

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 189**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 9/127</b>	(2006.01)	<b>A61K 38/47</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/00</b>	(2006.01)	<b>A61K 47/22</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/07</b>	(2006.01)	<b>A61K 38/04</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/375</b>	(2006.01)	<b>A61K 38/17</b>	(2006.01)
<b>A61K 33/00</b>	(2006.01)	<b>A61K 38/30</b>	(2006.01)
<b>A61K 33/06</b>	(2006.01)	<b>A61K 38/57</b>	(2006.01)
<b>A61K 33/14</b>	(2006.01)		
<b>A61K 38/18</b>	(2006.01)		
<b>A61K 38/38</b>	(2006.01)		
<b>A61K 38/40</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2006 E 06743460 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 2016937**

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

30 Prioridad:

**27.04.2006 ES 200601078**

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

**06.05.2015**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
(100.0%)  
RECTORADO AVENIDA DE SÉNECA, 2  
E-28040 MADRID, ES**

72 Inventor/es:

**MOLINA MARTÍNEZ, IRENE TERESA;  
VICARIO DE LA TORRE, MARTA;  
BENÍTEZ DEL CASTILLO, JOSÉ MANUEL;  
VICO RICO, EVA y  
HERRERO VANREL, ROCÍO**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 535 189 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**

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

**Objeto de la invención**

5 La presente invención se refiere a la formulación de vesículas liposomales en soluciones acuosas con características de película lagrimal, como se define por las reivindicaciones. 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 puede ser utilizada para sustituir la película natural y como preparado medicinal en algunas patologías del ojo, tal como es el caso del síndrome de ojo seco.

10 La presente invención es aplicable en las áreas de farmacia y medicina.

**Estado de la técnica**

15 La superficie ocular se sabe que está formada por el epitelio conjuntival, 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 película lagrimal. Hasta hace pocos años la estructuración teórica, generalmente aceptada, incluía tres tipos de componentes (lipídico, seroacuoso, mucinoso) repartidos en tres capas: lipídica, acuosa y mucinosa (Ibrahim H, Buri P, Gurny R. Pharm Acta Helv 1988, 63:146-53).

20 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 lagrimal (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 consistiría en dos fases:

- 25
- Fase polar hidrofílica, en contacto con la capa acuo-mucinoso que está compuesta por fosfolípidos, esfingomielina, 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.

30 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, tales 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.

35 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, tales como la recogida en la patente de los EE.UU. nº. 4.973.580 (Babiola), en la que la formulación oftálmica incluye ácido hialurónico empleando como conservante peróxido de hidrógeno. También se divulgan formulaciones en las que se aportan componentes semejantes a la película lagrimal, tales como soluciones hipotónicas de lecitina incluyendo agentes viscosizantes derivados de la celulosa como aparece en la patente de los EE.UU. nº. 4.421.748 (Trager). La utilización de fosfolípidos para el tratamiento del ojo seco aparece en diversas patentes. Se describen sistemas tipo emulsión que contienen fosfolípidos cargados positivamente, tales como los descritos a continuación: patente de los EE.UU nº. 4.914.088 (1990) (Korb:); 5.278.151 (1994) (Korb:); 5.371.108 (1994) (Korb:); 5.294.607 (1994) (Korb:). Asimismo se divulgan liposomas con carga positiva (patente de los EE.UU nº. 4.804.539 (Guo) (1989) y patente de los EE.UU nº. 4.818.537 (Guo)), en las que se emplean liposomas con carga positiva que se suspenden en soluciones acuosas que contienen polímeros de alta viscosidad, tales como la hidroxietilcelulosa, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y derivados vinílicos, tales como la polivinilpirrolidona, polivinilalcohol y sus mezclas. También se recogen emulsiones que contienen fosfolípidos, aceites no polares y emulsificantes, tales como la patente de los EE.UU nº. 6.656.460 (Benita).

50 La solicitud de patente US5064655 se refiere a composiciones de gel con liposoma de alta viscosidad, que debido a la forma viscosa persisten en el lugar de aplicación, especialmente el tejido mucoso. La composición incluye una suspensión de liposomas cargados en un medio de suspensión acuosa de baja conductividad, que tiene un pH seleccionado de 3,5 a 10,5. La solicitud de patente WO2005/084635 se refiere a una preparación farmacéutica apropiada para su uso en el ojo, que comprende: (i) un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para su uso en el ojo; (ii) uno o más ingredientes seleccionados de factores y agentes que promueven una cualquiera o más de

supervivencia, salud, adhesión celular y diferenciación normal de células epiteliales de la superficie ocular y opcionalmente factores y agentes para prevenir metaplasia escamosa; (iii) uno o más agentes capaces de alterar las propiedades del fluido de una película lagrimal, incluyendo al menos un agente capaz de establecer y/o mantener una película lagrimal estable y opcionalmente uno o más agentes seleccionados de agentes de lubricación oftalmológica, agentes que mejoran la viscosidad y agentes capaces de reducir la evaporación de la película lagrimal.

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 procedimiento objeto de la invención que se describe en el presente documento se refiere a la preparación de una formulación farmacéutica que actúa como sustituta de la película precorneal. La formulación, como se define por las reivindicaciones, incorpora vesículas liposomales de fosfolípidos como fase polar hidrofílica y lípidos no polares, ambos vehiculizados en soluciones acuosas que contienen mucina o sustancias con propiedades semejantes a la mucina o sustancias mucomiméticas o polímeros mucoadhesivos. Las 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).

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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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 contienen 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  $\alpha$ -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, esteroides 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 ( EGF).
  - Factor de crecimiento transformante Beta (TGF-β).
  - Factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF).
  - Factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF).
- 5
- Antiproteasas tales como la macroglobulina.
  - Factores neurales tales como la sustancia P y factor de crecimiento semejante a la insulina.
  - Agentes antibacterianos tales como la Ig G, lisozima y complemento.
  - Ácidos grasos de cadena larga tales como el ácido gadoleico, palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico, araquídico, linolénico, eicosénico, lignocérico, láctico y mirístico.
- 10
- Lípidos hidrofílicos tales 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, que no son limitativos de su alcance, que viene definido por la nota adjunta de las reivindicaciones.

- 15
- Las vesículas liposomales objeto de la presente invención se realizaron según el clásico procedimiento 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.
- 20

- 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 μm.
- 25

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.
- 30

- 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 %.
- 35

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 μm 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.
- 40

- 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) (Mossmann 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).
- 45

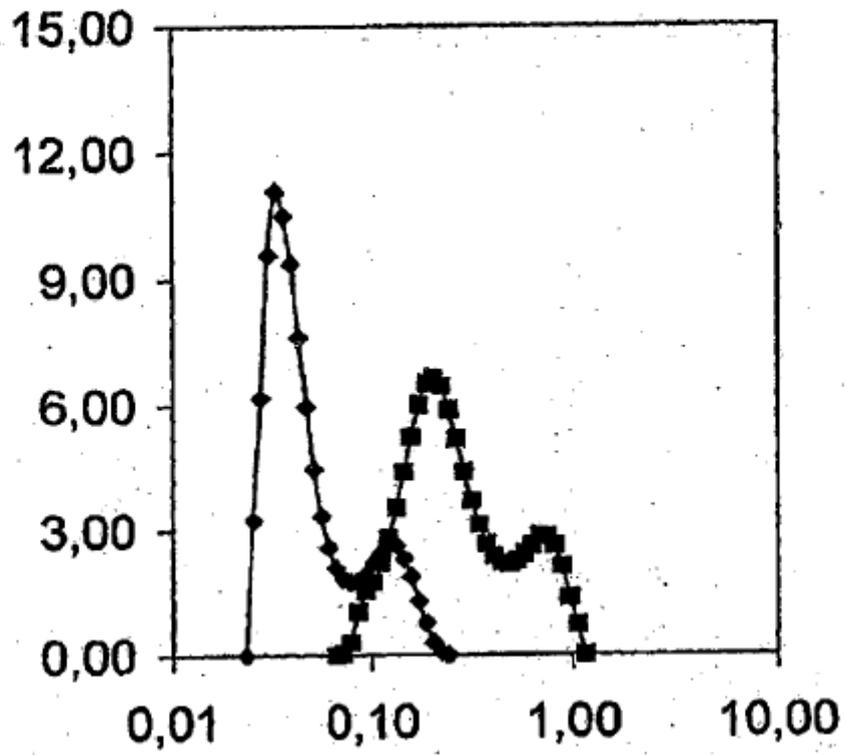
**Breve descripción de las figuras**

- 5
- 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 (-●-) y un baño de ultrasonidos durante 15 minutos (-■-). Se representa la frecuencia de cada clase, expresada en porcentaje, frente al tamaño medio de la misma en  $\mu\text{m}$ .
- 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).
- 10
- Figura 3: Viabilidad celular (%) con soluciones acuosas hipotónicas de liposomas base con (■) y sin (□) vitamina E 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 (■) y sin (□) vitamina E 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).

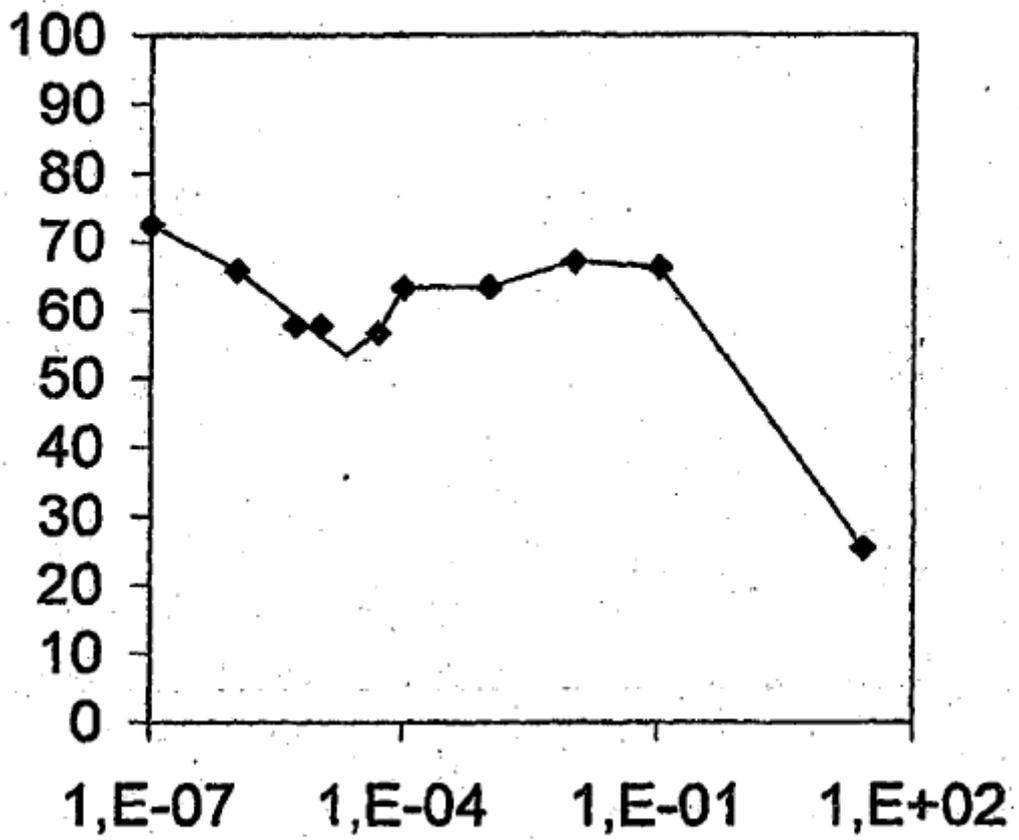
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición oftálmica destinada a actuar como sustitución de la película precorneal, **caracterizada porque** comprende vesículas liposomales de fosfatidilcolina obtenidas de lecitina de soja, colesterol y  $\alpha$ -tocoferol, vehiculizadas en soluciones acuosas que contienen mucina o sustancias con propiedades similares a la mucina o polímeros mucoadhesivos, un agente isotonzante y proteínas seleccionadas entre  $\alpha$ -macroglobulina, lisozima, lipocalina y lactoferrina.
2. Composición oftálmica según la reivindicación 1, donde el agente isotonzante es cloruro sódico, trehalosa o glucosa.
- 10 3. Composición oftálmica según la reivindicación 1, donde la sustancia mucoadhesiva y/o mucomimética es ácido hialurónico, derivados de la celulosa, condroitín sulfato, quitosano, ácido colomínico, derivados tiólicos.
4. Composición oftálmica según la reivindicación 1, que comprende vitamina A o vitamina C.
5. Composición oftálmica, según la reivindicación 1, que comprende iones de sodio, potasio, calcio, cloro o de bicarbonato.
6. Composición oftálmica según la reivindicación 1, que comprende albúmina o pre-albúmina.
- 15 7. Composición oftálmica según la reivindicación 1, que comprende inmunoglobulina A (IgA).
8. Composición oftálmica según la reivindicación 1, que comprende factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento epitelial (EGF), factor de crecimiento transformante beta (GF- $\beta$ ), factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF).
9. Composición oftálmica según la reivindicación 1, que comprende antiproteasas tales como la macroglobulina.
- 20 10. Composición oftálmica según la reivindicación 1, que comprende factores neurales tales como la sustancia P o el factor de crecimiento semejante a la insulina.
11. Composición oftálmica según la reivindicación 1, que comprende agentes antibacterianos tales como la Inmunoglobulina G (Ig G), lisozima y complemento.
- 25 12. Composición oftálmica según la reivindicación 1, que comprende ácidos grasos de cadena larga tales como el ácido gadoleico, palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico, araquídico, linolénico, eicosénico, lignocérico, láctico y mirístico.
13. Composición oftálmica según la reivindicación 1, que comprende lípidos hidrofílicos tales como fosfolípidos, esfingomielina, ceramidas y cerebrósidos.
- 30 14. Formulación oftálmica de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para su uso en la curación del síndrome de ojo seco.

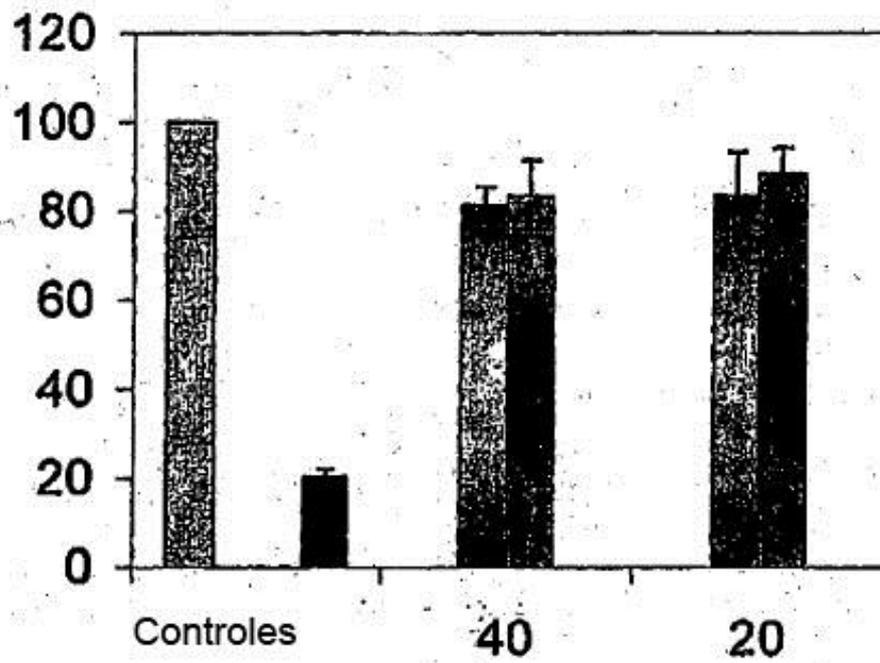
FIG. 1



**FIG. 2**



**FIG. 3**



**FIG. 4**

