



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 277 831**

⑤1 Int. Cl.:
A61P 27/02 (2006.01)
A61K 31/535 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **00911259 .0**
⑧6 Fecha de presentación : **13.03.2000**
⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1173255**
⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **23.01.2002**

⑤4 Título: **Utilización de pirenóxina para la protección de tejidos corneales en fotoqueratectomía.**

③0 Prioridad: **17.03.1999 IT RM99A0166**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.08.2007

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.08.2007

⑦3 Titular/es: **FARMIGEA S.p.A.**
Via G.B. Oliva, 6/8
56121 Pisa, IT

⑦2 Inventor/es: **Boldrini, Enrico y**
Ciuffi, Mario

⑦4 Agente: **Durán Moya, Carlos**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Utilización de pirenoxina para la protección de tejidos corneales en fotoqueratectomía.

La presente invención se refiere a la utilización de pirenoxina para la protección de los tejidos corneales en intervenciones de fotoqueratectomía. Más particularmente, la presente invención se refiere a la utilización de pirenoxina y sales de la misma como agentes capaces de inhibir en el interior de la córnea el fenómeno oxidativo determinado por las especies reactivas de oxígeno (o ROS, especies reactivas de oxígeno) que se producen en los tejidos después de la irradiación con láser.

Tal como se conoce, la cirugía oftálmica, y particularmente la refractiva, que se dirige a modificar el poder refractivo del ojo a efectos de corregir defectos visuales no negligibles, utiliza diversas técnicas, más o menos consolidadas o en desarrollo, algunos ejemplos de las cuales son la queratomileusis radial, epikeratofagia y queratomileusis. Además de éstas, también en el sector de la oftalmología ha aumentado notablemente el uso del láser, particularmente del láser de estado sólido, (tal como láser neodimio:itrio-aluminio-granate, conocido como Nd:YAG), y, sobretodo, láser excímer.

El láser excímer es un láser de pulsos que, debido a la descomposición de dímeros de gases nobles excitados (excímeros obtenidos de mezclas de gases de halógeno y gases nobles), es capaz de emitir grandes cantidades de energía en forma de radiación en el rango del ultravioleta lejano (UV-C), en forma de trenes de pulsos que tienen una duración, frecuencia y fluencia predeterminadas. Cualquier fotón emitido durante la irradiación tiene suficiente energía para romper los enlaces intramoleculares del material expuesto, de manera que las moléculas irradiadas se “rompen” en fragmentos volátiles pequeños que son expulsados a una velocidad supersónica representando un proceso conocido como “fotodescomposición”.

En las aplicaciones que utilizan el láser excímer en intervenciones de cirugía corneal, se utiliza habitualmente un láser de argón-flúor, que emite radiación con una longitud de onda de 193 nm, que es adecuada para llevar a cabo intervenciones altamente precisas con un control óptimo de la profundidad de penetración y un efecto mínimo del daño térmico o mecánico en las proximidades de los tejidos expuestos. Al contrario de otros láser utilizados en el sector clínico, el láser excímer no emite energía concentrada en un punto focal sino que tiene un radio con una sección transversal amplia que, pasando por rendijas adecuadas, se dirige a alcanzar zonas de la córnea con una superficie amplia con un control preciso de la forma y los tamaños de las zonas expuestas. La energía emitida es adsorbida casi totalmente por una capa superficial de un grosor de unas micras y da lugar, mediante evaporación, a la ablación en cada pulso de capas de la córnea con un grosor algo mayor que el molecular, con una reproducibilidad que no se consigue mediante otras técnicas.

El láser excímer se utiliza ampliamente para la remodelación refractiva corneal en técnicas conocidas como queratectomía fotorefractiva o PRK y LASIK (queratomileusis intraestromal con láser), para la corrección de varias ametropías entre las cuales la más difundida es la miopía. Tal como se conoce, esta última es un defecto determinado por una curvatura en la córnea mayor que la requerida por la longitud del globo ocular, de manera que los rayos de luz del exterior de refractan de una manera que, antes de que alcance la retina, convergen en un punto focal. En este caso, la utilización de láser excímer proporciona que las capas de tejido corneal, cuyo grosor aumenta hacia el centro, se corten reduciendo por lo tanto la curvatura de la córnea. Cuando la técnica se utiliza para la corrección de la hipermetropía, en la que, por el contrario, la modificación a obtener es un aumento de la curvatura de la córnea, la cantidad de tejido cortado en la periferia de la zona expuesta es más importante que en el centro. Finalmente, para la corrección del astigmatismo que, como se sabe, es una ametropía provocada por la diferencia de curvatura en varios meridianos de la superficie ocular, la profundidad de la ablación puede ser asimétrica, dependiendo del meridiano a “alisar”.

Más recientemente, se ha sugerido que la utilización del láser excímer para la eliminación terapéutica de tejidos corneales superficiales, para el tratamiento de irregularidades y opacidades corneales: tales como de tipo distrófico, degenerativo, cicatricial o infectivo. Se ha utilizado dicha operación, denominada queratectomía fototerapéutica o PTK, por ejemplo, para el tratamiento de erosiones corneales recurrentes, queratitis después de la operación, distrofias corneales como distrofias de Reis-Buckler, opacidades o cicatrices corneales causadas por Herpes simples, irregularidades en la superficie tras las intervenciones quirúrgicas, por ejemplo como resultados de una queratoplastia o intervenciones corneales refractivas. Al contrario de la fotoqueratectomía refractiva, PTK se dirige a eliminar irregularidades en la superficie corneal a efectos de alisar el perfil de la misma y, por lo tanto, implica la ablación de las capas de tejido con diferente grosor en las diversas zonas de la superficie corneal tratada.

Aunque las intervenciones de fotoqueratectomía descritas anteriormente parecen ser una alternativa menos traumática que las técnicas oftálmicas quirúrgicas, el proceso de reconstitución después de la fotoablación tiene desventajas que son más o menos transitorias y penetrantes o impertinentes para el paciente, entre las cuales, por ejemplo, existen problemas de cicatrización corneal, generación de opacidades bajo el epitelio denominadas “neblina”, que determinan una reducción de la eficacia visual resultante del fenómeno de la “dispersión de la luz” (difusión de la luz) y, en algunos casos, una reducción de los valores de refracción como resultado de la operación. Parece ser indiscutible por los técnicos en el sector que, como mínimo, parcialmente dichos efectos resultan de la formación de radicales libres y, generalmente, especies reactivas de oxígeno, que se detectaron como efecto secundario de la irradiación UV, y del aumento de la temperatura que tiene lugar en los tejidos implicados.

Tal como se conoce el término “especies (o sustancias) reactivas de oxígeno”, o ROS, significa en la actualidad colectivamente los radicales libres y especies químicas no radicales que actualmente participan en procesos biológicos oxidativos y cuyo exceso con respecto a las condiciones de equilibrio natural se considera que es la base de un número creciente de fenómenos degenerativos y patológicos. Específicamente, el término ROS comprende el radical aniónico superóxido O_2^- , el radical hidroxilo OH^\cdot , oxígeno singlete 1O_2 y el peróxido de hidrógeno, H_2O_2 , así como los radicales alcóxido RO^\cdot y peróxido ROO^\cdot que se generan a partir de moléculas orgánicas durante los procesos oxidativos. La actividad de estas especies ejerce, dentro del organismo, en varios componentes celulares, entre los cuales existen un gran número de proteínas estructurales y enzimas, ADN, ARN y, sobretodo, lípidos de membrana.

De hecho, la peroxidación lipídica es el mecanismo más conocido mediante el cual las ROS ejercen su actividad degenerativa en las estructuras celulares que dañan los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) contenidos en las membranas citoplasmáticas, frecuentemente como ésteres fosfolípidos. En la etapa inicial de este proceso, la acción de un radical libre abstrae un átomo de hidrógeno H^\cdot de la cadena lipídica, formando un radical libre R^\cdot que experimenta una redistribución molecular de los dobles enlaces dando lugar a un radical dieno conjugado. Este último reacciona rápidamente con oxígeno molecular formando de esta manera un radical de peróxido lipídico ROO^\cdot , que, al ser un oxidante tan fuerte para atacar otro PUFA, inicia la etapa de propagación de la reacción. De esta manera, un radical de hidroperóxido lipídico, $ROOH$; y, correspondientemente, se forma otro radical de peróxido lipídico ROO^\cdot . Por lo tanto, la principal derivación de la reacción descrita anteriormente tiene lugar mediante ataques de cadenas de radicales a los lípidos de membrana que, de esta manera, se transforman paso a paso en los hidroperóxidos correspondientes hasta la terminación de la cadena mediante un radical libre.

Diversos agentes naturales de los tejidos celulares pueden llevar a cabo de la acción descrita anteriormente, actuando en la práctica como secuestradores o antioxidantes. Entre éstos los más conocidos son las vitaminas C (ácido ascórbico) y E (alfa tocoferol), enzimas antioxidantes, tales como superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa y varios compuestos de peso molecular bajo, entre ellos glutatión (GSH), tirosina, ácido úrico. La protección natural del estrés oxidativo realizado por estas sustancias, sin embargo, no puede ser suficientemente fuerte para antagonizar el efecto de degradación de ROS, en cuyo caso la peroxidación lipídica puede dar lugar a un daño irreversible a las membranas celulares.

También se ha demostrado que las formas oxidadas de los iones de metales de transición, tales como Fe^{3+} y Cu^{2+} , en presencia de H_2O_2 , pueden acelerar el mecanismo oxidativo mediante una reacción no enzimática conocida como reacción de Fenton. En presencia de un agente reductor, tal como ascorbato, parte de los iones oxidados se reducen al estado de oxidación más bajo (por ejemplo, Fe^{2+}) y la reacción, cuya velocidad depende de la proporción $Fe^{3+}:Fe^{2+}$, continúa dando lugar a la conversión de peróxido de hidrógeno en ión hidroxilo, OH^- , más un radical hidroxilo, OH^\cdot . Éste último representa la ROS más reactiva.

Aunque es difícil detectar las ROS debido a su reactividad y, por lo tanto, a sus tiempos de vida cortos, la formación de radicales libres en tejidos sometidos a fotoablación utilizando láser excímer ha sido ampliamente demostrada. Por ejemplo, se ha observado la presencia de radicales libres en córneas bovinas expuestas a irradiación utilizando láser de ArF mediante espectroscopia EPR (resonancia paramagnética electrónica) (R.J. Landry y otros, “Laser and Light in Ophthalmol.”, 6: 87-90, 1994), mientras que las mediciones del aumento de temperatura a nivel del endotelio corneal y las determinaciones analíticas de la reducción de la actividad de SOD a nivel de humor acuoso confirmaron la formación de ROS en la córnea de conejos tratados por PRK (K. Bigihan y otros, “Jpn. J. Ophthalmol.”, 40, 154-157, 1996). La peroxidación lipídica se detectó, de nuevo en la córnea de conejos, tras el tratamiento por PTK realizado utilizando láser excímer, ambos mediante pruebas histoquímicas y la detección analítica de la presencia de productos de degradación en extractos lipídicos de córnea, particularmente dienos y cetodienos conjugados (S. Hayashi y otros, “British J. Ophthalmol.” 81, 141-144, 1997).

Además, se ha observado mediante espectroscopia EPR la generación de radicales libres también cuando los tejidos corneales son irradiados utilizando un láser de estado sólido Nd:Yag, a una longitud de onda de 213 nm en lugar de 193 nm, cuya longitud de onda es habitual de un láser excímer de argón-flúor. Sin embargo, en este caso, además de un daño oxidativo comparable con el obtenido utilizando el láser excímer, también se ha detectado un efecto citotóxico más destacado, de alguna manera dependiente de la mayor longitud de onda de la radiación (E. Ediger y otros, “Lasers Surg. Med.”, 21: 88-93, 1997).

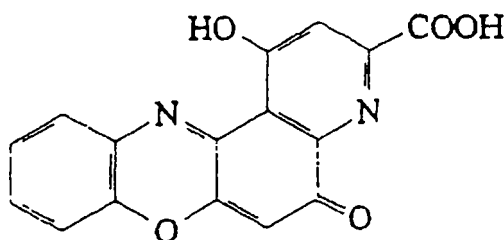
Además del efecto de la radiación UV en la producción primaria de ROS, también se ha observado que la actividad de quimiotaxis de los hidroperóxidos lipídicos formados de esta manera extrae células polimorfonucleadas *in situ* y macrófagos que, a su vez, mediante la producción de ROS adicional, potencian la acción dañina de la radiación que induce un conjunto de efectos citotóxicos (H. Goto y otros, “Curr. Eye Res.”, 10:1009-1014, 1991).

Aunque la literatura descrita anteriormente demuestra la formación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno en el tratamiento de fotoablación y relaciona este fenómeno con otras posibles complicaciones después de la operación, no se considera que sea particularmente importante la protección de los tejidos corneales mediante la administración de agentes exógenos que tienen una actividad antagonizante de ROS, tanto antes como después de la operación. En realidad, la terapia farmacológica utilizada actualmente para los tratamientos por fotoqueratectomía consiste en la aplicación tópica ocular, tras la operación, de antibióticos, con el objetivo claro de mantener en condiciones asépticas la superficie ocular durante el proceso de cicatrización, y fármacos antiinflamatorios (esteroidales o, según las tendencias más recientes, no esteroidales) a efectos de actuar contra las condiciones de flogosis tras la operación.

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar a los tejidos corneales implicados en una radiación UV, tanto antes como poco después del tratamiento, un agente adecuado para realizar una actividad protectora contra el daño celular desencadenado por las especies reactivas de oxígeno y para secuestrar la acción de las mismas. Particularmente, el agente sugerido debe ser eficaz para contrarrestar la peroxidación lipídica en los tejidos celulares corneales.

En los estudios sobre los efectos de ROS y la inhibición de la peroxidación lipídica por diversas moléculas exógenas que tienen actividad secuestradora o antioxidante, se ha observado que la pirenoxina, un principio activo ya conocido y utilizado terapéuticamente en otra zona ocular, el cristalino, muestra una actividad destacable en la inhibición de la peroxidación lipídica en los tejidos corneales y es, por lo tanto, capaz de realizar una acción protectora contra las modificaciones celulares resultantes de la radiación con láser.

La pirenoxina o ácido 1-hidroxi-5-oxo-5H-pirido-[3,2a]-fenoxazin-3-carboxílico (también denominado pirfenosona) es un compuesto conocido que tiene la siguiente fórmula:



utilizado en oftalmología, habitualmente en forma de una sal sódica del mismo, para el tratamiento de las cataratas. Esta última es una condición progresiva anormal del cristalino del ojo, caracterizada por una pérdida creciente de transparencia. Tal como se sabe, las cataratas resultan más frecuentemente de modificaciones degenerativas, que frecuentemente aparecen después de los 50 años de edad, mientras que más raramente puede ser resultante de traumas o exposición a venenos. Inicialmente, la visión es borrosa, a continuación, las luces brillantes deslumbran de manera difusa y se puede desarrollar una distorsión y doble visión. Al final, si no se tratan las cataratas, aparece la anopia. Además del tratamiento quirúrgico, que se hace necesario para estados degenerativos más avanzados e implica la ablación del cristalino (con o sin implantación quirúrgica de una lente intraocular), las cataratas se pueden tratar mediante la administración tópica oftálmica de pirenoxina en forma de colirio.

Se ha postulado que la capacidad de la pirenoxina para inhibir la formación de opacidades lenticulares resulta de, como mínimo, tres mecanismos de acción diferentes: (a) inhibición de la actividad de oxidación de las moléculas quinona en las proteínas lenticulares, mediante la unión de sus grupos -SH; (b) activación y normalización de la actividad de bombeo de cationes realizada por la cápsula del cristalino; (c) inhibición de la síntesis de sorbitol y la reducción del daño osmótico resultante de la acumulación de esta sustancia (S. Iwata, "J. Pharmac. Soc. Jap.", 1964; 844: 435-440; F. Ikemoto y otros, en: "Proc. 50th Congr. Pharmacol. Soc. Jap.", Región Kanto, 1974: I. Korte y otros, "Ophthalmic Res.", 1979; 11: 123-125).

Dentro de los estudios más recientes sobre la actividad biológica de la pirenoxina, también se ha observado, y es el objeto de la solicitud de patente europea No. EP 0885612, asignada al presente Solicitante, que esta molécula, además de la actividad en el tratamiento de las cataratas, tiene también propiedades antiinflamatorias. Estas propiedades, que se han verificado en modelos animales, se expresan a través de un mecanismo de acción no elucidado en la solicitud de patente mencionada, aunque en la descripción de la patente mencionada se postula una actividad inhibidora del catabolismo oxidativo de ácido araquidónico, que da lugar a la producción de prostaglandinas.

Según la presente invención, se ha observado, tal como ya se ha descrito, que la pirenoxina se puede utilizar ventajosamente para la protección de los tejidos corneales durante los tratamientos con láser excímer, ya que es activa en la inhibición de la peroxidación lipídica en los tejidos celulares corneales.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es la utilización de ácido 1-hidroxi-5-oxo-5H-pirido-[3,2a]-fenoxazin-3-carboxílico (pirenoxina) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la producción de un fármaco oftálmico tópico adecuado para la protección de los tejidos corneales en las intervenciones de fotoqueratectomía. Tal como se ha indicado, el fármaco sugerido se diseña como inhibidor de la actividad de ROS (especies reactivas de oxígeno) a nivel de los tejidos corneales y, particularmente, como inhibidor de la peroxidación lipídica a nivel de dichos tejidos.

La utilización de pirenoxina como agente protector antes y después de la operación tiene aplicación en cualquier tratamiento con fotoqueratectomía, suponiéndose un uso más amplio en aquellos tratamientos que actualmente están más difundidos, es decir, fotoablación corneal mediante láser excímer, tanto refractivo como terapéutico y, en el primer caso, mediante las técnicas PRK y LASIK.

Las preparaciones oftálmicas de la presente invención contienen preferentemente el principio activo, es decir, pirenoxina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en una cantidad de un 0,0001% a un 0,01% en peso, expresado como ácido libre. Más convenientemente, dichos medicamentos contienen de un 0,001% a un 0,005% en peso de pirenoxina, expresado como ácido libre, siendo la concentración óptima la misma que la utilizada actualmente para la terapia de las cataratas, es decir, un 0,005% en peso. Más convenientemente, dicha pirenoxina está en forma de sal sódica. Cuando se utiliza en forma de colirio que contiene un 0,005% en peso del principio activo, la preparación según la presente invención se puede administrar, con el fin de obtener el efecto deseado de inhibición de ROS, a una dosis de una-dos gotas dos o tres veces por día, preferentemente dos gotas tres veces por día, empezando, como mínimo, uno o dos días antes de la operación y continuando, después de la operación, durante, como mínimo, uno o dos días. Generalmente, la dosis y la posología pueden ser ampliamente variables sin perjudicar el efecto protector global contra las ROS, ejercido por el producto.

El fármaco tópico oftálmico que contiene pirenoxina o una sal de la misma puede estar, generalmente, en la misma forma preparada o propuesta para la utilización del mismo principio activo para la terapia de las cataratas o inflamación oftálmica, tal como se describe en la publicación de patente europea mencionada anteriormente EP-A-0885612. Particularmente, el producto puede estar en forma de solución acuosa o dispersión para colirio o en forma de emulsión, ungüento, gel o crema. Preferentemente, el producto se administra como una solución oftálmica acuosa. Debido a la inestabilidad del principio activo, la pirenoxina se formula normalmente, en los medicamentos ya utilizados para el tratamiento de las cataratas, como una preparación de dos componentes en la que un primer componente comprende pirenoxina liofilizada y el segundo componente comprende un portador o diluyente acuoso aceptable para el ojo. Los dos componentes se reconstituyen antes de la utilización y la solución obtenida de esta manera se puede guardar generalmente a temperatura ambiente durante, aproximadamente, dos semanas sin degradación.

Generalmente, las composiciones que contienen pirenoxina o una sal de la misma según la presente invención se pueden formular según la técnica conocida, por ejemplo, según las indicaciones de "Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook", Hack Publ. Co., USA. Habitualmente, deberían añadirse uno o más agentes para la regulación de la tonicidad a través de los cuales la solución tiene un valor de osmolaridad adecuado. Se puede utilizar cualquiera de los productos utilizados habitualmente en la técnica, como, por ejemplo, cloruro sódico, cloruro potásico, manitol, dextrosa, ácido bórico, propilenglicol. La preparación también puede comprender ácidos o bases como agentes para la regulación de pH y/o soluciones tampón, tales como, por ejemplo, los sistemas fosfato monosódico - fosfato disódico, borato sódico - ácido bórico o succinato sódico - ácido succínico. Para una buena tolerabilidad en el ojo, el pH debería estar entre 4,5 y 8,5. Además, la composición debería comprender también conservantes y agentes antimicrobianos, tales como cloruro de benzalconio, mertiolato sódico o timerosal, metil-, etil- y propil-paraben, clorobutanol, así como agentes quelantes o secuestrantes, tales como edetatos o EDTA. Si el producto se envasa en recipiente de una sola dosis, se puede evitar la presencia de conservantes, pero cuando se utilizan recipientes de dosis múltiples, por ejemplo, viales para colirios que contienen de 5 a 15 ml, la presencia de los conservantes es necesaria.

Además, la preparación oftálmica puede comprender ingredientes opcionales adicionales, tales como agentes espesantes, antioxidantes, estabilizantes, agentes activos de superficie, etc. Sólo a modo de ejemplo, a continuación se describe la composición de un producto ya disponible comercialmente diseñado para el tratamiento de las cataratas. La formulación también puede ser adecuada para la utilización del producto como agente protector de la córnea contra radicales libres o ROS.

Algunos resultados experimentales obtenidos dentro del alcance de la presente invención se describen a continuación a modo de ejemplo junto con los dibujos que se acompañan, en los que:

la figura 1 muestra el efecto de 10^{-5} M de pirenoxina en la formación de fluorescencia de sustancias lipídicas solubles en córneas de conejos tras la incubación con macrófagos autólogos estimulados por f-MLP. Cada barra \pm S.E.M. representa el valor promedio (entre paréntesis el número de córneas procesadas). *: $p < 0,01$ vs control. Los valores de control son significativamente más elevados que los valores basales ($p < 0,0002$);

la figura 2 muestra la formación de fluorescencia *in vitro* de sustancias lipídicas solubles en células corneales epiteliales irradiadas (80 mJ/cm^2) con UV_{312} tras la incubación en presencia y en ausencia de 10^{-5} M de pirenoxina. Los resultados son la media de 3 experimentos;

la figura 3 muestra los efectos *ex vivo* de instilaciones de pirenoxina ($60 \mu\text{l}$ cada hora durante 8 horas durante 2 días) en los ojos de conejo sobre la formación de dienos conjugados en las córneas *in vitro* sometidas a peroxidación lipídica inducida con hierro. Cada barra \pm S.E.M. representa el valor promedio (entre paréntesis el número de córneas procesadas). (a): expresada por la diferencia entre la muestra y el valor basal (sin inducción con hierro: $1,3 \pm 0,21 \text{ nmoles/hemicórnea}$; $n 0 8$). *: $p < 0,02$ vs control.

Ejemplo

Formulación de pirenoxina sódica liofilizada

El componente en polvo seco del producto tiene la siguiente composición, en la que las cantidades se dan para la reconstitución en una solución de 7 ml:

ES 2 277 831 T3

| | |
|--|----------|
| Pirenoxina sódica | 0,376 mg |
| Taurina (equivalente a 0,350 mg de pirenoxina) | 34,34 mg |

5 En la preparación, la taurina y la pirenoxina sódica se disuelven separadamente en agua desionizada, las dos soluciones se esterilizan mediante filtración y, a continuación, se mezclan conjuntamente y se someten al proceso de liofilización.

El disolvente acuoso tiene la siguiente composición:

| | | |
|----|---------------------------------------|-----------------|
| 10 | polivinil alcohol | 98 mg |
| | ácido succínico | 2,31 mg |
| | succinato sódico · 6 H ₂ O | 89,215 mg |
| | cloruro sódico | 34,3 mg |
| 15 | cloruro de benzalconio | 0,175 mg |
| | edetato sódico | 0,89 mg |
| | agua desionizada | c.s. hasta 7 ml |

20 Además de los ingredientes mencionados en la descripción anterior, dicha formulación contiene PVA como agente espesante. El pH del componente disolvente es 6. La formulación se prepara mediante, en primer lugar, la mezcla y la disolución en agua de todos los ingredientes a excepción del cloruro de benzalconio. Tras la completa disolución de todos los productos, se añade el cloruro de benzalconio con agitación continua y la mezcla se esteriliza mediante filtración. El pH del producto reconstituido es 6-6,3.

25 *Pruebas de análisis como inhibidor de la peroxidación lipídica*

A efectos de evaluar el rendimiento de la pirenoxina como agente protector contra la acción de ROS en los tejidos corneales y, particularmente, contra la peroxidación lipídica, se evaluó la actividad *in vitro* de la pirenoxina tanto en 30 homogenatos corneales en presencia del sistema de oxidación Fe(III)-ácido ascórbico como en toda la córnea sometida a la acción de ROS generadas a partir de macrófagos autólogos.

Además, se inspeccionaron cuidadosamente los efectos de la luz UV en la córnea ya que el tejido corneal está expuesto continuamente al medio externo y, por lo tanto, a la acción combinada de oxígeno y radiación.

35 Los primeros experimentos llevados a cabo mediante la radiación de UV₃₁₂ de células epiteliales corneales sugieren que también, en este caso, la pirenoxina proporciona una protección de antioxidación.

Se ensayó la misma molécula para su acción *ex vivo* en la protección de la córnea contra los ataques oxidativos *in vivo* catalizados por la presencia de hierro, así como contra la acción de un complejo fisiológico de hierro, ferritina, previamente radiado con UV y, a continuación, se inyectó en el estroma de la córnea. En ambos casos la pirenoxina dio resultados satisfactorios.

A partir de los experimentos llevados a cabo hasta ahora, la pirenoxina resulta ser un medio eficaz para proteger la 45 córnea afectada de patologías generadas por especies reactivas de oxígeno.

Efecto in vitro de pirenoxina sobre la acción de ROS inducida en homogenatos de epitelio y endotelio de córneas de conejo

50 El procedimiento experimental para la evaluación de la acción inhibidora contra la peroxidación lipídica ejercida por la pirenoxina en células epiteliales y endoteliales de córnea utilizó el sistema Fe(III)-ácido ascórbico para inducir el fenómeno peroxidativo. El ataque oxidativo en los lípidos de membranas se confirmó mediante determinaciones espectrofotométricas tanto de dienos conjugados como de sustancias solubles en lípidos fluorescentes que, como se sabe, se generan por la degradación oxidativa de moléculas lipídicas.

55 El procedimiento experimental utilizado incluía las siguientes etapas: a) abstracción de la córnea del ojo de conejos pigmentados machos seleccionados de forma adecuada y preparados para el estudio; b) incubación de estos últimos en 100 μ m de tampón fosfato, pH 7,5, en presencia de 1000 U de collagenasa y 5 μ M de CaCl₂ durante 20 horas a 37°C; c) centrifugación a 35000 rpm a 0°C durante 10 minutos y lavados del sedimento con tampón fosfato; d) 60 homogenización del sedimento celular en 1 ml de tampón, pH 7,4 (10% p/v); e) incubación de una parte alícuota de homogenato adecuado con 10 μ m de FeCl₃ y ácido ascórbico en tampón fosfato, pH 7,4, a 27°C durante 30 minutos en presencia y en ausencia de 10⁻⁵M de pirenoxina; f) extracción de las sustancias solubles en lípidos utilizando una mezcla de cloroformo/metanol (2:1 v/v). La determinación de los dienos conjugados contenidos en el extracto lipídico se llevó a cabo según Buege y otros ("Methods Enzymol." 52: 302-310, 1974), mientras que las sustancias solubles en 65 lípidos fluorescentes se determinaron según Fletcher y otros ("Anal. Biochem." 52: 1-2, 1973). Los resultados de las pruebas se describen en la siguiente tabla.

TABLA 1

| | mmol de dienos conjugados/hemicórnea | U de fluorescencia/hemicórnea |
|--|---|----------------------------------|
| 5 Homogenato (valor basal) | 2,93 ± 0,14 | 4,91 ± 0,11 |
| 10 Homogenato + Fe(III) (control) | 3,49 ± 0,13* | 5,89 ± 0,11# |
| 15 Homogenato + Fe(III) + 10 ⁻⁵ M pirenóxina | 2,77 ± 0,07* | 5,22 ± 0,13## |
| 20 Cada valor ± SEM representa el valor promedio de, como mínimo, 3 (x2) determinaciones | | |
| 25 *p<0,05 y #: p<0,001 vs valores basales relativos; | | |
| **p<0,001 y ##: p<0,005 vs controles relativos. | | |

A partir de los datos indicados en la tabla anterior, está claro que la pirenóxina ejerce una clara actividad inhibidora contra la acción peroxidante lipídica de ROS, inducida por el sistema Fe(III)-ácido ascórbico, tal como se puede deducir a partir del descenso notable de los dienos conjugados y el descenso significativo de las sustancias solubles en lípidos fluorescentes cuando dicha molécula anterior estaba presente.

Efecto protector in vitro de pirenóxina en córneas sometidas a la acción de ROS producidas a partir de macrófagos autólogos de conejos estimulados con f-MLP

A efectos de evaluar la inhibición ejercida por la pirenóxina contra la actividad oxidante de ROS producidas de macrófagos a nivel de la córnea, se llevó a cabo el siguiente procedimiento: (a) lavado bronco-alveolar del conejo para obtener los macrófagos; (b) abstracción de la córnea del ojo del conejo; (c) incubación de las córneas con macrófagos (800000 células/pocillo) estimulados o no estimulados con 10⁻⁷M de f-MLP durante dos horas a 37°C, 5% de CO₂ en presencia y en ausencia de 10⁻⁵M de pirenóxina; (d) separación y homogenización de las células corneales epiteliales o endoteliales y la posterior determinación de la fluorescencia, tal como se describe en las etapas b, c, d y f de la metodología anterior.

Los resultados indicados en la figura 1 muestran que, mediante la incubación de todas las córneas junto con macrófagos autólogos en presencia de pirenóxina, los niveles de la fluorescencia inducida resultan notablemente inferiores que los controles y son comparables con los de las córneas normales (valores basales).

Efecto protector in vitro de la pirenóxina en la acción de ROS inducida en células epiteliales radiadas con UVB

El efecto protector de la pirenóxina en células corneales epiteliales (SIRC) radiadas para 36'' utilizando luz UV₃₁₂ (80 mJ/cm²), según el siguiente procedimiento: (a) las células corneales se pusieron en placas en pocillos de 35 mm de diámetro; (b) a un 80% de confluencia las células se pusieron en contacto con un medio con un contenido bajo de suero (0,2%) para inhibir la proliferación de las mismas durante el experimento; (c) las células se irradiaron con luz UV en presencia y en ausencia de 10⁻⁵ de pirenóxina, se incubaron a 37°C durante 17 horas y se homogenizaron en tampón fosfato 10 mM, pH 7,4; (d) se determinaron las sustancias solubles en lípidos fluorescentes y las proteínas contenidas en partes alícuotas de homogenato adecuado.

Los resultados indicados en la figura 2 y en la tabla 2 muestran que la pirenóxina ejerce un efecto protector. De hecho, las sustancias solubles en lípidos fluorescentes producidas a partir de células corneales epiteliales, después de la radiación con UV₃₁₂ y en presencia de dicha molécula, eran notablemente inferiores (aproximadamente dos veces y media) que las producidas a partir de células radiadas de la misma manera pero no protegidas por pirenóxina y muestran valores de fluorescencia iguales a los de células no irradiadas.

ES 2 277 831 T3

TABLA 2

| | | | | |
|----|-------------------|-----------|------------------|---------------|
| | Células 17/12 | | | |
| 5 | | U/pocillo | Proteínas, mg/ml | U/mg proteína |
| | Control | 4,029 | 0,405 | 9,95 |
| | UV312 | 7,3 | 0,27 | 27 |
| 10 | UV312 + pir | 3,66 | 0,403 | 9,08 |
| | Células 20/12 | | | |
| | | U/pocillo | Proteínas, mg/ml | U/mg proteína |
| 15 | Control | 1,61 | 0,171 | 9,4 |
| | UV312 | 2,256 | 0,13 | 17,35 |
| | UV312 + pir | 1,8 | 0,245 | 7,35 |
| 20 | Células 14/01 | | | |
| | | U/pocillo | Proteínas, mg/ml | U/mg proteína |
| | Control | 4,48 | 0,444 | 1,08 |
| 25 | Células 14/01 | | | |
| | | U/pocillo | Proteínas, mg/ml | U/mg proteína |
| | UV312 | 1,02 | 0,189 | 5,4 |
| 30 | UV312 + pir | 0,92 | 0,333 | 2,76 |
| | Media | | | |
| | Control | 6,81 | | |
| 35 | UV ₃₁₂ | 16,6 | | |
| | UV ₃₁₂ | 6,4 | | |

40 Efecto *ex vivo* de la pirenoxina en córneas de conejo sometidas *in vitro* a la acción de ROS

Utilizando el mismo sistema Fe(III)-ácido ascórbico para inducir la peroxidación lipídica que en la primera prueba descrita, se ha evaluado *ex vivo* la acción protectora de la pirenoxina según el siguiente procedimiento experimental:

45 a) el ojo derecho de conejos del mismo tipo que en la prueba anterior se trató tópicamente cada hora durante 8 horas y durante 2 días con 2 gotas de pirenoxina al 0,005% en NaCl 0,145 M (1 gota = 30 μ l, correspondiente a aproximadamente 1,5 μ g), mientras que el ojo izquierdo se trató solamente con gotas salinas (60 μ l); b) al tercer día, el conejo se sacrificó mediante inyección pentobarbital (100 mg/kg de peso corporal); c) las córneas, abstraídas (115-120 mg), se extrajeron y se incubaron en tampón fosfato 100 μ M, pH 7,5, en presencia de 1000 U de colagenasa y CaCl₂ 5 μ M durante 20 horas a 37°C; a continuación: (d) centrifugación a 3500 rpm a 0°C durante 10 minutos y lavado del

50 sedimento con tampón fosfato; (e) homogenización de sedimento celular en 1 ml de tampón de pH 7,5, (f) extracción con una mezcla de cloroformo/metanol y determinación espectrofotométrica de los dienos conjugados. Los resultados experimentales se indican en la figura 3 y en la tabla 3 siguiente:

TABLA 3

| | | |
|----|------------------------------------|---------------------------------------|
| 55 | | (dienes conjugados (mmol/hemicórnea)) |
| | Ojos con instilación salina | 1,85 \pm 0,31 |
| 60 | Ojos con instilación de pirenoxina | 1,34* \pm 0,2 |

Cada valor \pm SEM representa el promedio de, como mínimo, 3 (x2) determinaciones

*: p<0,05

65

Los valores indicados en la tabla 3 indican que la pirenoxina, administrada tópicamente en los ojos de conejos, alcanza en la córnea tal concentración para contrastar *in vitro* la acción de peroxidación lipídica de ROS, en realidad

ES 2 277 831 T3

la formación de dienos conjugados en córneas de ojos (derechos) sometidos a una instilación de pirenoxina al 0,005% era inferior a los presentes en los ojos (izquierdos) tratados sólo con solución salina.

Efecto in vivo de la pirenoxina en córneas de conejos sometidas a inyección intraestromal de ferritina radiada con UV

El efecto *in vivo* de la pirenoxina se evaluó según lo siguiente:

(a) Los conejos se anestesiaron mediante dosis bajas de pentobarbital (20 mg/kg); (b) se inyectaron 25 μ l de ferritina 50 μ M en NaCl 0,15 M en el estroma de la córnea mediante una jeringa de insulina de 0,33 x 13 mm/29G, mientras que los controles se trataron con 25 μ l de solución fisiológica; (c) se instilaron en los ojos cada hora dos gotas (1 gota = 30 μ l) de pirenoxina al 0,005% en NaCl 0,145 M 8 veces por día durante 4 días, mientras que los controles se trataron sólo con disolvente, en la misma cantidad y frecuencia; (d) en el quinto día, los animales se sacrificaron utilizando una sobredosis de pentobarbital (100 mg/kg); (e) las córneas se extrajeron y se separaron las células de tejido y se recogieron según el procedimiento descrito en el experimento *ex vivo*; (f) se determinaron los dienos conjugados y los lípidos solubles fluorescentes contenidos en partes alícuotas de homogenato adecuado.

Los datos obtenidos, indicados en la tabla 4, señalan una reducción de la peroxidación lipídica en las córneas de ojos tratadas con pirenoxina, tal como se indica mediante la disminución de los dienos conjugados y las sustancias solubles en lípidos fluorescentes.

TABLA 4

| Ojos con inyección intraestromal de ferritina | nmoles de dienos conjugados/hemicórnea | Unidad de fluorescencia/hemicórnea |
|--|--|------------------------------------|
| Ojos con instilación salina (sin ferritina: valor basal) | 1,6 | 4,5 |
| Ojos con instilación salina (control) | 2,1 | 11,5 |
| Ojos con instilación de pirenoxina al 0,005% | 1,7 | 4,4 |

Formación de dienos conjugados y sustancias solubles en lípidos fluorescentes *in vivo* en córneas 5 días después de someter los ojos de los conejos a una inyección intraestromal de ferritina radiada con UV y la instilación tópica de una solución de pirenoxina (2 gotas cada hora durante 4 días).

REIVINDICACIONES

5 1. Utilización de ácido 1-hidroxi-5-oxo-5H-pirido-[3,2-a]-fenoxazin-3-carboxílico (pirenoxina) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la producción de un fármaco oftálmico tópico para la protección de tejido corneal en intervenciones de fotoqueratectomía.

2. Utilización, según la reivindicación 1, en la que dicho fármaco es adecuado como inhibidor de la acción de las ROS (especies reactivas de oxígeno) a nivel de los tejidos corneales.

10 3. Utilización, según la reivindicación 2, en la que dicho fármaco es adecuado como inhibidor de la peroxidación lipídica a nivel de los tejidos corneales.

15 4. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dichas intervenciones de fotoqueratectomía son intervenciones de fotoablación corneal que utilizan láser excímer.

5. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que dicho fármaco contiene de un 0,0001% a un 0,01% en peso de pirenoxina, expresada como ácido libre.

20 6. Utilización, según la reivindicación 5, en la que dicho fármaco contiene de un 0,001% a un 0,005% en peso de pirenoxina, expresada como ácido libre.

7. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dicha pirenoxina está en forma de la sal sódica correspondiente.

25 8. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que dicho fármaco oftálmico tópico está en forma de solución acuosa o suspensión para colirio o en forma de emulsión, ungüento, gel o crema.

30 9. Utilización, según la reivindicación 8, en la que dicha solución acuosa se obtiene mediante la reconstitución de una preparación de dos componentes en la que el primer componente comprende pirenoxina liofilizada, en forma de sal sódica, junto con un portador aceptable para el ojo y el segundo componente comprende un portador o diluyente acuoso aceptable para el ojo.

35

40

45

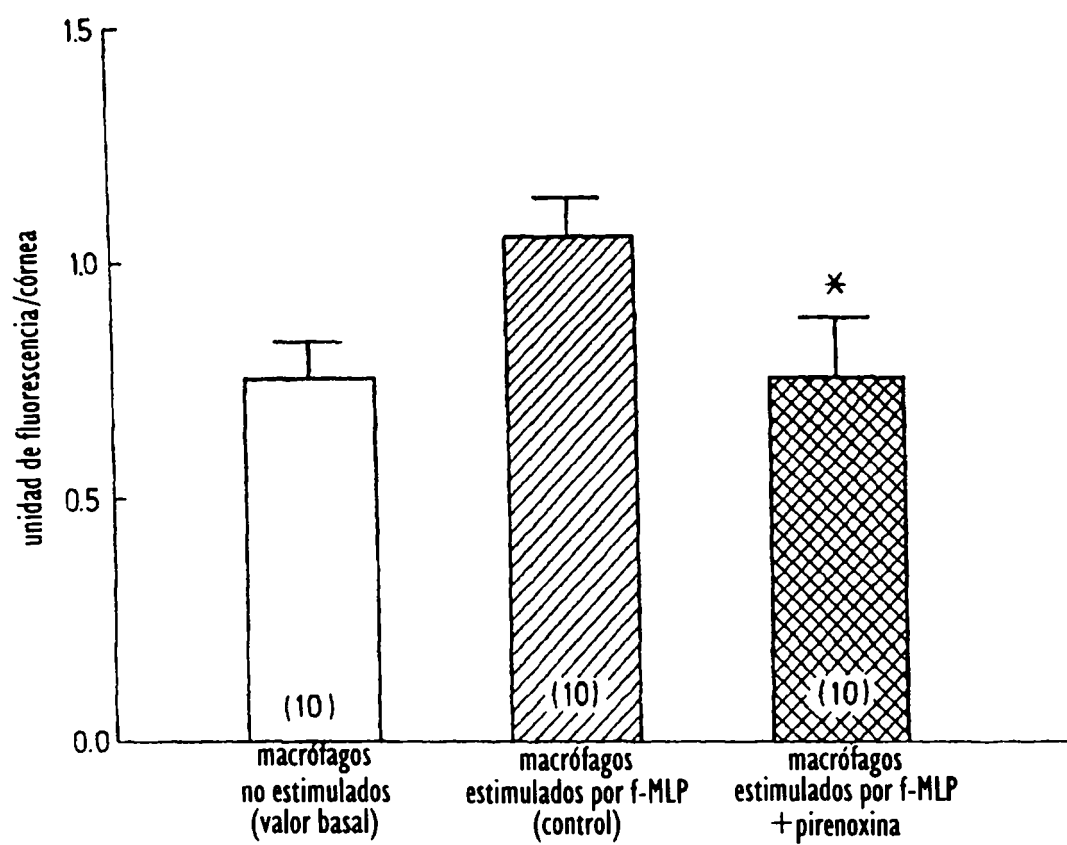
50

55

60

65

FIG. 1



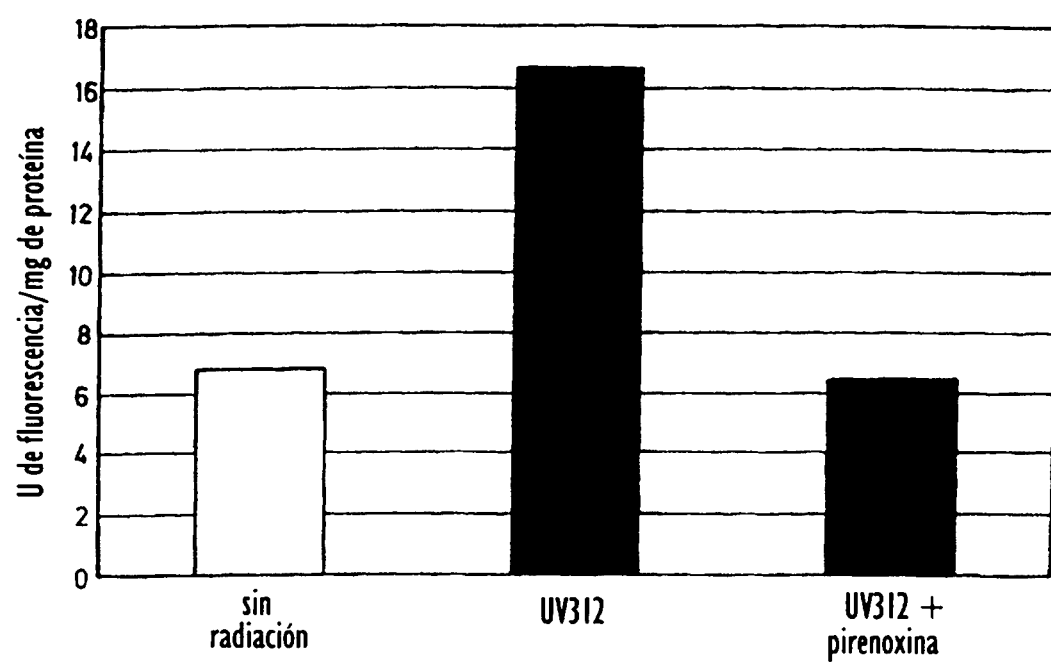


FIG. 2

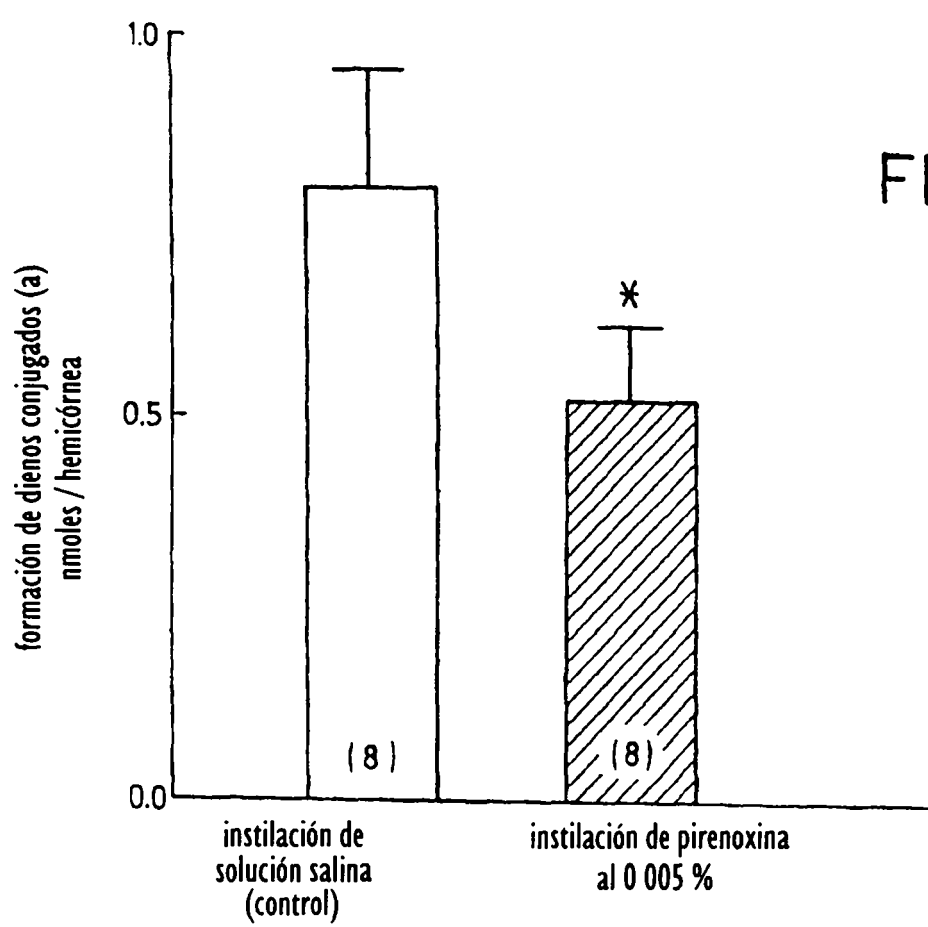


FIG. 3