bases débiles, calor o radiación ultravioleta.

50 La destrucción del epitelio corneal de algún modo aumenta el riesgo de invasión por parte de patógenos, con resultados potencialmente devastadores. La conjuntiva es, de hecho, uno de los tejidos del cuerpo colonizado por microbios justo desde los primeros momentos de vida extrauterina., y se debe indicar que, entre los microorganismos residentes habituales, tales como streptococci (*St. viridans*), staphylococci (*S. epidermidis*, *S. aureus*), *haemophiles*, *Propionibacterium acnes*, hay algunos que tienen todas las características para ser  
55 considerados como verdaderos patógenos.

El ecosistema conjuntival es un sistema que tiende a estar en equilibrio y biológicamente activo, y se mantiene tal cual siempre y cuando el tejido, los microbios o los factores ambientales no aumenten lo cual altera este equilibrio, haciendo de ese modo al hábitat conjuntival un terreno favorable para microbios o para el hospedante. Los factores tisulares son dependientes de la estructura histológica del tejido conjuntival y de las secreciones que componen la película lacrimal: estos factores pueden actuar como causas conjuntas en la patogénesis de diversas infecciones corneales traídas por bacterias, virus y micetos. Estos pueden invadir el tejido corneal, especialmente en presencia de lesiones corneales, y dan lugar a queratitis de incluso una clase muy seria e incapacitante que puede conducir a úlcera corneal. La queratitis bacteriana se caracteriza por dolor agudo, ulceración del epitelio y, algunas veces, del estroma corneal, así como secreción conjuntival. Los agentes etiológicos de este tipo de lesiones oculares son: *S. aureus*, *St. pneumoniae*, *Ps. aeruginosa*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*. Además, *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium fortuitum* pueden causar lesiones ulcerativas corneales crónicas. En relación a los agentes etiológicos de un tipo micótico, la queratitis micótica está causada principalmente por micetos saprófitos filamentosos y levaduras que colonizan sobre las lesiones epiteliales corneales. Finalmente, la queratitis debida a *Acanthamoeba* es una forma rara de queratitis crónica causada por este parásito – el cual puede incluso amenazar la visión – y se caracteriza por una supuración multifocal en forma de anillo del estroma corneal en sujetos que presentan ulceraciones previas.

Todas las alteraciones corneales (sean del tipo traumático, flogística o degenerativa) que causan destrucción de tejido o pérdida de sustancia se reparan rápidamente a través de mecanismos fisiológicos que difieren en parte de aquellos de otros tejidos debido a la avascularidad de esta membrana. El proceso de curación, que está influenciado por las características de la lesión y es ciertamente más problemático en presencia de ulceraciones sépticas, siempre empieza en el nivel epitelial, no solamente en caso de daño superficial limitado a su capa, sino también en casos que afectan el parénquima. Es decir, hay una interacción del epitelio en la curación de lesiones estromales que se pueden ejemplificar como la formación de un “tapón epitelial” necesario para regular el desarrollo de los posteriores fenómenos de regeneración de colágeno.

Heridas epiteliales simples o abrasiones se reparan rápidamente gracias también a la actividad mitótica marcada de los elementos celulares en esta región. Realmente, en el momento del trauma, allí ocurre una interrupción temporal del mecanismo fisiológico de descamación celular superficial y un cambio y migración de células adyacentes intactas al área dañada. La interrupción cesa cuando el área deficiente está completamente cubierto y la regeneración de los elementos epiteliales asegura la restauración de las características estructurales normales.

Si la alteración es epitelial, su completa recuperación garantiza la restauración de la perfecta especularidad y transparencia de membrana.

Una causa particular y no rara de abrasiones corneales son las lentes de contacto. Las causas de abrasión pueden implicar diferentes factores de una clase fisiológica, tóxica o mecánica, y las abrasiones corneales inducidas por lentes de contacto pueden ser debidas, en particular, a su uso, a dificultades en su inserción y retirada, problemas de las relaciones lentilla-córnea, lentillas dañadas o a cuerpos extraños atrapados bajo una lentilla. Estas abrasiones pueden derivar del uso de tanto lentillas rígidas como blandas, pero son más comunes en usuarios de lentillas rígidas. Un estudio conducido sobre 500 usuarios de lentes de contacto blandas mostró que un tercio de ellos tenían problemas bastantes serios con sus ojos que podrían dar como resultado infecciones, y que casi el 50 % de ellos tenían señales de lesiones leves sobre al menos un ojo (R.J. Derick et al., *CLAO J.*, 1989 Oct-Dic; 15(4):268-70).

Por tanto, las abrasiones corneales son un problema que pueden afectar a cualquiera, pero las lentes de contacto indudablemente causan fricción sobre la córnea, y esto aumenta la probabilidad de la existencia: usuarios de lentes de contacto sufren de lesiones corneales aproximadamente tres veces más que lo no usuarios.

El uso de lentes de contacto también puede producir una serie de otros problemas que derivan de su interferencia con el suministro de oxígeno normal al epitelio corneal o de afecciones patológicas, tales como conjuntivitis papilar gigante o vascularización corneal, o el caso más común de síndrome de ojo seco. Este último, también se conoce como “ojo seco” o queratoconjuntivitis sicca, es un trastorno causado por una disminución en la cantidad y calidad de las lágrimas. Los síntomas típicos de la patología son una sensación de irritación y quemado de los ojos, la sensación de arenilla o cuerpos extraños, fotofobia, dolor y niebla visual. A la larga pueden ser ulceraciones que comprometen la propia visión del ojo.

Para tratar el ojo seco o reducir sus síntomas relacionados, se han introducido muchas formulaciones fluidas de lágrima artificial, para ser aplicadas periódicamente por instilación sobre la córnea (o en el fórnix conjuntival) para proporcionar un sustituto fluido de lágrima y aliviar la sensación de sequedad en los ojos. Para aumentar el tiempo de permanencia sobre la superficie corneal y también tener una buena tolerabilidad, estas preparaciones generalmente se vuelven viscosas al añadir agentes de alto peso molecular – normalmente polímeros hidrosolubles de origen sintético, semi-sintético o natural. Sobre la suposición de que, para tener un alto tiempo de permanencia precorneal, un sustituto fluido de lágrima debe tener propiedades tan parecidas como sea posible a aquellas de las dispersiones de mucina, es decir, debe comportarse tanto como sea posible como una sustancia muco-mimética, se ha dado la preferencia a composiciones basadas en compuestos macromoleculares de origen natural tales como derivados de celulosa (en particular, ésteres de celulosa como carboximetilcelulosa, y derivados de alcohol de éteres de celulosa como hidroxipropilmetilcelulosa), glicosaminoglicanos (en particular, ácido hialurónico, un polisacárido

presente en muchos tejidos y fluidos humanos y animales, y ampliamente usados en preparaciones oftálmicas), polisacáridos que tienen propiedades reológicas adecuadas (tales como polisacárido extraído de goma de tamarindo, TSP).

5 Además, para ser capaz de presentar las propiedades lubricantes requeridas de la superficie corneal, estos sustitutos fluidos de lágrima siempre tienen una cierta viscosidad (incluso si, en soluciones preferidas, esta viscosidad disminuye drásticamente cuando el producto se somete a una tensión cortante ("shear stress"), como en el caso de parpadeo), y puede implicar el nublado de la vista, así como dejar residuos sobre la córnea o sobre el borde de los párpados.

10 En el caso de los anteriores problemas relacionados con el uso de las lentes de contacto, sin embargo, extremadamente importante para un posible producto usado como suplemento fluido de la lágrima para tener una viscosidad baja – siendo además bien tolerado y no teniendo efectos irritantes sobre el ojo – para no empañar la visión o dejar residuos sobre las lentes y sobre los bordes del párpado. Igualmente importante para dicho producto es ser capaz de asegurar la integridad epitelial corneal y prevenir cualquier interacción negativa y/o reacción con el material de las lentes de contacto.

15 La publicación científica por John L. Ubels et al. (J.L. Ubels et al. "Effects of preservative-free artificial tear solutions on corneal epithelial structure and function", *Archives of Ophthalmology*, vol. 113, N° 3, 1995, pp.371-378) describe soluciones de lágrima fisiológica artificial que contienen bicarbonato libres de conservante. Se sugiere que tales soluciones son beneficiosas en proporcionar confort a los pacientes con ojo seco leve a moderado pero solamente para promover la recuperación de la barrera epitelial corneal dañada, que puede ocurrir con el ojo seco, otras enfermedades de superficie ocular o uso en exceso de soluciones oftálmicas conservadas.

20 La publicación de patente internacional WO 03/092706 A1 describe composiciones farmacéuticas que contienen goma xantana como agente de reepitelización especialmente adecuado para el uso oftálmico. Las composiciones descritas se proponen para su uso en el tratamiento de heridas epiteliales corneales.

25 De acuerdo con la presente invención, se ha encontrado que las soluciones oftálmicas que contienen particulares polímeros de polisacárido naturales, arabinogalactanos, formulados para tener una viscosidad virtualmente insignificante, poseer mucoadhesividad suficiente para evitar ser drenado en un corto tiempo de la superficie corneal y, además ser bien tolerado, poseen una capacidad notable para promover la reepitelización. De hecho, se ha demostrado, dentro del marco de los estudios conectados con la presente invención, que estas composiciones – aplicadas sobre ojos con un epitelio dañado – aceleran la recuperación. Como resultado, las composiciones  
30 propuestas, asociadas con lentes de contacto, son capaces de estimular la curación de abrasiones corneales que pueden surgir, previniendo el empeoramiento del daño epitelial y cualquier complicación. Tal como ya se ha mencionado, otra característica importante del producto, que lo hace innovador e ideal para el propósito, es que – aunque poseyendo propiedades mucoadhesivas adecuadas – no altera la viscosidad de las soluciones acuosas, y, por tanto, no interfiere con la visión tanto en sujetos que llevan lentes de contacto como en no usuarios. A la vez, las propiedades mucoadhesivas permiten al producto establecer enlaces de diversas clases con la mucosa que cubre la  
35 superficie conjuntival y corneal del ojo, y estos enlaces permiten una mayor permanencia del producto en la región preocular, y así la posibilidad de realizar la actividad de reepitelización e hidratación que caracteriza al producto.

40 Soluciones oftálmicas para su uso como lágrimas artificiales que contienen arabinogalactano como polímero de lubricación superficial corneal ya están descritas en la patente estadounidense N° 4039662 (Hecht et al., asignada a Alcon Laboratories Inc.). En este caso, sin embargo, las propiedades de reepitelización del polisacárido no estaban puestas de relieve o explotadas y, sobre todo, su utilidad estaba condicionada a la presencia necesaria de cloruro de benzalconio en la formulación. De acuerdo con la descripción de este documento, de hecho, la incorporación de cloruro de benzalconio – una sustancia ya usada en las composiciones oftálmicas como biocida – es un elemento crítico para la preparación propuesta, debido a que se cree que este compuesto, combinado con, o formando  
45 complejos con, el polisacárido, es la causa de la permanencia del producto en un estado adsorbido sobre la superficie corneal, a fin de realizar su función como estabilizador de la película precorneal. En línea con esta observación, el documento citado propone soluciones oftálmicas a base de arabinogalactano y conteniendo cloruro de benzalconio como ingrediente necesario.

50 De acuerdo con los estudios llevados a cabo en el marco de la presente invención, por otro lado, las propiedades de reepitelización y protectoras de la superficie corneal mostradas por arabinogalactanos, así como sus propiedades mucoadhesivas que los da un alto tiempo de permanencia en la película precorneal, incluso en ausencia de cualquier viscosidad significativa, no están de ninguna manera condicionados por la copresencia de cloruro de benzalconio. Por lo tanto, las composiciones de reepitelización que contienen arabinogalactanos de acuerdo con la presente invención descartan la presencia de cloruro de benzalconio puesto que pueden hacer uso de muchos otros  
55 productos adecuados con el propósito la composición debería requerir la inclusión de conservantes.

Tal como se conoce, los arabinogalactanos son una clase de polisacáridos densamente ramificados de larga cadena con un peso molecular que oscila entre 10.000 y 120.000 daltons y una estructura central que consiste en una cadena de unidades de galactopiranosas. En la naturaleza se encuentran en diversos sistemas microbianos, especialmente Mycobacterias, donde están formando complejos con peptidoglicanos y ácido micólico para formar la

- pared celular. Muchas plantas comestibles y no comestibles son fuentes ricas de arabinogalactanos, principalmente en una forma glicoproteica. Muchas hierbas con propiedades inumunoestimulantes conocidas, tales como *Echinacea purpurea*, *Baptisia tintoria* y *Thuja occidentalis*, contienen cantidades significantes de arabinogalactanos. Los tejidos leñosos de plantas del género *Larex* son particularmente ricos en arabinogalactanos, especialmente *Larex occidentalis*, pero también *Larex dahurica* (original de Asia Central), por ejemplo, *Larex ducidua* (europeo) y *Larex leptolepis* (japonés). De hecho, la madera del alerce es la fuente industrial más común de arabinogalactano, a partir de dicha fuente este polisacárido se extrae para ser usado no solamente con propósitos industriales, tales como en la industria cosmética, sino también – y, sobre todo – en la industria alimenticia, como ingrediente dietético y nutricional rico en fibra, en bebidas y también como agente inmunomodulador.
- 5
- 10 Por lo tanto, la presente invención específicamente proporciona una composición oftálmica para su uso en un método para el tratamiento de lesiones epiteliales corneales, es decir, como un sustituto fluido de lágrima que tiene una actividad queratoprotectora y una actividad de reepitelización, que consiste en una solución acuosa que contiene entre 1 % y 10 % en peso de arabinogalactano y no contiene cloruro de benzalconio. Las concentraciones más adecuadas de arabinogalactano para el uso propuesto de acuerdo con la presente invención son, específicamente, las concentraciones que oscilan entre 3 % y 5 % en peso de polisacárido, en una solución acuosa.
- 15
- De acuerdo con las realizaciones preferidas de la presente invención, el arabinogalactano usado en las composiciones propuestas es arabinogalactano de alerce de grado farmacéuticamente aceptable. En particular, el arabinogalactano preferentemente usado en las preparaciones de acuerdo con la presente invención (arabinogalactano CASN° 9036-66-2) tiene el nombre comercial de FiberAid® AG y es producido por LAREX® Company (Cohasset, Mn, EEUU) de acuerdo con la patente americana N° 5756098. Este arabinogalactano está en la forma de un polvo fino blanco (peso molecular = 45 kdalton), dispersable pero no compatiblemente soluble en agua fría.
- 20
- Todos los arabinogalactanos aislados de alerce son polisacáridos con menos nitrógeno. Un tercio de la molécula está compuesta de la cadena principal, del tipo (1→3)-β-D-galactopirano, mientras que el resto consiste en grupos laterales unidos en la posición (1→6) a cada unidad de galactosa, cuyo tamaño varía de monosacáridos a oligosacáridos. La distribución de los grupos laterales no es uniforme. Con frecuencia, el grupo lateral es el disacárido β-D-Galp-(1→6)-β-D-Galp o β-L-Arap-(1→3)-α-L-Araf. Menos frecuentemente, está el monómero β-D-Galp o el monómero α-L-Araf. Las unidades de galactosa y arabinosa están en una proporción molar de aproximadamente 6:1.
- 25
- 30 Estudios morfológicos sobre arabinogalactano han mostrado que este polímero tiene gran libertad conformacional y puede tomar muchas formas distintas, pero la cadena principal generalmente tiene una estructura de triple hélice en espiral mientras que los grupos laterales forman ramificaciones flexibles con muchos grupos hidroxilo expuestos (R. Chandrasekaran, S. Janaswamy, 2002, *Carbohydrate Research*). Esto se considera que es la razón que subraya las características mucoadhesivas del polímero, que lo hace capaz de establecer enlaces de hidrógeno con las moléculas de mucina del ojo.
- 35
- De acuerdo con algunas realizaciones específicas de la presente invención, la composición oftálmica contiene – además de arabinogalactano – también uno o más agentes de ajuste de tonicidad que dan a la solución el valor de osmolaridad deseado. Puesto que la solución oftálmica propuesta puede ser isotónica o ligeramente hipotónica con respecto al fluido de lágrima, los agentes reguladores de la tonicidad estarán presentes en la composición en tal cantidad para proporcionar una solución con una osmolaridad que oscile entre 150 y 300 mOsm/l. Preferentemente, dichos uno o más agentes reguladores de la tonicidad están elegidos entre el grupo que consiste en: manitol, cloruro de sodio, cloruro de potasio, dextrosa, ácido bórico y sorbitol.
- 40
- Puesto que el arabinogalactano resulta que es estable también en soluciones acuosas tamponadas a diversos valores de pH, otros ingredientes que se pueden añadir, de manera similar a los que ya se conocen en el campo farmacéutico, son uno o más ácidos o bases oftálmicamente aceptables, como correctores del pH, y/o uno o más tampones. En particular, los tampones utilizables se pueden elegir entre el grupo que consiste en: tampón fosfato, tampón borato, tampón citrato, tampón bicarbonato, tampón trizma (trihidroximetil-aminometano). Además, se pueden usar de forma ventajosa otros sistemas tampón en las composiciones de acuerdo con la invención.
- 45
- 50 Cuando el producto no está empaquetado en unidades monodosis, la composición también puede incluir conservantes y agentes antimicrobianos, excepto para el cloruro de benzalconio. Posibles conservantes que son compatibles con el producto son, en particular, mertiolato de sodio o timerosal, nitrato o acetato fenilmercurio, alcohol feniletílico, metil-, etil- y propilparabeno, acetato de clorhexidina o gluconato y clorobutanol.
- Finalmente, incluso se pueden añadir, cuando es requerido, agentes quelantes como los edetatos o EDTA a las composiciones que contienen arabinogalactanos de acuerdo con la invención.
- 55
- De acuerdo con otro aspecto de la misma, la presente invención también proporciona el uso de una composición oftálmica que contiene entre 1 % y 10 % en peso, y preferentemente entre 3 % y 5 % en peso, de arabinogalactano en solución acuosa y que no contiene cloruro de benzalconio para la producción de una solución de lágrima artificial para el tratamiento de lesiones epiteliales corneales, es decir, que tiene una actividad queratoprotectora y de

reepitelización. Tal como ya se ha indicado, la formulación de dicha composición oftálmica puede descartar el uso de cloruro de benzalconio sin ningún problema en absoluto.

5 Más específicamente, la composición oftálmica realizada con el uso de arabinogalactano de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención es un sustituto fluido de lágrima indicado para usuarios de lentes de contacto. De acuerdo con algunas realizaciones específicas, dicha composición oftálmica es un sustituto fluido de lágrima indicado para el tratamiento de lesiones epiteliales corneales y, en este último caso, puede ser más específicamente una composición oftálmica recomendada para el tratamiento de abrasiones corneales causadas por el uso de lentes de contacto.

10 A continuación, se presentan algunos ejemplos de composiciones que contienen arabinogalactano utilizables como sustitutos fluidos de lágrima con una actividad queratoprotectora y de reepitelización de acuerdo con la invención.

Composición 1

arabinogalactano	2 % p/p
manitol	q.s. a 300 mOsmol/kg
tampón fosfato pH 7,4	q.s. a 100 % p/p

Composición 2

arabinogalactano	3 % p/p
manitol	q.s. a 300 mOsmol/kg
agua desionizada	q.s. a 100 % p/p

Composición 3

arabinogalactano	6 % p/p
NaCl	q.s. a 300 mOsmol/kg
agua desionizada	q.s. a 100 % p/p

Compuesto 4

arabinogalactano	2 % p/p
manitol	q.s. a 300 mOsmol/kg
nitrate de fenilmercurio	0,002 % p/p
tampón fosfato pH 5,9	q.s. a 100 % p/p

15 Composición 5

arabinogalactano	5 % p/p
NaCl	q.s. a 300 mOsmol/kg
mertiolato de sodio	0,008 % p/p
agua desionizada	q.s. a 100 % p/p

Para la preparación de las composiciones anteriormente mencionadas, se dispersó una cantidad de polímero pesado con exactitud en agua desionizada o tampón fosfato y se mantuvo bajo agitación hasta que se disolvió completamente. Se añadió cantidades adecuadas de otros excipientes (manitol, NaCl y/o conservante) a la solución así obtenida, aún bajo agitación hasta que se disolvió completamente.

20 Las composiciones así obtenidas se pueden esterilizar mediante filtración a través de una membrana de 0,22 µm.

25 Las características específicas de la presente invención, así como sus ventajas, serán más evidente con referencia a una de sus realizaciones específicas descritas a continuación simplemente con propósitos ilustrativos, junto con los resultados de los experimentos llevados a cabo sobre ellas y con los datos para comparaciones con la técnica anterior. Algunos resultados experimentales también están ilustrados en las figuras de los dibujos adjuntos, en donde:

Figura 1 muestra la variación en viscosidad de las composiciones que contienen arabinogalactano en soluciones acuosas de acuerdo con la presente invención ya que la concentración en polisacárido varía;

Figura 2 muestra la tendencia del tiempo de permanencia precorneal de una solución que contiene arabinogalactano de acuerdo con la invención, evaluada mediante la determinación de un derivado fluorescente de arabinogalactano;

- 5 Figura 3 muestra los resultados obtenidos con el ensayo Schimer I llevado a cabo en conejos tratados con atropina sulfato (AS) para inducir experimentalmente el ojo seco; también se administró en un ojo de dichos conejos una composición que contenía arabinogalactano de acuerdo con la invención (AG-Sol), como tratamiento;

Figura 4 muestra un histograma de los resultados de un ensayo de alteración del epitelio corneal llevado a cabo con fluoresceína y la observación mediante lámpara de hendidura llevado a cabo en los mismos conejos de la Figura 3;

- 10 Figura 5 presenta gráficamente los resultados de un ensayo de recuperación de una lesión corneal experimentalmente inducida en conejos, los cuales a continuación se trataron con la composición de acuerdo con la invención (AG) o, por comparación, con sacárido de goma de tamarindo (TSP) o con ácido hialurónico (AH);

- 15 Figuras 6 y 6a presentan gráficamente – a dos niveles de detalle – de los resultados de un ensayo de recuperación de la lesión corneal experimentalmente inducida como en los ensayos de la Figura 5, en donde la comparación se hace entre la composición de la presente invención (AG-Sol) y una solución similar que también contiene cloruro de benzalconio (AG-Bz); y

Figura 7 muestra los resultados de los ensayos de toxicidad celular en términos de viabilidad celular después de la exposición a una solución que contiene arabinogalactano de acuerdo con la invención (AG-Sol), o a una solución similar que también contiene cloruro de benzalconio (AG-Bz).

## 20 **Ensayos de viscosidad**

Se sometieron soluciones de arabinogalactosa (FiberAid® AG de LAREX®, Cohasset, Mn, EEUU), más adelante denominada AG, en diversas concentraciones (0,2, 0,5, 0,8, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 % en peso) a ensayos de viscosidad usando un viscosímetro rotacional Rheostress RS 150 (Haake) con cuerpos de medición cilíndricos coaxiales (Z40 y Z41), a una temperatura constante de 25°C. Los valores de viscosidad de las soluciones están presentados gráficamente en la Figura 1 de los dibujos adjuntos.

- 25 Los reogramas se llevaron a cabo para valores en gradiente de velocidad que oscilaban entre 0 y 200  $\text{seg}^{-1}$  y, a partir de los gráficos, la correlación entre tensión cortante ( $\tau$ ) y gradientes de velocidad ( $\dot{\gamma}$ ) se valoró mediante tratamiento matemático usando el programa informático Rheowin. Así se encontró que las soluciones del producto AG tienen un comportamiento reológico Newtoniana y no presentan tixotropía.

- 30 El comportamiento Newtoniano de las soluciones AG se debe a su no viscosidad – una característica deseable en el caso de soluciones a aplicar al ojo cuando lleva lentes de contacto, de manera que el líquido que penetra en el espacio entre las lentillas y la córnea no cause ninguna nebulosidad de la visión.

## **Ensayos de mucoadhesión**

### 1. Ensayos de mucoadhesión sobre matriz sólida

- 35 Las propiedades mucoadhesivas del arabinogalactano de acuerdo con la invención (FiberAid® AG, Larex®) se valoraron mediante la medición de la fuerza requerida para separar dos superficies mucosas entre las cuales se colocaba la muestra bajo estudio. Las superficies mucosas estaban compuestas de una dispersión acuosa de mucina gástrica de cerdo al 25 % (TCI, Tokyo) adsorbida sobre papel de filtro (Saettone et al., 1989, *Int. J. Pharm.*, 51:203-212).

- 40 El equipo usado consiste en una escala micrométrica, una plataforma móvil y sistema computarizado capaz de registrar la fuerza necesaria para separar las dos superficies (muestra bajo estudio y capa mucosa) como función de la elongación (programa informático TP 5008, TiePie Engineering, Leeuwarden, Holanda).

- 45 Se midió el trabajo de adhesión para matrices sólidas que consistían en el polímero de polisacárido bajo estudio, de 13 mm de diámetro y 1 mm de grosor, que se prepararon comprimiendo una cantidad adecuada de material de polímero por medio de una prensa hidráulica (Perkin-Elmer) a una presión de 3.000  $\text{kg/cm}^2$ .

Los resultados obtenidos se compararon con el trabajo de adhesión medido por matrices sólidas del mismo tamaño con TS-polisacárido (TSP), ya conocido en la bibliografía como mucoadhesivo, preparado con el mismo método. Los resultados obtenidos están presentados en la siguiente Tabla.

Tabla 1

Trabajo de adhesión para los polímeros bajo estudio (media  $\pm$  S.E., n=20)

	AG	TSP	mucina/mucina
Trabajo de adhesión (erg/cm <sup>2</sup> )	282,77	355,87	118,00
S.E.	23,60	41,73	9,00

## 2. Evaluación reológica de la fuerza de la unión de adhesión mucina-polímero

Para examinar las propiedades mucoadhesivas del arabinogalactano (AG) a más detalle, se siguió el método de Saettone et al. (Saettone et al., 1994, *Journal of Ocular Pharmacology*, 10:83-92) y Hassan y Gallo (Hassan, Gallo, 1990, *Pharm. Res.*, 7:491-495), que consiste en medir las variaciones de viscosidad causadas en una dispersión de mucina después de añadir el polímero. De acuerdo con este método, el componente de viscosidad debido a bioadhesión,  $\eta_b$ , se calculará mediante la ecuación  $\eta_b = \eta_t - \eta_m - \eta_p$ , donde  $\eta_t$ ,  $\eta_m$  y  $\eta_p$  son coeficientes individuales de viscosidad del sistema, mucina y polímero, respectivamente. El valor de  $\eta_b$  posteriormente se normalizó de acuerdo con la siguiente ecuación:  $\Delta\eta/\eta = \eta_b/\eta_p$ .

5 A continuación, las medidas de las variaciones de viscosidad debido a la interacción mucina-polímero se llevaron a cabo sobre soluciones acuosas que contenían: i) 15 % de mucina sola ( $\eta_m$ ); ii) AG y otros polímeros, usados como referencia, a sus respectivas concentraciones eficaces ( $\eta_p$ ); iii) mezclas de mucina-polímero, a las mismas concentraciones previamente indicadas ( $\eta_t$ ).

Las composiciones usadas eran las siguientes:

1. Solución acuosa de mucina gástrica de cerdo (MGS; TCI, Tokyo), a 15 % p/p;
- 15 2. Solución acuosa de AG, a 5 % p/p (FiberAid® AG, LAREX®);
3. Solución acuosa de TSP, a 0,5 % p/p (Farmigea, Pisa);
4. Solución acuosa de ácido hialurónico, a 0,2 % p/p (Chemofin, Milano);
5. Dispersión acuosa de mucina, a 15 % p/p, y AG a 5 % p/p;
6. Dispersión acuosa de mucina, a 15 % p/p, y TSP a 0,5 % p/p;
- 20 7. Dispersión acuosa de mucina, a 15 % p/p, y ácido hialurónico a 0,2 % p/p.

Las medidas viscosimétricas se llevaron a cabo por medio de un viscosímetro rotacional Rheostress RS 150 (Haake) con cuerpos de medición cilíndricos coaxiales (Z40 y Z41), a una temperatura constante de 32°C. Los reogramas se obtuvieron para valores de gradiente de velocidad que oscilaban entre 0 y 500 seg<sup>-1</sup>.

25 Las soluciones poliméricas muestran un comportamiento Newtoniano, y los gráficos obtenidos se usaron para evaluar la correlación lineal entre tensión cortante ( $\tau$ ) y gradientes de velocidad (indicados con un  $\gamma$  o D) por medio de tratamiento matemático realizado con el programa informático Rheowin.

30 Ácido hialurónico, mucina y dispersiones de mucina-polímero muestran un comportamiento pseudoplástico. La correlación matemática de los gráficos obtenidos, realizados con el programa informático Rheowin, es la siguiente:  $\tau = aD^b$ . La viscosidad en las formulaciones Newtonianas y la viscosidad aparente de las formulaciones pseudoplásticas se calcularon eligiendo un cierto valor de D y obteniendo a continuación  $\tau$  a partir las respectivas ecuaciones ( $D=200 \text{ s}^{-1}$ ).

Los valores de viscosidad para todas las composiciones están presentados en la Tabla 2 de a continuación, mientras que los valores del parámetro  $\Delta\eta/\eta$  para los polímeros usados están presentados en la Tabla 3.

Tabla 2

Viscosidad de las composiciones bajo estudio

Composición	MGS (% p/p)	AG (% p/p)	TSP (% p/p)	Acido hialurónico (% p/p)	$\eta$ (mPa·s)
1	15,0	-	-	-	47,98
2	-	5,0	-	-	1,38
3	-	-	0,5	-	9,16

Composición	MGS (% p/p)	AG (% p/p)	TSP (% p/p)	Ácido hialurónico (% p/p)	$\eta$ (mPa·s)
4	-	-	-	0,2	24,40
5	15,0	5,0	-	-	73,10
6	15,0	-	0,5	-	190,41
7	15,0	-	-	0,2	145,97

Tabla 3

 $\Delta\eta/\eta$  de las composiciones bajo estudio

Composición	MGS (% p/p)	AG (% p/p)	TSP (% p/p)	Ácido hialurónico (% p/p)	$\Delta\eta/\eta$
5	15,0	5,0	-	-	17,21
6	15,0	-	0,5	-	14,55
7	15,0	-	-	0,2	3,02

- 5 Tal como muestran los resultados, la solución acuosa de AG a 5 % p/p presenta una viscosidad mucho menor (1,38 mPa·s) que los polímeros tomados como referencia (9,16 mPa·s y 24,40 mPa·s para TSP y para AH, respectivamente), mientras que el valor normalizado  $\Delta\eta/\eta$  de AG es de la misma magnitud que el valor TSP. Esto indica que AG es capaz de formar interacciones de diversos tipos con la mucosa que cubre las superficies conjuntivales y corneales del ojo. Por lo tanto, aunque siendo un polímero no viscoso que no empaña la visión y no interfiere con el uso de lentes de contacto, AG establece interacciones que permiten una permanencia prolongada del producto en la región preocular y así una protección e hidratación prolongada de la superficie corneal.

#### Estudios de la interacción lentes de contacto-polímero

Para valorar el grado de interacción de las lentes de contacto con el polímero bajo estudio, se preparó un derivado fluorescente de arabinogalactano (FITC-AG), como se informa a continuación.

- 15 Se disolvió una cantidad pesada con exactitud de arabinogalactano (FiberAid® AG, Larex®) igual a 1 g en 10 ml de dimetilsulfóxido que contenía unas pocas gotas de piridina. A esta solución se añadió 0,1 g de isotiocianato de fluoresceína (Sigma-Aldrich, Alemania) seguido de 20 mg de dilaurato de dibutilina (Sigma-Aldrich, Alemania). La mezcla así obtenida se calentó durante dos horas a 95 °C. Después de la precipitación y el lavado con etanol para eliminar los productos que no reaccionaron, se filtró el FITC-AC y se secó a 80 °C (A.N. de Belder & K. Granath, 1973, *Carbohydrate Research*, 30:375-378).

- 20 Se prepararon las siguientes soluciones en agua desionizada para el ensayo:

1. FITC-AG 5 % p/p;
2. fluoresceína de sodio (FS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU) 0,0223 % p/p.

La concentración de la disolución FS se eligió para tener la misma fluorescencia que la solución FITC-AG a 5 % p/p. Lentes de contacto diarias blandas (Focus Dailies®, Ciba Vision, Alemania) se usaron para el ensayo.

- 25 Las lentes de contacto se sumergieron en 1 ml de fluido de lágrima artificial sin proteínas, al cual se había añadido 50  $\mu$ l de una solución de FITC-AG a 5 % p/p o de FS a 0,0223 % p/p, y se dejaron reposar durante 30 minutos. A continuación, las lentes se lavaron sumergiéndolas en 100 ml de fluido de lágrima artificial durante 15 minutos bajo agitación lenta con un agitador magnético. A continuación, se observaron las lentes tratadas con una lámpara de Wood a 365 nm en comparación con las lentes de contacto no tratadas como referencia.

- 30 Ninguna de las lentes mostró ningún rastro visible de fluorescencia, demostrando el hecho de que el polímero AG no se retiene sobre la superficie de las lentes en las condiciones empleadas.

El fluido de lágrima artificial tenía la siguiente composición expresada en mg/100 ml de agua desionizada: 4,75 de  $MgCl_2$ ; 7,97 de  $CaCl_2$ ; 260,00 de  $KHCO_3$ ; 754,00 de NaCl (Burgalassi et al., 1999).

**Ensayo de cristalización en forma de hehecho (“ferning”)**

5 La capa más íntima del fluido lacrimal está compuesta de glicoproteínas de mucosa, las cuales en condiciones normales están producidas por células caliciformes de la conjuntiva. Una de las características físicas más importantes de la mucosa es su capacidad para cristalizar en formas tipo hehecho (“ferning”) cuando se hace evaporar a temperatura ambiente.

Los diversos aspectos de la cristalización de la mucosa de lágrima pueden reportar indicaciones útiles sobre las condiciones de estabilidad de la película lacrimal, y están clasificadas en cuatro tipos:

Tipo I: la cristalización en forma de hehecho está presente de una manera uniforme sin ningún espacio entre las formas tipo hehecho individuales. Las formas tipo hehecho son largas y densamente ramificadas.

10 Tipo II: cristalización en forma de hehechos es aún abundante pero las formas tipo hehecho individuales son más pequeñas en tamaño y no están ampliamente ramificadas. Hay espacios apreciables entre las formas tipo hehecho.

Tipo III: la cristalización en forma de hehecho está presente de un modo parcial, las formas tipo hehecho son pequeñas y escasamente ramificadas; hay espacios considerables entre las formas tipo hehecho.

15 Tipo IV: la cristalización en forma de hehecho está ausente y hay filamentos o conglomerados que representan el material mucoso degenerado mezclado con células exfoliadas.

Las dos primeras clases de cristalización en forma de hehecho son típicas de ojos normales con buenas condiciones de la capa de mucosa y de la película lacrimal. El tipo III parece ser una forma de transición e indica un estado difícil de la mucosa en mantener su integridad y funciones. El tipo IV indica una gran alteración de los componentes de la mucosa del fluido lacrimal.

20 Todas las soluciones oftálmicas que cristalizan en forma de formas tipo hehecho comparables al tipo I y tipo II son estructuralmente similares a las glicoproteínas de mucosa producidas por las células caliciformes conjuntivales.

25 Por tanto, el ensayo de cristalización en forma de hehecho se llevó a cabo para evaluar la posible capacidad de AG de cristalizar con características similares a la presente mucosa sobre la superficie del ojo. El ensayo consiste en la evaporación a temperatura ambiente ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), durante 24 h, sobre un portaobjetos de microscopio, una mezcla previamente preparada compuesta de 10  $\mu\text{l}$  de solución a 2,5 % p/p de AG y 2  $\mu\text{l}$  de fluido de lágrima artificial.

La solución de AG al 2,5 % se preparó dispersando, bajo agitación, una cantidad adecuada de polímero (FiberAid® AG, Larex®) en agua desionizada. Después de la evaporación, el residuo se observó por medio de un microscopio Reichert-Jung Microstar de luz polarizada con unas lentes de aumento 10x.

30 La cristalización de la solución AG produjo estructuras ramificadas tipo hehecho muy similares a aquellas obtenidas con el fluido de lágrima humana. El resultado obtenido, también confirmado por los ensayos de interacción reológica, soporta la hipótesis de que el polímero bajo estudio es compatible con las estructuras de glicoproteína de la mucosa ocular. Por tanto, se puede hacer la hipótesis de que puede reemplazar el componente mucoso natural cuando éste es deficiente debido a razones patológicas.

**Ensayos biológicos**

35 1. Evaluación del tiempo de permanencia precorneal

El presente estudio usó el derivado fluorescente de arabinogalactano (FITC-AG), preparado como ya se ha descrito en la sección sobre los estudios de interacción lentes de contacto-polímero.

40 La determinación cuantitativa de FITC-AG en muestras biológicas se llevaron a cabo a través de análisis fluorimétrico. El equipo estaba compuesto de un detector de fluorescencia Shimadzu RF-551 con el programa informático de integración apropiado. La detección se realizó a una longitud de onda de excitación de 490 nm y una longitud de onda de emisión de 514 nm.

45 El ensayo se llevó a cabo en conejos albinos de Nueva Zelanda que pesaban 2-2,5 kg. Se administraron 50  $\mu\text{l}$  de la composición acuosa FITC-AG 5 % p/p al saco conjuntival inferior de los conejos. A intervalos de tiempo adecuados después de la instilación (1, 3, 5, 10, 20, 30, 45 y 60 minutos), se recogieron muestras de fluido de lágrima (1,0  $\mu\text{l}$ ) de la parte marginal del saco conjuntival inferior por medio de microcapilares (Microcaps, Drummond Scientific, NJ, EEUU), evitando cualquier contacto con el epitelio corneal. Las muestras de fluido de lágrima se transfirieron a tubos de ensayo Eppendorf y a continuación se analizaron por medio de análisis fluorimétrico después de la dilución con 50  $\mu\text{l}$  de agua.

50 La Figura 2 adjunta muestra la disminución de porcentaje en fluorescencia de FITC-AG en el fluido de lágrima con el paso del tiempo, tomando como 100 % la fluorescencia del producto después de 1 minuto. La fluorescencia es

siempre alta 10 minutos después de la administración, desciende después de 20 minutos, y aún es apreciable después de 60 minutos, poniendo de relieve la permanencia prolongada de AG en la región precorneal.

2. Inducción y tratamiento del síndrome de ojo seco

5 El presente estudio usó una solución de arabinogalactano (FiberAid® AG, Larex®) en agua, más adelante referida como AG-Sol, con una concentración de AG de 5 % p/p, vuelta isotónica al añadir una cantidad adecuada de manitol (4,41 % p/p) y que tenía un pH de 6,46.

Para preparar la composición AG-Sol, se dispersó una cantidad de polímero pesado con exactitud en agua desionizada (Milli-Q, Millipore) y la solución así obtenida se calentó a 80 °C durante 30 minutos bajo agitación con un agitador magnético. Después de enfriar, se añadió el manitol.

10 La solución así obtenida se filtró bajo una campana de flujo laminar por medio de filtros estériles de 0,22 µm (Minisart Sartorius) y empaquetados en viales de vidrio.

Para valorar la influencia de arabinogalactano sobre la lacrimación, en casos donde las lesiones epiteliales corneales están asociadas con el síndrome de ojo seco, se llevó a cabo un experimento *in vivo*.

Los ensayos se llevaron a cabo, usando conejos albinos de Nueva Zelanda que pesaban 2-2,5 kg.

15 Se instiló una gota de una solución acuosa de atropina sulfato (AS) al 1,0 %, 3 veces al día (a 9 a.m., 1 p.m. y 5 p.m) durante 5 días consecutivos en ambos ojos de los animales para disminuir la producción lacrimal e inducir el ojo seco (S. Bungalassi et al., 1999, *Ophthalm. Res.*, 31, 229-235). Después de 5 minutos de cada administración de AS, se instiló 50 µl de la composición AG-Sol que contenía arabinogalactano en solamente su ojo derecho.

20 Los animales se sometieron al ensayo Schimer I a tiempo 0 (antes del tratamiento) y en el 2º, 3º, 4º y 5º día después del inicio del tratamiento. El ensayo prevé la medición, una vez al día, de la cantidad de fluido de lágrima secretado. La determinación se llevó a cabo antes de cada administración de las soluciones (AS y AG-Sol) por medio de tiras de papel secante (Alfa Intes) colocadas en el fórnix conjuntival inferior de cada ojo de conejo. La subida del fluido de lágrima a lo largo de las tiras de papel secante se midió en mm. Los valores obtenidos para los ojos tratados con solamente atropina sulfato se compararon con aquellos obtenidos para los ojos tratados con la solución de arabinogalactano de acuerdo con la invención.

25 El valor base de la secreción lacrimal se midió en un grupo de animales control sobre los cuales no se llevó a cabo tratamiento farmacológico.

Los resultados obtenidos están presentados gráficamente en la Figura 3 de los dibujos adjuntos. La figura muestra como la solución AG-Sol tiene un efecto protector frente al inicio de ojo seco.

30 Además, los días 3, 4 y 5 después del inicio del tratamiento, se valoró el grado de alteración del epitelio corneal causado por el ojo seco mediante la observación con una lámpara de hendidura equipada con un filtro azul, después de teñir la córnea con 10 µl de una solución acuosa a 1 % p/p de fluoresceína. En el caso de alteraciones epiteliales, se observan las áreas de color sobre la superficie corneal: ojo fuopositivo.

35 La Tabla 4 de a continuación presenta los resultados obtenidos, como porcentaje de ojos fuopositivos del total de los ojos tratados. Los mismos resultados están presentados en el histograma de la Figura 4 adjunta, la cual compara gráficamente el porcentaje de ojos que resultan fuopositivos después del tratamiento con la solución AG-Sol con respecto al porcentaje de los ojos fuopositivos en los animales control solamente tratados con AS.

Tabla 4

Resultados obtenidos a través de la observación por lámpara de hendidura

Nº	3º día		4º día		5º día	
	DX (tratado)	SX	DX (tratado)	SX	DX (tratado)	SX
1	-	+	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	+
3	-	-	-	+	-	-
4	-	+	-	+	+	+
5	-	-	-	+	-	-

N°	3° día		4° día		5° día	
	DX (tratado)	SX	DX (tratado)	SX	DX (tratado)	SX
6	-	+	-	+	-	-
7	-	-	-	+	-	+
8	+	-	-	-	+	+
9	-	-	+	+	-	+
10	-	-	-	-	-	+
11	-	+	-	-	-	+
12	-	-	+	-	-	-
Total	1	4	2	6	2	7
Fluopositividad %	8,33	33,33	16,67	50,00	16,67	58,33

A partir de los resultados mostrados en la Tabla 4 y la Figura 4 es posible indicar como en los ojos no tratados el porcentaje de fluopositividad aumenta día a día, y el 5° día de tratamiento alcanza casi el 60 %, mientras que en los ojos tratados con la solución AG-Sol, el porcentaje de fluopositividad se mantiene constante entre el 4° y 5° día de tratamiento, a un valor mucho menor de aproximadamente 17 %.

### 3. Evaluación de la capacidad de reepitelización

El ensayo presentado a continuación valora el tiempo de recuperación de una lesión producida sobre córnea de conejo después de la administración de las siguientes composiciones:

1. Solución acuosa AG-Sol (AG al 5 %, manitol al 4,41 %);

2. Solución acuosa de TS-polisacárido (TSP) al 0,04 %;

3. Solución acuosa de ácido hialurónico (AH) al 0,00144 %.

Se debe indicar, puesto que el objetivo de los productos de acuerdo con la invención es el de proporcionar suplementos lacrimales que no sean tan viscosos como las lágrimas artificiales de la técnica anterior a base de polisacáridos de manera que sean particularmente útiles para los usuarios de lentes de contacto, la concentración de las soluciones de referencia 2) y 3) que contienen TSP y AH fue elegida para tener soluciones con el mismo comportamiento reológico (es decir, Newtoniano) y el mismo valor de viscosidad como la solución AG-Sol.

El ensayo se condujo sobre conejos albinos de Nueva Zelanda que pesaban 2-2,5 kg. Los conejos se anestesiaron por inyección intramuscular (0,15 ml/kg) de Zoletil 100® (Laboratories Viridac, Francia) y el ojo se mantuvo abierto usando un blefarostato y se anestesió sobre la superficie instilando 10 µl de clorhidrato de oxibuprocaina (Novesina®, MiPharm, Italia).

Para causar la lesión corneal, un disco de papel de microbiología de 6 mm de diámetro empapado con 10 µl de n-heptanol se colocó sobre la región central de la córnea durante 60 segundos. Después de retirar el disco, se lavó a fondo la superficie ocular con 1 ml de solución fisiológica (Burgalassi et al., 2000, *Eur. J. Ophthalmol.*, 10, 71-76).

A tiempo 0 (inmediatamente después de la retirada del papel empapado y el lavado) y 3, 7, 18, 24, 27, 29, 31, 34, 41, 44, 48 y 51 horas después de la producción de la lesión, se tiñó la superficie ocular con 10 µl de una solución acuosa de fluoresceína de sodio a 1 % p/p y se midió el diámetro de la lesión por medio de un micrómetro específico.

Los animales tratados recibieron 100 µl de las soluciones examinadas en el ojo dañado 5 veces al día (a 9 a.m., 11 a.m., 1 p.m. y 5 p.m.).

Un grupo de animales, sobre el cual se había llevado a cabo la lesión corneal, se dejó curar espontáneamente y se usó como grupo control.

La Figura 5 de los dibujos adjuntos presentan gráficamente la tendencia de recuperación de la lesión corneal de los grupos de animales con el paso del tiempo. Los datos han sido presentados como disminución en porcentaje del área de la lesión, tomando como 100 % el área en tiempo 0. Los mismos datos están presentados numéricamente en la Tabla 5 de a continuación.

5

Tabla 5

Ensayo de recuperación de lesión corneal

Tiempo (horas)	Control (% área)	S.E.	AG-Sol (% área)	S.E.	TSP (% área)	S.E.	AH (% área)	S.E.
0	100	0	100	0	100	0	100	0
3	100	0	100	0	100	0	100	0
7	87,1	9,14	72,358	2,918	79,167	3,076	91,071	4,593
18	55	4,1	44,44	0	61,033	5,075	59,293	7,591
24	31,62	4,35	29,236	3,065	31,859	2,117	41,863	3,64
27	26,91	1,57	18,839	1,833	23,627	1,637	30,95	2,183
29	25,205	4,545	15,838	1,211	15,508	2,273	20,121	3,362
31	16,29	4,38	7	1	13,657	2,688	14,384	2,101
34	11,72	4,28	3,812	1,047	7,098	1,782	7,213	1,249
41	7,12	2,098	1,062	0,981	2,568	1,336	5,083	2,663
44	5,2	2,3	0,695	0,695	0,187	0,653	2,847	1,663
48	3,7	3,7	0,001	0	0,17	0,17	0,111	0,099
51	0	0	0	0	0	0	0	0

- A partir de la tabla anterior, así como a partir de la Figura 5, es posible indicar que empezando a partir de 27 horas después de la administración de las composiciones, solamente la composición de acuerdo con la presente invención, AG-Sol, muestra un índice de recuperación significativamente diferente que el valor control. De hecho, mientras que AG-Sol presenta diferencias estadísticamente significativas 27, 29, 31, 34 y 41 horas después del inicio del tratamiento, para las otras composiciones esta diferencia es significativa solamente con TSP después de 29 horas.
- 5
4. Evaluación de la capacidad de reepitelización en presencia de cloruro de benzalconio
- El ensayo valora el tiempo de recuperación de una lesión producida sobre la córnea de conejo después de la administración de las siguientes composiciones:
- 10
- 1) Solución acuosa de AG (AG al 5 %, manitol al 4,41 %).
  - 2) Solución acuosa de AG-Bz (AG al 5 %, manitol al 4,00 %, cloruro de benzalconio al 0,01 %).
- El ensayo se llevó a cabo en conejos albinos de Nueva Zelanda que pesaban 2-2,5 kg. Los conejos se anestesiaron mediante inyección intramuscular (0,15 ml/kg) de Zoletil 100® (Laboratories Viridac, Francia), y el ojo se mantuvo abierto usando un blefarostato y se anestesió sobre la superficie instilando 10 µl de clorhidrato de oxibuprocaina (Novesina®, MiPharm, Italia).
- 15
- Para causar la lesión corneal, un disco de papel de microbiología de 6 mm de diámetro empapado con 10 µl de n-heptanol se colocó sobre la región central de la córnea durante 60 segundos. Después de retirar el disco, se lavó a fondo la superficie ocular con 1 ml de solución fisiológica (Burgalassi et al., 2000, *Eur. J. Ophthalmol.*, 10, 71-76).
- A tiempo 0 (inmediatamente después de la retirada del papel empapado y el lavado) y 3, 7, 18, 24, 27, 29, 31, 34, 41, 44, 48 y 51 horas después de la producción de la lesión, se tiñó la superficie ocular con 10 µl de una solución acuosa de fluoresceína de sodio al 1 % p/p y se midió el diámetro de la lesión por medio de un micrómetro específico.
- 20
- Los animales tratados recibieron 100 µl de las soluciones examinadas en el ojo dañado 5 veces al día (a 9 a.m., 11 a.m., 1 p.m. y 5 p.m.).
- 25
- Un grupo de animales, sobre el cual se había llevado a cabo la lesión corneal, se dejó curar espontáneamente y se usó como grupo control.
- Las Figuras 6 y 6a muestran gráficamente de la tendencia de recuperación de la lesión corneal, a dos niveles diferentes de detalle, para los grupos de animales con el paso del tiempo. Los datos han sido presentados como disminución en porcentaje del área de la lesión, tomando como 100 % el área a tiempo 0.
- 30
- Es posible indicar que la presencia de cloruro de benzalconio modifica el índice de recuperación de AG bajándolo: la recuperación completa en los animales tratados con la composición AG-Bz ocurre después de 51 horas, mientras que en los animales tratados con AG-Sol ocurre tan pronto como 44 horas después. Esto es porque usar ambos productos en una composición dirigida a proteger la córnea es desventajoso
- Evaluación histológica de córneas tratadas**
- 35
- Para valorar si el proceso de reepitelización – además de proporcionar la curación completa de las lesiones inducidas experimentalmente – también produce la estratificación apropiada de las células epiteliales, para reconstituir la estructura corneal original, se lleva a cabo un análisis histológico.
- Muestras de córneas recogidas 24 horas después de la producción de la lesión corneal, después de la recuperación completa (cuando no se observó detección de fluoresceína adicional sobre el epitelio) y 1 semana después de la recuperación, se fijaron en una solución de paraformaldehído al 10 % en un tampón fosfato 0,1 M pH 7,4. A continuación, las muestras se sometieron a varios lavados con un tampón durante 12 horas, se deshidrataron en una serie de soluciones de alcohol etílico de concentración creciente y se incrustaron a 4 °C en una resina específica para microscopía óptica (JB-4, Embedding Kit, Polysciences Inc.). La muestra incrustada se seccionó por microtomo y se sometió a tinción de Nissl antes de ser observada bajo un microscopio.
- 40
- 45
- 24 horas después de producir la lesión, el mecanismo reparador fisiológico era evidente, puesto que había un cambio y migración de las células epiteliales adyacentes al área dañada, con la formación de una monocapa. El epitelio, sin embargo, reestableció un espesor natural (55-60 µm en la región central de la córnea) y la estructura estratificada solamente cuando se dio la recuperación completa, cuando la interrupción del mecanismo fisiológico de la descamación de la superficie celular había cesado y la cobertura completa de la mínima región y la regeneración de los elementos epiteliales aseguraron la restauración de las características estructurales normales. Las condiciones se mantuvieron incambiables una semana después de la recuperación, indicando que el proceso de regeneración era completo.
- 50

- Los tratamientos llevados a cabo después de producir la lesión corneal, realizados con los mismos productos presentados en la sección 3 precedente de los ensayos biológicos, condujeron a una disminución del tiempo de recuperación de la lesión a diferentes grados, dependiendo del producto usado. Esto condujo a la suposición de una diferente influencia de los polímeros usados sobre el mecanismo de reparación. Por tanto, llega a ser necesario investigar las fases de reepitelización para poner de relieve cualquier diferencia en el aspecto morfológico del tejido.
- Para este fin, el método de evaluación de la capacidad de reepitelización (sección 3, ensayos biológicos) se repitió realizando la lesión y los tratamientos con las composiciones poliméricas tal como se ha informado anteriormente. Los animales se sacrificaron inmediatamente antes de la completa recuperación de la lesión corneal, es decir, cuando ésta no se podía medir más con el equipo usado, pero la captación de fluoresceína sobre la superficie ocular era aún visible.
- Las muestras corneales tratadas así se sometieron a análisis histológico con el mismo procedimiento que el anteriormente indicado, y se midió el espesor del epitelio reconstituido en cada caso.
- La medición se realizó a la misma distancia cada vez desde el margen de recrecimiento, y se pusieron de relieve diferencias en el espesor de los epitelios reformados después de los diversos tratamientos. De hecho, se obtuvieron los siguientes resultados:
- Control no tratado (recuperación espontánea), 6  $\mu\text{m}$ ;
  - muestra tratada con AG-Sol (AG al 5 %, manitol al 4,41 %), 18  $\mu\text{m}$ ;
  - muestra tratada con TS-polisacárido al 0,5 %, 18  $\mu\text{m}$ ;
  - muestra tratada con ácido hialurónico al 0,2 %, 12  $\mu\text{m}$ .
- Estos resultados muestran que el epitelio que va a reconstituir el área deficiente no tiene aún un espesor fisiológico en ninguno de los casos observados, incluso si en las muestras tratadas con las composiciones de AG-Sol y TS-polisacárido el espesor es considerablemente mayor que el del control dejado para recuperarse espontáneamente.
- La observación de las respectivas imágenes (no mostradas) también pusieron de relieve la diversidad morfológica entre las muestras corneales bajo estudio. De hecho, hay considerables diferencias en la disposición del epitelio nuevo en los cuatro casos examinados:
- La muestra que procede del ojo control mostró una estructura aún no bien organizada, con poca o sin estratificación.
  - El epitelio tratado con la composición AG-Sol mostró una cercana similitud al epitelio original, en lo que respecta a la disposición del tejido.
  - La muestra tratada con TS-polisacárido mostró un tejido nuevo escasamente estratificado, a pesar del hecho de que el espesor de este epitelio era el mismo que el de la muestra tratada con AG-Sol; de hecho, con frecuencia era un asunto de unas pocas células de gran tamaño, más grandes de lo normal.
  - Finalmente, el tratamiento con AH produjo una distinta estratificación del epitelio nuevo, incluso si el espesor final obtenido era menor.
- Estos resultados condujeron a la conclusión de que el mayor índice de recuperación de una lesión corneal determinado después del tratamiento con composición que contiene AG es debido a la estimulación de la regeneración de los elementos epiteliales que causa este producto. La mayor capacidad de replicación de las células epiteliales conduce a una estratificación temprana del tejido, lo cual consigue así tener un mayor número de células para cubrir la zona déficit.
- 40 Estudios de toxicidad celular**
- Se evaluó la citotoxicidad de soluciones que contenían AG solo o en presencia de cloruro de benzalconio (Bz). Se prepararon soluciones madre del polímero (1. AG 5 % p/p; 2. AG 5 % p/p + Bz 0,01 % p/p) directamente en medio Eagles modificado de Dulbecco (DMEM, del inglés "Dulbecco's modified Eagles medium", Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, EEUU). A continuación, se diluyeron estas soluciones 1:2, 1:5, 1:10, 1:100 y 1:1.000 usando aún DMEM.
- La línea celular usada consistía en células epiteliales corneales de conejo (RCE, del inglés, "Rabbit corneal epithelial", SV40 transformadas, N. 95081046, ECACC, G.B.). La línea RCE se creó infectando cultivos primarios de células epiteliales corneales de conejo con un retrovirus recombinante SV-40. Las células mostraron la típica morfología pavimentada de epitelios y una capacidad de estratificación, así como el desarrollo de desmosomas y microvellosidades.
- El medio de crecimiento celular era medio Eagles modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, EEUU) enriquecido con mezcla de nutriente Ham F12 (1:1), L-glutamina (1 % v/v, 2 mM), penicilina (100 UI/ml),

estreptomycin (0,1 mg/ml), amfotericina B (0,25 µg/ml), suero fetal bovino desactivado por calor (15 % v/v) (Gibco, Gran Bretaña), insulina (5 µg/ml), factor de crecimiento epidérmico (10 ng/ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, EEUU). Las células crecieron a 37°C en una atmósfera saturada de humedad con CO<sub>2</sub> al 5 %.

- 5 La evaluación del grado de toxicidad de las soluciones ensayadas sobre las células RCE se llevaron a cabo por medio del método colorimétrico, usando el reactivo de proliferación celular WST-1 comercialmente disponible (Roche Diagnostics® S.p.A., Monza). El ensayo se basa en la reducción, a través de la actividad mitocondrial, de la sal de tetrazolio WST-1 a un compuesto coloreado soluble (formazán). Puesto que la transformación solamente se puede realizar por medio de células vivas, la cantidad de formazán producido está directamente correlacionada con el número de células vivas.
- 10 Las células RCE se colocaron sobre portaobjetos de 96 pocillos (Cornig Costar® Italia, Milán) a una concentración de 5x10<sup>3</sup> células/pocillo. Después de 24 horas, a 90 % de confluencia, se retiró el medio de crecimiento y se reemplazó con la solución a ensayar (100 µl de solución). Después de 60 minutos de contacto (a 37°C, en una atmósfera humidificada y con CO<sub>2</sub> al 5 %), se retiró el medio de reacción y las células se lavaron dos veces con DMEM F12; a continuación, se añadieron 100 µl de medio de crecimiento fresco y 10 µl de reactivo WST-1 en cada pocillo. Las células se incubaron de nuevo durante 2 horas (a 37°C, en una atmósfera humidificada y con CO<sub>2</sub> al 5 %) y los portaobjetos se agitaron suavemente durante 9 segundos; la absorbancia del medio se midió a 450 nm usando un espectrofotómetro apropiado (Microtiter reader 550®, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). El tiempo de incubación óptimo con el reactivo WST-1 se había determinado a través de una serie de experimentos preliminares.
- 20 La lectura espectrofotométrica se realizó frente a pocillo "vacío" que contenía una mezcla de solamente medio y WST-1 (100 y 10 µl, respectivamente), sin células. Los resultados se expresaron como el porcentaje de absorbancia de los pocillos tratados (Abs<sub>tr</sub>) con respecto a los pocillos no tratados (control, Abs<sub>c</sub>), que contenían células tratadas con solamente el medio sin producto farmacéutico, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ células vivas} = \frac{\text{Abs}_{tr} \times 100}{\text{Abs}_c}$$

- 25 Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 7, en la cual la viabilidad celular se expresa como un porcentaje con respecto al logaritmo de concentración de AG, cuando las células se trataron con soluciones que contenían solamente AG o la mezcla AG+Bz. AG no mostró ninguna citotoxicidad en todas las concentraciones ensayadas. La adición de Bz causó un aumento en la toxicidad, sobre todo, en las concentraciones superiores. Por tanto, la presencia de cloruro de benzalconio implica una citotoxicidad significativa y, además, como se demuestra mediante los experimentos *in vivo*, también una disminución en la actividad de reepitelización de AG.
- 30

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición oftálmica para su uso en un método para el tratamiento de lesiones epiteliales corneales, que consiste en una solución acuosa que contiene entre 1 % y 10 % en peso de arabinogalactano y no contiene cloruro de benzalconio.
- 5 2. Una composición oftálmica para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha composición contiene entre 3 % y 5 % en peso de arabinogalactano en una disolución acuosa.
3. Una composición oftálmica para su uso en un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho arabinogalactano es arabinogalactano de alerce de grado farmacéuticamente aceptable.
- 10 4. Una composición oftálmica para su uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha composición también contiene uno o más agentes de ajuste de tonicidad.
5. Una composición oftálmica para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dichos uno o más agentes de ajuste de tonicidad están presentes en la disolución acuosa en tal cantidad para proporcionar una solución con osmolaridad entre 150 y 300 mOSmol/L.
- 15 6. Una composición oftálmica para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dichos uno o más agentes de ajuste de tonicidad se eligen entre el grupo que consiste en: manitol, cloruro de sodio, cloruro de potasio, dextrosa, ácido bórico y sorbitol.
- 20 7. Una composición oftálmica para su uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha composición también contiene uno o más ácidos o bases farmacéuticamente aceptables, como correctores de pH.
8. Una composición oftálmica para su uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicha composición también contiene uno o más tampones.
- 25 9. Una composición oftálmica para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dichos tampones se eligen entre el grupo que consiste en: tampón fosfato, tampón borato, tampón citrato, tampón bicarbonato, tampón trizma (trihidroximetil-aminometano).
- 30 10. Una composición oftálmica para su uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicha composición también contiene uno o más conservantes, excepto para cloruro de benzalconio.
11. Una composición oftálmica para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dichos conservantes se eligen entre el grupo que consiste en: mertiolato o timerosal de sodio, nitrato o acetato fenilmercúrico, alcohol feniletílico, metil-, etil- y propilparabeno, acetato de clorhexidina o gluconato y clorobutanol.
- 35 12. Una composición oftálmica para su uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en donde dicha composición también contiene uno o más agentes quelantes.
13. Una composición oftálmica para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicho agente quelante es EDTA.
- 40 14. El uso de una composición oftálmica que contiene de 1 % a 10 % en peso de arabinogalactano en solución acuosa y no contiene cloruro de benzalconio para la producción de una solución de lágrima artificial para el tratamiento de lesiones epiteliales corneales.
15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde dicha composición oftálmica contiene entre 3 % y 5 % en peso de arabinogalactano.
16. El uso de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, en donde dicha solución está indicada para usuarios de lentes de contacto.
- 45 17. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en donde dicha solución de lágrima artificial está indicada para el tratamiento de abrasiones corneales causadas por el uso de lentes de contacto.

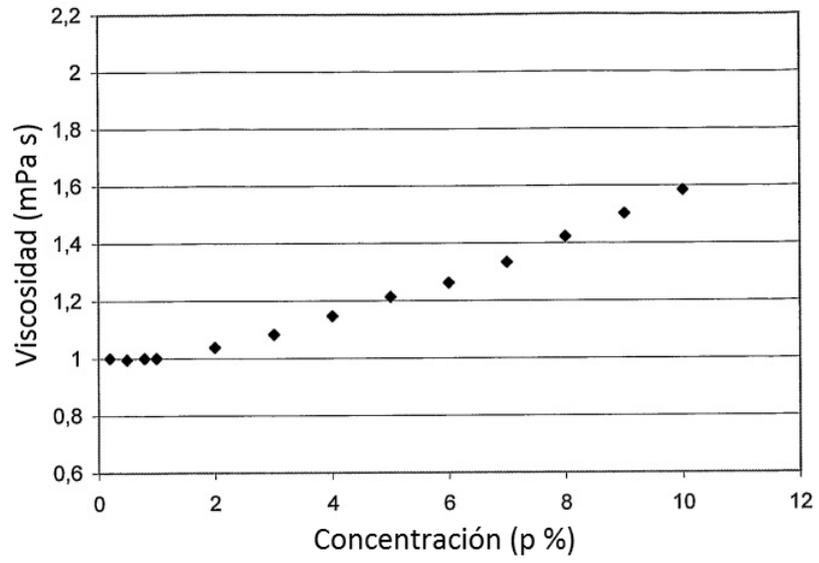


Fig. 1

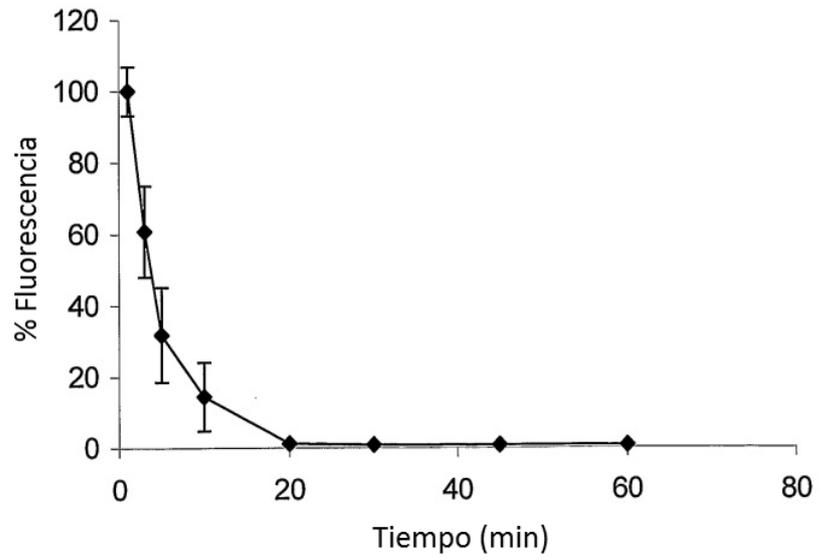


Fig. 2

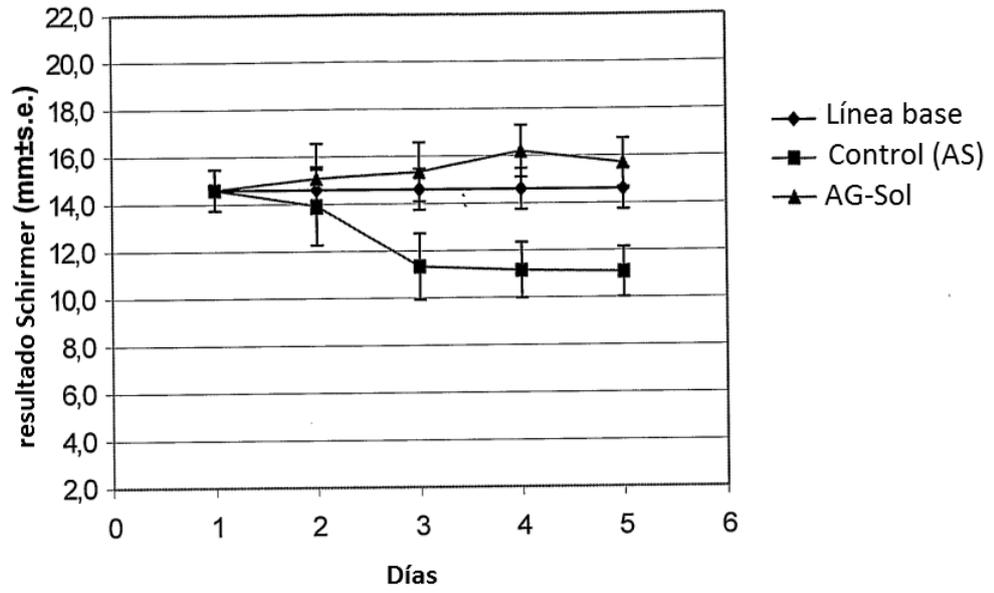


Fig. 3

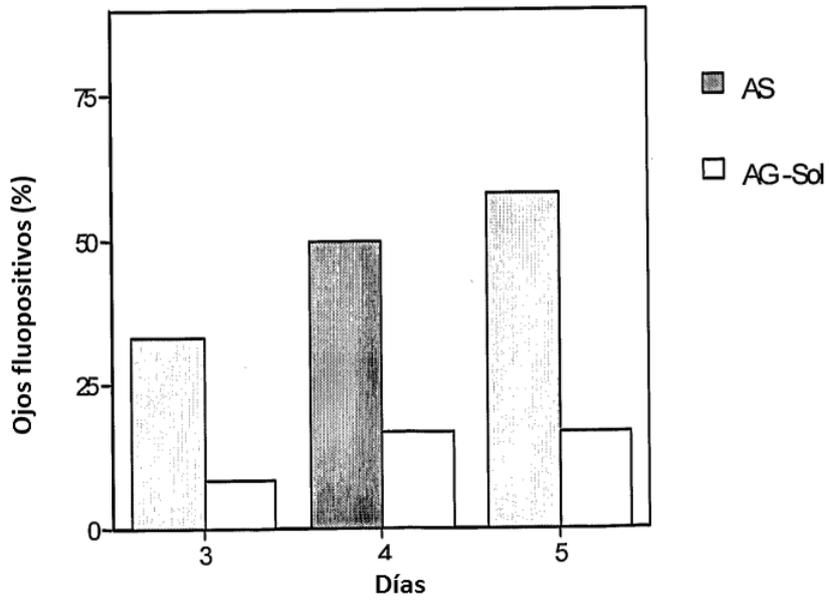


Fig. 4

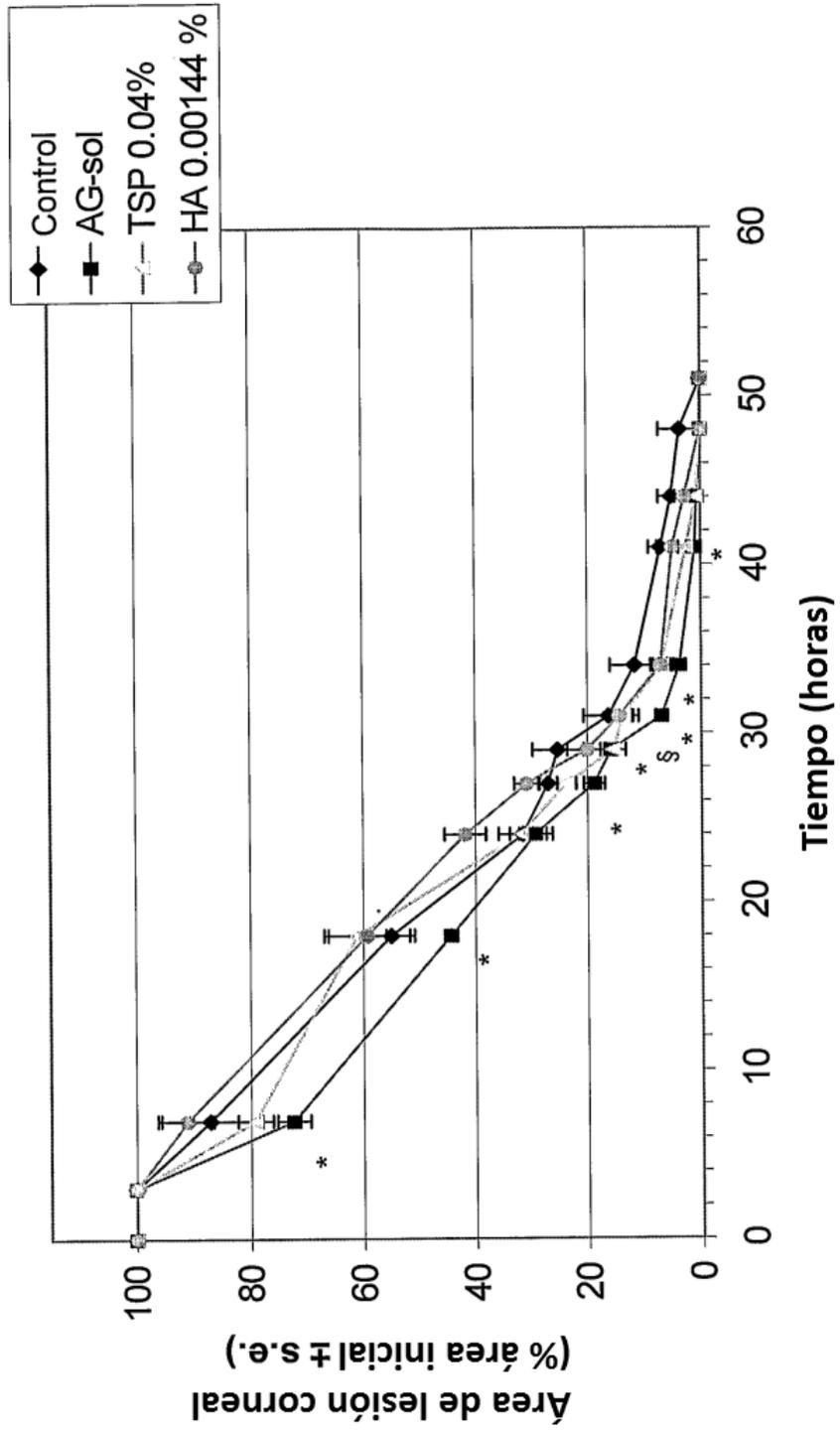


Fig. 5

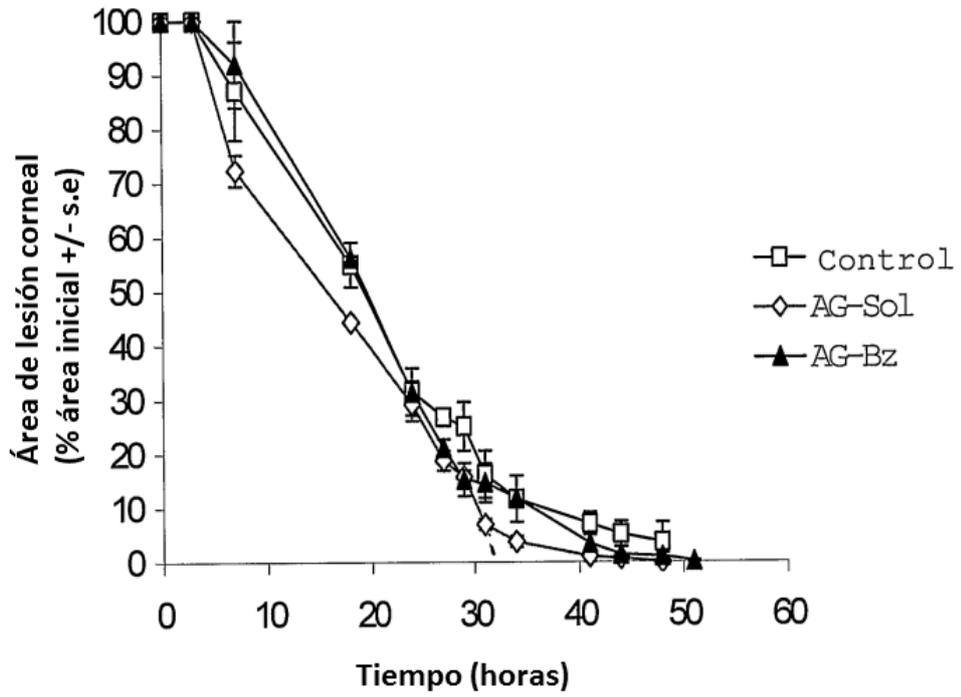


Fig. 6

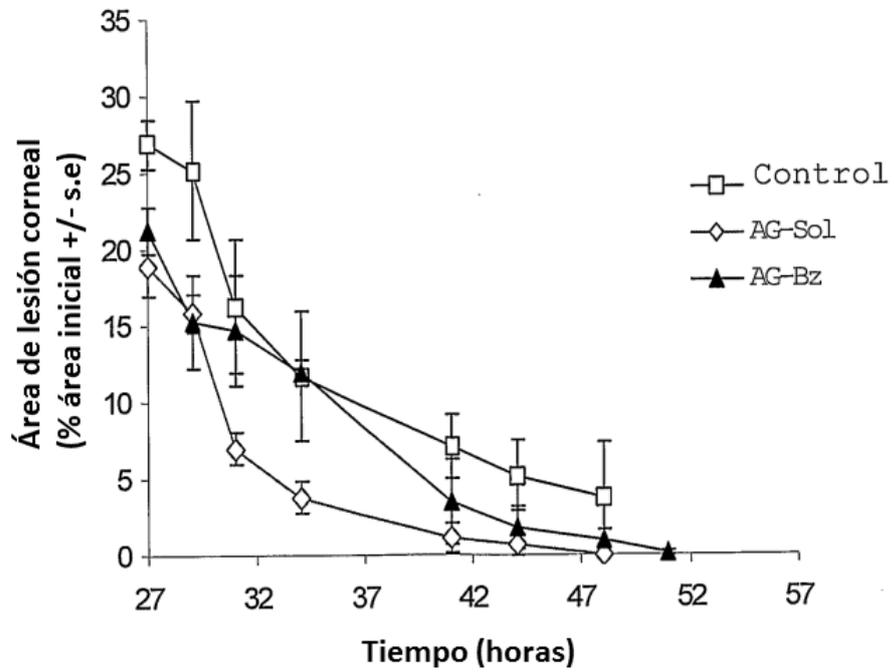


Fig. 6a

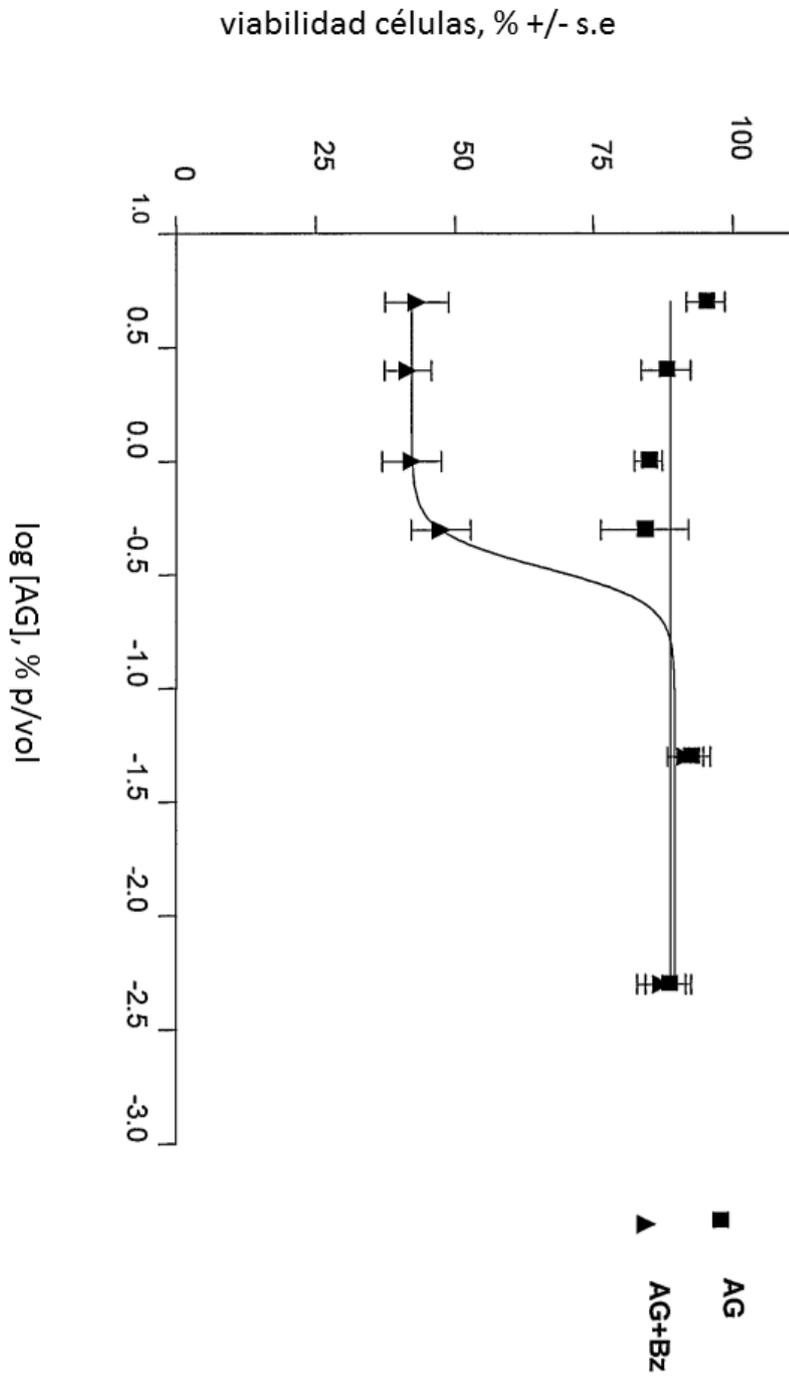


Fig. 7