



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 127 110**

⑫ Número de solicitud: 009601215

⑤① Int. Cl.⁶: A61K 31/70
A61K 9/08

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **24.05.1996**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.1999**

Fecha de concesión: **04.09.1999**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.12.1999**

⑮ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.12.1999

⑦③ Titular/es:
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
Plaza de Santa Cruz, 8
47002 Valladolid, ES

⑦② Inventor/es: **Girbés Juan, Tomás y**
Pastor Jimeno, José Carlos

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Procedimiento para variar las propiedades eléctricas del moco ocular humano y de sustitutos para uso oftálmico.**

⑤⑦ Resumen:

Procedimiento para variar las propiedades eléctricas del moco ocular humano y de sustitutos para uso oftálmico.

Se describe un nuevo procedimiento para variar la carga y por lo tanto las propiedades eléctricas del moco ocular humano consistente en variar el contenido en ácido siálico. Dicho procedimiento tiene utilidad en la fabricación de soluciones oftálmicas cuyas propiedades eléctricas determinen de manera importante su utilidad como lubricante de la superficie ocular en condiciones patológicas, como por ejemplo en el tratamiento del síndrome de ojo seco, así como su utilización como vehículo de principios farmacológicamente activos.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

ES 2 127 110 B1

DESCRIPCION

Procedimiento para variar las propiedades eléctricas del moco ocular humano y de sustitutos para uso oftálmico.

Campo técnico de la invención

La presente invención se encuadra dentro del campo de las soluciones oftálmicas naturales o artificiales que facilitan la lubricación de la superficie ocular tanto en condiciones normales como patológicas, o sirven como vehículo de principios farmacológicamente activos.

Estado de la técnica anterior a la invención

El moco ocular humano es una estructura supramolecular muy compleja compuesta principalmente por mucinas que se encuentran asociadas a otros constituyentes tales como proteínas, lípidos y DNA (Chao y cols. *Exp. Eye Res.* **47**, 185-196 [1988]; Chao y cols. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **31**, 1127-1135 [1990]). Esta capa mucídica de la película lagrimal es secretada principalmente por las células caliciformes de la conjuntiva (Moore y cols. *Exp. Eye Res.* **29**, 291-301 [1979]) aunque también se ha descrito la producción de mucinas por parte de las células del epitelio corneal y conjuntival (Greiner y cols. *Acta Ophthalmol.* **63**, 89-92 [1985]; Gipson y cols. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **33**, 218-227 [1992]).

Las mucinas son glucoproteínas macromoleculares que confieren al moco sus propiedades específicas, como la viscosidad y su capacidad lubricante. El análisis químico de las mucinas han mostrado una elevada proporción de los aminoácidos serina y treonina; además, mediante β -eliminación alcalina y posterior reducción con borohidruro tritiado se ha observado que los oligosacáridos liberados contienen galactosaminotol, lo cual indica la presencia en las mucinas de cadenas laterales de oligosacáridos unidos mediante enlaces O-glucosídicos a serina o treonina, a través de un residuo de N-acetilgalactosamina (Chao y cols. *Exp. Eye Res.* **47**, 185-196 [1988]; Moore y cols. *Exp. Eye Res.* **33**, 203-212 [1981]). Mediante análisis glucídicos de hidrolizados ácidos de moco ocular se ha detectado la presencia de fucosa, manosa, galactosa, glucosa, galactosamina, glucosamina y ácido siálico (Moore y cols. *Exp. Eye Res.* **29**, 291-301 [1979]). Se ha sugerido que las mucinas oculares consisten en cientos de cortas cadenas de polisacáridos unidas a un núcleo central (parte más interna de la mucina) de naturaleza proteica (Strous y cols. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **27**, 57-92 [1992]) y que el ácido siálico terminal podría influir en la viscosidad del moco (Kawano y cols. *Exp. Eye Res.* **47**, 439-447 [1988]). Sin embargo, a pesar de la importancia que posee la estructura glucídica en la calidad y propiedades del moco ocular humano, la configuración molecular exacta de las mucinas permanece desconocida.

Por otra parte, se sabe que la película lagrimal puede estar alterada en multitud de situaciones clínicas y así el síndrome de ojo seco esta producido en muchas ocasiones por alteraciones en la capa mucosa de la película lagrimal precorneal (Tseng y cols. *Ophthalmology* **91**, [1984]). El tratamiento farmacológico de la queratoconjuntivitis seca se dirige a la normalización de la dis-

tribución de la película lagrimal alterada sobre la superficie corneal. Sin embargo, el principal problema, el cual permanece todavía sin resolver, es encontrar una sustancia que aparte de tener una buena tolerancia, alta estabilidad y por lo tanto un largo período de retención sobre la cornea, no sea demasiado viscosa y que no tenga una influencia negativa sobre la agudeza visual (Norm y cols. *Arch. Ophthalmol.* **55**, [1977]; Lemp y cols. *Int. Ophthalmol. Clin.* **13**, [1973]).

Las sustancias descritas como agentes humectantes, a menudo llamadas lubricantes oculares o soluciones oftálmicas, son las más frecuentemente usadas para el tratamiento del ojo seco. Estas son soluciones acuosas de polímeros tales como derivados de celulosa 0.5-1.0% (Lemp y cols. *Ann. Ophthalmol.* **4**, [1972]), alcohol polivinílico 1.4% (Krishna y cols. *Am. J. Ophthalmol.* **59**, [1965]), ácido hialurónico 0.1-0.2% (Polack y cols. *Cornea* **1** [1982]), sulfato de condroitina 1% (Limberg y cols. *Am. J. Ophthalmol.* **103**, [1987]), etc. Más recientemente se ha patentado un producto de bajo peso molecular, compuesto de quitosano hidrolizado para su uso como solución oftalmológica ((SHIH) SEIKO EPSON CORP, JP 9414658 (940208)).

Descripción detallada de la invención

La presente invención, tal y como se indica en su enunciado, se refiere a un nuevo procedimiento para variar las propiedades eléctricas del moco ocular humano y de sustitutos para uso oftálmico.

La originalidad de la presente invención frente al estado de la técnica expuesto en el apartado anterior, reside en el hallazgo de un método para variar la carga eléctrica del moco ocular humano mediante la variación en el contenido en ácido siálico. Este cambio se realiza mediante el tratamiento el moco ocular con la enzima sialidasa. La solución oftálmica se libera de ácido desoxirribonucleico contaminante por tratamiento con desoxirribonucleasa (DNAsa) en solución y posteriormente se trata con neuraminidasa para eliminar los restos de ácido siálico terminales.

Las aplicaciones más importantes de la presente invención son la fabricación de soluciones oftálmicas cuyas propiedades eléctricas determinen de manera importante su utilidad como lubricante de la superficie ocular en condiciones patológicas, así como su utilización como vehículo de principios farmacológicamente activos.

Modos de realizar la invención

Los variados aspectos de la invención se describen con los siguientes ejemplos que no intentan limitar en modo alguno la invención.

Primer ejemplo:

Variación de la carga del moco ocular humano mediante el tratamiento con el enzima sialidasa.

Este ejemplo consta de cuatro partes: a) pretratamiento de la muestra de moco ocular humano; b) tratamiento enzimático de las mucinas; c) análisis de las mucinas mediante electroforesis y Western blot; d) tinción con lectinas.

a) *Pretratamiento de la muestra de moco ocular humano*

Las muestras se recogieron mecánicamente del fornix inferior de personas adultas de ambos sexos, con edades comprendidas entre los 18 y 45 años, sin enfermedades de superficie ocu-

lar, ni portadoras de lentes de contacto, tratamientos tópicos, cirugía ocular o que estuvieran recibiendo terapia sistémica tal como la administración de diuréticos, antihistamínicos, β -bloqueantes, o drogas citotóxicas que pudieran afectar la mucosa o el sistema lagrimal.

El moco ocular se liofilizó y se trató con 1 μ g de DNAasa en 50 μ l de solución 20 mM Tris-HCl (pH 7.8) durante 15 minutos a 0°C para degradar el DNA procedente de células epiteliales descamadas. A las muestras tratadas con DNAasa se les añadió 50 μ l de solución 4 M urea, 0.5 % β -mercaptoetanol, 0.4 M cloruro sódico y 20 mM Tris-HCl (pH 7.8), calentando a 100°C durante 20 minutos para solubilizar las mucinas de alto peso molecular. La muestra solubilizada se centrifugó a 3170 x g durante 10 minutos, sometiendo el sobrenadante a cromatografía de exclusión molecular en *Sephacrose CL-4B* (columna de 0.7 x 30 cm). La solución de equilibrio de columna fue 4 M urea, 0.5 % β -mercaptoetanol, 0.4 M cloruro sódico y 20 mM Tris-HCl (pH 7.8). La columna se acopló a un sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) (Farmacia-LKB, Suecia). Las muestras se eluyeron en el tampón anterior con un flujo de 0.3 ml/min, leyéndose la absorbancia a 280 nm. Los picos resueltos mediante cromatografía en *Sephacrose CL-4B* fueron recogidos, alícuotados, dializados frente a agua y liofilizados.

La cromatografía de exclusión molecular a través de *Sephacrose CL-4B* del moco ocular humano produjo dos fracciones. El análisis electroforético mostró que la fracción eluida en el volumen de exclusión correspondía principalmente a mucinas con un peso molecular aparente superior a los 200000 daltons. La fracción de medio y bajo peso molecular eran principalmente contaminantes no mucínicos tales como glucoproteínas procedentes de la película lagrimal y del glucocáliz.

b) Tratamiento enzimático de las mucinas

La fracción liofilizada de alto peso molecular resuelta mediante cromatografía en *Sephacrose CL-4B* se solubilizó calentando a 60°C durante 30 minutos en una solución 50 mM acetato sódico (pH 5.0). La muestra solubilizada fue hidrolizada con las siguientes enzimas y en las condiciones que se especifican:

1 μ l de moco ocular humano se trató con 1 mU de neuraminidasa (*sialidasa*) de *Arthrobacter ureafaciens* durante 1 hora a 37°C. Esta enzima es específica para ácido N-acetilneuramínico terminal unido mediante un enlace α 2-3, α 2-8 o α 2-6 al resto de la molécula. Una unidad (U) de neuraminidasa se define como la actividad enzimática que hidroliza 1 μ mol de N-acetilneuraminosil-D-lactosa en 1 minuto a 25°C bajo las siguientes condiciones de incubación: N-acetilneuraminosil-D-lactosa, 10 mM; acetato sódico, 50 mM; pH 5.5.

c) Análisis de las mucinas mediante electroforesis y Western blot

Las mucinas tratadas enzimáticamente fueron detectadas mediante SDS-PAGE y Western blot. La técnica de SDS-PAGE se realizó según el método descrito por Laemmli (Laemmli y cols. *Nature* 227, 680-685 [1970]) y utilizando un Phast System (Farmacia-LKB). La electroforesis se llevó a cabo en geles en gradiente de poliacrila-

mida (4-15%), a una corriente constante de 20 mA por gel y parando después de transcurridos 210 Voltios/hora. La transferencia de las mucinas a una membrana de Immobilon P (Millipore, EEUU) se lleva a cabo mediante un Phast Transfer Cell (Farmacia-LKB) durante 5 Vh. Una vez transferidas las mucinas a la membrana se detectaron usando el DIG Glycan Detection Kit (Boehringer-Mannheim, Alemania) según se indica en el protocolo facilitado por el fabricante, y que básicamente consiste en la oxidación de los grupos hidroxilo de los azúcares a grupos aldehído mediante una disolución de metaperiodato sódico, el marcaje de los grupos aldehído con un derivado de la digoxigenina (DIG), la incubación de la membrana con un anticuerpo anti-DIG marcado con fosfatasa alcalina y por último, la adición del sustrato de la fosfatasa alcalina responsable del desarrollo de color en la zona donde se encuentran los azúcares. Se utilizó la miosina como marcador glucosilado de alto peso molecular.

Se produjo una disminución en la movilidad electroforética de las mucinas cuando estas se trataron con neuraminidasa, puesto que se liberó ácido N-acetilneuramínico, azúcar que a pH fisiológico confiere a la mucina carga neta negativa. En estas condiciones, las mucinas permanecieron en el "gel de compactación".

d) Tinción con lectinas

Las mucinas oculares se purificaron mediante cromatografía de exclusión molecular como se ha descrito previamente. La fracción de alto peso molecular que contenía las mucinas se dializó frente a agua y se liofilizó, realizándose una electroforesis en geles en gradiente de poliacrilamida (4-15%) en Phast System y en las mismas condiciones que el apartado anterior. Se llevó a cabo la transferencia a una membrana de Immobilon P y se determinó de forma específica la secuencia de azúcares presentes en las mucinas mediante el empleo de lectinas marcadas con digoxigenina, utilizando el método descrito en el DIG Glycan Differentiation Kit (Boehringer Mannheim).

Las lectinas utilizadas y sus respectivas especificidades se presentan en la Tabla 1.

TABLA 1

Especificidad de las lectinas para secuencias glucídicas

Lectina	Secuencia glucídica
MAA	NeuNAc α 2-3Gal
SNA I	NeuNAc α 2-6Gal; NeuNAc α 2-6GalNAc

NeuNAc= ácido N-acetilneuramínico; Gal= galactosa; GalNAc= N-acetilgalactosamina; GlcNAc= N-acetilglucosamina; SNA I= lectina de *Sambucus nigra*; MAA= lectina de *Maackia amurensis*. Los controles positivos fueron transferrina para SNA I, y fetuina para MAA.

La tinción positiva con MAA muestra que el ácido siálico en estas mucinas está unido mediante un enlace α 2-3 a un resto de galactosa. El tratamiento con neuraminidasa eliminó la tinción, lo que indica que estos enlaces son accesibles a la acción de la neuraminidasa de *Arthrobacter ureafaciens*. Por otra parte, las mucinas no se unieron a SNA I.

Segundo ejemplo:

Variación de la carga de moco ocular humano, degradado por tratamiento con el enzima quitinasa, mediante tratamiento con el enzima sialidasa.

Este ejemplo consta de tres partes: a) pretratamiento de la muestra de moco ocular humano; b) tratamiento enzimático de las mucinas; c) análisis de las mucinas mediante electroforesis y Western blot.

a) *pretratamiento de la muestra de moco ocular humano*

El pretratamiento de la muestra de moco ocular humano se realizó como se detalla en el ejemplo primero.

b) *tratamiento enzimático de las mucinas*

1 μ l de moco ocular humano se trató con 1 mU de quitinasa de *Streptomyces griseus* durante 1 hora a 37°C. Esta enzima es específica para N-acetilglucosamina unida por un enlace β 1-4 a otra molécula de N-acetilglucosamina. Una unidad de quitinasa se define como la actividad en-

zimática que libera de la quitina 1.0 mg de N-acetil-D-glucosamina por hora a pH 6.0 y a 25°C, en una reacción que incluye un segundo paso al tratar con β -N-acetilglucosaminidasa de *Aspergillus niger* durante 2 horas.

c) *análisis de las mucinas mediante electroforesis y Western blot*

El análisis de las mucinas pretratadas con quitinasa se llevó a cabo como en el ejemplo primero.

El tratamiento de las mucinas con quitinasa incrementó ligeramente su movilidad, un hecho que indica la hidrólisis de uniones β (1-4) N-acetilglucosamina dentro de la estructura de la mucina y la formación de fragmentos con un peso molecular aparente todavía por encima de los 200000 daltons y que contienen restos de ácido siálico. El tratamiento de estos fragmentos con neuraminidasa suprime también su migración, lo que indica que es el ácido siálico el responsable de la mayor parte de la carga de las mucinas.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la variación de la carga y propiedades eléctricas de soluciones oftálmicas consistente en la variación del contenido de ácido siálico libre o polimerizado, en el que la solución oftálmica se libera de ácido desoxirribonucleico contaminante por tratamiento con desoxirribonucleasa (DNAsa) en solución y posteriormente se trata con neuraminidasa para eliminar los restos de ácido siálico terminales.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, mediante el cual la enzima hidroliza los residuos terminales de ácido siálico de las cadenas de polisacáridos de las mucinas, eliminando con ello la carga correspondiente.

3. Un procedimiento según la reivindicación 1, cuando la solución oftálmica está constituida por mucinas del moco ocular humano útiles como medicamento para el tratamiento del síndrome de ojo seco, o como vehículo de principios farma-

cológicamente activos.

4. Un procedimiento según la reivindicación 1, cuando la solución oftálmica es cualquier macromolécula útil como sustitutivo del moco ocular humano en el síndrome de ojo seco, siempre que contengan en su composición ácido siálico libre o polimerizado, tanto de manera natural como artificial.

5. Un procedimiento según la reivindicación 1, cuando la solución oftálmica es cualquier macromolécula útil como vehículo de principios farmacológicamente activos, siempre que contengan en su composición ácido siálico libre o polimerizado, tanto de manera natural como artificial.

6. Cualquier sustituto del moco ocular humano, útil como medicamento en el tratamiento del síndrome de ojo seco, o como vehículo de principios farmacológicamente activos, cuyas propiedades eléctricas sean debidas al contenido en ácido siálico libre o polimerizado.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 127 110
⑫ N.º solicitud: 9601215
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 21.05.96
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: A61K 31/70, 9/08

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	BASE DE DATOS CAPLUS en STN, Chemical Abstracts Service (Columbus, OH, U.S.A.), AN: 1996:275165, Conferencia: Ocul. Toxicol. [Proc. Congr. Int. Soc. Ocul. Toxicol.], 4th, 1995. Meeting Date 1994, 269-276, resumen.	
A	WO 9112808 A (MACNAUGHT PTY. LTD.) 05.09.1991, todo el documento.	
A	ES 2052664 A (OCULAR RESEARCH OF BOSTON INC.) 16.07.1994, todo el documento.	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe 18.02.99	Examinador L. Serriá Ramírez	Página 1/1
--	---------------------------------	---------------