

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 960 069**

51 Int. Cl.:

A61K 9/10	(2006.01)
A61K 9/08	(2006.01)
A61K 38/05	(2006.01)
A61K 47/02	(2006.01)
A61P 27/02	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.01.2019 PCT/CN2019/072664**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.08.2019 WO19144863**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2019 E 19743390 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2023 EP 3744316**

54 Título: **Composición farmacéutica oftálmica, método de preparación de la misma, y aplicación de la misma**

30 Prioridad:

23.01.2018 CN 201810063904

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.02.2024

73 Titular/es:

**SEINDA PHARMACEUTICAL GUANGZHOU CORPORATION (100.0%)
C401, No. 9 Luoxuan 4th Road Guangzhou
International Bio-Island
Guangzhou, Guangdong, CN**

72 Inventor/es:

**LIU, ZUGUO;
ZHAO, YUFEN;
HUANG, CAIHONG;
WU, YANG;
TANG, GUO;
LIU, YAN y
XU, PENGXIANG**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 960 069 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 farmacéutica oftálmica, método de preparación de la misma, y aplicación de la misma

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica oftálmica para uso en la mejora de los síntomas de la enfermedad del ojo seco (DED) y/o la mejora de la DED y/o el tratamiento de la DED.

10 Antecedentes

La DED se refiere a una clase de enfermedades causadas por una película lagrimal anormal o una homeostasis de la superficie ocular, que dan como resultado inestabilidad de la película lagrimal, malestar ocular y discapacidad visual. Tiene el potencial de causar daño permanente a la superficie ocular. La DED suele manifestarse como sequedad, dolor, ardor y picazón en el ojo, así como sensación de cuerpo extraño, visión borrosa, ojos rojos, fotofobia, lagrimeo, etc. Las molestias oculares a largo plazo pueden afectar gravemente la calidad de vida del paciente. La DED grave también puede provocar queratitis, neovascularización corneal, úlceras corneales, e incluso puede amenazar la visión del paciente y provocar ceguera final. Actualmente, la DED es la enfermedad de la superficie ocular más común en todo el mundo. La investigación epidemiológica muestra que la incidencia de DED oscila de 5,5% a 33,7% en el mundo, y 21% a 30% en China. Se estima que hay más de 300 millones de pacientes con DED en China. En los últimos años, con el agravamiento de la contaminación del aire y el uso cada vez mayor de terminales de vídeo y pantallas digitales, la prevalencia de DED está aumentando rápidamente, y se desarrolla a una edad cada vez más temprana. La DED puede causar dificultades a los pacientes en su trabajo y actividades diarias, tales como leer, usar computadoras, mirar televisión, y conducir. Por lo tanto, la DED tiene un impacto negativo significativo en la eficiencia laboral y la calidad de vida de las personas.

Hay muchos factores que afectan la aparición y el desarrollo de la DED. Los factores que inducen la DED incluyen la inflamación de la superficie ocular, el abuso de drogas, el uso prolongado de lentes de contacto corneales, la menopausia, el uso prolongado de computadoras, y otros factores inmunológicos. Los estudios han demostrado que las principales manifestaciones patológicas de la DED son una serie de daños al epitelio de la superficie ocular inducidos por el estrés ambiental seco después de que se reduce la homeostasis de la película lagrimal, incluido el deterioro de la función de la barrera epitelial corneal, la disminución de la densidad de las células caliciformes conjuntivales, la metaplasia escamosa de la superficie ocular, y la inflamación de la superficie ocular. Actualmente, los principales tratamientos para la DED incluyen lágrimas artificiales, corticosteroides e inmunosupresores tal como ciclosporina A (CsA). Las lágrimas artificiales, sin embargo, son sólo un sustituto de las lágrimas naturales, y no tienen ningún efecto terapéutico. El uso prolongado de corticosteroides y CsA tiene ciertos efectos secundarios tóxicos en la superficie ocular. Hasta el momento, no existe ningún fármaco particularmente eficaz para el tratamiento de la DED en la práctica clínica. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar un fármaco para el tratamiento de la DED con buena eficacia, uso a largo plazo, y sin efectos secundarios locales ni sistémicos obvios.

El documento WO 2010/107069 A1 describe una composición oftálmica útil para la prevención y el tratamiento de enfermedades de la superficie ocular acompañadas de ojo seco. La composición oftálmica descrita allí incluye al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en alanina, asparagina, glutamina y arginina.

45 Sumario

La presente invención está definida por la reivindicación independiente 1. Las reivindicaciones dependientes representan realizaciones adicionales de la invención.

50 Esta invención proporciona una composición farmacéutica oftálmica para uso en la mejora de los síntomas de la DED y/o la mejora y/o el tratamiento de la DED. La composición farmacéutica oftálmica de la invención tiene las ventajas de causar una irritación mínima, con una alta estabilidad y un buen perfil de seguridad.

55 En primer lugar, la composición farmacéutica oftálmica para uso comprende L-alanil-L-glutamina suspendida o disuelta en una disolución oftálmica isoosmótica aceptable.

Preferiblemente, la concentración de L-alanil-L-glutamina está en el intervalo de 0,1-10% (p/v), preferiblemente 1-10% (p/v), más preferiblemente 1-5% (p/v), y lo más preferible 1% (p/v).

60 Preferiblemente, la disolución isoosmótica se prepara con un agente osmótico;

Preferiblemente, el agente osmótico se selecciona de uno o más de los siguientes: cloruro de sodio, cloruro de potasio, ácido bórico, bórax, sulfato de sodio, sulfato de potasio, nitrato de sodio, nitrato de potasio, acetato de sodio, manitol, glicerina, propilenglicol, hidrocloreuro de 2-(4-octilfeniletil)-2-aminopropilenglicol, y glucosa;

65 Preferiblemente, el agente osmótico se selecciona de uno o ambos de cloruro de sodio y cloruro de potasio;

Preferiblemente, el agente osmótico es cloruro de sodio;

5 Preferiblemente, la concentración del agente osmótico es 0,01-3% (p/v), preferiblemente 0,1-1% (p/v), más preferiblemente 0,4-0,8% (p/v), y lo más preferible 0,5% (p/v).

Preferiblemente, la composición farmacéutica contiene opcionalmente un agente bacteriostático o antimicrobiano;

10 Preferiblemente, el agente bacteriostático o antimicrobiano se selecciona de uno o más de los siguientes: cloruro de benzalconio, bromuro de benzalconio, acetato de clorhexidina, gluconato de clorhexidina, clorobutanol, alcohol fenoxietílico, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de etilo, hidroxibenzoato de propilo;

15 Preferiblemente, el agente bacteriostático o antimicrobiano se selecciona de uno o más de los siguientes: cloruro de benzalconio, cloruro de benzalconio, bromuro de benzalconio, e hidroxibenzoato de etilo.

Preferiblemente, el agente bacteriostático o antimicrobiano es hidroxibenzoato de etilo;

20 Preferiblemente, la concentración del agente bacteriostático o antimicrobiano es 0,003-0,5% (p/v), preferiblemente 0,01-0,05% (p/v), más preferiblemente 0,02-0,035% (p/v), lo más preferible 0,03% (p/v).

Preferiblemente, la composición farmacéutica incluye opcionalmente un agente modificador de la viscosidad;

25 Preferiblemente, el agente modificador de la viscosidad se selecciona de uno o más de los siguientes: hialuronato de sodio, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, polietilenglicol, alcohol polivinílico, y povidona;

Preferiblemente, el agente modificador de la viscosidad se selecciona de uno o ambos de hialuronato de sodio y carboximetilcelulosa de sodio;

30 Preferiblemente, el agente modificador de la viscosidad es hialuronato de sodio.

Preferiblemente, la concentración del agente modificador de la viscosidad es 0,01-0,5% (p/v), preferiblemente 0,05-0,2% (p/v), más preferiblemente 0,1-0,15% (p/v), lo más preferible 0,1% (p/v).

35 Preferiblemente, la composición farmacéutica también incluye uno o más reguladores del pH seleccionados de los siguientes: dihidrógenofosfato de sodio, hidrogenofosfato de disodio, dihidrógenofosfato de potasio, hidrogenofosfato dipotásico, ácido bórico, bórax, ácido acético, acetato de sodio, ácido cítrico, citrato de sodio, ácido tartárico, tartrato de sodio, carbonato de sodio, carbonato de potasio, bicarbonato de sodio, bicarbonato de potasio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, ácido clorhídrico, y ácido fosfórico. El regulador del pH ajusta el valor del pH a 5,0-9,0, preferiblemente a 6,0-8,0, más preferiblemente a 6,5-7,5, y lo más preferible a 7,0;

40 Preferiblemente, el agente de ajuste del pH se selecciona de uno o más de los siguientes: carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, e hidróxido de sodio.

45 Preferiblemente, el agente de ajuste del pH es hidróxido de sodio;

Preferiblemente, la concentración de hidróxido de sodio es 0,25 mol/l.

50 En segundo lugar, la invención también proporciona un método para preparar la composición farmacéutica para uso descrito anteriormente. El método consiste en las siguientes etapas: suspender o disolver el dipéptido propiónico en una disolución isoosmótica; ajustar el valor del pH a 5,0-9,0, preferiblemente a 6,0-8,0, más preferiblemente a 6,5-7,5 y lo más preferible a 7,0; y filtrar para esterilizar la disolución con una membrana filtrante microporosa;

55 Preferiblemente, el método comprende las siguientes etapas: agitar y disolver el agente osmótico con agua para inyección, preferiblemente a 80-90°C, lo más preferible a 85°C; añadir L-alanil-L-glutamina y agitar para disolver; añadir agua para inyección; ajustar el valor del pH a 5,0-9,0 con agente de ajuste del pH, preferiblemente a 6,0-8,0, más preferiblemente a 6,5-7,5, lo más preferible a 7,0; calentar para esterilizar a 100°C; filtrar para esterilizar con una membrana filtrante microporosa; y llenar en frascos de colirios esterilizados en un entorno de fabricación aséptico;

60 Preferiblemente, el método comprende las siguientes etapas: agitar y disolver agentes osmóticos y agentes bacteriostáticos o antimicrobianos con agua para inyección, preferiblemente a 80-90°C, lo más preferible a 85°C; después de disolver, añadir opcionalmente un agente modificador de la viscosidad mientras se agita y se continúa agitando hasta que se disuelva; añadir L-alanil-L-glutamina y agitar para disolver; añadir agua para inyección; ajustar el valor del pH final a 5,0-9,0 con agente de ajuste del pH, preferiblemente a 6,0-8,0, más preferiblemente a 6,5-7,5, lo más preferible a 7,0; calentar para esterilizar a 100°C; filtrar para esterilizar con una membrana filtrante microporosa;

65 y llenar en frascos de colirios esterilizados en un entorno de fabricación aséptico;

Dibujos

5 La Figura 1 muestra el análisis estadístico de la secreción lagrimal en ratones. NS representó el grupo normal, DSS representó el grupo de DED, DSS+Vehículo representó el grupo de control de disolventes, y DSS+AG representó el grupo de tratamiento; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001;

10 La Figura 2 muestra las estadísticas del número de células caliciformes conjuntivales en ratones. NS representó el grupo normal, DSS representó el grupo de DED, DSS+Vehículo representó el grupo de control de disolventes, y DSS+AG representó el grupo de tratamiento de DED tratado con preparación oftálmica; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001;

15 La Figura 3 muestra el defecto epitelial corneal en ratones. La Figura 3A es una imagen típica de tinción con OGD de la córnea de ratón. La Figura 3B son las estadísticas de la intensidad de fluorescencia de la tinción con OGD de la córnea de ratón. NS representó el grupo normal, DSS representó el grupo de DED, DSS+Vehículo representó el grupo de control de disolventes, y DS5+AG representó el grupo de tratamiento de DED; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

Descripción detallada

20 Las soluciones técnicas de esta invención se especificarán en forma de realizaciones a continuación, pero los siguientes ejemplos o ejemplos experimentales no limitan el alcance de la presente invención.

25 A menos que se especifique lo contrario, las realizaciones en los siguientes ejemplos son métodos convencionales, y las materias primas y materiales reactivos usados en los siguientes ejemplos son todos productos comercialmente disponibles.

Ejemplo 1 de Preparación

30 1. Composición farmacéutica

Hialuronato de sodio	1,0 g
Hidroxibenzoato de etilo	0,3 g
Cloruro de sodio	5,0 g
L-Alanil-L-Glutamina	10,0 g
Agua para inyección	Añada agua hasta que el volumen total alcance 1000 ml
pH	Ajuste el pH a 7,0 con hidróxido de sodio 0,25 mol/l

35 2. Método de preparación

40 Pese el cloruro de sodio y el hidroxibenzoato de etilo, añada luego 800 ml (85°C) de agua y agite para disolver. Después de disolver, añada hialuronato de sodio mientras agita, y continúe agitando hasta que se disuelva, añada después L-alanil-L-glutamina y agite para disolver. Añada agua hasta alcanzar un volumen total de 1000 ml, añada después hidróxido de sodio para ajustar el valor del pH a 7,0. Hierva y esterilice a 100°C durante 30 minutos, filtre después con una membrana de filtro microporosa de 0,22 µm, y dispense asépticamente en frascos cuentagotas esterilizados, 5 ml/frasco.

Ejemplo 2 de Preparación

45 1. Composición farmacéutica

Hialuronato de sodio	1,2 g
Hidroxibenzoato de etilo	0,3 g
Cloruro de sodio	5,0 g
L-Alanil-L-Glutamina	0,2 g
Agua para inyección	Añada agua hasta que el volumen total alcance 1000 ml
pH	Ajuste el pH a 7,0 con hidróxido de sodio 0,25 mol/l

2. El método de preparación es el mismo que el del Ejemplo 1 de Preparación

5 Ejemplo 3 de Preparación

1. Composición farmacéutica

Hialuronato de sodio	1,5 g
Hidroxibenzoato de etilo	0,35 g
Cloruro de sodio	6,0 g
L-Alanil-L-Glutamina	50,0 g
Agua para inyección	Añada agua hasta que el volumen total alcance 1000 ml
pH	Ajuste el pH a 7,5 con hidróxido de sodio 0,25 mol/l

10

2. El método de preparación es el mismo que el del Ejemplo 1 de Preparación.

Ejemplo 4 de Preparación

15

1. Composición farmacéutica

Hialuronato de sodio	1,0 g
Hidroxibenzoato de etilo	0,2 g
Cloruro de sodio	2,0 g
L-Alanil-L-Glutamina	10,0 g
Agua para inyección	Añada agua hasta que el volumen total alcance 1000 ml
pH	Ajuste el pH a 6,5 con hidróxido de sodio 0,25 mol/l

20

2. El método de preparación es el mismo que el del Ejemplo 1 de Preparación.

Ejemplo 5 de Preparación

25

1. Composición farmacéutica

Hialuronato de sodio	2,0 g
Hidroxibenzoato de etilo	0,5 g
Cloruro de sodio	10,0 g
L-Alanil-L-Glutamina	100,0 g
Agua para inyección	Añada agua hasta que el volumen total alcance 1000 ml
pH	Ajuste el pH a 8,0 con hidróxido de sodio 0,25 mol/l

30

2. El método de preparación es el mismo que el del Ejemplo 1 de Preparación.

Ejemplo 6 de Preparación

35

1. Composición farmacéutica

ES 2 960 069 T3

Hialuronato de sodio	0,5 g
Hidroxibenzoato de etilo	0,1 g
Cloruro de sodio	1,0 g
L-Alanil-L-Glutamina	10,0 g
Agua para inyección	Añada agua hasta que el volumen total alcance 1000 ml
pH	Ajuste el pH a 6,0 con hidróxido de sodio 0,25 mol/l

2. El método de preparación es el mismo que el del Ejemplo 1 de Preparación.

5 Ejemplo 7 de Preparación

1. Composición farmacéutica

Hialuronato de sodio	5,0 g
Hidroxibenzoato de etilo	5,0 g
Cloruro de sodio	30,0 g
L-Alanil-L-Glutamina	100,0 g
Agua para inyección	Añada agua hasta que el volumen total alcance 1000 ml
pH	Ajuste el pH a 9,0 con hidróxido de sodio 0,25 mol/l

10

2. El método de preparación es el mismo que el del Ejemplo 1 de Preparación.

15 Ejemplo 8 de Preparación

1. Composición farmacéutica

Hialuronato de sodio	0,1 g
Hidroxibenzoato de etilo	0,03 g
Cloruro de sodio	0,1 g
L-Alanil-L-Glutamina	1,0 g
Agua para inyección	Añada agua hasta que el volumen total alcance 1000 ml
pH	Ajuste el pH a 5,0 con hidróxido de sodio 0,25 mol/l

20

2. El método de preparación es el mismo que el del Ejemplo 1 de Preparación.

Ejemplo 9 de Preparación

25 1. Composición farmacéutica

Hialuronato de sodio	1,0 g
Hidroxibenzoato de etilo	0,3 g
Cloruro de sodio	5,0 g
L-Alanil-L-Glutamina	1,0 g
Agua para inyección	Añada agua hasta que el volumen total alcance 1000 ml
pH	Ajuste el pH a 7,0 con hidróxido de sodio 0,25 mol/l

2. El método de preparación es el mismo que el del Ejemplo 1 de Preparación.

5 Ejemplo 10 de Preparación

1. Composición farmacéutica

Hialuronato de sodio	1,0 g
Hidroxibenzoato de etilo	0,3 g
Cloruro de sodio	5,0 g
L-Alanil-L-Glutamina	50,0 g
Agua para inyección	Añada agua hasta que el volumen total alcance 1000 ml
pH	Ajuste el pH a 7,0 con hidróxido de sodio 0,25 mol/l

10

2. El método de preparación es el mismo que el del Ejemplo 1 de Preparación.

Ejemplo 11 de Preparación

15

1. Composición farmacéutica

Hialuronato de sodio	1,0 g
Hidroxibenzoato de etilo	0,3 g
Cloruro de sodio	5,0 g
L-Alanil-L-Glutamina	100,0 g
Agua para inyección	Añada agua hasta que el volumen total alcance 1000 ml
pH	Ajuste el pH a 7,0 con hidróxido de sodio 0,25 mol/l

20

2. El método de preparación es el mismo que el del Ejemplo 1 de Preparación.

Ejemplo 12 de Preparación

25 1. Composición farmacéutica

Carboximetilcelulosa de sodio	1,0 g
Cloruro de benzalconio	0,3 g
Cloruro de potasio	5,0 g
L-Alanil-L-Glutamina	10,0 g
Agua para inyección	Añada agua hasta que el volumen total alcance 1000 ml
pH	Ajuste el pH a 7,0 con hidróxido de sodio 0,25 mol/l

30 2. Método

35 Pese el cloruro de potasio y el cloruro de benzalconio, añade entonces 800 ml de agua para inyección (85°C) y agite para disolver. Después de disolver, añade carboximetilcelulosa de sodio mientras agita, y continúe agitando hasta que se disuelva. Añada L-alanil-L-glutamina y agite para disolver, añade después agua hasta alcanzar un volumen total de 1000 ml. Añada hidróxido de sodio para ajustar el pH a 7,0 y caliente para esterilizar a 100°C durante 30 minutos, filtre entonces con una membrana de filtro microporosa de 0,22 µm y dispense asépticamente en frascos cuentagotas esterilizados, 5 ml/frasco.

Ejemplo 13 de Preparación

5

1. Composición farmacéutica

Carboximetilcelulosa sódica	1,0 g
Bromuro de benzalconio	0,3 g
Cloruro de potasio	5,0 g
L-Alanil-L-Glutamina	10,0 g
Agua para inyección	Añada agua hasta que el volumen total alcance 1000 ml
pH	Ajuste el pH a 7,0 con hidróxido de sodio 0,25 mol/l

2. Método

10

Pese el cloruro de potasio y el bromuro de benzalconio, añada entonces 800 ml de agua (85°C) y agite para disolver. Después de disolver, añada carboximetilcelulosa de sodio mientras agita, y continúe agitando hasta que se disuelva. Añada L-alanil-L-glutamina y agite para disolver, añada después agua hasta alcanzar un volumen total de 1000 ml. Añada hidróxido de sodio para ajustar el pH a 7,0, y hierva para esterilizar a 100°C durante 30 minutos. Filtre con una membrana de filtro microporosa de 0,22 µm, y dispense asépticamente en frascos cuentagotas esterilizados, 5 ml/frasco.

15

Ejemplo 14 de Preparación

20

1. Composición farmacéutica

Hidroxibenzoato de etilo	0,3 g
Cloruro de sodio	5,0 g
L-Alanil-L-Glutamina	10,0 g
Agua para inyección	Añada agua hasta que el volumen total alcance 1000 ml
pH	Ajuste el pH a 7,0 con hidróxido de sodio 0,25 mol/l

2. Método

25

Pese el cloruro de potasio y el hidroxibenzoato de etilo, añada entonces 800 ml de agua para inyección (85°C) y agite para disolver. Después de disolver, añada L-alanil-L-glutamina y agite para disolver, filtre después con una membrana de filtro microporosa de 0,22 µm, y dispense asépticamente en frascos cuentagotas esterilizados, 5 ml/frasco.

30

Ejemplo 15 de Preparación

1. Composición farmacéutica

35

Hialuronato de sodio	1,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
L-Alanil-L-Glutamina	10,0 g
Agua para inyección	Añada agua hasta que el volumen total alcance 1000 ml
pH	Ajuste el pH a 7,0 con hidróxido de sodio 0,25 mol/l

2. Método

Pese el cloruro de sodio, añada entonces 800 ml de agua (85°C) y agite para disolver. Después de disolver, añada hialuronato de sodio mientras agita, y continúe agitando hasta que se disuelva, añada después L-alanil-L-glutamina y agite para disolver. Ajuste el pH a 7,0, caliente para esterilizar a 100°C durante 30 minutos, filtre después con una membrana de filtro microporosa de 0,22 µm, y dispense asépticamente en frascos cuentagotas esterilizados, 5 ml/frasco.

Ejemplo 16 de Preparación

1. Composición farmacéutica

Cloruro de sodio	5,0 g
L-Alanil-L-Glutamina	10,0 g
Agua para inyección	Añada agua hasta que el volumen total alcance 1000 ml
pH	Ajuste el pH a 7,0 con hidróxido de sodio 0,25 mol/l

2. Método

Pese el cloruro de sodio, añada entonces 800 ml de agua para inyección (85°C) y agite para disolver. Después de disolver, añada L-alanil-L-glutamina y agite para disolver, filtre después con una membrana de filtro microporosa de 0,22 µm, y dispense asépticamente en frascos cuentagotas esterilizados, 5 ml/frasco.

Ejemplo experimental

Métodos de experimentación con animales:

(1) Establecimiento del modelo de DED en ratones y su tratamiento de agrupación

Se dividieron aleatoriamente ratones C57/BL hembra sanos de 10-12 semanas en 4 grupos: Grupo normal (NS), grupo de DED (DSS), grupo de control de vehículo para ojo seco (DS5+Vehículo), y grupo de tratamiento del ojo seco (DSS +AG).

Establecimiento del modelo de DED de ratón: los ratones se mantuvieron en un ambiente seco (humedad relativa: <40%, temperatura: 21-23°C) e inyección subcutánea de hidrobromuro de escopolamina (0,5 mg/0,2 ml, 200 µl cada uno, 4 veces al día durante 5 días consecutivos), se induje exitosamente ratones con DED.

Ratones en el grupo Normal (NS): El grupo NS incluía ratones normales. Este grupo de ratones no fue tratado con colirios, y se mantuvo en un ambiente estándar a una temperatura de 21-23°C y una humedad relativa del 50-60%.

Ratones del grupo de DED (DS5): Los ratones con DED en el grupo con DED no recibieron tratamiento con colirios, se mantuvieron en un ambiente con una temperatura de 21-23°C y una humedad relativa inferior al 40%, y recibieron una inyección subcutánea de hidrobromuro de escopolamina (0,5 mg/0,2 ml, 200 µl cada vez, 4 veces al día durante 5 días consecutivos).

Ratones en el grupo de control de vehículo para ojo seco (grupo control de sólo disolvente) (DS5 + Vehículo): los ojos de ratones con DED en este grupo recibieron el colirio de Control de Vehículo (1 gota cada vez, 4 veces al día, con un intervalo de 4 horas cada vez durante 5 días). Los ratones se mantuvieron en un ambiente seco (humedad relativa: <40%, temperatura: 21-23°C).

Ratones en el grupo de tratamiento del ojo seco (DS5+AG): Los ojos de ratones con DED se trataron con las formulaciones oftálmicas preparadas en los Ejemplos 1-16 de Preparación (1 gota cada vez, 4 veces al día, con un intervalo de 4 horas cada vez, y el tratamiento continuó durante 5 días). Los ratones se mantuvieron en un ambiente seco (humedad relativa: <40%, temperatura: 21-23°C).

El manejo de los animales durante el experimento se realizó de conformidad con las "Opiniones orientativas sobre el tratamiento de animales de experimentación" emitidas por el Ministerio de Ciencia y Tecnología.

(2) Determinación de indicadores relacionados

Después del tratamiento de los ratones de cada grupo, los ratones se examinaron. Cada examen se realizó por la misma persona y la hora, el lugar, la iluminación y la temperatura fueron los mismos para cada examen.

La secreción lagrimal, la tinción corneal con Verde de Oregón-dextrano (OGD), y el número de células caliciformes conjuntivales se analizaron con los ratones en cada grupo.

① Prueba de hilo de algodón con rojo fenol para detectar la cantidad de secreción lagrimal

La cantidad de secreción lagrimal se detectó mediante algodón con fenolamina (Zone-Quick; Lacrimedics, Eastsound, WA). Bajo la lámpara de hendidura, el hilo de algodón fenólico se colocó en el fondo de saco conjuntival inferior del canto lateral de ratones con pinzas oftálmicas. 15 segundos después, se midió la longitud de la tinción del hilo de algodón fenólico con una regla milimétrica, y se registró. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1 Secreción lagrimal (mm)

Ejemplo de preparación	Grupo normal (NS)	Grupo DED (DSS)	Grupo de control de disolventes (DS5+Vehículo)	Grupo de tratamiento (DS5+AG)
1	4	0,86	1,85	3,04
2			1,71	2,66
3			1,75	2,57
4			1,73	2,90
5			1,58	2,45
6			1,64	2,80
7			1,54	2,40
8			1,55	2,35
9			1,85	2,53
10			1,85	2,58
11			1,85	2,54
12			1,53	2,70
13			1,52	2,68
14			1,45	2,40
15			1,76	2,83
16			1,47	2,33

② Tinción con OGD para detectar la función de la barrera epitelial corneal:

Se aplicaron 0,5 µl de OGD (50 mg/ml, peso molecular 70.000; Invitrogen) al saco conjuntival inferior de los ratones, los ratones se sacrificaron, y la conjuntiva se enjuagó con 1 ml de disolución salina, y después, bajo un microscopio de fluorescencia *in vivo* (AZ100, Nikon), se analizó y fotografió la tinción de fluorescencia del epitelio corneal. La intensidad de fluorescencia de la tinción corneal se midió y registró utilizando el software NIS-element. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2 Intensidad de fluorescencia de tinción (u.a.)

Ejemplo de preparación	Grupo normal (NS)	Grupo DED (DSS)	Grupo de control de disolventes (DS5+Vehículo)	Grupo de terapia (DS5+AG)
1	6,87	19,09	16,49	10,76
2			16,58	11,23
3			16,73	11,53
4			16,64	10,88
5			16,89	11,81
6			16,90	11,05
7			17,11	11,93
8			17,24	12,03

Ejemplo de preparación	Grupo normal (NS)	Grupo DED (DSS)	Grupo de control de disolventes (DS5+Vehículo)	Grupo de terapia (DS5+AG)
9			16,49	11,70
10			16,49	11,40
11			16,49	11,74
12			17,45	11,20
13			17,50	11,17
14			17,62	12,23
15			17,20	11,15
16			17,70	12,34

③ Medida del número de células caliciformes:

- 5 Las muestras de tejido ocular se fijaron con formalina al 10%, se embebieron en parafina, y se seccionaron. Las secciones se tiñeron con reactivo de ácido periódico de Schiff (PAS). Se usó Nikon Nikon eclipse 50i para recolectar imágenes, y se contó el número de células caliciformes conjuntivales. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3 Número de células caliciformes en la conjuntiva

Ejemplo de preparación	Grupo normal (NS)	Grupo DED (DSS)	Grupo de control de disolventes (DS5+Vehículo)	Grupo de tratamiento (DS5+AG)
1	103,6	68,19	82,48	103,5
2			80,73	97,44
3			80,52	97,26
4			79,23	101,8
5			77,34	93,3
6			76,90	99,5
7			75,12	92,7
8			75,46	93,02
9			82,48	96
10			82,48	97,4
11			82,48	96,5
12			75,00	97,82
13			74,16	98,24
14			72,64	92,8
15			76,80	98,38
16			71,50	91,57

10

Análisis de resultados experimentales:

- 15 Además, para los experimentos anteriores, esta invención también analiza los datos de los Ejemplos 1, 9-11 de Preparación, como se muestra en las Figuras 1-3, en las que:

20 Los resultados de la Figura 1 mostraron que la secreción lagrimal de los ratones en el grupo de DED (DSS) disminuyó significativamente tras la inducción de DED; la secreción lagrimal de los tres grupos de tratamiento (DS5+AG) fue significativamente mayor que la del grupo de control de vehículo (DS5+Vehículo), y el grupo de tratamiento de DED (DS5+1%AG) tratado con 1% de L-alanil-L-glutamina tuvo el efecto más significativo, ***P<0,001.

Los resultados en la Figura 2 mostraron que el número de células calciformes conjuntivales en los ratones del grupo de DED (DSS) disminuyó tras la inducción de DED, y el efecto fue muy significativo en el grupo de L-alanil-L-glutamina al 1% (caso de preparación 1), * $P < 0,05$.

- 5 Los resultados de la Figura 3 mostraron que había una tinción de OGD evidente en la córnea del grupo de ojo seco (DSS) después del modelado, y la tinción de OGD de los tres grupos de tratamiento (DSS+AG) fue significativamente menos visible que la del grupo de control de vehículo (DSS+Vehículo), y el efecto fue más significativo en el grupo de L-alanil-L-glutamina al 1% (caso de preparación 1), * $P < 0,001$.
- 10 Debe entenderse que la invención descrita aquí no se limita a metodologías, protocolos o reactivos específicos, ya que estos son modificables. La discusión y los ejemplos proporcionados aquí se presentan para ilustrar realizaciones específicas, y no pretenden limitar el alcance de la invención, que está limitada únicamente por las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica oftálmica que comprende L-alanil-L-glutamina suspendida o disuelta en una disolución isoosmótica que es adecuada para ojos, para uso en un método para aliviar los síntomas de la enfermedad del ojo seco (DED) y/o mejorar la DED y/o tratar la DED en un paciente que lo necesita, comprendiendo el método administrar al paciente dicha composición farmacéutica.
- 10 2. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 1, en la que la concentración de L-alanil-L-glutamina es 0,1-10% (p/v) de la composición.
3. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la disolución isoosmótica comprende un agente osmótico.
- 15 4. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 3, en la que el agente osmótico se selecciona del grupo que consiste en cloruro de sodio, cloruro de potasio, ácido bórico, bórax, sulfato de sodio, sulfato de potasio, nitrato de sodio, nitrato de potasio, acetato de sodio, manitol, glicerina, propilenglicol, hidrocloreto de 2-(4-octilfeniletíl)-2-amino-propilenglicol, glucosa, y combinaciones de los mismos.
- 20 5. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en la que la concentración del agente osmótico es 0,01-3% (p/v) de la composición.
6. La composición farmacéutica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la composición farmacéutica comprende además un agente bacteriostático o antimicrobiano.
- 25 7. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 6, en la que el agente bacteriostático o antimicrobiano se selecciona del grupo que consiste en cloruro de benzalconio, bromuro de benzalconio, acetato de clorhexidina, gluconato de clorhexidina, clorobutanol, alcohol fenoxietílico, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de etilo, hidroxibenzoato de propilo, y combinaciones. del mismo.
- 30 8. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en la que la concentración del agente bacteriostático o antimicrobiano es 0,003 - 0,5% (p/v) de la composición.
9. La composición farmacéutica para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que la composición farmacéutica comprende además un agente modificador de la viscosidad.
- 35 10. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 9, en la que el agente modificador de la viscosidad se selecciona del grupo que consiste en hialuronato de sodio, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, polietilenglicol, alcohol polivinílico, povidona, y combinaciones de los mismos.
- 40 11. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en la que la concentración del agente modificador de la viscosidad es 0,01-0,5% (p/v) de la composición.
- 45 12. La composición farmacéutica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que la composición farmacéutica comprende además uno o más reguladores del pH.
- 50 13. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 12, en la que el regulador del pH se selecciona del grupo que consiste en dihidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato de disodio, dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato de dipotasio, ácido bórico, bórax, ácido acético, acetato de sodio, ácido cítrico, citrato de sodio, ácido tartárico, tartrato de sodio, carbonato de sodio, carbonato de potasio, bicarbonato de sodio, bicarbonato de potasio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, y combinaciones de los mismos, en la que opcionalmente el pH de la composición farmacéutica es 5,0-9,0.
- 55 14. Un método para preparar la composición farmacéutica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, comprendiendo el método suspender o disolver L-alanil-L-glutamina en una disolución isosmótica; ajustar el pH a 5,0-9,0; y filtrar para esterilizar la disolución resultante con una membrana de filtro microporosa.

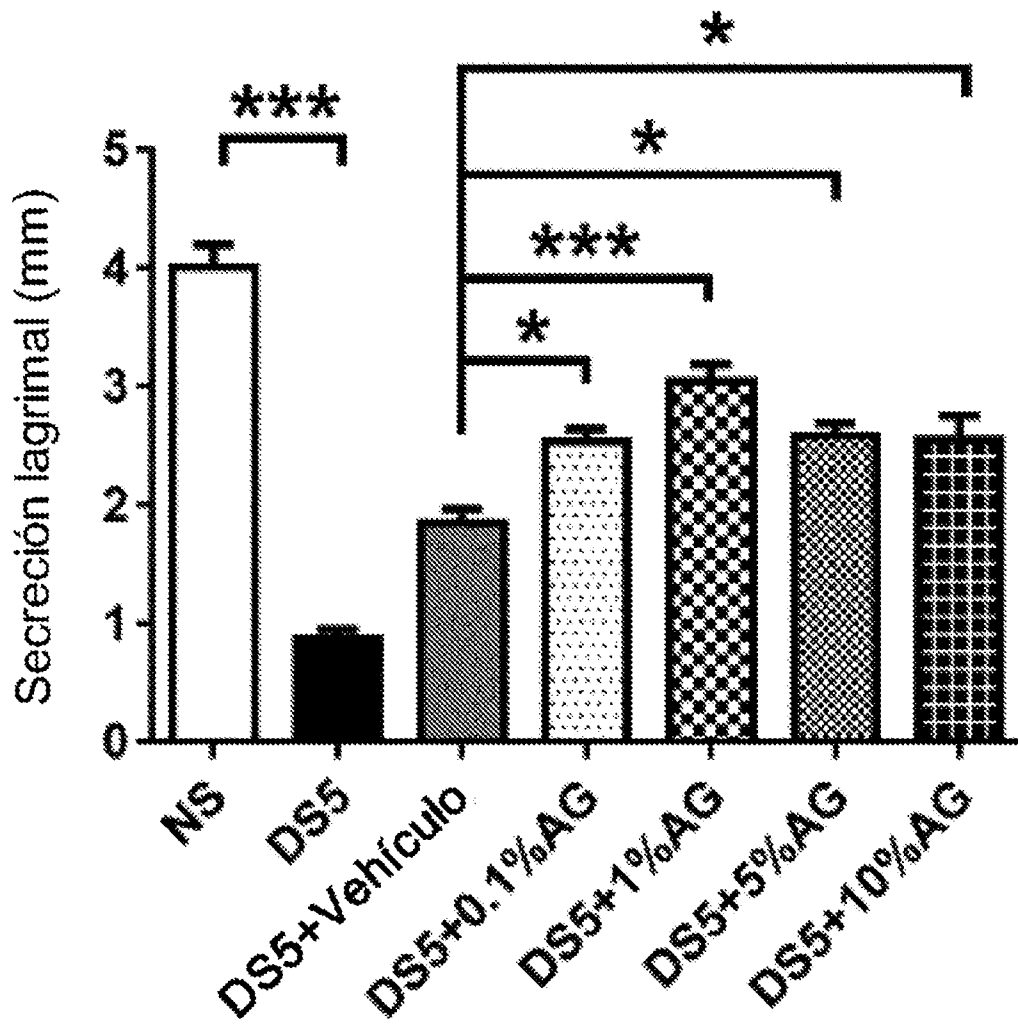


Figura 1

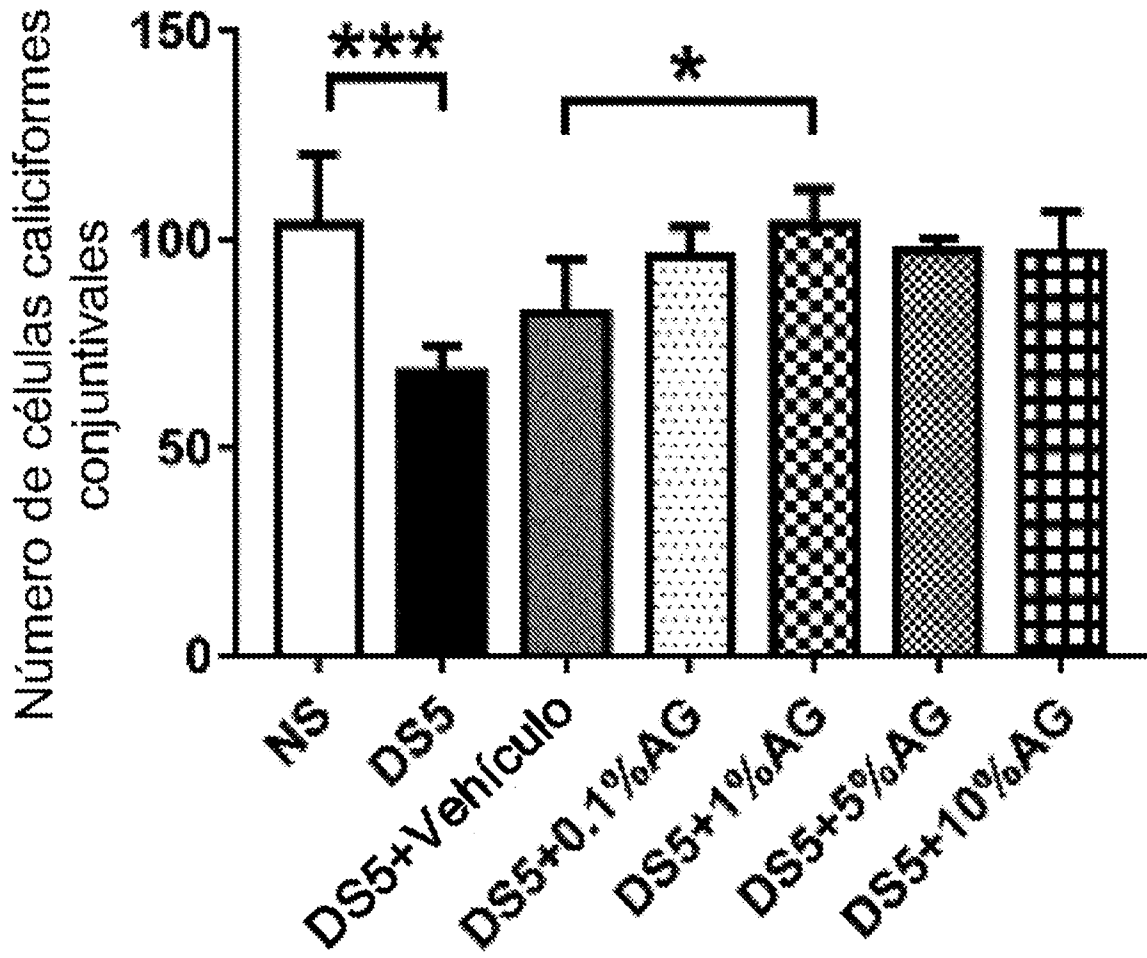
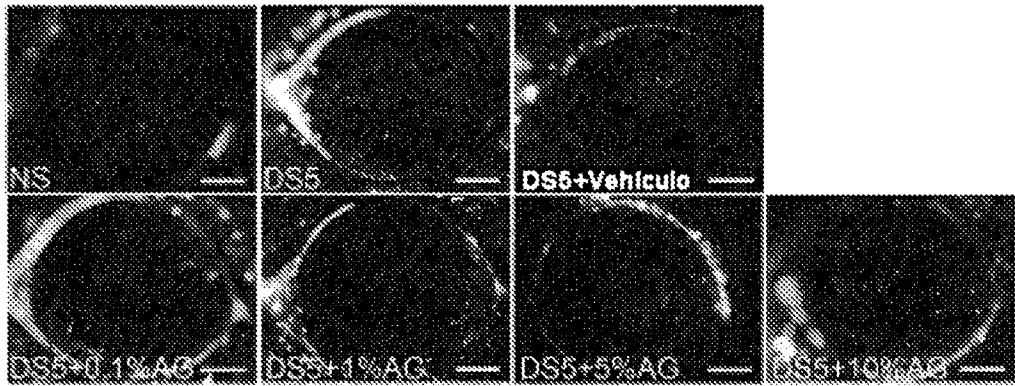
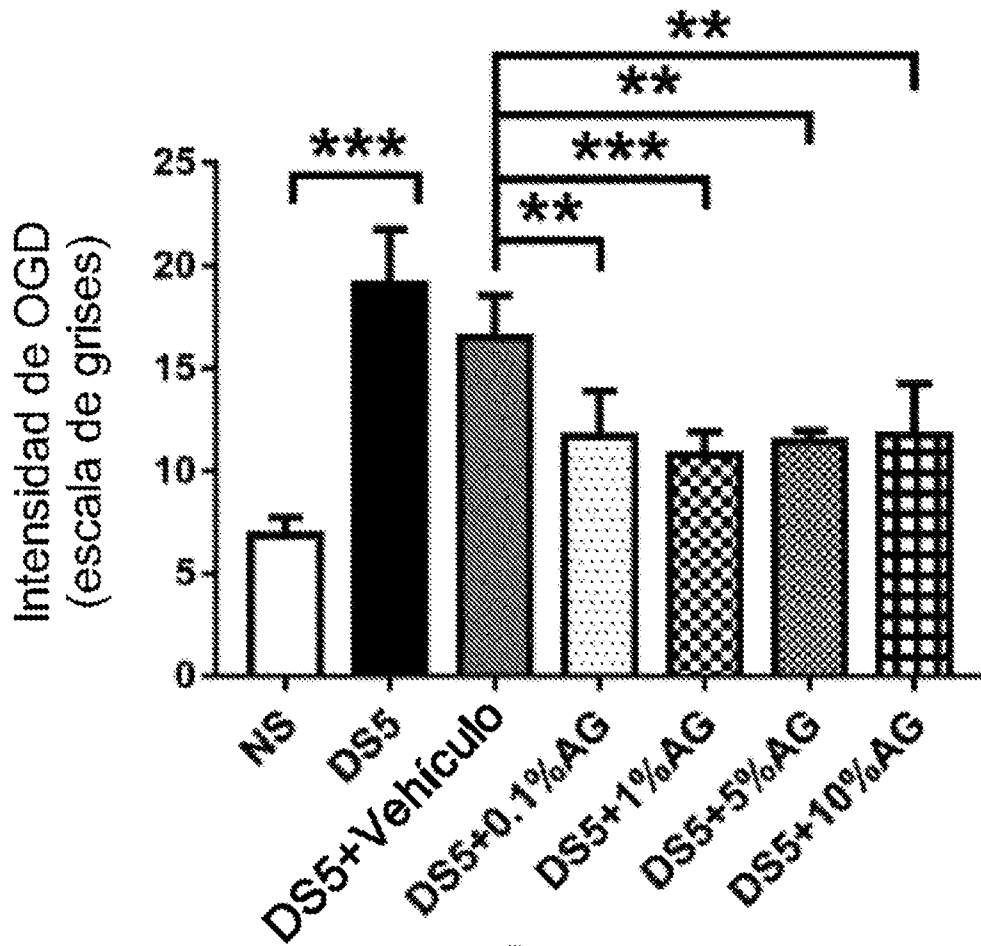


Figura 2



A



B

Figura 3