

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 910**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 31/7068 (2006.01)

A61K 47/18 (2007.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61P 27/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.10.2017** **PCT/IB2017/056400**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.04.2018** **WO18073720**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2017** **E 17811373 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2024** **EP 3525758**

54 Título: **Formulación oftálmica que comprende citicolina transportada por liposomas para el tratamiento del glaucoma**

30 Prioridad:

17.10.2016 IT 201600103956

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

18.11.2024

73 Titular/es:

OMIKRON ITALIA S.R.L. (100.0%)
Viale Bruno Buozzi 5
00197 Rome, IT

72 Inventor/es:

VIRNO, CRISTIANO y
MALIZIA, MARCO

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 987 910 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 oftálmica que comprende citicolina transportada por liposomas para el tratamiento del glaucoma

- 5 La presente invención se refiere a una formulación oftálmica que comprende liposomas que contienen citicolina o sus sales y su uso en el tratamiento del glaucoma. Los inventores han descubierto que los liposomas resultan extremadamente eficaces para transportar citicolina al segmento posterior del ojo (cámara vítrea) y para llegar a la retina y a la cabeza del nervio óptico.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

El glaucoma es una patología neurodegenerativa crónica caracterizada por la pérdida progresiva de células ganglionares de la retina y cambios estructurales en la cabeza del nervio óptico. Representa la segunda causa de ceguera en todo el mundo y, por tanto, es un problema muy extendido. La forma más común, el glaucoma primario de ángulo abierto, tiene como principal factor de riesgo el aumento de la presión intraocular (PIO), por lo que la primera aproximación terapéutica está representada por fármacos tópicos hipotonizantes. Sin embargo, dado que más de un tercio de los pacientes, a pesar de estar bajo un buen control de la presión, retrasan pero no detienen la progresión del daño visual, se considera que están implicados otros mecanismos no dependientes de la presión (Grieb P et al. J Neurosci Res 2002). En concreto, tras una agresión primaria de naturaleza hiperbárica, se desencadena la apoptosis neuronal, lo que interfiere con el suministro normal de sangre a nivel del distrito capilar de esta estructura, y con el transporte axonal regular, tanto anterógrado como retrógrado, de metabolitos y neurotrofinas indispensables para la función ganglionar, la supervivencia celular se ve comprometida. La apoptosis es responsable del daño secundario relacionado con los mecanismos de excitotoxicidad locales debido a la hiperestimulación de los receptores NMDA por el glutamato liberado de las células apoptóticas. De hecho, el glutamato, cuando está presente en concentraciones excesivas en el espacio extracelular, hiperestimula los receptores NMDA en la superficie de las neuronas circundantes, lo que provoca la apertura de los canales de Ca^{++} . La hiperafluencia de los iones Ca^{++} en la célula representa el desencadenante de la cascada bioquímica que conducirá a la apoptosis de la propia neurona, configurando un mecanismo capaz de autoalimentarse también en ausencia de agresión primaria. Otra etapa clave en el mecanismo de daño celular en el curso de la apoptosis está representada por la hiperactivación de la fosfolipasa A2, una enzima capaz de desestabilizar y disgregar la membrana celular mediante el catabolismo de su constituyente principal, el fosfolípido fosfatidilcolina (Burgoyne FC et al. Prog Retin Eye Res 2005;24). Evidentemente, la hipotonización ocular tiene escasos efectos sobre la agresión secundaria que representa una verdadera cascada de muerte responsable de la progresión del daño.

En el sector de la neuroprotección, se presta especial interés a la molécula de citicolina (citidina-5'-difosfocolina), por su mecanismo de acción y la evidencia científica que va desde estudios experimentales hasta ensayos clínicos en pacientes glaucomatosos. La citicolina (citidina-5'-difosfocolina) es un precursor natural de la fosfatidilcolina, componente principal de las membranas neuronales y mitocondriales. Por vía oral, se absorbe rápidamente y menos del 1 % se excreta en las heces. El pico plasmático se alcanza 1 hora después de la ingestión, seguido de un pico mayor 24 h después. Se metaboliza en la pared intestinal y en el hígado. La colina y la citidina derivadas de la hidrólisis de la misma molécula son absorbidas por la circulación sistémica y atraviesan por separado la barrera hematoencefálica (BEE, por sus siglas en inglés) para su resíntesis en citicolina (citidina-5'-difosfocolina) a nivel cerebral. La eliminación se produce principalmente por vía respiratoria y excreción urinaria, reflejando los dos picos plasmáticos, es decir, una primera eliminación rápida, seguida de una más lenta (Citicoline, monograph Altern Med Rev 2008).

A nivel cerebral, la citicolina actúa principalmente como sustrato para la formación de fosfatidilcolina y como inhibidor de la fosfolipasa A2, por lo que tiene una acción directa sobre el daño de la membrana de la neurona aún viable. Además, esta molécula presenta una acción neuromoduladora principalmente a nivel del sistema dopaminérgico, lo que justifica el uso de la citicolina en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, así como del glaucoma, siendo la dopamina uno de los principales neurotransmisores implicados en la transmisión de la señal visual tanto a nivel retiniano y posretiniano.

Numerosos estudios en la literatura demuestran el efecto positivo de la citicolina en pacientes glaucomatosos, tanto en el campo visual, mediante campimetría computarizada (Pecori Giraldi et al 1989) como en toda la vía visual, mediante el uso de electroretinograma de patrón (PERG) y potenciales evocados visuales (PEV) (Parisi et al 1999, 2005, 2008, Rejadak et al 2003 y WO 2011/101802 A1).

En particular, los estudios de Parisi y colaboradores confirman los mismos resultados en pacientes glaucomatosos bajo terapia hipotonizante y con citicolina administrada tanto por vía intramuscular (1000 mg/día) como por vía oral (1600 mg/día), con respecto a pacientes glaucomatosos bajo terapia hipotonizante únicamente, y la necesidad de repetir cíclicamente el tratamiento para mantener los efectos positivos sobre la función visual (tiempo total de estudio, 8 años).

En 2009, Chan et al. publicó los resultados del uso *in vivo* de la espectroscopia de resonancia magnética (espectroscopia de resonancia magnética de protones ¹H MRS) en modelos experimentales de glaucoma en ratas, demostrando que el glaucoma también se caracteriza por la alteración del metabolismo de la colina a nivel de la corteza visual, reflejando el compromiso de la integridad estructural de las membranas neuronales.

La administración intramuscular de citicolina para el tratamiento del glaucoma es claramente muy incómoda para el paciente y no permite el uso de la sustancia durante los largos períodos necesarios para obtener los resultados positivos observados en los estudios. La administración intramuscular, además de la incomodidad que supone no realizarla uno mismo y la que conlleva la necesidad de que el paciente cuente con una persona capaz de realizar inyecciones intramusculares, necesidad que, sobre todo en pacientes de edad avanzada, puede ser difícil de satisfacer, puede exponer al riesgo de complicaciones infecciosas después de la terapia crónica.

La administración oral de citicolina para el tratamiento del glaucoma, si bien representa un paso adelante respecto a la terapia intramuscular, está condicionada por las dificultades debidas a la imposibilidad de su uso en sujetos con patologías gástricas o intestinales, así como por la baja concentración de principio activo que llega a alcanzar, a nivel de la cabeza del nervio óptico, la estructura nerviosa más dañada por la patología del glaucoma debido a la metabolización en el hígado.

Oshitari et al. (Neuroreport 2002) evaluó el efecto de regeneración de neuritas *in vitro* obtenido al agregar citicolina a células ganglionares de la retina cultivadas (CGR) obtenidas de retinas de ratón explantadas.

La Patente EP2538918 presentada por los mismos inventores describe como realización preferente de una formulación oftálmica que comprende citicolina, ácido hialurónico y cloruro de benzalconio para uso tópico en el tratamiento del glaucoma. El ácido hialurónico aumenta el tiempo de residencia a nivel de la superficie ocular anátomo-funcional/unidad de película lagrimal, permitiendo aumentar en todas partes el tiempo de contacto fármaco/ojo; el cloruro de benzalconio (BAK) favorece aún más el paso transcorneal del fármaco gracias al debilitamiento temporal y reversible de la barrera del epitelio corneal: la estimulación de las uniones corneales permite que la citicolina pase a la cámara vítrea y se propague a través del humor vítreo y las vías uveoesclerales, hasta las células ganglionares de la retina y la cabeza del nervio óptico. El efecto final es entonces maximizar el transporte del principio activo hacia el objetivo terapéutico. Sin embargo, se cree que BAK podría provocar con el tiempo, en caso de uso crónico, una ligera citotoxicidad a nivel del epitelio corneal, sobre todo en determinados tipos de pacientes (por ejemplo, pacientes con sequedad ocular severa) y en particular, después de un uso continuo, como ocurre en caso de patologías crónicas como el glaucoma.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

Los estudios realizados por los presentes inventores en un modelo experimental *in vivo* demostraron sorprendentemente que la administración sobre la superficie ocular de una formulación oftálmica que comprende citicolina incorporada en los liposomas es ideal para asegurar el paso del principio activo en el segmento posterior del ojo (cámara vítrea) y para llegar a la retina y a la cabeza del nervio óptico. Los inventores han descubierto que el uso en formulación oftálmica de citicolina incorporada en liposomas permite transportar el principio activo con una alta eficiencia incluso en ausencia de BAK y agentes espesantes como el ácido hialurónico. La presente invención tiene entonces la ventaja de no tener que utilizar BAK en la formulación para llevar eficazmente el principio activo hacia su objetivo.

Además, los resultados experimentales obtenidos por los inventores y descritos en la sección experimental de la presente descripción han resaltado sorprendentemente que:

- la solución de citicolina convenientemente transportada con liposomas consigue atravesar la barrera corneal y alcanzar el segmento posterior del ojo (cámara vítrea);
- la formulación de citicolina en liposomas es capaz de penetrar el humor vítreo en alta concentración. En estado de la técnica anterior era necesario utilizar tanto un agente espesante como el ácido hialurónico en combinación con un potenciador de la penetración como BAK;
- la cantidad de citicolina detectada en el flujo sanguíneo es extremadamente reducida (y es muy complejo determinar su concentración), por lo que es posible excluir un efecto sistémico de la citicolina;
- la formulación de citicolina en liposomas resultó ser particularmente estable en el tiempo. Las ventajas, las características y los modos de uso de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de algunas realizaciones de la misma, dadas a modo de ejemplo y no con fines limitativos.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1A. Perfil de elución por HPLC obtenido analizando una muestra estándar de citicolina y una muestra estándar de citicolina incorporada en liposomas.

Figura 1B. Espectro de absorción obtenido analizando una muestra estándar de citicolina incorporada en

liposomas.

Figura 2. Perfil de elución por HPLC de la figura 2 muestra que la citicolina está presente en altas concentraciones sólo en el humor vítreo de los ojos de los animales tratados tópicamente, mientras que el humor vítreo de los ojos no tratados no muestra ninguna traza de citicolina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una formulación oftálmica que comprende liposomas que contienen citicolina o sales de la misma y sin cloruro de benzalconio (BAK), para uso en el tratamiento del glaucoma mediante administración tópica oftálmica. La composición de la presente invención podría usarse en el tratamiento de todas las diferentes formas de glaucoma tales como, por ejemplo, glaucoma congénito, glaucoma de ángulo abierto, glaucoma de ángulo cerrado y glaucoma sin hipertensión.

En la presente descripción, bajo el término liposomas se entienden vesículas fosfolípicas con tamaños nanométricos, preferentemente dichos liposomas constan de una doble capa fosfolípica. En las composiciones según la presente descripción, la citicolina se incorpora dentro de los liposomas para que se transporte adecuadamente. Según una realización, los tamaños de los liposomas estarán entre 25 nm y 1 µm, preferentemente entre 25 nm y 200 nm, aún más preferentemente entre 100 y 150 nm. Según una realización preferente, tales liposomas consistirán en una doble capa fosfolípica de fosfolípidos hidrogenados.

Por supuesto, dichas composiciones podrían comprender además uno o más vehículos, diluyentes y/o excipientes adecuados para preparar composiciones oftálmicas. Todos los vehículos, diluyentes o excipientes tolerados por el ojo son adecuados para preparar composiciones oftálmicas. Las composiciones podrían incluir además ácido hialurónico y/o estearilamina. El ácido hialurónico, en particular tiene un peso molecular elevado, gracias a sus propiedades mucoadhesivas y mucomiméticas, lo que permite aumentar el tiempo de residencia a nivel de la superficie ocular anatómico-funcional/unidad de película lagrimal y, por tanto, aumentar el tiempo de contacto fármaco/ojo. La estearilamina es una molécula capaz de mejorar aún más la adhesión ocular de la solución y que luego podría favorecer una mayor absorción de citicolina.

Según la presente invención, la citicolina (citidina-5'-difosfocolina) utilizada en las composiciones o sus sales, como por ejemplo la sal monosódica, podría adquirirse o prepararse según los protocolos descritos en el estado de la técnica conocidos, como por ejemplo el protocolo de producción de Kyowa (Drug Master File citicoline Kyowa Haakko Kogyo Co., Ltd). La concentración de citicolina en dichas composiciones está comprendida preferentemente en el intervalo entre 5 y 30 mg por gramo o ml de composición. Según la presente invención, la citicolina se usa preferentemente en una concentración por unidad de dosis entre aproximadamente 0,0035 y aproximadamente 1,5 mg/día. Por "dosis unitaria" se entiende la dosis que se administra cada vez al paciente, tanto dividida en varias administraciones durante el día, como diariamente y a intervalos de días. Las composiciones aquí descritas podrían comprender, además de citicolina, otros principios activos para uso tópico en el tratamiento del glaucoma como, por ejemplo, fármacos antihipertensivos tópicos. Dichas composiciones para uso tópico podrían estar en cualquier forma que el experto en la materia considere adecuada para aplicarse directamente sobre la superficie ocular, como por ejemplo solución, pomada, suspensión, colirio, gel, crema, espuma, aerosol, pomada. Los colirios pueden comprender sales tales como fosfato sódico monobásico monohidratado, fosfato sódico dibásico dodecahidratado, cloruro sódico o una combinación de los mismos, preferentemente puede ser una solución fisiológica con NaCl al 0,9 %, a un pH fisiológico (pH 7,0-7,4) y una osmolaridad fisiológica (280-300 mOsm/kg). En una realización preferente, el colirio comprende citicolina entre 0,5 % y 3 % (% p/p), preferentemente 2 %. La presente descripción incluso proporciona un método para el tratamiento del glaucoma que comprende la administración de cantidades eficaces de una composición como se describe en el presente documento a pacientes que lo requieran. En el método de tratamiento, la dosificación exacta y la frecuencia de administración de las composiciones dependerán de la gravedad particular de la afección a tratar, de la edad, el peso y las condiciones físicas generales del paciente particular, como es bien conocido por los expertos en la materia. A continuación se mencionan algunas dosis eficaces que pueden administrarse: podrían administrarse en una dosis unitaria comprendida entre aproximadamente 0,0035 y aproximadamente 1,5 mg/día, opcionalmente en combinación con uno o más compuestos para el tratamiento del glaucoma como, por ejemplo, fármacos antihipertensivos tópicos, la dosis unitaria de los mismos podría ser aproximadamente 100 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 30 % o menos con respecto a las dosis unitarias comúnmente utilizadas en terapia contra el glaucoma.

La presente invención también se refiere a un método para preparar las composiciones oftálmicas aquí descritas que comprende las siguientes etapas de:

- a) mezclar los lípidos solubilizados con citicolina;
- b) concentrar la mezcla por evaporación;
- c) rehidratar la mezcla concentrada en la etapa b) en una solución acuosa;
- d) someter a extrusión a alta presión la mezcla de la etapa b).

El método podría incluir una etapa adicional de esterilización mediante filtración a 0,2 micras.

- 5 La invención se describirá en detalle a continuación en los siguientes ejemplos que tienen un propósito puramente ilustrativo sin limitar el alcance de la protección otorgada.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Fórmula A

10

Liposomas hidrogenados/2,0 % citicolina/0,075 % ácido hialurónico

| Porcentaje de composición | | |
|---|-------|---|
| Materias primas | %p/p | |
| Sal monosódica de citicolina | 2.000 | Principio activo |
| Fosfolípidos 90H | 2.000 | Fosfolípidos hidrogenados muy estables a la oxidación, color blanco |
| Fosfato de sodio bibásico dodecahidrato | 0,685 | Sistema tampón |
| Fosfato de sodio monobásico dihidrato | 0,225 | Sistema tampón |
| Cloruro de sodio | 0,246 | Modulador de isotonía |
| Sal de sodio del ácido hialurónico | 0,075 | Tiqueador mucoadhesivo |
| Agua según sea necesaria | 100 | |

| Propiedades de la formulación | | |
|-------------------------------------|-----------------------|------------|
| | Límites de aceptación | Resultados |
| pH | 7-7,4 | 7,19 |
| Osmolaridad (mOsmol/kg) | 280-300 | 289 |
| Diámetro promedio (µm) | <0,2 | <0,2 |
| Estéril por filtración a 0,2 micras | Sí conforme | |

15

Ejemplo 2. Fórmula B

Liposomas hidrogenados con estearilamina al 2,0 %/citicolina/ácido hialurónico al 0,075 %

| Porcentaje de composición | | |
|---|-------|---|
| Materias primas | %p/p | |
| Sal monosódica de citicolina | 2.000 | Principio activo |
| Fosfolípidos 90H | 2.000 | Fosfolípidos hidrogenados muy estables a la oxidación, color blanco |
| Estearilamina | 0,005 | Modulador de carga positiva |
| Fosfato de sodio bibásico dodecahidrato | 0,685 | Sistema tampón |
| Fosfato de sodio monobásico dihidrato | 0,225 | Sistema tampón |
| Cloruro de sodio | 0,246 | Modulador de isotonía |
| Sal de sodio del ácido hialurónico | 0,075 | Tiqueador mucoadhesivo |
| Agua según sea necesaria | 100 | |

| Propiedades de la formulación | | |
|-------------------------------------|-----------------------|------------|
| | Límites de aceptación | Resultados |
| pH | 7-7,4 | 7,19 |
| Osmolaridad (mOsmol/kg) | 280-300 | 289 |
| Diámetro promedio (µm) | <0,2 | <0,2 |
| Estéril por filtración a 0,2 micras | Sí conforme | |

EJEMPLO 3 PREPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUE COMPRENDE CITICOLINA INCORPORADA EN LOS LIPOSOMAS

- 5 En un matraz de vidrio se solubilizan los lípidos (fosfolípidos 90H) y el principio activo pulverizado, es decir, la citicolina, con una mezcla de disolventes orgánicos. Posteriormente, la solución se evapora al vacío mediante un rotavapor, hasta la formación de una película, que una vez formada se deja nuevamente al vacío para eliminar los últimos restos de disolvente. Posteriormente se rehidrata la película lipídica, con una solución adecuada (agua, tampón, etc.). A continuación se hace agitar la mezcla hasta que adquiera un aspecto
- 10 homogéneo, sin precipitados. Se obtiene entonces la formación de Vesículas Multilamelares (MLV). La mezcla de fosfolípidos y principio activo luego de ser hidratada y adecuadamente mezclada es sometida a extrusión a alta presión, esto provoca la formación de liposomas y la disminución de su tamaño. El número de ciclos de extrusión modifica los tamaños de los liposomas que pueden alcanzar entonces un tamaño igual o inferior a 200 nm, haciendo los liposomas esterilizables por filtración a 0,2 micras.

Datos experimentales

- 15 Para el grupo experimental se utilizaron 12 animales para un adecuado manejo estadístico de los resultados (promedio, desviación estándar y significancia).

- 20 El número de animales utilizado, tras una evaluación estadística, representa el número mínimo del cual es posible obtener datos significativos. En el estudio se utilizaron ratones machos de la cepa Wistar-Kyoto según experimentos previos realizados por el grupo de investigación.

- 25 Los animales fueron mantenidos y manipulados en una estructura adecuada para mantener a los animales en condiciones óptimas (temperatura, humedad, ventilación, condiciones higiénicas). En el estudio se utilizó una formulación en solución para uso oftálmico constituida por liposomas de 200 nm que incluían sal sódica de citicolina al 2 %. En particular, la composición del preparado es la siguiente (en g/100 g de solución):

- 30 Sal monosódica de citicolina 2,0
Fosfolípidos 90 H 2,0
Fosfato de sodio bibásico bihidrato 0,685
Fosfato de sodio monobásico dihidrato 0,225
Cloruro de sodio 0,246

- 35 El experimento se llevó a cabo en 12 ratones macho (el peso de cada ratón era de aproximadamente 250 g), divididos de la siguiente manera:

- 40 a) 4 ratones fueron tratados con liposomas en ambos ojos (ratones 1 - 2 - 3 - 4);
b) 4 ratones fueron tratados con liposomas únicamente en el ojo derecho (5 - 6 - 7 - 8);
c) 4 ratones control (ratón 9 - 10 - 11 - 12).

- 45 El tratamiento consiste en la instilación de 2 g de solución de liposomas dos veces al día durante tres días. Al cuarto día, después del sacrificio del animal, se recogerán sus ojos, se enjuagarán con solución fisiológica y se mantendrán en hielo:

- a. Ratones 1 - 2 - 3 - 4 ambos ojos enteros en solución de PBS.
b. Ratones 5 - 6 - 7 - 8 Ojo Derecho completo (RE) tratados en solución de PBS separados del Ojo Izquierdo (Le) todavía sumergidos en PBS.
50 c. Ratones 9 - 10 - 11 - 12 ambos ojos enteros en solución de PBS.

Además a cada animal se le tomó una muestra de sangre endocárdica después de anestesia total antes y después del tratamiento, justo antes de ser sacrificado, utilizando un tubo de ensayo con EDTA; sobre dicha

muestra, a cada animal se le determinó el hemograma y la presencia de citicolina.

En laboratorio con un sistema de succión al vacío conectado a una jeringa de 100 µL se tomó el humor vítreo diluido con 50 µL de una solución 0,6 M de ácido perclórico para eliminar la posible presencia de proteínas y se llevó al volumen final de 150 µL. Posteriormente, la muestra se neutralizó con carbonato de potasio y se trató con 150 µL de cloroformo para eliminar posibles trazas de sustancias lipídicas.

Después de la extracción y posterior centrifugación a 13.000 rpm durante 5 minutos a 5 °C, el sobrenadante se tomó y se inyectó en un sistema HPLC equipado con un detector ultravioleta Diode Array y una columna cromatográfica C18 - Kromasil 250x4,6 mm con partículas de 5 µm. Por supuesto, todas las muestras, incluso las de control, fueron sometidas al mismo tipo de tratamiento antes de ser analizadas en HPLC.

En cuanto a la sangre, tras realizar el hemograma se desproteinizaron 500 µL de suspensión con ácido perclórico, se neutralizaron y se extrajeron con cloroformo y, tras centrifugación a 13.000 rpm durante 5 minutos, se analizaron en HPLC.

Resultados

Los ratones fueron tratados durante 3 días por vía tópica con la formulación de liposomas. Para determinar un estándar de referencia, se determinaron mediante HPLC las características de la suspensión de citicolina al 2 % (concentración de peso/volumen) antes del tratamiento; los resultados se muestran en la Figura 1 tanto en el perfil de elución de HPLC (Figura 1A) como en el espectro de absorción (Figura 1B). A partir de estos elementos se determina la cantidad de citicolina presente tanto en el humor vítreo como en la sangre.

Al finalizar el tratamiento ninguno de los animales presentó anomalías de comportamiento ni lesiones sistémicas cutáneas u oculares.

Los resultados obtenidos mostraron que:

1) La citicolina está presente, en una concentración media (peso/volumen) de 0,065 g ($\pm 0,01$) % (correspondiente al 13 % de la cantidad aplicada tópicamente), sólo en el humor vítreo de los ojos tratados tópicamente, mientras que el humor vítreo de los ojos no tratados no muestra ningún rastro de citicolina (Figura 2).

2) La cantidad de citicolina existente en la sangre es muy inferior a la existente en el humor vítreo y es difícil determinar la concentración de la misma (peso/volumen) (resultando unos 0,01 g ($\pm 0,002$) %), ya que en algunos casos dicha la cantidad está por debajo de la sensibilidad de detección del sistema.

En conclusión, el colirio en la formulación liposómica resulta capaz de penetrar en mayor medida en el humor vítreo con respecto a lo observado si se administra en solución (Parisi et al., 2015; Roberti et al., 2015) (alcanzando una concentración (peso/volumen) de aproximadamente 0,07 g ($\pm 0,01$) %) (a nivel ocular es una concentración alta).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende liposomas, para uso en el tratamiento del glaucoma mediante administración tópica oftálmica, **caracterizada por que** dichos liposomas incluyen citicolina o sales de la misma, y **por que** dicha composición no contiene cloruro de benzalconio (BAK).
- 10 2. Composición para su uso, según la reivindicación 1, en la que dichos liposomas comprenden o consisten en una doble capa de fosfolípidos y un núcleo acuoso y/o en la que dichos liposomas están compuestos de fosfolípidos hidrogenados.
- 15 3. Composición para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que además comprende ácido hialurónico y/o estearilamina.
4. Composición para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha citicolina tiene una concentración comprendida entre 0,5 y 3 % en peso, en particular 2 %.
- 20 5. Composición para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en una forma seleccionada entre solución, pomada, suspensión, colirio, gel, crema, espuma, spray, pomada.
6. Composición para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que además comprende uno o más principios activos para uso tópico en el tratamiento del glaucoma.
- 25 7. Composición para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dichos uno o más principios activos para uso tópico en el tratamiento del glaucoma son fármacos antihipertensivos tópicos.

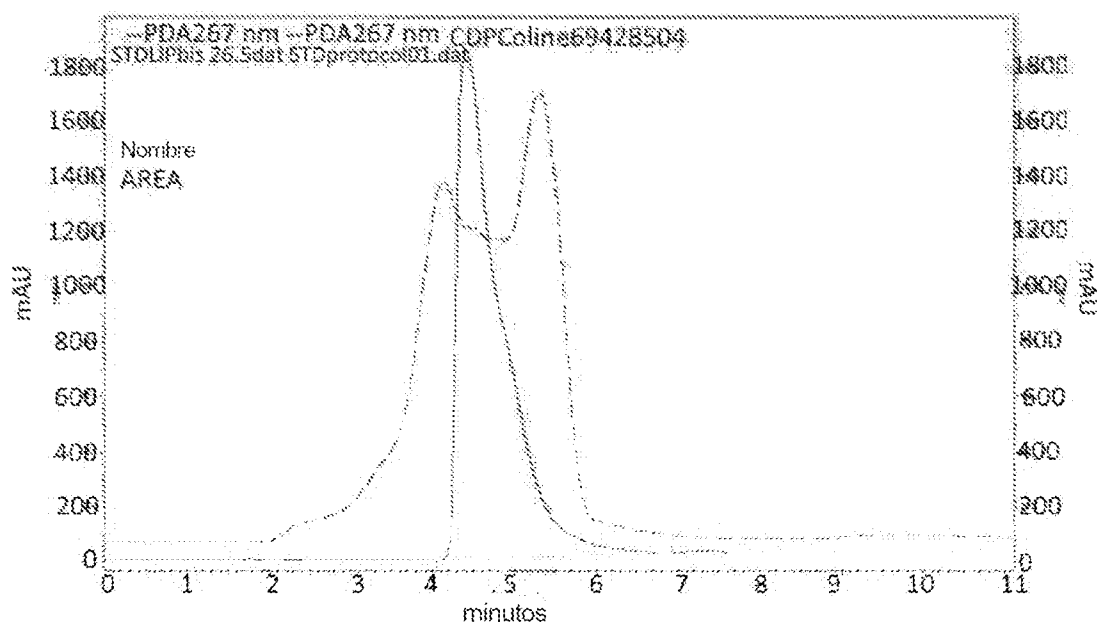


FIG.1A

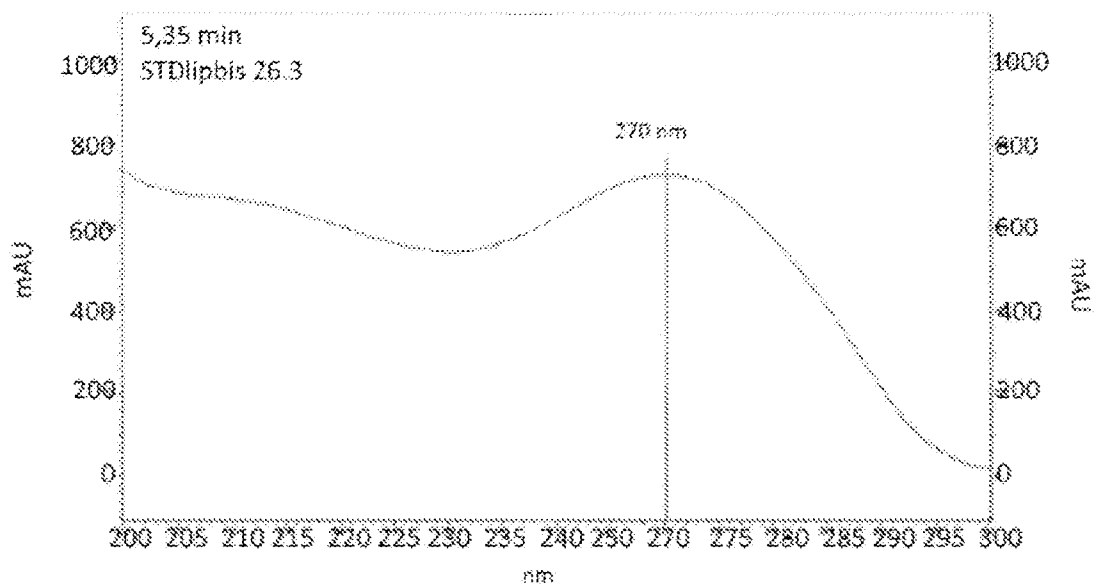


FIG.1B

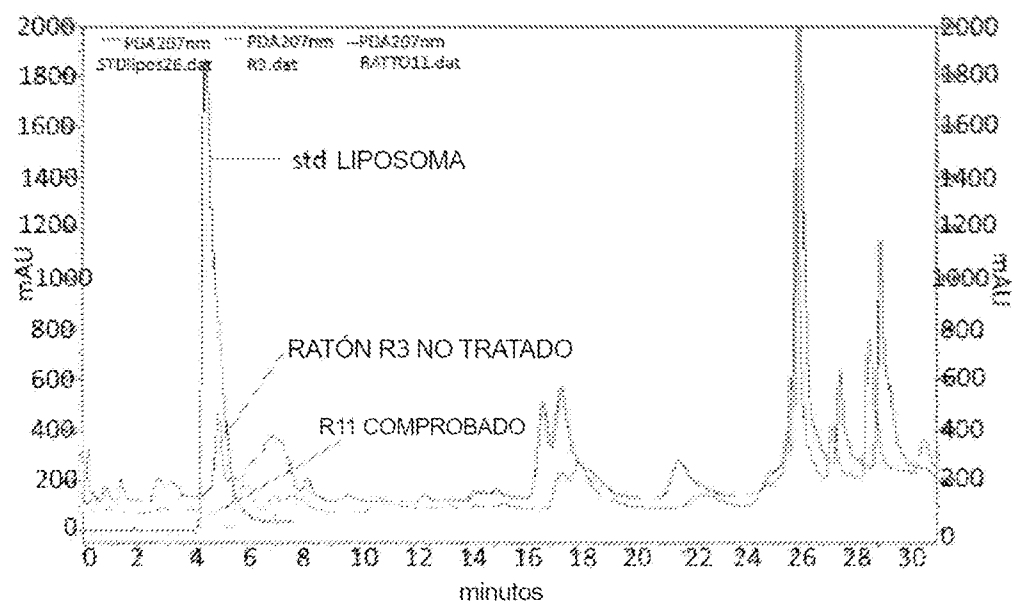


FIG.2

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 2011101802 A1
- EP 2538918 A

Literatura no patente citada en la descripción

- GRIEB P et al. *J Neurosci Res*, 2002
- CITICOLINE. *Altern Med Rev*, 2008
- BURGOYNE FC et al. *Prog Retin Eye Res*, 2005, vol. 24
- OSHITARI et al. *Neuroreport*, 2002