

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 295**

51 Int. Cl.:

A61K 31/726 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 31/728 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61K 31/7008 (2006.01)
A61P 27/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.10.2006 PCT/JP2006/320801**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.04.2007 WO07043702**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2006 E 06811990 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 1942912**

54 Título: **Agente para aplicar a mucosa y procedimiento para la producción del mismo**

30 Prioridad:

12.10.2005 JP 2005297170
09.06.2006 JP 2006160478

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.06.2017

73 Titular/es:

SEIKAGAKU CORPORATION (100.0%)
6-1, MARUNOUCHI, 1-CHOME CHIYODA-KU
TOKYO 100-0005, JP

72 Inventor/es:

MIYAMOTO, KENJI;
TAKAHASHI, KATSUYA y
SHIMOJIMA, YUUJI

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 616 295 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

Agente para aplicar a mucosa y procedimiento para la producción del mismo

5 Campo técnico

[0001] La presente invención se refiere a un agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal, que contiene un glicosaminoglicano de tipo unión a grupo hidrófobo como ingrediente activo, y además se describe un procedimiento para la producción del mismo.

Antecedentes de la técnica

[0002] Convencionalmente, se ha conocido como sustancia que tiene efectos curativos sobre trastornos de la mucosa tales como inflamación y lesiones el ácido hialurónico, que es un glicosaminoglicano representativo (descrito de aquí en adelante como "GAG") (p.ej. documento de patente 1). Sin embargo, en la mucosa de la córnea, cavidad oral, cavidad nasal y conjuntiva, que están en contacto con el mundo exterior, y mucosa de la vejiga urinaria, las superficies mucosas están lavadas con secreciones y excreciones tales como fluido de lágrimas, fluido salival y orina, y las sustancias extrañas se eliminan. Por tanto, se han demandado derivados de GAG que mantengan los efectos medicinales inherentes a GAG y ejerzan una propiedad de alta permanencia en estos tejidos mucosos.

[0003] Al mismo tiempo, se ha conocido un ácido hialurónico fotorreactivo cuya hidrosolubilidad se ha aumentado uniendo un grupo fotorreticulante tal como ácido cinámico al ácido hialurónico y dando además al mismo un tratamiento alcalino (p.ej., documento de patente 2). Este ácido hialurónico fotorreactivo se ha proporcionado uniendo un grupo fotorreticulante tal como ácido cinámico al ácido hialurónico para proporcionar materiales médicos tales como materiales antiadhesivos al dar la fotorreticulación y no aspira a potenciar la propiedad de permanencia en el tejido mucoso.

[0004] Los documentos JP 01-238530 A y WO 98/29125 A1 divulgan ácido hialurónico para aplicación a mucosa para tratar trastornos mucosos. Ninguno de estos documentos divulga que pueda unirse un grupo hidrófobo al ácido hialurónico a través de una cadena de unión y un espaciador, en el que el grupo hidrófobo es un grupo arilalquenilo.

[0005]

35 [Documento de patente 1] publicación de patente japonesa publicada no examinada nº Hei-1-238530
[Documento de patente 2] publicación de patente japonesa publicada no examinada nº 2002-249501

Divulgación de la invención

40

[0006] Se define el alcance de la presente invención por las reivindicaciones adjuntas.

Problema para resolver por la invención

45 **[0007]** La presente invención aspira a proporcionar un agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal que ejerza una excelente propiedad de permanencia y efectos farmacológicos en la mucosa.

Medios para resolver el problema

50

[0008] Como resultado de un extenso estudio para resolver el problema anterior, los presentes inventores encontraron que el "GAG de tipo unión a grupo hidrófobo" obtenido uniendo un grupo hidrófobo a GAG a través de una cadena de unión puede usarse como ingrediente activo extremadamente excelente en un agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal, porque este GAG mantiene los efectos curativos inherentes al GAG sobre trastornos de la capa epitelial corneal tales como inflamación y lesiones y exhibe una propiedad de alta permanencia cuando se aplica a la misma, y completaron la presente invención.

[0009] La presente invención se refiere a un agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la

prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal que contiene glicosaminoglicano en el que se introduce un grupo hidrófobo a través de una cadena de unión como ingrediente activo, en el que el glicosaminoglicano es ácido hialurónico o una sal del mismo, y la cadena de unión es -CONH- o -COO-, el grupo hidrófobo es un grupo arilaquenilo,

- 5 el "glicosaminoglicano en que se introduce un grupo hidrófobo a través de una cadena de unión" incluye además una cadena espaciadora entre la cadena de unión y el grupo hidrófobo, en el que la cadena espaciadora incluye además una cadena de unión por el lado del grupo hidrófobo, y la cadena espaciadora que tiene además la cadena de unión por el lado del grupo hidrófobo es COO(CH₂)_m, -COO-(CH₂)-(OCH₂)_n-, -CONH-(CH₂)_m- o CONH(CH₂)(OCH₂)_n-, en los que m y n representan enteros de 1 a 18.

10

Efectos de la invención

- [0010]** El agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal de la presente invención puede ejercer el efecto curativo persistente sobre la prevención o el tratamiento del trastorno de la capa epitelial corneal tal como inflamación y lesiones incluso mediante administración de baja frecuencia, porque este puede permanecer en un sitio afectado durante un largo periodo de tiempo exhibiendo la propiedad de alta permanencia en la capa epitelial corneal.

Breve descripción de los dibujos

20

[0011]

- La FIG. 1 es una vista que muestra un espectro de transmitancia de luz;
 la FIG. 2 es una vista que muestra los porcentajes de área curada;
 25 la FIG. 3 es una vista que muestra las áreas curadas;
 la FIG. 4 es una vista que muestra la tasa de curación;
 la FIG. 5 es una vista que muestra las áreas curadas;
 la FIG. 6 es una vista que muestra la tasa de curación;
 la FIG. 7 es una vista que muestra las áreas curadas;
 30 la FIG. 8 es una vista que muestra la tasa de curación;
 la FIG. 9 es una vista que muestra las áreas curadas;
 la FIG. 10 es una vista que muestra la tasa de curación;
 la FIG. 11 es una vista que muestra la propiedad de permanencia en sitios exfoliados en epitelio corneal de conejo;
 la FIG. 12 es una vista que muestra la propiedad de permanencia en sitios exfoliados en epitelio corneal de conejo;
 35 la FIG. 13 es una vista que muestra fotografías de un globo ocular después de irradiación con rayos ultravioleta;
 la FIG. 14 es una vista que muestra las cantidades de evaporación de agua en una córnea extraída;
 la FIG. 15 es una vista que muestra las cantidades de evaporación de agua en una córnea extraída, y
 la FIG. 16 es una vista que muestra los cambios en la relación de cantidad de evaporación de agua en hámsteres modelo de xerostomía;
 40 la FIG. 17 es una vista que muestra las áreas curadas;
 la FIG. 18 es una vista que muestra la tasa de curación;
 la FIG. 19 es una vista que muestra las áreas curadas;
 la FIG. 20 es una vista que muestra la tasa de curación.

45 Mejores modos de llevar a cabo la invención

[0012] La presente invención se describirá con más detalle a continuación mediante los mejores modos de llevar a cabo la invención.

- 50 **[0013]** En la presente memoria, un grupo alquilo hace referencia a un grupo hidrocarburo alifático lineal o ramificado que tiene un número descrito de átomos de carbono. Un grupo alquenilo hace referencia a un grupo hidrocarburo alifático lineal o ramificado que tiene un número descrito de átomos de carbono que tiene al menos un doble enlace. Un grupo alquinilo hace referencia a un grupo hidrocarburo alifático lineal o ramificado que tiene un número descrito de átomos de carbono que tiene al menos un triple enlace.

55

[0014] Un grupo arilo hace referencia a un grupo hidrocarburo aromático monocíclico o policíclico que tiene de 6 a 20 átomos de carbono como átomos constituyentes de anillo. Un grupo heteroarilo hace referencia a un grupo hidrocarburo aromático monocíclico o policíclico que tiene de 3 a 20 átomos de carbono y uno o más heteroátomos seleccionados de átomos de nitrógeno, azufre y oxígeno como átomos constituyentes de anillo.

5 **[0015]** Un grupo arilalquilo hace referencia al grupo alquilo definido anteriormente sustituido con el grupo arilo definido anteriormente. Un grupo arilalquenilo hace referencia al grupo alquenilo definido anteriormente sustituido con el grupo arilo definido anteriormente. Un grupo arilalquinilo es el grupo alquinilo definido anteriormente sustituido con el grupo arilo definido anteriormente.

[0016] Un grupo aminoácido hace referencia a un grupo derivado de la pérdida de un grupo carboxilo, un grupo amino o un grupo hidroxilo por un enlace químico de un aminoácido natural o sintético.

10 **[0017]** En la presente memoria, el término "tratamiento" incluye prevención, control de la progresión (prevención del deterioro), mejora (reducción) y cura del trastorno mucoso. El "trastorno mucoso" significa una afección en que la morfología, propiedades y funciones inherentes a la mucosa están afectadas de alguna forma. Por ejemplo, el trastorno mucoso puede incluir afecciones tales como lesiones, defectos, erosión, inflamación, úlceras y sequedad.

15

[0018] El GAG en que se introduce el grupo hidrófobo a través de la cadena de unión, que está contenido como ingrediente activo en el agente para aplicar a mucosa de la presente invención, puede ser cualquier GAG siempre que el GAG se una al grupo que tiene hidrofobicidad derivado de un compuesto hidrófobo que tiene una naturaleza hidroinsoluble y oleosoluble. Este grupo hidrófobo se une al GAG a través de la cadena de unión. Como se describe más adelante, no es necesario que todas las unidades constitutivas del GAG se unan a los grupos hidrófobos.

1) GAG

25 **[0019]** El GAG en que se introduce el grupo hidrófobo a través de la cadena de unión contenido en el agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal de la presente invención es ácido hialurónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Los ejemplos de dichas sales incluyen sales de sodio, sales de potasio, sales de magnesio y sales de calcio y, entre ellas, es preferible la sal de sodio. Por lo tanto, lo más preferible es que el GAG en el agente adecuado para aplicar a mucosa
30 para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal de la presente invención sea hialuronato de sodio. El origen del GAG no está particularmente limitado, y el GAG puede derivar de un animal o un microorganismo o sintetizarse químicamente. Por ejemplo, cuando se usa hialuronato de sodio, pueden ejemplificarse aquellos derivados de cresta de gallo. El peso molecular del GAG no está particularmente limitado, pero su peso molecular medio ponderado es preferiblemente de 200.000 a 3.000.000, más preferiblemente de
35 500.000 a 2.000.000 y lo más preferiblemente de 600.000 a 1.200.000. Cuando se usa ácido hialurónico o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, su peso molecular medio ponderado es preferiblemente de 200.000 a 3.000.000, más preferiblemente de 500.000 a 2.000.000 y lo más preferiblemente de 600.000 a 1.200.000.

2) Grupo hidrófobo

40

[0020] El grupo hidrófobo en el GAG en que se introduce el grupo hidrófobo a través de la cadena de unión contenido en el agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal es un grupo arilalquenilo.

45 **[0021]** Los grupos alquilo que tienen de 2 a 18 átomos de carbono pueden incluir metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, terc-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-heptilo, 5-metilhexilo, 4,4-dimetilpentilo, 1,1-dimetipentilo y n-octilo. Entre ellos, pueden incluirse preferiblemente los grupo alquilo que tienen de 2 a 6 átomos de carbono tales como n-butilo.

50 **[0022]** El grupo arilalquenilo puede incluir grupos tales como 2-feniletlenilo y p-aminofeniletlenilo.

[0023] Estos grupos hidrófobos pueden estar monosustituidos o polisustituidos con grupos tales como hidroxilo, carboxilo, ciano, amino (que puede estar monosustituido o disustituido con el alquilo anterior), nitro, oxo y alquilcarboniloxi.

55

[0024] Entre los grupos hidrófobos anteriores, se incluyen grupos arilalquenilo que son grupos hidrófobos que contienen el grupo arilo y pueden incluirse preferiblemente el grupo arilalquenilo sustituido con el grupo alquilcarboniloxi. Como dicho grupo arilalquenilo, es posible usar específicamente feniletlenilo y p-aminofeniletlenilo.

[0025] Estos grupos hidrófobos pueden tener también una función tal como una capacidad de absorción de rayos ultravioleta debido a tener un doble enlace en el grupo hidrófobo, como se muestra por un grupo funcional tal como feniletlenilo ejemplificado anteriormente contenido en el grupo hidrófobo. Por ejemplo, cuando se usa el agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal de la presente invención como gotas oculares descritas a continuación, es posible elaborar gotas oculares que tengan la función de absorber eficazmente los rayos ultravioletas nocivos mediante el uso del grupo que tiene la capacidad de absorción de rayos ultravioleta como grupo hidrófobo. Además, por ejemplo, cuando se usa el agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal de la presente invención para el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal tales como xerosis corneal (ojo seco), queratoconjuntivitis, queratitis punteada superficial (QPS), erosión epitelial corneal, pérdida epitelial corneal y tumor corneal, es posible elaborar un agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal que tenga efectos farmacológicos sobre los trastornos anteriores en combinación con la función de absorber eficazmente los rayos ultravioleta nocivos mediante el uso del grupo que tiene la capacidad de absorción de rayos ultravioleta como grupo hidrófobo. Como grupo que tiene la capacidad de absorción de rayos ultravioleta es preferible, por ejemplo, el grupo arilalquenilo que tiene el doble enlace de conjugación que se ejemplifica por 2-feniletlenilo y p-aminofeniletlenilo descritos anteriormente. Cuando se usa el agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal de la presente invención para el trastorno corneal, es preferible que el "GAG en que se introduce el grupo hidrófobo", que es el ingrediente activo del agente para aplicar a mucosa de la presente invención, se elabore en una solución acuosa al 0,1 % en peso que bloquee de 70 a 100 % de la transmisión de rayos ultravioleta a una longitud de onda de 200 a 300 nm cuando se mide la transmitancia de rayos ultravioleta mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo descrito a continuación. Dicho grupo hidrófobo que tiene la capacidad de absorción de rayos ultravioleta puede incluir preferiblemente grupos arilalquenilo tal como 2-feniletlenilo y p-aminofeniletlenilo.

25 3) Cadena de unión

[0026] En el GAG en que se introduce el grupo hidrófobo a través de la cadena de unión contenido en el agente para aplicar a mucosa de la presente invención, el GAG anterior se une al grupo hidrófobo anterior a través de la cadena de unión. El GAG tiene un grupo funcional que es un grupo carboxilo, hidroxilo o sulfonato (-SO₃H) como cadena lateral. Por tanto, el grupo hidrófobo puede estar unido al GAG a través de la cadena de unión obtenida formado un enlace éster carboxilato o enlace amida de ácido carboxílico junto con estos grupos funcionales. Dicha cadena de unión puede incluir específicamente -CONH- y -COO-. Entre ellos, pueden usarse preferiblemente el enlace amida de ácido carboxílico de -CONH- y el enlace éster carboxilato de -COO-, y puede usarse con particular preferencia el enlace amida de ácido carboxílico de -CONH-.

35

4) Cadena espaciadora

[0027] En el GAG en que se introduce el grupo hidrófobo a través de la cadena de unión contenido en el agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal de la presente invención, el grupo hidrófobo está unido al GAG a través de la cadena de unión anterior, y existe además una cadena espaciadora entre la cadena de unión y el grupo hidrófobo.

[0028] La cadena espaciadora tiene además una cadena de unión por el lado del grupo hidrófobo. La cadena espaciadora que tiene la cadena de unión por el lado del grupo hidrófobo es -COO-(CH₂)_m-, -COO-(CH₂)-(OCH₂)-, -CONH-(CH₂)_m- y -CONH-(CH₂)-(OCH₂)_n-, en las que m y n son enteros de 1 a 18, respectivamente.

5) Relación de presencia de grupo hidrófobo

[0029] En el GAG en que se introduce el grupo hidrófobo a través de la cadena de unión contenido en el agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal de la presente invención, no es necesario que todas las unidades constituyentes del GAG tengan respectivamente los grupos hidrófobos. Puede determinarse opcionalmente la relación de grupo hidrófobo unido en equivalentes molares respecto a una unidad repetida disacarídica en equivalentes molares de GAG (de aquí en adelante, se hace referencia como "relación de introducción"), dependiendo del tipo de grupo hidrófobo, el grado de hidrofobicidad requerido, el tipo de trastornos de la capa epitelial corneal administrados con el agente para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal y el sitio de administración, etc. Por ejemplo, cuando se usa un grupo feniletlenilo que puede estar sustituido como grupo hidrófobo, preferiblemente se introduce de 5 a 30 %, y más preferiblemente de 10 a 20 %, de grupo hidrófobo en equivalentes molares respecto a la unidad repetida disacarídica en equivalente molares de GAG (en el caso en que no se forme el enlace de reticulación

descrito a continuación).

6) Grupo formador de reticulación

5 **[0030]** En el GAG en que se introduce el grupo hidrófobo a través de la cadena de unión contenido en el agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal de la presente invención, el grupo hidrófobo puede formar un enlace de reticulación entre las moléculas de GAG por el grupo funcional contenido en el grupo. Como grupo hidrófobo capaz de formar el enlace de reticulación, puede usarse cualquier grupo siempre que el grupo hidrófobo produzca una reacción de fotodimerización o una
10 reacción de fotopolimerización por irradiación de rayos ultravioleta y sea la misma que se define anteriormente. El grupo hidrófobo capaz de formar el enlace de reticulación incluye, por ejemplo, feniletlenilo, p-aminofeniletlenilo, etenilo, 2-carboxietenilo y pentano-1,3-dienilo. Es deseable que estos grupos estén unidos a GAG a través de la cadena de unión que contiene el grupo carbonilo. Entre estos grupos hidrófobos, pueden usarse con particular preferencia feniletlenilo o p-aminofeniletlenilo que están unidos a GAG a través de la cadena de unión que contiene el
15 grupo carbonilo.

[0031] En dicho GAG en que se introduce el grupo hidrófobo capaz de formar el enlace de reticulación, las moléculas de GAG pueden reticularse entre sí al someterse a la reacción de fotodimerización o la reacción de fotopolimerización por procedimientos estándares. Por ejemplo, según los procedimientos descritos en la publicación de patente japonesa publicada no examinada nº 2002-249501, puede darse la reacción de fotodimerización o la
20 reacción de fotopolimerización.

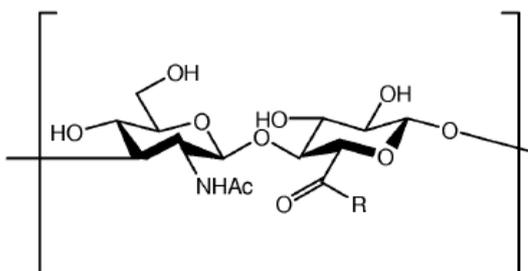
7) Unidad constitutiva de GAG preferible

25 **[0032]** Puede incluirse el siguiente GAG como representativo.

[0033] El GAG que tiene la unidad repetida de la unidad estructura representada por la fórmula química 1 como esqueleto básico:

[Fórmula química 1]

30



donde R representa R₁ o R₂;

Ac representa un grupo acetilo;

35 R₁ representa ONa u OH;

R₂ representa (1) Ph-CH=CH-COO-(CH₂)_m-NH-;

donde Ph representa un grupo fenilo, m representa enteros de 1 a 18, en la que la relación de la unidad estructural anterior en la que R representa R₂ es de 5 a 30 % en equivalentes molares respecto a la unidad repetida disacáridica en equivalentes molares de GAG.

40

8) Procedimiento para producir GAG en que se introduce el grupo hidrófobo a través de la cadena de unión

[0034] Se describe además un procedimiento para producir GAG en que se introduce un grupo hidrófobo a través de la cadena de unión. Para obtener un GAG en que se introduce el grupo hidrófobo a través de la cadena de
45 unión, se hace reaccionar GAG con un compuesto hidrófobo en que el grupo hidrófobo anterior se ha unido a un grupo funcional tal como un grupo hidroxilo, carboxilo, amino o sulfonato que puede formar un enlace éter, enlace éster carboxilato, enlace éster sulfato, enlace amida de ácido carboxílico o enlace amida de sulfonato junto con el grupo carboxilo, hidroxilo o sulfonato (-SO₃H) en GAG. Específicamente, cuando el enlace es el enlace amida de ácido carboxílico, se hace reaccionar el GAG que tiene un grupo carboxilo con el compuesto hidrófobo que tiene un

grupo amino para unir el grupo carboxilo en GAG con el grupo amino en el compuesto hidrófobo. En el caso del enlace éster carboxilato, se hace reaccionar el GAG con el compuesto hidrófobo que tiene un grupo hidroxilo o carboxilo para unir el grupo carboxilo en GAG con el grupo hidroxilo en el compuesto hidrófobo o para unir el grupo hidroxilo en GAG con el grupo carboxilo en el compuesto hidrófobo. En el caso de enlace éter, se hace reaccionar el GAG que tiene el grupo hidroxilo con el compuesto hidrófobo que tiene el grupo hidroxilo para reaccionar el grupo hidroxilo en GAG con el grupo hidroxilo en el compuesto hidrófobo. En el caso del enlace éster sulfonato, se hace reaccionar el GAG con el compuesto hidrófobo que tiene el grupo hidroxilo o grupo sulfonato para unir el grupo hidroxilo en GAG con el grupo sulfonato en el compuesto hidrófobo o para unir el grupo sulfonato en GAG con el grupo hidroxilo en el compuesto hidrófobo. Estas reacciones pueden efectuarse mediante procedimientos estándares comunes, y las condiciones de reacción pueden seleccionarse opcionalmente por los especialistas en la materia.

[0035] Cuando está presente una cadena espaciadora entre la cadena de unión y el grupo hidrófobo, el orden de introducción de la cadena espaciadora y el grupo hidrófobo en GAG no está particularmente limitado. Por ejemplo, puede usarse cualquiera del procedimiento en que se hace reaccionar con GAG un compuesto espaciador que tiene un grupo funcional tal como un grupo hidroxilo, carboxilo, amino o sulfonato que puede formar un enlace éter, enlace éster carboxilato, enlace éster sulfato, enlace amida de ácido carboxílico o enlace amida de sulfonato junto con el grupo funcional en GAG en un extremo de la cadena espaciadora anterior, y posteriormente se hace reaccionar el otro extremo del compuesto espaciador con el compuesto hidrófobo que está unido a un grupo funcional tal como un grupo hidroxilo, carboxilo, amino o sulfonato, o el procedimiento en que se hace reaccionar el compuesto espaciador que tiene un grupo funcional tal como un grupo hidroxilo, carboxilo, amino o sulfonato que puede formar un enlace éter, enlace éster carboxilato, enlace éster sulfato, enlace amida de ácido carboxílico o enlace amida de sulfonato junto con el grupo funcional en el compuesto hidrófobo en un extremo con el compuesto hidrófobo en que se ha unido el grupo hidrófobo a un grupo funcional tal como un grupo hidroxilo, carboxilo, amino o sulfonato, y posteriormente se hace reaccionar el otro extremo del compuesto espaciador con GAG. En particular, puede usarse preferiblemente el procedimiento en que se hace reaccionar el compuesto espaciador con el compuesto hidrófobo seguido de reacción con GAG.

[0036] El procedimiento anteriormente descrito puede llevarse a cabo apropiadamente mediante procedimientos conocidos públicamente, y efectuarse preferiblemente en presencia de un agente de condensación. Dicho agente de condensación puede incluir preferiblemente carbodiimida hidrosoluble tal como clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI·HCl), agentes de condensación tales como dicitohexilcarbodiimida (DCC) y N-hidroxisuccinimida (HOSu). Por ejemplo, cuando se usa ácido hialurónico como GAG y se usa un derivado de cinamato tal como $\text{Ph-CH=CH-COO-(CH}_2\text{)}_m\text{-NH}_2$ o $\text{Ph-CH=CH-COOCH}_2\text{-(OCH}_2\text{)}_n\text{-NH}_2$ (en las que m y n son enteros de 1 a 18, respectivamente) como compuesto hidrófobo que está unido al compuesto espaciador, puede usarse preferiblemente el procedimiento de condensación que usa una carbodiimida hidrosoluble tal como clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI·HCl) y N-hidroxisuccinimida. La reacción puede lograrse usando un disolvente mixto de agua y un disolvente orgánico hidrosoluble tal como dioxano, dimetilformamida o etanol. Puede obtenerse un derivado de hialuronato que es altamente soluble en un vehículo acuoso tratando con una base tal como hidrogenocarbonato de sodio después de la terminación de la reacción.

[0037] Cuando se somete el GAG así producido en que se ha introducido el grupo hidrófobo a través de la cadena de unión a la reacción de fotodimerización o la reacción de fotopolimerización para reticular las moléculas de GAG entre sí, puede usarse por ejemplo el procedimiento descrito en la publicación de patente japonesa publicada no examinada n° 2002-249501. Específicamente, en el caso del compuesto en que se une un grupo feniltenilo como grupo hidrófobo a GAG a través de $\text{-COO-(CH}_2\text{)}_m\text{-NHCO-}$, puede formarse reticulación mediante la irradiación de luz a la solución que los contiene usando una lámpara ultravioleta.

9) Agente para aplicar a mucosa de la presente invención

[0038] El agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal de la presente invención contiene uno o más GAG en que se introduce el grupo hidrófobo a través de la cadena de unión como ingrediente activo, y puede incluir además otras sustancias médica, farmacéutica o biológicamente aceptables distintas del GAG en que se introduce el grupo hidrófobo a través de la cadena de unión. Dichas sustancias incluyen, pero sin limitación, sales tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, hidrogenofosfato de disodio, dihidrogenofosfato de sodio e hidrogenofosfato de monopotasio, y conservantes tales como ésteres paraoxibenzoato, cloruro de benzalconio, clorobutanol y gluconato de clorhexidina y otros ingredientes farmacológicamente activos.

[0039] El agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal de la presente invención puede elaborarse en cualquier forma de formulación conocida públicamente (p.ej., preparaciones sólidas tales como gránulos y polvos, preparaciones líquidas tales como soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas y preparaciones de gel) como producto farmacéutico para aplicar a la córnea. En el agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal de la presente invención, la forma del mismo tras formulación y distribución y la forma del mismo tras aplicación a la córnea pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, el agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal de la presente invención puede formularse en forma de solución y puede aplicarse directamente a la córnea como tal. También, el agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal de la presente invención puede formularse y distribuirse en forma sólida, y puede elaborarse en solución o gel cuando se aplica a la córnea. Por tanto, el agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal de la presente invención puede elaborarse en la forma de formulación para preparar cuando se use.

[0040] Cuando se elabora en un agente líquido disolviendo en agua, la cantidad de GAG en que se introduce el grupo hidrófobo a través de la cadena de unión es preferiblemente de 0,02 a 5 % en peso, más preferiblemente de 0,1 a 3 % en peso, con extrema preferencia de 0,1 a 1 % en peso y lo más preferiblemente de 0,1 a 0,6 % en peso.

20 <Sujetos aplicados >

[0041] El agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal de la presente invención aspira al uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal. Los animales a que se aplica el agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal de la presente invención no están particularmente limitados, siempre que tengan córnea, y se prefieren animales mamíferos. Los animales mamíferos incluyen, pero sin limitación, seres humanos, caballos, ganado vacuno, perros, gatos, conejos, hámsteres, conejillos de Indias y ratones. El agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal de la presente invención puede elaborarse por supuesto en productos farmacéuticos para seres humanos, y puede elaborarse también en productos farmacéuticos para animales. Entre ellos, es preferible elaborar en productos farmacéuticos para seres humanos.

[0042] La córnea a la que puede aplicarse el agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal de la presente invención no está particularmente limitada, siempre que la córnea sea la córnea presente en el animal. El agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal de la presente invención se aplica a la córnea.

40 <Enfermedades aplicadas>

[0043] Puesto que el agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal de la presente invención ejercen excelentes efectos farmacológicos, particularmente sobre los trastornos de la capa epitelial corneal, es posible usarlo para el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal tales como xerosis corneal (ojo seco); queratoconjuntivitis, queratitis punteada superficial (QPS), erosión epitelial corneal, pérdida epitelial corneal y tumor corneal.

Procedimiento y cantidad de aplicación

[0044] El agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal de la presente invención puede aplicarse a la córnea, y su procedimiento de aplicación y formulación de aplicación pueden determinarse apropiadamente por los especialistas en la materia dependiendo de la posición, morfología, propiedades y funciones de la córnea para aplicar, y del fin de la aplicación. Sin embargo, es preferible aplicar a la córnea el agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal de la presente invención en forma líquida tal como una solución en uso. En ese caso, tras la producción (formulación) o aplicación del agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal de la presente invención, puede obtenerse el líquido disolviendo el GAG en que se introduce el grupo hidrófobo a través de la cadena de unión en el disolvente. El disolvente no está particularmente limitado, siempre que el disolvente pueda disolver el GAG en que se introduce el grupo hidrófobo a través de la cadena de unión y sea un disolvente farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo,

puede usarse un tampón tal como un tampón fosfato o solución salina, pero el disolvente no está limitado a ellos. En este caso, la concentración de GAG en que se introduce el grupo hidrófobo a través de la cadena de unión en el agente líquido no está particularmente limitada, y puede determinarse apropiadamente dependiendo del tipo de córnea para aplicar y del grado del trastorno de la capa epitelial corneal. Cuando el agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal de la presente invención está en gotas oculares, por ejemplo, la concentración es preferiblemente de 0,02 a 5 % en peso, más preferiblemente de 0,1 a 3 % en peso, aún más preferiblemente de 0,1 a 1 % en peso, aún más preferiblemente de 0,1 a 0,6 % en peso, con extremada preferencia de 0,1 a 0,5 % en peso y lo más preferiblemente de 0,1 a 0,3 % en peso.

10

[0045] Cuando se aplica a la mucosa del ojo, por ejemplo, puede seleccionarse un procedimiento de administración tal como instilación de gotas.

[0046] La cantidad, el número de veces y la frecuencia de aplicación (administración) del agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal de la presente invención no están particularmente limitados, y deberían determinarse dependiendo de la mucosa sometida a la aplicación, el fin de la aplicación, el tipo, edad, peso corporal, género y grado de trastorno mucoso en el animal para aplicar.

[0047] Específicamente, cuando se usa el agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial de la presente invención con el fin de tratar un trastorno de la capa epitelial corneal humana, puede administrarse el agente para aplicar a mucosa de la presente invención a la concentración anteriormente descrita como formulación líquida para la instilación de gotas (gotas oculares) que contienen GAG en que se introduce el grupo hidrófobo a través de la cadena de unión instilando de 1 a 3 gotas por administración de 1 a 5 veces al día, y puede administrarse instilando de 1 a 3 gotas por administración de 1 a 3 veces al día.

[0048] El agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal de la presente invención puede permanecer en el sitio afectado durante un periodo más largo de tiempo porque el ingrediente activo contenido en el agente exhibe la propiedad de alta permanencia en la córnea, en comparación con los fármacos convencionales que contienen ácido hialurónico como ingrediente activo en que no se ha encontrado grupo hidrófobo. Por lo tanto, el agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal de la presente invención puede ejercer también el efecto de tratamiento persistente sobre los trastornos incluso a una baja frecuencia de administración. Sin embargo, el agente para aplicar a mucosa de la presente invención no está limitado por su frecuencia de administración.

[0049] La presente invención se describirá a continuación mediante Ejemplos.

40 <Ejemplo 1>

(1-1) Preparación de hialuronato de sodio con introducción de derivado de cinamato

[0050] Se añadieron una solución acuosa de N-hidroxisuccinimida (HOSu: Watanabe Chemical Industries, Ltd.) 172 mg/5 ml, una solución acuosa de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI·HCl) (Watanabe Chemical Industries, Ltd.) 143 mg/5 ml y una solución acuosa de clorhidrato de cinamato de 3-aminopropilo (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) 181 mg/5 ml a una solución de hialuronato de sodio (1,06 g, 2,7 mmol/unidad disacáridica, peso molecular medio ponderado 900.000; derivado de cresta de gallo, Seikagaku Corporation) en agua (115 ml)/dioxano (144 ml). Se agitó la mezcla durante 3 horas y se añadió una solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio (Farmacopea japonesa) 50 mg/10 ml. Después de agitar otras 2 h y 30 min, se inactivó la reacción con ácido acético (214 mg) y cloruro de sodio (1,0 g). Se añadió etanol (300 ml), se separó por filtración el precipitado resultante y se lavó dos veces sucesivamente con etanol al 80 % y etanol al 95 %. Se secó el sólido a vacío a 40 °C durante un noche, facilitando un sólido blanco (1,06 g) (de aquí en adelante en los Ejemplos, "hialuronato de sodio con introducción de derivado de cinamato" se abrevia como "HA con introducción de derivado de cinamato"). La relación de introducción del derivado de cinamato era de un 16 %. La relación de introducción del derivado de cinamato se calculó basándose en la cantidad de cinamato mediante un procedimiento de medida de la absorbancia (longitud de onda: 269 nm) y la cantidad de hialuronato mediante un procedimiento de sulfato de carbazol.

(1-2) Preparación de una solución de HA con introducción de derivado de cinamato

[0051] Se añadió solución salina a 86 mg de HA con introducción de derivado de cinamato obtenido en (1-1) anterior, dando una cantidad total de 15,45 ml, se agitó entonces la solución durante un noche con un agitador hasta disolución uniforme. Se obtuvo una solución de un 0,5 % en peso de HA con introducción de derivado de cinamato (pérdida por secado del 10 %). Igualmente, se obtuvieron soluciones al 0,3 % en peso y al 0,1 % en peso de HA con introducción de derivado de cinamato.

<Ejemplo 2>

10

(2-1) Preparación de HA con introducción de derivado de cinamato

[0052] Se añadieron una solución acuosa de HOSu 75 mg/5 ml, una solución de EDCI-HCl en API 62 mg/5 ml y una solución de clorhidrato de cinamato de 6-aminohexilo en API (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) 92 mg/5 ml a una solución de hialuronato de sodio (1,0 g, 2,5 mmol/unidad disacáridica, peso molecular medio ponderado 1.500.000; derivado de cresta de gallo, Seikagaku Corporation) en agua para inyecciones (a la que se hace referencia de aquí en adelante como API) (150 ml)/dioxano (75 ml). Se agitó la mezcla durante 4 horas y se añadió cloruro de sodio (1,0 g). Se añadió etanol (500 ml), se separó por filtración el precipitado resultante y se lavó dos veces sucesivamente con etanol al 80 % y etanol. Se secó el sólido a vacío a 40 °C, facilitando un sólido blanco (1,1 g). La relación de introducción del derivado de cinamato era de un 2,7 %.

20

(2-2) Preparación de HA con introducción de derivado de cinamato reticulado

[0053] Se disolvió el HA con introducción de derivado de cinamato anterior (12,5 g) en solución salina tamponada con fosfato (concentración de fosfato: 1,5 mM, de aquí en adelante abreviado como "PBS") para preparar una solución de HA con introducción de derivado de cinamato al 2,5 % (500 ml). Se irradió la solución de HA con introducción de derivado de cinamato al 2,5 % con lámpara de mercurio de alta presión a 800 W y se efectuó un tratamiento térmico en autoclave a 121 °C durante 7,5 min, procurando HA con introducción de derivado de cinamato reticulado.

30

[0054] Además, se disolvió 1 g del HA con introducción de derivado de cinamato reticulado anterior en 11,5 ml de API para preparar el HA con introducción de derivado de cinamato reticulado al 0,2 % en peso.

<Ejemplo 3>

35

(3-1) Preparación de HA con introducción de derivado de cinamato

[0055] Se añadieron una solución acuosa de HOSu 172 mg/5 ml, una solución acuosa de EDCI-HCl 143 mg/5 ml y una solución acuosa de clorhidrato de cinamato de 3-aminopropilo 181 mg/5 ml (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) a una solución de hialuronato de sodio (1,0 g, 2,5 mmol/unidad disacáridica, peso molecular medio ponderado 900.000; derivado de cresta de gallo, Seikagaku Corporation) en agua (150 ml)/dioxano (75 ml). Se agitó la mezcla durante 3 horas y se añadió una solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio (Farmacopea japonesa) 750 mg/10 ml. Después de agitar otras 2 h y 30 min, se inactivó la reacción con ácido acético (214 mg) y cloruro de sodio (1,0 g). Se añadió etanol (300 ml), se separó por filtración el precipitado resultante y se lavó dos veces sucesivamente con etanol al 80 % y etanol al 95 %. Se secó el sólido a vacío a 40 °C, facilitando un sólido blanco (1,0 g) como HA con introducción de derivado de cinamato. La relación de introducción de derivado de cinamato era de un 10,1 %.

45

(3-2) Preparación de HA con introducción de derivado de cinamato marcado con fluorocromo

50

[0056] Se añadieron una solución acuosa de HOSu 3,0 mmol/ml, una solución acuosa de EDCI-HCl 1,5 mmol/ml y una solución acuosa de 4-aminofluoresceína (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) 1,5 mmol/ml a una solución del HA con introducción de derivado de cinamato obtenido en (3-1) anterior (1,00 g, 2,5 mmol/unidad disacáridica) en agua (150 ml)/dioxano (75 ml). Se agitó la mezcla un día y se añadió una solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio (Farmacopea japonesa) 500 mg/10 ml. Después de agitar otras 4 h y 30 min, se inactivó la reacción con ácido acético (2 ml) y cloruro de sodio (6,0 g). Se añadió etanol (500 ml), se separó por filtración el precipitado resultante y se lavó 4 veces con etanol al 80 % y dos veces con etanol. Se secó el sólido a vacío durante una noche, facilitando un sólido marcado con fluorocromo (782 mg). La relación de introducción de fluorescencia era de un 0,60 %.

55

<Ejemplo comparativo 1>

Preparación de HA marcado con fluorocromo

- 5 [0057] Se añadieron una solución acuosa de HOSu 3,0 mmol/ml, una solución acuosa de EDCI-HCl 1,5 mmol/ml y una solución acuosa de 4-aminofluoresceína (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) 1,5 mmol/ml a una solución de hialuronato de sodio (1,00 g, 2,5 mmol/unidad disacáridica, peso molecular medio ponderado 900.000; derivado de cresta de gallo, Seikagaku Corporation) en agua (150 ml)/dioxano (75 ml). Se agitó la mezcla un día y
- 10 se añadió una solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio (Farmacopea japonesa) 500 mg/10 ml. Después de agitar otras 4 h y 30 min, se inactivó la reacción con ácido acético (2 ml) y cloruro de sodio (6,0 g). Se añadió etanol (500 ml), se separó por filtración el precipitado resultante y se lavó 4 veces con etanol al 80 % y dos veces con etanol. Se secó el sólido a vacío durante una noche, facilitando un sólido marcado con fluorocromo (830 mg). La relación de introducción de fluorescencia era de un 0,32 %.

15 **<Ejemplo 4>**

Medida de la transmitancia de rayos ultravioleta de la solución de HA con introducción de derivado de cinamato

- 20 [0058] Se preparó la solución acuosa de HA con introducción de derivado de cinamato al 0,1 % en peso obtenida en (1-1) anterior y se midió la transmitancia de rayos ultravioleta mediante un espectrómetro (UV-1600, Shimadzu Corporation).
- [0059] Se muestra en la FIG. 1 un espectro que indica la transmitancia, y se muestra en la Tabla 1 la
- 25 transmitancia (%) a diversas longitudes de onda. Como resultado, se mostraba un 100 % de transmitancia a las longitudes de onda de 340 nm o más, pero la transmitancia a longitudes de onda de aproximadamente 320 nm o menos era de un 20 % o menor, lo que era extremadamente bajo, y se demostró que esta solución bloquea eficazmente la transmisión de rayos ultravioleta.
- 30 [0060] En la FIG. 1, se muestran las escalas con intervalos de 65 nm en el eje horizontal y con intervalos del 20 % en el eje vertical.

Tabla 1

λ	T (%)
234	19,9
340	106,2
380	101,8
450	98.5

- 35 [0061] En la Tabla, λ y T representan la longitud de onda y la transmitancia (%), respectivamente.

<Ejemplo 5>

- 40 [0062] Efecto del HA con introducción de derivado de cinamato sobre la migración de epitelio corneal de conejo

[0063] Efecto del HA con introducción de derivado de cinamato preparado en el Ejemplo 1 sobre la migración de epitelio corneal de conejo con extracción quirúrgica (modelo quirúrgico)

45 (5-1) Procedimientos

1) Extracción quirúrgica del epitelio corneal (modelo quirúrgico)

- [0064] Se extrajo el epitelio corneal de la región central usando una trefina (8 mm de DI), una aguja de 23G y
- 50 microtijeras después de anestesia con una inyección intravenosa de ketamina 5 mg/kg y xilazina 2 mg/kg y administración tópica de clorhidrato de oxibuprocaina al 0,4 %.

2) Administración tópica

[0065] Se administraron 1 hora y 4 horas después de exfoliar el epitelio corneal 150 µl de solución salina como sustancia de control al ojo izquierdo, y se administraron 150 µl de la solución de HA con introducción de derivado de cinamato al 0,5 % en peso preparada en el Ejemplo (1-2) anterior como sustancia en cuestión al ojo derecho. 1 día y 2 días después de la exfoliación, se efectuó la misma administración que anteriormente un total de 5 4 veces con intervalos de 3 horas, y 3 días después de la exfoliación con intervalos de 3 horas. En la administración, se usaron jeringuillas de inyección de 1 ml. Se usaron como sujetos de administración 6 conejos modelo para el trastorno de la capa epitelial corneal descrito en 1) anterior.

3) Fotografía de la región defectiva epitelial corneal

10

[0066] Se dio al conejo anestesia general mediante la inyección intravenosa de ketamina 5 mg/kg y xilaxina 2 mg/kg, posteriormente se tiñó el sitio de pérdida epitelial corneal con fluoresceína de sodio al 0,2 % disuelta en PBS y se fotografió bajo luz ultravioleta. Se efectuó la fotografía justo antes de la administración de la sustancia en cuestión 1 hora después de exfoliar la córnea y 3 horas después de la administración final a los 3 días después de la 15 exfoliación. Al fotografiar, se mantuvo constante la longitud focal para dar un aumento constante en las fotografías.

4) Medida de la región defectiva epitelial corneal

[0067] Se midió el área de la región defectiva epitelial corneal teñida con fluoresceína de sodio sobre la 20 fotografía impresa usando un analizador de imágenes. Se representó el valor obtenido restando el área del sitio exfoliado 3 horas después de la administración final a los 3 días después de la exfoliación del área (área exfoliada) del sitio exfoliado justo antes de la administración de la sustancia en cuestión 1 hora después de exfoliar el epitelio corneal como "área curada".

25 (5-2) Resultados del estudio

[0068] Se muestran en la FIG. 2 los resultados del porcentaje de área curada en cada individuo, y se muestran en la Tabla 2 los resultados del porcentaje de área curada y la relación de porcentaje de área curada en cada individuo. El porcentaje de área curada y la relación de porcentaje de área curada se calcularon como sigue.

30

[0069] $\text{Porcentaje de área curada (\%)} = (\text{área curada} / \text{área exfoliada}) \times 100$

[0070] $\text{Relación de porcentaje de área curada} = (\text{porcentaje de área curada en el ojo derecho} / \text{porcentaje de área curada en el ojo izquierdo}) \times 100$

35

Tabla 2

Número de espécimen	Porcentaje de área curada (%)		Relación de porcentaje de área curada
	Ojo derecho (administración de HA con introducción de derivado de cinamato)	Ojo izquierdo (administración de solución salina)	
1	76,90	66,59	115,47
2	69,44	85,90	80,85
3	75,23	61,71	121,91
4	75,54	56,79	133,01
5	68,41	64,53	106,01
6	83,76	66,92	125,16
Media	74,88	67,07	133,73
Desviación estándar	5,57	9,95	-

[0071] Para cada individuo de los números individuales 1 a 6, la columna izquierda muestra el porcentaje de área curada en el ojo derecho (administración de HA con introducción de derivado de cinamato) y la columna 40 derecha muestra el porcentaje de área curada en el ojo izquierdo (administración de solución salina). En la FIG. 2 y la Tabla 2, se observó el efecto evidente de facilitar la curación de la capa epitelial corneal en 5 de los 6 individuos administrados.

<Ejemplo 6>

45

[0072] Efecto del HA con introducción de derivado de cinamato sobre la migración de epitelio corneal de

conejo

[0073] Efecto del HA con introducción de derivado de cinamato preparado en el Ejemplo 1 sobre la migración de epitelio corneal de conejo con extracción quirúrgica (modelo quirúrgico)

5

(6-1) Procedimientos

1) Extracción quirúrgica del epitelio corneal (modelo quirúrgico)

10 **[0074]** Se extrajo el epitelio corneal de la región central usando una trefina (8 mm de DI), una aguja de 23G y microjeringas después de anestesia con una inyección intravenosa de ketamina 5 mg/kg y xilaxina 2 mg/kg y administración tópica de clorhidrato de oxibuprocaina al 0,4 %.

2) Administración tópica

15

[0075] Se administraron 1 hora y 4 horas después de exfoliar el epitelio corneal 150 µl de solución salina como sustancia de control al ojo izquierdo, y se administraron 150 µl de la solución de HA con introducción de derivado de cinamato al 0,5 % en peso preparada en el Ejemplo (1-2) anterior como sustancia en cuestión al ojo derecho. 1 día y 2 días después de la exfoliación, se efectuó la misma administración que anteriormente un total de 4 veces con intervalos de 3 horas, y 3 días después de la exfoliación con intervalos de 3 horas. En la administración, se usaron jeringuillas de inyección de 1 ml. Se usaron como sujetos de administración 14 conejos modelo para el trastorno de la capa epitelial corneal descrito en 1) anterior.

20

3) Fotografía de la región defectiva epitelial corneal

25

[0076] Se dio al conejo anestesia general mediante la inyección intravenosa de ketamina 5 mg/kg y xilaxina 2 mg/kg, posteriormente se tiñó el sitio de pérdida epitelial corneal con fluoresceína de sodio al 0,2 % disuelta en PBS y se fotografió bajo luz ultravioleta. Se efectuó la fotografía justo antes de la administración de la sustancia en cuestión 1 hora después de exfoliar la córnea y 3 horas después de la segunda administración de 1 a 3 días después de la exfoliación. Al fotografiar, se mantuvo constante la longitud focal para dar un aumento constante en las fotografías.

30

4) Medida de la región defectiva epitelial corneal

35 **[0077]** Se midió el área de la región defectiva epitelial corneal teñida con fluoresceína de sodio sobre la fotografía impresa usando un analizador de imágenes. Se representó el valor obtenido restando el área del sitio exfoliado 3 horas después de la administración final a los 3 días después de la exfoliación del área (área exfoliada) del sitio exfoliado justo antes de la administración de la sustancia en cuestión 1 hora después de exfoliar el epitelio corneal como "área curada".

40

(6-2) Resultados del estudio

[0078] Se muestran en la FIG. 3 los resultados del área curada en cada individuo, y se muestran en la FIG. 4 los resultados de la tasa de curación en cada individuo. Se calcularon el área curada y la tasa de curación como sigue.

45

Área curada= área después de exfoliación* - área en cada punto temporal (después de 1 a 3 días)

*De aquí en adelante, "área después de exfoliación" significa el área del sitio exfoliado justo antes de la administración de la sustancia en cuestión 1 hora después de exfoliar la córnea en el cálculo del área curada.

50

Tasa de curación= media de las áreas curadas en los puntos temporales respectivos (después de 1 a 3 días)

[0079] En las FIG. 3 y 4, se observó que al área curada del epitelio corneal aumentaba significativamente en los ojos administrados con solución de HA con introducción de derivado de cinamato al 0,5 % en peso en comparación con el área curada del epitelio corneal en los ojos de control. Y se observó también que la tasa de curación se potenciaba significativamente en los ojos administrados con solución de HA con introducción de derivado de cinamato al 0,5 % en peso.

55

<Ejemplo 7>

[0080] Efecto de HA con introducción de derivado de cinamato al 0,3 % sobre la migración de epitelio corneal de conejo

5

[0081] Efecto del HA con introducción de derivado de cinamato preparado en el Ejemplo 1 sobre la migración de epitelio corneal de conejo con extracción quirúrgica (modelo quirúrgico)

(7-1) Procedimientos

10

1) Extracción quirúrgica de epitelio corneal (modelo quirúrgico)

[0082] Se extrajo el epitelio corneal de la región central usando una trefina (8 mm de DI), una aguja de 23G y microtijeras después de anestesia con una inyección intravenosa de ketamina 5 mg/kg y xilaxina 2 mg/kg y administración tópica de clorhidrato de oxibuprocaina al 0,4 %.

15

2) Administración tópica

[0083] Se administraron 1 hora y 4 horas después de exfoliar el epitelio corneal 150 µl de solución salina como sustancia de control al ojo izquierdo, y se administraron 150 µl de la solución de HA con introducción de derivado de cinamato al 0,3 % en peso preparada en el Ejemplo (1-2) anterior como sustancia en cuestión al ojo derecho. 1 día y 2 días después de la exfoliación, se efectuó la misma administración que anteriormente un total de 4 veces con intervalos de 3 horas, y 3 días después de la exfoliación con intervalos de 3 horas. En la administración, se usaron jeringuillas de inyección de 1 ml. Se usaron como sujetos de administración 14 conejos modelo para el trastorno de la capa epitelial corneal descrito en 1) anterior.

20

25

3) Fotografía de la región defectiva epitelial corneal

[0084] Se dio al conejo anestesia general mediante la inyección intravenosa de ketamina 5 mg/kg y xilaxina 2 mg/kg, posteriormente se tiñó el sitio de pérdida epitelial corneal con fluoresceína de sodio al 0,2 % disuelta en PBS y se fotografió bajo luz ultravioleta. Se efectuó la fotografía justo antes de la administración de la sustancia en cuestión 1 hora después de exfoliar la córnea y 3 horas después de la segunda administración de 1 a 3 días después de la exfoliación. Al fotografiar, se mantuvo constante la longitud focal para dar un aumento constante en las fotografías.

30

35

4) Medida de la región defectiva epitelial corneal

[0085] Se midió el área de la región defectiva epitelial corneal teñida con fluoresceína de sodio sobre la fotografía impresa usando un analizador de imágenes. Se representó el valor obtenido restando el área del sitio exfoliado 3 horas después de la administración final a los 3 días después de la exfoliación del área (área exfoliada) del sitio exfoliado justo antes de la administración de la sustancia en cuestión 1 hora después de exfoliar el epitelio corneal como "área curada".

40

(7-2) Resultados del estudio

45

[0086] Se muestran en la FIG. 5 los resultados del área curada en cada individuo y se muestran en la FIG. 6 los resultados de la tasa de curación en cada individuo. Se calcularon el área curada y la tasa de curación como sigue.

50

Área curada= área después de exfoliación - área en cada punto temporal (después de 1 a 3 días)

Tasa de curación= media de las áreas curadas en los puntos temporales respectivos (después de 1 a 3 días)

[0087] En las FIG. 5 y 6, se observó que el área curada del epitelio corneal aumentaba significativamente en los ojos administrados con solución de HA con introducción de derivado de cinamato al 0,3 % en peso en todos los puntos temporales de los días 1 a 3, en comparación con el área curada del epitelio corneal en los ojos de control. Y se observó también que la tasa de curación se potenciaba significativamente en los ojos administrados con solución de HA con introducción de derivado de cinamato al 0,3 % en peso.

55

<Ejemplo 8>

[0088] Efecto de HA con introducción de derivado de cinamato al 0,1 % sobre la migración de epitelio corneal de conejo (solución acuosa de HA con introducción de derivado de cinamato al 0,1 % en peso y solución acuosa de HA al 0,1 % en peso, gotas oculares 4 veces al día).

5

[0089] Efecto del HA con introducción de derivado de cinamato preparado en el Ejemplo 1 sobre la migración de epitelio corneal de conejo con extracción quirúrgica (modelo quirúrgico)

(8-1) Procedimientos

10

1) Extracción quirúrgica del epitelio corneal (modelo quirúrgico)

[0090] Se extrajo el epitelio corneal de la región central usando una trefina (8 mm de DI), una aguja de 23G y microtijeras después de anestesia con una inyección intravenosa de ketamina 5 mg/kg y xilaxina 2 mg/kg y administración tópica de clorhidrato de oxibuprocaina al 0,4 %.

15

2) Administración tópica

[0091] Se administraron 1 hora y 4 horas después de exfoliar el epitelio corneal 150 µl de una solución acuosa de HA al 0,1 % en peso con un peso molecular medio ponderado de 600.000 a 1.200.000 como sustancia de control al ojo izquierdo, y se administraron 150 µl de la solución de HA con introducción de derivado de cinamato al 0,1 % en peso preparada en el Ejemplo (1-2) anterior como sustancia en cuestión al ojo derecho. 1 día y 2 días después de la exfoliación, se efectuó la misma administración que anteriormente un total de 4 veces con intervalos de 3 horas, y 3 días después de la exfoliación con intervalos de 3 horas. En la administración, se usaron jeringuillas de inyección de 1 ml. Se usaron como sujetos de administración 8 conejos modelo para el trastorno de la capa epitelial corneal descrito en 1) anterior.

20

25

3) Fotografía de la región defectiva epitelial corneal

[0092] Se dio al conejo anestesia general mediante la inyección intravenosa de ketamina 5 mg/kg y xilaxina 2 mg/kg, posteriormente se tiñó el sitio de pérdida epitelial corneal con fluoresceína de sodio al 0,2 % disuelta en PBS y se fotografió bajo luz ultravioleta. Se efectuó la fotografía justo antes de la administración de la sustancia en cuestión 1 hora después de exfoliar la córnea y 3 horas después de la segunda administración de 1 a 3 días después de la exfoliación. Al fotografiar, se mantuvo constante la longitud focal para dar un aumento constante en las fotografías.

30

35

4) Medida de la región defectiva epitelial corneal

[0093] Se midió el área de la región defectiva epitelial corneal teñida con fluoresceína de sodio sobre la fotografía impresa usando un analizador de imágenes. Se representó el valor obtenido restando el área del sitio exfoliado 3 horas después de la administración final a los 3 días después de la exfoliación del área (área exfoliada) del sitio exfoliado justo antes de la administración de la sustancia en cuestión 1 hora después de exfoliar el epitelio corneal como "área curada".

40

45

(8-2) Resultados del estudio

[0094] Se muestran en la FIG. 7 los resultados del área curada en cada individuo y se muestran en la FIG. 8 los resultados de la tasa de curación en cada individuo. Se calcularon el área curada y la tasa de curación como sigue.

50

Área curada= área después de exfoliación - área en cada punto temporal (después de 1 a 3 días)

Tasa de curación= media de las áreas curadas en los puntos temporales respectivos (después de 1 a 3 días)

[0095] En las FIG. 7 y 8, se observó que el área curada del epitelio corneal aumentaba significativamente en los ojos administrados con solución de HA con introducción de derivado de cinamato al 0,1 % en peso, en comparación con el área curada de epitelio corneal en los ojos de control administrados con la solución acuosa de HA al 0,1 % en peso. Y se observó también que las tasas de curación se potenciaban significativamente en los ojos administrados con solución de HA con introducción de derivado de cinamato al 0,1 % en peso.

55

<Ejemplo 9>

[0096] Efecto de HA con introducción de derivado de cinamato al 0,1 % sobre la migración de epitelio corneal de conejo (solución acuosa de HA con introducción de derivado de cinamato al 0,1 % en peso y solución acuosa de HA al 0,1 % en peso, gotas oculares una vez al día).

[0097] Efecto del HA con introducción de derivado de cinamato preparado en el Ejemplo 1 sobre la migración de epitelio corneal de conejo con extracción quirúrgica (modelo quirúrgico)

10 (9-1) Procedimientos

1) Extracción quirúrgica del epitelio corneal (modelo quirúrgico)

[0098] Se extrajo el epitelio corneal de la región central usando una trefina (8 mm de DI), una aguja de 23G y microtijeras después de anestesia con una inyección intravenosa de ketamina 5 mg/kg y xilaxina 2 mg/kg y administración tópica de clorhidrato de oxibuprocaina al 0,4 %.

2) Administración tópica

[0099] Se administraron 1 hora después de exfoliar el epitelio corneal 150 µl de una solución acuosa de HA al 0,1 % en peso con un peso molecular medio ponderado de 600.000 a 1.200.000 como sustancia de control al ojo izquierdo, y se administraron 150 µl de la solución de HA con introducción de derivado de cinamato al 0,1 % en peso preparada en el Ejemplo (1-2) anterior como sustancia en cuestión al ojo derecho. Además, 1 y 3 días después de la exfoliación, se efectuó la misma administración que anteriormente una vez al día. En la administración, se usaron jeringuillas de inyección de 1 ml. Se usaron como sujetos de administración 8 conejos modelo para el trastorno de la capa epitelial corneal descrito en 1) anterior.

3) Fotografía de la región defectiva epitelial corneal

[0100] Se dio al conejo anestesia general mediante la inyección intravenosa de ketamina 5 mg/kg y xilaxina 2 mg/kg, posteriormente se tiñó el sitio de pérdida epitelial corneal con fluoresceína de sodio al 0,2 % disuelta en PBS y se fotografió bajo luz ultravioleta. Se efectuó la fotografía justo antes de la administración de la sustancia en cuestión 1 hora después de exfoliar la córnea y 6 horas después de la segunda administración de 1 a 3 días después de la exfoliación. Al fotografiar, se mantuvo constante la longitud focal para dar un aumento constante en las fotografías.

4) Medida de la región defectiva epitelial corneal

[0101] Se midió el área de la región defectiva epitelial corneal teñida con fluoresceína de sodio sobre la fotografía impresa usando un analizador de imágenes. Se representó el valor obtenido restando el área del sitio exfoliado 3 horas después de la administración final a los 3 días después de la exfoliación del área (área exfoliada) del sitio exfoliado justo antes de la administración de la sustancia en cuestión 1 hora después de exfoliar el epitelio corneal como "área curada".

45 (9-2) Resultados

[0102] Se muestran en la FIG. 9 los resultados del área curada en cada individuo y se muestran en la FIG. 10 los resultados de la tasa de curación en cada individuo. El área curada y la tasa de curación se calcularon como sigue.

50

Área curada= área después de exfoliación - área en cada punto temporal (después de 1 a 3 días)

Tasa de curación= media de las áreas curadas en los puntos temporales respectivos (después de 1 a 3 días)

[0103] En las FIG. 9 y 10, se observó que el área curada del epitelio corneal aumentaba significativamente en los ojos administrados con solución de HA con introducción de derivado de cinamato al 0,1 % en peso en todos los puntos temporales de los días 1 a 3, en comparación con el área curada de epitelio corneal en los ojos de control administrados con la solución acuosa de HA al 0,1 % en peso. Y se observó también que la tasa de curación se potenciaba significativamente en los ojos administrados con solución de HA con introducción de derivado de cinamato al 0,1 % en peso.

<Ejemplo 10>

5 **[0104]** Propiedad de permanencia en el sitio de exfoliación epitelial corneal de conejo usando HA con introducción de derivado de cinamato marcado con fluorescencia

10 **[0105]** Efecto del HA con introducción de derivado de cinamato marcado con fluorescencia preparado en el Ejemplo 3 y del HA marcado con fluorescencia preparado en el Ejemplo comparativo 1 sobre la propiedad residual de epitelio corneal de conejo con extracción quirúrgica (modelo quirúrgico).

(10-1) Procedimientos

1) Extracción quirúrgica de epitelio corneal (modelo quirúrgico)

15 **[0106]** Se extrajo el epitelio corneal de la región central usando una trefina (8 mm de DI), una aguja de 23G y microtijeras después de anestesia con una inyección intravenosa de ketamina 5 mg/kg y xilazina 2 mg/kg y administración tópica de clorhidrato de oxibuprocaina al 0,4 %.

20 2) Administración tópica

25 **[0107]** Se administraron 1 hora después de exfoliar el epitelio corneal 150 µl de la solución acuosa de HA marcada con fluorescencia al 0,3 % preparada en el Ejemplo comparativo 1 anterior como sustancia de control al ojo izquierdo, y se administraron 150 µl de la solución acuosa de HA con introducción de derivado de cinamato marcado con fluorescencia al 0,3 % en peso preparada en el Ejemplo 3 anterior como sustancia en cuestión al ojo derecho. En la administración, se usaron jeringuillas de inyección de 1 ml. Se usaron como sujetos de administración 8 conejos modelo para el trastorno de la capa epitelial corneal descrito en 1) anterior.

3) Extracción del epitelio corneal y producción de bloques congelados

30 **[0108]** Se les dio anestesia general a dos conejos mediante inyección intravenosa de ketamina 5 mg/kg y xilazina 2 mg/kg por conejo, y se extrajeron los globos oculares 30 minutos, 1 hora, 1 hora y media y 2 horas y 30 minutos después de la administración de la sustancia en cuestión y la sustancia de control. Se abrió un poro entre la córnea y la esclerótica en el globo ocular extraído usando una cuchilla quirúrgica y se sacó solo la córnea usando microtijeras. Se dispuso la córnea extraída en una rebanadora de muestras biológicas (suministrada por Nisshin EM Corporation, nº de cat. 428) y se cortó la porción para observar usando una cuchilla de afeitar de acero inoxidable de un filo (GEM(R) STAINLESS STEEL UNCOATED, Nisshin EM Corporation, nº de cat. 429). Se sumergió la porción cortada en compuesto O.C.T. (Tissue-Tek (R) 4583, Lote 1178) y se embebió entonces en una bandeja criostática (suministrada por Murazumi Co., Ltd., nº de cat. 31) rellena con el compuesto O.C.T. de modo que la porción para observar estuviera en el fondo, y se congeló rápidamente usando nitrógeno líquido en espuma de poliestireno para elaborar un bloque congelado no fijado.

4) Producción de secciones congeladas

45 **[0109]** Posteriormente, se extrajo el bloque congelado de la bandeja criostática y se unió a una tabla de muestras usando el compuesto O.C.T. Se pusieron la tabla de muestras y una hoja microtómica desechable (suministrada por Leica Microsystems Japan, modelo 818, nº de lote 913212) en un micrótopo de alta resolución con congelación para investigación y se rebanó el bloque en condiciones de temperatura de cámara (CT) congelada a -20 °C y temperatura lateral de muestra (OT) a -16 °C para elaborar secciones con un grosor de 5 µm usando portaobjetos recubiertos con silano (suministrados por Muto Pure Chemicals Co., Ltd., Star Frost Slide Glass, nº de cat. 5116).

5) Procedimientos de observación y fotografía

55 **[0110]** Se puso la sección congelada en un microscopio de fluorescencia de luz incidente (Olympus Corporation, BH2-RFC), se observaron las imágenes de FA y autofluorescentes en un cubo IB (BH2-DMIB, longitud de onda de excitación: 495 nm, longitud de onda de absorción: 460 nm) y un cubo U (BH2-DMU, excitación de banda ancha U, longitud de onda de absorción: 435 nm), respectivamente. Se fotografiaron la imagen de FA y la imagen autofluorescente usando una cámara de alta sensibilidad enfriada de CCD (Keyence Corporation, VB-6010) en condiciones de tiempo de exposición de 1 segundo y sensibilidad USO de 200.

(10-2) Resultados del estudio

5 **[0111]** Se mostraron en las FIG. 11 y 12 las fotografías de la córnea muestreada. En las FIG. 11 y 12, se identificó por el desarrollo de color del marcador de fluorescencia que la solución acuosa de HA marcado con fluorescencia al 0,3 % en peso, que era la sustancia de control, permanecía hasta 30 minutos después de la administración, pero no permanecía después de 1 hora. Al mismo tiempo, aunque el desarrollo de color fluorescente de la solución acuosa de HA con introducción de derivado de cinamato marcado con fluorescencia al 0,3 % en peso, que es la sustancia en cuestión, se debilitaba por el paso del tiempo, se observó desarrollo de color en todos los
10 puntos temporales desde 30 minutos a 2 horas y 30 minutos después de la administración, confirmando así el rendimiento de alta permanencia.

<Ejemplo 11>

15 **[0112]** Efecto de HA con introducción de derivado de cinamato al 0,3 % sobre ojos de conejo después de exposición a luz ultravioleta

[0113] Efecto protector del HA con introducción de derivado de cinamato preparado en el Ejemplo 1 sobre conejo con queratopatía punteada superficial corneal.

20

(11-1) Procedimiento de estudio

1) Anestesia y abertura del párpado en conejo

25 **[0114]** Se dieron al conejo anestesia introducida mediante la inyección intravenosa de ketamina 5 mg/kg y xilazina 2 mg/kg y anestesia mantenida mediante inhalación de isoflurano. Posteriormente, se abrió siempre el párpado usando un retractor de párpado para niños.

2) Administración de la sustancia en cuestión y la sustancia de control

30

[0115] En condiciones de ojo abierto, se administraron 150 µl de una solución acuosa de HA con un peso molecular medio ponderado de 600.000 a 1.200.000 al 0,3 % en peso como sustancia de control al ojo derecho y 150 µl de HA con introducción de derivado de cinamato al 0,3 % en peso preparado en el ejemplo (1-2) anterior como sustancia en cuestión al ojo izquierdo. En la administración, se usaron jeringuillas de inyección de 1 ml. Se usó
35 un conejo descrito en 1) anterior como sujeto de administración.

3) Irradiación de rayos ultravioleta en la córnea de conejo

[0116] Se irradiaron rayos ultravioleta en ambos ojos a una distancia de aproximadamente 10 cm del globo ocular del conejo usando una lámpara germicida de 15 kW. Se efectuó la irradiación durante 3 horas.

40

4) Fotografía del sitio irradiado con rayos ultravioleta

[0117] Se tiñó el globo ocular con fluoresceína de sodio al 0,2 % con anestesia continua del conejo y se
45 fotografió bajo luz ultravioleta. Al fotografiar, se mantuvo constante la longitud focal para dar un aumento constante en las fotografías.

(11-2) Resultado del estudio

50 **[0118]** Se mostraron en las FIG. 13 las fotografías después de la irradiación de los rayos ultravioleta. En la FIG. 13, era evidente el sitio afectado teñido con fluoresceína de sodio al 0,2 % en el globo ocular irradiado con los rayos ultravioleta después de la administración de la sustancia de control. Al mismo tiempo, en el globo ocular irradiado con los rayos ultravioleta después de la administración de la sustancia en cuestión, el sitio afectado teñido con fluoresceína de sodio al 0,2 % era claramente menor que el de la sustancia de control, y se prevenía el trastorno
55 corneal causado por los rayos ultravioleta.

[0119] <Ejemplo 12>

Efecto humectante usando córnea extraída

[0120] Usando la córnea extraída del conejo, se validó el rendimiento humectante del HA con introducción de derivado de cinamato preparado en el Ejemplo 1.

5 (12-1) Procedimientos

1) Extracción de córnea

[0121] Se dio al conejo anestesia general mediante la inyección intravenosa de ketamina 5 mg/kg y xilazina 2 mg/kg y se extrajo el globo ocular. Se abrió un poro entre la córnea y la esclerótica en el globo ocular extraído usando una cuchilla quirúrgica y se sacó solo la córnea usando microtijeras.

2) Tratamiento secante de la córnea

15 **[0122]** Se efectuó el tratamiento secante disponiendo la córnea extraída en un bloque de parafina con un material estabilizador de dientes postizos y proporcionando aire frío a una distancia de aproximadamente 1 m de la córnea usando un secador durante 5 minutos.

20 3) Administración de sustancias de prueba (sustancia en cuestión, sustancia de control y sustancia de control negativo)

[0123] Después de la terminación del tratamiento de secado, se administraron a las dos córneas 100 µl de solución salina como sustancia de control negativo, la solución acuosa de HA con un peso molecular medio ponderado de 600.000 a 1.200.000 al 0,3 % en peso como sustancia de control o la solución acuosa de HA con introducción de derivado de cinamato al 0,5 % en peso preparada en el Ejemplo (1-2) anterior como sustancia en cuestión. En la administración, se usaron jeringuillas de inyección de 1 ml. Se usaron 3 conejos (6 córneas) descritos en 1) anterior como sujetos de administración.

30 4) Medida de la cantidad de evaporación de agua

[0124] Se midió la cantidad de evaporación de agua usando un aparato de medida de la cantidad de evaporación de agua (AS-TW2, ASAHIBIOMED) antes de la administración de la sustancia de prueba, después del tratamiento de secado, después de la administración de la sustancia de prueba y hasta 40 minutos con intervalos de 10 minutos después de la administración de la sustancia de prueba.

35 (12-2) Resultados del estudio

[0125] Se mostraron en la FIG. 14 los resultados de medir la cantidad de evaporación de agua. En la FIG. 14, la cantidad de evaporación de agua era ligeramente mayor en la solución acuosa de HA, que era la sustancia de control, que en la solución salina que era el control negativo, mientras que la solución salina se volvía de un valor cercano a 0 después de 40 minutos. Por otro lado, la cantidad de evaporación de agua después de la administración de la sustancia en cuestión se mantenía a un valor alto incluso tras pasar 40 minutos, confirmando así el claro rendimiento humectante de la sustancia en cuestión.

45 <Ejemplo 13>

(13-1) Procedimientos

1) Extracción de epitelio corneal

50 **[0126]** Se sacrificó el conejo y, después de extraer el globo ocular, se extrajo toda la capa corneal por incisión a lo largo de la esclerótica. Se conservó la córnea extraída en solución salina y se fijó el epitelio corneal colocándolo en un bloque de parafina con material estabilizador de dientes postizos justo antes de la medida (descrita de aquí en adelante como "la córnea para medir").

55 2) Evaporación de agua en epitelio corneal

[0127] Se aportó a la córnea para medir aire frío por el secador a una distancia de 30 cm durante 5 minutos, y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora.

3) Administración de la sustancia en cuestión

5 **[0128]** Después de evaporar el agua, se administraron dos gotas (aproximadamente 100 µl) de solución salina como sustancia de control negativo, la solución acuosa de HA con un peso molecular medio ponderado de 600.000 a 1.200.000 al 0,3 % en peso como sustancia de control o la solución acuosa de HA con introducción de derivado de cinamato al 0,5 % en peso preparada como en el Ejemplo (1-2) anterior como sustancia en cuestión con la jeringuilla de 1 ml.

10 4) Medida de las cantidades de evaporación de agua

[0129] Se midió directamente la cantidad percibida como cantidad de evaporación no percibida (cantidad de agua liberada por m² por hora) como la cantidad de evaporación de agua de la córnea para medir usando el aparato de medida de la cantidad de evaporación de agua (AS-TW2).

15

(13-2) Resultados del estudio

[0130] Se mostraron en la FIG. 15 los resultados de medir la cantidad de evaporación de agua. En la FIG. 15, la cantidad de evaporación de agua era ligeramente mayor en la solución acuosa de HA, que era la sustancia de control, que en la solución salina que era el control negativo, mientras que la solución salina exhibía un valor cercano a 0 después de 40 minutos. Por otro lado, la cantidad de evaporación de agua de la sustancia en cuestión administrada mantenía un valor alto incluso tras pasar 40 minutos, confirmando así que la sustancia en cuestión tiene una propiedad de retención de agua más persistente en la córnea en comparación con solución salina y la solución acuosa de HA.

25

<Ejemplo de referencia 14>

[0131] Validación del efecto curativo de HA con introducción de derivado de cinamato reticulado

30 **[0132]** Usando un modelo de hámster para xerostomía, se validó el efecto curativo del HA con introducción de derivado de cinamato reticulado preparado en el Ejemplo 2 sobre la xerostomía.

(14-1) Procedimiento de prueba

35 1) Producción del hámster modelo para xerostomía

[0133] Se expuso el interior de la cavidad oral de un hámster sirio macho por inserción de un tubo de ensayo con un diámetro de aproximadamente 10 mm en la cavidad oral cercana al lado bucal e inversión con anestesia de Nembutal. Al aportar aire caliente durante aproximadamente 20 segundos y aportar posteriormente aire frío durante 40 2 minutos y 40 segundos al interior expuesto de la cavidad oral usando un secador, se obtuvo el hámster modelo para xerostomía. Se expuso continuamente el interior de la cavidad oral hasta que se completó la medida.

2) Administración de la sustancia en cuestión y la sustancia de control

45 **[0134]** Inmediatamente después de elaborar el modelo de xerostomía, se administraron 100 µl de (A) PBS, (B) solución de HA al 0,2 % en peso (suministrado por Seikagaku Corporation, peso molecular medio ponderado: 1.500.000) o (C) solución de HA con introducción de derivado de cinamato reticulado al 0,2 % en peso por aplicación al interior de la cavidad oral usando una microjeringuilla.

50 **[0135]** De aquí en adelante, se hace referencia al grupo administrado con (A), el grupo administrado con (B) y el grupo administrado con (C) como el grupo PBS, el grupo HA y el grupo HA con introducción de derivado de cinamato reticulado, respectivamente. Para la clasificación de la administración (composición del grupo de administración), se usaron 7 hámsteres para cada uno del grupo de PBS, el grupo de HA y el grupo de HA con introducción de derivado de cinamato reticulado.

55

3) Cálculo de la relación de cantidad de evaporación de agua

[0136] Se midió la cantidad de evaporación de agua en el interior de la cavidad oral en el hámster modelo de xerostomía usando el sistema de evaporación de agua (Asahibiomed), y se calculó la relación de cantidad de

evaporación de agua cuando el valor de medida inmediatamente después de elaborar el hámster modelo de xerostomía era de 1. Cuanto mayor es esta relación de evaporación de agua, se mantiene una condición más humectada (el grado de sequedad de la cavidad oral es bajo). Se efectuó la medida inmediatamente después de elaborar el hámster modelo de xerostomía, inmediatamente después de la administración, 10 minutos y 20 minutos después de la administración.

(14-2) Resultados del estudio

[0137] Se muestran en la FIG. 16 los resultados de medir la relación de cantidad de evaporación de agua. En la figura, los números rodeados 1, 2, 3 y 4 en el eje horizontal representan los datos inmediatamente después de la elaboración del hámster modelo de xerostomía, inmediatamente después de la administración, 10 minutos y 20 minutos después de la administración, respectivamente. P representa el nivel de significación. Inmediatamente después de la administración, todos los grupos de administración exhibían una relación de cantidad de evaporación de agua de 3,3 a 4,5. La relación de cantidad de evaporación de agua 10 minutos después de la administración era de 0,9 de media en el grupo de PBS y de 2,3 de media en el grupo de HA. Por otro lado, era de 3,2 de media en el grupo de HA con introducción de derivado de cinamato reticulado, por tanto mostró una mayor relación de cantidad de evaporación de agua que el grupo de PBS y el grupo de HA. Además, la relación de cantidad de evaporación de agua 20 minutos después de la administración era de 0,9 de media en el grupo de PBS y de 1,3 de media en el grupo de HA. Por otro lado, era de 3,2 en el grupo de HA con introducción de derivado de cinamato reticulado, por tanto se indicó una relación de cantidad de evaporación de agua extremadamente alta en comparación con el grupo de PBS y el grupo de HA. Además, resulta evidente por la FIG. 16 que la relación de cantidad de evaporación de agua en el grupo de HA con introducción de derivado de cinamato reticulado era muy estable independientemente del paso del tiempo. Esto indicaba que el HA con introducción de derivado de cinamato reticulado permanecía en el sitio administrado durante un largo periodo de tiempo y ejercía un efecto altamente persistente.

[0138] A partir de los resultados anteriores, se ha mostrado que los GAG en que se introduce el grupo hidrófobo a través de la cadena de unión, incluyendo el HA con introducción de derivado de cinamato y el HA con introducción de derivado de cinamato reticulado, son adecuados para aplicación a la mucosa y capaces de tratar eficazmente el trastorno de la capa epitelial mucosa al aplicarse a la mucosa. Se ha mostrado también que el efecto del tratamiento es altamente persistente.

[0139] Puesto que no se ha observado ningún efecto adverso debido a la administración del HA con introducción de derivado de cinamato y el HA con introducción de derivado de cinamato reticulado en ninguno de los estudios animales observados, puede estimarse suficiente la seguridad del agente para aplicar a mucosa de la presente invención.

<Ejemplo de referencia 15>

(15-1) Preparación de hialuronato de sodio con introducción de octilamina

[0140] Se añadieron una solución de octilamina (etanol:HCl 0,1 M= 1:1) 25,8 mg/2 ml, 2 ml de solución de DMT-MM (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 0,1 M (etanol:agua=1:1) a una solución de hialuronato de sodio (502 mg, 1,25 mmol/unidad disacáridica, peso molecular medio ponderado 900.000) en agua (50 ml)/etanol (50 ml). Se agitó la mezcla durante una noche y se añadió una solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio (Farmacopea japonesa) 376 mg/5 ml. Después de agitar otras 5 horas, se inactivó la reacción con ácido acético (107 mg) y cloruro de sodio (522 mg). Se añadió etanol (250 ml), se separó por filtración el precipitado resultante y se lavó dos veces sucesivamente con etanol al 80 % y etanol. Se secó el sólido a vacío, facilitando un sólido blanco (475 mg). La relación de introducción de octilamina era de un 12,6 % por HPLC.

(15-2) Preparación de hialuronato de sodio con introducción de hexadecilamina

[0141] Se añadieron una solución de hexadecilamina (etanol:HCl 0,1 M= 1:1) 30 mg/3 ml y 1,25 ml de solución de DMT-MM (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 0,1 M (etanol:agua= 1:1) a una solución de hialuronato de sodio (501 mg, 1,25 mmol/unidad disacáridica, peso molecular medio ponderado 900.000) en agua (50 ml)/etanol (50 ml). Se agitó la mezcla durante una noche y se añadió una solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio (Farmacopea japonesa) 381 mg/5 ml. Después de agitar otras 5 horas, se inactivó la reacción con ácido acético (107 mg) y cloruro de sodio (497 mg). Se añadió etanol (250 ml), se separó por filtración el precipitado resultante y se lavó dos veces sucesivamente con etanol al 80 % y etanol. Se secó el sólido a vacío, facilitando un sólido blanco (497 mg). La relación de introducción de hexadecilamina era de un 12 % por HPLC.

(15-3) Preparación de solución de muestra

5 **[0142]** Se añadieron 64 mg del compuesto obtenido en (15-1) anterior a solución salina tamponada con fosfato 5 mM, dando una cantidad total de 59 ml, se agitó entonces la solución durante una noche con un agitador. Se obtuvo la solución de compuesto al 0,1 % en peso preparada en (15-1) anterior.

[0143] Igualmente, se obtuvo la solución de compuesto al 0,1 % en peso preparada en (15-2) anterior.

10 <Ejemplo 16>

[0144] Efecto de HA con introducción de derivado de cinamato al 0,1 % sobre la migración de epitelio corneal de conejo

15 **[0145]** Efecto del HA con introducción de derivado de cinamato preparado en el Ejemplo 1 sobre la migración de epitelio corneal de conejo con extracción quirúrgica (modelo quirúrgico).

(16-1) Procedimientos

20 1) Extracción quirúrgica del epitelio corneal (modelo quirúrgico)

[0146] Se extrajo el epitelio corneal de la región central usando una trefina (8 mm de DI), una aguja de 23G y microtijeras después de anestesia con una inyección intravenosa de ketamina 5 mg/kg y xilaxina 2 mg/kg y administración tópica de clorhidrato de oxibuprocaina al 0,4 %.

25

2) Administración tópica

[0147] Se administraron 1 hora y 4 horas después de exfoliar el epitelio corneal 150 µl de solución salina como sustancia de control al ojo izquierdo, y se administraron 150 µl de la solución de HA con introducción de derivado de cinamato al 0,1 % en peso preparada en el Ejemplo (1-2) anterior como sustancia en cuestión al ojo derecho. El día 1 y 2 después de la exfoliación, se efectuó la misma administración que anteriormente un total de 4 veces con intervalos de 3 horas, y 3 días después de la exfoliación con intervalos de 3 horas. En la administración, se usaron jeringuillas de inyección de 1 ml. Se usaron 14 conejos modelo para trastorno de la capa epitelial corneal descrito en 1) anterior como sujetos de administración.

35

3) Fotografía de la región defectiva epitelial corneal

[0148] Se dio al conejo anestesia general mediante la inyección intravenosa de ketamina 5 mg/kg y xilaxina 2 mg/kg, posteriormente se tiñó el sitio de pérdida epitelial corneal con fluoresceína de sodio al 0,2 % disuelta en PBS y se fotografió bajo luz ultravioleta. Se efectuó la fotografía justo antes de la administración de la sustancia en cuestión 1 hora después de exfoliar la córnea y 3 horas después de la segunda administración de 1 a 3 días después de la exfoliación. Al fotografiar, se mantuvo constante la longitud focal para dar un aumento constante en las fotografías.

45 4) Medida de la región defectiva epitelial corneal

[0149] Se midió el área de la región defectiva epitelial corneal teñida con fluoresceína de sodio sobre la fotografía impresa usando un analizador de imágenes. Se representó el valor obtenido restando el área del sitio exfoliado 3 horas después de la administración final a los 3 días después de la exfoliación del área (área exfoliada) del sitio exfoliado justo antes de la administración de la sustancia en cuestión 1 hora después de exfoliar el epitelio corneal como "área curada".

(16-2) Resultados del estudio

55 **[0150]** Se muestran en la FIG. 17 los resultados del área curada en cada individuo y se muestran en la FIG. 18 los resultados de la tasa de curación en cada individuo. Se calcularon el área curada y la tasa de curación como sigue.

Área curada= área después de exfoliación - área en cada punto temporal (después de 1 a 3 días)

Tasa de curación= media de las áreas curadas en los puntos temporales respectivos (después de 1 a 3 días)

[0151] En las FIG. 17 y 18, se observó que el área curada del epitelio corneal aumentaba significativamente en los ojos administrados con solución de HA con introducción de derivado de cinamato al 0,1 % en peso en todos los puntos temporales de los días 1 a 3, en comparación con el área curada del epitelio corneal en los ojos de control. Y se observó también que la tasa de curación se potenciaba significativamente en los ojos administrados con solución de HA con introducción de derivado de cinamato al 0,1 % en peso.

<Ejemplo 17>

10

[0152] Efecto de HA con introducción de octilamina y HA con introducción de hexadecilamina al 0,1 % sobre la migración de epitelio corneal de conejo

[0153] Efecto del HA con introducción de octilamina y el HA con introducción de hexadecilamina preparados en el Ejemplo de referencia 15 sobre la migración en epitelio corneal de conejo con extracción quirúrgica (modelo quirúrgico).

(17-1) Procedimientos

20 1) Extracción quirúrgica del epitelio corneal (modelo quirúrgico)

[0154] Se extrajo el epitelio corneal de la región central usando una trefina (8 mm de DI), una aguja de 23G y microtijeras después de anestesia con una inyección intravenosa de ketamina 5 mg/kg y xilaxina 2 mg/kg y administración tópica de clorhidrato de oxibuprocaina al 0,4 %.

25

2) Administración tópica

[0155] Se administraron 1 hora y 4 horas después de exfoliar el epitelio corneal 150 µl de solución salina como sustancia de control al ojo izquierdo, y se administraron 150 µl de la solución de HA con introducción de octilamina al 0,1 % en peso preparada en el Ejemplo (15-2) anterior como sustancia en cuestión al ojo derecho. El día 1 y 2 después de la exfoliación, se efectuó la misma administración que anteriormente un total de 4 veces con intervalos de 3 horas, y 3 días después de la exfoliación con intervalos de 3 horas. En la administración, se usaron jeringuillas de inyección de 1 ml. Se usaron 8 conejos de cada modelo de trastorno de la capa epitelial corneal descrito en 1) anterior como sujetos de administración.

35

3) Fotografía de la región defectiva epitelial corneal

[0156] Se dio al conejo anestesia general mediante la inyección intravenosa de ketamina 5 mg/kg y xilaxina 2 mg/kg, posteriormente se tiñó el sitio de pérdida epitelial corneal con fluoresceína de sodio al 0,2 % disuelta en PBS y se fotografió bajo luz ultravioleta. Se efectuó la fotografía justo antes de la administración de la sustancia en cuestión 1 hora después de exfoliar la córnea y 3 horas después de la segunda administración de 1 a 3 días después de la exfoliación. Al fotografiar, se mantuvo constante la longitud focal para dar un aumento constante en las fotografías.

45 4) Medida de la región defectiva epitelial corneal

[0157] Se midió el área de la región defectiva epitelial corneal teñida con fluoresceína de sodio sobre la fotografía impresa usando un analizador de imágenes. Se representó el valor obtenido restando el área del sitio exfoliado 3 horas después de la administración final a los 3 días después de la exfoliación del área (área exfoliada) del sitio exfoliado justo antes de la administración de la sustancia en cuestión 1 hora después de exfoliar el epitelio corneal como "área curada".

(17-2) Resultados del estudio

55 **[0158]** Se muestran en la FIG. 19 los resultados del área curada en cada individuo, y se muestran en la FIG. 20 los resultados de la tasa de curación en cada individuo. En la FIG. 19, C8-L(a: control), C8-R(b), C16-L(c: control) y C16-R(d) representan el ojo izquierdo al que se administró solución salina como control para C8-R, el ojo derecho al que se administró solución de HA con introducción de octilamina al 0,1 %, el ojo izquierdo al que se administró solución salina como control para C16-R y el ojo derecho al que se administró solución de HA con introducción de

hexadecilamina al 0,1 %, respectivamente. En la FIG. 20, C8 representa los resultados del estudio anterior que usa octilamina y C16 representa los resultados del estudio anterior que usa hexadecilamina. Se calcularon el área curada y la tasa de curación como sigue.

- 5 Área curada= área después de exfoliación - área en cada punto temporal (después de 1 a 3 días)
Tasa de curación= media de las áreas curadas en los puntos temporales respectivos (después de 1 a 3 días)

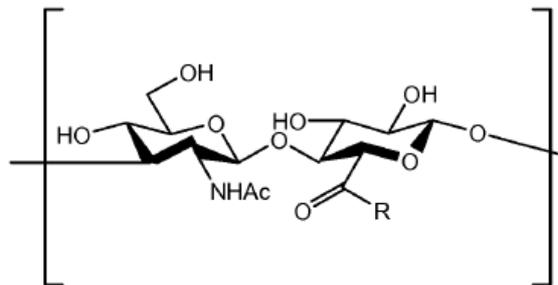
[0159] En las FIG. 19 y 20, se observó que el área curada del epitelio corneal aumentaba significativamente en los ojos administrados con solución de HA con introducción de octilamina y de HA con introducción de hexadecilamina al 0,1 % en todos los puntos temporales de los días 1 a 3, en comparación con el área curada del epitelio corneal en los ojos de control. Y se observó también que la tasa de curación se potenciaba significativamente en los ojos administrados con solución de HA con introducción de octilamina o HA con introducción de hexadecilamina al 0,1 %.

REIVINDICACIONES

1. Un agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal que contiene glicosaminoglicano en que se introduce un grupo hidrófobo a través de una
 5 cadena de unión como ingrediente activo, donde el glicosaminoglicano es ácido hialurónico o una sal del mismo, la cadena de unión es -CONH-, o -COO-, el grupo hidrófobo es un grupo arilalquenilo, el glicosaminoglicano en que se introduce un grupo hidrófobo a través de una cadena de unión incluye además una
 10 cadena espaciadora entre la cadena de unión y el grupo hidrófobo, donde la cadena espaciadora incluye además una cadena de unión por el lado del grupo hidrófobo, y la cadena espaciadora que tiene además una cadena de unión en el lado del grupo hidrófobo es -COO-(CH₂)_m-, -COO-(CH₂)-(OCH₂)_n-, -CONH-(CH₂)_m o -CONH-(CH₂)-(OCH₂)_n-, en las que m y n representan enteros de 1 a 18.

2. El agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de
 15 la capa epitelial corneal de acuerdo con la reivindicación 1, donde el glicosaminoglicano es hialuronato de sodio.

3. Un agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal de acuerdo con la reivindicación 1, que contiene glicosaminoglicano que tiene una estructura repetida de una unidad estructural representada por la siguiente fórmula como esqueleto básico:
 20



donde R representa R₁ o R₂;

Ac representa un grupo acetilo;

25 R₁ representa ONa u OH;

R₂ representa Ph-CH=CH-COO-(CH₂)_m-NH-; donde Ph representa fenilo y m representa enteros de 1 a 18, donde la relación de la unidad estructural anterior donde R representa R₂ es de 5 a 30 % en equivalentes molares respecto a la unidad repetida disacáridica en equivalentes molares de glicosaminoglicano.

30 4. El agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de la capa epitelial corneal de acuerdo con la reivindicación 3, donde la concentración del ingrediente activo es de 0,02 a 5 % en peso.

5. El agente adecuado para aplicar a mucosa para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos de
 35 la capa epitelial corneal según la reivindicación 3, donde la concentración de ingrediente activo es de 0,1 a 0,6 % en peso.

Fig. 1

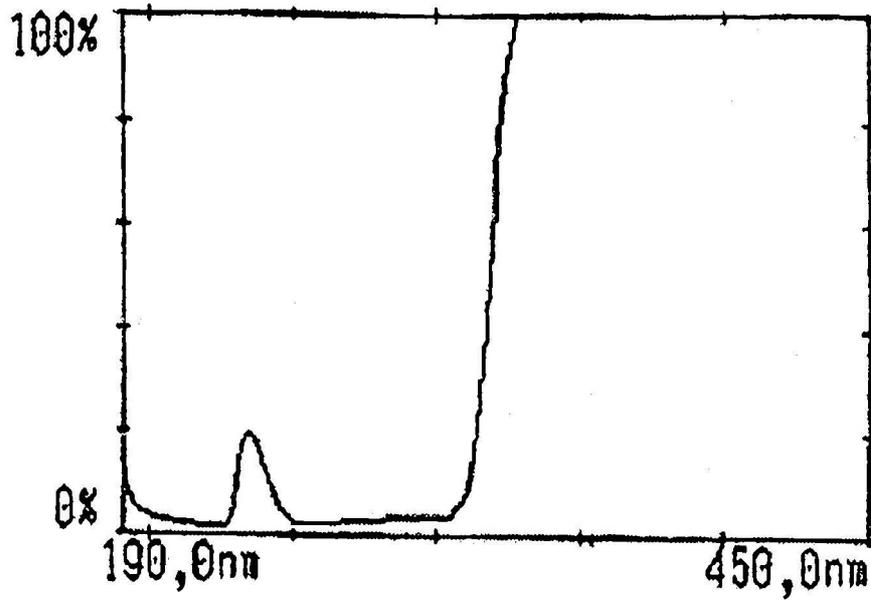


Fig. 2

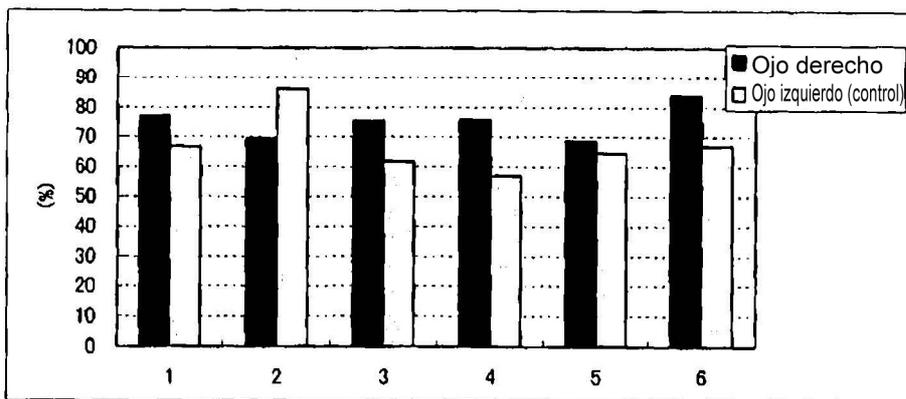
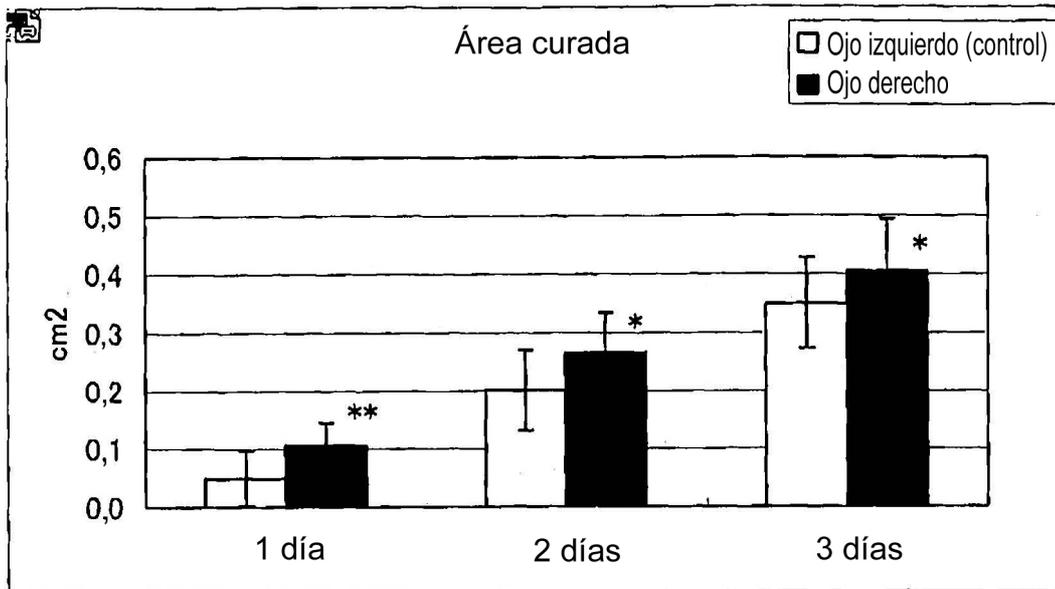
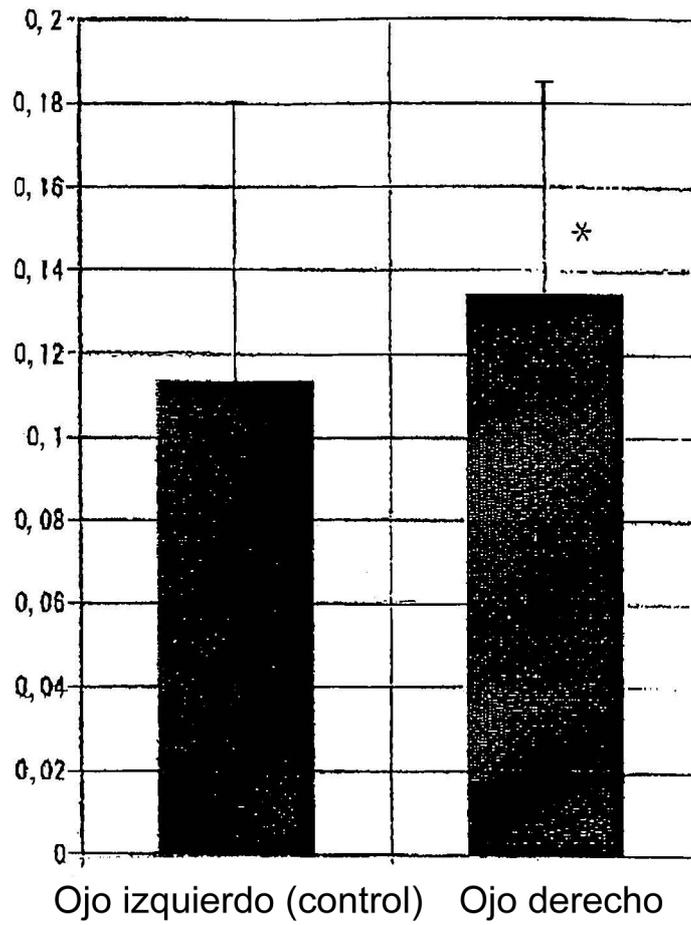


Fig. 3



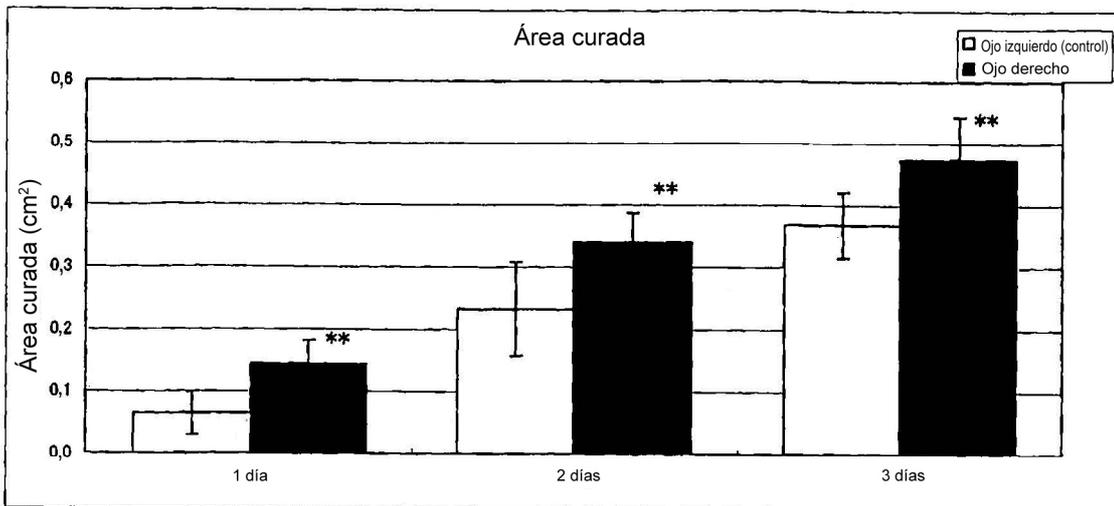
Área curada (n= 14, media \pm DE, *: P < 0,05, **: P < 0,01)

Fig. 4



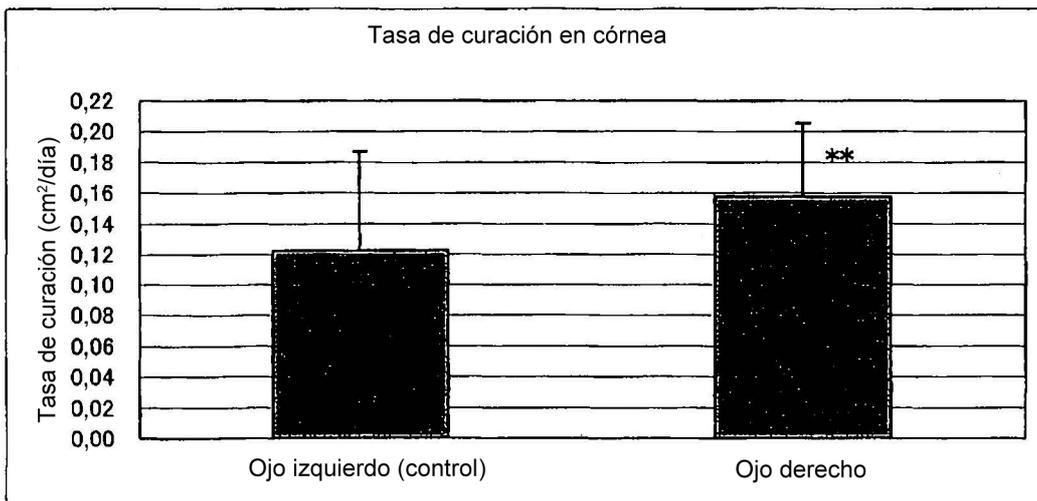
Tasa de curación (cm²/día, n= 42 (n= 14x3 veces), media ± DE, *: P< 0,05

Fig. 5



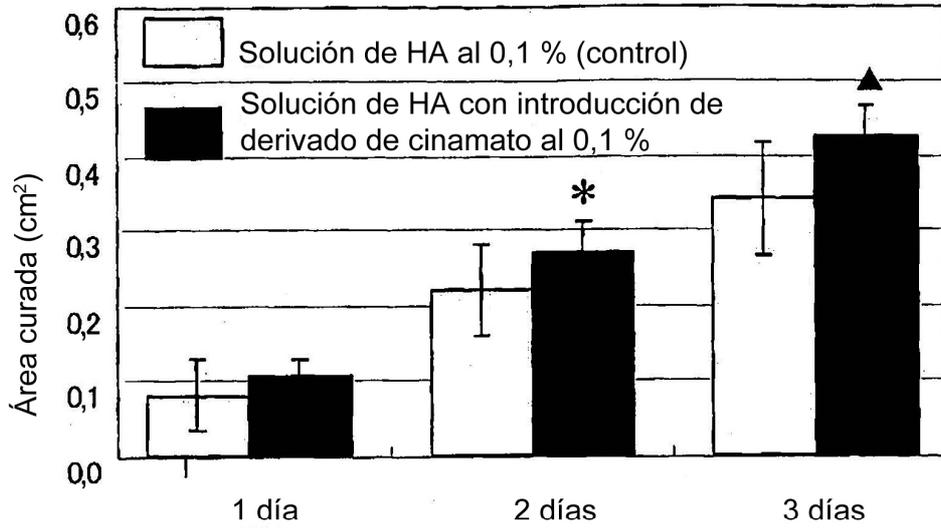
Área curada (n= 14, media ± DE, **: P < 0,01)

Fig. 6



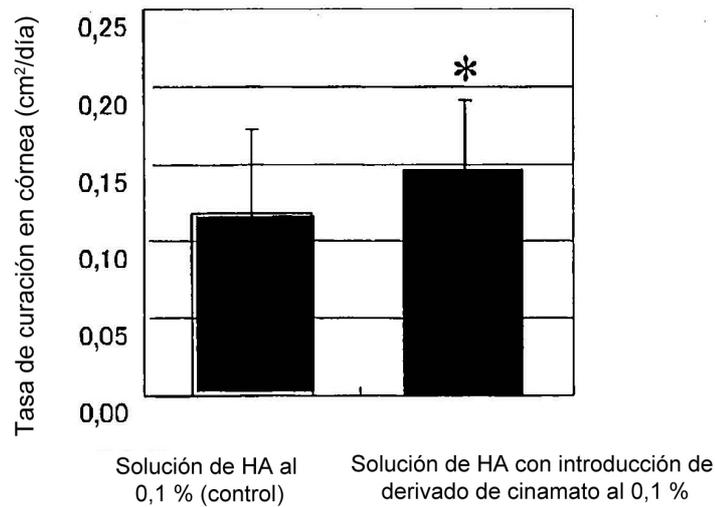
Tasa de curación (n= 42 (n= 14x3 veces), media ± DE, **: P < 0,01)

Fig. 7



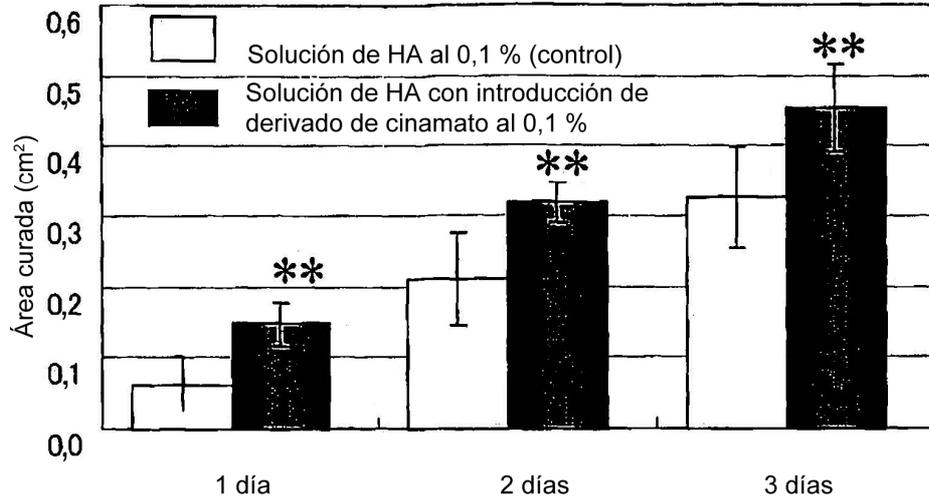
Área curada (N= 8, *: P< 0,05, ▲: P< 0,0556)

Fig. 8



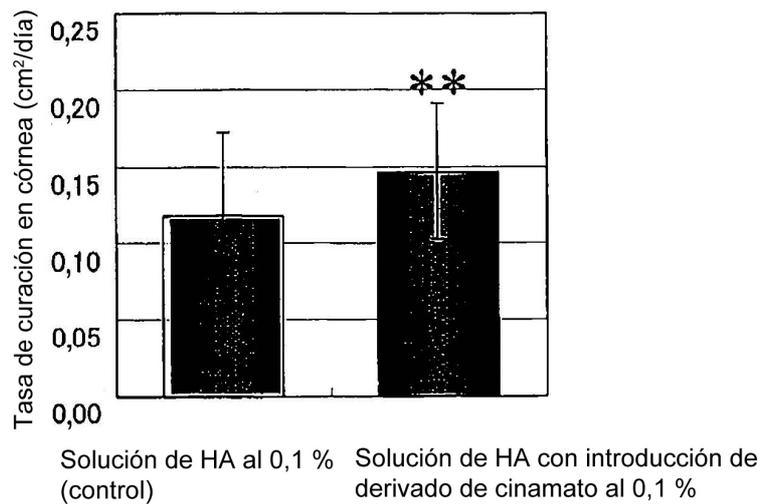
Tasa de curación (n= 24 (n= 8x3 veces), media ± DE, **: P< 0,05)

Fig. 9



Área curada (N= 8, *: P< 0,01)

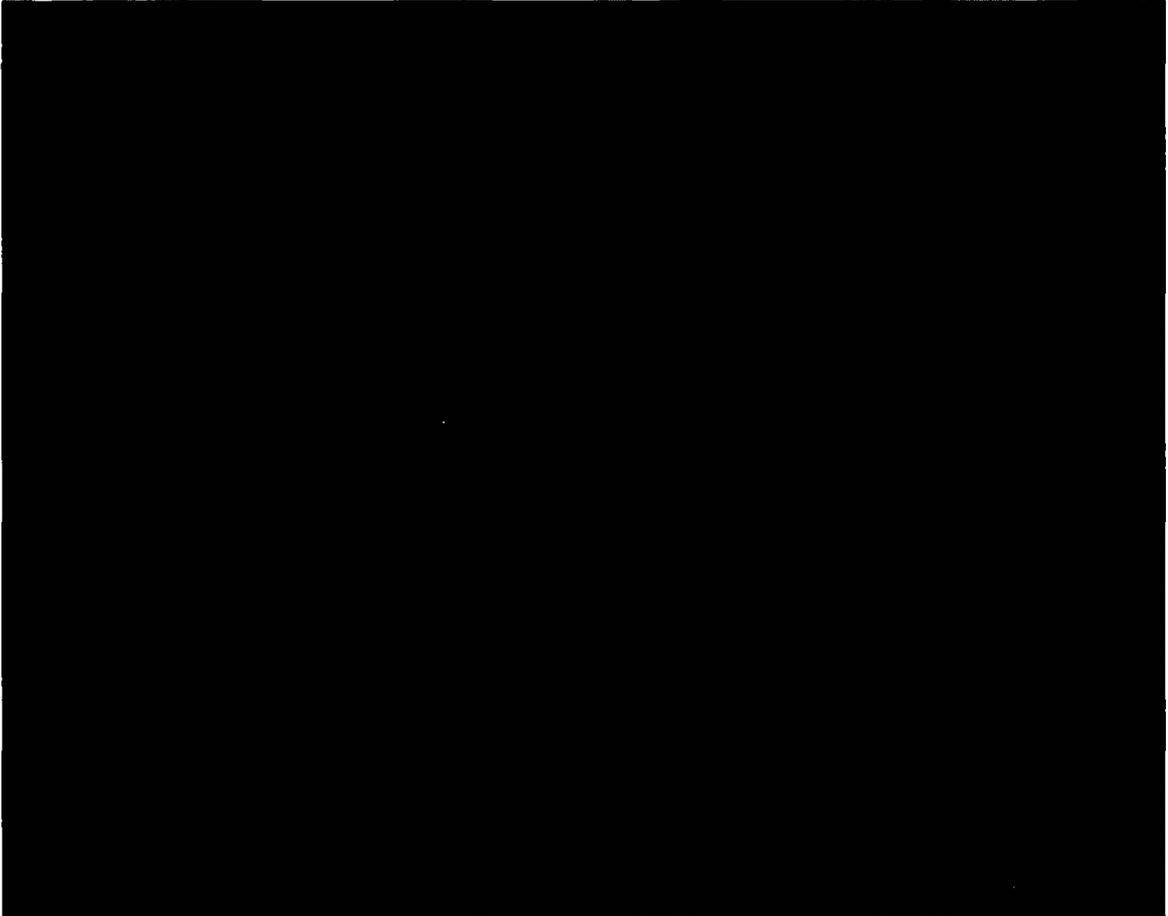
Fig. 10



Tasa de curación (n= 24 (n= 8x3 veces), media ± DE, **: P< 0,01)

Fig. 11

a.

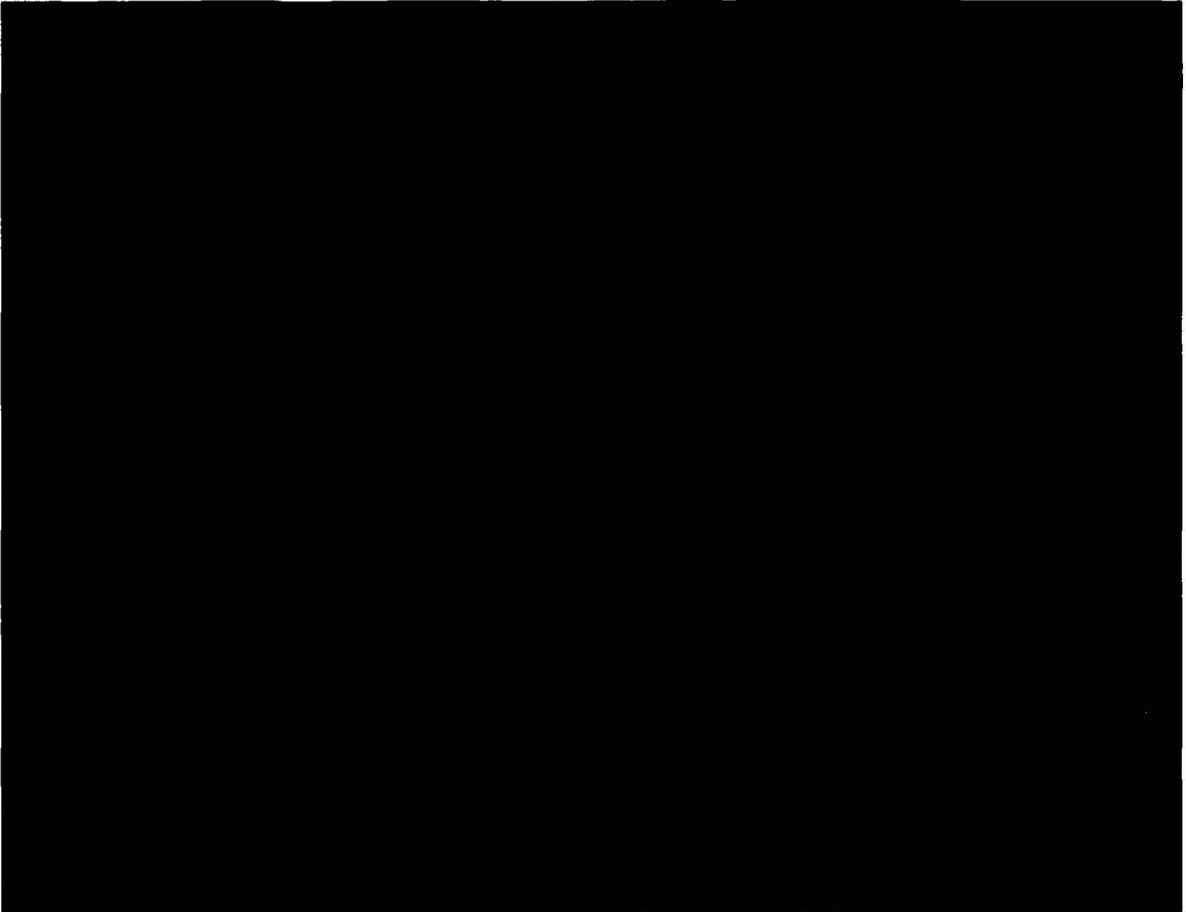


a. solución de HA marcado con fluorescencia al 0,3 %
30 minutos después de la administración

Imágenes de FA: longitud de onda de excitación: 495 nm, longitud de onda
de absorción: 460 m

Fig. 11

b.

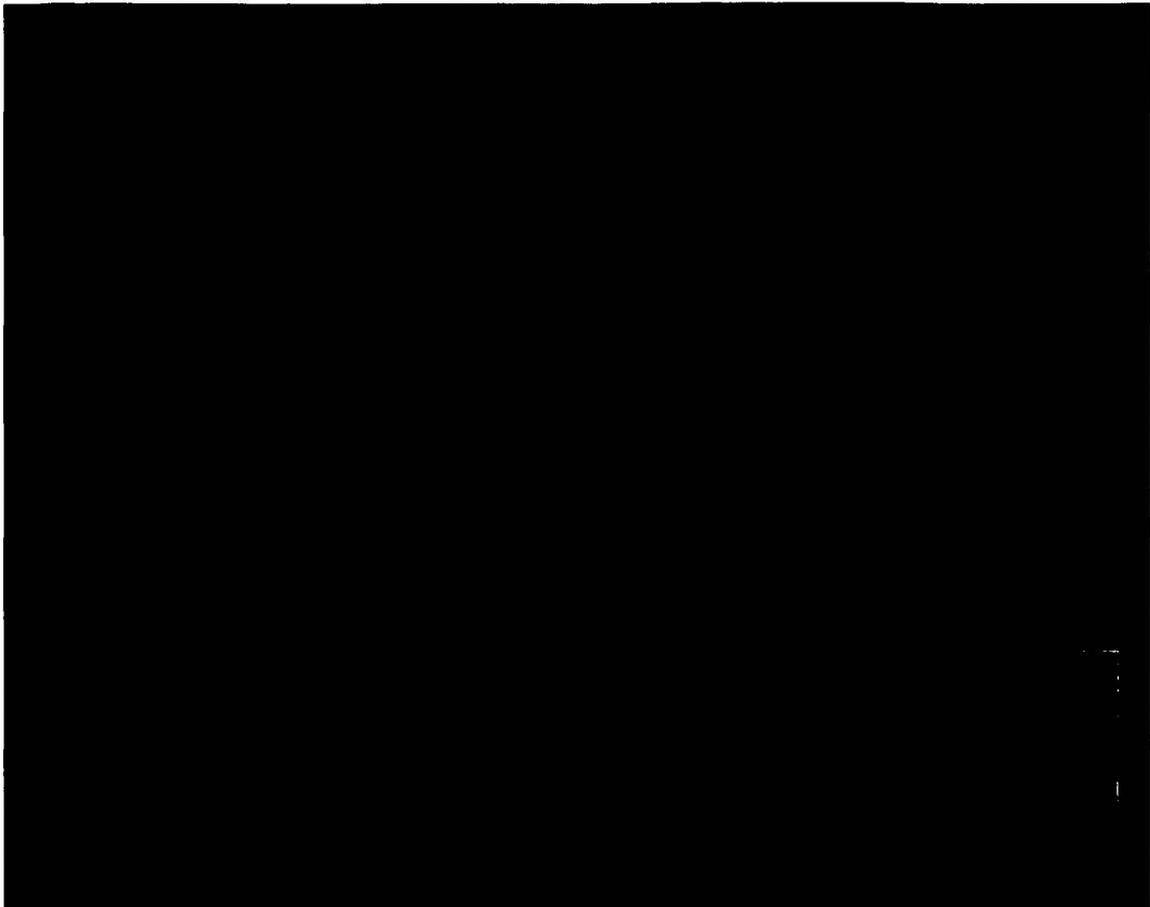


b. solución de HA con introducción de derivado de cinamato marcado
con fluorescencia al 0,3 %
30 minutos después de la administración

Imágenes de FA: longitud de onda de excitación: 495 nm, longitud de onda de absorción: 460 m

Fig. 11

c.

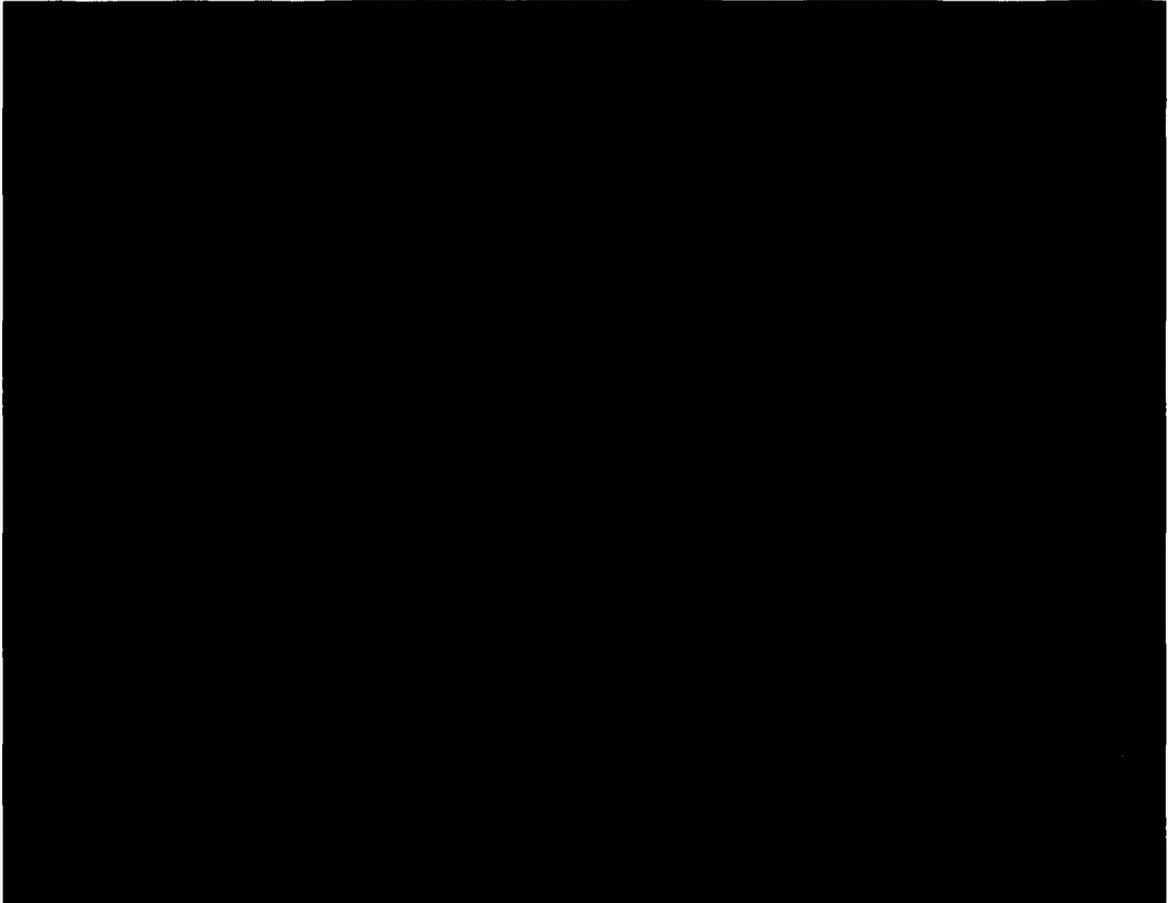


c. solución de HA marcado con fluorescencia al 0,3 %
1 hora después de la administración

Imágenes de FA: longitud de onda de excitación: 495 nm, longitud de onda de absorción: 460 m

Fig. 11

d.

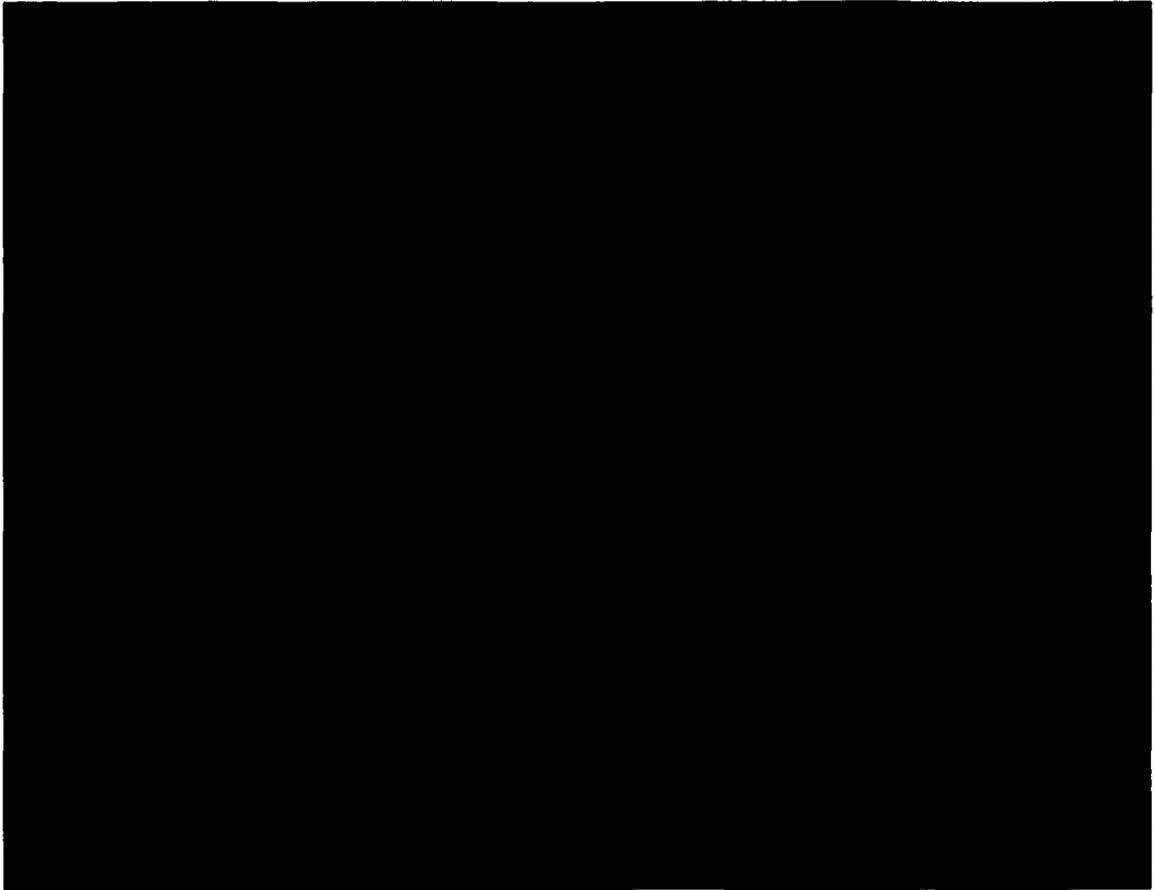


d. solución de HA con introducción de derivado de cinamato
marcado con fluorescencia al 0,3 %
1 hora después de la administración

Imágenes de FA: longitud de onda de excitación: 495 nm, longitud de onda de absorción: 460 m

Fig. 12

a.

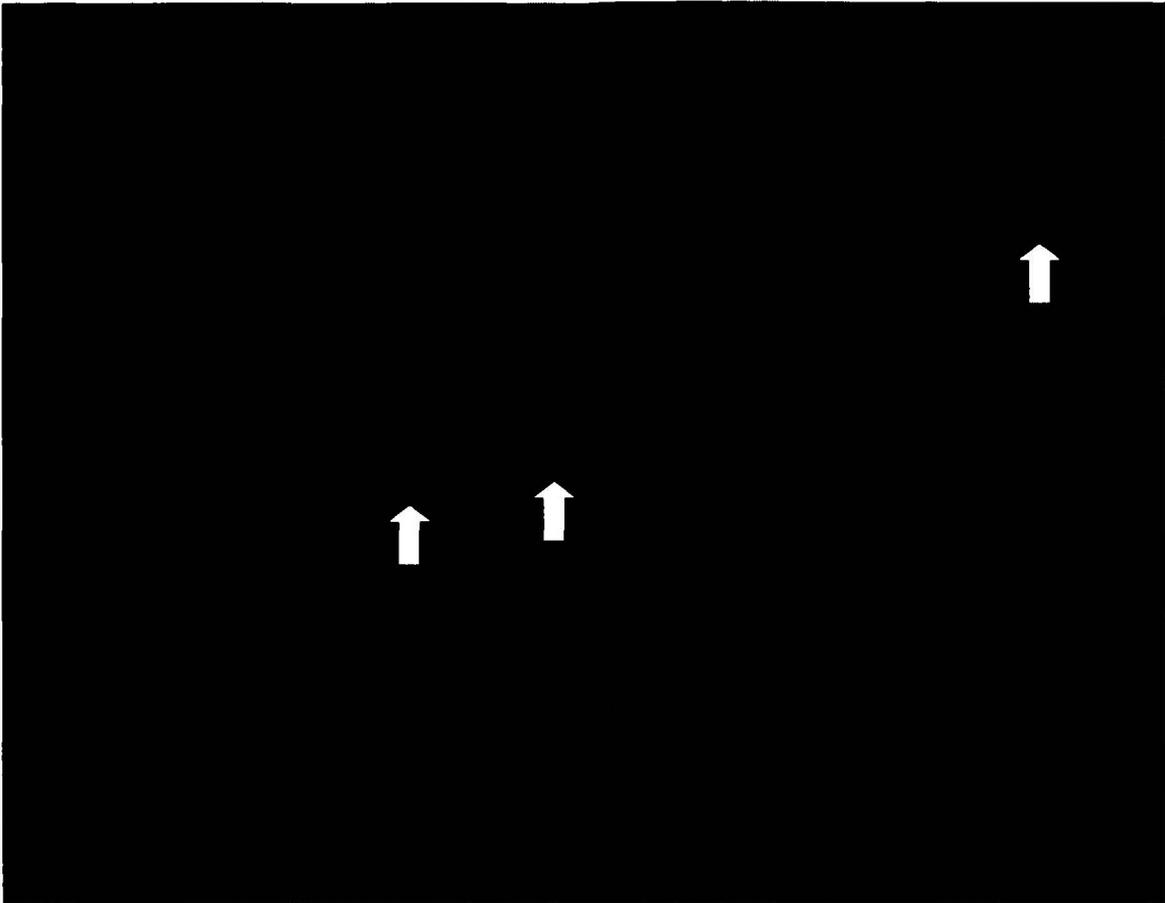


a. solución de HA marcado con fluorescencia al 0,3 %
1,5 horas después de la administración

Imágenes de FA: longitud de onda de excitación: 495 nm, longitud de onda de absorción: 460 m

Fig. 12

b.

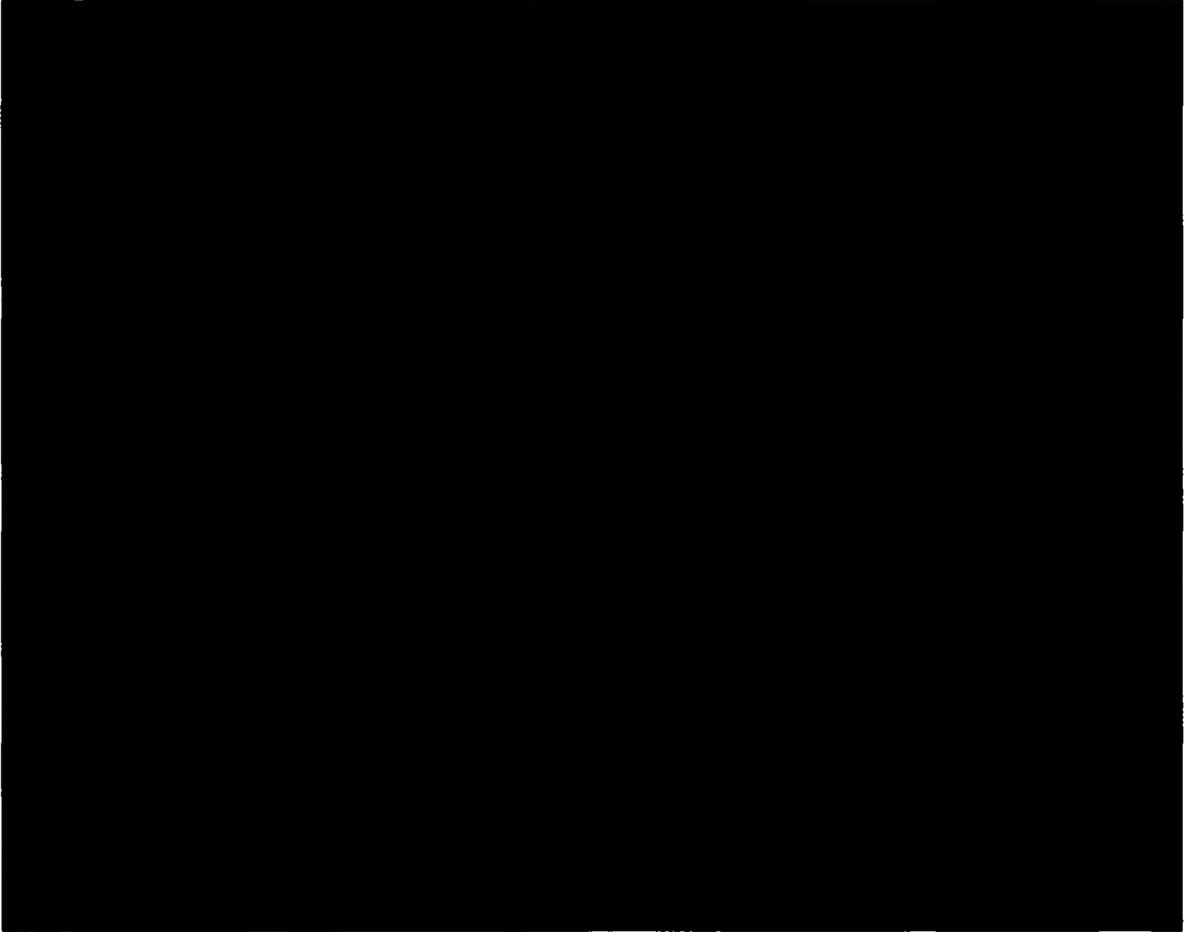


b. solución de HA con introducción de derivado de cinamato marcado
con fluorescencia al 0,3 %
1,5 horas después de la administración

Imágenes de FA: longitud de onda de excitación: 495 nm, longitud de onda de absorción: 460 m

Fig. 12

c.

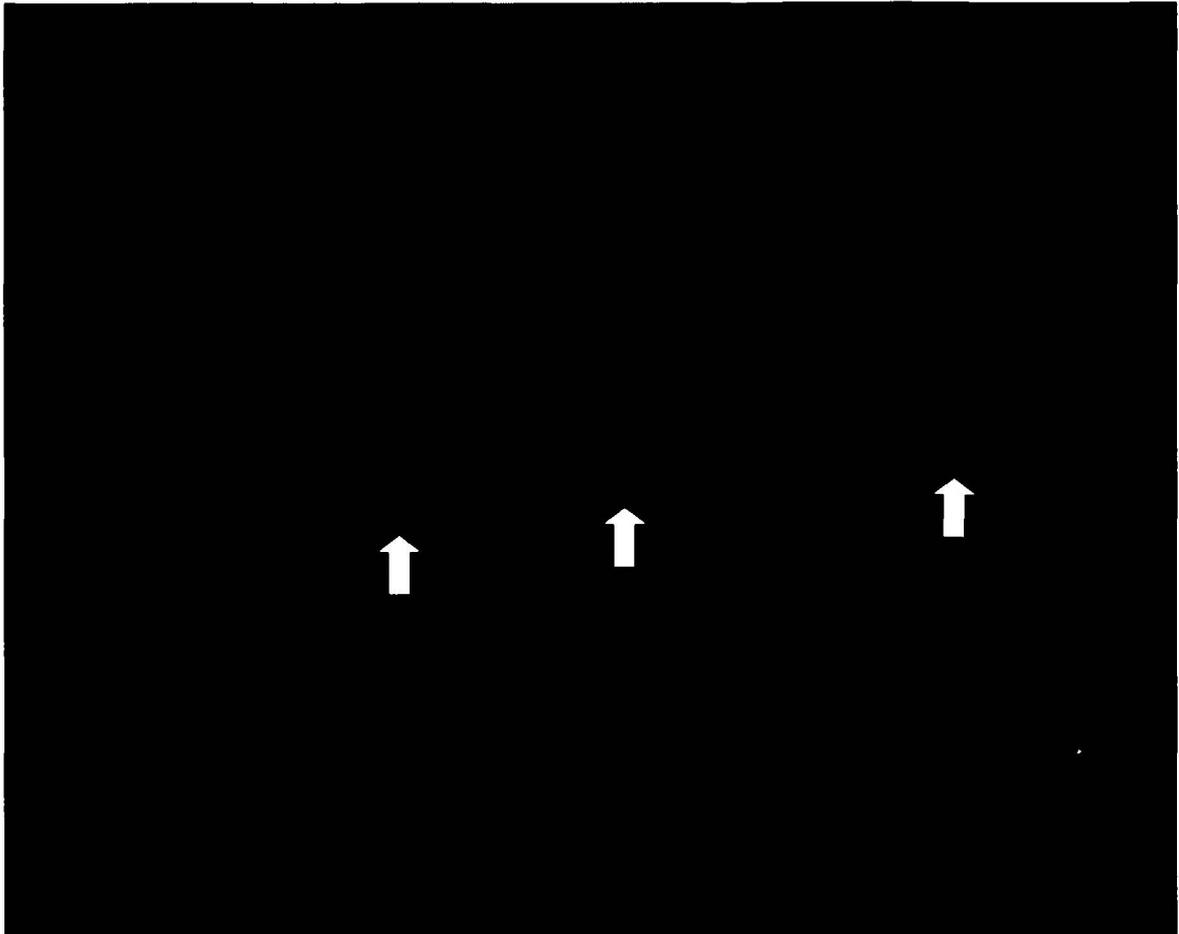


c. solución de HA marcado con fluorescencia al 0,3 %
2,5 horas después de la administración

Imágenes de FA: longitud de onda de excitación: 495 nm, longitud de onda de absorción: 460 m

Fig. 12

d.



d. solución de HA con introducción de derivado de cinamato
marcado con fluorescencia al 0,3 %
2,5 horas después de la administración

Imágenes de FA: longitud de onda de excitación: 495 nm, longitud de onda de absorción: 460 m

Fig. 13

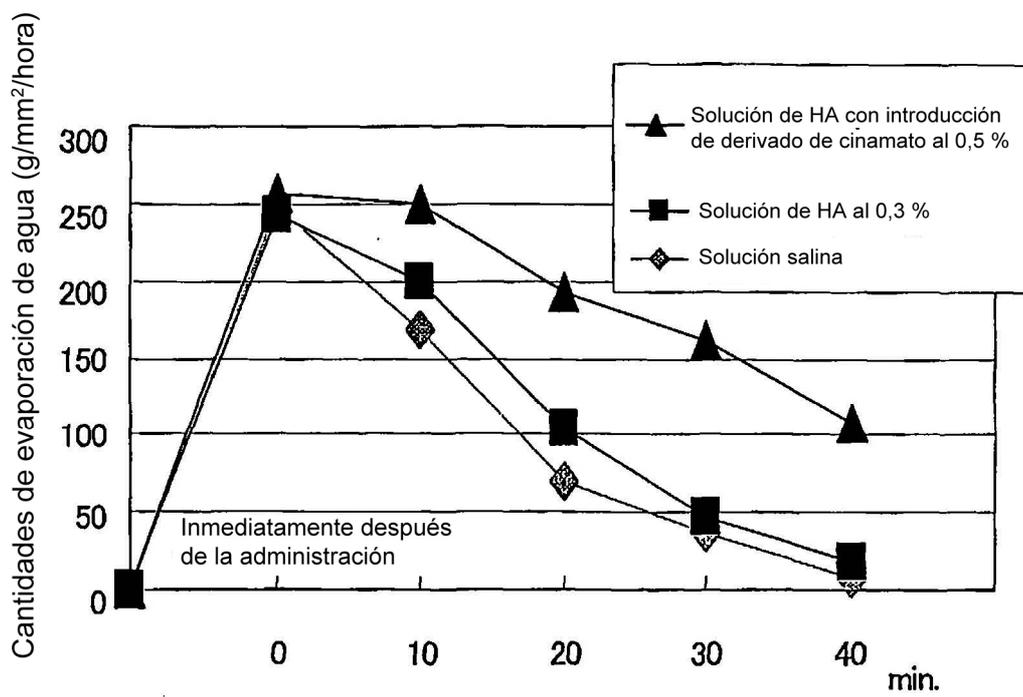
Solución de HA al 0,3 %



Solución de HA con introducción de derivado de cinamato al 0,3 %



Fig. 14



Efecto humectante en la córnea extraída, n= 2

Fig. 15

Efecto humectante en la córnea extraída

Resultados de prueba

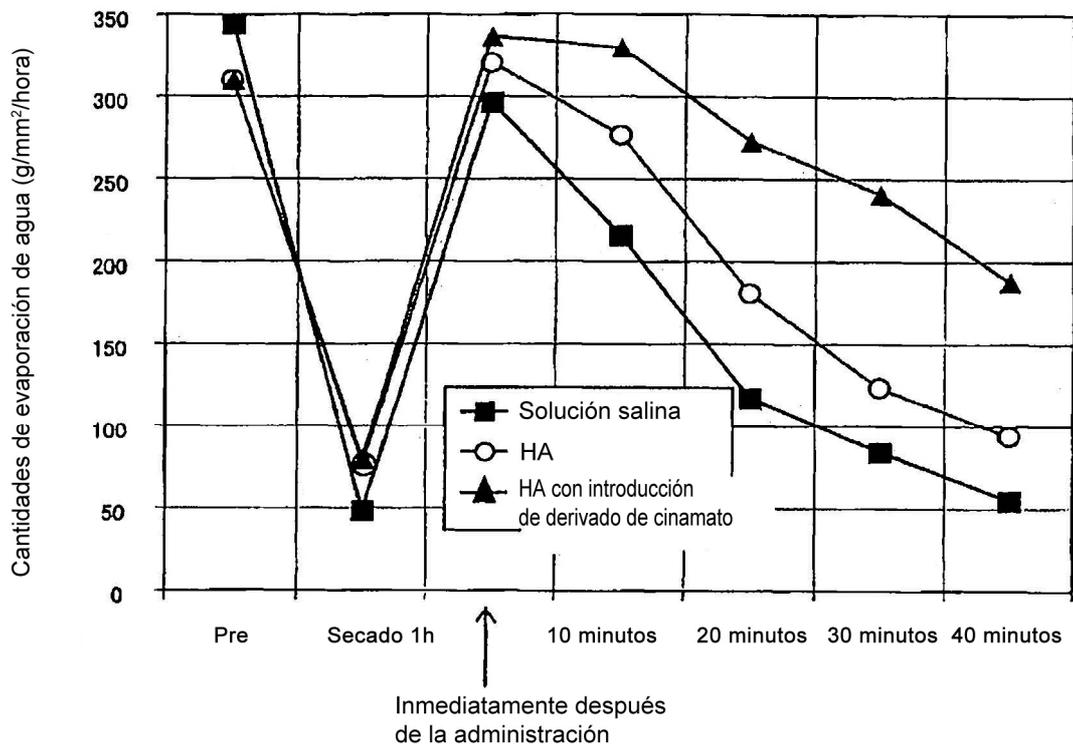
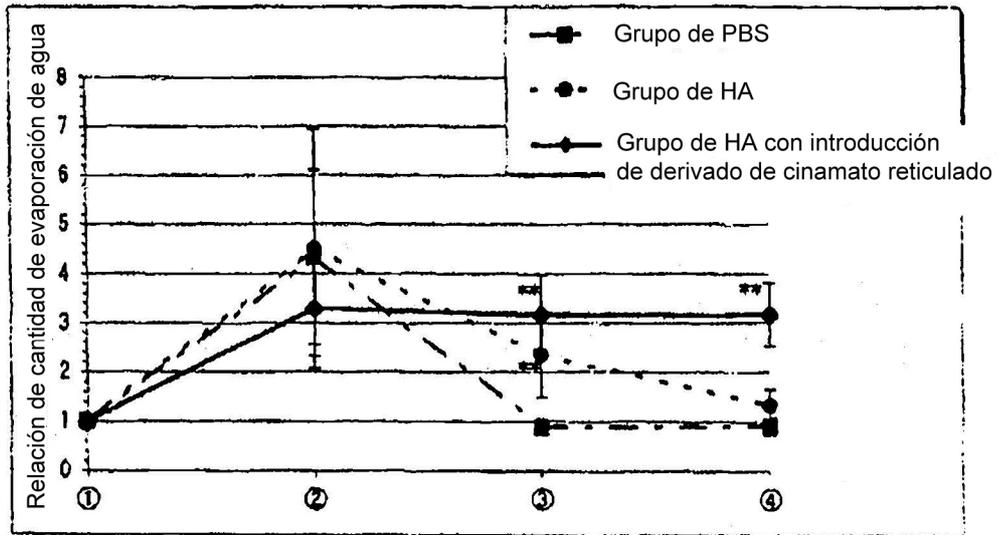
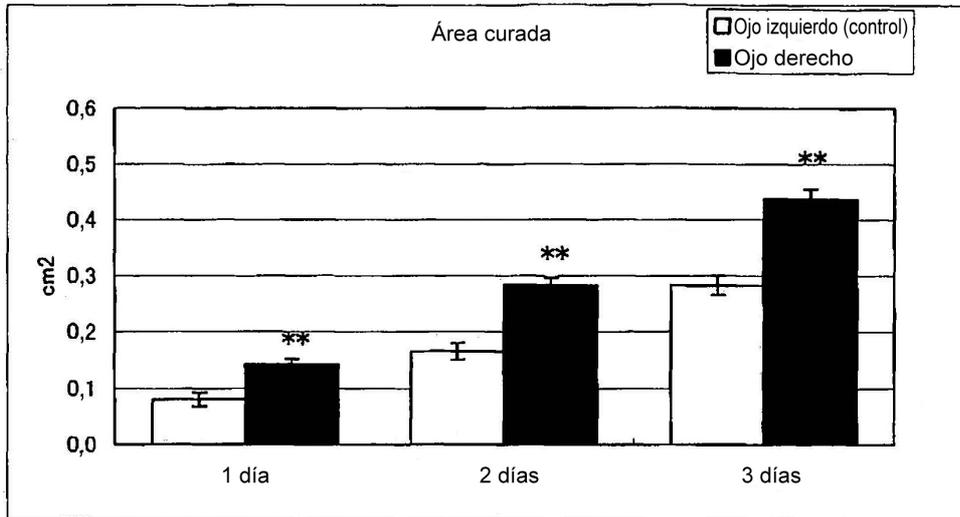


Fig. 16



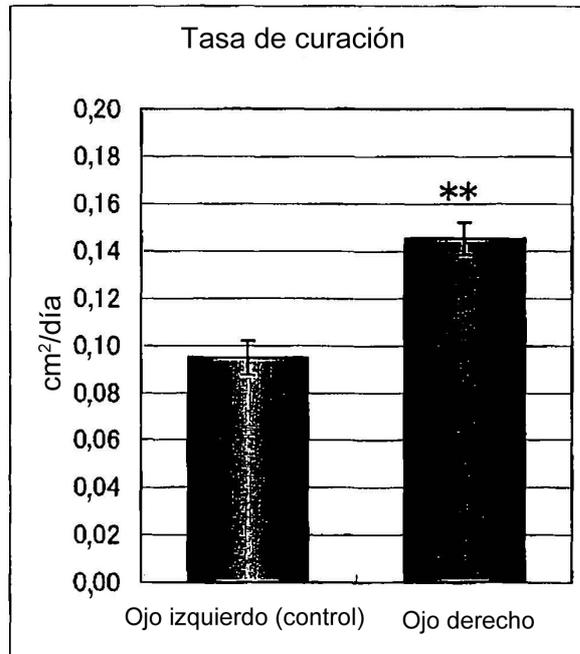
** : $P < 0,01$

Fig. 17



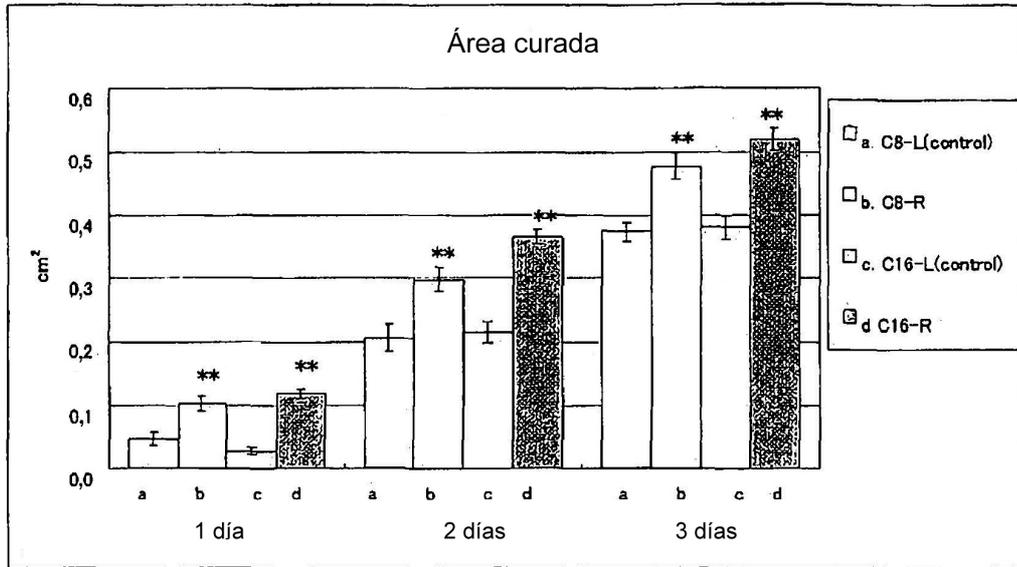
Área curada (n= 14, media ± DE, **: P< 0,01)

Fig. 18



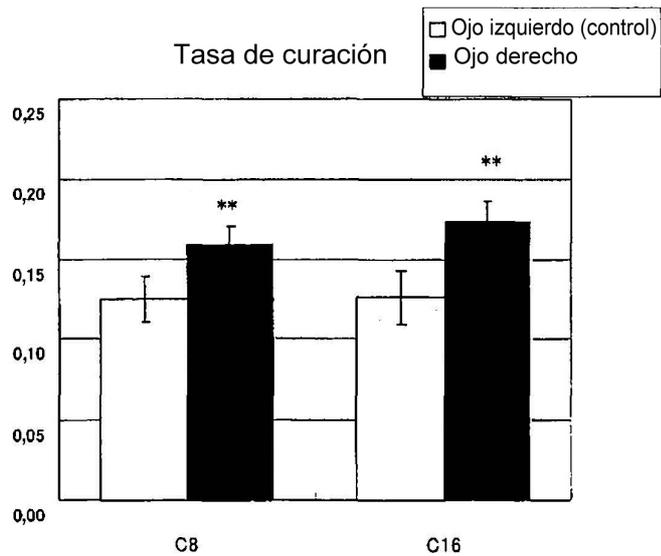
Tasa de curación (n= 42 (n= 14x3 veces), media ± DE, **: P< 0,01)

Fig. 19



Área curada (n= 14, media ± DE, **: P< 0,01)

Fig. 20



Tasa de curación (cm2/día, n= 24 (n= 8x3 veces), media ± DE, **: P< 0,01)