

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 069 382**

51 Int. Cl.:

A61K 31/00 (2006.01)

A61K 9/107 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2022 E 22383251 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.02.2026 EP 4201401**

54 Título: **Microemulsión oftálmica, procedimiento de obtención y uso de la misma**

30 Prioridad:

23.12.2021 ES 202131205

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

08.06.2026

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(100,00%)
Avenida de Séneca, 2
28015 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**LOPEZ CANO, JOSE JAVIER;
GONZALEZ CELA CASAMAYOR, MIRIAM ANA;
BENITEZ DEL CASTILLO, JOSE MANUEL;
HERRERO VANRELL, ROCIO;
MOLINA MARTÍNEZ, IRENE TERESA y
VICARIO DE LA TORRE, MARTA**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 069 382 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

Microemulsión oftálmica, procedimiento de obtención y uso de la misma

La presente invención se refiere a microemulsiones oftálmicas compatibles con la película precorneal que se pueden utilizar como lágrimas artificiales y como vehículo de fármacos para su administración por vía tópica ocular. De la misma manera se refiere al procedimiento de obtención de la microemulsión.

Antecedentes de la invención

La superficie ocular está compuesta por varias capas entre las cuales se encuentran el epitelio corneal, epitelio conjuntival, glándulas de meibomio y glándulas lacrimales.

Sobre estas capas se distribuye una fina película conocida como película precorneal o lagrimal, con componentes acuosos, mucinosos y lipídicos cuya principal función es lubricar y proteger la superficie ocular. Esto contribuye a evitar la evaporación de la fracción acuosa y a preservar la osmolaridad normal de la lágrima (=300 mOsm/L). Cuando se produce una evaporación excesiva del componente acuoso o un defecto en la secreción del componente lipídico encargado de evitar la evaporación de la fracción acuosa, se produce un incremento en la osmolaridad de la lágrima (>330 mOsm/L), que desencadena una serie de procesos inflamatorios asociados a alteraciones en la superficie ocular y pérdida de células del epitelio conjuntival y corneal, manifestándose la enfermedad de ojo seco (EOS). Estos procesos desencadenan una cascada de sucesivos eventos inflamatorios y muerte celular que cronifican esta enfermedad.

Se han desarrollado diferentes sistemas de administración tópica ocular de fármacos con el objetivo de disminuir la sintomatología de ojo seco y contrarrestar los diversos eventos de muerte celular e inflamación en la superficie ocular. Se han en investigación y desarrollo formulaciones liposomales para el tratamiento de ojo seco debido a su capacidad para proveer a la película precorneal de la película lipídica, así como para encapsular sustancias activas tanto hidrófilas como hidrófobas.

Algunos autores han señalado el potencial sobre la utilización de nanoemulsiones para la inclusión de principios activos hidrófilos y lipófilos en el tratamiento de diversas patologías oculares. Las nanoemulsiones son dispersiones coloidales tanto acuosas como oleosas en las que la fase dispersa forma gotículas nanométricas comprendidas entre 100 y 400 nm en la fase dispersante. Estas pueden ser del tipo agua/aceite o aceite/agua en función de cuál sea la fase dispersante o mayoritaria (aceite o agua respectivamente). A su vez se caracterizan por necesitar un aporte energético para su elaboración siendo por tanto termodinámicamente inestables. Debido a esto, muchas nanoemulsiones son producidas mediante homogenización a alta presión, ya que se necesita superar la energía de barrera para formar un sistema estable. Por lo tanto, es de gran interés el desarrollo de emulsiones más sencillas de obtener.

En la misma línea, se ha descrito ampliamente una asociación entre el uso de agentes antiglaucomatosos de forma crónica y la aparición, el empeoramiento o el desarrollo de la enfermedad de ojo seco. En muchos casos, las formulaciones antiglaucomatosas contienen como conservante cloruro de benzalconio, el cual tiene toxicidad sobre el epitelio corneal, el conjuntival y la superficie ocular en general. El cloruro de benzalconio produce un incremento en la expresión de marcadores inflamatorios en los epitelios corneal y conjuntival, y disminuye la densidad de células caliciformes. Estos eventos conllevan una inflamación crónica, así como una desestabilización de la película prelagrimal con la consiguiente aparición de un ambiente hiperosmolar. En muchos casos la enfermedad de ojo seco producida por la inestabilidad de la película prelagrimal puede exacerbarse debido a la administración de los agentes antiglaucomatosos en régimen de dosis múltiple. Por lo tanto, es de interés el desarrollo de un producto antiglaucomatoso que no implique todos estos problemas.

En la patente EP1985298 se describe una emulsión ocular con prostaglandina.

La solicitud de patente US2020/390699 describe una microemulsión de aceite en agua para la formulación de compuestos farmacéuticamente activos. La microemulsión contiene aceite, surfactante, agua y el compuesto farmacéutico. La solicitud de patente EP3919047 describe una microemulsión para aplicaciones oftálmicas, como el tratamiento del síndrome del ojo seco, que comprende al menos un componente oleoso, una fase acuosa, al menos un surfactante no iónico, al menos un polisacárido, una sal o un derivado del mismo, y al menos un agente reticulante. El documento US2012/251613 describe una microemulsión oftálmica de bimatoprost, en el que una microemulsión es una composición fluida que contiene una fase oleosa finamente dispersa en una fase acuosa. Finalmente, el documento "Microemulsiones como sistemas de administración ocular de fármacos: desarrollos recientes y desafíos futuros", Vandamme, Progress in retinal and eye research, Oxford, vol. 21, n.º 1, 1 de enero de 2002, describe microemulsiones como sistemas de administración ocular de fármacos. Estos documentos no describen una microemulsión oftálmica cuya fase oleosa contenga escualeno.

En la presente invención se describe una microemulsión ocular con capacidad de utilizarse como lagrime artificial y como vehículo de medicamentos oculares.

Descripción de la invención

En la presente invención se ha desarrollado una microemulsión oftalmológica que tienen la capacidad de solubilizar fármacos hidrófobos que son difíciles de vehicular en medio acuoso y/o para aumentar la baja biodisponibilidad de aquellos que tienen una permeabilidad disminuida.

5 Las microemulsiones se caracterizan por tener tamaños de gotículas nanométricos, normalmente comprendidos entre 10 nm y 100 nm. La reducción del diámetro de gotícula, implica un incremento de su superficie activa, viéndose incrementada la funcionalidad de la sustancia medicinal y el efecto terapéutico. Además, no necesitan aporte energético para su elaboración siendo esta espontánea y termodinámicamente estables, con características análogas a una disolución ideal. Debido a esto, su perfil de estabilidad puede durar años, ya que su perfil energético es muy distinto a las macro- y nano- emulsiones. Al igual que las anteriores, pueden existir de varios tipos en función de la naturaleza de la fase dispersa y dispersante (agua/aceite o aceite/agua). Contrariamente a lo que se cree, el tamaño de gotícula de las nanoemulsiones está comprendido entre las macroemulsiones y las microemulsiones (aproximadamente 100-500 nm).

15 Así mismo, la naturaleza de las microemulsiones es particularmente atractiva para la vía de administración ocular debido a que forman soluciones transparentes con baja tensión superficial y tamaños de gotícula muy pequeños, lo que promueve un aumento en la internalización de las sustancias activas. Las microemulsiones oftálmicas de la invención son compatibles con la película precorneal.

20 Por tanto, se presentan las microemulsiones como sistemas termodinámicamente estables con una capacidad superior de internalización con potencial uso para transportar sustancias activas al interior celular, concretamente cuando se trata de barreras cuya función principal es la de impedir el paso de sustancias tales como las presentes en la superficie ocular.

Las microemulsiones incluyen una fase acuosa y otra oleosa, e incorporan agentes surfactantes y cosurfactantes para la formación de la microemulsión.

Las microemulsiones de la invención no presentan cloruro de benzalconio.

25 Por lo tanto, el primer aspecto de la invención se refiere a una microemulsión oftálmica con un tamaño de gotícula comprendido entre 10 nm a 100 nm determinado mediante dispersión dinámica de la luz (DLS), comprendiendo el procedimiento:

una fase acuosa y

30 una fase oleosa que comprende: un aceite vegetal, un éster de ácido graso farmacéuticamente aceptable, un compuesto glicol, escualeno, agentes surfactantes y agentes cosurfactantes.

Preferentemente el tamaño de gotícula está comprendido entre 10nm y 50nm.

El término "compuesto glicol" se refiere a un compuesto con dos o más sustituyentes hidroxilo.

35 El término "aceite vegetal" se refiere a una mezcla de triglicéridos de origen vegetal o similar. Ejemplos de aceites vegetales son aceite de argán, aceite de maíz, aceite de palma, aceite de coco, aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de colza, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de soja.

La expresión "éster de ácido graso farmacéuticamente aceptable" se refiere a un éster de alquilo C₆-16 de un ácido graso C₁₀-20, que es adecuado para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica.

El término "agentes cosurfactantes" se refiere a compuestos que junto a los surfactantes estabilizan la microemulsión.

40 El procedimiento objeto de la invención que aquí se describe se refiere a la preparación de microemulsiones en medio acuoso compatibles con la película precorneal.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de la microemulsión de la invención que comprende las etapas de:

- a) mezclar los compuestos que comprende la fase oleosa;
- 45 b) añadir la fase acuosa;
- c) filtrar
- d) estabilizar.

Los últimos aspectos de la invención se refieren a los usos que son la utilización de la microemulsión de la invención como lagrimas artificiales y como vehículo de principios activos con baja biodisponibilidad y/o poco hidrosolubles para

facilitar su administración por vía tópica ocular.

Por lo tanto, otro aspecto se refiere a la microemulsión para su uso como lágrimas artificiales. Igualmente, la invención se refiere al uso de la microemulsión definida arriba para su uso como vehículo de fármacos para su administración por vía tópica ocular y para su uso en el tratamiento de la hipertensión ocular.

5 Finalmente, también se refirió al uso de la microemulsión para su uso en el tratamiento del glaucoma.

Breve descripción de los dibujos

10 La Figura 1 muestra la morfología de la microemulsión-base (MB) visualizada mediante cryo-TEM a 73.000 aumentos (a) y SEM a 200.000 aumentos (b). La escala situada en la parte inferior derecha comprende un tamaño de 50 nm (a) y 200 nm (b). Las microemulsiones comprendidas en el rango anteriormente descrito se muestran con una flecha.

La Figura 2 muestra una distribución de tamaños de la microemulsión-base (MB) representados en escala semi-logarítmica expresados como % Chan (porcentaje de volumen en el canal) frente al tamaño expresado en nanómetros.

15 La Figura 3 muestra un reograma obtenido para el estudio de viscosidad de la microemulsión-base (MB). Se representa esfuerzo de cizalla (Pa) y viscosidad (η) frente a velocidad de cizalla (1/s).

La Figura 4 muestra una viabilidad celular (%) con el vehículo base incubado a 37°C durante 1 y 4 horas en líneas celulares epiteliales de córnea y conjuntiva. Se utilizan dos controles, uno positivo (+; cloruro de benzalconio 0,005%) y otro negativo (-; solución acuosa de NaCl 0,9%).

20 La Figura 5 muestra resultados del ensayo de captación celular de la formulación microemulsión-base (MB) por células epiteliales de córnea humana (HCE). Se muestran células HCE expuestas a una suspensión de cumarina 10 µg/mL durante 15 minutos (a), MB cargada con cumarina 10 µg/mL durante 15 minutos (b), suspensión de cumarina 10 µg/mL durante 30 minutos (c) y a MB cargada con cumarina 10 µg/mL durante 30 minutos (d). La barra de escala representa 50 µm.

25 La Figura 6 muestra una morfología de la microemulsión-base con ácido hialurónico (MB-HA) visualizada mediante cryo-TEM a 73.000 aumentos (a) y SEM a 200.000 aumentos (b). La escala situada en la parte inferior derecha comprende un tamaño de 50 nm (a) y 200 nm (b). Las microemulsiones comprendidas en el rango anteriormente descrito se muestran con una flecha.

30 La Figura 7 muestra una distribución de tamaños de la microemulsión-base con ácido hialurónico (MB-HA) representados en escala semi-logarítmica expresados como % Chan (porcentaje de volumen en el canal) frente al tamaño expresado en nanómetros.

La Figura 8 muestra un reograma obtenido para el estudio de viscosidad de las microemulsión-base con ácido hialurónico (MB-HA). Se representa esfuerzo de cizalla (Pa) y viscosidad ($r\eta$) frente a velocidad de cizalla (1/s).

35 La Figura 9 muestra la viabilidad celular (%) de la microemulsión con hialuronato sódico (MB-HNa) incubada a 37°C durante 1 y 4 horas en líneas celulares epiteliales de córnea y conjuntiva. Se utilizan dos controles, uno positivo (+; cloruro de benzalconio 0,005%) y otro negativo (-; solución acuosa de NaCl 0,9%).

La Figura 10 muestra la viabilidad celular (%) de microemulsión con hialuronato sódico y con sustancias osmoprotectoras y reepitelizantes incubadas a 37°C durante 1 y 4 horas en líneas celulares epiteliales de córnea. Se utilizan dos controles, uno positivo (+; cloruro de benzalconio 0,005%) y otro negativo (-; solución acuosa de NaCl 0,9%).

40 La Figura 11 muestra presiones intraoculares (expresadas en porcentaje de la presión basal) obtenidas con la formulación MB-HA (Δ PIO > 10 %) en comparación con las encontradas con la microemulsión-base que se utiliza como control (Δ PIO < 10 %).

45 La Figura 12 muestra una morfología de la microemulsión con hialuronato sódico y latanoprost (MB-HNa-Latanoprost) visualizada mediante cryo-TEM a 73000 aumentos (a) y SEM a 100000 aumentos (b). La escala situada en la parte inferior derecha comprende un tamaño de 50 nm (a) y 200 nm (b). Las microemulsiones comprendidas en el rango anteriormente descrito se muestran con una flecha.

La Figura 13 muestra una distribución de tamaños de la microemulsión con ácido hialurónico y latanoprost (MB-HA-Latanoprost) representados en escala semi-logarítmica expresados como % Chan (porcentaje de volumen en el canal) frente al tamaño expresado en nanómetros.

50 La Figura 14 muestra un reograma obtenido para el estudio de viscosidad de las microemulsión con ácido hialurónico y latanoprost (MB-HA-Latanoprost). Se representa esfuerzo de cizalla (Pa) y viscosidad (Pa s) frente a velocidad de cizalla (1/s).

La Figura 15 muestra la viabilidad celular (%) de microemulsión con hialuronato sódico y latanoprost (MB-HNa-Latanoprost) incubadas a 37°C durante 1 y 4 horas en líneas celulares epiteliales de córnea y conjuntiva. Se utilizan dos controles, uno positivo (+; cloruro de benzalconio 0,005%) y otro negativo (-; solución acuosa de NaCl 0,9%).

- 5 La Figura 16 muestra presiones intraoculares expresadas en porcentaje de la presión basal obtenidas con la formulación MB-HA-Latanoprost y el Monoprost comercial que se usa como referencia en el ensayo. La microemulsión-base (MB) se emplea como formulación control.

Descripción de una realización preferente

- 10 Como se ha indicado, el primer aspecto de la invención se refiere a una microemulsión oftálmica con un tamaño de gota comprendido entre 10 nm y 100 nm, determinado mediante dispersión dinámica de la luz (DLS), comprendiendo el procedimiento:

una fase acuosa y

una fase oleosa que comprende: un aceite vegetal, un éster de ácido graso farmacéuticamente aceptable, un compuesto glicol, escualeno, un agente surfactante y un agente cosurfactante.

- 15 De manera preferente el aceite vegetal está en una concentración en masa respecto a la masa total de la microemulsión en un rango comprendido entre 0,001% y el 2%, el éster de ácido graso farmacéuticamente aceptable en una concentración en masa respecto a la masa total de la microemulsión en un rango comprendido entre el 0,05% y el 4% y el compuesto glicol está en una concentración en masa respecto a la masa total de la microemulsión en un rango comprendido entre el 0,5% y el 4%.

- 20 De manera particular en la fase oleosa de la invención el aceite vegetal es aceite de soja, el éster de ácido graso farmacéuticamente aceptable es oleato de etilo y el compuesto glicol es propilenglicol que favorece la disolución de los componentes hidrófobos.

- 25 De manera preferente el surfactante de la microemulsión está en una concentración en masa respecto a la masa total de la microemulsión en un rango comprendido entre 0,1% y el 2% y el cosurfactante está en una concentración en masa respecto a la masa total de la microemulsión en un rango comprendido entre el 0,5% y el 3%.

De manera particular como surfactantes de la microemulsión es fosfatidilcolina de soja y el cosurfactante es ricino polioxílico 35 (Kolliphor EL®). En concreto la fosfatidilcolina, tras su administración, va a disminuir la tensión superficial de la película lagrimal lo que favorece su rápida extensibilidad e interacción con las mucinas de la superficie ocular.

- 30 En general a las microemulsiones se les pueden añadir diferentes compuestos activos que, sin ser fármacos, tienen propiedades osmoprotectoras, reepitelizantes, antiinflamatorias y/o antioxidantes y protegen a la superficie ocular de posibles efectos adversos que se pueden producir con el uso continuado de la preparación durante largos periodos de tiempo. Estos compuestos según su naturaleza se incluirán en la fase acuosa o en la fase oleosa.

De manera preferente la fase oleosa comprende activos liposolubles seleccionados entre: ácido oleanólico, ubiquinol y/o vitaminas liposolubles.

- 35 De manera preferente el escualeno se encuentra en una concentración en masa respecto a la masa total de la microemulsión en un rango comprendido entre el 0,1% y el 2%.

- 40 De manera preferente la microemulsión comprende una sustancia medicinal antiglaucomatosa, más preferentemente prostaglandinas, de manera particular la fase oleosa comprende latanoprost, número CAS 130209-82-4. El latanoprost pertenece al grupo de medicamentos conocidos como análogos de las prostaglandinas. Se utiliza para tratar enfermedades como el glaucoma de ángulo abierto y la hipertensión ocular en adultos. Ambas enfermedades están relacionadas con un aumento de la presión dentro del ojo, lo que puede llegar a afectar a la visión. El latanoprost actúa aumentando la salida natural del humor acuoso desde el interior del ojo al torrente sanguíneo.

- 45 De manera preferente la fase acuosa comprende compuestos mucoadhesivos y/o mucomiméticos. De manera preferente el compuesto mucoadhesivo y/o mucomimético de la microemulsión está en una concentración en masa respecto a la masa total de la microemulsión en una proporción inferior al 0,8%. Más preferentemente los compuestos mucoadhesivos y/o mucomiméticos se seleccionan entre: ácido hialurónico y sus sales, dextrano, derivados de la celulosa, sulfato de condroitin, quitosano, alginatos, y goma gelano.

De manera particular el compuesto es ácido hialurónico o las sales del mismo, presentando características similares a la de la película precorneal. Esta microemulsión se puede utilizar como lagrimas artificiales.

- 50 En la fase acuosa se incorpora el agente isotónico (trehalosa, cloruro sódico, glucosa) para conseguir una osmolaridad ajustada para uso clínico y el agente adecuado para tamponar el preparado hasta pH adecuado. Los preparados podrán ser isotónicos o hipotónicos.

Por lo tanto, preferentemente la fase acuosa comprende un agente isotonzante y más preferentemente el agente isotónico se selecciona entre: trehalosa, cloruro sódico, glucosa, fructosa, manitol, sorbitol, ribitol, eritritol y dextrosa.

5 De manera preferente la fase acuosa comprende activos hidrosolubles seleccionados entre: vitaminas hidrosolubles, betaína, leucina, clusterina y L- carnitina, taurina, glicina, ribitol, ectoína y aminoácidos. De manera particular betaína, leucina.

De manera preferente la fase acuosa tiene una osmolaridad comprendida en un rango entre 150 mOsm/kg y 330 mOsm/kg.

10 De manera preferente la microemulsión comprende: agentes capaces de disminuir la presión infraocular, agentes neuroprotectores, material genético como el ADN y el ARN, proteínas y ácidos nucleicos, inmunógenos como escualeno y polisorbato 80.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de la microemulsión de la invención que comprende las etapas de: a) mezclar los compuestos que comprende la fase oleosa;

b) añadir la fase acuosa;

c) filtrar

15 d) estabilizar.

De manera preferente la etapa a) se realiza a una temperatura comprendida entre 20°C y 30°C y con protección de la luz, en la etapa b) se añade la fase acuosa a la fase oleosa en agitación, en la etapa c) el filtrado se realiza con un filtro que tiene un tamaño de poro entre 0,20 µm y 0,25 µm y donde la etapa d) de estabilización se realiza a una temperatura entre 2°C y 25°C.

20 **Ejemplos**

Los siguientes ejemplos tienen únicamente carácter ilustrativo de esta invención, y no deben ser interpretados en sentido limitativo de la misma.

Ejemplo 1

1º Preparación de las fases

25 FASE OLEOSA (para 10 g de microemulsión). Se utilizaron oleato de etilo 0,8 % (m:m), aceite de soja 0,2 % (m:m), Kolliphor EL® 1 % (m:m), propilenglicol 1 % (m:m), fosfatidilcolina de soja 0,5 % (m:m) y escualeno 0,2 % (m:m).

Se mezclaron los diferentes componentes y dejó en agitación a 400 rpm, y a temperatura ambiente, durante un mínimo de 30 min hasta conseguir transparencia.

La osmolaridad de la fase oleosa, sin activos liposolubles, es próxima a 170 mOsm/L.

30 FASE ACUOSA (para 10 g de microemulsión). Se utilizaron ácido hialurónico 0,2 % (m:m), trehalosa es. para osmolaridad deseada (250-300 mOsm/kg), agua csp. 10 g de microemulsión (primera fase acuosa).

Se preparó una segunda fase acuosa igual a la anterior sin ácido hialurónico. La microemulsión preparada con la fase acuosa sin ácido hialurónico se denomina a partir de ahora MB, microemulsión base.

35 Y una tercera fase acuosa con ácido hialurónico con la adición de activos osmoprotectores y reepitelizantes a esta formulación que favorece su utilización como vehículo de fármacos hipotensores oculares como tratamientos prolongados y que posibilitan la manifestación de alteraciones de la superficie ocular.

2º Elaboración de la microemulsión

40 La elaboración de la microemulsión se realizó a temperatura ambiente y con protección de la luz. Se añadió la totalidad de cualquiera de las fases acuosas, una sola etapa, a la fase oleosa que se encontraba en agitación a 1.000 rpm. Se mantuvo la agitación a 1.000 rpm durante 10 minutos. Se filtró, utilizando un filtro hidrófilo de baja retención, con un tamaño de poro de 0,22 µm. Se dejó estabilizar en nevera a 2-8° C durante 24 horas.

3º Características de la microemulsión obtenidas en el punto 1º y 2º referenciada como MB (microemulsión base sin ácido hialurónico)

45 Esta caracterización se limita a la microemulsión según lo descrito en este ejemplo. La morfología de las gotículas fue estudiada utilizando las técnicas de cryo-TEM y SEM. Para ello se utilizaron los equipos 200 kV FEI TALOS Arctica y JEOL JSM 7600F, respectivamente. Las fotografías obtenidas se muestran en la Figura 1 apartados a) y b).

El preparado MB presenta valores de pH de 7,27 ± 0,12.

- 5 El diámetro de las partículas emulsionadas de la microemulsión se determinó utilizando el método de dispersión de luz dinámica (DLS) (también llamado de espectroscopia de correlación fotónica). El valor del diámetro medio volumen de las partículas obtenidas en distintos lotes de la microemulsión oscilan entre 21 y 23 nm con desviaciones estándar (SD) entre 4,5 y 5,3 nm. El porcentaje de partículas superiores 50 nm fue, en todos los casos, inferior al 1 % (Figura 2).
- Los valores de potencial zeta para los distintos lotes fluctuaron entre -7 y -9 mV (las medidas se realizaron a temperatura ambiente con un Autosizer4700, Malvern).
- Las medidas de tensión superficial se realizaron con un tensiómetro de la marca comercial Kruss (K-11) utilizando el método de la placa y se obtuvieron valores entre 34 y 38 mN/m.
- 10 En la evaluación reológica del vehículo MB a velocidades de cizalla entre 0 y 1.000 s⁻¹ y temperatura ambiente, se observa que aparece un comportamiento newtoniano con valores de viscosidad dinámica entre 1,1 y 1,3 mPa s (Figura 3). Para su determinación se utilizó el equipo Discovery HR-Hybrid Rheometer DHR-1 con un sistema de placas paralelas de 60 mm.
- 15 En los ensayos de citotoxicidad *in vitro* se utilizaron líneas celulares epiteliales de córnea humana (hTERT-HCEC) y de conjuntiva humana (HConEpiC). Para el estudio 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). Como control negativo se utilizó cloruro sódico al 0,9 % 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 superior al 90 % a los tiempos ensayados por lo que se considera que es óptima (Figura 4).
- 20 En un ensayo inicial de captación celular de las gotículas lipídicas por células epiteliales de córnea humana (hTERT-HCEC) utilizando la microemulsión marcada con un colorante fluorescente, la cumarina-6 sustancia muy lipófila, se manifestó captación a los 15 y 30 min de exposición según se muestra en la Figura 5.
- 25 4° Características de la microemulsión según el punto 1° y el 2° con hialuronato sódico al 0,2 % como polímero mucoadhesivo (se denomina MB-HNa).
- La caracterización de esta formulación (MB-HNa) se llevó a cabo utilizando los mismos equipos que los indicados en apartado 3°.
- La morfología de las gotículas fue estudiada utilizando las técnicas de cryo-TEM y SEM Las fotografías obtenidas se muestran en las Figuras 6 a) y b).
- 30 El preparado MB-HNa presenta valores de pH comprendidos entre 6,79 ± 0,05.
- El diámetro medio volumen de las partículas obtenidas en distintos lotes de la microemulsión con hialuronato sódico oscilan entre 29 y 37 nm con desviaciones estándar (SD) entre 6,9 y 7,4 nm. El porcentaje de partículas superiores a 50 nm fue inferior al 11 % (Figura 7).
- El potencial zeta fluctuó entre -0,1 y 0,2 mV (las medidas se realizaron a temperatura ambiente).
- 35 Las medidas de tensión superficial sobre el vehículo de la invención con hialuronato sódico se encontraron valores entre 35 y 38 mN/m.
- En la evaluación reológica del vehículo a temperatura ambiente de la invención con hialuronato sódico a velocidades de cizalla entre 0 y 1.000 s⁻¹ se manifiesta un comportamiento newtoniano con valores de viscosidad dinámica entre 4,3 y 4,5 mPa s (Figura 8).
- 40 En los ensayos de citotoxicidad *in vitro* se utilizaron líneas celulares epiteliales de córnea humana (hTERT-HCEC) y de conjuntiva humana (HConEpiC). Para el estudio 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). Como control negativo se utilizó cloruro sódico al 0,9 % 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 superior al 90 % a todos los tiempos ensayados (Figura 9).
- 45 Esta composición farmacéutica (MB-HNa) con características de película preocular tiene la capacidad de disminuir la tensión ocular en el conejo. Así se puede observar en los resultados obtenidos en esta especie animal tras la administración de 25 pL de la formulación (Figura 11). Se observa una disminución de la presión infraocular entre valores del 15 al 17 % a partir de las 2 horas de la instilación que se mantiene durante 6 horas.
- 50 5° Características de la microemulsión según la invención con agentes opcionales
- A este vehículo (MB-HNa) basado en la microemulsión objeto de la invención con hialuronato sódico se le puede añadir componentes opcionales osmoprotectores y reepitelizantes como la betaína, la leucina y la l-carnitina. No existe

comercializada ninguna lágrima artificial que sea una microemulsión que incluya estos componentes.

En los estudios realizados con la línea celular de córnea humana (hTERT-HCEC), se incluyeron formulaciones con sustancias opcionales osmoprotectoras y reepitelizantes como la betaína y la leucina, manteniéndose la buena tolerancia en las formulaciones que incluyen los activos indicados (Figura 10). Esta composición derivada de la microemulsión objeto de la invención debido a las características indicadas en este apartado puede ser utilizada como sustituto lagrimal. Este hecho junto con la adición de activos osmoprotectores y reepitelizantes a esta formulación favorece su utilización como vehículo de fármacos hipotensores oculares que suponen tratamientos prolongados y posibilitan la manifestación de alteraciones de la superficie ocular.

6° Características de la microemulsión según la invención con agentes opcionales y una sustancia medicinal antiglaucomatosa

El último ensayo se realizó con una microemulsión que comprende la composición base descrita en el punto primero de este ejemplo, hialuronato sódico y latanoprost.

El colirio comercializado en forma de disolución en envases multidosis lleva cloruro de benzalconio, producto altamente citotóxico en las células de conjuntiva y cornea. El producto comercializado en envases unidosis (Monoprost) incorpora diferentes surfactantes ajenos al cloruro de benzalconio. Este último colirio se ha utilizado como referencia en los ensayos de comparación de actividad hipotensora.

El preparado farmacéutico propósito de esta invención lleva la misma dosificación que los preparados que están comercializados (50 µg/mL).

La caracterización de esta formulación (MB-HNa-Latanoprost) se llevó a cabo utilizando los mismos equipos que los indicados en apartado 3°.

La morfología de las gotículas fue estudiada utilizando la técnica de cryo-TEM y SEM. Las fotografías obtenidas se muestran en las Figuras 12 (a) y (b).

El preparado MB-HNa-latanoprost presenta un valor de pH de $6,58 \pm 0,02$.

El diámetro medio del volumen de las partículas obtenidas en distintos lotes de la microemulsión con hialuronato sódico oscilan entre 29 y 32 nm con desviaciones estándar (SD) entre 6,9 y 7,1 nm. El porcentaje de partículas superiores 50 nm fue inferior al 6 % (Figura 13).

El potencial zeta fluctuó entre -0,1 y 0,0 mV y los valores de la tensión superficial oscilaron entre 36 y 38 mN/m.

En la evaluación reológica de la microemulsión con hialuronato sódico y latanoprost realizada a velocidades de cizalla entre 0 y 1.000 s^{-1} , se manifiesta un comportamiento newtoniano con valores de viscosidad dinámica entre 4,5 y 4,7 mPa s (Figura 14).

En los ensayos de citotoxicidad *in vitro* se utilizaron líneas celulares epiteliales de córnea humana (hTERT-HCEC) y de conjuntiva humana (HConEpiC). Para el estudio 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). Como control negativo se utilizó cloruro sódico al 0,9 % 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 superior al 90 % a todos los tiempos ensayados (Figura 15).

Esta composición farmacéutica (MB-HNa-latanoprost) con actividad hipotensora fue comparada con la formulación comercializada de latanoprost en envases unidosis (Monoprost) que se utilizó como referencia. Como control se empleó la microemulsión base (MB). Los resultados se indican en la Figura 16. A las 2 h después de su administración se alcanza con ambas formulaciones una disminución en la presión intraocular (Δ PIO) superior al 15 %. En el caso de la formulación comercial se alcanzó un efecto máximo hipotensor del 20% a las 2h que se conservó aproximadamente durante 9 h (Δ PIO ~15 %) y un efecto residual (inferior al 10 %) que se mantuvo hasta los 2 días. Con la composición farmacéutica objeto de la patente, además se puede observar un Δ PIO entre el 35-38 % a partir de las 24 h que se mantiene durante 3 días. A partir del cuarto día el efecto comienza a disminuir lentamente, manteniéndose la eficacia hipotensora (Δ PIO>10%) hasta los 12 días.

REIVINDICACIONES

1. Una microemulsión oftálmica con un tamaño de gotícula comprendido entre 10 nm a 100 nm que comprende:
una fase acuosa y
una fase oleosa que comprende: un aceite vegetal, un éster de ácido graso farmacéuticamente aceptable, un compuesto glicol, escualeno, agentes surfactantes y cosurfactantes.
2. La microemulsión según la reivindicación 1, **caracterizada porque** el aceite vegetal es aceite de soja, el éster de ácido graso farmacéuticamente aceptable es oleato de etilo y el compuesto glicol es propilenglicol el agente surfactante es fosfatidilcolina de soja y el cosurfactante es aceite de ricino polioxil 35.
3. La microemulsión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizada porque** la fase acuosa comprende compuestos mucoadhesivos y/o mucomiméticos seleccionados entre: ácido hialurónico y sus sales, dextrano, derivados de la celulosa, sulfato de condroitin, quitosano, dextrano, alginatos y goma gelano .
4. La microemulsión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada porque** la fase oleosa comprende activos liposolubles seleccionados entre: ácido oleanólico, ubiquinol y/o vitaminas liposolubles.
5. La microemulsión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada porque** la fase oleosa comprende latanoprost.
6. La microemulsión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada porque** la fase acuosa comprende un agente isotónico seleccionado entre: trehalosa, cloruro sódico, glucosa, fructosa, manitol, sorbitol, ribitol, eritrol y dextrosa.
7. La microemulsión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada porque** la fase acuosa comprende activos hidrosolubles seleccionados entre: vitaminas hidrosolubles, betaína, clusterina, leucina, L-carnitina, taurina, glicina, ribitol, ectoína y aminoácidos.
8. La microemulsión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada porque** la fase acuosa tiene una osmolaridad comprendida en un rango entre 150 mOsm/kg y 330 mOsm/kg.
9. Un procedimiento de obtención de la microemulsión según las reivindicaciones 1 a 8, que comprende las etapas de:
 - (a) mezclar los compuestos que comprende la fase oleosa;
 - (b) añadir la fase acuosa;
 - (c) filtrar
 - (d) estabilizar.
10. El procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado porque:** la etapa a) se realiza a una temperatura comprendida entre 20°C y 30°C y con protección de la luz, en la etapa b) se añade la fase acuosa a la fase oleosa en una etapa con agitación, en la etapa c) el filtrado se realiza con un filtro que tiene un tamaño de poro entre 0,20 µm y 0,25 µm y en el que la etapa d) de estabilización se realiza a una temperatura entre 2°C y 25°C.
11. La microemulsión según las reivindicaciones 3 a 4 y 6 a 8, para su uso como lágrimas artificiales.
12. La microemulsión según las reivindicaciones 1 a 4 y 6 a 8, para su uso como vehículo de fármacos para su administración por vía tópica ocular.
13. La microemulsión según alguna de las reivindicaciones 5 a 8, para su uso en el tratamiento de la hipertensión ocular.
14. La microemulsión según las reivindicaciones 5 a 8, para su uso en el tratamiento del glaucoma.

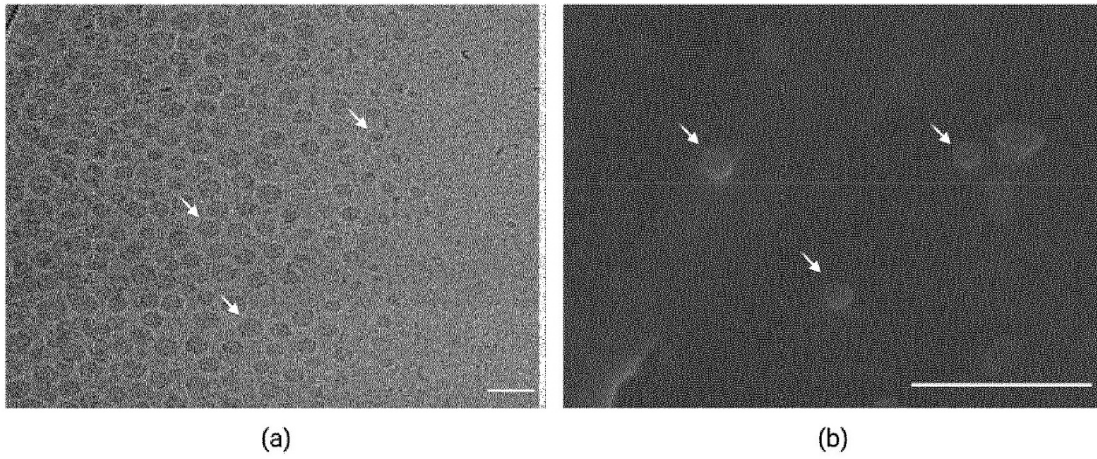


FIG. 1

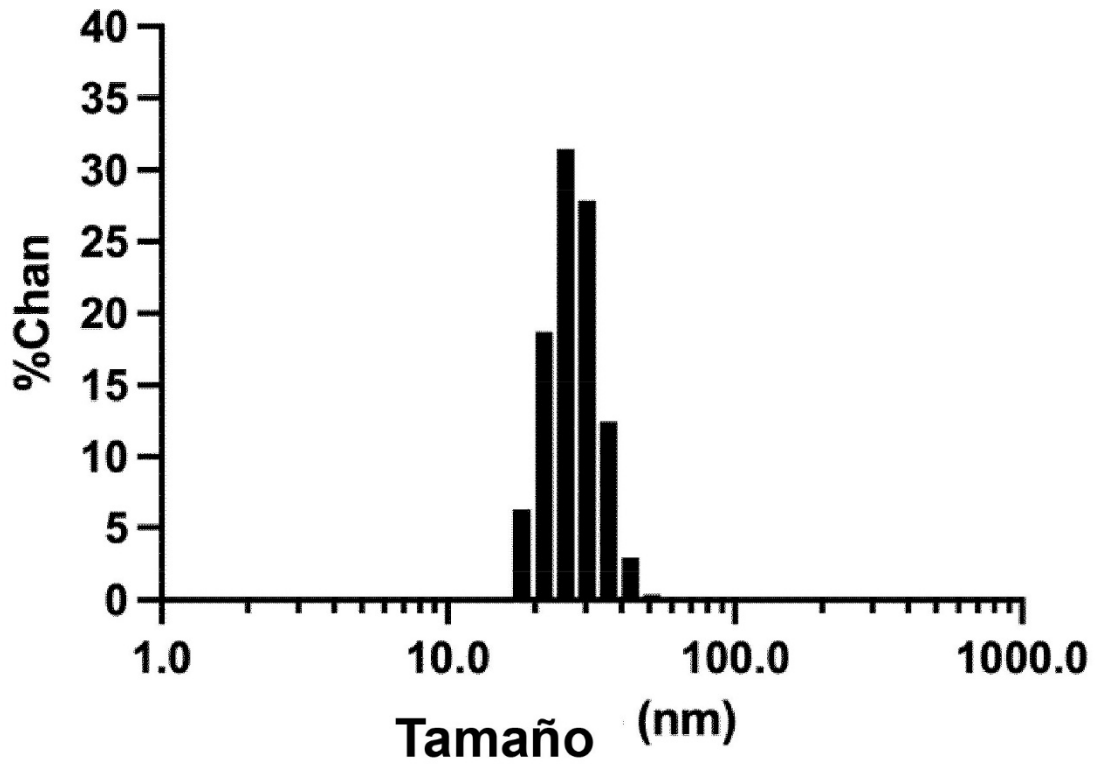


FIG. 2

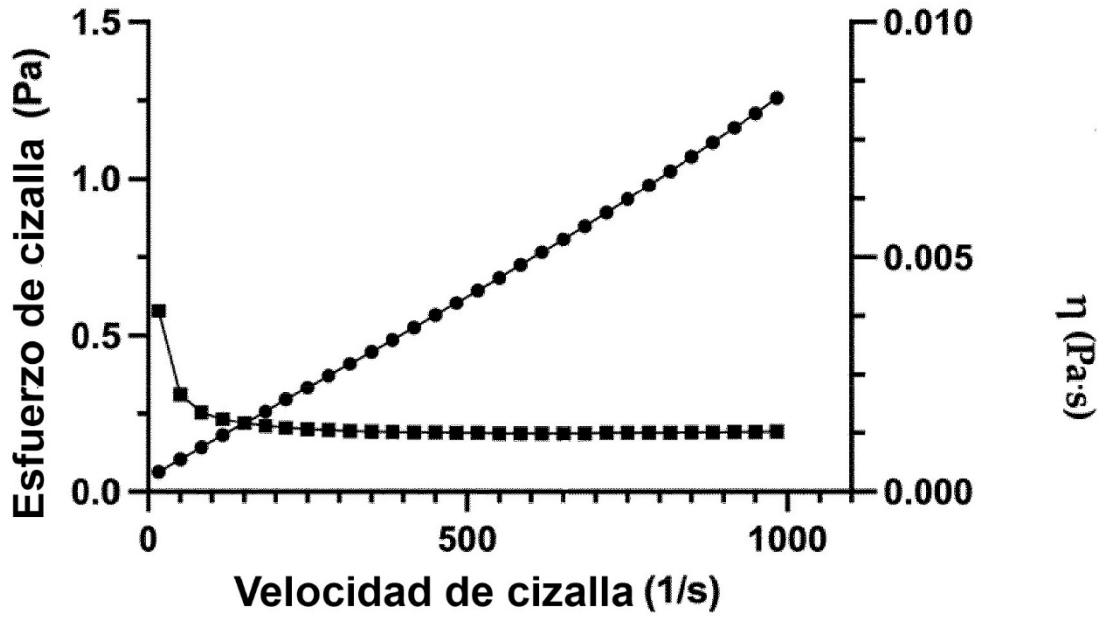


FIG. 3

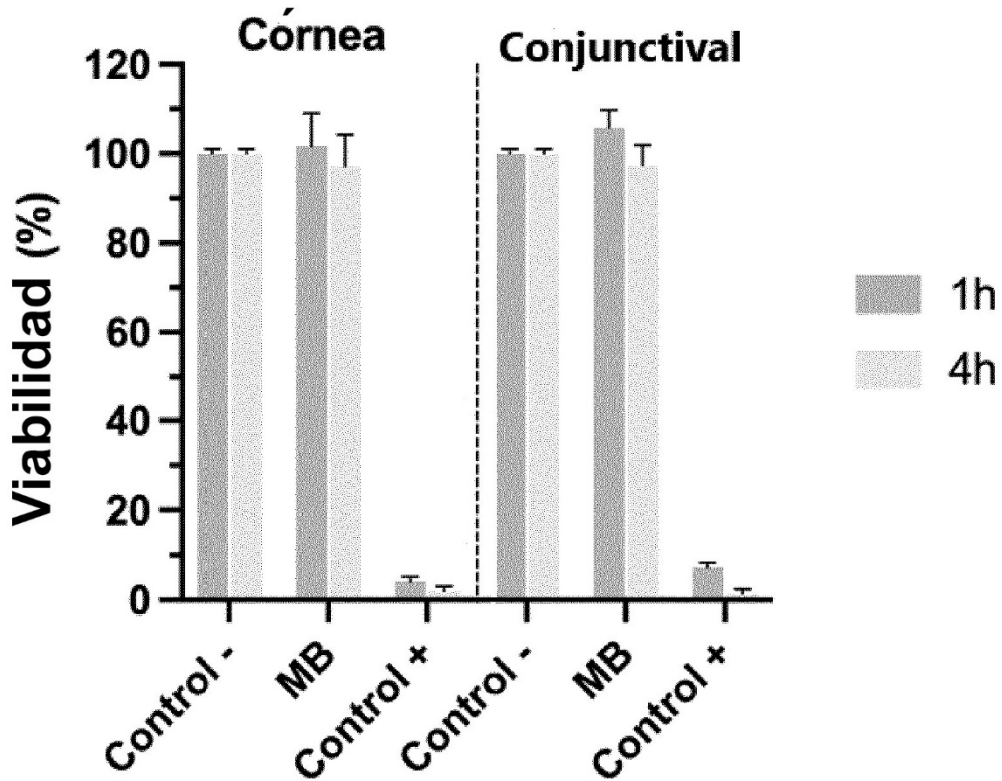


FIG. 4

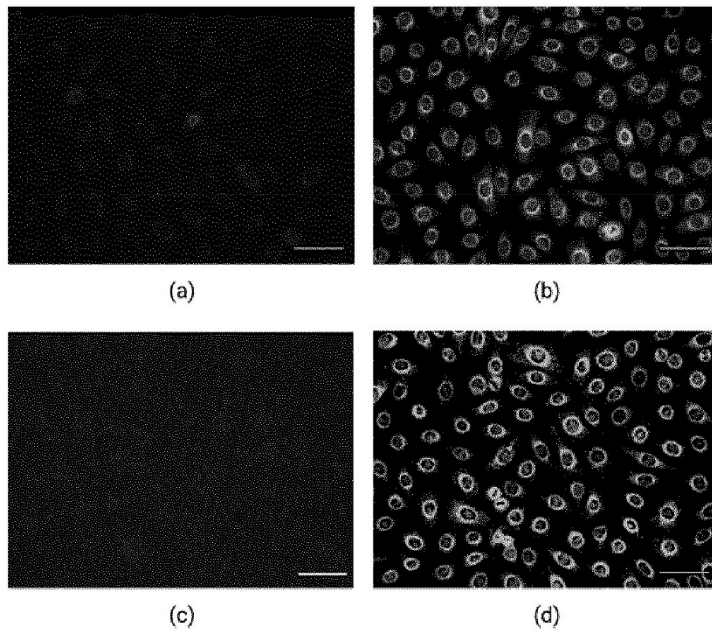


FIG. 5

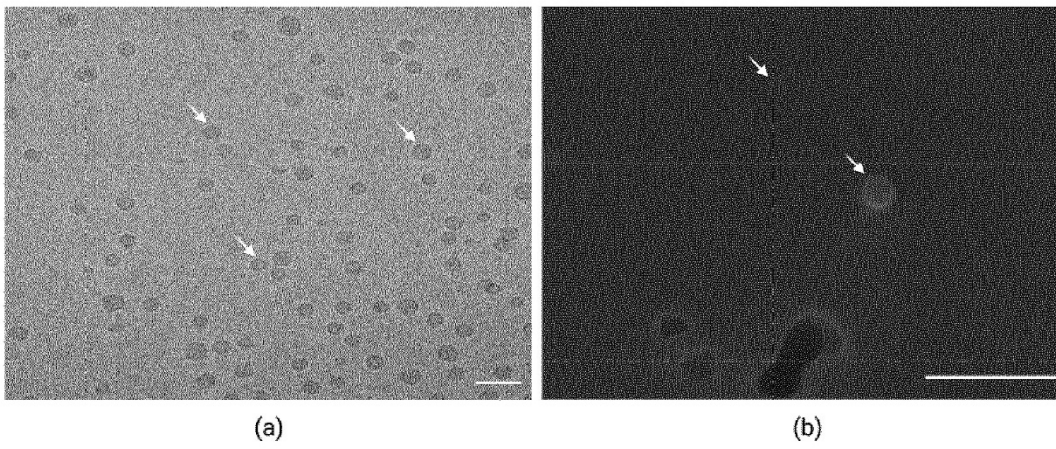


FIG. 6

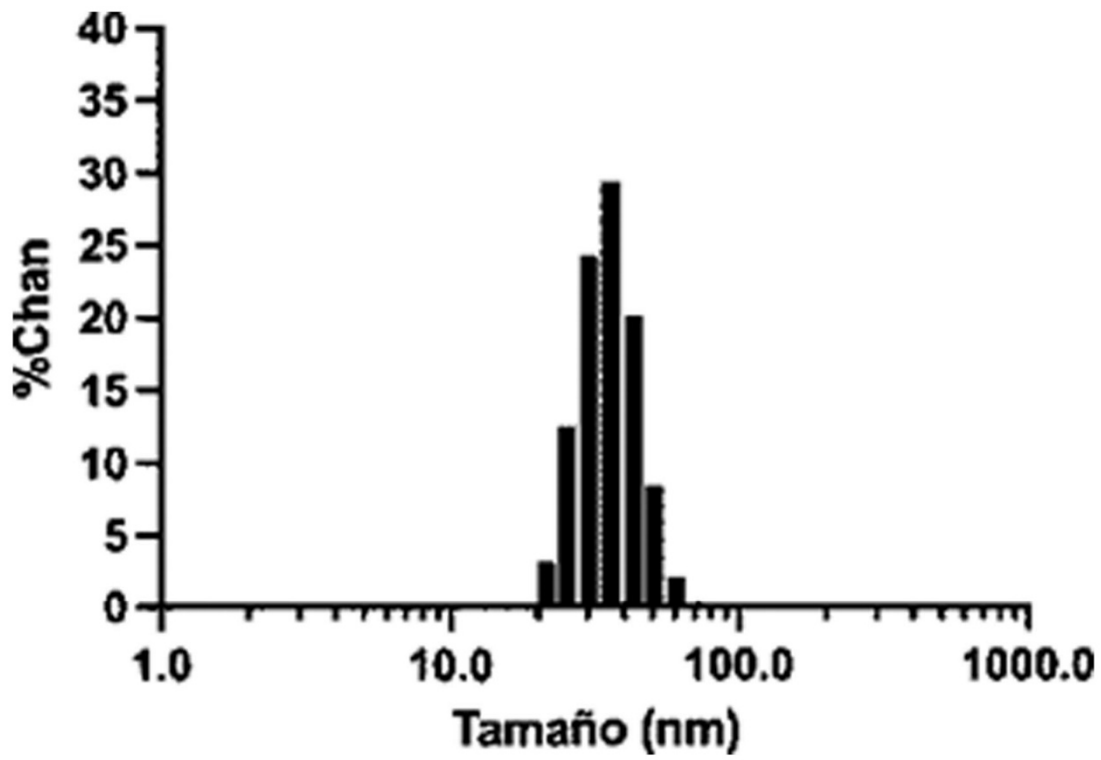


FIG. 7

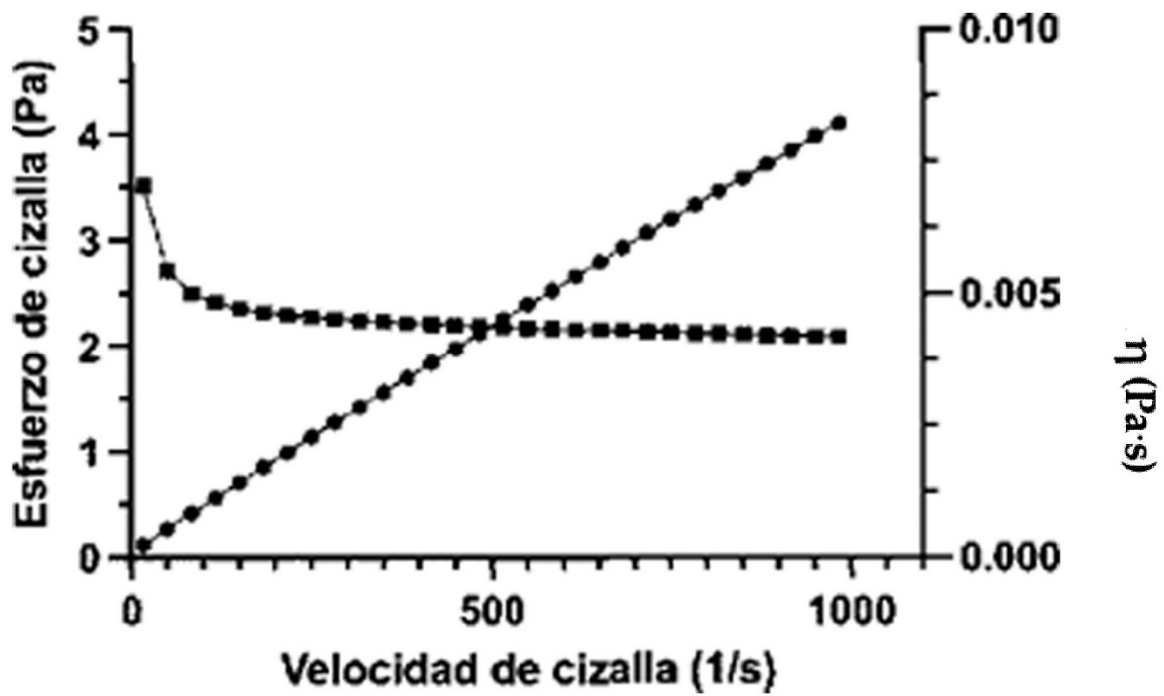


FIG. 8

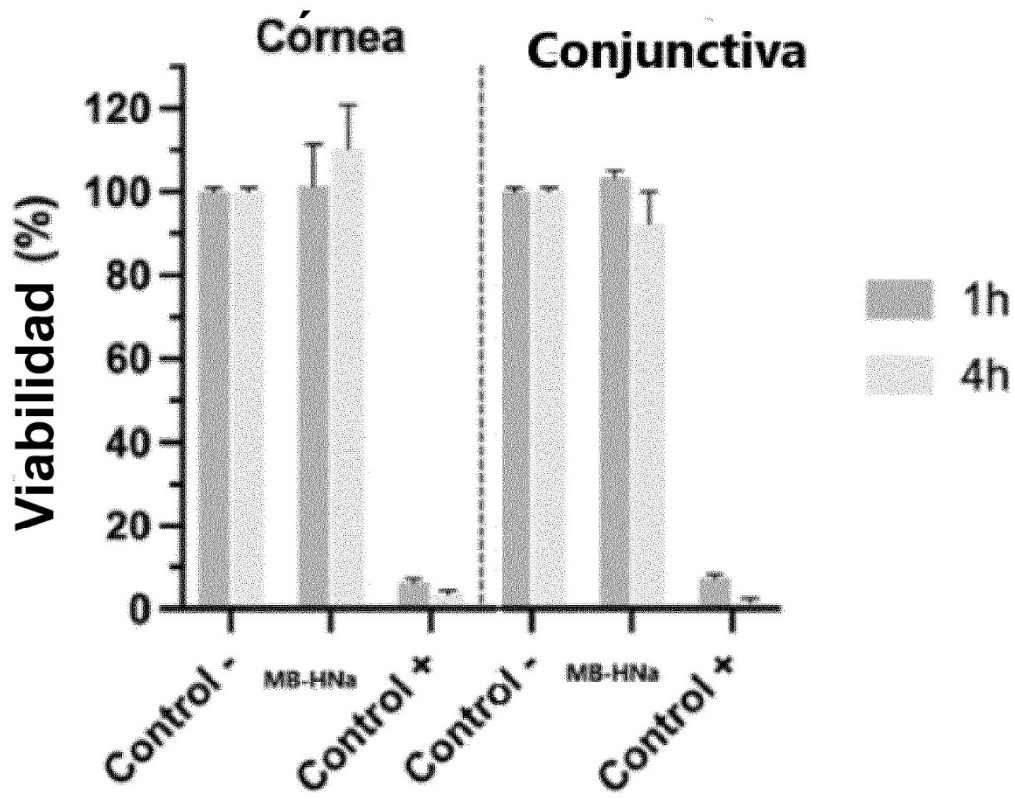


FIG. 9

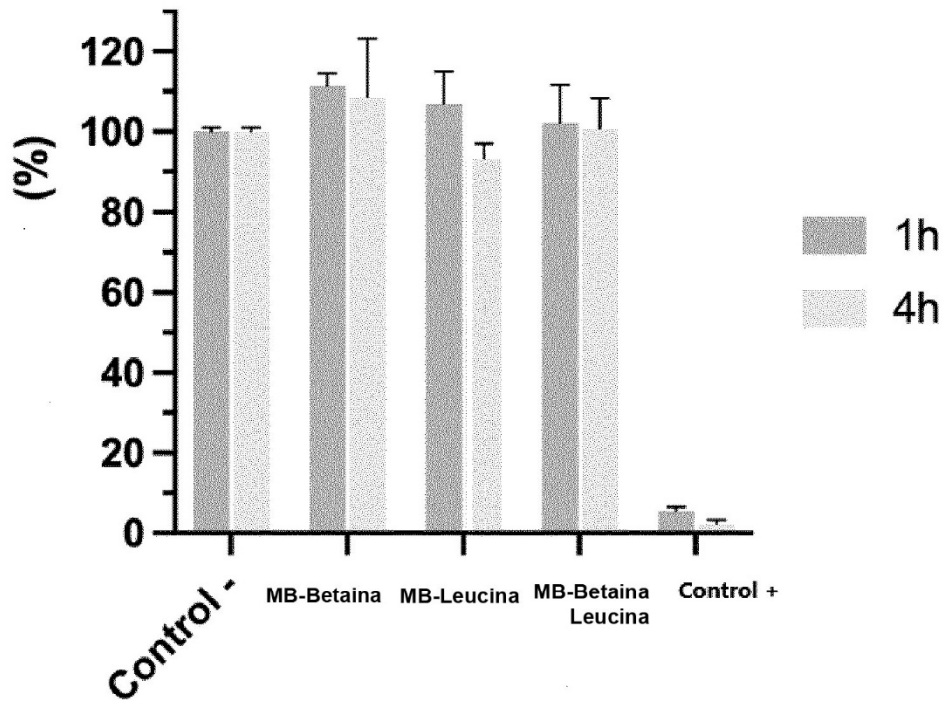


FIG. 10

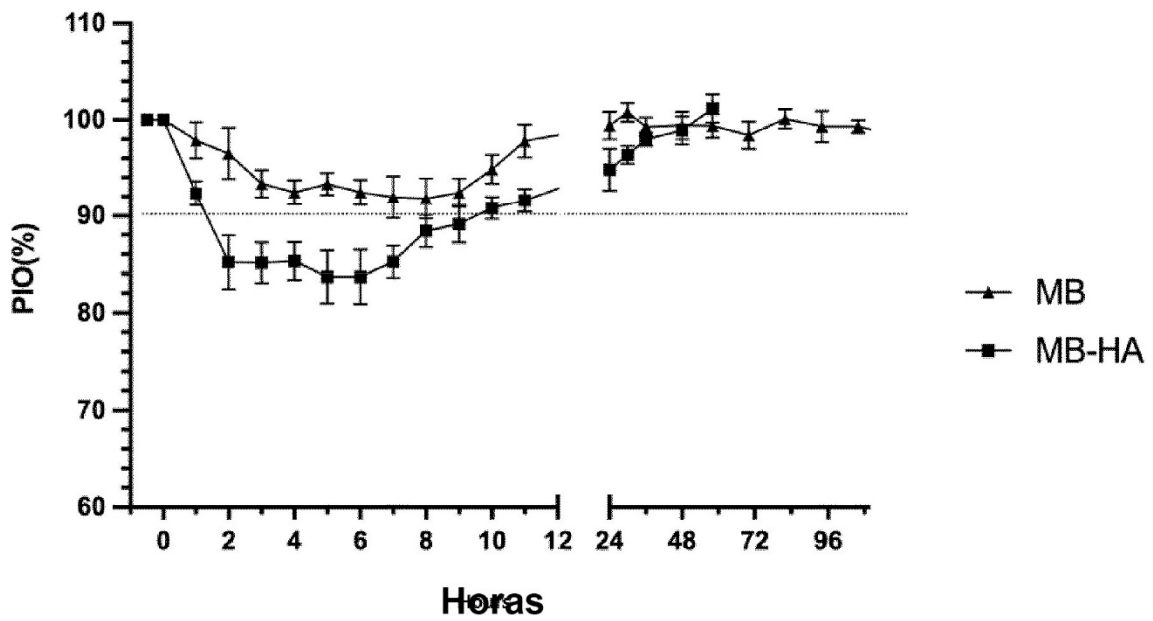


FIG. 11

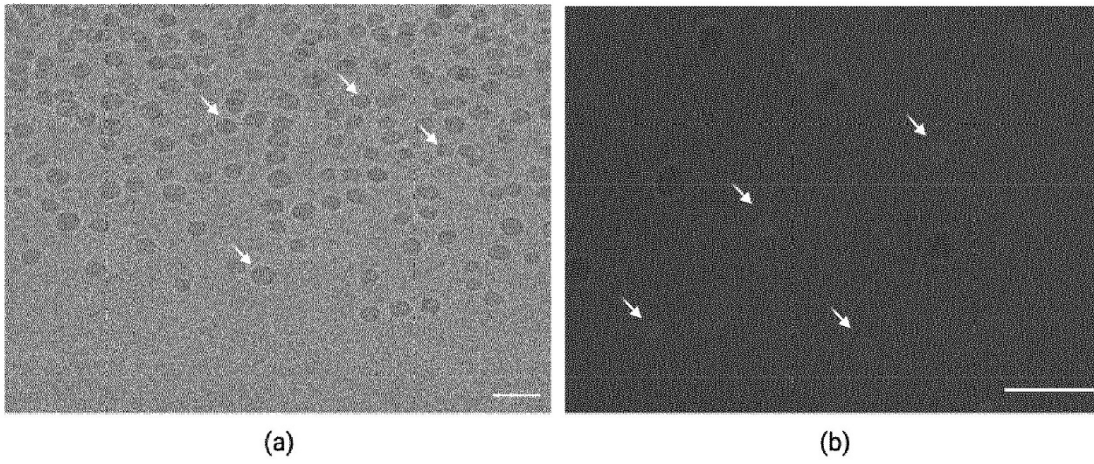


FIG. 12

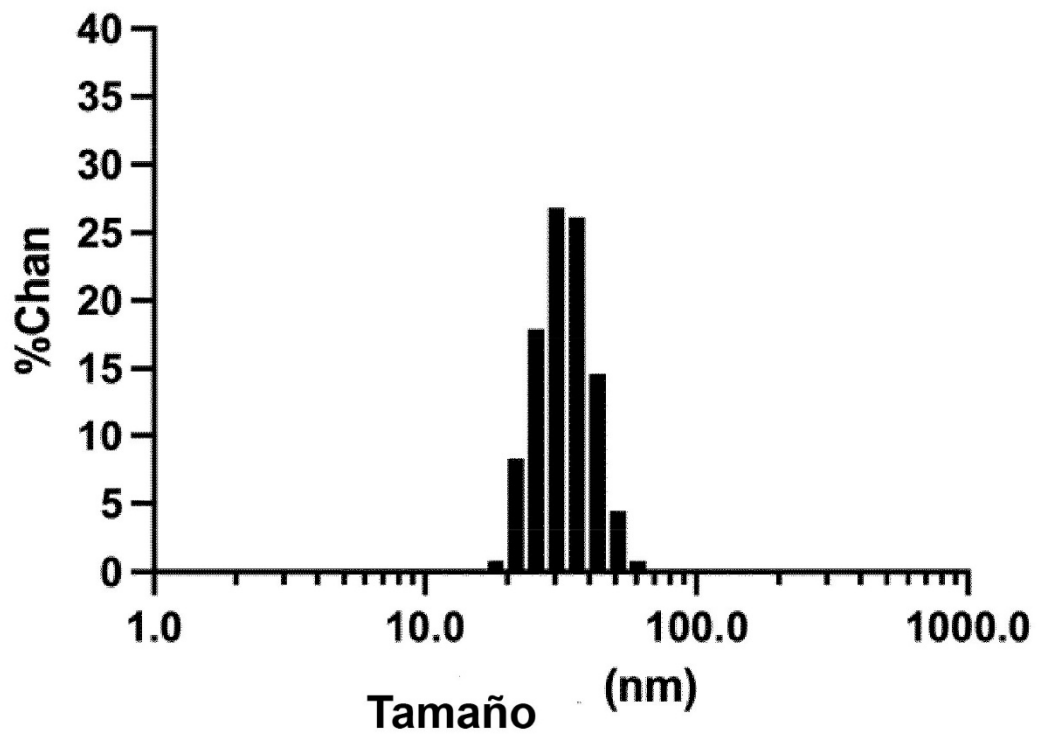


FIG. 13

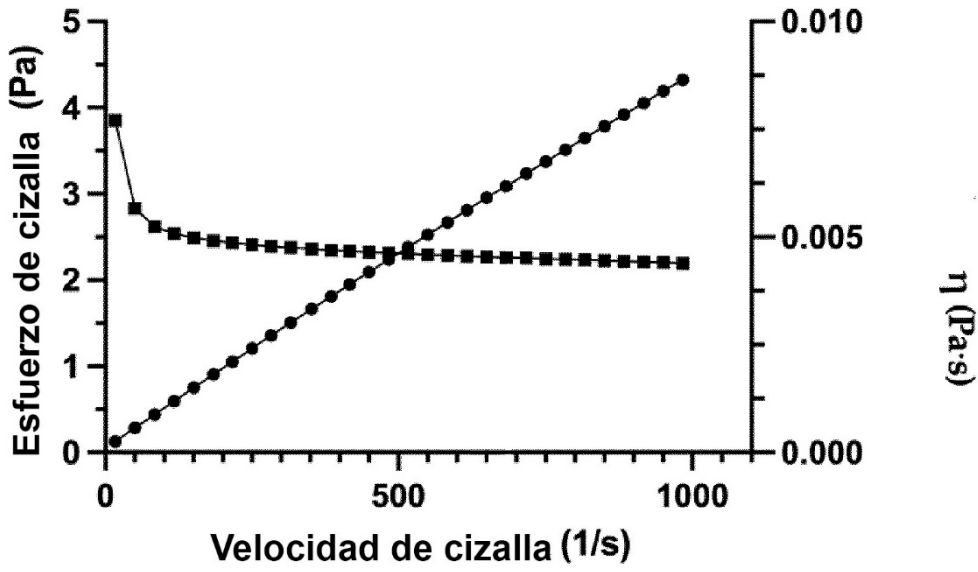


FIG. 14

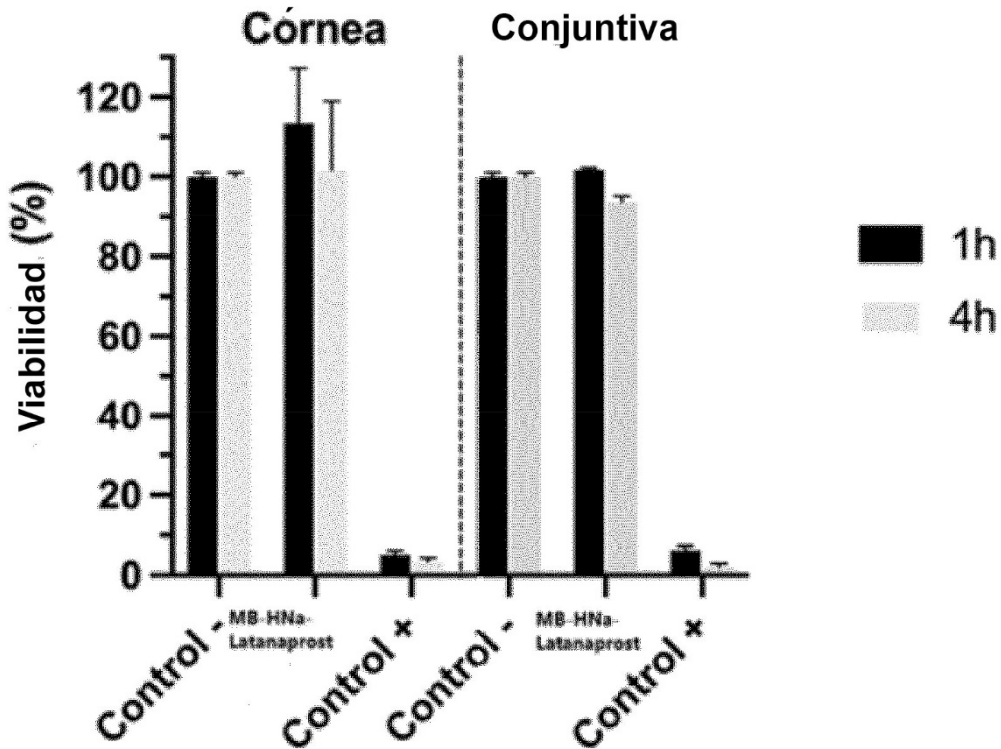


FIG. 15

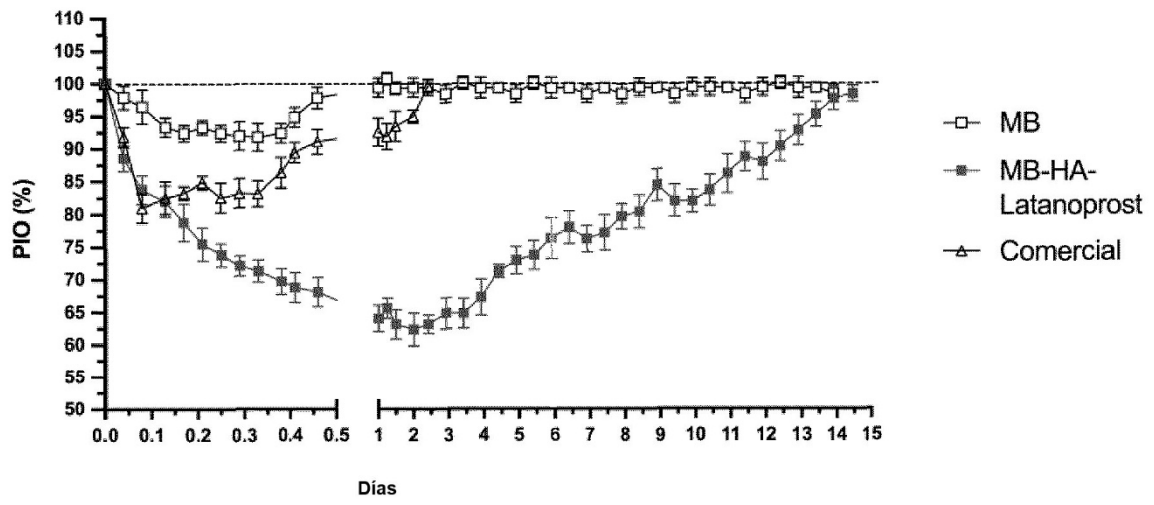


FIG. 16