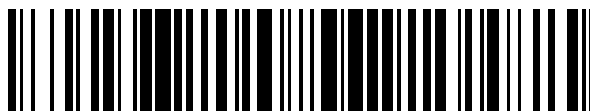


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 828**

51 Int. Cl.:

| | |
|-------------------|-----------|
| A61K 9/127 | (2006.01) |
| A61K 9/51 | (2006.01) |
| A61K 9/00 | (2006.01) |
| A61K 38/00 | (2006.01) |
| A61K 38/31 | (2006.01) |
| A61K 47/48 | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2010 PCT/EP2010/007737**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2011 WO11076368**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2010 E 10810911 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 2515870**

54 Título: **Formulación tópica oftálmica de péptidos**

30 Prioridad:

23.12.2009 ES 200931242

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

27.10.2016

73 Titular/es:

**BCN PEPTIDES, S.A. (100.0%)
Polígono Industrial Els Vinyets Els Fogars 2,
Carretera Comarcal C-244 km 22
08777 Sant Quinti de Mediona, Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**SIMÓ CANONGE, RAFAEL;
HERNÁNDEZ PASCUAL, CRISTINA;
FERNÁNDEZ CARNEADO, JIMENA;
GÓMEZ CAMINALS, MARC;
JORDANA I LLUCH, RIBERA;
FARRERA SINFREU, JOSEP y
PONSATI OBIOLS, BERTA**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 587 828 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 tópica oftálmica de péptidos

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención pertenece al campo de la medicina, y en particular se refiere a una formulación farmacéutica en forma de composición tópica oftálmica de somatostatina y análogos de somatostatina.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las patologías de la retina y el cuerpo vítreo son causas principales de ceguera, y entre ellas destacan la retinopatía diabética y la degeneración macular asociada con la edad.

10 Aunque hay referencias en el estado de la técnica del potencial uso de somatostatina y análogos, en el tratamiento de enfermedades del segmento posterior del ojo, basadas en la evidencia de la sobreexpresión de receptores de somatostatina en estas patologías, no hay ejemplos claros de un efecto terapéutico.

15 Recientemente se ha descrito la presencia de somatostatina endógena y de receptores de somatostatina en distintas partes del ojo humano. Así por ejemplo, los receptores de somatostatina sstr1, sstr2 y sstr5 han sido detectados en las glándulas lacrimales, conjuntiva, córnea y conductos nasolacrimales [Minsel et al., *Endocrinology*, 2009, 150(5) : 2254-2263]. En el segmento posterior del ojo se ha descrito la presencia de genes correspondientes a los receptores de somatostatina sstr1, sstr2, sstr3, sstr4 y sstr5 en la retina, cuerpo ciliar y coroides en ojos humanos sanos [Klisovic et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2001, 42(10) : 2193-2201], la presencia de mRNA de sstr2 y sstr3 en retina [van Hagen et al., *European Journal of Endocrinology*, 2000, 143 : S43-S51; Cervia et al., *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2008, 286 : 112-122] y también la presencia de somatostatina endógena en el humor vítreo y retina [Simó et al., *Diabetes Care*, 2002, 25(12) : 2282-2286]. También es conocido en el estado de la técnica que hay una menor expresión de somatostatina en retina en las primeras fases de la retinopatía diabética, posiblemente asociada a la neurodegeneración retiniana [Carrasco et al., *Diabetes Care*, 2007, 30(11) : 1-7].

Existen distintas vías de administración de fármacos para el tratamiento de enfermedades en el segmento posterior del ojo tales como sistémica, tópica, intraocular y periocular.

25 El documento WO 02/09739 A1 describe el uso de somatostatina o un análogo suyo para el tratamiento o prevención de desórdenes oculares. Entre las formas de administración nombradas en ese documento, la preferida es la administración sistémica parenteral, subcutánea o intramuscular, y no existen indicios en dicho documento de una formulación en forma de colirio para la administración de somatostatina o un análogo suyo. Sin embargo, en el caso de la administración sistémica es difícil alcanzar concentraciones terapéuticas en el segmento posterior del ojo debido a la barrera hemato-retiniana, que limita la penetración de fármacos en el ojo. Otra desventaja general de la administración sistémica es que su efecto no es local y no está dirigido en exclusiva al segmento posterior del ojo. Además, en el caso de somatostatina, serían necesarias dosis altas debido a su inestabilidad en sangre. En el caso del análogo octreotide distintos estudios clínicos han evaluado sus efectos mediante administración sistémica subcutánea, si bien los resultados no muestran un efecto terapéutico claro [Wegewitz et al., *Current Pharmaceutical Design*, 2005, 11 : 2311-2330; Palií et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2008, 49(11) : 5094-5102].

De forma similar, CA 2263042 describe un método para el tratamiento de un desorden ocular, siendo preferida la vía de administración subcutánea.

40 Una alternativa a la baja disponibilidad en el segmento posterior del ojo de la ruta de administración sistémica es la administración local en el segmento posterior del ojo mediante inyecciones intraoculares e inyecciones periorbitales como subconjuntiva, sub-Tenon y retrobulbar, o bien implantes subconjuntivales en dicho segmento [Geroski et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2000, 41(5) : 961-964 ; Kiagiadaki et al. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2008, 49(7) : 3080-3089]. Sin embargo, estas formas de administración no son confortables para el paciente y presentan efectos secundarios cuya frecuencia aumenta si se realizan reiteradamente. Además en el caso de implantes, conllevan una intervención quirúrgica. Aunque este tipo de tratamientos han demostrado ser efectivos en estudios preclínicos, requieren la aplicación de inyecciones con regularidad lo que en ciertos casos provoca efectos secundarios como desprendimiento de retina, cataratas, rubeosis o endoftalmitis [Geroski et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2000, 41(5) : 961-964 ; Herrero-Vanrell et al, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2007, 17(1) : 11-17 ; Robertson et al., *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 1997, 13(2) : 171-177].

50 Otra alternativa a las vías anteriores para la administración de fármacos en el ojo es la administración tópica ocular. Sin embargo, la vía tópica ocular, como vía de administración de un fármaco con diana en el segmento posterior del

ojo, ha sido limitada hasta ahora debido a la estimación de que el porcentaje de sustancia activa capaz de alcanzar el segmento posterior resulta insignificante en la mayoría de los casos [Andrés-Guerrero *et al.*, *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, 2008, 83 : 683-686].

5 Dentro del estado de la técnica se han mencionado varias opciones para la administración tópica ocular de somatostatina y análogos. Así por ejemplo, el documento US 2005/074497 A1 describe un hidrogel que contiene un fármaco anti-angiogénico, como por ejemplo octreotide, para el tratamiento de enfermedades en el segmento posterior del ojo. Octreotide se describe en esta solicitud de patente dentro de una extensa lista de fármacos. Además, no se describe ningún ejemplo de octreotide o de algún otro fármaco en este documento. El hidrogel se pone en contacto con el ojo mediante una lente de contacto o alternativamente se adhiere al ojo mediante adhesivos
10 o por intervención quirúrgica. En este documento queda explícitamente excluida la administración en forma de gotas en el ojo. Sin embargo, la administración a través de una lente de contacto conlleva un riesgo de infección en el ojo por patógenos y además no es tolerada en pacientes con elevada tensión ocular

15 Otra posibilidad es la administración tópica en forma de pomada o ungüento en el interior del párpado. Sin embargo, las pomadas tienden a ser poco confortables y disminuyen la agudeza visual debido a su excesiva viscosidad y lenta absorción.

Asimismo, el documento WO 99/24019 A1 describe una formulación seca, sólida, de distintos fármacos, entre ellos somatostatina, que se reconstituye en una disolución líquida y se administra en forma de gotas oftálmicas. Aunque este documento no aporta ningún ejemplo de una formulación de somatostatina, ni ninguna indicación de éste u otro fármaco que llegue al segmento posterior del ojo aplicado mediante un colirio.

20 Por otro lado, el documento US 5182258 A describe una formulación en forma de colirio que a través del sistema nasolacrimal, se utiliza para la administración sistémica, donde el principio activo que se administra puede ser somatostatina, entre muchos otros. Sin embargo, nada se dice en este documento sobre la administración de éste u otro principio activo para el tratamiento de enfermedades en el segmento posterior del ojo. Lo mismo sucede para otras formulaciones del estado de la técnica donde se administra octreotide por vía tópica sin que se indique una posible aplicación para el tratamiento y/o prevención de enfermedades del segmento posterior del ojo [Danesi *et al.*, *Clinical Cancer Research*, 1997, 3 : 265-272 ; Demir *et al.* *Documenta Ophthalmologica*, 2003, 107 : 87-92].
25

30 Así pues, existe en el estado de la técnica la necesidad de encontrar una forma de administración tópica ocular de somatostatina o un análogo suyo para el tratamiento y/o prevención local de enfermedades en el segmento posterior del ojo que resuelva conjuntamente los problemas de comodidad para el paciente y baja disponibilidad terapéutica en una formulación farmacéuticamente aceptable.

35 El objeto de la presente invención es una composición tópica oftálmica, una formulación farmacéutica líquida de administración tópica en el ojo, de somatostatina o un análogo suyo, que llega al segmento posterior del ojo, se une a los receptores de somatostatina allí presentes y que tiene aplicación para el tratamiento y/o prevención de enfermedades del segmento posterior del ojo que se benefician de la unión de somatostatina o sus análogos a los receptores de somatostatina. Esta invención proporciona un gran paso sin precedentes en la administración tópica oftálmica de péptidos, y en particular, somatostatina y sus análogos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

40 La presente invención describe una composición tópica oftálmica seleccionada del grupo formado por colirios, pomadas y ungüentos, donde dicha composición contiene somatostatina o un análogo de somatostatina seleccionado del grupo formado por somatostatina-28, somatostatina-14, somatostatina-13, prosomatostatina, octreotide, lanreotide, vapreotide, pasireotide, seglitide, cortistatina y sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad del segmento posterior del ojo seleccionada del grupo formado por retinopatía diabética no-proliferativa, retinopatía diabética proliferativa, neovascularización de retina, retinopatía inducida por isquemia, retinopatía de la prematuridad, retinopatía de células falciformes, oclusión de la
45 vena retinal, retinitis pigmentosa, uveítis, edema macular y edema macular cistoide mediante administración tópica ocular, caracterizada por que la concentración de somatostatina o análogo de somatostatina en dicha composición oscila entre 1 µg/mL y 10 mg/mL.

50 Sorprendentemente, la presente invención resuelve los problemas descritos anteriormente. En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición tópica oftálmica que contiene un péptido caracterizada por que una cantidad terapéuticamente eficaz de este péptido alcanza el segmento posterior del ojo. En una realización particular, la composición tópica oftálmica se selecciona del grupo formado por colirios, pomadas y ungüentos. En un aspecto adicional, esta invención se refiere a un colirio que contiene un péptido caracterizado porque una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho péptido llega al segmento posterior del ojo.

En el contexto de la presente invención el término “colirio” se refiere a una formulación farmacéutica líquida que se administra en forma de gotas en la superficie externa del ojo y que tiene un efecto local en el segmento posterior del ojo.

5 En el contexto de la presente invención el término “segmento posterior del ojo” incluye coroides, epitelio pigmentado retinal, retina, mácula, fovea, nervio óptico y humor vítreo.

El péptido se selecciona de entre somatostatina o un análogo de somatostatina, preferentemente la somatostatina o el análogo de somatostatina se seleccionan del grupo formado por somatostatina-28, somatostatina-14, somatostatina-13, prosomatostatina, octreotide, lanreotide, vapreotide, pasireotide, seglitide, cortistatina y sus sales farmacéuticamente aceptables.

10 En otra realización particular, la somatostatina o el análogo de somatostatina están sustituidos con un grupo acilo o una unidad de polietilenglicol. Preferentemente, el grupo acilo se selecciona del grupo formado por acetilo, terc-butanoilo, hexanoilo, 2-metilhexanoilo, ciclohexancarboxilo, octanoilo, decanoilo, lauroilo, miristoilo, palmitoilo, estearoilo, oleoilo y linoleilo. Preferentemente, la unidad de polietilenglicol tiene un peso molecular entre 200 y 35.000 daltons.

15 La concentración del péptido está entre 1 µg/mL y 10 mg /mL, más preferentemente entre 10 µg/mL y 1 mg/mL.

En otra realización particular, el pH del colirio está entre 3 y 8, preferentemente entre 4 y 7. Para ajustar el pH del colirio se añadirán los ácidos y/o bases conocidos por el experto en la materia para alcanzar los valores de pH anteriores.

20 En otra realización particular, el vehículo del colirio de la invención es una disolución acuosa isotónica, tal como la disolución isotónica de cloruro de sodio o de ácido bórico, o es una disolución acuosa de alcohol polivinílico o sus mezclas.

25 En otra realización particular, el péptido de la composición de la invención puede estar incorporado también en liposomas, liposomas mixtos, niosomas, etosomas, nanopartículas, nanopartículas sólidas lipídicas, transportadores lipídicos nanoestructurados, micelas, micelas mixtas de tensioactivos, micelas mixtas de tensioactivos-fosfolípidos, nanoesferas, lipoesferas y nanocápsulas.

30 En otra realización particular, el colirio de la presente invención opcionalmente contiene un conservante. Un experto en la materia reconoce los agentes conservantes del estado de la técnica tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, alquil parabenos, alquil benzoatos, clorobutanol, clorocresol, alcoholes cetílicos, alcoholes grasos como hexadecil alcohol, compuestos organometálicos de mercurio tales como acetato, nitrato o borato de fenilmercurio, diazolidinil urea, adipato de diisopropilo, dimetil polisiloxano, sales de EDTA, vitamina E y sus mezclas.

35 En otra realización particular, el colirio de la presente invención opcionalmente contiene un agente que aumenta la permeabilidad del péptido, preferentemente del péptido somatostatina o un análogo de somatostatina, al segmento posterior del ojo. Preferentemente el agente que aumenta la permeabilidad se selecciona del grupo formado por cloruro de benzalconio, saponinas, ácidos grasos, éteres grasos de polioxietileno, ésteres alquílicos de ácidos grasos, pirrolidonas, polivinilpirrolidona, ácidos pirúvicos, ácidos piroglutámicos y sus mezclas, entre otros.

40 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere al colirio de la presente invención para el tratamiento y/o prevención de enfermedades del segmento posterior del ojo según la reivindicación 1. Preferentemente, el tratamiento y/o prevención de las enfermedades del segmento posterior del ojo se beneficia de la unión de somatostatina o sus análogos a los receptores de somatostatina. Más preferentemente, las enfermedades del segmento posterior del ojo se seleccionan del grupo formado por retinopatía diabética no-proliferativa, retinopatía diabética proliferativa, degeneración macular asociada con la edad, neovascularización de retina, retinopatía inducida por isquemia, retinopatía de la prematuridad, retinopatía de células falciformes, oclusión de la vena retinal, retinitis pigmentosa, neovascularización de coroides, uveítis, edema macular, edema macular cistoide. En el caso de somatostatina, su mayor estabilidad en el humor vítreo del segmento posterior del ojo respecto a su tiempo de semivida en suero favorece su acción a nivel local para el tratamiento y/o prevención de las enfermedades del segmento posterior del ojo citadas anteriormente.

50 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un método de tratamiento y/o prevención de enfermedades del segmento posterior del ojo que comprende la administración tópica de una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido mediante una composición tópica oftálmica seleccionada del grupo formado por colirios, pomadas y ungüentos según la reivindicación 1.

El péptido se selecciona de entre somatostatina o un análogo de somatostatina, preferentemente somatostatina o el análogo de somatostatina se seleccionan del grupo formado por somatostatina-28, somatostatina-14, somatostatina-13, prosomatostatina, octreotide, lanreotide, vapreotide, pasireotide, seglitide, cortistatina y sus sales farmacéuticamente aceptables.

5 En otra realización particular, la frecuencia de administración puede variar enormemente, dependiendo de las necesidades de cada sujeto y de la severidad de la enfermedad a ser tratada o prevenida, con una recomendación de un rango de administración desde una vez a la semana a diez veces al día, preferentemente desde tres veces a la semana a tres veces al día, incluso más preferentemente una o dos veces al día.

10 En otra realización particular, el método de tratamiento y/o prevención comprende adicionalmente la administración de otro agente terapéutico para el tratamiento y/o prevención de enfermedades del segmento posterior del ojo. Agentes terapéuticos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades del segmento posterior del ojo son por ejemplo, y sin sentido limitativo, aquellos agentes seleccionados del grupo formado por anti-VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), análogos de prostaglandina, antagonistas beta-adrenérgicos, agonistas alfa-2-adrenérgicos, inhibidores de la anhidrasa carbónica, agentes mióticos, anticuerpos monoclonales, corticosteroides, glucocorticoides, inhibidores de quinasas, ciclopléjicos o antimetabolitos. La administración de estos agentes terapéuticos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades del segmento posterior del ojo puede ser por vía tópica, oral o parenteral. En el contexto de esta invención el término "parenteral" incluye inyecciones intravítreas, intraoculares, intracorneales, subcutáneas, intradérmicas, intravasculares, tales como intravenosas, intramusculares y cualquier otra inyección similar o técnica de infusión.

20 Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan aquí sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 Figura 1: La figura 1 muestra las retinas de 2 ratones (1 y 2) que recibieron somatostatina en el ojo derecho (+) y placebo en el ojo izquierdo (-)

Figura 2: La figura 2 muestra la diferencia entre la amplitud del segundo potencial oscilatorio (OP) en ratas control (Grupo 1); ratas diabéticas (Grupo 2); ratas diabéticas tratadas con somatostatina (Grupo 3) y ratas diabéticas tratadas con octreotide (Grupo 4)

30 Figura 3: La figura 3 muestra las imágenes de microscopía confocal. Inmunoquímica confocal GFAP 40X. Una mayor expresión de GFAP (marcaje más brillante) se observó en la capa de células ganglionares de las ratas con diabetes inducida por STZ (Grupo 2). El tratamiento con somatostatina (Grupo 3) u octreotide (Grupo 4) previno la activación de células gliales que se correlacionó con niveles de GFAP similares al control (Grupo 1)

35 Figura 4: La figura 4 muestra las imágenes de microscopía confocal. Imágenes confocales de TUNEL 40X. La degeneración de la retina se correlacionó con un número mayor de células apoptóticas (marcaje más brillante significa TUNEL positivo) especialmente en la capa nuclear externa (ONL) observado en ratas con diabetes inducida por STZ (Grupo 2). El tratamiento con somatostatina (Grupo 3) y octreotide (Grupo 4) previno la degeneración retiniana y mostró un número similar de células que el encontrado en ratas sanas control (Grupo 1).

EJEMPLOS

Ejemplo 1 (no incluido en el alcance de la reivindicación 1):

40 Colirio que contiene somatostatina-14

Se preparó una composición farmacéutica de somatostatina en forma de colirio mediante la adición de 125 µL de cloruro sódico al 0,9% sobre 5 mg de somatostatina-14

Ejemplo 2: Evaluación de la concentración de somatostatina tópica oftálmica en retina.

45 Se utilizaron ratones C57BL/6 de 8 semanas. La manipulación y cuidado de los animales se realizó siguiendo el protocolo del Institut de Recerca del Hospital Universitari Vall d'Hebron y las normativas internacionales de la Comunidad Económica Europea (orden 86/609/CEE) y de la A.R.V.O. (Association for Research in Vision and Ophthalmology). Los animales estuvieron en jaulas individuales en el estabulario en condiciones controladas de temperatura (20°) y humedad (60%), bajo ciclos constantes de luz-oscuridad de 12 horas y tuvieron libre acceso a comida y bebida. Se administró el colirio del ejemplo 1 de somatostatina-14 (1 gota de 5 µL) en el ojo derecho y

placebo (suero fisiológico) en el ojo izquierdo. Se administraron dos gotas por día, una por la mañana y otra por la tarde, durante 5 días. Los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical bajo anestesia a las 2 horas de la última dosis. Inmediatamente después se extrajeron los globos oculares que se congelaron a -80° hasta su procesamiento. Se separó el segmento posterior (retina y humor vítreo) del resto del globo ocular mediante disección bajo lupa. La cantidad de somatostatina-14 en retina se determinó mediante Western blot. Las proteínas se extrajeron con la solución 50 mM Tris-HCl, pH 7,9, 300 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0,1% Nonidet P-40 y 20% glicerol que contenía Complete™ protease inhibitor cocktail a 4° C durante 12 horas. Posteriormente se centrifugaron las muestras (12,000 rpm a 4° C) durante 10 min. Con las proteínas se realizó un Western blot con anticuerpos de conejo contra la somatostatina-14 (ab53165, abcam). Para normalizar la concentración de somatostatina-14 obtenida se utilizó como control β -actina. Los complejos específicos anticuerpo-antígeno fueron identificados usando anticuerpos de cabra contra IgG de conejo marcados con HRP o anticuerpos de conejo contra IgG de cabra junto con sustratos quemiluminiscentes (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, Illinois, EEUU) mediante exposición en películas radiográficas. Se realizó un análisis densitométrico (Densitómetro GS-800. Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, EEUU) y los resultados se expresan como unidades arbitrarias. La figura 1 muestra las retinas de 2 ratones (1 y 2) que recibieron somatostatina en ojo derecho (+) y placebo en el izquierdo (-). Como puede apreciarse la cantidad de somatostatina fue mayor en el ojo tratado en ambos animales. En ratones control, que recibieron placebo en ambos ojos, no se detectaron diferencias en la concentración de somatostatina entre ambos ojos.

Ejemplo 3: Estabilidad de somatostatina en humor vítreo humano y suero humano.

La somatostatina se incubó con suero humano o humor vítreo humano al 90% a $37^{\circ}C$. Se extrajeron alícuotas a distintos tiempos de incubación. Se añadió acetonitrilo para precipitar las proteínas del suero, se centrifugó y el sobrenadante se filtró e inyectó en el RP-HPLC (Gradiente: 20-80% B en 30 min, B=0,07%TFA en acetonitrilo). Se analizó la desaparición del producto inicial utilizando el área correspondiente al producto inicial y se calculó el tiempo de semivida. El tiempo de semivida de somatostatina es de 2,7 h en suero y 64 h en humor vítreo.

Ejemplo 4: Colirio que contiene somatostatina-14.

Se preparó una composición farmacéutica de somatostatina en forma de colirio mediante la adición de 1 mL de una disolución acuosa de cloruro sódico al 0,9% sobre 10 mg de somatostatina-14. Finalmente, la disolución se filtró a través de un filtro esterilizante de $0,22 \mu m$.

Ejemplo 5: Colirio que contiene octreotide.

Se preparó una composición farmacéutica de octreotide en forma de colirio mediante la adición de 1 mL de una disolución acuosa de cloruro sódico al 0,9% sobre 10 mg de octreotide. Finalmente, la disolución se filtró a través de un filtro esterilizante de $0,22 \mu m$.

Ejemplo 6: Colirio que contiene vapreotide.

Se preparó una composición farmacéutica de vapreotide en forma de colirio mediante la adición de 1 mL de una disolución acuosa de cloruro sódico al 0,9% sobre 10 mg de vapreotide. Finalmente, la disolución se filtró a través de un filtro esterilizante de $0,22 \mu m$.

Ejemplo 7: Colirio que contiene cortistatina

Se preparó una composición farmacéutica de cortistatina en forma de colirio mediante la adición de 1 mL de una disolución acuosa de cloruro sódico al 0,9% sobre 10 mg de cortistatina. Finalmente, la disolución se filtró a través de un filtro esterilizante de $0,22 \mu m$.

Ejemplo 8: Colirio que contiene somatostatina-14

Se preparó una composición farmacéutica de somatostatina en forma de colirio mediante la adición de 1 mL de una disolución acuosa de cloruro sódico al 0,9% y de alcohol polivinílico al 1,4% sobre 0,27 mg de somatostatina-14. Finalmente, la disolución se filtró a través de un filtro esterilizante de $0,22 \mu m$.

Ejemplo 9: Colirio que contiene somatostatina-28.

Se preparó una composición farmacéutica de somatostatina en forma de colirio mediante la adición de 1 mL de una disolución acuosa de cloruro sódico al 0,9% sobre 0,05 mg de somatostatina-28. Finalmente, la disolución se filtró a través de un filtro esterilizante de $0,22 \mu m$.

Ejemplo 10: Colirio que contiene somatostatina-14, hidroxibenzoatos y éteres grasos de polioxietileno.

Se preparó una composición farmacéutica de somatostatina en forma de colirio mediante la adición de 1 mL de una disolución acuosa de cloruro sódico al 0,9% sobre 50 µg de 4-hidroxibenzoato de metilo, 100 µg de 4-hidroxibenzoato de propilo, 50 µg de polioxietilen-20-estearil éter (Brij-78) y 1 mg de somatostatina-14. Finalmente, la disolución se filtró a través de un filtro esterilizante de 0,22 µm.

5 Ejemplo 11: Colirio que contiene liposomas de somatostatina-14.

Se preparó una composición farmacéutica de somatostatina en cloruro sódico al 0,9% conteniendo 20 mg de fosfatidilcolina y 2,7 mg de somatostatina-14 por mL. Brevemente, la fosfatidilcolina se añadió lentamente bajo agitación a una disolución acuosa de cloruro sódico al 0,9% conteniendo somatostatina-14. La composición se continuó agitando durante 15 minutos más hasta que se formó una suspensión de liposomas. A continuación los liposomas se extrudaron secuencialmente a través de un filtro de policarbonato con un tamaño de poro de 400 nm, un filtro de tamaño de poro de 200 nm y finalmente diez veces con un filtro de tamaño de poro de 100 nm. Finalmente, la disolución de liposomas se filtró a través de un filtro esterilizante de 0,22 µm.

Ejemplo 12: Colirio que contiene nanocápsulas de somatostatina-14.

Se preparó una disolución al 10% del copolímero de ácido láctico-co-glicólico (50:50) de peso molecular 5000, 1g, en diclorometano. Se disolvió somatostatina-14 (100 mg) en 1 mL de agua. La disolución de somatostatina se añadió a la disolución polimérica y se emulsionó utilizando una sonda de ultrasonidos. A continuación, la nanoemulsión se filtró a través de un filtro esterilizante de 0,22 µm. La nanoemulsión resultante se dispersó entonces en una disolución acuosa de alcohol polivinílico al 1% utilizando una sonda de ultrasonidos para reducir el tamaño de partícula hasta que se obtuvo una nanoemulsión. Las nanocápsulas se extrajeron en una disolución acuosa de etanol al 40% y se purificaron mediante ultrafiltración de flujo tangencial.

Finalmente, 70 mg de nanocápsulas que contenían somatostatina (16 mg) se dispersaron en 100 mL de una disolución acuosa de alcohol polivinílico al 1,4%.

Ejemplo 13: Pomada oftálmica que contiene somatostatina-14.

Se preparó una composición farmacéutica de somatostatina en forma de pomada oftálmica por adición de 50 mL de vaselina blanca USP a 200 mg a somatostatina-14.

Ejemplo 14: Efecto del tratamiento tópico ocular con somatostatina y octreotide en la prevención de la neurodegeneración retiniana en ratas diabéticas.

Estreptozotocina (STZ), 60 mg/Kg, se administró en ratas Sprague Dawley. Los animales fueron divididos en cuatro grupos detallados en la Tabla 1:

30 Tabla 1: Diseño del estudio

| Grupo /Identificación | Dosis de STZ (mg/kg) | Dosis del tratamiento | | |
|------------------------|-------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|---|
| | | Gotas en ojo Derecho por día | Gotas en ojo Izquierdo por día | |
| 1/ Vehículo | 0 | 1 | 2 | 4 |
| 2/ STZ + Vehículo | 60 | 1 | 2 | 4 |
| 3/ STZ + Somatostatina | 60 | 1 | 2 | 8 |
| 4/ STZ + Octreotide | 60 | 1 | 2 | 8 |

(Vehículo =solución acuosa 0,9% NaCl)

Dos días después de la administración de STZ, los animales fueron tratados diariamente con una o dos gotas de vehículo (Grupo 2), colirio del ejemplo 4 (Grupo 3) o colirio del ejemplo 5 (Grupo 4) durante 14 días adicionales. Las ratas sanas control fueron diariamente tratadas sólo con una o dos gotas de vehículo (Grupo 1).

35 La electroretinografía es una técnica utilizada clínicamente en retinopatía diabética para evaluar la funcionalidad de la retina. Varios parámetros pueden estar afectados en estadios tempranos de la enfermedad: tiempo de latencia,

amplitud y potenciales oscilatorios [Tzekov *et al.*, *Survey of Ophthalmology*, 1999, 44(1) : 53-60]. El incremento del tiempo de latencia y la disminución de la amplitud de los potenciales oscilatorios (OPs) se observan también en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina [Hancock *et al.*, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2004, 45(3) : 1002-1008].

5 Los resultados de electroretinografía mostraron que después de 14 días de tratamiento, el tiempo de latencia de la onda b a 0 db aumentaba significativamente comparado con el pretratamiento en el grupo diabético (Grupo 2) (15,5 ojo Derecho; 15,2 ojo Izquierdo) y no sufría un aumento significativo en el grupo control (Grupo 1) (-2,3 ojo Derecho; -7,5 ojo Izquierdo) y grupos tratados con la composición de somatostatina del ejemplo 4 (Grupo 3) (9,0 ojo Derecho; 4,9 ojo Izquierdo) o la composición de octreotide del ejemplo 5 (Grupo 4) (8,8 ojo Derecho; 1,1 ojo Izquierdo).

10 Sobre la amplitud, somatostatina previno la disminución de la amplitud de la onda b a -30 db, -10 db y 0 db respecto al grupo diabético y octreotide previno la disminución de la amplitud de la onda b a -30 db pero fue solo eficaz a la dosis más alta a -10 db y 0 db.

15 El análisis de los potenciales oscilatorios (OP) de la onda b a 0 db indican que somatostatina y octreotide presentaron un efecto positivo previniendo la disminución de la amplitud del segundo OP (OP2). Este efecto ya se observó el día 8 y se conservó hasta el día 14. La Figura 2 muestra la diferencia entre la amplitud del segundo OP en ratas control (Grupo 1: 17,0 ojo Derecho; 15,9 ojo Izquierdo); ratas diabéticas (Grupo 2: -2,5 ojo Derecho; -1,2 ojo Izquierdo); ratas diabéticas tratadas con somatostatina (Grupo 3: 44,8 ojo Derecho; 68,7 ojo Izquierdo) y ratas diabéticas tratadas con octreotide (Grupo 4: 45,5 ojo Derecho; 55,1 ojo Izquierdo).

20 El día 14, los animales fueron sacrificados y los tejidos oculares parafinados. La activación glial y el número de células apoptóticas se evaluaron como marcadores de la primera etapa en el desarrollo de la retinopatía diabética: la neurodegeneración retiniana [Carrasco *et al.*, *Diabetes Care*, 2007, 30(11) : 1-7].

25 La activación glial se determinó analizando la inmunofluorescencia de la Proteína Gliofibrilar Ácida (GFAP) por microscopía confocal. Secciones oculares de 7 μm de grosor se fijaron en cubreobjetos altamente adherentes (Visionbiosystems, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido). Se desparafinaron, rehidrataron y lavaron en tampón fosfato salino (PBS). Las uniones inespecíficas fueron bloqueadas incubando las muestras durante 1h en PBS al 1% de BSA (Albúmina Sérica Bovina) 0,5% Triton X-100. Posteriormente, el anticuerpo primario de conejo anti GFAP humana (Sigma, Madrid, España) diluido en tampón de bloqueo (1:100) fue incubado durante 36 h a 4°C. Después de tres lavados durante 5 min con PBS, las secciones fueron incubadas con un anticuerpo secundario anti IgG humana marcado con Alexa Fluor® 488 (Invitrogen, Eugene, Oregón) durante 1h a temperatura ambiente. Las secciones marcadas se lavaron y montaron con medio fluorescente que contenía 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para teñir los núcleos celulares (Vector Laboratories, Burlingame, California). Las secciones positivas para GFAP fueron capturadas en un microscopio confocal (FV1000, Olympus. Hamburgo, Alemania) obteniéndose secciones ópticas con un láser a 488nm para Alexa 488 y un láser a 405 nm para DAPI. La fluorescencia de GFAP se cuantificó en cada imagen con el programa Fluoview ASW 1.4 (Olympus, Hamburgo, Alemania). Los resultados se normalizaron respecto al área analizada (21705,33 μm^2). La Figura 3 muestra las imágenes de microscopía confocal. Una mayor expresión de GFAP (marcaje más brillante) se observó en la capa de células ganglionares de las ratas con diabetes inducida por STZ (Grupo 2). El tratamiento con somatostatina (Grupo 3) u octreotide (Grupo 4) previno la activación de células gliales que se correlacionó con niveles de GFAP similares al control (Grupo 1).

40 La eficacia del tratamiento tópico ocular con somatostatina (Grupo 3) y octreotide (Grupo 4) en la prevención de la activación glial provocada por la diabetes se determinó utilizando los valores de fluorescencia de GFAP, indicador de activación glial. El valor de fluorescencia de GFAP fue de 2095 \pm 26 para ratas sanas control Grupo 1; 6871 \pm 159 para el Grupo 2; 2514 \pm 90 para el Grupo 3 y 1696 \pm 48 para el Grupo 4.

45 La evaluación del nivel de apoptosis de la retina después de 14 días de tratamiento se realizó utilizando la técnica TUNEL ("Terminal Transferase dUTP Nick-End Labeling"). Se utilizó el kit "In Situ Cell Death Detection" (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Las secciones oculares se desparafinaron, rehidrataron y lavaron en PBS. Se obtuvieron tres imágenes confocales (40X) correspondientes a una superficie de 317,13 μm X 317,13 μm para cada sección. El número total de núcleos y núcleos positivos para TUNEL se cuantificaron con el programa Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). El marcaje con yoduro de propidio (PI) se realizó para examinar la morfología del núcleo y descartar falsos positivos. La Figura 4 muestra las imágenes de microscopía confocal. La degeneración de la retina se correlacionó con un número mayor de células apoptóticas (marcaje más brillante significa TUNEL positivo) observado en ratas con diabetes inducida por STZ (Grupo 2). El tratamiento con somatostatina (Grupo 3) y octreotide (Grupo 4) previno la degeneración retiniana y mostró un número similar de células que el encontrado en ratas sanas control (Grupo 1).

55 La Tabla 2 muestra el porcentaje de células apoptóticas respecto al número total de células en diferentes capas de la retina como el epitelio pigmentario de la retina (RPE), capa nuclear externa (ONL), capa nuclear interna (INL) y capa de células ganglionares (GCL). El incremento en el porcentaje de células apoptóticas es significativo en ratas

diabéticas (Grupo 2). El tratamiento tópico ocular con somatostatina (Grupo 3) u octreotide (Grupo 4) redujo el número de células apoptóticas hasta niveles del control (Grupo 1).

Tabla 2: Porcentaje de células apoptóticas

| % Células apoptóticas | | | | |
|-----------------------|-----|-----|-----|-----|
| | RPE | ONL | INL | GCL |
| Grupo 1 | 6 | 2 | 0 | 9 |
| Grupo 2 | 28 | 10 | 4 | 35 |
| Grupo 3 | 6 | 3 | 1 | 14 |
| Grupo 4 | 11 | 5 | 0,1 | 7 |

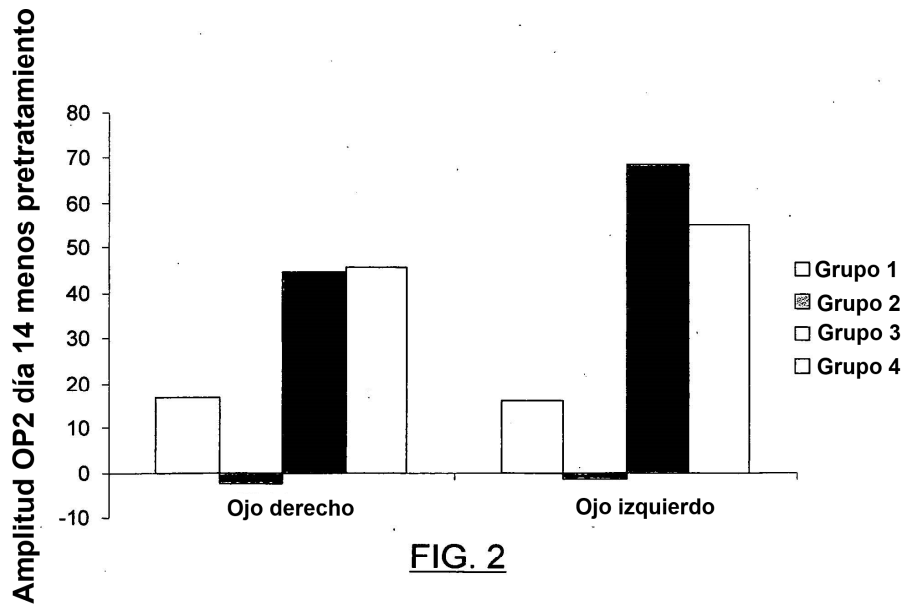
- 5 La neurodegeneración de células de la retina es una de las primeras etapas en el desarrollo de la retinopatía diabética. Los resultados de electroretinografía, activación glial y apoptosis indicaron que la administración tópica ocular de somatostatina u octreotide durante 14 días previno la degeneración retiniana en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición tópica oftálmica seleccionada del grupo formado por colirios, pomadas y ungüentos, donde dicha composición contiene somatostatina o un análogo de somatostatina seleccionado del grupo formado por somatostatina-28, somatostatina-14, somatostatina-13, prosomatostatina, octreotide, lanreotide, vapreotide, pasireotide, seglitide, cortistatina y sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento y/o
- 10 prevención de una enfermedad del segmento posterior del ojo seleccionada del grupo formado por retinopatía diabética no-proliferativa, retinopatía diabética proliferativa, neovascularización de retina, retinopatía inducida por isquemia, retinopatía de la prematuridad, retinopatía de células falciformes, oclusión de la vena retinal, retinitis pigmentosa, uveítis, edema macular y edema macular cistoide mediante administración tópica ocular, caracterizada por que la concentración de somatostatina o análogo de somatostatina en dicha composición oscila entre 1 µg/mL y 10 mg /mL.
2. Composición tópica oftálmica para su uso según la reivindicación 1, donde dicha composición oftálmica es una composición colirio.
- 15 3. Composición tópica oftálmica para su uso según la reivindicación 1, caracterizada por que dicha somatostatina o análogo de somatostatina están sustituidos con un grupo acilo o una unidad de polietilenglicol.
4. Composición tópica oftálmica para su uso según la reivindicación 2, caracterizada por que el pH del colirio está entre 3 y 8.
5. Composición tópica oftálmica para su uso según la reivindicación 2, caracterizada por que el vehículo del colirio es una disolución acuosa isotónica, una disolución acuosa de alcohol polivinílico o sus mezclas.
- 20 6. Composición tópica oftálmica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde dicha composición oftálmica contiene un conservante.
7. Composición tópica oftálmica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde dicha composición oftálmica contiene un agente que aumenta la permeabilidad.
- 25 8. Composición tópica oftálmica para su uso según la reivindicación 1, caracterizada por que el tratamiento y/o prevención se beneficia de la unión de somatostatina o un análogo de somatostatina a los receptores de somatostatina.

| | ojo derecho | | ojo izquierdo | |
|-------------|---------------|------|---------------|------|
| gotas SST | + | | - | |
| | 1 | 2 | 1 | 2 |
| beta-actina | [Blacked out] | | | |
| SST | [Blacked out] | | [Blacked out] | |
| | 0.79 | 0.76 | 0.55 | 0.31 |

FIG. 1 Ratio beta-actina/SST



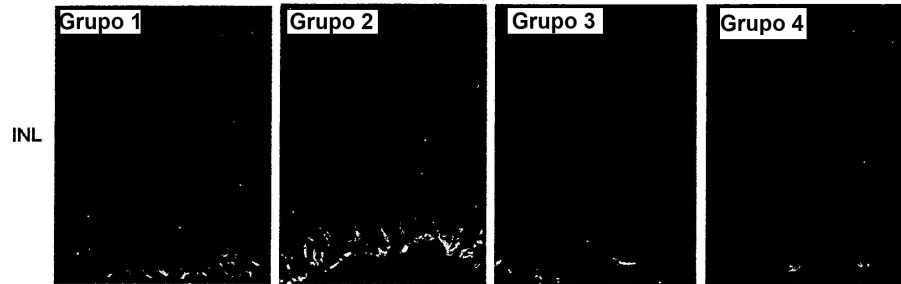


FIG. 3

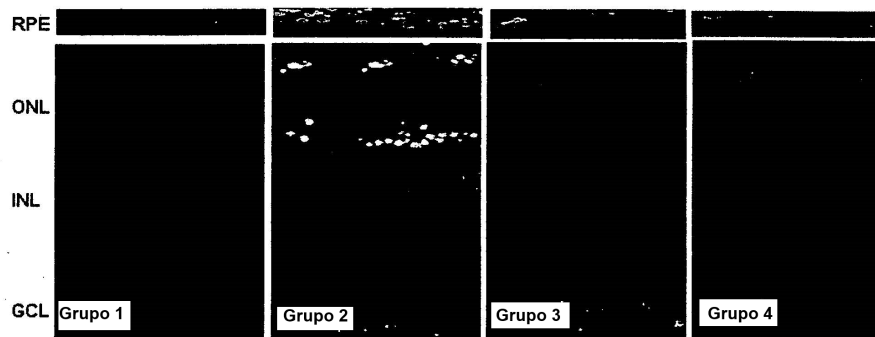


FIG. 4