

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 192**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61K 47/02** (2006.01)  
**A61K 47/18** (2007.01)  
**A61K 31/401** (2006.01)  
**A61K 31/728** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.12.2003 PCT/FR2003/003917**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2017 WO04060348**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.12.2003 E 03814501 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 1575558**

54 Título: **Utilización oftálmica y oftalmológica de una base nutritiva compleja en medio acuoso**

30 Prioridad:

**26.12.2002 FR 0216722**

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

**29.12.2017**

73 Titular/es:

**THOREL, JEAN-NOEL (100.0%)  
3 RUE LAROCHELLE  
F-75014 PARIS, FR**

72 Inventor/es:

**THOREL, JEAN-NOËL y  
GATTO, HUGUES**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 648 192 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**

Utilización oftálmica y oftalmológica de una base nutritiva compleja en medio acuoso.

5 La presente invención se refiere al uso oftálmico y oftalmológico de una base nutritiva compleja, tanto en seres humanos como en animales.

10 Por "oftálmico" se entiende una base nutritiva compleja como se define y se describe a continuación que puede ser utilizada en diversas aplicaciones no terapéuticas relacionadas con el ojo en seres humanos o animales, y específicamente en relación con la superficie exterior o la parte exterior de la córnea.

15 Por "oftalmológico" se entiende que la misma base nutritiva compleja se puede aplicar al tratamiento terapéutico o clínico del ojo en seres humanos o animales, y más específicamente en una aplicación, por ejemplo local, en contacto con el exterior de la córnea.

Más en particular, en cuanto a los fines de los usos definidos anteriormente, la presente invención se refiere a composiciones tróficas que comprenden una base nutritiva compleja.

20 Por base nutritiva compleja se entiende cualquier composición o formulación en medio acuoso, como se especifica a continuación, de un medio de cultivo celular, que permite, en general, como este último, un cultivo viable *in vitro* durante al menos 72 horas de un inóculo de ciertas células predeterminadas.

25 Los diferentes medios de cultivo están perfectamente descritos y comercializados. Por lo tanto, en cuanto al cultivo *in vitro* de queratinocitos cabe citar:

- BOYCE ST, HAM RG, Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in defined clonal culture and serum-free serial culture; J. Invest. Dermatol. 1983; 81:335-409;
- BOYCE ST, HAM RG, Cultivation, frozen storage, and clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in serum-free media; J. Tissue Culture Methods 1985; 9:83-93;
- 30 - el medio comercial denominado MCDB 153, comercializado en particular por las empresas IRVINE SCIENTIFIC y GIBCO-BRL;
- los medios comerciales denominados DMEM (medio epidérmico modificado de DUBECO); KSFM de GIBCO-BRL, etc.

35 Tales medios de cultivo incorporan, para ser activos, factores de crecimiento celular y estos factores o bien están incluidos inicialmente en la composición o se producen en el momento del cultivo, por ejemplo, por una capa de nutrientes de fibroblastos, si se trata de un cultivo de queratinocitos.

40 Una base nutritiva compleja, como se considera en la presente invención, no tiene aplicación en el caso del factor de crecimiento, por ejemplo, el EGF (factor de crecimiento epidérmico).

Muchos medios de cultivo ya identificados comprenden extractos biológicos, por ejemplo, de origen animal, celular o de otro origen, es decir se obtienen a partir de un material de partida biológico. Dentro de estos extractos biológicos cabe citar, por ejemplo, cualquier suero de ternera fetal, cualquier extracto de tallo hipofisario de buey.

45 Según su naturaleza, estos extractos tienen una composición variable, o incluso indeterminada.

50 Una base nutritiva compleja, como la considerada de acuerdo con la presente invención no contiene ningún extracto orgánico como se definió anteriormente.

Estos mismos medios de cultivo previamente identificados incluyen, en algunos casos, diferentes principios activos terapéuticos utilizados como medicamentos y para favorecer la conservación y/o la eficiencia del medio de cultivo.

55 Entre estos principios activos se pueden citar determinados antibióticos, tales como penicilina y/o estreptomina, solos o mezclados, algunas hormonas, tales como la toxina colérica, la insulina.

Una base nutritiva compleja, considerada de acuerdo con la presente invención, no contiene ningún ingrediente farmacéuticamente activo.

60 Tales bases de nutrientes complejos en el sentido de que pueden ser utilizadas solas o en combinación con otros componentes, como principio activo o como excipiente, se han descrito en el documento WO 96/21421.

65 Tales bases nutritivas complejas están constituidas en un medio acuoso por al menos una pluralidad de aminoácidos, algunos esenciales, diferentes vitaminas, oligoelementos y sales metálicas.

## ES 2 648 192 T3

De acuerdo con el documento WO 96/21421, una base nutritiva compleja de este tipo tiene, por ejemplo, la siguiente composición según la Tabla 1 mostrada a continuación:

Tabla 1

COMPONENTES	Concentración en mg/ml
Agua	c.s.p.
<u>Aminoácidos</u>	
L-Alanina	9,2
L-Arginina HCl	421,4
L-Asparagina (anhidra)	14,2
Ácido L-aspártico	4,0
L-Cisteína HCl · H <sub>2</sub> O	42,0
Ácido L-glutámico	14,8
L-Glutamina	1.754,4
Glicina	7,6
L-Histidina HCl · H <sub>2</sub> O	50,0
L-Isoleucina	6,0
L-Leucina	131,2
L-Lisina HCl	54,0
L-Metionina	13,5
L-Fenilalanina	10,0
L-Prolina	34,6
L-Serina	126,1
L-Treonina	24,0
L-Triptófano	9,3
L-Tirosina 2 Na 2H <sub>2</sub> O	11,7
L-Valina	70,3
<u>Vitaminas</u>	
d-Biotina	0,02
Ácido fólico	0,80
Nicotinamida	0,04
D-Pantotenato Ca	0,30
Piridoxina HCl	0,06
Riboflavina	0,04
Tiamina HCl	0,30
i-Inositol	18,0
Piruvato de sodio	55,0
Timidina	0,73
Adenina (HCl)	24,0
Ácido DL-lipoico	0,20
<u>Componentes inorgánicos</u>	
Cloruro de sodio	6.800,0
KCl	112,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	284,0
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,003
Acetato sódico	300,00
D-Glucosa	1.080,0
HEPES (piperazina)	6.600,0
Fosforiletanolamina	0,06768
Etanolamina	0,04684
Sulfato sódico	3,4
Bicarbonato sódico	1.160,0
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,39
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	120,0
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	De 13,0 a 22,05
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,144
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MO <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,00120
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,142

COMPONENTES	Concentración en mg/ml
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,00002
SnCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,00011
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	0,00057

En el documento WO 02 087326 se describe y proporciona una composición oftálmica u oftalmológica que comprende un derivado de vitamina, como agente de tensioactivo no iónico y un agente conservante catiónico, por ejemplo, polihexametilen biguanida, y un agente desinfectante, por ejemplo, peróxido de hidrógeno. Esta composición tiene esencialmente propiedades limpiadoras y desinfectantes, pero no de regeneración a nivel de la córnea.

En el documento US 5.654.266, se describe y proporciona una composición básicamente salina y tamponada para la conservación y enjuague de tejidos antes de un trasplante, tales como en las córneas destinadas a ser injertadas. La composición propuesta comprende principalmente  $\beta$ -hidroxi-butarato, que reduce la producción y acumulación de ácido láctico en los tejidos almacenados.

En el documento EP 0517970 se describe y proporciona una solución para la irrigación intraocular de las cámaras anterior y posterior del ojo en el contexto de la cirugía ocular, con propiedades reparadoras exclusivamente del endotelio corneal, es decir, en la cámara anterior del ojo.

En el documento JP 02 083318 se describe una composición limpiadora del ojo que comprende sales de amonio cuaternario, sulfato sódico de condroitina y ácido glicirretínico, así como alcoholes, incluyendo propilenglicol.

En el documento WO 026495 se describe una composición de limpieza de una lente de contacto, especialmente para su impregnación, que comprende vitaminas, y cuyo objetivo es liberar dicha composición en contacto con la córnea a partir de la lente de contacto impregnada.

El documento US 6 194 457 B1 describe y proporciona una solución para tratar la irritación, la sequedad de ojo y/o para tratar las cataratas, que comprende aminoácidos, vitaminas, oligoelementos, sales metálicas, cisteína, excluyendo en especial cualquier factor de crecimiento celular o compuesto que favorezca la cicatrización.

La presente invención tiene por objeto el uso oftálmico u oftalmológico de una base nutritiva compleja como se define anteriormente, por ejemplo mediante una composición trófica que comprende dicha base, en particular, para mejorar la viabilidad, por ejemplo en el caso de agresión o estrés, y mantener la integridad y el equilibrio de las células epiteliales de la córnea del ojo, en los seres humanos o en animales.

Más particularmente, la presente invención tiene por objeto un tal uso para mejorar la viabilidad, el crecimiento y la diferenciación de las células del epitelio corneal, en los seres humanos o en animales.

De acuerdo con la presente invención, la composición trófica en medio acuoso que puede aplicarse comprende:

- una base nutritiva compleja, constituida al menos por una pluralidad de aminoácidos, vitaminas, oligoelementos y sales metálicas, excluyendo dicha base cualquier factor de crecimiento celular, cualquier extracto biológico de origen animal o celular y cualquier principio activo terapéutico, penicilina, estreptomina, la toxina colérica y la insulina para obtener un medicamento oftalmológico o una solución oftalmológica, formulada para una aplicación en contacto con el exterior del ojo en los seres humanos o en animales, donde el medicamento oftalmológico o la solución oftalmológica consiste en una composición trófica en medio acuoso que comprende la base nutritiva compleja, un inhibidor de las colagenasas del epitelio corneal de los seres humanos o animales, seleccionado entre cisteína, N-acetil cisteína y la sal de calcio del EDTA y un promotor de la síntesis de nuevo colágeno que es prolina o hidroxiprolina.

Preferiblemente, la composición trófica se formula con la base nutritiva compleja para proporcionar un pH entre 7,3 y 7,5, y una osmolaridad comprendida entre 300 y 350 mOsm.

Se conocen diferentes inhibidores funcionales y/o químicos de la colagenasa, haciéndose referencia en particular a los siguientes documentos:

- Berman; Int. Ophtalmol. Clin. 1975 Winter; 15(4): 49-66
- Haffner JC, Fecteau KA, Eilet H, Vet. Ophtalmol. 2003 Mar; 6(1): 67-72.

Se conocen diferentes promotores de la síntesis de nuevo colágeno, haciéndose referencia en particular a los siguientes documentos:

- Bellon G, Monboisse JC, Fandoux A, Borel JP, Biochim. Biophys. Acta. 1987, Aug 19, 930 (1): 39-47
- Kefalides NA, Cameron JD, Tomichack EA, Yanoff M, J Biol Chem. 1976, Feb 10; 251(3): 730-3.

Según la invención, la composición trófica tiene ventajosamente las siguientes características, siendo consideradas estas últimas solas o en combinación:

- 5 - el inhibidor de las colagenasas es la N-acetil cisteína,
- el inhibidor de las colagenasas representa como máximo el 5 % y preferiblemente entre 0,05 y 0,5 % en peso de dicha composición;
- el promotor de la síntesis de nuevo colágeno representa como máximo 0,5 % y preferiblemente 0,004 % en peso de dicha composición;
- 10 - la composición trófica comprende ácido hialurónico y/o una sal de ácido hialurónico, en una proporción total en peso de la composición, de como máximo 0,1 % y preferiblemente igual a 0,07 %;
- la composición trófica comprende un conservante, en una proporción en peso de la composición, de no más de 0,0001 %;
- el conservante es polihexanida o polihexametilen biguanida (PHMB);
- 15 - la composición trófica tiene la fórmula descrita en la Tabla 2 de la memoria descriptiva.

En comparación con la composición de acuerdo con la Tabla 1, la composición de acuerdo con la Tabla 2 difiere de esta última en los siguientes puntos:

- 20 - no comprende vitamina B12, putrescina 2HCl, ni  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$
- comprende un inhibidor de la colagenasa ni un promotor de la síntesis de nuevo colágeno
- sus características de pH y osmolaridad permiten la oxigenación del epitelio corneal y la actividad lisozima de las lágrimas.

25 La presente solicitud describe igualmente el uso de una composición trófica como se describió anteriormente como un medicamento en oftalmología o contactología, en los seres humanos o animales, mediante la aplicación, por ejemplo, local en contacto con exterior de la córnea.

30 La invención se refiere igualmente a un medicamento tal, en forma líquida, o en forma seca, es decir, para la reconstitución con un medio acuoso.

En una variante, un medicamento tal está en forma líquida, por ejemplo, en forma de gotas o de lágrimas regeneradoras o de colirio o de solución.

35 Por lo tanto, a modo de ejemplo, la presente invención proporciona un colirio que comprende una composición trófica como se definió anteriormente, para cicatrizar la córnea, o para prevenir las adherencias conjuntivales.

Un colirio tal tiene las siguientes indicaciones:

- 40 - ulceraciones corneales de origen traumático o de otro origen, quemaduras corneales;
- prevención de adherencias conjuntivales y corneo-conjuntivales (simbléfaron);
- xerosis conjuntival y corneal.

45 La invención se refiere igualmente a una solución oftalmológica, por ejemplo, de confort, para la aplicación tópica en contacto externo de la córnea en los seres humanos o en animales, que comprende por ejemplo una composición trófica como se definió anteriormente.

50 Por lo tanto, la presente invención proporciona, por ejemplo, "lágrimas regeneradoras", que comprenden una composición trófica como se definió anteriormente, para la hidratación de lentes de contacto y la regeneración de la córnea, en los seres humanos o en animales.

Tales "lágrimas regeneradoras" eventualmente lubrican la córnea. En última instancia, evitan o limitan la erosión prematura de la córnea en presencia de lentes de contacto, rígidas o semi-rígidas en particular. Y estas "lágrimas regeneradoras" mejoran el confort visual y aumentan el potencial tiempo de uso de las lentes de contacto.

55 Por lo tanto, la presente invención proporciona, por ejemplo, gotas de confort para los siguientes usos:

- sequedad ocular iatrogénica (relacionada en particular con el uso de retinoides tópicos o sistémicos, antihistamínicos, antiparkinsonianos, betabloqueantes, espasmolíticos, ansiolíticos, neurolépticos, antidepresivos y broncodilatadores, etc.), y que causan molestias, especialmente en los pacientes que llevan lentes de contacto;
- 60 - sequedad ocular en personas de edad avanzada.

La presente solicitud describe igualmente el uso de una base nutritiva compleja como se ha definido anteriormente para el tratamiento de, por ejemplo, el mantenimiento de piezas o prótesis, por ejemplo lentes de contacto, destinadas a entrar en contacto con el exterior de la córnea ocular, en los seres humanos o en animales.

65

En este sentido, se refiere a una solución para el mantenimiento o el almacenamiento, o el transporte o la aplicación (por ejemplo, quirúrgica) de piezas o prótesis, por ejemplo, lentes de contacto, por ejemplo, destinadas a entrar en contacto con el exterior de la córnea ocular, en los seres humanos o en animales.

- 5 Gracias a una base nutritiva compleja como se define anteriormente, y en particular a una composición trófica de acuerdo con la presente invención, y como se ha demostrado por los estudios descritos a continuación, las propiedades intrínsecas primarias del epitelio corneal se conservan de forma permanente, aumentando su resistencia a las agresiones, y favoreciendo, en su caso, su vuelta al estado de equilibrio.
- 10 La presente invención se describe ahora y se ilustra, a partir de una composición trófica en medio acuoso, que tiene la fórmula de la Tabla 2.

Tabla 2

N.º LÍNEA	DENOMINACIÓN SEGÚN LA NOMENCLATURA INTERNACIONAL DE INGREDIENTES COSMÉTICOS (NOMBRE INCI)	CONCENTRACIÓN en mg/ml
1	AGUA	c.s.p.
2	CLORURO SÓDICO	6.800
3	GLUTAMINA	1.754,4
4	BICARBONATO SÓDICO	1.160
5	GLUCOSA	1.080
6	ARGININA HCL	421,4
7	ACETATO SÓDICO	300
8	FOSFATO DISÓDICO	284
9	LEUCINA	131,2
10	SERINA	126,1
11	CLORURO DE Mg	120,0
12	CLORURO DE K	112
13	VALINA	70,3
14	PIRUVATO SÓDICO	55

N.º LÍNEA	DENOMINACIÓN SEGÚN LA NOMENCLATURA INTERNACIONAL DE INGREDIENTES COSMÉTICOS (NOMBRE INCI)	CONCENTRACIÓN en mg/ml
15	LISINA HCL	54
16	HISTIDINA HCL	50
17	CISTEÍNA HCL	42
18	ADENINA	24
19	TREONINA	24
20	CLOURO DE Ca	20,05
21	INOSITOL	18
22	ÁCIDO GLUTÁMICO	14,8
23	ASPARAGINA	14,2
24	METIONINA	13,5
25	TIROSINA	11,7
26	FENILALANINA	10,0
27	TRIPTÓFANO	9,3

N.º LÍNEA	DENOMINACIÓN SEGÚN LA NOMENCLATURA INTERNACIONAL DE INGREDIENTES COSMÉTICOS (NOMBRE INCI)	CONCENTRACIÓN en mg/ml
28	ALANINA	9,2
29	GLICINA	7,6
30	ISOLEUCINA	6,0
31	ÁCIDO ASPÁRTICO	4,0
32	SULFATO SÓDICO	3,4
33	SULFATO FERROSO	0,003
34	ÁCIDO FÓLICO	0,8
35	TIMIDINA	0,73
36	CIANOCOBALAMINA	0,41
37	PANTOTENATO DE CALCIO	0,3
38	TIAMINA HCL	0,3
39	ÁCIDO TIÓCTICO	0,3
40	SULFATO DE ZINC	0,144
41	SILICATO SÓDICO	0,142
42	PIRIDOXINA HCL	0,06
43	NIACINAMIDA	0,04
44	RIBOFLAVINA	0,3
45	BIOTINA	0,02
46	SULFATO DE COBRE	0,003

N.º LÍNEA	DENOMINACIÓN SEGÚN LA NOMENCLATURA INTERNACIONAL DE INGREDIENTES COSMÉTICOS (NOMBRE INCI)	CONCENTRACIÓN en mg/ml
47	MOLIBDATO DE AMONIO	0,00120
48	VANADATO DE AMONIO	0,003
49	CLORURO DE Mn	0,00002
50	HIALURATO DE SODIO	70
51	POLIHEXANIDA o POLIHEXAMETILEN BIGUANIDA	0,1
52	N-ACETIL-CISTEÍNA	500
53	HIDROXIPROLINA o PROLINA	35

De acuerdo con la definición según la presente invención de la composición trófica, los ingredientes en un medio acuoso de la base nutritiva compleja son aquellos numerados del 1 al 49, mientras que los ingredientes del 50 al 53 se consideran externos a la base nutritiva compleja y permiten su adaptación a un contacto externo con el epitelio de la córnea del ojo.

Los ingredientes 50 y 51 son opcionales, dependiendo de la función o la función deseada para la composición trófica.

Además, la elección y proporciones de los diversos ingredientes se definen para establecer la composición trófica finalmente obtenida:

- un pH comprendido entre 7,3 y 7,5 y preferiblemente comprendido entre 7,42 y 7,45 (pH que favorece la oxigenación del epitelio corneal y la actividad lisozima de las lágrimas).
- una osmolaridad comprendida entre 300 y 350 mOsm, por ejemplo, igual a 340 mOsm.

#### Estudio N° 1

Se evalúa la biocompatibilidad de la composición trófica como se ha definido anteriormente en un modelo de epitelio corneal humano reconstituido.

De la fórmula de la Tabla 2, se define y formulan de cuatro variantes, denominadas respectivamente:

- EVE 1: sin hialuronato sódico (ingrediente 50) y sin conservante (ingrediente 51).
- EVE 2: sin hialuronato sódico (ingrediente 50) y con conservante (ingrediente 51).
- EVE 3: con hialuronato sódico (ingrediente 50) y sin conservante (ingrediente 51).
- EVE 4: idéntica a la fórmula de la Tabla 2, y por lo tanto con hialuronato sódico (ingrediente 50) y con conservante (ingrediente 51).

Se hacen ajustes menores del resto de los ingredientes para mantener el pH y la osmolaridad en los valores indicados anteriormente.

La citocompatibilidad de las fórmulas EVE 1 a EVE 4 se evaluó mediante la aplicación tópica en un modelo in vitro de epitelio corneal humano reconstruido, como el disponible de la Compañía SKINETHIC LABORATORIES, 45 Rue de Saint Philippe, 06000 Niza, Francia.

Roger W. BEUERMAN y Lia PEDROSA describen, en detalle, la ultraestructura de la córnea humana, en un artículo titulado "Ultra-structure of the human cornea", en la revista "Microscopy Research and Technique", 33: 320-335 (1996) y a la que se hará referencia cuando sea necesario.

A partir de la estructura natural, O. DOUCET et al. han propuesto y descrito un epitelio corneal humano, tridimensional, reconstruido, en particular para la realización de diferentes ensayos de toxicidad in vitro; véase el artículo titulado "A new in vitro human epithelium model for assessing the eye irritation potential of formulated cosmetics products", publicado en "In Vitro and Molecular Toxicology", 11, 4: 273-283 (1998).

Este epitelio corneal reconstruido o remodelado, se obtiene mediante el cultivo de células epiteliales de la córnea, por ejemplo, la línea de HCE, disponible y comercializada por LSU Eye Center, Louisiana State University School of Medicine, Nueva Orleans, Luisiana, EE.UU. 70112. Las células epiteliales se cultivan en la interfase aire/líquido en

un medio definido y forman un tejido epitelial corneal, que carece de estrato córneo, asemejándose así al epitelio corneal in vivo.

5 El estudio se realizó en tales epitelios corneales reconstruidos, tales como los obtenidos el 5º día de cultivo (tamaño: 0,5 cm<sup>2</sup>) y el control de calidad de los diversos epitelios en las diferentes etapas de cultivo fue realizado por la empresa SKINETHIC LABORATORIES, anteriormente mencionada, de acuerdo con la última publicación citada.

10 El principio de la prueba consiste en aplicar la composición trófica en contacto directo con el epitelio corneal reconstruido, 15 minutos tres veces al día durante un período de 7 días. En paralelo se lleva a cabo un control de epitelio corneal no tratado. Cada condición (excepto para el control no tratado) se lleva a cabo por duplicado. Al 2º, 4º y 7º día del experimento, la viabilidad celular (ensayo MTT) se evalúa para cada condición.

15 En la práctica, se depositan 30 µl de composiciones tróficas a ensayar tres veces al día (a las 9 h, a las 13 h y a las 17 h), directamente sobre la superficie de los equivalentes corneales, durante 15 minutos. Después de este tiempo de contacto, la composición en exceso se elimina y los epitelios se mantienen en incubación a 37 °C en una atmósfera húmeda, 5 % de CO<sub>2</sub>. Esta operación se repite todos los días durante 7 días. Al 2º, 4º y 7º día del experimento, los epitelios reconstruidos se recogen para el ensayo de viabilidad celular.

20 Al 2º, 4º y 7º día del experimento, los epitelios recogidos se aclaran con PBS y se colocan en 300 µl de MTT (0,5 mg/ml). Después de 3 horas de incubación a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, los epitelios se transfieren a 1,5 ml de isopropanol. La extracción del producto de escisión de MTT se lleva a cabo con agitación suave, durante 2 horas a temperatura ambiente. La densidad óptica a 570 nm se midió a continuación en 200 µl de solución de extracción. Los resultados se expresan en porcentaje de viabilidad en comparación con el control (sin tratar):

25  $\% \text{ de viabilidad} = [\text{DO}_{(570 \text{ nm producto ensayado})} / \text{DO}_{(570 \text{ nm control})}] \times 100$

30 En las condiciones experimentales así definidas, se observa una conservación total de la viabilidad in vitro de los epitelios de córnea humana reconstruidos, después de la aplicación tópica de cada una de las composiciones tróficas mencionados. La presencia del conservante y del ácido hialurónico a las concentraciones de uso como se define no afecta a la viabilidad celular de los epitelios.

### Estudio N.º 2

35 Poniendo en cultivo un epitelio de córnea humana reconstruido en composiciones tróficas como las definidas anteriormente, se comparan los resultados obtenidos en relación con los obtenidos mediante el cultivo en una solución salina tamponada.

40 El modelo de epitelio corneal utilizado es el mismo que el descrito y definido en el estudio N.º 1, cultivado durante 72 horas en la composición trófica estudiada.

Para este estudio se selecciona una única composición trófica, concretamente, la definida por la Tabla 2, denominada EVE 4 en el Estudio N.º 1.

45 Tras la recepción de los epitelios, el medio de nutrientes de transporte SKINETHIC es eliminado y reemplazado por uno de los epitelios, con 1 ml de la composición trófica estudiada. Se coloca un segundo epitelio para comparación en una solución salina tamponada (solución salina tamponada con fosfato, enriquecida en Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>). La citocompatibilidad de la composición trófica estudiada se ha verificado previamente (ausencia de efecto citotóxico, ver estudio anterior N.º 1). Los epitelios se mantienen en incubación a 37 °C en una atmósfera húmeda, 5 % de CO<sub>2</sub>.

50 Los medios se renuevan cada día. Después de 3 días de cultivo, los 2 epitelios reconstruidos se recogen para realizar un análisis histológico. Se fijan con solución de formaldehído al 10 % y se incluyen en parafina. Los cortes histológicos teñidos con hematoxilina/eosina se evaluaron mediante microscopía óptica.

55 La interpretación histopatológica de los cortes tiene en cuenta el espesor y la regularidad del tejido epitelial, así como la morfología, la cohesión y la capacidad de las células para proliferar.

60 En cuanto al epitelio cultivado durante 72 h en la composición trófica, el análisis de la muestra presenta un epitelio implantado en el soporte de la membrana. Este comprende de 6 a 7 capas de células contiguas (los puntos de unión son visibles). No hay signos de necrosis ni de queratinización de la capa superficial.

En el caso del epitelio cultivado durante 72 h en solución salina tamponada, el análisis de la muestra presenta una desaparición casi total del epitelio, solamente es visible el soporte. No hay capa de células identificable.

65 En las condiciones experimentales definidas para este estudio, se observa la supervivencia y la cohesión celular de un epitelio de córnea humana reconstruido cultivado durante 72 h en una composición trófica de la presente

invención. En comparación, el experimento similar realizado con una solución salina tamponada mostró la degeneración completa del epitelio, que ya no es identificable.

### Estudio N.º 3

5 Se evaluaron las propiedades cicatrizantes de las composiciones tróficas según la invención en un modelo de córnea humana reconstituida.

10 Las cuatro variantes de la composición trófica estudiada son idénticas a las definidas y descritas en el Estudio N.º 1.

15 El modelo de epitelio corneal reconstruido es idéntico al descrito y definido en los Estudios N.º 1 y N.º 2.

20 Las propiedades cicatrizantes de las composiciones tróficas estudiadas se evalúan después de la aplicación tópica en el modelo anterior, que se lleva a cabo antes de una lesión por alteración mecánica.

25 La realización de las lesiones en la superficie del epitelio corneal reconstruido se hace usando la punta de un bisturí dividiendo el diámetro de cada uno de los epitelios.

30 El principio de la prueba consiste en aplicar inmediatamente después del traumatismo, la composición trófica en contacto directo con el epitelio corneal reconstruido, 15 minutos tres veces al día, y cada día durante un periodo de 9 días. Se lleva a cabo un control en paralelo con una solución salina tamponada (PBS). Al 2º, 4º, 7º y 9º día del experimento, se evalúa la histología del tejido reconstruido para cada condición. Se compara con la histología de una condición de control de referencia correspondiente a un epitelio no lesionado y no tratado.

35 En la práctica, se depositan 30 µl de composiciones tróficas a ensayar 3 veces al día (a las 9 h, a las 13 h y a las 17 h), directamente sobre la superficie de los epitelios corneales, durante 15 minutos. Después de este tiempo de contacto, las composiciones en exceso se eliminan y los epitelios se mantienen en incubación a 37 °C en una atmósfera húmeda, 5 % de CO<sub>2</sub>. Esta operación se repite todos los días durante 9 días. Al 2º, 4º, 7º y 9º día del experimento, los epitelios reconstruidos se recogen para efectuar el análisis histológico.

40 Al 2º, 4º, 7º y 9º día del experimento, los epitelios se fijan con una solución de formaldehído al 10 % y se incluyen en parafina. La histología de los cortes teñidos con hematoxilina/eosina se evalúa mediante microscopía óptica.

45 La evaluación de las propiedades cicatrizantes de las composiciones tróficas se realiza mediante el análisis histológico de los cortes y la observación de la reparación del epitelio a nivel de la lesión inducida por el bisturí. La localización de las lesiones se realiza mediante el marcado con tinta china sobre la superficie de los epitelios corneales, antes de realizar el corte histológico (corte transversal del epitelio).

50 La interpretación histopatológica de los cortes tiene en cuenta el espesor y la regularidad del tejido epitelial, así como la morfología, la cohesión y la capacidad de las células para proliferar después del traumatismo infringido.

55 Las fotografías agrupadas establecen, para cada condición, los cortes transversales de los epitelios llevados a cabo al principio del tratamiento (2º día después de realizada la lesión) y en el último día del mismo (9º día).

60 En el caso del control (sin tratar, sin agresión), se observa al 2º día de cultivo, un epitelio perenne compuesto de 6 a 7 capas de células, de forma regular (aspecto en empedrado) contiguas. Al 9º día de tratamiento, se observa un engrosamiento del epitelio formado por una decena de capas de células, siempre contiguas y regulares. Se observa la presencia de una capa de superficie queratinizada.

65 En el caso de tratamiento con EVE 4 (composición trófica de acuerdo con la Tabla 2), se observa en la fotografía tomada al 2º día la lesión formada en el epitelio y que expone el soporte de la membrana. A cada lado de la herida el epitelio es perenne. No hay queratinización. Al 9º día de tratamiento, se observa a nivel de la señal realizada con tinta china, un epitelio reparado, continuo, formado por varias capas de células relativamente regulares (apariencia más redondeada que en el caso del control), no necrótico. Se observa la presencia de una zona de queratinización en las capas superficiales.

70 En el caso de tratamiento con una solución salina tamponada (PBS), se visualiza al 2º día la zona lesionada, marcada por una pérdida significativa de sustancia en el epitelio. Al 9º día, se observa a nivel de la señal, un epitelio reparado, constituido por 5 a 6 capas de células solamente, de aspecto redondeado, algunas turgentes, con presencia de vacuolas.

75 En el caso del tratamiento con las composiciones denominadas EVE 1, EVE 2, EVE 3, se observa, en las muestras tomadas el 2º día del experimento, la lesión identificada por una pérdida completa de sustancia. A ambos lados, el epitelio está multiestratificado, perenne y no queratinizado.

Al 9º día, con la formulación EVE 1, se observa un epitelio reconstituido, continuo, que consta de células redondeadas, bastante regulares con presencia de algunas vacuolas. En el caso de las formulaciones EVE 2 y EVE 3, los epitelios tienen la misma apariencia, con células contiguas y de morfología regular.

5 Sin embargo, el espesor de los epitelios aparece más delgado en comparación con el de los epitelios tratados con la formulación EVE 4.

En las condiciones experimentales así definidas, después de los tratamientos, se observa para cada una de las condiciones ensayadas una reparación de los epitelios corneales humanos lesionados previamente.

10 La formulación EVE 4 (que contiene ácido hialurónico y conservante) proporciona los mejores resultados. El epitelio reparado es continuo, perenne, compuesto de células contiguas y regulares.

#### 15 Estudio Nº 4

Se evalúan las propiedades cicatrizantes de las composiciones tróficas de acuerdo con la presente invención, en comparación con una solución salina tamponada.

20 La composición trófica estudiada es idéntica a la definida en la Tabla 2.

El modelo de epitelio corneal, reconstruido, es idéntico al utilizado en los Estudios números 1 a 3.

25 Las propiedades cicatrizantes de las composiciones tróficas se evalúan mediante la aplicación tópica en un modelo in vitro de epitelio corneal humano reconstruido, en el que se infringe previamente una lesión por traumatismo mecánico.

La realización de las lesiones en la superficie del epitelio corneal reconstruido se hace usando la punta de un bisturí dividiendo el diámetro de cada uno de los epitelios.

30 El principio de la prueba consiste en aplicar inmediatamente después del trauma, la composición trófica en contacto directo con el epitelio corneal reconstruido, 15 minutos tres veces al día, y cada día durante un período de 7 días. En paralelo, se proporciona un control en una solución salina tamponada (PBS enriquecido con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ). Al 2º, 4º y 7º día del experimento, se evalúa la histología del tejido reconstruido para cada condición. Se compara con la histología de una condición control de referencia correspondiente a un epitelio no lesionado y no tratado.

35 En la práctica, se depositan 30 µl de las composiciones a ensayar 3 veces al día (a las 9 h, a las 13 h y a las 17 h), directamente sobre la superficie de los equivalentes corneales, durante 15 minutos. Después de este tiempo de contacto, las composiciones en exceso se eliminan y los epitelios se mantienen en incubación a 37 °C en una atmósfera húmeda, 5 % de  $\text{CO}_2$ . Esta operación se repite todos los días durante 7 días. Al 2º, 4º y 7º día del experimento, los epitelios reconstruidos se recogen para efectuar el análisis histológico.

Al 2º, 4º y 7º día del experimento, los epitelios se fijan con solución de formaldehído al 10 % y se incluyen en parafina. Los cortes histológicos teñidos con hematoxilina/eosina se evalúan mediante microscopía óptica.

45 La evaluación de las propiedades cicatrizantes de las composiciones tróficas se realiza mediante el análisis histológico de los cortes y la observación de la reparación del epitelio a nivel de la lesión inducida con el bisturí. La localización de las lesiones se realiza mediante el marcado con tinta china en la superficie del epitelio corneal antes del corte histológico (corte transversal del epitelio).

50 La interpretación histopatológica tiene en cuenta el espesor y la regularidad del tejido epitelial, así como la morfología, la cohesión y la capacidad de las células para proliferar después del traumatismo infringido.

Las fotografías establecen, para cada condición, los cortes transversales de los epitelios llevados a cabo en diferentes etapas del tratamiento.

55 En el caso del control (no tratado, no lesionado), se observa al 2º día de cultivo, un epitelio perenne compuesto de 6 a 7 capas de células, de forma regular (aspecto en empedrado) contiguas. Al 7º día de tratamiento, se observa un engrosamiento del epitelio formado por una decena de capas de células, siempre contiguas y regulares. Se observa la presencia de una capa de superficie queratinizada.

60 En el caso del tratamiento con la composición trófica de acuerdo con la Tabla 2, se observa en la fotografía tomada al 2º día, la lesión realizada a nivel del epitelio exponiendo el soporte de la membrana. A cada lado de la herida, el epitelio es perenne. No hay queratinización. Al 4º día, se observa una recolonización celular del soporte. El epitelio tiene de 3 a 4 capas de células, algunas de los cuales están en división. Al 7º día de tratamiento, se observa a nivel de la señal realizada con tinta china, un epitelio reparado, continuo, formado por varias capas de células

65

relativamente regulares (apariencia más redondeada que en el caso del control), no necrosadas. Se observa la presencia de una zona de queratinización en las capas superficiales.

5 En el caso del tratamiento con una solución salina tamponada (PBS), se visualiza al 2º día la zona lesionada identificada por una pérdida significativa de sustancia en el epitelio. Al 4º día, el epitelio se reconstituye y está compuesto solamente por una a dos capas de células redondeadas.

10 Al 7º día, el epitelio está reparado, constituido por 5 a 6 capas de células, con aspecto redondeado, algunas turgentes, con presencia de vacuolas.

En las condiciones experimentales así definidas, la composición trófica permite la reconstitución de un epitelio corneal humano lesionado previamente. El epitelio reparado es continuo, perenne, pluriestratificado, compuesto de células contiguas y regulares.

15 La aplicación de una solución salina tamponada también permite la reparación del epitelio. Sin embargo, éste está formado por 3 a 4 capas de células, lo que indica una regeneración inferior a la observada con la composición trófica. Además, las células son redondeadas con presencia de vacuolas.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de una base nutritiva compleja en medio acuoso, constituida al menos por una pluralidad de aminoácidos, vitaminas, oligoelementos y sales metálicas, excluyendo dicha base cualquier factor de crecimiento celular, o cualquier extracto biológico de origen animal o celular, la penicilina, la estreptomina, la toxina colérica y la insulina para obtener un medicamento oftalmológico, o una solución oftalmológica, formulado para una aplicación en contacto con el exterior del ojo en seres humanos o en animales, donde el medicamento oftalmológico o la solución oftalmológica consiste en una composición trófica en medio acuoso que comprende la base nutritiva compleja, un inhibidor de colagenasas del epitelio corneal de seres humanos o animales, seleccionado del grupo constituido por
- 10 cisteína, N-acetil cisteína y la sal de calcio del EDTA y un promotor de la síntesis de nuevo colágeno que es prolina o hidroxiprolina
- 15 2. Uso según la reivindicación 1, caracterizado por que la composición trófica está formulada para establecer un pH comprendido entre 7,3 y 7,5 y una osmolaridad comprendida entre 300 a 350 Osm.
3. Uso según la reivindicación 1, caracterizado por que el inhibidor de colagenasas es la N-acetil cisteína.
- 20 4. Uso según la reivindicación 1, caracterizado por que el inhibidor de colagenasas representa como máximo el 5 %, y preferiblemente entre el 0,05 y el 0,5 % en peso de la composición trófica.
5. Uso según la reivindicación 1, caracterizado por que el promotor de la síntesis de nuevo colágeno representa como máximo el 0,5 % y preferiblemente el 0,004 % en peso de la composición trófica.
- 25 6. Uso según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende ácido hialurónico y/o una sal de ácido hialurónico, en una proporción total en peso de la composición trófica, como máximo de 0,1 % y preferiblemente igual a 0,07 %.
- 30 7. Uso según la reivindicación 1, caracterizado por que la composición trófica comprende un conservante, en una proporción en peso de dicha composición, como máximo de 0,0001 %.
8. Uso según la reivindicación 7, caracterizado por que el conservante es polihexanida o polihexametilen biguanida.
- 35 9. Uso según la reivindicación 7, caracterizado por que la composición trófica tiene la fórmula descrita en la Tabla 2 de la memoria descriptiva.
10. Uso según la reivindicación 1, caracterizado por que el medicamento oftalmológico o la solución oftalmológica está en forma líquida, o en forma seca, es decir, para la reconstitución con un medio acuoso.
- 40 11. Uso según la reivindicación 1, caracterizado por que el medicamento oftalmológico o la solución oftalmológica está en forma de gotas o de lágrimas regeneradoras, o de gotas de confort, o de colirio, o de solución.
12. Uso según la reivindicación 1, caracterizado por que la solución oftálmica es una solución de confort.