

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 501**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7032 (2006.01)
A61K 31/728 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.11.2016 PCT/IB2016/056719**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.08.2017 WO17137820**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2016 E 16809172 (6)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 3413868**

54 Título: **Composición oftálmica para uso en el tratamiento de trastornos oculares relacionados con alteraciones de la superficie córneo-conjuntival**

30 Prioridad:

08.02.2016 IT UB20160543

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.03.2020

73 Titular/es:

**SOFT ITALIA S.P.A. (100.0%)
Contrada Molino, 17
63833 Montegiorgio (FM) , IT**

72 Inventor/es:

**BIONDI, MARCO;
BIONDI, PIERO;
STAGNI, EDOARDO y
STAGNI, MARCELLO**

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 747 501 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

Composición oftálmica para uso en el tratamiento de trastornos oculares relacionados con alteraciones de la superficie córneo-conjuntival

5

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere al campo farmacéutico médico y, más específicamente, el campo técnico de las preparaciones oftálmicas tópicas que se pueden aplicar sobre la superficie de la córnea y usar como un sustituto de lágrimas, para estabilizar y reintegrar la película lacrimal, indicadas en caso de alteraciones de la superficie córneo-conjuntival debido a estados inflamatorios, estrés oxidativo, desequilibrio del potencial de oxidación-reducción y acumulación de radicales libres, ojos secos y abrasiones traumáticas. Además, la composición según la invención ha demostrado que también tiene actividad antiinflamatoria, antibacteriana y reepitelizante.

10

Antecedentes de la invención

Debido a su contacto continuo con el entorno externo, el ojo representa uno de los órganos que sufre más fácilmente y frecuentemente las agresiones; en particular, la córnea y la conjuntiva están expuestas al riesgo de acontecimientos traumáticos y dañinos debido a su estructura, función específica y posición anatómica. La córnea es la membrana que cubre la parte delantera del ojo, a través de la cual es posible ver el iris y la pupila, está en relación directa con el exterior y protege la parte interna del ojo. La superficie delantera de la córnea, convexa y directamente en relación con el entorno externo, está recubierta por la película lagrimal.

20

La conjuntiva, en cambio, es la membrana delgada que cubre la superficie delantera del globo ocular, con la excepción de la córnea, y la superficie interna de los párpados. La conjuntiva tiene la función principal de proteger la superficie delantera del ojo de cuerpos extraños e infecciones, además, facilita el deslizamiento de los párpados en las fases de parpadeo y permite que se mueva el globo ocular, sin fricción de las superficies, gracias a la secreción del componente de mucina de la película lagrimal (un tipo de moco viscoso que protege la córnea y permite estratificar la importante fase acuosa de la película lagrimal).

25

30

La película lagrimal es la delgada capa de líquido distribuida sobre la superficie ocular, tiene espesor variable dependiendo de su localización, con espesor máximo en correspondencia con la córnea (aproximadamente 8 μ). La película lagrimal está compuesta por 98 % de agua y el 2 % restante por proteínas y lípidos, se distribuye continua y uniformemente sobre la superficie ocular al cerrar los párpados. La película lagrimal desempeña una función importante en nuestra vista, ya que hace uniforme la superficie de la córnea y mejora la calidad óptica de la imagen. La película lagrimal permite la adecuada lubricación, reduce la fricción de los párpados, permite el transporte y la difusión de moléculas y elementos fundamentales para la fisiología epitelial y corneal, tal como oxígeno, dióxido de carbono, iones, mucina y lípidos. Además, la película lagrimal realiza una actividad antibacteriana, garantiza la reposición molecular y mantiene la superficie ocular limpia retirando las impurezas del entorno, productos residuales del metabolismo y células descamadas. La superficie ocular y la película lagrimal actúan de una única entidad funcional. El equilibrio y la integridad de sus componentes anatómicos, tales como los epitelios y las glándulas lagrimales, su inervación y respuesta inmunitaria, pH y concentración adecuada de electrolitos y algunas sustancias orgánicas, condiciones medioambientales, tales como viento, humedad relativa y temperatura, tienen una influencia directa sobre su funcionamiento fisiológico.

35

40

45

Las lágrimas se producen por las glándulas lagrimales y se distribuyen continua y uniformemente sobre la mucosa conjuntiva y sobre la córnea por el parpadeo, el cierre involuntario de los párpados que ocurre al menos 12-14 veces en un minuto.

50

Así, la película lagrimal tiene varias funciones:

- lubrica el ojo, creando sobre la córnea una superficie lisa a través de la cual se pueden desplazar fácilmente los párpados,
- nutre la córnea, que como carece de vasos sanguíneos, recibe nutrientes y oxígeno directamente a través de la película lagrimal, y finalmente
- retira productos residuales y protege el ojo de las infecciones.

55

Además, el ojo, debido a su estructura anatómica particular y su contacto continuo con el entorno externo, representa ciertamente uno de los órganos que sufre más fácilmente y frecuentemente las agresiones ejercidas por el estrés oxidativo, es decir, la alteración en el equilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (radicales libres) y la defensa antioxidante.

60

La mayoría de los procesos biológicos normalmente generan radicales libres que pueden incluso tener efectos beneficiosos, pero cuando llega a ser excesiva la formación de radicales libres, pueden ser extremadamente destructores y atacar los componentes fundamentales de las células, tales como lípidos, proteínas y ADN.

65

En particular, la acción del estrés oxidativo al nivel de la córnea da como resultado la aparición de alteraciones estructurales y funcionales en tanto el epitelio como el estroma corneal asociados a la apoptosis de queratinocitos y fibroblastos del estroma.

5 La exposición continua a radiación visible (reacción fotoquímica) que da como resultado la producción de formas reactivas de oxígeno, la presencia de nivel de peróxido de hidrógeno en el humor acuoso, la mayor concentración de oxígeno en la retina como resultado de la alta circulación sanguínea en esta estructura, y la hiperacumulación de lipofuscina en el epitelio del epitelio pigmentario de la retina capaces de llevar a cabo la acción de fotosensibilización, son factores típicos que determinan el estrés oxidativo en el ojo.

10 Además, existen enfermedades que afectan el ojo que son provocadas por un fuerte estrés oxidativo, tales como en una forma no limitante, cataratas y degeneración macular.

15 Aunque las cataratas son una enfermedad típica del envejecimiento, también puede afectar en edad menos avanzada, pero en estos casos se asocia a factores secundarios (diabetes, causas inflamatorias, congénitas e iatrogénicas).

20 También parece que la degeneración macular está relacionada con la genética y el medioambiente. El fumar se considera un factor de riesgo grave dependiente de la dosis, mientras que son menos claras correlaciones incoherentes con exposición a la luz del sol, hipertensión arterial, obesidad, operación de cataratas.

25 La aparición de procesos inflamatorios en el ojo, o la exposición a diversos tipos de radiación o a agentes químicos, puede ser directamente responsable del aumento significativo de la concentración fisiológica de peróxido de hidrógeno a nivel de la córnea con un aumento consecuente de especies reactivas de oxígeno responsables de la acción oxidativa de la córnea.

30 La acción oxidativa de los radicales libres en la córnea se manifiesta por la aparición de alteraciones estructurales y funcionales en tanto el epitelio como en el estroma de la córnea, asociadas a procesos apoptóticos que implican queratinocitos y fibroblastos del estroma.

A partir de lo anterior es evidente la importante función del estrés oxidativo en la aparición de alteraciones estructurales y funcionales en el ojo responsables de enfermedades que pueden comprometer seriamente la salud del ojo y la calidad de vida de los que las padecen.

35 Para contrarrestar las consecuencias del estrés oxidativo es muy importante restablecer la condición fisiológica de la película lagrimal.

40 Otro tipo de alteración de la superficie córneo-conjuntival que requiere una rápida acción estabilizadora y de reintegración de la película lagrimal y de la continuidad de tejido subyacente son las excoiaciones de la córnea, es decir, lesión de una parte de la córnea con pérdida parcial de tejido superficial.

45 Las excoiaciones más comunes son debidas a abrasiones traumáticas provocadas por cuerpos extraños en el ojo, arañazos, rotura de lentillas, exposición sin protección a ultravioleta (UV), etc., en donde las capas externas de la córnea pueden estar implicadas o, en casos más complicados, también participan las capas más profundas.

50 La sensación de cuerpos extraños, dolor, fotofobia, enrojecimiento de los ojos y lagrimeo abundante son los síntomas típicos de la abrasión de la córnea. Si, sin embargo, está afectada la zona central de la córnea, también habrá una reducción de la calidad visual. Generalmente, si la excoiación no es demasiado profunda, se puede curar en el plazo de algunos días. La terapia varía dependiendo del grado de la lesión. Generalmente, la abrasión de la córnea se trata por instilación de un colirio antibiótico o pomada, seguido por una venda durante al menos 2-3 días, para permitir que se vuelva a forma el tejido de la córnea.

55 Por tanto, el tratamiento de las complejas y multifactoriales alteraciones de la superficie córneo-conjuntival, incluso asociadas al envejecimiento, debido a la aparición de estados inflamatorios, estrés oxidativo, desequilibrio del potencial de oxidación-reducción y acumulación de radicales libres, síndrome del ojo seco y abrasiones traumáticas, todas las condiciones que algunas veces pueden ocurrir conjuntamente y establecerse juntas, requiere cuidado particular y tener disponibles formulaciones completas que cubran múltiples actividades.

60 Marjorie J. Rah describe la utilidad de la administración oftálmica de ácido hialurónico en trastornos oculares tales como ojo seco y cicatrización de la córnea debido a su actividad antiinflamatoria y antioxidante (Optometry 2011, 82, 38-43). Sorprendentemente, se ha encontrado que la composición oftálmica según la presente invención, que comprende la asociación de ácido lactobiónico y ácido hialurónico, no solo protege mejor contra el daño hiperosmótico, que ocurre por ejemplo en casos de ojo seco, promueve la rápida reepitelización y cicatrización del epitelio de la córnea, sino que también tiene un efecto protector contra infecciones bacterianas.

65 En la presente invención, se propone el uso de la asociación de ácido hialurónico y ácido lactobiónico en una

composición oftálmica para el tratamiento de trastornos oculares que se va a usar como un sustituto de lágrimas que estabiliza y sustituye la película lagrimal, indicada en el caso de alteraciones de la superficie córneo-conjuntival asociadas a deficiencias cualitativas y cuantitativas de la película lagrimal debido a estados inflamatorios, desequilibrio del potencial de oxidación-reducción, acumulación de radicales libres, estrés sobre la superficie ocular, síndrome del ojo seco, envejecimiento, también asociado a infecciones bacterianas.

Además, incluso inesperadamente, dicha composición ha demostrado ser útil en proteger los tejidos del ojo contra infecciones y promover la cicatrización, por tanto, puede ser útil en la reepitelización de la superficie córneo-conjuntival.

Sumario de la invención

Es, por tanto, un objeto de la presente invención una composición oftálmica que comprenda la asociación de ácido hialurónico y ácido lactobiónico, y su uso para el tratamiento de trastornos oculares caracterizados por alteraciones de la superficie córneo-conjuntival debido a estados inflamatorios, desequilibrio del potencial de oxidación-reducción, acumulación de radicales libres, estrés sobre la superficie ocular, asociado al envejecimiento, pero también edad menos avanzada según las reivindicaciones adjuntas.

Se desvela además el uso de dicha composición oftálmica para la regeneración reparadora del epitelio de la córnea en caso de lesiones y microlesiones de la córnea, laceración menor de la córnea o conjuntiva, o daño ocular provocado por estrés traumático.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los diagramas de la evaluación de la escala visual analógica (VAS) en los cuatro grupos probados: A - ojo derecho de pacientes con edad 18-55 años; B - ojo izquierdo de pacientes con edad 18-55 años; C - ojo derecho de pacientes de más de 55 años; D - ojo izquierdo de pacientes de más de 55 años.

La Figura 2 muestra los diagramas con respecto a la evaluación de la frecuencia de síntomas en ojo seco (SANDE) en los cuatro grupos probados como antes.

La Figura 3 muestra los diagramas con respecto a la evaluación de la gravedad de síntomas en ojo seco (SANDE) en los cuatro grupos probados como antes.

La Figura 4 muestra los diagramas de la prueba de Schirmer en los cuatro grupos probados como antes.

La Figura 5 muestra los diagramas de la evaluación del tiempo de rotura de la lágrima en los cuatro grupos probados como antes.

La Figura 6 muestra los diagramas de la evaluación de la osmolaridad en los cuatro grupos probados como antes.

La Figura 7 muestra los diagramas de la tinción de Oxford en los cuatro grupos probados como antes.

La Figura 8 muestra las imágenes de helechito lagrimal (10X aumentos) en un paciente que recibió el tratamiento según la invención.

La Figura 9 muestra el diagrama de la proliferación celular *in vitro* en células SIRC expresada como % de proliferación celular de la muestra de control.

La Figura 10 muestra el diagrama de la proliferación celular *in vitro* en células SIRC expresada como porcentaje de proliferación celular de la muestra de control 24 horas y 48 horas tras la incubación con las composiciones probadas.

La Figura 11 (A) muestra el diagrama que expresa el porcentaje de cierre de heridas *in vitro* en células SIRC tras la incubación con lactobionato de sodio, ácido hialurónico y sus combinaciones.

La Figura 11 (B) muestra las imágenes de cierre de heridas en monocapa de células SIRC en los tratamientos probados.

La Figura 12 (A) muestra la micrografía de tinción con fluoresceína de una herida de córnea representativa obtenida 0, 24, 48 y 72 h después de la abrasión. La primera fila de paneles muestra epitelio de córnea lesionada tratado con PBS como control positivo en diferentes momentos de tiempo; el panel inferior muestra epitelio de córnea sin lesionar como control negativo.

La Figura 12 (B) muestra el diagrama que expresa el porcentaje de cierre de heridas *in vivo* en córneas de conejo tras la instilación de una composición que comprende 4 % de lactobionato de sodio y 4 % de lactobionato de sodio, 0,15 % de hialuronato de sodio (Ejemplo 1).

La Figura 13 (A) muestra el diagrama de la variación en la expresión de la metaloproteinasa-9 de matriz (MMP-9) en lágrimas de conejo en 24, 48 y 72 horas durante la cicatrización.

La Figura 13 (B) muestra el diagrama de la variación en la expresión de la metaloproteinasa-9 de matriz (MMP-9) en córneas de conejo en 48 y 72 horas durante la cicatrización.

La Figura 14 (A) muestra el diagrama de la variación en la expresión de TGF- β en lágrimas de conejo en 48 horas durante la cicatrización.

La Figura 14 (B) muestra el diagrama de la variación en la expresión de TGF- β en córneas de conejo en 48 y 72 horas durante la cicatrización.

Descripción de la invención

El fin de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica formulada para administración tópica oftálmica, con una acción estabilizadora y de reintegración de la película lagrimal, con actividad reepitelizante y cicatrizante, con acción antibacteriana, cuyo componente fundamental y característico es la asociación de ácido lactobiónico, o una sal del mismo, y ácido hialurónico, o una sal del mismo.

El ácido lactobiónico es un poli-hidroxiácido complejo, también conocido como ácido aldónico de polisacárido, está constituido de un poli-hidroxiácido, ácido glucónico y galactosa.

Las observaciones experimentales indican que la administración tópica de ácido lactobiónico aumenta la turgencia de la piel y corrige los signos histológicos del envejecimiento de la piel con perfiles de tolerabilidad e irritación comparables a los de la solución fisiológica. Además, los poli-hidroxiácidos no provocan fenómenos de irritación sensorial y, por tanto, son compatibles con piel clínicamente sensible, que incluye afecciones de rosácea y dermatitis atópica, y se pueden emplear después de tratamiento cosmético. El ácido lactobiónico, así como la mayoría de los poli-hidroxiácidos, tiene fuertes propiedades humectantes e hidratantes, estimula la función de la barrera constituida por la capa córnea de la epidermis y, por tanto, estimula la función protectora del estrato córneo, aumentando la resistencia de la piel a la agresión química.

En la patente italiana N° 1404752, concedida al solicitante, se ha desvelado por primera vez el uso de ácido lactobiónico en un colirio para el tratamiento de edema de la córnea, también en asociación con fenómenos de inflamación. Dichos colirios se caracterizan por la presencia de ácido lactobiónico en una concentración variable desde 5 % p/p hasta 20 % p/p, y más preferentemente desde 6 % p/p hasta 16 % p/p; además de ácido lactobiónico, las soluciones según la invención pueden comprender además otros agentes hiperosmóticos, tales como manitol o cloruro sódico, solos o en combinación. El ácido hialurónico es un constituyente natural del tejido conjuntivo, concretamente, es un glucosaminoglicano, o una molécula formada por cadenas largas sin ramificar de unidades de disacárido con ácido glucurónico y N-acetilglucosamina alternos.

El ácido hialurónico se usa en muchos campos:

- en cosméticos, en la formulación de cremas hidratantes, antienvjecimiento y antiarrugas;
- en la medicina estética, en forma de carga inyectable para corregir imperfecciones menores de la piel, tales como arrugas, labios finos, mamas vaciadas, cicatrices, etc.;
- en la ortopedia, el ácido hialurónico se inyecta por vía intrarticular (infiltración) para el tratamiento de artrosis;
- en el campo de la salud, la molécula se usa para la preparación de suplementos antienvjecimiento orales; y en oftalmología, el ácido hialurónico se usa para la preparación de colirios o pomadas oftálmicas para promover la curación de la conjuntiva tras los traumatismos.

Las pomadas oftálmicas y los colirios preparados con ácido hialurónico son útiles en el tratamiento de todos los trastornos oculares caracterizados por sequedad aparente (ojo seco o queratoconjuntivitis seca) o por lesiones de la conjuntiva (por ejemplo, conjuntivitis traumática). En estos casos, el ácido hialurónico promueve la curación de la conjuntiva en un tiempo relativamente corto y, atenuando los síntomas, mantiene el ojo hidratado. El objeto de la presente invención es proporcionar una composición oftálmica isotónica caracterizada por la presencia de la asociación de ácido lactobiónico y de ácido hialurónico, o sus sales respectivas, particularmente se prefieren sus sales de sodio. Según la invención, en la composición la concentración de ácido lactobiónico, o una sal del mismo, varía desde 1 % p/p hasta 5 % p/p, preferentemente desde 3,5 % p/p hasta 4,5 % p/p, todavía más preferentemente la concentración de ácido lactobiónico es 4,0 % p/p.

Según la invención, la concentración de ácido hialurónico, o una sal del mismo, en la composición varía entre 0,01 % p/p y 1,0 % p/p, preferentemente entre 0,05 % p/p y 0,5 % p/p, y más preferentemente la concentración de ácido hialurónico es 0,15 % p/p. Preferentemente, el ácido hialurónico usado en la presente invención tiene un peso entre 1 y 2 MDa.

La composición según la invención es una disolución acuosa, clara e incolora, con pH entre 7,0 y 7,4, y osmolalidad isotónica entre 250 y 350 mOsm/Kg.

El valor de pH es debido a un sistema tampón adecuado para mantener el valor de pH en el intervalo entre 7,0 y 7,4. Se pueden emplear en algunas realizaciones de la presente invención diversos sistemas tampón conocidos por el experto en el campo. Sin embargo, en algunas realizaciones preferidas de la presente invención, se usa el sistema tampón de fosfato de sodio monobásico/dibásico. La isotonicidad de la composición se garantiza por la presencia de una cantidad adecuada de ácido lactobiónico y de ácido hialurónico, o sus sales, en particular de sus sales de sodio.

Además de la asociación de ácido lactobiónico y ácido hialurónico, o sus sales, la composición de la presente invención puede comprender además agentes estabilizantes de la solución, agentes lubricantes, agentes hidratantes tales como hidroxipropilmetilcelulosa, o análogos estructurales o funcionales.

Según la invención, la composición también comprende conservantes y agentes quelantes. Entre los conservantes y agentes quelantes, se prefieren particularmente EDTA disódico y N-hidroximetilglicinato.

5 Según la invención, la composición oftálmica también puede incluir en su formulación uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados del grupo de factores de crecimiento, agentes antiinflamatorios, vitaminas, fibronectina, colágeno y aminoácidos.

10 Las formulaciones de la presente invención se preparan mezclando y agitando los componentes hasta que todos los componentes estén en solución.

La solución así obtenida se esteriliza entonces por filtración (0,2 micrómetros) o por medio de tratamiento térmico a temperatura de 121 °C, durante 20 min, a 1 atmósfera. Sin embargo, los expertos pueden variar y optimizar las condiciones de esterilización.

15 **Realizaciones preferidas de la invención**

Según la presente invención, la composición oftálmica se puede preparar en cualquier forma farmacéutica que permita su solicitud en el saco conjuntival, tal como gotas para los ojos, colirio, geles, pomadas, espray, pero preferentemente se prepara en forma de colirios, administrables como gotas, constituyendo cada gota una forma de 20 unidad de dosificación para permitir la fácil administración y uniformidad de la dosificación.

Para fines ilustrativos, se presentan dos ejemplos de formulación particularmente preferida.

Ejemplo 1 - Formulación de colirios

Ingrediente	% p/p
Lactobionato de sodio	4,0
Hialuronato de sodio	0,15
Dihidrogenofosfato de sodio dihidratado	0,225
Difosfato de sodio deshidratado	0,686
EDTA disódico	0,100
Hidroximetilglicinato de sodio	0,002
Agua destilada	c.s. hasta 100 g

25 En una realización particularmente preferida de la invención, normalmente se instilan 1-2 gotas de la composición en el saco conjuntival, 2-3 veces al día o más, sin embargo, la cantidad terapéuticamente eficaz es definida por el médico en función de la afección del paciente. La composición también se puede instilar mientras que se llevan 30 lentillas. Se ajustarán la dosificación y el método de administración para proporcionar niveles suficientes del principio activo o para mantener el efecto deseado. Los factores adicionales que se deben considerar incluyen: gravedad de la afección, evolución de la enfermedad, edad, peso y sexo del paciente, momento y frecuencia de administración, dieta, asociación con otros fármacos, reacciones de sensibilidad, tolerancia y respuesta a terapia.

35 El uso de la presente invención no se limita a los seres humanos, sino que se puede extender, cuando corresponda, a otros mamíferos.

El colirio según la presente invención ha demostrado ser altamente tolerable por los pacientes, que en ensayos clínicos confirmaron una sensación de bienestar después de usar el producto.

40 Según la invención, la composición proporcionada es particularmente simple, ya que comprende un número muy limitado de componentes y excipientes: esto representa una característica ventajosa que permite reducir hasta un mínimo el riesgo de posibles fenómenos alérgicos o de sensibilización.

45 En particular, en la realización de la formulación de dosis única o formulación de múltiples dosis sin conservante, se puede eliminar el sistema conservante.

Ejemplo 2 - Formulación de los colirios de dosis única o de múltiples dosis sin conservante

Ingrediente	% p/p
Lactobionato de sodio	4,0
Hialuronato de sodio	0,15
Dihidrogenofosfato de sodio dihidratado	0,225
Difosfato de sodio dihidratado	0,686
Agua destilada	c.s. hasta 100 g

50 Según los resultados de los estudios experimentales llevados a cabo, un campo de aplicación particularmente interesante para la composición según la invención es el tratamiento de alteraciones de la superficie córneo-conjuntival debido a estados inflamatorios, estrés oxidativo, desequilibrio del potencial de oxidación-reducción y acumulación de radicales libres, síndrome del ojo seco y abrasiones traumáticas. Además, los resultados

experimentales han demostrado que la invención proporciona una composición oftálmica para el uso en cicatrización y reepitelización de la superficie córneo-conjuntival.

5 En realidad, los datos del estudio descritos a continuación referentes al análisis de marcadores de proteína implicados en el proceso de cicatrización confirmaron fenotípicamente lo que se conoce de la bibliografía. Se conoce que tanto MMP-9 como TGF- β se correlacionan negativamente con el proceso de curación de heridas; particularmente en los procesos de cicatrización que afectan la córnea, altos niveles de ambas proteínas retrasan, con el tiempo, los mecanismos implicados en la reepitelización de la córnea [Kim E.C. et al. Acta Ophthalmol. 2012. 90: 540-6]. Los niveles de ambas proteínas se reducen en las lágrimas y en las córneas, 48 horas después de la
10 lesión, tras la instilación de la composición que tiene la formulación como se describe en el Ejemplo 1, que comprende 4 % de lactobionato de sodio y 0,15 % de hialuronato de sodio, proporcionan evidencia experimental de un rápido proceso de reepitelización de la córnea tras el uso de dicha composición.

15 Sorprendentemente, la composición oftálmica según la invención ha demostrado que también proporciona protección contra bacterias. Actualmente está en curso investigación adicional, los datos preliminares en relación con esta actividad son alentadores.

20 Debido a sus características técnicas adicionales, el uso técnico de la invención es particularmente importante debido a que evita el uso de bacteriostáticos, como antibióticos y desinfectantes químicos, que son demasiado agresivos e irritantes para el ojo, prefiriéndose sustancias no tóxicas, bien toleradas, cuya seguridad está bien confirmada. La composición según la invención que tiene actividad antibacteriana, actividad reepitelizante, se puede usar para contrarrestar las alteraciones de la superficie córneo-conjuntival debidas a estados inflamatorios, desequilibrio del potencial de oxidación-reducción, acumulación de radicales libres y estrés oxidativo.

25 La composición objeto de la invención, gracias a sus componentes, añade a la acción de sustituto de lágrimas que estabiliza y repone la película lagrimal, común a muchos productos similares ya disponibles a la venta, también la acción reepitelizante, de cicatrización y antibacteriana.

30 La invención y su realización serán ahora descritos mediante ejemplos que permitirán a los expertos entender completamente las ventajas que derivan del uso de la misma.

Parte experimental

35 Estudio 1 - Evaluación de la seguridad y eficacia de la asociación de ácido lactobiónico y ácido hialurónico en el tratamiento de síndrome del ojo seco

40 El estudio se diseña para evaluar la seguridad y la eficacia de una composición de colirio que contiene ácido lactobiónico, o una sal del mismo, y ácido hialurónico, o una sal del mismo, en comparación con una composición idéntica que no contiene ácido lactobiónico, contra un conjunto de síntomas normalmente reconocidos en el síndrome del ojo seco. En el estudio, la fase de tratamiento de cinco semanas fue seguida por un periodo de seguimiento de una semana para evaluar la seguridad de la composición.

45 En el día 7, día 21, día 35, día 45 se realizaron múltiples evaluaciones oftalmológicas para excluir el efecto adverso de las composiciones probadas en la estructura y fisiología del ojo.

50 Escala visual analógica (VAS). Se determinó una puntuación de molestia ocular global usando una escala visual analógica (VAS) de 100 mm en donde 0 significa ningún síntoma y 100 significa indica la peor molestia posible. Esta evaluación se realizó antes de cualquier evaluación oftálmica en cualquier visita. Los síntomas oculares específicos a evaluar con la VAS incluyeron: sensación de cuerpos extraños, quemazón/escozor, picor, dolor, sensación pegajosa, vista nublada, fotofobia.

55 Evaluación de síntomas en ojo seco (SANDE). Puesto que no existe prueba diagnóstica de "referencia" para EOS (enfermedad del ojo seco), comúnmente se usan una combinación de signos y síntomas como criterios de diagnóstico. Debido a la variabilidad de los síntomas del ojo seco y las limitaciones de las pruebas clínicas disponibles, los cuestionarios que registran los síntomas de los pacientes son herramientas muy útiles para diagnosticar y seguir la enfermedad del ojo seco. El cuestionario de la evaluación de síntomas en ojo seco (SANDE) es un cuestionario breve e intuitivo basado en una escala visual analógica que cuantifica tanto la gravedad como la frecuencia de los síntomas del ojo seco. SANDE comprende dos preguntas, y cada pregunta emplea una escala visual analógica lineal horizontal de 100 mm. La medición de la frecuencia de síntomas varía desde "raramente" hasta "todo el tiempo", y la gravedad de síntomas desde "muy leve" hasta "muy grave".
60

65 La prueba de Schirmer es una prueba simple que permite cuantificar la secreción de lágrimas basales, que resulta reducida en algunas enfermedades (LES, artritis reumatoide, síndrome de Sjogren) o debido a causas iatrogénicas relacionadas con la toma de medicación. Se realiza poniendo tiras de tejido de papel de 2 mm en el fondo de saco conjuntival y esperando algunos minutos (5 min). Entonces se mide la porción de tira humedecida; por debajo de un cierto valor se clasifica como ojo seco, así es necesaria una terapia de sustitución.

El ojo es normal cuando se obtienen ≥ 15 mm de papel húmedo después de 5 min; el ojo está levemente seco cuando se obtienen 14-9 mm de papel húmedo después de 5 min; el ojo está moderadamente seco cuando se obtienen 8-4 mm de papel húmedo después de 5 min; el ojo está gravemente seco cuando se obtienen < 4 mm de papel húmedo después de 5 min.

El tiempo de rotura de la lágrima (TBUT) es una prueba clínica usada para evaluar la enfermedad de ojo seco evaporativo. Para medir TBUT, se instila fluoresceína dentro de la película lagrimal del paciente y se le pide al paciente que no parpadee mientras que la película lagrimal se observa bajo un haz ancho de iluminación de azul de cobalto. Se registra TBUT como el número de segundos que transcurren entre el último parpadeo y la aparición del primer punto seco en la película lagrimal, como se observa en esta progresión de estas fotos de lámpara de hendidura con el tiempo. Se considera anormal un TBUT inferior a 10 segundos.

Osmolaridad Se ha evaluado el cambio en la osmolaridad de la película lagrimal por TearLab Instrument. Osmolaridad < 290 mOsm se considera normal, $> 290 < 316$ se considera leve; > 316 es de moderada a grave.

Examen con lámpara de hendidura (SLE) tras la tinción de Oxford con fluoresceína para evaluar la alteración en el margen del párpado, conjuntiva, córnea, cámara anterior, iris y lente. Cierta grado de tinción corneal es un resultado normal en hasta 79 % de las córneas y 71 % de conjuntiva en ojos normales. Sin embargo, los signos de tinción de la córnea también son indicativos de córnea comprometida. De forma interesante, todavía no está absolutamente claro cómo actúa la fluoresceína sobre la superficie ocular, sin embargo, es comúnmente aceptado que solo penetra en discontinuidades o huecos en el epitelio y en espacios intracelulares y tejidos subyacentes mediante células dañadas.

Criterios de inclusión:

En el estudio clínico se han incluido:

- Adultos masculinos y femeninos de 18 años edad y mayores;
- Sujetos con al menos 3 meses de antecedentes documentados de ojo seco en ambos ojos, diagnosticado como síndrome del ojo seco, queratoconjuntivitis seca (QCS) o debido a síndrome de Sjogren;
- Sujetos que han suspendido todas las lágrimas artificiales durante la duración del periodo de tratamiento;
- Sujetos que no han usado colirios esteroides durante 4 semanas antes del estudio;
- Sujetos que han dejado de usar lentillas una semana antes del estudio y durante todo el estudio.

Del estudio clínico se han excluido:

- Mujeres embarazadas o lactantes;
- Mujeres en edad fértil que no estén usando contracepción sistémica, no posmenopáusicas, no quirúrgicamente esterilizadas;
- Sujetos sometidos a cualquier tipo de cirugía ocular o traumatismo ocular en el plazo de cuatro meses antes del estudio;
- Sujetos afectados por otras enfermedades o afección considerada por el investigador/médico que es incompatible con la evaluación necesaria en este estudio;
- Sujetos que tienen una inflamación del ojo activa en curso diferente de QCS;
- Participación en cualquier otro ensayo clínico en el plazo de 30 días antes del estudio.

Los pacientes enrolados en el estudio han sido divididos en dos grupos según la edad: Grupo A, 20 pacientes con edad entre 18 y 50 años y Grupo B, 20 pacientes mayores de 50 años. Dentro de cada grupo, aleatoriamente la mitad de los sujetos recibió la composición que comprende la asociación de 4 % de lactobionato de sodio y 0,15 % de ácido de hialuronato de sodio y la mitad recibió la composición de control que comprende solo 0,15 % de hialuronato de sodio. Todos los pacientes recibieron 1-2 gotas de la composición tres veces al día durante cinco semanas seguido por un periodo de seguimiento de una semana.

Resultados

Los resultados de la evaluación de seguridad y eficacia de la asociación de ácido lactobiónico y ácido hialurónico en el tratamiento de síndrome del ojo seco se ha mostrado en las Figuras 1-7 por la evaluación de los parámetros anteriormente mencionados y demuestran que los colirios basados en ácido hialurónico solo o la asociación de ácido hialurónico y lactobiónico son ambos eficaces – como era de esperar – en mejorar los síntomas y signos del ojo seco ya después de una semana de tratamiento. Sin embargo, los pacientes tratados con la asociación de ácido hialurónico y lactobiónico mostraron una mejoría significativamente mejor también con respecto a los pacientes tratados con ácido hialurónico solo, y dicha diferencia fue más evidente en el grupo de pacientes de más de 55 años, indicando así una superioridad de la asociación de ácido hialurónico y lactobiónico, especialmente en la edad avanzada. No se conocen otros colirios que tengan este comportamiento diferente con respecto a la edad de los

pacientes.

Estudio 2 – Prueba de hehecho lagrimal

5 El conocimiento práctico de la composición de la película lagrimal es muy útil para el profesional clínico para el diagnóstico y tratamiento de pacientes. La prueba de hehecho lagrimal es una prueba de laboratorio, pero se puede aplicar en el ámbito clínico para investigar en una forma simple la composición de la película lagrimal. Consiste en secar una pequeña muestra de fluido lagrimal sobre un portaobjetos de microscopio de vidrio limpio; esto produce un patrón de cristalización característico, descrito como un 'hehecho lagrimal'.

10 La prueba de hehecho proporciona de una forma indirecta una indicación cualitativa de la estabilidad de la película lagrimal: así, la prueba puede evaluar el equilibrio entre las mucoproteínas y las sales disueltas en lágrimas y entonces la osmolaridad de la película lagrimal.

15 En el estudio de los presentes inventores, el paciente (mujer, 40 años, afectada por ojo seco) ha recibido el tratamiento con la composición según la invención durante 15 minutos.

Resultados

20 Los resultados de la prueba de hehecho se muestran en la Figura 8, la imagen (10x aumentos) del patrón de cristalización obtenido indica que antes del tratamiento el hehecho era muy pobre en los bordes de la lágrima e incompleto en el centro de la lágrima. Quince minutos después de la administración de Lactoyal se pudo observar un patrón de hehecho más denso y más estructurado tanto en los bordes de la lágrima como en el centro de la lágrima.

25 Estudio 3 - Ensayo de cristal violeta para determinar el efecto de la composición según la invención sobre la supervivencia e inhibición del crecimiento de célula cultivada

30 Las células adherentes se desprenden de las placas de cultivo celular durante la muerte celular. Esta característica se puede usar para la cuantificación indirecta de muerte celular y para determinar diferencias en la proliferación tras cualquier estimulación detectando células adherentes y viables teñidas con colorante cristal violeta que se une a proteínas y ADN. Las células que experimentan muerte celular pierden su adherencia y posteriormente se pierden de la población de células, reduciendo la cantidad de tinción de cristal violeta en un cultivo. Este protocolo de ensayo proporciona un método de cribado rápido y fiable adecuado para evaluar el impacto de una composición sobre la supervivencia celular e inhibición del crecimiento. Tras la solubilización, se puede cuantificar la cantidad de colorante absorbido por la monocapa de células en un espectrofotómetro o lector de placas.

35 Se sembraron células SIRC [córnea de conejo del Statens Serum Institut] (ATCC® CCL-60™) y se cultivaron hasta la densidad deseada según el protocolo del fabricante.

40 Las composiciones ensayadas son:

CTRL = control (PBS, solución salina tamponada con fosfato);
LS 1 % = 1 % de lactobionato de sodio;
HA 0,03 % = 0,03 % de hialuronato de sodio;
45 HA 0,075 % = 0,075 % de hialuronato de sodio;
MEZCLA 1 = 1 % de lactobionato de sodio, 0,03 % de hialuronato de sodio;
MEZCLA 2 = 1 % de lactobionato de sodio, 0,075 % de hialuronato de sodio;

50 Después de lavar con PBS, se añadió solución de cristal violeta a las células y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Se retiró cuidadosamente el medio de cultivo de los pocillos.

55 Se lavó suavemente la placa con PBS calentado al menos hasta temperatura ambiente.

Entonces se lavó la placa dos veces en agua de grifo por inmersión en un vaso de precipitados grande y se drenó al revés sobre toallitas de papel. Para solubilizar el colorante, se añadió 1 % de SDS a cada pocillo.

60 Se agitó la placa en un agitador orbital hasta que el color fue uniforme sin áreas de coloración densa en el fondo de los pocillos.

Se leyó la absorbancia de cada pocillo por espectrofotómetro a 570 nm.

Resultados

65 Los valores de proliferación celular obtenidos tras el tratamiento con las composiciones ensayadas se muestran en

los diagramas de la Figura 9, en donde es evidente el efecto sinérgico de lactobionato de sodio y hialuronato de sodio en la composición según la invención.

5 La Figura 10 muestra los valores de proliferación celular después de 24 horas y 48 horas de incubación con las composiciones probadas.

Estudio 3 - Ensayo de cicatrización en células SIRC

10 Se investigó la consecuencia biológica directa de la administración de la composición que comprende lactobionato de sodio y hialuronato de sodio en células SIRC por ensayo de migración de células, es decir, migración de célula SIRC para el cierre de heridas. Se incubaron células SIRC en una placa multipocillos de 24 pocillos, recubierta por fibronectina y colágeno de tipo I, usando MEM con 10 % (v/v) de suero bovino fetal hasta que el crecimiento cubrió completamente la superficie del pocillo. Se usó un elevador de células para raspar una línea a través del centro de la placa. Se lavaron dos veces con PBS las células restantes en ambos lados. Entonces, se incubaron las células durante 24, 48 y 72 horas a 37 °C con 5 % de CO₂, respectivamente, con:

1. medio (MEM con 10 % [v/v] de suero bovino fetal) (CTRL);
2. medio (MEM con 10 % [v/v] de suero bovino fetal) que contiene 1 % de lactobionato de sodio (LS 1 %);
3. medio (MEM con 10 % [v/v] de suero bovino fetal) que contiene 0,03 % de hialuronato de sodio (HA 0,03 %);
- 20 4. medio (MEM con 10 % [v/v] de suero bovino fetal) que contiene 0,075 % de hialuronato de sodio (HA 0,075 %);
5. medio (MEM con 10 % [v/v] de suero bovino fetal) que contiene 1 % de lactobionato de sodio, 0,03 % de hialuronato de sodio (MEZCLA 1);
- 25 6. medio (MEM con 10 % [v/v] de suero bovino fetal) que contiene 1 % de lactobionato de sodio, 0,075 % de hialuronato de sodio (MEZCLA 2).

Se fotografió el grado de migración y se estimó con tres experimentos separados (triplicado).

Resultados

30 Se empleó el ensayo de migración como un modelo *in vitro* para la migración de células epiteliales durante la cicatrización para examinar la influencia de lactobionato de sodio, hialuronato de sodio, y sus combinación, sobre células SIRC. Los resultados se muestran en la Figura 11 (A y B). Se observó la evidencia de migración celular cuando el araño en la monocapa de células se cerró gradualmente durante la incubación con lactobionato de sodio, hialuronato de sodio, y su combinación, durante 24 -72 horas.

35 Los valores del porcentaje de cierre de heridas obtenido en células SIRC se informan en la Tabla 1 y se representan en el diagrama de la Figura 11 (A).

40

Tabla 1

	Control CTRL	LS 1 %	HA 0,03 %	HA 0,075 %	MEZCLA 1	MEZCLA 2
24 horas	17	19	21	22,8	22	24,8
48 horas	39,3	49	50,3	50,5	50,6	53,8
72 horas	79	89	93	95	91	90

45 La Tabla 1 y la Figura 11 (A) muestran que las células SIRC en todos los grupos de tratamiento proliferaron a las 24, 48 y 72 horas en comparación con aquellas en el grupo de control. Los datos indican que la variación en el porcentaje de cierre de heridas es mayor tras la incubación durante 24 y 48 horas en presencia de lactobionato de sodio y hialuronato de sodio tras la incubación con los dos compuestos individuales durante el mismo tiempo con respecto al control, y dicho porcentaje de cierre de heridas es incluso mayor cuando en la asociación la concentración de hialuronato de sodio es 0,075 % en vez de 0,03 %. A las 72 horas parece que el cierre de heridas es mayor debido a la incubación con solo hialuronato de sodio. Por tanto, dichos datos a 24 y 48 horas indican claramente que la asociación de lactobionato de sodio y hialuronato de sodio es capaz de promover la reepitelización más rápidamente que los componentes individuales que proporcionan un empuje proliferativo importante en un tiempo más corto. La importancia de esta característica será evidente para el experto en el campo, ya que interfiere positivamente con la velocidad del proceso de cicatrización. A tiempo de incubación más largo (72 horas), la asociación cesa su acción positiva, ya que el proceso de reepitelización ya ha ocurrido y se ha completado. De hecho, es evidente la importancia de que el proceso de reepitelización se establezca muy rápidamente, ya que la velocidad de reepitelización está limitando el resultado de la curación y la asociación de lactobionato de sodio y hialuronato de sodio ha demostrado que permite dicha velocidad *in vitro*.

55 La evidencia de la migración celular se puede observar en el araño en la monocapa de células gradualmente cerradas durante la incubación en las imágenes de la Figura 11 (B).

60 Estudio 4 - Estudio animal

Se usaron en este estudio conejos blancos macho de Nueva Zelanda que pesaban aproximadamente 2,5 kg. Todos los conejos se proporcionaron por Harlan-Envigo (Milán) y el Comité Ético de la Universidad de Catania autorizó todos los procedimientos. Los animales se anestesiaron con una inyección intramuscular de Zoletil (Virbac lab.) a 5 mg/kg (0,1 ml por conejo). Para evaluar el efecto de reepitelización de la composición según la invención que tiene la formulación como se describe en el Ejemplo 1 de la presente solicitud y compararlo con el de una solución que comprende 4 % de lactobionato de sodio, se sometieron 23 ojos de conejo a desepitelización corneal en un ojo por Algerbrush II (Accutome, EE.UU.), no se dañó el ojo contralateral y se usó como control (sin cicatrización (sin WH)).

Los animales se dividieron en tres grupos:

- Nº 8 ojos de conejo instilados por la composición que comprende 4 % de lactobionato de sodio;
- Nº 7 ojos de conejo instilados por la composición del Ejemplo 1;
- Nº 8 ojos de conejo instilados por PBS;

Según el protocolo de tratamiento, los ojos de conejo recibieron colirios cuatro veces al día cada 2 horas. Se observaron diariamente (T0, T24, T48, T72) los ojos lesionados después de 1 mg/ml de tinción de fluoresceína para demarcar el área herida. 48 y 72 horas después de la lesión, se sacrificaron los conejos.

Se usó una solución de fluoresceína sódica para evaluar la relación de curación del epitelio de la córnea. Se cuantificó el área de la herida de la córnea a partir de fotografías usando el software de análisis Imagen J, Figura 12 (A). Se expresó la tasa de curación como el porcentaje de cierre de heridas. Los datos se informan en la Tabla 2 y se presentaron gráficamente en el diagrama de la Figura 12 (B).

Tabla 2

± dS	Control	Composición que comprende 4 % de lactobionato de sodio, 0,15 hialuronato de sodio	Composición que comprende 4 % de lactobionato de sodio
T0	0	0	0
T24	47 ± 19	68 ± 17 p<0,01 frente a control	60 ± 12
T48	80 ± 11	91 ± 6 p<0,01 frente a control	92 ± 6 p<0,01 frente a control
T72	100 ± 12	100 ± 0,5	104 ± 0

Estudio 5 - *Actividad de MMP-9*

Existe una gran cantidad de evidencia referente a las metaloproteinasas de la matriz (MMPs), que desempeñan una función clave en regular la inflamación, degradación y remodelación de ECM (matriz extracelular) nueva durante el proceso de cicatrización. Como parte de la respuesta del tejido a la lesión, la actividad de MMPs está estrictamente regulada en diversos niveles, que incluyen la expresión génica y los inhibidores de tejido de MMPs (TIMPs) [Robert A.R. Tetracyclines and the treatment of corneal stromal ulceration: a review. *Cornea*. 2000;19:274-277. Fini M. E. et al. Proteolytic mechanisms in corneal ulceration and repair. *Arch Dermatol Res*. 1998; 290 Suppl: S12-S23. Toriseva M. et al. Proteinases in cutaneous wound healing. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66:203-224]. Todas las clases de proteínas de la matriz extracelular y moléculas de señalización tales como citocinas y factores de crecimiento son sustratos para las MMPs. En particular, MMP-9, desempeña una función significativa en la remodelación de la ECM del estroma de córnea y la reforma de la membrana basal epitelial [Mulholland B. et al. Matrix metalloproteinase distribution during early corneal wound healing. *Eye*. 2005; 19: 584-588. Ollivier F.J. et al. Proteinases of the cornea and precocular tear film. *Vet Ophthalmol*. 2007; 10: 199-206]. MMP-9, también conocida como gelatinasa B, es secretada por células epiteliales de la córnea, macrófagos y neutrófilos durante la cicatrización de la córnea. Se han descrito cambios al nivel de MMPs en la película lagrimal y la expresión de MMP en la córnea durante la cicatrización. MMP-9, la enzima degradadora de matriz, se expresa altamente en el sitio de inflamación y está implicada en los procesos de remodelación. También facilita el reclutamiento de células inflamatorias, tales como eosinófilos y neutrófilos a través de las membranas basales. Se conoce que en córneas dañadas, se ha encontrado que la proteólisis en el fluido lagrimal es significativamente elevada en comparación con ojos normales.

En el estudio de los presentes inventores, se evaluó el cambio en las proteínas MMP-9 de la lágrima y la córnea por ELISA según procedimientos convencionales conocidos por el experto en el campo.

Resultados

El resultado del análisis de las actividades de MMP-9 de las muestras de lágrima en el grupo experimental en comparación con el grupo de control se muestra en la Tabla 3 y en el diagrama de la Figura 13 (A); presentaron una disminución significativa en la actividad de MMP-9 en las condiciones experimentales de los presentes inventores.

Tabla 3

± dS	24 horas	48 horas	72 horas
sin WH	1 ± 0,19	1 ± 0,3	1 ± 0,01
WH	1,4 ± 0,15	1,8 ± 0,14	0,7 ± 0,1
	p<0,01 frente a sin WH	p<0,01 frente a sin WH	
Composición que comprende 4 % de lactobionato de sodio, 0,15 % de hialuronato de sodio	1,9 ± 0,75	1,2 ± 0,06 p<0,01 frente a WH	0,7 ± 0,3
Composición que comprende 4 % de lactobionato de sodio	1,3 ± 0,5	1,1 ± 0,4 p<0,05 frente a WH	0,6 ± 0,07

La aceleración de la cicatrización de la córnea tras la administración de la asociación de lactobionato de sodio y hialuronato de sodio está probablemente correlacionada con la reducción en la actividad de MMP-9 y la atenuación de la inflamación en el sitio de la herida.

Se evaluó por ensayo de ELISA el nivel de metaloproteinasas MMP-9 en la córnea de los ojos tratados con la composición como se formuló en el Ejemplo 1 de esta descripción. El ensayo mostró que en las córneas tratadas la actividad de las metaloproteinasas se reduce en comparación con la del control positivo que recibió la lesión de la córnea (WH) y similar al control negativo proporcionado por la córnea no lesionada, como se muestra en la Tabla 4 y en el diagrama Fig. 13 (B).

Tabla 4

± dS	48 horas	72 horas
sin WH	152 ± 2,1	152 ± 2,1
WH	167 ± 4,2	173 ± 5,2
	p<0,01 frente a sin WH	p<0,01 frente a sin WH
Composición que comprende 4 % de lactobionato de sodio, 0,15 % de hialuronato de sodio	153 ± 1,1 p<0,01 frente a WH	158 ± 3,2 p<0,01 frente a WH

Estudio 6 - *Actividad de TGF-β*

El factor de crecimiento transformante-beta (TGF-β) es un péptido multifuncional que modula la proliferación y diferenciación celular en muchos tipos de células y acelera la respuesta de reparación tisular. De la bibliografía se conoce que en córneas de rata 4 horas después de la abrasión, células inflamatorias agudas que muestran alta positividad hacia TGF-β aparecen en el estroma periférico y se dispersan gradualmente hasta la córnea central. A las 24 horas, estas células se acumularon y formaron una pseudomembrana en el defecto epitelial, que también mostró una intensa positividad hacia TGF-β, sugiriendo que el péptido participa incluso en la respuesta inflamatoria aguda. Normalmente, la reepitelización ocurre sobre la pseudomembrana y se completa en 48 horas [Hayashi K. et al. Expression of transforming growth factor-beta in wound healing of vitamin A-deficient rat corneas. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1989; 30: 239-47]. En este estudio, se investigó inmunohistoquímicamente la expresión de TGF-β en la curación de heridas epiteliales de córneas de conejo, tanto en córneas como en lágrimas.

Basándose en los resultados previamente obtenidos que muestran que el momento de tiempo crítico para el efecto de restauración de la piel es 48 horas después de la abrasión, se realizó el ensayo de ELISA para medir el nivel de TGF-β.

Resultados

Los resultados mostraron que en la lágrima del ojo instilado con la composición que tiene la formulación como en el Ejemplo 1, se reduce el nivel de proteína de TGF-β en comparación con el de los ojos de control (WH) y similar al ojo no lesionado. Véanse los resultados en la Tabla 5 y Figura 14 (A).

Tabla 5

± dS	48 horas
sin WH	3075 ± 288
WH	4402 ± 308 p<0,05 frente a sin WH
Composición que comprende 4 % de lactobionato de sodio, 0,15 % de hialuronato de sodio	3082 ± 743

También se ha confirmado un resultado similar referente al nivel de TGF-β en córnea en donde el ensayo de ELISA ha resaltado el reducido nivel de TGF-β en córneas de ojo tratadas con la composición que comprende 4 % de lactobionato de sodio y 0,15 de hialuronato de sodio 48 horas y 72 horas después de la abrasión. El resultado confirma una respuesta inflamatoria reducida a la lesión de tejido y posterior cicatrización en córneas tratadas en comparación con córneas sin tratar. Véanse los resultados en la Tabla 6 y la Figura 14 (B).

Tabla 6

± dS	48 horas	72 horas
sin WH	11,4 ± 6	11,4 ± 6
WH	98,7 ± 8 p<0,01 frente a sin WH	53 ± 4 p<0,01 frente a sin WH
Composición que comprende 4 % de lactobionato de sodio, 0,15 % de hialuronato de sodio	77 ± 3,7 p<0,01 frente a WH	28 ± 11 p<0,01 frente a WH

Análisis estadístico

- 5 Todos los resultados se expresaron como la media ± desviación estándar (DE). Los datos se compararon entre los grupos de tratamiento usando el análisis de la varianza (ANOVA) unilateral. Las diferencias se consideraron significativas a $P < 0,05$.

Conclusión

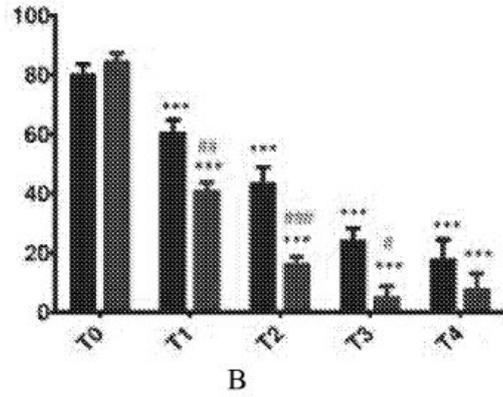
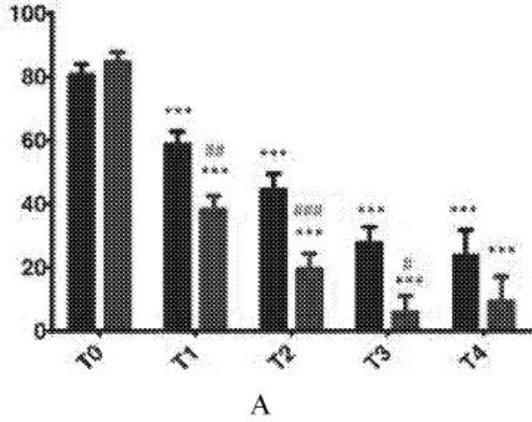
- 10 Son muy importantes una película lagrimal sana y superficie de la córnea y conjuntiva sana para muchas funciones importantes del ojo. Las inflamaciones del ojo, posteriores a lesión o debidas a infecciones microbiológicas, y la enfermedad del ojo seco son problemas clínicos significativos que necesitan ser resueltos, pero su complejidad y la mala correlación entre los signos clínicos y la diversificación de los síntomas informados dificulta que el profesional clínico identifique el correcto enfoque terapéutico. El estudio de los presentes inventores demuestra que la administración tópica de una composición que comprende ácido lactobiónico, o una sal del mismo, y ácido hialurónico, o una sal del mismo, conduce a una respuesta significativamente mejor a lesión, estrés oxidativo, envejecimiento. Los presentes inventores fueron capaces de demostrar que la preparación farmacéutica según la invención aceleraba rápidamente el proceso de curación, mientras que reducía la inflamación local.
- 15
- 20 confirma la posible aplicación de una composición que comprende lactobionato de sodio y hialuronato de sodio para el tratamiento de lesiones e inflamaciones de la superficie de la córnea. Además, parece que la administración tópica es responsable de un aumento en los procesos de epitelización celular que ofrece escenarios prometedores usando la asociación de ácido lactobiónico y ácido hialurónico o sus sales, para fines terapéuticos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición oftálmica que comprende la asociación de ácido lactobiónico, o una sal del mismo, que varía entre 1 % p/p y 5 % p/p, y ácido hialurónico, o una sal del mismo, que varía entre 0,01 % p/p y 1,0 % p/p, y uno o más excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables.
2. Composición oftálmica según la reivindicación 1, en donde la cantidad de ácido lactobiónico, o de su sal, varía entre 3,5 % p/p y 4,5 % p/p, y la cantidad de ácido hialurónico, o de su sal, varía entre 0,05 % p/p y 0,5 % p/p.
- 10 3. Composición oftálmica según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el ácido lactobiónico, o su sal, es igual a 4 % p/p, y el ácido hialurónico, o su sal, es igual a 0,15 % p/p.
- 15 4. Composición oftálmica según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la sal es una sal de sodio.
5. Composición oftálmica según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que es isotónica, con osmolalidad entre 250 y 350 mOsm/Kg y que tiene pH entre 7,0 y 7,4.
- 20 6. Composición oftálmica según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que comprende además agentes estabilizantes de la disolución, agentes lubricantes, agentes hidratantes, agentes de tamponamiento, conservantes y agentes quelantes.
7. Composición oftálmica según la reivindicación 6, que comprende EDTA disódico y N-hidroximetilglicinato.
- 25 8. Composición oftálmica según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además agentes terapéuticos adicionales, seleccionados del grupo de: factores de crecimiento, agentes antiinflamatorios, vitaminas, fibronectina, colágeno y aminoácidos.
- 30 9. Composición oftálmica según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en cualquier forma para administración tópica.
10. Composición oftálmica según la reivindicación 9 en forma de colirios, gel, pomada, espray.
- 35 11. Composición oftálmica según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que tiene la siguiente formulación:
- | | |
|---|------------------|
| Lactobionato de sodio | 4,0 % p/p |
| Hialuronato de sodio | 0,15 % p/p |
| Dihidrogenofosfato de sodio dihidratado | 0,225 % p/p |
| Difosfato de sodio dihidratado | 0,686 % p/p |
| EDTA disódico | 0,100 % p/p |
| Hidroximetilglicinato de sodio | 0,002 % p/p |
| Agua destilada | c.s. hasta 100 g |
12. Composición oftálmica según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que tiene la siguiente formulación:
- | | |
|---|-------------------|
| Lactobionato de sodio | 4,0 % p/p |
| Hialuronato de sodio | 0,15 % p/p |
| Dihidrogenofosfato de sodio dihidratado | 0,225 % p/p |
| Difosfato de sodio dihidratado | 0,686 % p/p |
| Agua destilada | c.s. hasta 100 g. |
- 40 13. Composición oftálmica según las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en el tratamiento de trastornos oculares caracterizados por estados inflamatorios, alteración de la película lagrimal, síndrome del ojo seco, estrés oxidativo, estrés sobre la superficie ocular, envejecimiento de los ojos.
- 45 14. Composición oftálmica según las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en la cicatrización del epitelio córneo-conjuntival.

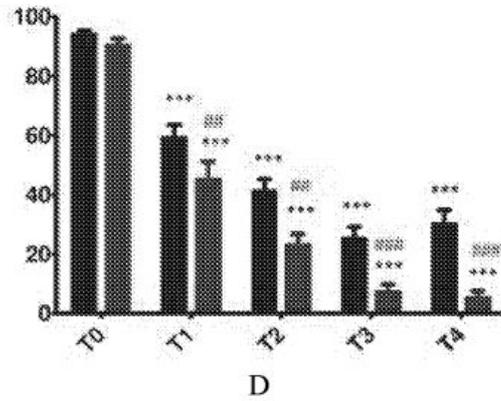
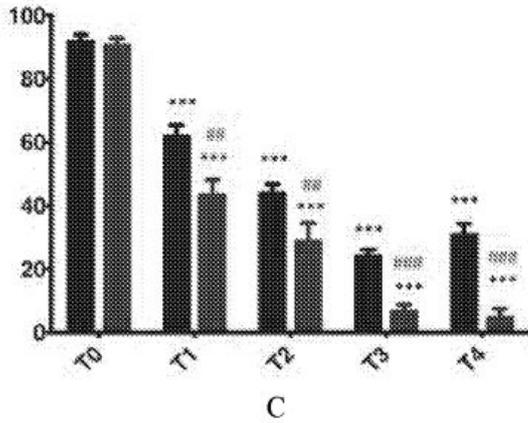
VAS (Edad 18-55) Ojo derecho

VAS (Edad 18-55) Ojo izquierdo



VAS (Edad superior a 55) Ojo derecho

VAS (Edad superior a 55) Ojo izquierdo



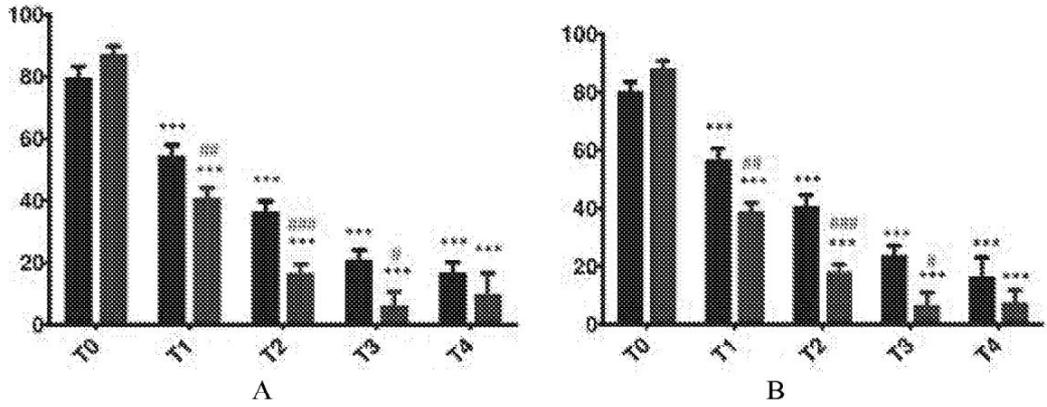
 composición que comprende 0,15 % de hialuronato de sodio
 composición que comprende 4 % de lactonato de sodio y 0,15 % de hialuronato de sodio

*** p<0,001 frente a T0; ### p<0,001; ## p<0,01; # p<0,05 frente a composición que comprende 0,15 % de hialuronato de sodio

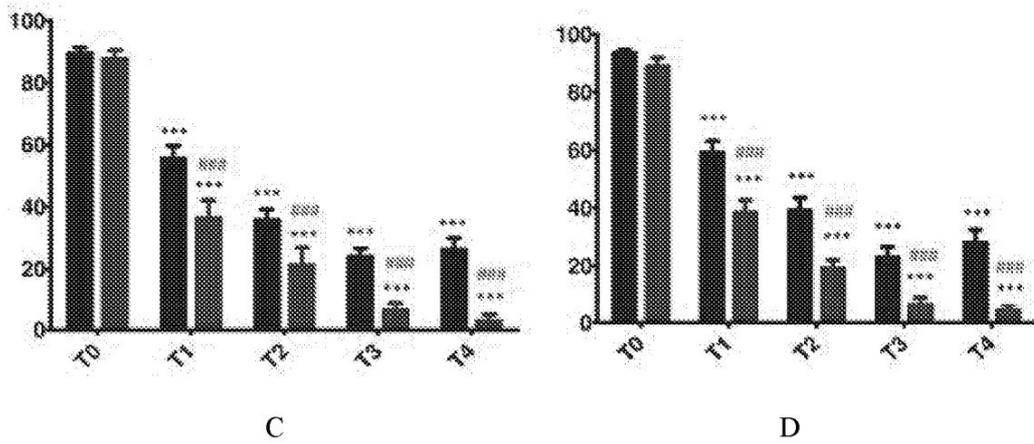
Figura 1

ES 2 747 501 T3

Frec. de Sande (Edad 18-55) Ojo derecho Frec. de Sande (Edad 18-55) Ojo izquierdo



Frec. de Sande (Edad superior a 55) Ojo derecho Frec. de Sande (Edad superior a 55) Ojo izquierdo



- composición que comprende 0,15 % de hialuronato de sodio
- composición que comprende 4 % de lactonato de sodio y 0,15 % de hialuronato de sodio

*** p<0,001 frente a T0; ### p<0,001; ## p<0,01; # p<0,05 frente a composición que comprende 0,15 % de hialuronato de sodio

Figura 2

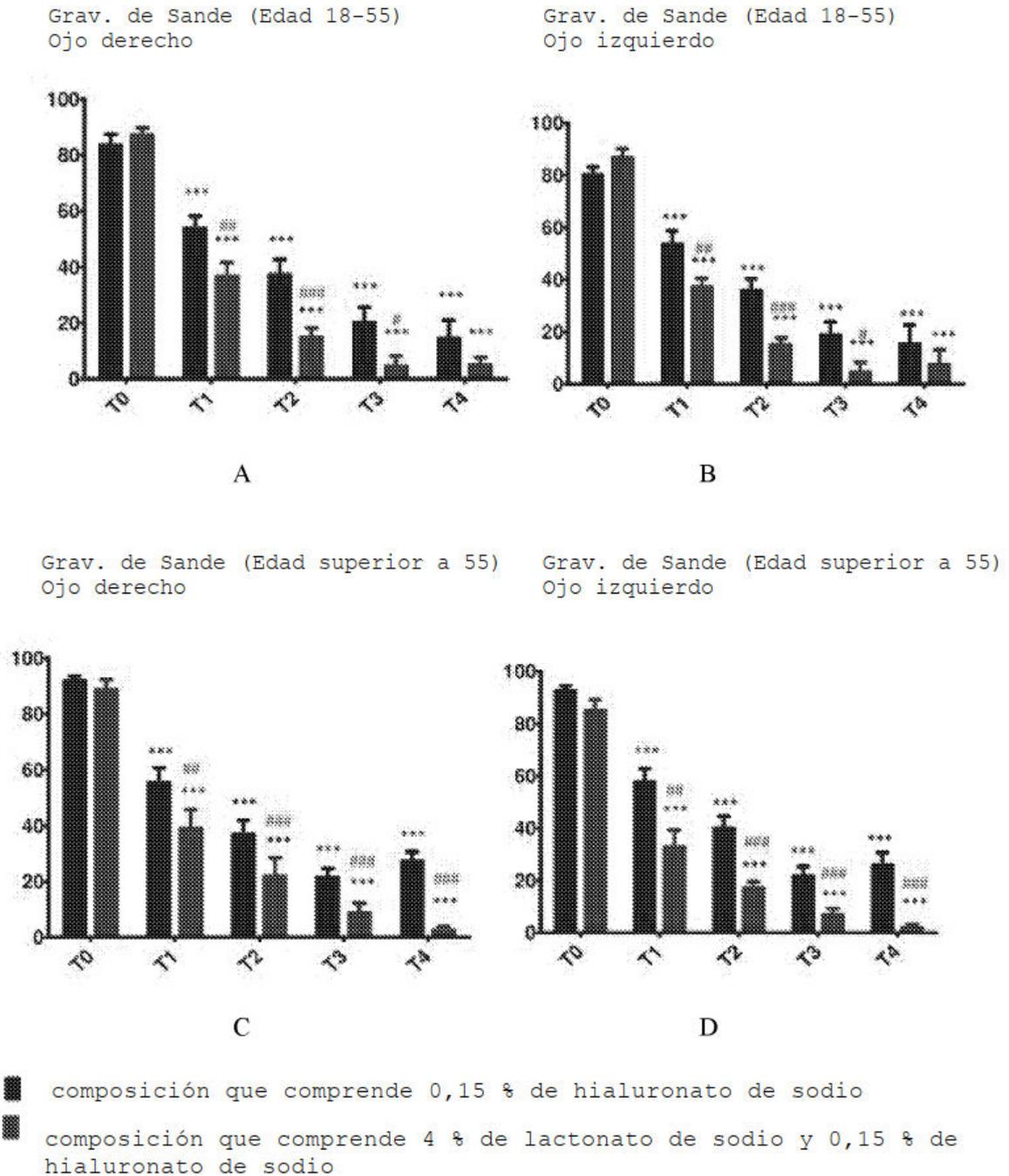
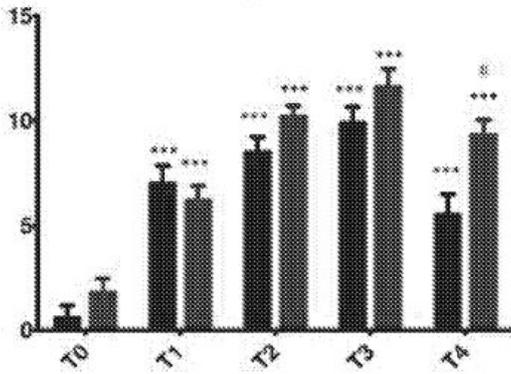


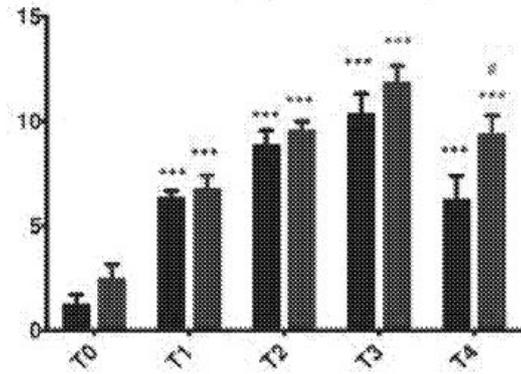
Figura 3

Schirmer (Edad 18-55) Ojo derecho

Schirmer (Edad 18-55) Ojo izquierdo



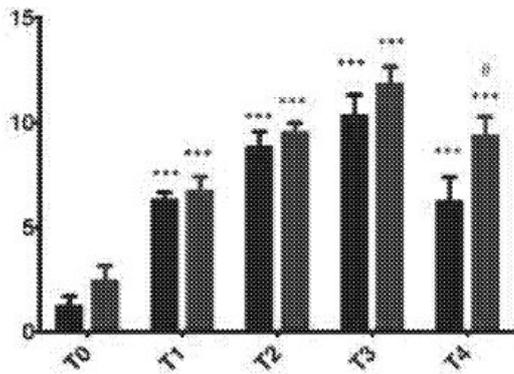
A



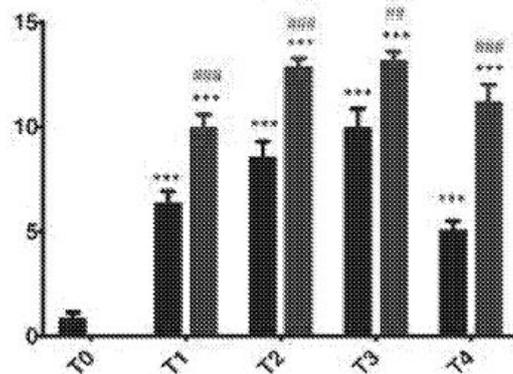
B

Schirmer (Edad superior a 55) Ojo derecho

Schirmer (Edad superior a 55) Ojo izquierdo



C

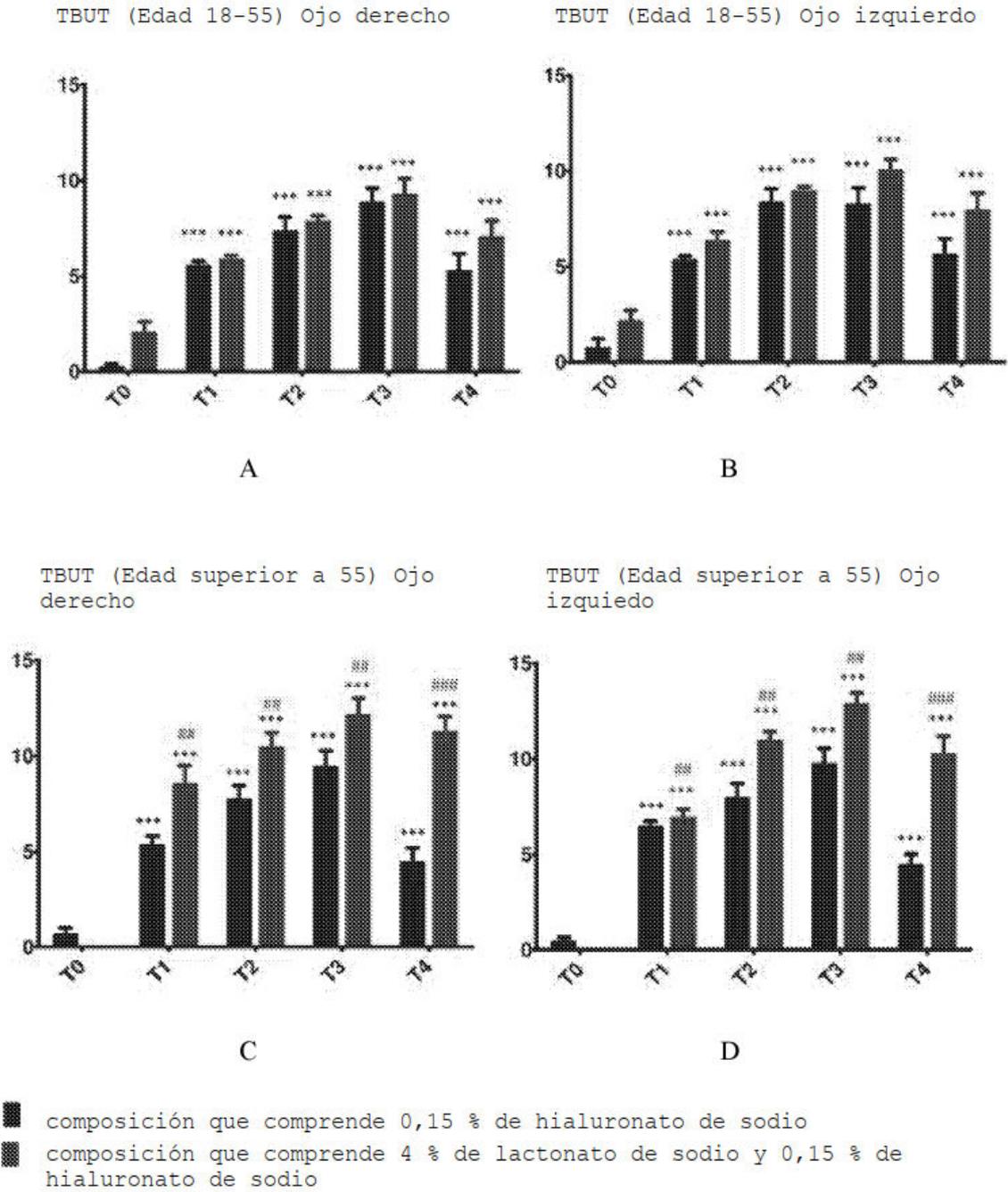


D

- composición que comprende 0,15 % de hialuronato de sodio
- ▨ composición que comprende 4 % de lactonato de sodio y 0,15 % de hialuronato de sodio

*** p<0,001 frente a T0; ### p<0,001; ## p<0,01; # p<0,05 frente a composición que comprende 0,15 % de hialuronato de sodio

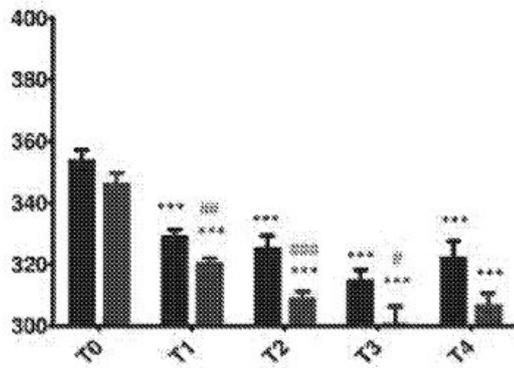
Figura 4



*** p<0,001 frente a T0; ### p<0,001; ## p<0,01; # p<0,05 frente a composición que comprende 0,15 % de hialuronato de sodio

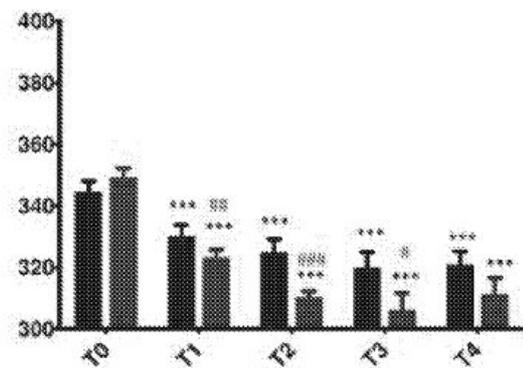
Figura 5

Osmolaridad (Edad 18-55) Ojo derecho



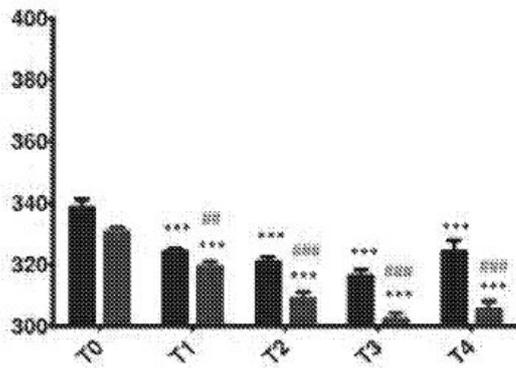
A

Osmolaridad (Edad 18-55) Ojo izquierdo



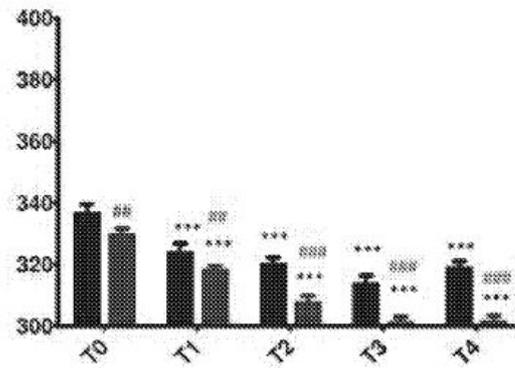
B

Osmolaridad (Edad superior a 55) Ojo derecho



C

Osmolaridad (Edad superior a 55) Ojo izquierdo

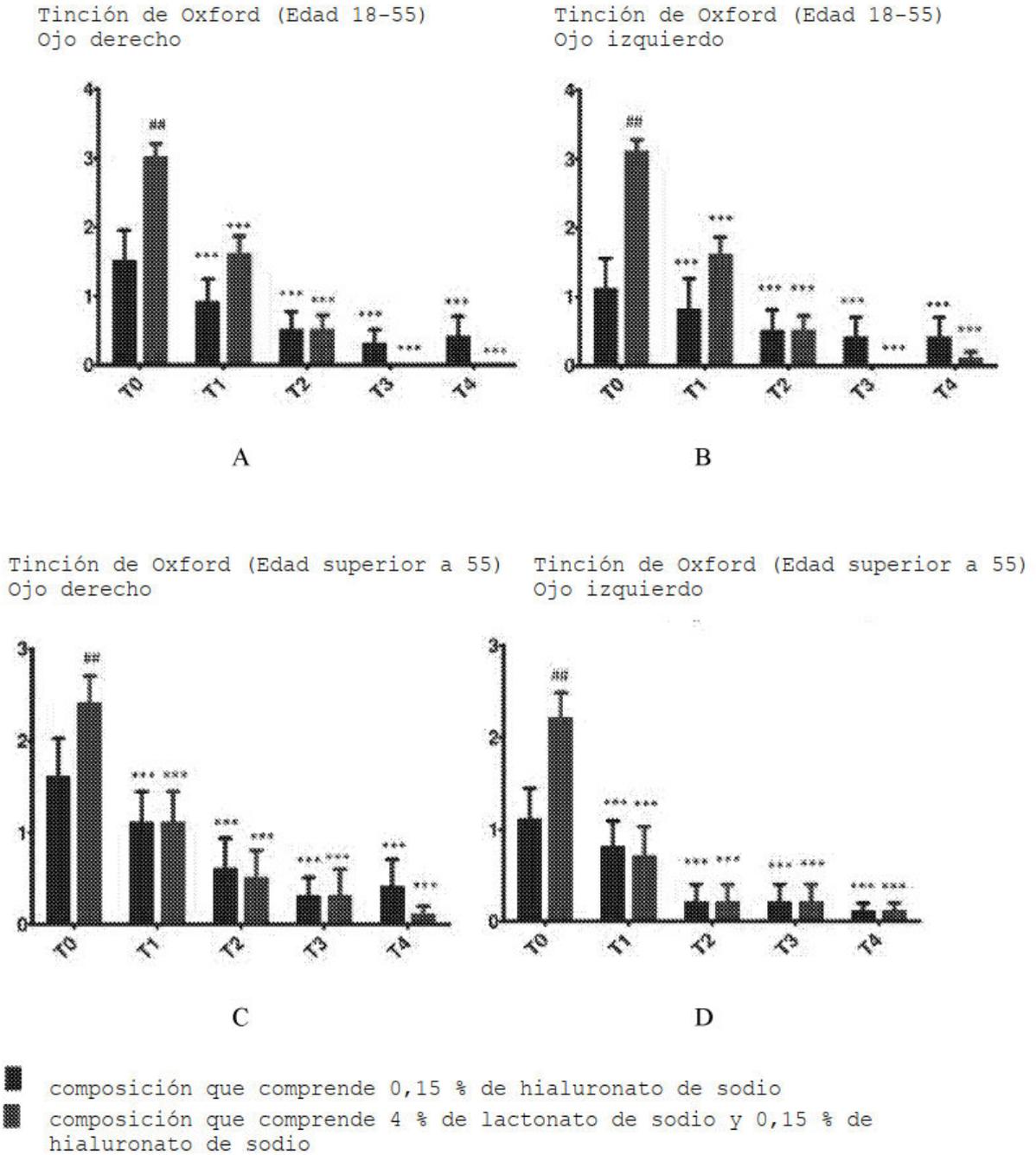


D

- composición que comprende 0,15 % de hialuronato de sodio
- ▨ composición que comprende 4 % de lactonato de sodio y 0,15 % de hialuronato de sodio

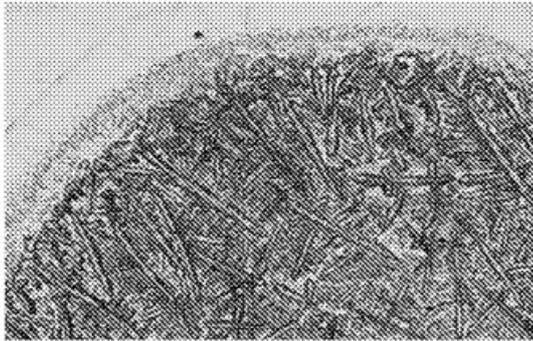
*** p<0,001 frente a T0; ### p<0,001; ## p<0,01; # p<0,05 frente a composición que comprende 0,15 % de hialuronato de sodio

Figura 6

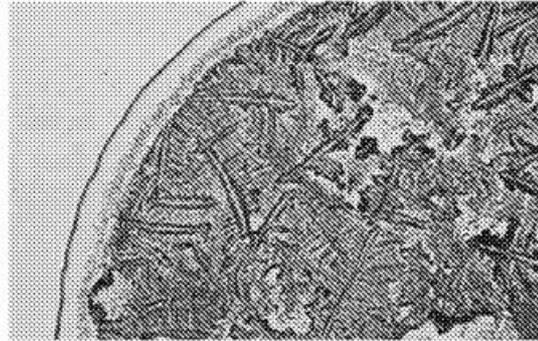


*** p<0,001 frente a T0; ### p<0,001; ## p<0,01; # p<0,05 frente a composición que comprende 0,15 % de hialuronato de sodio

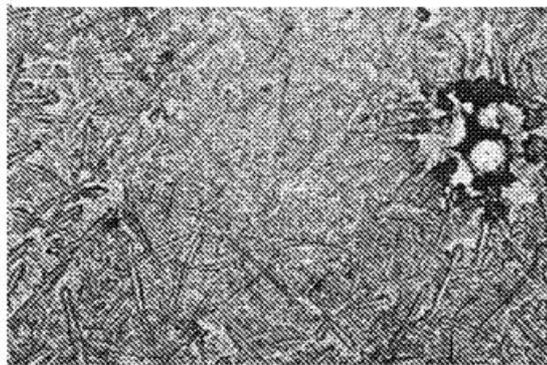
Figura 7



Ojo derecho de control - Borde



Ojo izquierdo de control - Borde



Ojo derecho de control - Centro



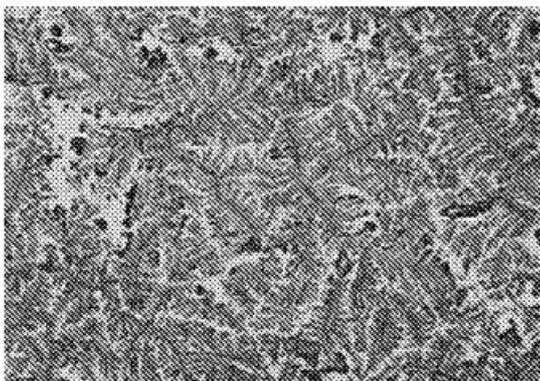
Ojo izquierdo de control - Centro



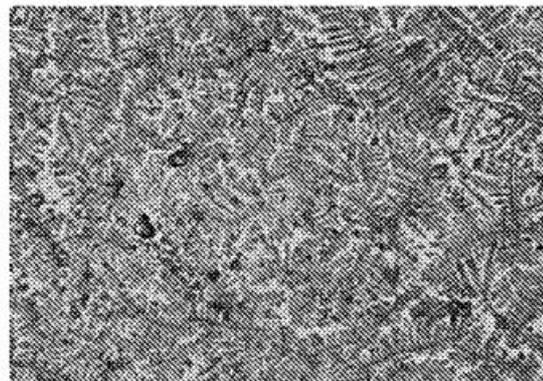
Ojo derecho tratado - Borde



Ojo izquierdo tratado - Borde



Ojo derecho tratado - Centro



Ojo izquierdo tratado - Centro

Figura 8

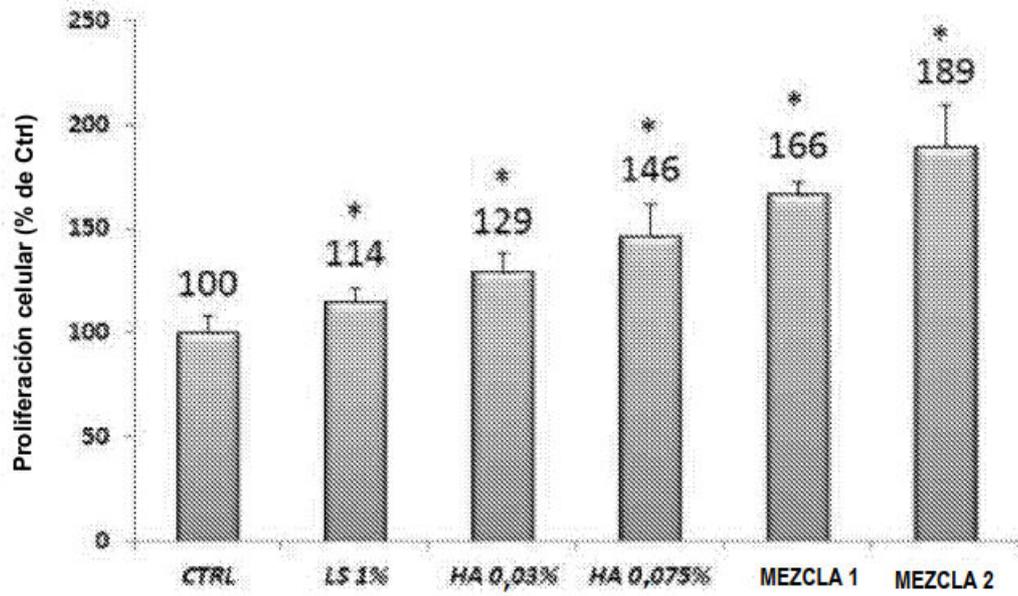


Figura 9

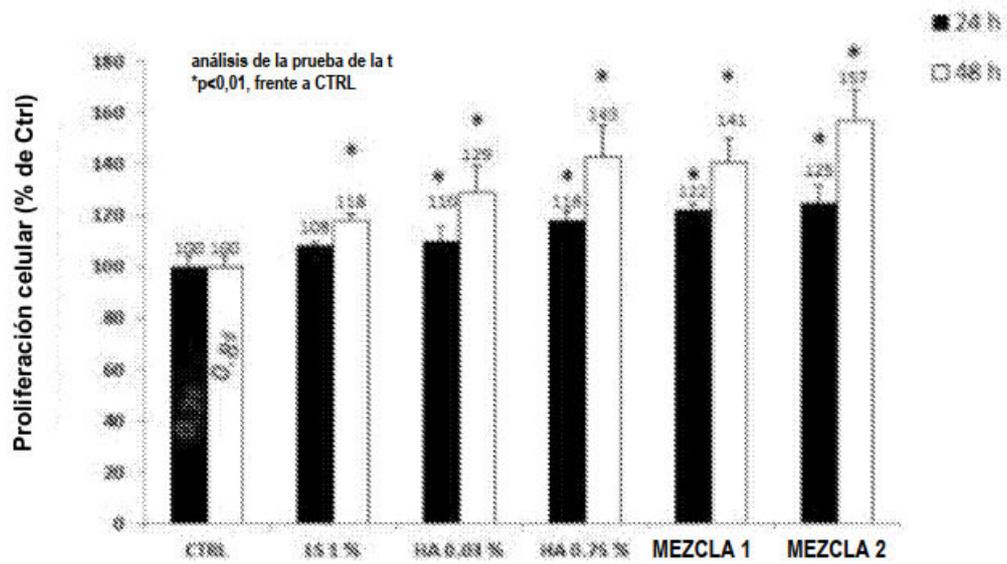


Figura 10

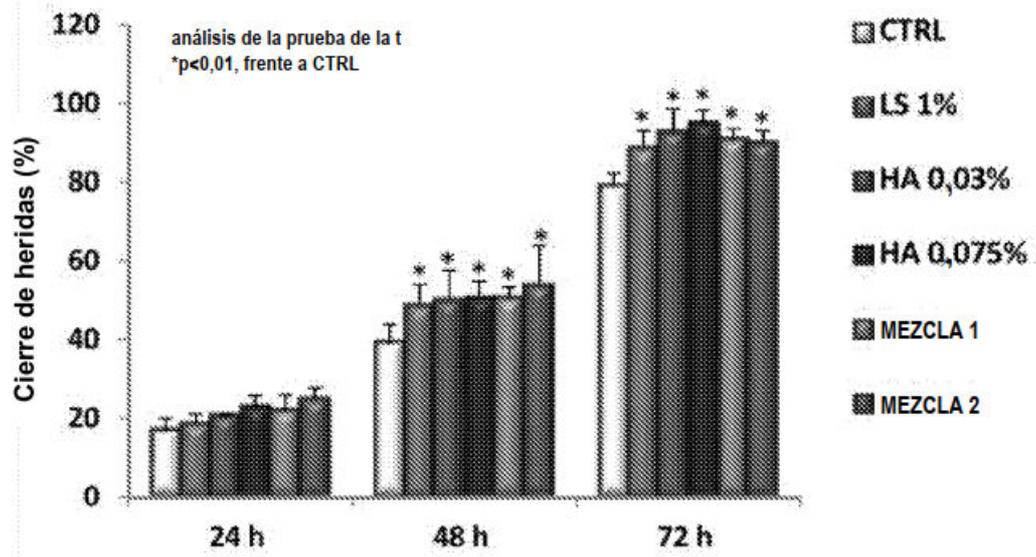


Figura 11 (A)

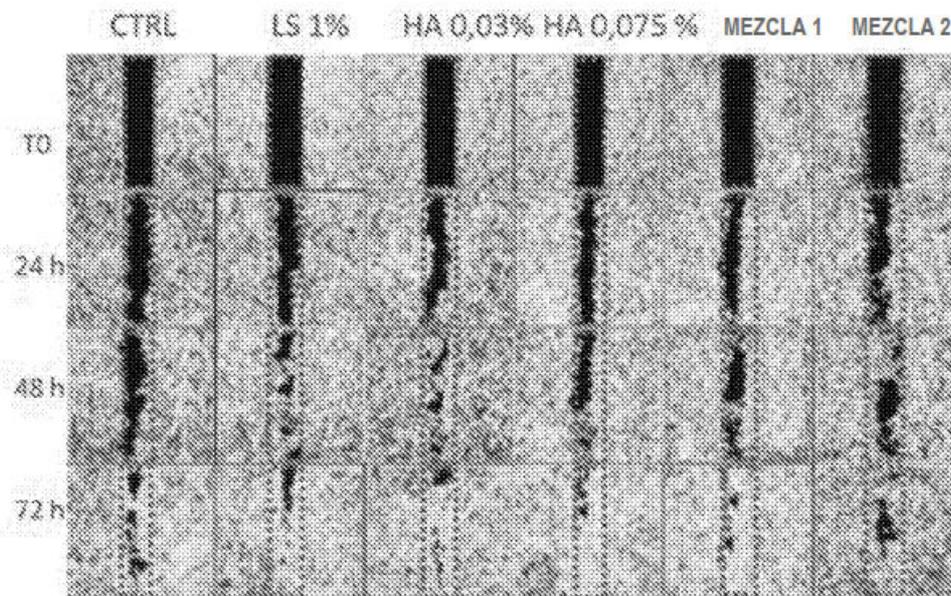


Figura 11 (B)

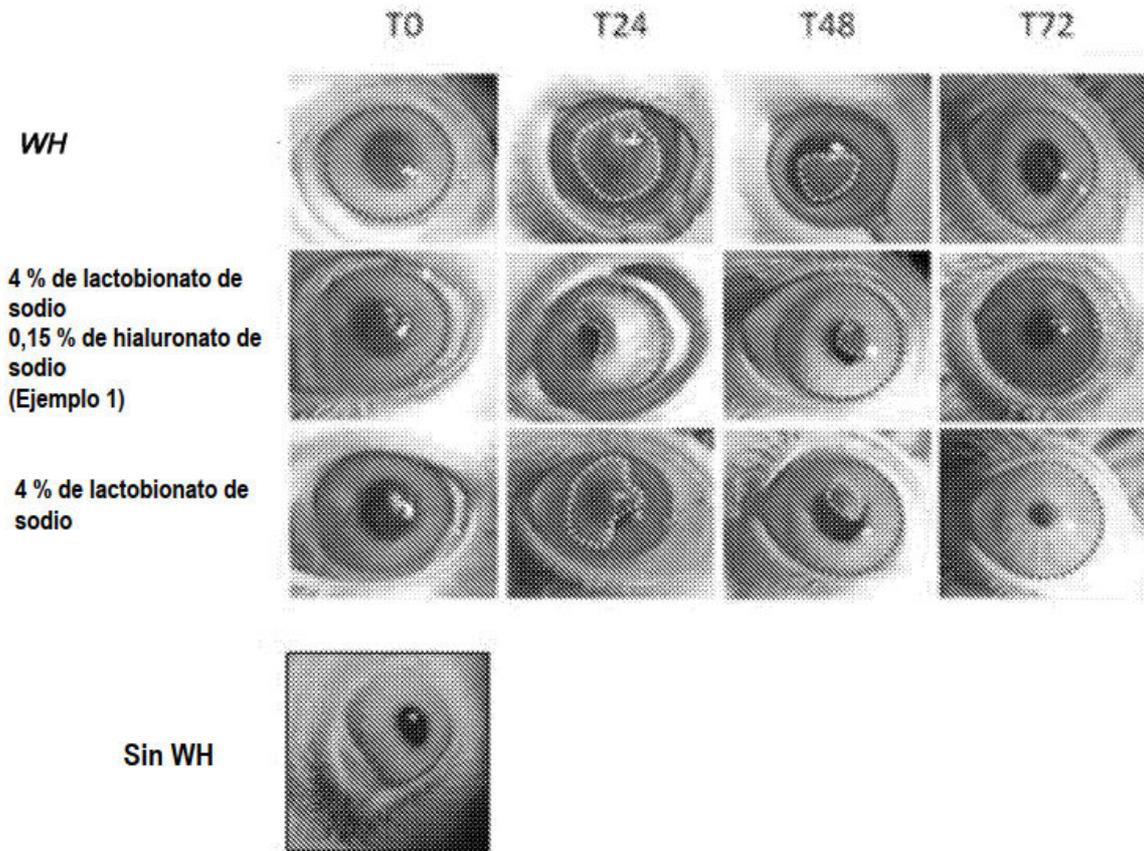


Figura 12 (A)

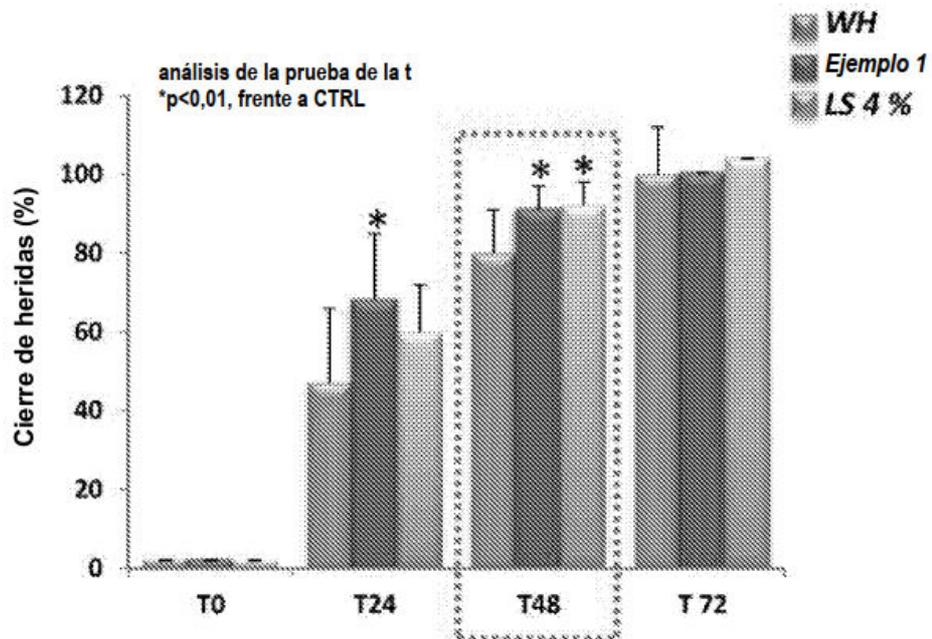


Figura 12 (B)

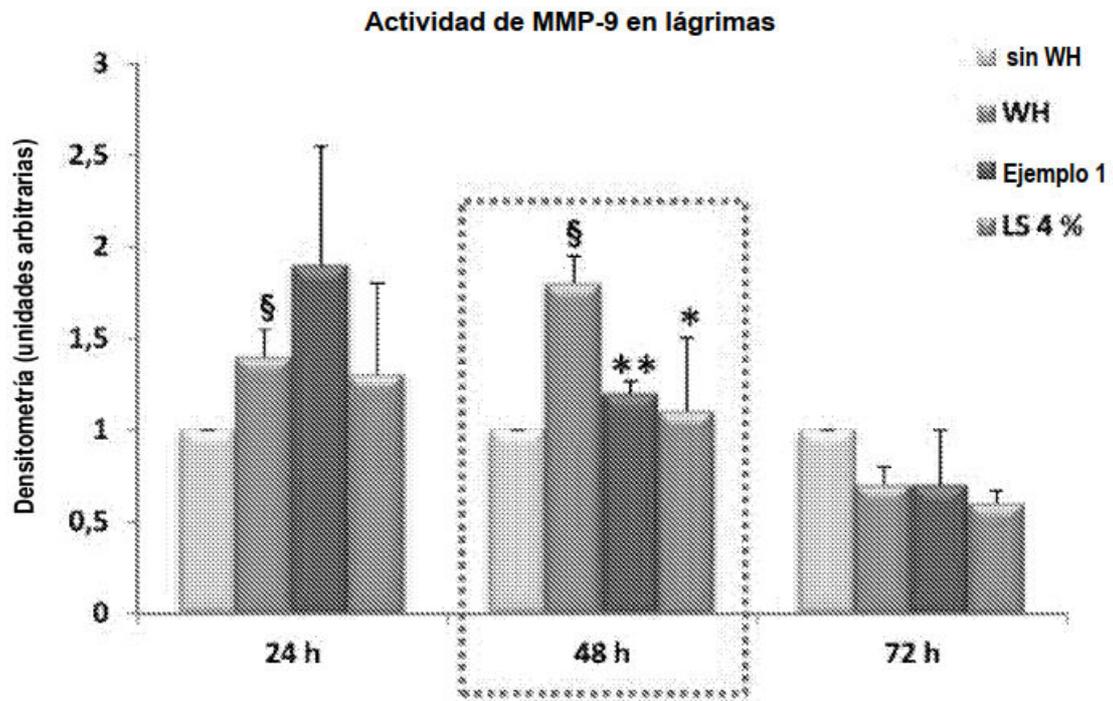


Figura 13 (A)

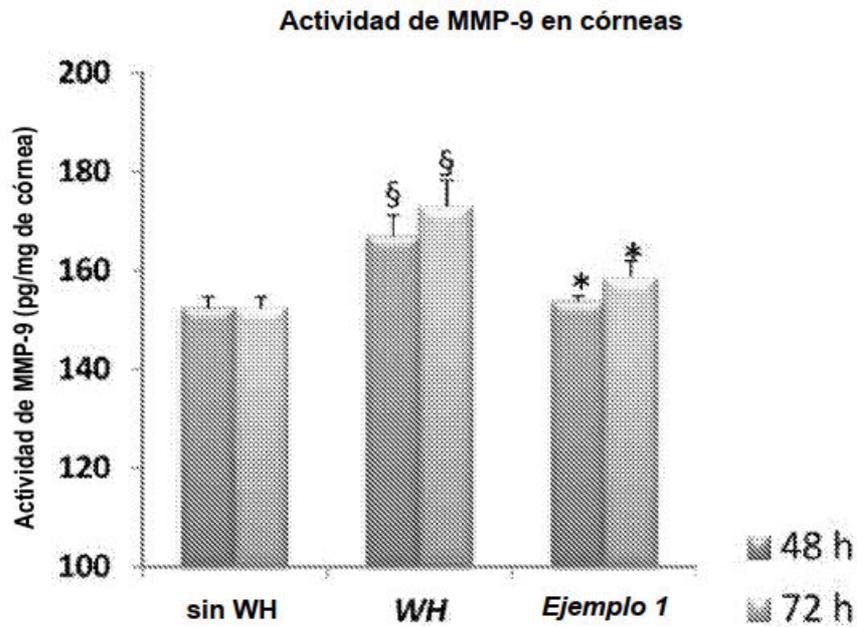


Figura 13 (B)

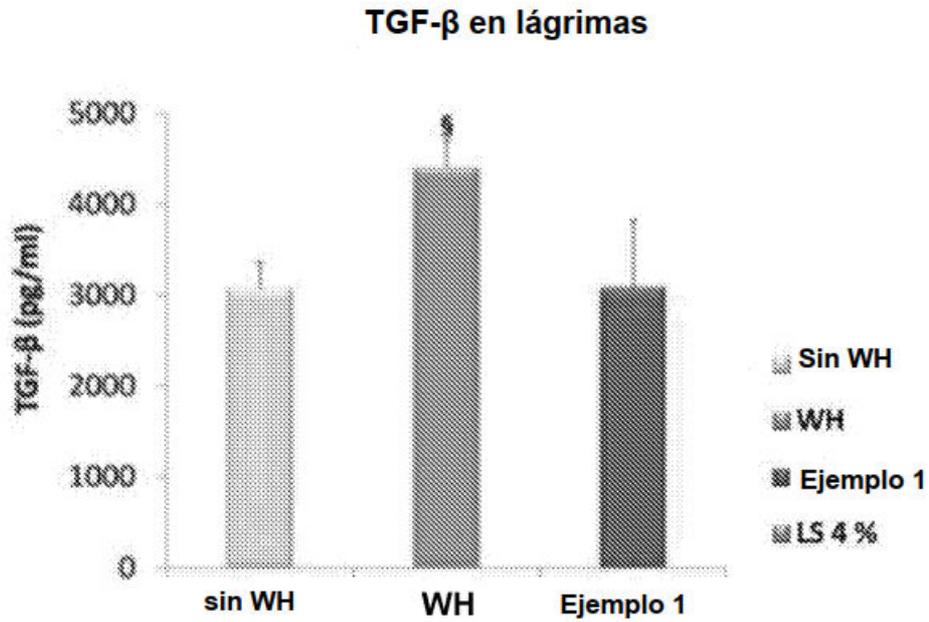


Figura 14 (A)

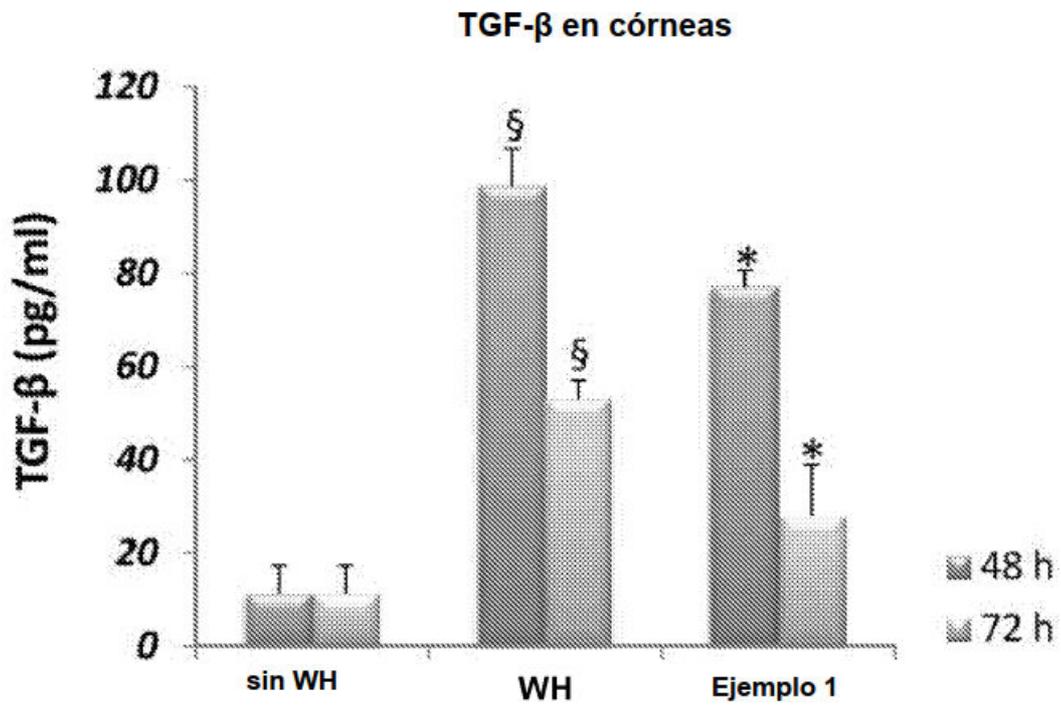


Figura 14 (B)