

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 182**

51 Int. Cl.:

A61K 33/30	(2006.01)
A61K 33/14	(2006.01)
A61K 33/00	(2006.01)
A61P 27/04	(2006.01)
A61P 27/02	(2006.01)
A61P 7/08	(2006.01)
C11D 1/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2014 PCT/EP2014/058770**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2014 WO14177594**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2014 E 14723756 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 2991732**

54 Título: **Solución marina enriquecida con zinc y potasio**

30 Prioridad:

03.05.2013 FR 1301040

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

15.04.2019

73 Titular/es:

**YS LAB (100.0%)
2 rue Félix Le Dantec
29000 Quimper, FR**

72 Inventor/es:

**HEMON, MARC;
DUTOT-WOLF, MELODY;
TANTER, CAROLINE y
FAGON, ROXANE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 709 182 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

Solución marina enriquecida con zinc y potasio

La presente invención se refiere a una solución a base de agua de mar, destinada particularmente para aplicaciones en los ojos, la piel o las mucosas.

- 5 Las soluciones salinas se usan comúnmente en oftalmología como excipiente para colirios, soluciones de enjuague para lentes de contacto o acondicionadores para implantes intraoculares. Las soluciones salinas también se usan comúnmente en otorrinolaringología (ORL) para el lavado de las fosas nasales.

10 Otras composiciones tratan de aproximarse con mayor precisión al agua de mar. Así, la solicitud de patente FR 2803205 describe una solución acuosa a base de agua de mar cuyo contenido de ciertos ingredientes se modifica por electrodiálisis selectiva. Una disminución del pH, una osmolalidad inferior y concentraciones respectivamente superiores de potasio e inferiores de sodio, magnesio, calcio y cloro con relación a las del agua de mar, permiten su uso para higiene ocular.

15 La solicitud de patente FR 2843029 describe una solución para el enjuague de lentes de contacto a base de agua de mar. Se pueden modificar ciertas características de sus constituyentes; así, su pH y su osmolalidad pueden ser inferiores a los del agua de mar natural. A estas modificaciones se puede añadir una mayor concentración de potasio y una menor concentración de sodio, magnesio, calcio y cloro.

20 Dichas soluciones de agua de mar tratadas del estado de la técnica no permiten responder selectivamente a ciertas necesidades, en particular en lo que se refiere a las terapias del ojo y de las mucosas y, más particularmente, su eficacia sigue siendo con frecuencia muy limitada para el tratamiento de patologías que impliquen una interacción con los receptores P2X, tal como P2X7.

25 Para paliar la totalidad o parte de los inconvenientes del estado de la técnica, la presente invención tiene por objeto una composición acuosa obtenida a partir de agua purificada, a pH de 5,5 a 7,5, osmolalidad de 200 a 400 mosmol/kg, conductividad de 17 a 22,5 mS/cm a 25°C y preparada a partir de 1 a 20% de agua de mar filtrada, y de tal manera que dicha composición incorpore una sal de potasio con un contenido de 90 a 180 mmol/L, así como Zn(X)₂ a una concentración de 200 a 300 micromoles/L.

Las concentraciones se dan con referencia a la composición final a la que se ha añadido la sal, este es también el caso de todas las concentraciones descritas a continuación en la presente solicitud (a menos que se mencione expresamente otra referencia). El agua de mar se considera el reservorio de todos los oligoelementos en la medida en que casi todos están representados, en concentraciones más o menos importantes.

- 30 Preferiblemente, la composición según la invención incorpora un contenido de sal de potasio inferior a 150 mmol/L y ventajosamente de 95 a 145 mmol/L, y más ventajosamente el contenido de sal de potasio es de 98 a 141 mmol/L.

La osmolalidad se mide según el método descrito en la Farmacopea Europea 6.0 (sexta edición) - punto 2.2.35. La conductividad se mide según el método descrito en la Farmacopea Europea 6.0 - punto 2.2.38. La osmolalidad de la solución es ventajosamente de 250 a 350 mosmol/kg, o incluso de 270 a 330 mosmol/kg.

- 35 La Tabla 1 muestra los elementos constitutivos del agua de mar, así como su proporción teórica, expresada en partes por millón:

Tabla 1:

Elemento	ppm
Cloro, Cl	19.500
Sodio, Na	10.770
Magnesio, Mg	1290
Azufre, S	905
Calcio, Ca	412
Potasio, K	380
Bromo, Br	67
Carbono, C	28
Zirconio, Zr	0,00003
Bismuto, Bi	0,00002
Niobio, Nb	0,00001

ES 2 709 182 T3

Elemento	ppm
Talio, Tl	0,00001
Torio, Th	0,00001
Hafnio, Hf	7×10^{-6}
Helio, He	$6,8 \times 10^{-6}$
Berilio, Be	$5,6 \times 10^{-6}$
Nitrógeno, N	11,5
Estroncio, Sr	8
Oxígeno, O	6
Boro, B	4,4
Silicio, Si	2
Flúor, F	1,3
Argón, Ar	0,43
Litio, Li	0,18
Rubidio, Rb	0,12
Fósforo, P	0,06
Iodo, I	0,06
Bario, Ba	0,02
Molibdeno, Mo	0,01
Arsénico, As	0,0037
Uranio, U	0,0032
Vanadio, V	0,0025
Titanio, Ti	0,001
Zinc, Zn	0,0005
Níquel, Ni	0,00048
Aluminio, Al	0,0004
Cesio, Cs	0,0004
Cromo, Cr	0,0003
Antimonio, Sb	0,00024
Kriptón, Kr	0,0002
Selenio, Se	0,0002
Neón, Ne	0,00012
Manganeso, Mn	0,0001
Cadmio, Cd	0,0001
Cobre, Cu	0,0001
Wolframio, W	0,0001
Hierro, Fe	0,000055
Xenón, Xe	0,00005
Germanio, Ge	5×10^{-6}
Oro, Au	4×10^{-6}
Renio, Re	4×10^{-6}
Cobalto, Co	3×10^{-6}
Lantano, La	3×10^{-6}

Elemento	ppm
Neodimio, Nd	3×10^{-6}
Plomo, Pb	2×10^{-6}
Plata, Ag	2×10^{-6}
Tántalo, Ta	2×10^{-6}
Galio, Ga	2×10^{-6}
Ytrio, Y	$1,3 \times 10^{-6}$
Mercurio, Hg	1×10^{-6}
Cerio, Ce	1×10^{-6}
Disproso, Dy	9×10^{-7}
Erbio, Er	8×10^{-7}
Yterbio, Yb	8×10^{-7}
Gadolinio, Gd	7×10^{-7}
Praseodimio, Pr	6×10^{-7}
Escandio, Sc	6×10^{-7}
Estaño, Sn	6×10^{-7}
Holmio, Ho	2×10^{-7}
Lutecio, Lu	2×10^{-7}
Tulio, Tm	2×10^{-7}
Indio, In	1×10^{-7}
Terbio, Tb	1×10^{-7}
Paladio, Pd	5×10^{-8}
Samario, Sm	5×10^{-8}
Telurio, Te	1×10^{-8}
Europio, Eu	1×10^{-8}
Radio, Ra	7×10^{-11}
Protactinio, Pa	5×10^{-11}
Radón, Rn	6×10^{-16}

Se observa, en la tabla 1, que numerosos elementos químicos están representados, en cantidad más o menos importante, en el agua de mar. Estas concentraciones se expresan en valores medios, que pueden variar según la localización geográfica del mar, e incluso el lugar de bombeo del agua de mar.

- 5 El agua de mar destinada a la composición según la invención se bombea directamente del mar de manera que se respete su estado inicial y en consecuencia sus propiedades intrínsecas. La concentración de los elementos constituyentes del agua puede variar dependiendo de la localización geográfica del lugar de bombeo, y necesitar eventualmente una modificación de la concentración de ciertos elementos. El lugar de bombeo se elegirá por consiguiente con precisión de forma que el agua se pueda usar directamente, sin modificar las concentraciones de sus elementos constituyentes.
- 10

Así, por ejemplo, el agua de mar se elegirá de manera que no tenga una concentración de sodio demasiado alta, en la medida en la que este elemento está implicado en las reacciones inflamatorias cuando está presente en una cantidad demasiado alta.

- 15 El agua de mar utilizada en el marco de la invención tiene un pH de 7,5 a 8,5, comprendiendo una concentración de sales o iones próxima a la composición teórica del agua de mar (tabla 1).

Las aguas de mar utilizadas se seleccionan por sus emplazamientos privilegiados:

- ausencia de industrias próximas, con un medio ambiente sano,
- sitio de toma no aislado: renovación constante de agua,
- corrientes en la zona que favorezcan la renovación del agua,

- calidad reconocida como satisfactoria por los organismos especializados, tales como IFREMER y DDASS.

Los inventores han descubierto, de manera totalmente inesperada, que una solución de agua de mar diluida en el intervalo de valores de acuerdo con la composición según la presente invención, en combinación con una adición de sal de zinc en los contenidos recomendados, permitía después de aplicación al ojo, por una acción sinérgica, obtener una respuesta que genera una señal eléctrica específica capaz de actuar sobre los canales iónicos de las células del ojo. Se ha demostrado que la composición según la invención, en particular sus iones, permite un transporte pasivo y activo hacia las células, debido a sus canales iónicos.

La composición según la invención ha demostrado sorprendentemente que presenta una gran tolerancia por los tejidos más frágiles (reducción del estrés oxidante o inflamatorio...), tales como la superficie ocular y las mucosas, y una actividad anti-apoptósica (por acción sobre el receptor P2X7). Se puede usar para aplicaciones directas (enjuague) o como excipiente (cosméticos, dispositivos médicos...). El estudio de la citotoxicidad de la solución según la invención ha permitido evaluar su alta tolerancia para su uso en oftalmología. Se han realizado diferentes ensayos de evaluación de la citotoxicidad para definir mejor la tolerancia de la composición según la invención por los diferentes tipos de células de la superficie ocular (corneales y conjuntivales).

El agua de mar como la base de la composición según la invención constituye un reservorio de diferentes elementos químicos presentes en concentraciones más o menos significativas. Las propiedades fisicoquímicas del agua de mar son debidas a un equilibrio entre aniones y cationes. Estos elementos se comportan como un conjunto de biomoléculas que interactúan unas con otras. En el marco de la invención, la acción sinérgica se produce no solo entre estos diferentes iones, sino igualmente con las sales de zinc presentes en la composición.

El agua de mar se diluye y enriquece con zinc y luego se ajusta con el fin de obtener una solución en los intervalos de pH y de osmolalidad deseados, por adición de una sal. La sal utilizada preferiblemente es cloruro de potasio. La interacción de los iones de zinc con los diferentes elementos del agua de mar refuerza su acción sobre el estrés celular.

Preferiblemente, el pH de la composición es de 6 a 7,2.

La sociedad solicitante ha realizado un estudio sobre los receptores de muerte celular P2X. Estos receptores son receptores ionotrópicos que conducen a un influxo catiónico después de su activación. Más exactamente, entre los receptores P2X antes citados, el receptor P2X7 induce respuestas inflamatorias, una sobreproducción de especies reactivas del oxígeno, una apoptosis e incluso una citolisis. Los diferentes ensayos comparativos muestran, como se describe en la parte experimental, que la activación de los receptores P2X7 es inhibida fuertemente en presencia de una composición a base de agua de mar según la invención. La inhibición de la activación de los receptores P2X7 se puede equiparar con una orden de "no muerte" de las células, atenuando los fenómenos inflamatorios y la apoptosis. Esto demuestra igualmente una buena tolerancia celular.

La composición de agua de mar está enriquecida con zinc, y más particularmente con una sal del tipo $Zn(X)_2$ a una concentración de 125 a 500 $\mu\text{mol/L}$, pudiendo ser X^- cualquier tipo de contra-anión que forme complejo con el catión Zn^{2+} .

Como fuente de zinc, se prefiere incorporar en la composición según la invención cloruro de zinc ($ZnCl_2$), que favorece las interacciones con los otros elementos constitutivos del agua de mar. En este contexto, la presente invención se refiere ventajosamente a una composición tal como la descrita anteriormente, para la cual la sal de zinc es cloruro de zinc ($ZnCl_2$).

Preferiblemente, $Zn(X)_2$ se incorpora en una cantidad de 200 a 300 $\mu\text{mol/L}$.

La composición según la invención comprende una sal de potasio que es preferiblemente cloruro de potasio (KCl).

El enriquecimiento del agua de mar con otros iones, tales como Mg^{2+} o Ca^{2+} no da resultados tan convincentes como los obtenidos con Zn^{2+} .

Preferiblemente, el agua de mar está presente en la composición en un contenido de 3 a 17%.

La composición se puede usar como excipiente o como producto de contacto según su destino.

La composición según la invención está destinada ventajosamente a utilización como medicamento en el tratamiento de enfermedades oculares por inactivación de los receptores de muerte celular del tipo P2X7.

La composición según la invención se puede utilizar igualmente como colirio, lágrimas artificiales, solución de enjuague para lentes, solución de lavado ocular y/o como producto contenedor de implante ocular. Debido a su polaridad, posee buenas propiedades de lavado, así como buenas propiedades de disolvente. Por tanto, permite el enjuague del ojo en caso de proyección de productos nocivos, sin provocar irritación y favoreciendo la regeneración celular.

La composición según la invención ha sido descrita específicamente para oftalmología, pero sin embargo se podrá aplicar a cualquier otro campo en el que intervenga la fisiología celular, en otros órganos tales como los órganos del campo de la ORL - en particular las mucosas nasales - para prevenir afecciones tales como rinitis, congestiones nasales, sequedades nasales, sinusitis o bronquitis. La composición según la invención se puede aplicar igualmente a la piel y a las mucosas vaginales, principalmente en preparaciones para la higiene íntima. La composición según la invención está destinada ventajosamente a una utilización como medicamento en el tratamiento de mucosas nasales, bucales, vaginales y/o cutáneas.

Además, para limpiar tejidos lesionados, mucosas o piel, la composición según la invención puede estimular la cicatrización, gracias a sus propiedades. La composición según la invención está destinada ventajosamente a una utilización como medicamento en el tratamiento de la cicatrización de mucosas y/o de la piel.

La composición según la invención se puede utilizar igualmente como pulverización, gotas o excipiente de solubilización de moléculas que presentan un interés terapéutico, tales como ácido hialurónico, polifenoles o ácidos grasos.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para preparar una composición tal como se ha descrito anteriormente en el marco de la invención, que comprende las etapas:

- a) bombear agua de mar;
- b) pretratar eventualmente el agua de mar con ayuda de un primer filtro natural o artificial;
- c) filtrar el agua de mar eventualmente pretratada a través de un segundo filtro cuyo diámetro medio de poros es inferior o igual a 5 μm ;
- d) efectuar otra filtración a través de un tercer filtro cuyo diámetro medio de poros es inferior al del segundo filtro y es inferior o igual a 0,45 μm ; y
- e) diluir la solución filtrada con agua purificada.

En la etapa a), el agua de mar bombeada se filtra eventualmente (etapa b)) utilizando bien un filtro natural como por ejemplo arena, o bien un filtro artificial como por ejemplo una rejilla adaptada para retirar las partículas de gran tamaño. El agua se almacena a continuación ventajosamente en un recipiente para pretratamiento. Esta agua de mar se redirige a continuación a tuberías con ayuda de una bomba para su filtración.

El agua de mar pretratada se filtra en las etapas c) y d) a través de dos filtros cuyos diámetros medios son respectivamente de 5 μm a 1 μm (para c)) e inferior a 0,45 μm (para d)). Para esta etapa de filtración, el agua se inyecta preferiblemente en un conjunto de filtración integrado en las tuberías que comprende ventajosamente filtros en forma de cartuchos cilíndricos. Un ejemplo de un conjunto de filtración se describe a continuación en la parte experimental.

La presente invención se comprenderá mejor leyendo la parte experimental que sigue, cuyos ejemplos y figuras se dan únicamente con fines ilustrativos y no pueden considerarse en absoluto como limitativos. Para ilustrar los resultados de la parte experimental, el esquema 1 representa una vista esquemática en sección transversal de un conjunto de filtración que permite filtrar el agua de mar antes de su dilución para obtener la composición según la invención.

Parte experimental

La osmolalidad se mide según el método descrito en la Farmacopea Europea 6.0 (sexta edición) - punto 2.2.35. La conductividad se mide según el método descrito en la Farmacopea Europea 6.0 - punto 2.2.38.

1) Preparación de una composición según la invención que comprende 5% de agua de mar (Esquema 1):

Con ayuda de una tolva se filtran 5 litros de agua de mar recogida por bombeo en el sur de Finisterre. El agua de mar así recogida se almacena en una cubeta para pretratamiento. A continuación, se procede al bombeo de este agua de mar con ayuda de una bomba.

El agua de mar pretratada se inyecta en las tuberías de un conjunto de filtración 1 representado en el esquema 1. El conjunto de filtración 1 comprende una entrada 2 del agua de mar. Esta entrada de agua 2 está conectada a un caudalímetro 3 que está conectado a la parte inferior de la carcasa 4 de un pre-filtro 5 (1 μm). La salida del pre-filtro 5 (siempre en la parte inferior de la carcasa 4) está conectada a la parte inferior de la carcasa 6 de un filtro 7 (0,22 μm) cuya salida está conectada a una tubería que sirve para recoger el agua procedente de la filtración para almacenarlo en un recipiente 8.

A continuación, se completa la solución filtrada con agua destilada y se añade cloruro de zinc y cloruro de potasio de forma que se obtenga una composición (1) que contiene 250 $\mu\text{mol/L}$ de ZnCl_2 y 140,9 mmol/L de KCl . La conductividad de la solución es 20 mS/cm a 25°C y la osmolalidad es 300 mosmol/kg .

2) Estudio de la viabilidad celular:

5 Células WKD (células epiteliales conjuntivales humanas) se dejan en incubación en diferentes medios de cultivo y se evalúa la viabilidad celular por el ensayo con rojo neutro. El rojo neutro se incuba durante 3 horas a 37°C con las células y luego estas células se enjuagan con tampón PBS y se usa una solución de ácido acético/etanol para liberar el rojo neutro de las células y homogeneizar la coloración. El aparato utilizado para cuantificar la fluorescencia es un citómetro adaptado a microplacas (Safire, TECAN). Se recomienda el ensayo con rojo neutro para la evaluación de la citotoxicidad de los dispositivos médicos según la norma ISO 10993-5 versión de julio de 2010. Los resultados de este ensayo se expresan en porcentaje con relación a las células de control.

Los resultados se recogen en la tabla 2.

Tabla 2.

Composiciones utilizadas para la incubación de las células	Solución de PBS	Agua de mar 5%	Agua de mar 5% + KCl 140,9 mM	Agua de mar 5% + ZnCl ₂ 250 µmol/L	Agua de mar 5% + KCl 140,9 mM + ZnCl ₂ 250 µmol/L	Agua de mar 5% + KCl 100 mM + ZnCl ₂ 250 µmol/L	Agua de mar 5% + KCl 160 mM + ZnCl ₂ 250 µmol/L	Agua de mar 5% + KCl 250 mM + ZnCl ₂ 250 µmol/L	Agua de mar 5% + KCl 500 mM + ZnCl ₂ 250 µmol/L
Porcentaje de células vivas después de 1 h de incubación	100	54	102	42	97	102	63	43	25

Se observa que la composición que comprende 5% de agua de mar y KCl a 140,9 mmol/L muestra una tolerancia celular (102%) mejorada con relación a la composición equivalente que no contiene más que agua de mar, y que además de esta tolerancia no se degrada por la presencia de ZnCl₂ a 250 µmol/L.

3) Medición del estado de oxido-reducción de las células:

15 Se analizó la composición preparada en la parte 1) (denominada en lo sucesivo composición (1)) con el fin de evaluar su poder citotóxico. Un agente citotóxico tiene el poder de disminuir el potencial redox de una célula. Esto provoca la disminución de la actividad de las enzimas de oxido-reducción y por tanto la muerte celular.

En el ensayo efectuado, se observa una sonda fluorescente, alamar azul, incubada durante 6 horas a 37°C con las células. El aparato utilizado para cuantificar la fluorescencia es un citómetro adaptado a microplacas (Safire, TECAN). Este ensayo forma parte de los ensayos propuestos para la evaluación del potencial citotóxico ocular de las soluciones multifuncionales para el mantenimiento de lentes de contacto según la norma NF S11-820 en su versión de febrero de 2012. La intensidad de la fluorescencia es proporcional a la capacidad de oxido-reducción y por extensión al número de células vivas. Los ensayos se realizan en comparación con una solución de NaCl al 0,9% y una solución salina tamponada con fosfato (PBS, comúnmente utilizada en cultivos celulares), y los resultados se presentan en las figuras 1 y 2. Los resultados muestran en ordenadas el porcentaje de fluorescencia cuantificado con relación a la PBS (o «% Fluor/PBS»). Esta relación se calcula dividiendo la intensidad de fluorescencia de las células tratadas por la intensidad de fluorescencia de las células no tratadas (incubadas con el tampón PBS), y luego multiplicando por 100 para obtener un porcentaje. En la figura 1, los resultados se refieren a una incubación de una hora sobre células WKD (células epiteliales conjuntivales humanas) y en la figura 2, se refieren a una incubación de una hora sobre células HCE (células epiteliales corneales humanas).

Los resultados muestran que la composición no induce una disminución del potencial redox con relación al control sobre las células de la conjuntiva.

Se observa una ligera disminución de la fluorescencia para las células de la córnea, pero esta no es estadísticamente significativa.

35 En conclusión, la incubación en la composición (1) no crea una pérdida de potencial redox, por lo que no hay disminución del número de células vivas. La composición 1 es por tanto bien tolerada.

4) Modulación de la activación de los P2X7:

40 Células WKD (células epiteliales conjuntivales humanas) se dejan en incubación en diferentes soluciones salinas y la activación de los receptores P2X7 se cuantifica gracias al ensayo YO-PRO-1. La sonda YO-PRO-1 entra en las células debido a la apertura de un poro de membrana, como resultado de la activación del receptor P2X7. Un aumento en la fluorescencia corresponde a una activación del receptor P2X7. La activación de P2X7 es un signo de apoptosis. El aparato utilizado para cuantificar la fluorescencia es un citómetro adaptado a microplacas (Safire, TECAN).

Leyendo la figura 3 (en abscisas se lee el tiempo en minutos y en ordenadas se leen las unidades relativas de fluorescencia o RFU), se puede observar que la composición (2) que comprende 5% de agua de mar y KCl a 140,9 mmol/L muestra una inhibición de la activación de los P2X7, siendo esta inhibición visible con relación a una composición (3) de referencia de NaCl al 0,9% y, que además, esta inhibición se mejora aún más por la presencia de ZnCl₂ a razón de 250 µmol/L para la composición (1) (cabe recordar que la composición (1) comprende 5% de agua de mar, KCl a 140,9 mmol/L y ZnCl₂ a 250 µmol/L).

5) Inhibición de la producción de especies reactivas del oxígeno:

En las células WKD se mide la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) gracias al ensayo H2DCF-DA. Esta sonda entra en las células y es hidrolizada por las enzimas intracelulares. Una vez hidrolizada, la sonda es atrapada en las células y puede ser oxidada por las ERO presentes. Esta forma oxidada es entonces fluorescente. El aparato utilizado para cuantificar la fluorescencia es un citómetro adaptado a microplacas (Safire, TECAN).

Los ensayos se realizan con referencia a una solución salina tamponada con fosfato (PBS, comúnmente utilizada en cultivos celulares) y los resultados se recogen en la figura 4. Los resultados muestran, en ordenadas, el porcentaje de fluorescencia cuantificado con relación al PBS. Esta relación se calcula dividiendo la intensidad de fluorescencia de las células tratadas por la intensidad de fluorescencia de las células no tratadas (incubadas con el tampón PBS), y luego multiplicando por 100 para obtener un porcentaje.

Se observa, de la lectura de la figura 4, que para las siguientes soluciones se aplican los siguientes comentarios:

> Solución de agua de mar (o «ADM») 5% + KCl a 140,9 mM: hay inhibición del estrés oxidante; y

> Solución de agua de mar 5% + KCl de 140,9 mM + ZnCl₂ 250 µM: la inhibición del estrés oxidante es óptima.

Para los niveles más altos de ZnCl₂, o los niveles más bajos, la inhibición es menos evidente e incluso inexistente.

6) Evaluación del interés de la composición (1) en el enjuague del ojo después de exposición a un agente tóxico:

Durante un trabajo *in vitro*, se estudió el impacto del enjuague con diferentes soluciones de un ojo quemado químicamente (Said et al., 2009).

Se realizó una evaluación de la viabilidad celular por el ensayo con rojo neutro 24 horas después de la quemadura con metanol o sosa, seguido de la aplicación de soluciones de enjuague. El rojo neutro se incubó durante 3 horas a 37°C con las células y luego las células se enjuagaron con tampón PBS y se utilizó una solución de ácido acético/etanol para liberar el rojo neutro de las células y homogeneizar la coloración. El aparato utilizado para cuantificar la fluorescencia es un citómetro adaptado a microplacas (Safire, TECAN). Se recomienda el ensayo con rojo neutro para la evaluación de la citotoxicidad de los dispositivos médicos según la norma ISO 10993-5 en su versión de julio de 2010. Los resultados de este ensayo evaluados en porcentaje con respecto a las células de control, se presentan en la figura 5 ($p < 0,001$ se indica con relación a las otras composiciones distribuidas en el gráfico circular).

Se observa que el enjuague con la composición (1) mejora la supervivencia de las células y la recuperación celular después de la quemadura química. Esta mejora es estadísticamente significativa con relación a las otras soluciones utilizadas (incluida NaCl 0,9%).

Se realizó un estudio sobre conejos. La tabla 3, que se presenta a continuación, enumera los resultados de los ensayos de Draize realizadas después de la quemadura ocular con un producto químico básico y luego el enjuaga con las diferentes soluciones. En este ensayo, se realizó igualmente la aplicación de un producto cicatrizante (Euronac®) después del enjuague con la solución de NaCl al 0,9% o la composición (1) según la invención.

Tabla 3:

	NaCl 0,9%	NaCl 0,9% + Euronac®	Composición 1 + Euronac®
1	100	100	96
24	108	102	98
48	104	100	94
144	54	50	20
168	52	50	10
192	52	50	10

La primera línea de esta tabla indica los diferentes tratamientos y la primera columna indica el tiempo en horas.

5 Cuanto menor es la puntuación, más débil es la irritación. Se puede observar que el enjuague con NaCl al 0,9% antes de la aplicación de Euronac® comercializado por los laboratorios Doliage (colirio cicatrizante) no baja la puntuación por debajo de 50. Mientras que la solución según la invención baja la puntuación a 20 y luego a 10 en una semana (nota: una puntuación inferior a 15 indica la ausencia de irritación).

Los resultados de este estudio destacan un mejor pronóstico cuando el ojo se enjuaga con la composición (1) en lugar de una solución de tipo NaCl al 0,9%, antes de la aplicación del colirio cicatrizante.

7) Estudio del poder de enjuague de productos para mantenimiento de lentes de contacto:

10 Se realizó un estudio previo en lentes rígidas descontaminadas con una solución de ácido peracético y peróxido de hidrógeno. Durante este estudio previo, se observó que la composición (1) permitía un enjuague eficaz con esta solución.

Los inventores extendieron luego las investigaciones al enjuague de las soluciones multifuncionales utilizadas para mantener las lentes de contacto blandas hidrófilas.

15 Una primera serie de ensayos se realizó de la manera siguiente:
 - 3 tipos de lentes se expusieron a diferentes soluciones multifuncionales,
 - la viabilidad celular después de la aplicación de las lentes en un tapiz de células corneales se observó al microscopio y por medición con rojo neutro,
 - se repitió la experiencia después de un enjuague de las lentes con la solución según la invención.

Se compararon los enjuagues con NaCl al 0,9% y la composición 1 según la invención.

20 La Tabla 4, que se muestra a continuación, resume los resultados de la viabilidad celular obtenidos:

Tabla 4:

		Acuvue Advance - 0,5	Proclear – 0,5
	A la salida del envase	71%	83%
Optifree	Solo	44%	74%
	+ NaCl 0,9%	51%	87%
	+ Composición 1	64%	100%
Biotrue	Solo	69%	89%
	+ NaCl 0,9%	84%	86%
	+ Composición 1	98%	95%

25 Se ensayaron diferentes tipos de lentes y soluciones multifuncionales de mantenimiento de lentes de contacto (SME) (Biotrue y Optifree). La solución Biotrue es comercializada por Bausch&Lomb y contiene ácido hialurónico, sulfobetaina, poloxamina, ácido bórico, borato de sodio, edetato de sodio, poliaminopropil-biguanida, policuaturnio y cloruro de sodio; la solución Optifree es comercializada por Alcon y contiene, entre otros, Tetric 1304, Polyquad®, Aldox®, tampón de citrato, cloruro de sodio, edetato de sodio. Ambas soluciones se comercializan para el mantenimiento de lentes de contacto blandas.

30 Se comparó el enjuague con NaCl al 0,9% y la composición (1). Las lentes se sumergieron durante 96 horas en 100 mL de una SME (= 20 ciclos de mantenimiento, protocolo de la *Food and Drug Administration de 1994 FDA Premarket Notification 510(k) Guidance Document for Daily Wear Contact Lens*), y luego se enjuagaron sumergiéndolas 24 horas en 100 mL de la composición 1 o NaCl al 0,9%.

35 En todos los casos, el enjuague redujo la pérdida de viabilidad celular.

Se observó una mejora notable gracias al enjuague de las lentes de contacto. La composición (1) según la invención proporciona una mejor viabilidad celular.

8) Estudio de la protección contra la inflamación en macrófagos

5 La liberación de citoquinas proinflamatorias (TNF- α) en macrófagos se mide por la técnica ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Esta técnica permite la valoración de proteínas en una muestra; en el caso presente, la técnica ELISA permite cuantificar la citoquina TNF- α , liberada en el líquido sobrenadante celular por los macrófagos, después de un estrés inflamatorio. El antígeno específico de TNF- α se une a un soporte, una microplaca de 96 pocillos. Se deposita en ella el líquido sobrenadante celular y el TNF- α se puede unir a su antígeno. Un anticuerpo primario permite reconocer el TNF- α , y luego un anticuerpo secundario conjugado con una enzima se une al anticuerpo primario. Una reacción enzimática colorimétrica permite el revelado del complejo de anticuerpos. El aparato utilizado para cuantificar la absorbancia es un citómetro adaptado a microplacas (Safire, TECAN). En paralelo, se realiza un intervalo patrón a partir de una solución de TNF- α para permitir expresar la absorbancia en cantidad de proteína (pg/mL).

Los ensayos se realizan con referencia al medio de cultivo y los resultados se recogen en la figura 6.

15 Los resultados muestran en ordenadas la cantidad de TNF- α valorada en el líquido sobrenadante de macrófagos en pg/mL. Los macrófagos se incubaron con la composición 1 diluida 1:2 en el medio de cultivo y luego se estimularon con LPS (lipopolisacárido) de *Escherichia coli* durante 24 horas a 37°C.

20 La figura 6 muestra los resultados obtenidos para el control - sin (o «0 LPS») y con el LPS de *Escherichia Coli*. La figura 6 muestra igualmente los resultados obtenidos para la composición (1) sin y con el LPS de *Escherichia coli*. Según la figura 6, la composición (1) es favorable a la reducción de los fenómenos inflamatorios.

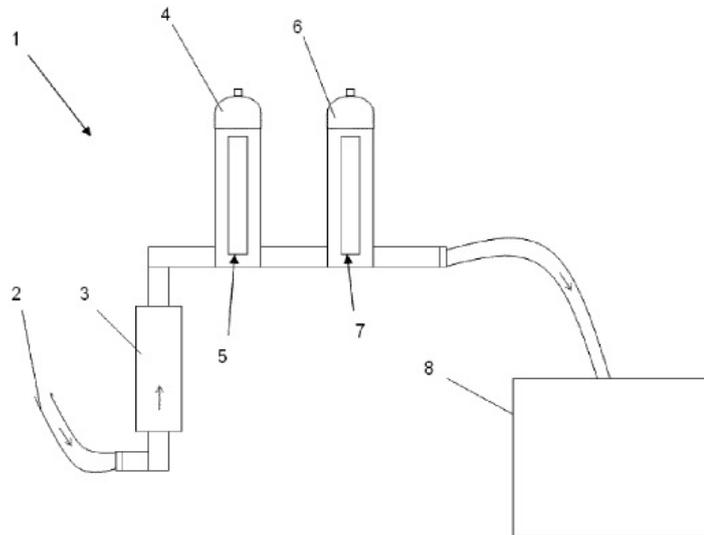
La tabla 5 muestra los resultados de la figura 6 para expresarlos en forma de relación: la cantidad de TNF- α segregada en el control sin LPS se indica con 1, y las cantidades de TNF- α segregadas en las otras condiciones se refieren todas a la cantidad de TNF- α segregada en el control (dividiendo la cantidad de TNF- α por la cantidad de TNF- α en el control).

25 **Tabla 5:**

	Solo	LPS
Control	1	422,0
Composición 1	1,28	356,27

Quando las células son estimuladas con LPS para inducir una inflamación, la preincubación con la composición 1 diluida 1:2 reduce la producción de TNF- α (x422 \rightarrow x356).

Esquema 1



REIVINDICACIONES

1. Composición acuosa obtenida a partir de agua purificada, de pH 5,5 a 7,5, osmolalidad de 200 a 400 mosmol/kg, conductividad de 17 a 22,5 mS/cm a 25°C, y preparada a partir de 1 a 20% de agua de mar filtrada, incorporando dicha composición una sal de potasio en un contenido de 90 a 180 mmol/L e incorporando además dicha composición $Zn(X)_2$ a una concentración de 200 a 300 $\mu\text{mol/L}$.
2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada por que el pH es de 6 a 7,2.
3. Composición según una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizada por que los iones X^- son iones cloruro.
4. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que la sal de potasio es cloruro de potasio.
5. Utilización de la composición según una de las reivindicaciones 1 a 4, como solución de enjuague para lentes de contacto o como producto contenedor de un implante ocular.
6. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 4, para su utilización como medicamento en el tratamiento de enfermedades oculares por inactivación de los receptores de muerte celular de tipo P2X7.
7. Composición para utilización según la reivindicación 6, estando la composición en forma de colirio, lágrimas artificiales o solución para lavado ocular.
8. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 4, para su utilización como medicamento en el tratamiento de al menos uno de los elementos seleccionados entre mucosas nasales, mucosas bucales, mucosas vaginales y piel.
9. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 4, para su utilización como medicamento en el tratamiento de la cicatrización de al menos uno de los elementos seleccionado entre mucosas y piel.
10. Utilización de la composición según una de las reivindicaciones 1 a 4, como excipiente solubilizante de moléculas que presentan interés terapéutico.
11. Procedimiento para preparar una composición según una de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende las etapas:
 - a) bombear agua de mar;
 - b) pretratar eventualmente agua de mar con ayuda de un primer filtro natural o artificial;
 - c) filtrar el agua de mar eventualmente pretratada a través de un segundo filtro cuyo diámetro medio de poros es inferior o igual a 5 μm ;
 - d) efectuar otra filtración a través de un tercer filtro cuyo diámetro medio de poros es inferior al del segundo filtro y es inferior o igual a 0,45 μm ; y
 - e) diluir la solución filtrada con agua purificada.

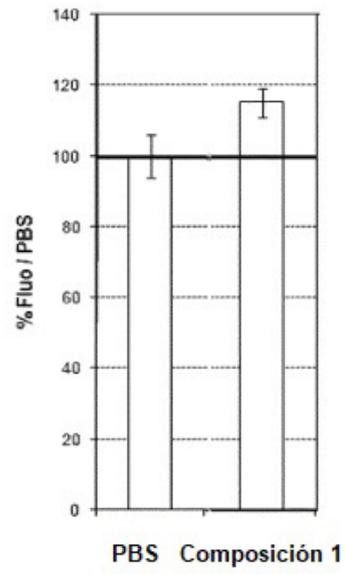


FIG. 1

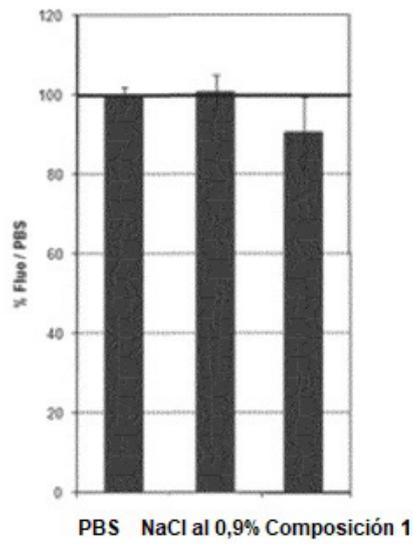


FIG. 2

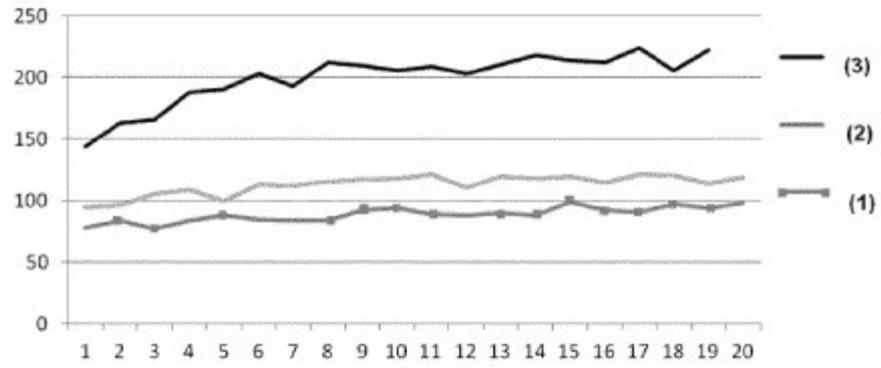


FIG. 3

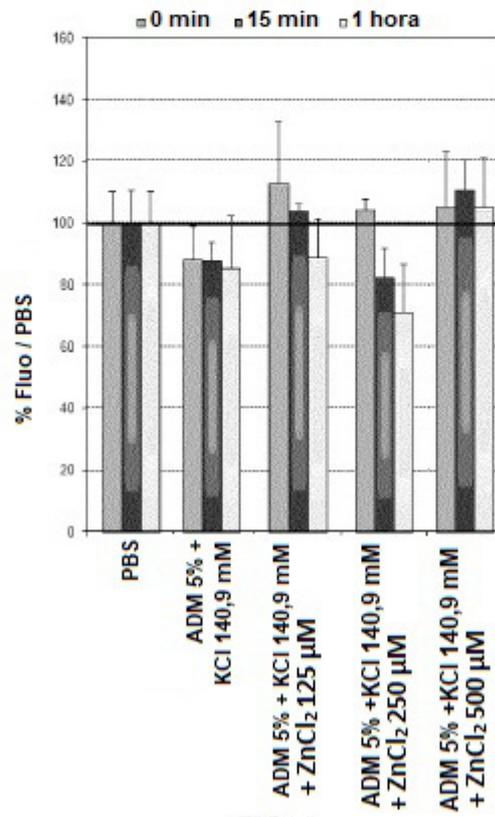


FIG. 4

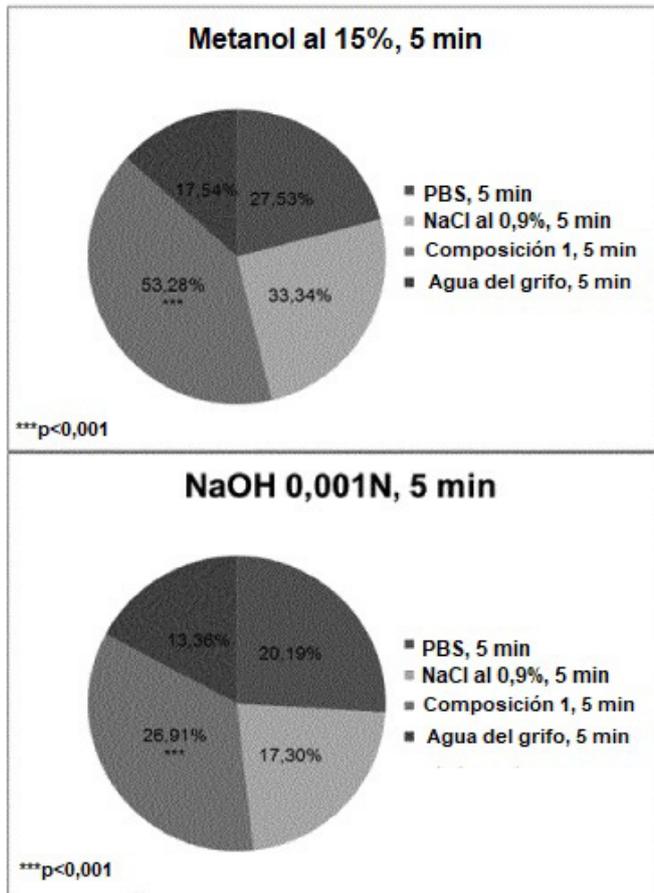


FIG. 5

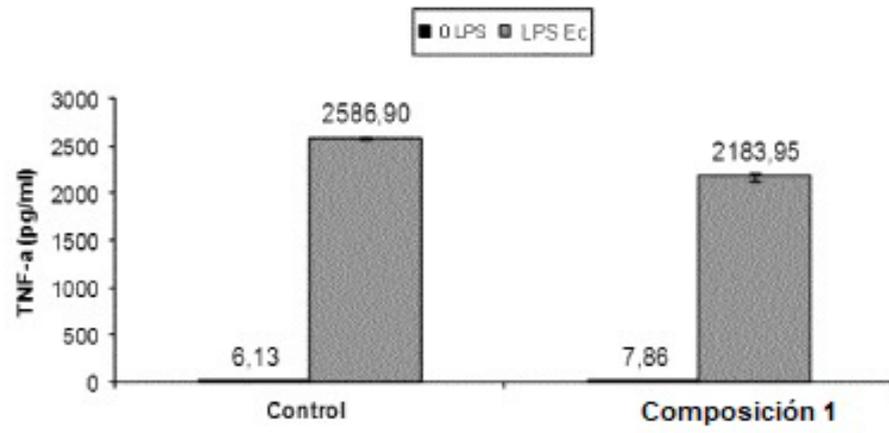


FIG. 6