



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 284 398**

② Número de solicitud: 200601078

⑤ Int. Cl.:
A61K 9/127 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

⑫ Fecha de presentación: **27.04.2006**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.11.2007**

Fecha de la concesión: **06.10.2008**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:
31.01.2008

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.12.2008**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.12.2008

⑰ Titular/es: **Universidad Complutense de Madrid
Rectorado - Avenida de Séneca, 2
28040 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Molina Martínez, Irene Teresa;
Vicario de la Torre, Marta;
Benítez del Castillo, José Manuel;
Vico Rico, Eva y
Herrero Vanrell, Rocío**

⑳ Agente: **Carpintero López, Mario**

㉑ Título: **Formulación de vesículas liposomales en soluciones acuosas con características de película lagrimal.**

㉒ Resumen:

Formulación de vesículas liposomales en soluciones acuosas con características de película lagrimal.

La presente invención trata sobre la preparación de un sistema farmacéutico liposomal en una solución acuosa que incorpora una sustancia o polímero con propiedades mucomiméticas y/o mucoadhesivas y que debido a sus componentes y características puede sustituir a la película precorneal. Esta invención se encuadra dentro de las áreas de farmacia y medicina.

ES 2 284 398 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Formulación de vesículas liposomales en soluciones acuosas con características de película lagrimal.

5 Objeto de la invención

La presente invención se refiere a la formulación de vesículas liposomales en soluciones acuosas con características de película lagrimal. La presente invención describe una formulación de liposomas en vehículos acuosos que contienen mucina o sustancias similares a la mucina, sustancias mucomiméticas o polímeros con propiedades mucoadhesivas que, a la temperatura de la superficie corneal, presentan características similares a la película precorneal del ojo humano. Dicha preparación podría ser utilizada en sustitución de la película natural y como preparado medicinal en algunas patologías del ojo como es el caso del síndrome de ojo seco.

Esta invención se encuadra dentro de las áreas de farmacia y medicina.

15 Estado de la técnica

La superficie ocular se sabe que esta formada por el epitelio conjuntival, el epitelio corneal, las glándulas lacrimales accesorias y las glándulas de meibomio. Dicha superficie se encuentra recubierta por una película continua, de un espesor de aproximadamente 10 μm , denominada película precorneal o film lagrimal. Hasta hace pocos años la estructuración teórica, generalmente aceptada, incluía tres tipos de componentes (lipídico, seroacuoso y mucinoso) repartidos en tres capas: lipídica, acuosa y mucinosa (Ibrahim H, Buri P, Gurny R. Pharm Acta Helv 1988, 63:146-53).

Estudios recientes consideran que la película precorneal es una estructura formada por los componentes acuoso-proteicos y mucinosos combinados para formar un gel hidratado. A su vez, este gel quedaría protegido por una película de carácter lipídico, cuyos componentes serían producidos principalmente por las glándulas de meibomio y cuya función sería impedir la evaporación de la lágrima y mejorar la estabilidad de la película lacrimal (Pflugfelder SC, Solomon A, Stern ME. Cornea 2000; 19 (5): 644-649. McCulley JP, Shine W. Tr Am Ophth Soc 1997; 95: 79-93).

De acuerdo con el modelo propuesto, la película precorneal constaría de dos fases:

- Fase polar hidrofílica, en contacto con la capa acuo-mucinoso que esta compuesta por fosfolípidos, esfingomieli-
na, ceramidas y cerebrósidos.

- Fase no polar hidrofóbica en contacto con la atmósfera y compuesta por lípidos no polares tales como ésteres de cera, ésteres de colesterol, triglicéridos, ácidos grasos libres e hidrocarburos.

La fracción de fosfolípidos representa aproximadamente entre el 1 - 5% del total de la secreción lipídica, siendo el de mayor concentración la fosfatidilcolina (FC) con un porcentaje cercano al 40% del total de fosfolípidos. Otros fosfolípidos, como la fosfatidiletanolamina aparecen en un porcentaje del 18%, encontrándose los restantes (un total de 10) en un rango comprendido entre el 3 y el 9%. Probablemente, esta fracción produce una disminución de la tensión superficial de la fase acuosa facilitando la extensibilidad de la película precorneal durante el movimiento de parpadeo.

El tratamiento usual del ojo seco consiste en aliviar los síntomas mediante la aplicación de sustitutos de las lágrimas por vía tópica. La composición típica de estos preparados incluye soluciones poliméricas como la recogida en la U.S. patent No 4,973,580 (Babiolo) en la que la formulación oftálmica incluye ácido hialurónico empleando como conservante peróxido de hidrógeno. También se describen formulaciones en las que se aportan componentes semejantes a la película lagrimal como soluciones hipotónicas de lecitina incluyendo agentes viscosizantes derivados de la celulosa como aparece en la U.S. patent No. 4,421,748 (Trager). La utilización de fosfolípidos para el tratamiento del ojo seco aparece en diversas patentes. Se describen sistemas tipo emulsión conteniendo fosfolípidos cargados positivamente como las descritas en las siguientes: U.S. patent No. 4,914,088 (1990) (Korb:); 5,278,151 (1994) (Korb:); 5,371,108 (1994) (Korb:); 5,294,607 (1994) (Korb:). Asimismo se describen liposomas cargados positivamente U.S. patent No 4,804,539 (Guo) (1989) y U.S. Patent No 4,818,537 (Guo) en las que se emplean liposomas con carga positiva que se suspenden en soluciones acuosas conteniendo polímeros de alta viscosidad como la hidroxietilcelulosa, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y derivados vinílicos como la polivinilpirrolidona, polivinilalcohol y sus mezclas. También se recogen emulsiones conteniendo fosfolípidos, aceites no polares y emulsificantes como la U.S. Patent No 6,656,460 (Benita).

En ninguna de estas patentes aparece la utilización de liposomas neutros o con carga negativa que se desestabilicen a la temperatura de la película precorneal ni que se asocien con mucina o con sustancias mucoadhesivas o semejantes a la mucina o mucomiméticas como es el caso de la invención que se describe a continuación.

Descripción de la invención

El método objeto de la invención que aquí se describe se refiere a la preparación de una formulación farmacéutica que actúa como sustituto de la película precorneal. La formulación incorpora vesículas liposomales de fosfolípidos como fase polar hidrofílica y lípidos no polares, ambos vehiculizados en soluciones acuosas que contengan mucina ó sustancias con propiedades semejantes a la mucina o sustancias mucomiméticas o polímeros mucoadhesivos. Las

ES 2 284 398 B2

ventajas más relevantes de esta invención consisten en la utilización de fosfatidilcolina cuya temperatura de transición es inferior a la temperatura de la superficie de la córnea y además incorpora polímeros o sustancias mucoadhesivas y/o mucomiméticas (mucina o polímeros como el ácido hialurónico, derivados de la celulosa, condroitín sulfato, quitosano, ácido colomínico, derivados tiólicos u otro componente similar).

5 Los componentes de la formulación y en concreto los fosfolípidos que componen los liposomas van a permitir la formación, en la superficie corneal, tras la desestabilización de las vesículas liposomales, de una película monomolecular insoluble en agua que actúa impidiendo la evaporación de la fase acuosa y, además, van a disminuir la tensión superficial de esta última lo que favorece su rápida extensibilidad. Los liposomas se preparan con fosfatidilcolina obtenida a partir de lecitina de soja como componente mayoritario, colesterol y α -tocoferol. La fosfatidilcolina contiene restos acilos de ácidos grasos insaturados presentando una temperatura de transición inferior a la temperatura de la superficie de la córnea, lo que garantiza la rápida formación de la película sobre la fase acuosa, una vez aplicada en la superficie de la córnea. El colesterol, por su parte, estabiliza esta película al reducir la fluidez de la matriz formada por los restos poliinsaturados de la fosfatidilcolina. Finalmente el α -tocoferol asegura la estabilidad química de los dobles enlaces evitando la posible peroxidación.

Los liposomas se vehiculizan en solución acuosa que contiene un agente isotonzante (trehalosa, cloruro sódico, glucosa...) para conseguir la osmolaridad adecuada según su uso clínico. Las soluciones podrán ser isotónicas, o hipotónicas, una vez formados los liposomas se incorporan en soluciones acuosas que contengan una o varias sustancias o polímeros con características mucoadhesivas o mucomiméticas con la finalidad de producir un aumento en el tiempo de permanencia de la formulación y de los componentes de los liposomas desestabilizados sobre la superficie ocular. Así se favorece el mantenimiento de la nueva película una vez formada y se evita la evaporación acuosa de la superficie corneal. Las concentraciones de este último componente dependerán de la viscosidad final deseada en la formulación, de su interacción con la mucina, de su tensión superficial y del comportamiento reológico esperado tras su administración. También se incluyen proteínas en la formulación con el fin de favorecer la estabilidad de la película formada y mejorar sus propiedades lubricantes. Estas proteínas se encuentran en las lágrimas naturales y pueden ser α -macroglobulina, lisozima, lipocalina y lactoferrina.

A esta formulación se le pueden añadir diferentes compuestos, en su mayoría componentes de la película lagrimal natural, que mejoran las características de formación y permanencia de la película precorneal y/o que actúan como reepitelizantes, antiinflamatorios y antioxidantes de la superficie ocular, y/o favorecedores de la diferenciación epitelial corneal y conjuntival. Dentro de estas sustancias se encuentran:

• Polímeros mucoadhesivos como el ácido hialurónico, derivados de la celulosa, condroitín sulfato, quitosano, ácido colomínico, derivados tiólicos (u otro componente similar).

• Lípidos neutros y lípidos de baja polaridad como ceras, ésteres del colesterol, triglicéridos, ácidos grasos libres e hidrocarburos.

• Vitamina A.

• Iones sodio, potasio, calcio, cloro y bicarbonato.

• Vitamina C.

• Albúmina o pre-albúmina.

• Inmunoglobulina A (IGA).

• Factor de crecimiento epitelial (epithelial growth factor: EGF).

• Factor de crecimiento transformante Beta (Beta transforming growth factor) (TGF- β).

• Factor de crecimiento de fibroblastos ácido (Acidic fibroblast growth factor) (aFGF).

• Factor de crecimiento de fibroblastos básico. (Basic fibroblast growth factor) (bFGF).

• Antiproteasas como la macroglobulina.

• Factores neurales como la sustancia P e insulinlike growth factor.

• Agentes antibacterianos como la Ig G, lisozima y complemento.

• Ácidos grasos de cadena larga como el ácido gadoleico, palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico, araquídico, linoléico, eicosénico, lignocérico, láctico y mirístico.

• Lípidos hidrofílicos como fosfolípidos, esfingomielina, ceramidas y cerebrósidos.

Modo de realización de la invención

La presente invención que se refiere a la formulación de vesículas liposomales en soluciones acuosas con características de película lagrimal, se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no son limitativos de su alcance, el cuál viene definido por la nota reivindicatoria adjunta.

Las vesículas liposomales objeto de la presente invención se realizaron según el clásico método de Bangham. Para esto, se disolvieron fosfatidilcolina, colesterol y α -tocoferol (en distintas proporciones) en cloroformo obteniéndose una concentración final de fosfatidilcolina de 8 mg/ml. Una vez saturada esta disolución con nitrógeno se introdujo en el matraz del rotavapor a una temperatura de 30-35°C con un vacío moderado. Tras la evaporación del disolvente se formó una fina película lipídica en las paredes que, a continuación, se hidrató. La fase de hidratación se realizó con una solución acuosa saturada de nitrógeno que contenía el agente isotonzante a una temperatura de 37°C, utilizando perlas de vidrio que por cizalla producían la formación de vesículas multilamelares. La concentración final de fosfatidilcolina se ajustó en función del volumen de vehículo isotonzante.

Después de dos horas de reposo y en ausencia de luz, se procedió a la sonicación de la dispersión manteniendo la temperatura del producto entre 5 y 10°C con hielo picado. La preparación finalizó realizando 5 pases de la dispersión por filtros de 0,8 μ m.

La mucina o sustancia mucoadhesiva y/o mucomimética se añadió al diluir los liposomas a la concentración final deseada. Las concentraciones finales de los liposomas en la solución polimérica pueden oscilar entre 1 mg/ml y 40 mg/ml.

El resto de los posibles componentes se añaden, en función de sus características físico-químicas, con el agente isotonzante o con las sustancias mucomiméticas.

Los liposomas *base* se prepararon a partir de fosfatidilcolina procedente de soja, y colesterol (8:1) y se reconstituyeron con agua y soluciones hipotónicas de cloruro sódico. Se estudio la influencia del proceso de sonicación en el tamaño final de las vesículas comparando la utilización de una sonda de ultrasonidos durante 2,5 min. y un baño de ultrasonidos durante 15 min. (Figura 1). El rendimiento del proceso de preparación de las vesículas lipídicas, en ambos casos, fue superior a un 90%.

Las dispersiones de los liposomas en agua a una concentración de FC de 20 mg/ml presentaron unos valores de pH comprendidos entre 6,9 y 7,2. Los diámetros medios de partículas para los distintos lotes preparados con baño de ultrasonidos oscilaron entre 392 y 478 nm. El porcentaje de partículas superiores a 1 μ m fue, en todos los casos, inferior al 2%.

Se realizaron medidas de tensión superficial con soluciones de distintas concentraciones de liposomas, obteniéndose los datos de la Figura 2.

Se realizaron pruebas de viabilidad celular con soluciones acuosas hipotónicas de liposomas *base* y de liposomas *base* con vitamina E en cultivos celulares de macrófagos. Para el estudio de citotoxicidad se utilizó la técnica de reducción, a nivel mitocondrial, de la sal bromuro de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a un producto coloreado (formazán) (Mossman T. J Immun Methods 1983, 65:55-63). Se emplearon macrófagos peritoneales obtenidos de ratones Swiss machos. Las células fueron expuestas a formulaciones que contenían soluciones acuosas hipotónicas de liposomas *base*. Como control negativo se utilizó medio de cultivo y como control positivo cloruro de benzalconio al 0,005%. Las soluciones se incubaron a 37°C durante 1 y 4 horas. Los resultados obtenidos demostraron una tolerancia óptima para los liposomas *base* con y sin vitamina E (Figuras 3 y 4).

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Influencia del proceso de sonicación en el tamaño final de las vesículas, comparando la utilización de una sonda de ultrasonidos durante 2,5 minutos (- \blacklozenge -) y un baño de ultrasonidos durante 15 minutos (- \blacksquare -). Se representa la frecuencia de cada clase, expresada en porcentaje, frente al tamaño medio de la misma en μ m.

Figura 2: Tensión superficial de la dispersión acuosa de liposomas (mN/m) en función de su concentración. La concentración de los liposomas en la solución se expresa en concentración de fosfatidilcolina (mM).

Figura 3: Viabilidad celular (%) con soluciones acuosas hipotónicas de liposomas *base* con (\blacksquare) y sin vitamina E (\blacklozenge) incubadas a 37°C durante 1 hora. Se estudian dos concentraciones de liposomas (20 y 40 mg/ml) y dos controles, uno positivo (cloruro de benzalconio 0,005%) y otro negativo (medio de cultivo).

Figura 4: Viabilidad celular (%) con soluciones acuosas hipotónicas de liposomas *base* con (\blacksquare) y sin vitamina E (\blacklozenge) incubadas a 37°C durante 4 horas. Se estudian dos concentraciones de liposomas (20 y 40 mg/ml) y dos controles, uno positivo (cloruro de benzalconio 0,005%) y otro negativo (medio de cultivo).

REIVINDICACIONES

1. Formulaci3n oft3lmica que comprende:

- ves3culas liposomales neutras o con carga negativa que comprenden fosfol3pidos, colesterol y α -tocoferol.
- una soluci3n acuosa vehiculizante de las ves3culas liposomales que comprende:
 - un agente isotonzante
 - sustancias mucoadhesivas y/o mucomim3ticas
 - una o m3s prote3nas seleccionadas entre α -macroglobulina, lisozima, lipocalina y lactoferrina.

2. Formulaci3n oft3lmica seg3n reivindicaci3n 1 donde los fosfol3pidos son fosfatidilcolina obtenida a partir de lecitina.

3. Formulaci3n oft3lmica seg3n reivindicaci3n 2 donde la lecitina es de soja.

4. Formulaci3n oft3lmica seg3n reivindicaci3n 1, donde el agente isotonzante es cloruro s3dico, trehalosa o glucosa.

5. Formulaci3n oft3lmica seg3n reivindicaci3n 1, donde la sustancia mucoadhesiva y/o mucomim3tica es el 3cido hialur3nico, derivados de la celulosa, condroit3n sulfato, quitosano, 3cido colom3nico o derivados ti3licos.

6. Formulaci3n oft3lmica seg3n reivindicaci3n 1 que comprende vitamina A.

7. Formulaci3n oft3lmica seg3n reivindicaci3n 1 que comprende vitamina C.

8. Formulaci3n oft3lmica, seg3n reivindicaci3n 1, que comprende iones sodio, potasio, calcio, cloro o bicarbonato.

9. Formulaci3n oft3lmica seg3n reivindicaci3n 1 que comprende alb3mina o pre-alb3mina.

10. Formulaci3n oft3lmica seg3n reivindicaci3n 1 que comprende inmunoglobulina A (IgA).

11. Formulaci3n oft3lmica seg3n reivindicaci3n 1 que comprende factores de crecimiento como el factor de crecimiento epitelial (epithelial growth factor: EGF), factor de crecimiento transformante beta (beta transforming growth factor: TGF β), factor de crecimiento de fibroblastos 3cido (acidic fibroblast growth factor: aFGF), factor de crecimiento de fibroblastos b3sico (basic fibroblast growth factor: bFGF).

12. Formulaci3n oft3lmica seg3n reivindicaci3n 1 que comprende antiproteasas como la macroglobulina.

13. Formulaci3n oft3lmica seg3n reivindicaci3n 1 que comprende factores neurales como la sustancia P o el factor de crecimiento semejante a la insulina: insulinlike growth factor.

14. Formulaci3n oft3lmica seg3n reivindicaci3n 1 que comprende agentes antibacterianos como la Inmunoglobulina G (Ig G), lisozima y complemento.

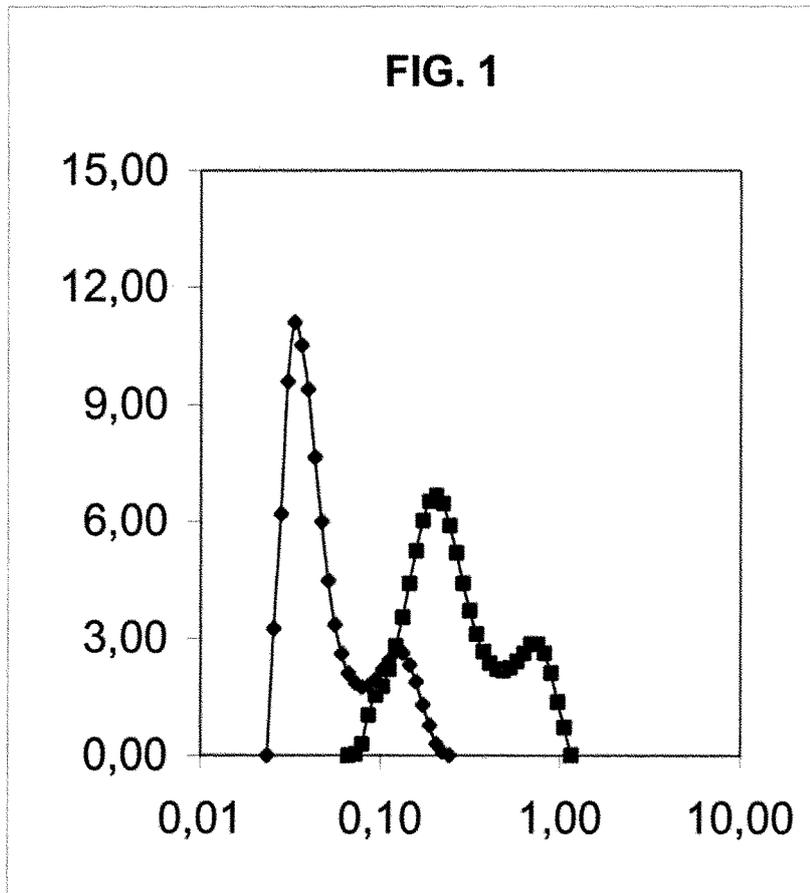
15. Formulaci3n oft3lmica seg3n reivindicaci3n 1 que comprende 3cidos grasos de cadena larga como el 3cido gadoleico, palm3tico, palmitoleico, este3rico, oleico, linoleico, araquidico, linol3nico, eicos3nico, lignoc3rico, l3ctico y miristico.

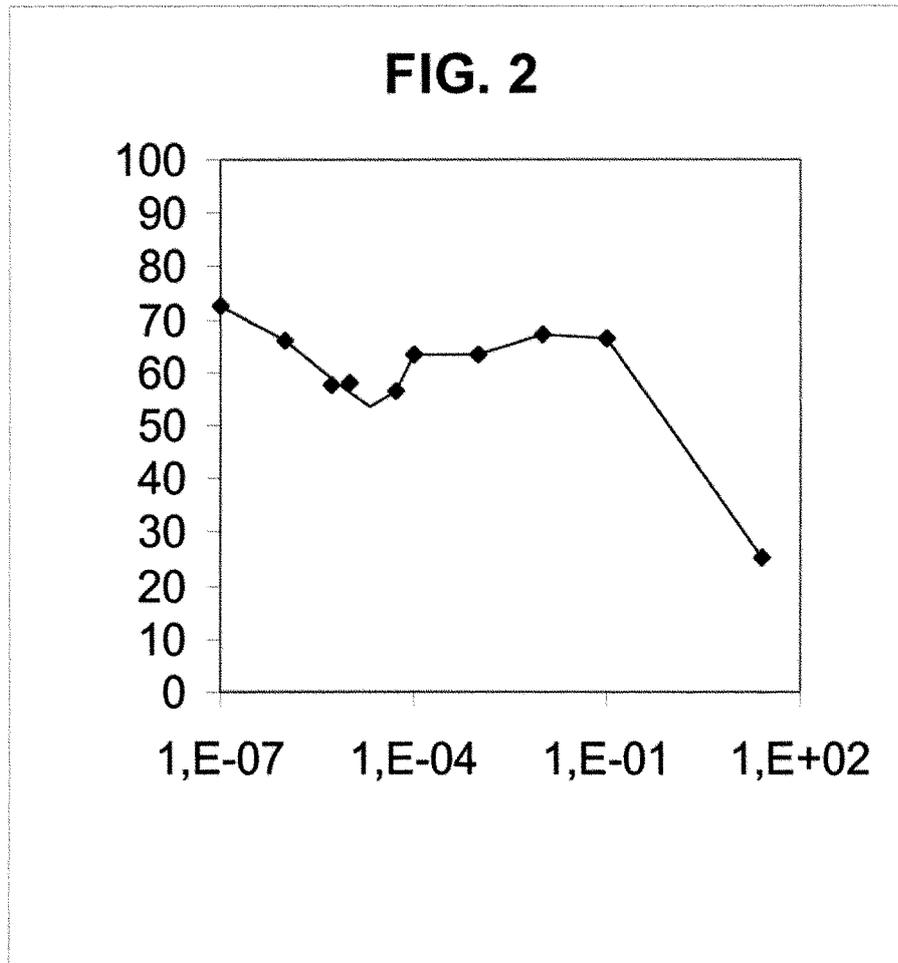
16. Formulaci3n oft3lmica seg3n reivindicaci3n 1 que comprende l3pidos hidrof3licos como fosfol3pidos, esfingomielina, ceramidas y cerebr3sidos.

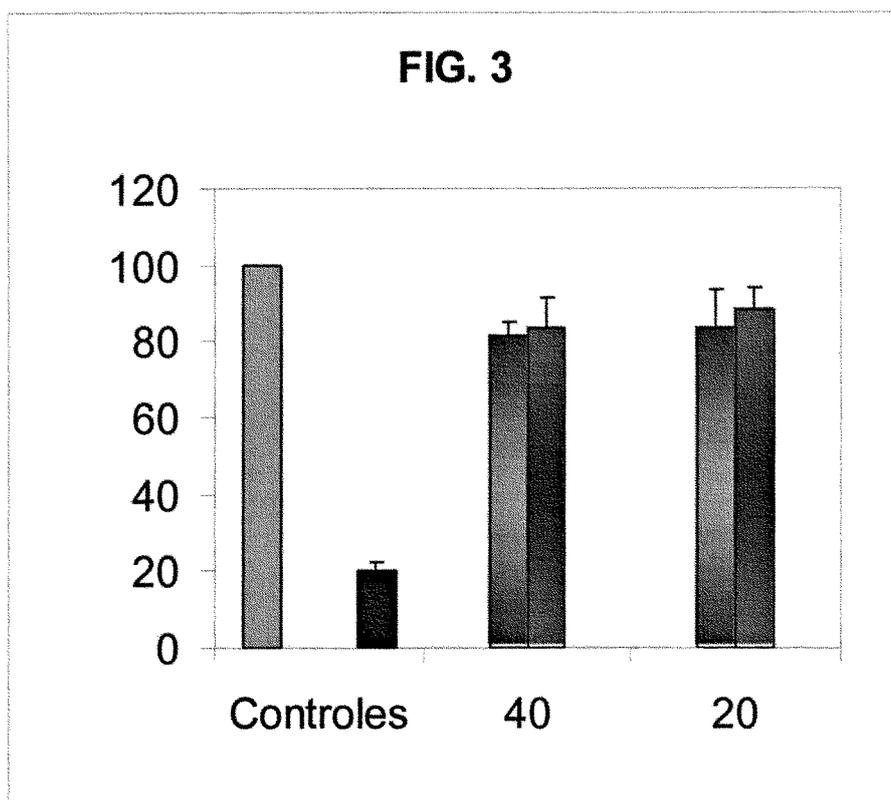
17. Uso de la formulaci3n oft3lmica de cualquiera de las reivindicaciones 1-16 en la elaboraci3n de preparados farmac3uticos 3tiles en el tratamiento de determinadas patolog3as oculares.

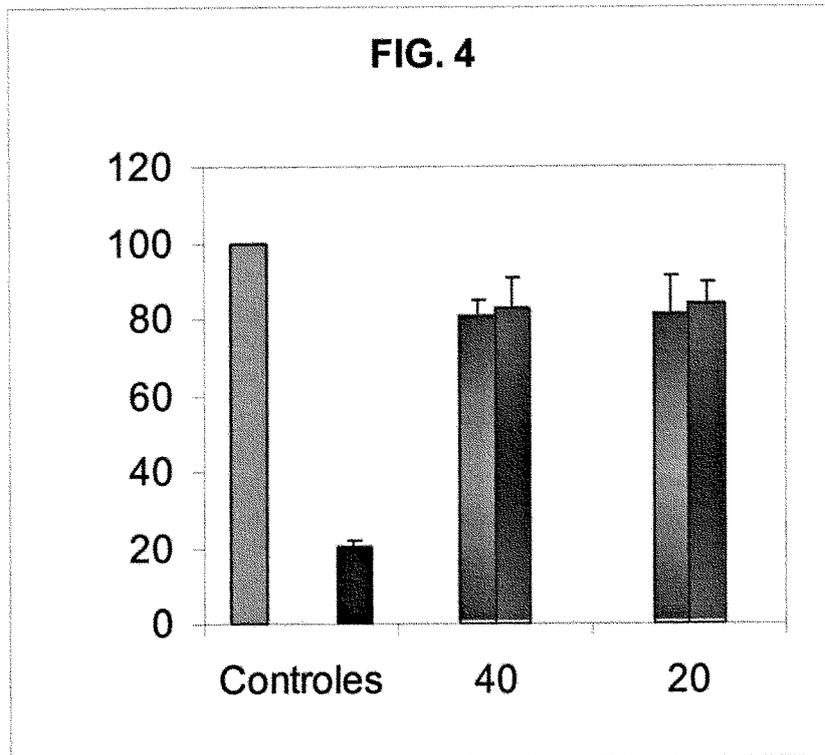
18. Uso seg3n la reivindicaci3n 17 donde la patolog3a es el s3ndrome de ojo seco.

19. Uso seg3n la reivindicaci3n 17 donde el preparado farmac3utico es un sustituto de la l3grima natural o una l3grima artificial.











OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 284 398

② Nº de solicitud: 200601078

③ Fecha de presentación de la solicitud: 27.04.2006

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A61K 9/127** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 9011781 A1 (ALCON LABORATORIES, INC) 18.10.1990, páginas 4-7; ejemplos; reivindicaciones 1-10.	1-21
X	WO 9843616 A1 (UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION) 08.10.1998, páginas 6-10; reivindicaciones.	1-21
A	WO 0051619 A1 (VISTA SCIENTIFIC LLC) 08.09.2000, página 5, líneas 22- 27; páginas 12-13.	1-21
A	US 20050202097 A1 (MASKIN) 15.09.2005, página 3, párrafos 28,31; reivindicación 25.	1-21

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 nº:

Fecha de realización del informe

23.11.2006

Examinador

H. Aylagas Cancio

Página

1/1