

FORMACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE CICLOSPORINA A/CICLODEXTRINA

ANTECEDENTES

[0001]La presente invención se refiere a un compuesto de gotas acuosas para los ojos en donde el ingrediente activo es la ciclosporina A.

[0002]La administración tópica de gotas para los ojos es el medio preferido de administración de medicamentos en el ojo debido a la conveniencia y seguridad de las gotas para los ojos en comparación con otras rutas de administración de medicamentos oftálmicos tales como inyecciones intravítreas e implantes (Le Boursais, C., Acar, L., Zia, H., Sado, P.A., Needham, T., Leverage, R., 1998. Sistemas para la administración de medicamentos oftálmicos – Avances recientes. Progresos en la investigación de la Retina y el Ojo 17, 33-58). Los medicamentos son transportados principalmente por medio de la difusión pasiva desde la superficie del ojo hacia el ojo y los tejidos circundantes donde, de conformidad con la ley de Fick, el medicamento es introducido en el ojo por medio del gradiente de moléculas de medicamento disueltas. La difusión pasiva de medicamentos en el ojo se ve obstruida por tres obstáculos importantes (Gan, L., Wang, J., Jiang, M., Bartlett, H., Ouyang, D., Eperjesi, F., Liu, J., Gan, Y., 2013. Avances recientes en la administración tópica de medicamentos oftálmicos con nanoportadores a base de lípidos. Drug Discov. Today 18, 290-297; Loftsson, T., Sigurdsson, H.H., Konradsdottir, F., Gísladottir, S., Jansook, P., Stenfansson, E., 2008. Administración de medicamentos tópicos al segmento posterior del ojo: consideraciones anatómicas y fisiológicas. Pharmazie 63, 171-179; Urtti, A., 2006. Desafíos y obstáculos de la farmacocinética ocular y la administración de medicamentos. Adv. Drug Del. Rev. 58, 1131-1135).

[0003]Primero es la solubilidad acuosa del medicamento. Únicamente las moléculas disueltas del medicamento son capaces de difundirse en el ojo y, por lo

tanto, los medicamentos deben poseer la suficiente solubilidad en el fluido lagrimal acuoso para difundirse en el ojo. Aumentar la solubilidad de los medicamentos poco solubles, por ejemplo, a través de la formación de complejos de ciclodextrina, incrementarán su gradiente de concentración y su consecuente difusión pasiva en el ojo (Loftsson, T., Järvinen, T., 1999. Ciclodextrinas en la administración de medicamentos oftálmicos. *Revisiones Avanzadas de la Administración de Medicamentos* 36, 59-79).

[0004] El segundo obstáculo es la alta tasa de eliminación del fluido lagrimal y la consecuente disminución en la concentración de las moléculas disueltas del medicamento. Luego de la instilación de una gota oftálmica (25 – 50 μ l) en el área pre-corneal del ojo, la mayor parte de la solución del medicamento es drenada rápidamente de la superficie del ojo y el volumen de lágrima vuelve a su volumen residente normal de alrededor de 7 μ l. Después de esto, el volumen de lágrima permanece constante, pero la concentración de medicamento disminuye debido a la dilución por la tasa de eliminación de la lágrima y absorción corneal y no corneal. El valor de la constante de velocidad de primer orden para el drenaje de gotas oculares desde el área de la superficie es por lo general de alrededor de 1.5 min^{-1} en humanos. La secreción lagrimal normal es de alrededor 1.2 μ l/min en humanos y la vida media pre-corneal de medicamentos aplicados de forma tópica está entre 1 y 3 minutos (Sugrue, M.F., 1989. La farmacología de los medicamentos anti-glaucoma. *Pharmacology & Therapeutics* 43, 91 -138). La vida media pre-corneal de los medicamentos aplicados de forma tópica necesita ser incrementada por ejemplo mediante la formación de pequeñas micro-partículas de medicamento/ciclodextrina con el fin de ampliar su biodisponibilidad (Johannesson, G., Moya-Ortega, M.D., Asgrimsdottir, G.M., Lund, S.H., Thorsteinsdottir, M., Loftsson, T., Stefansson, E., 2014. Cinética de las gotas para los ojos de suspensión de nanopartículas de γ -ciclodextrina en el fluido lagrimal. *Acta Ophthalmologica* 92,

550-556; Loftsson, T., Jansook, P., Stefansson, E., 2012. Administración de medicamentos tópicos en el ojo: dorzolamida. *Acta Opthalmologica* 90, 603 – 608).

[0005]El tercer obstáculo es la lenta permeación del medicamento a través de la barrera de membrana, es decir, la córnea y/o la conjuntiva/esclerótica. Las moléculas del medicamento tienen que dividirse desde el exterior acuoso en la membrana antes de que éstas puedan permear pasivamente la barrera de membrana. El resultado es que por lo general sólo un pequeño porcentaje de la dosis del medicamento aplicado será suministrado a los tejidos oculares. La mayor parte (50 – 100%) de la dosis administrada será absorbida desde la cavidad nasal hacia la circulación sistémica del medicamento lo cual puede causar varios efectos colaterales.

[0006]El síndrome del ojo seco es un desorden ocular común causado por una producción de lágrimas disminuida que ocasiona incomodidad y trastorno visual. El síndrome del ojo seco tiene una etiología de múltiples factores que involucra la inestabilidad de la película lagrimal, osmolalidad incrementada de la película lagrimal e inflamación de la superficie ocular, con daño potencial de la superficie ocular. Pocas terapias se encuentran disponibles para esta enfermedad.

[0007]Las ciclosporinas son un conjunto de péptidos aislados de los hongos de los cuales la ciclosporina A es la más conocida. Existen muchas otras ciclosporinas naturales y semi – sintetizadas incluyendo la ciclosporina B, C, D, E, F, G y H (Lawen, A., 2015. Biosíntesis de las ciclosporinas y otros inhibidores naturales de peptidil prolil cis / trans isomerasa. *Biochimica et Biophysica Acta* 1850, 2111-2120; Peel, M., Sctiber, A., 2015. Semi-síntesis de las ciclosporinas, *Biochimica et Biophysica Acta* 1850, 2121-2144).

[0008]La ciclosporina A es un medicamento polipéptido cíclico obtenido del caldo de fermentación de dos hongos, *Trichoderma polysporum* y *Cylindrocarpon lucidum* (Laupacis, A., Keown, P.A., Ulan, R.A., McKenzie, N., Stiller, C.R., 1982. Ciclosporina A: un poderoso inmunosupresor. Canadian Medical Association Journal 126, 1041-1046). Éste tiene el peso molecular de 1202.6 Da, solubilidad acuosa de 0.008 mg/ml a temperatura ambiente y $\text{LogP}_{\text{octanol/agua}} = 2.92$ a 21° C (El Tayar, N., Mark, A.E., Vallat, P., Brunne, R.M., Testa, B., Gunsteren, W.F.v., 1993. Conformación dependiente de solvente y capacidad de enlace de hidrógeno de la ciclosporina A: evidencia a partir de los coeficientes de partición y simulaciones dinámicas moleculares. J. Med. Chem. 36, 3753-3764; Loftsson, T., Hreinsdottir, D., 2006. Determinación de la solubilidad acuosa por medio del calentamiento y el equilibrio: Una nota técnica. Aaps Pharmscitech 7, artículo número 4).

[0009]La ciclosporina A tiene una variedad de actividades biológicas, que incluyen propiedades inmunosupresoras, antiinflamatorias y antifungales, las demás ciclosporinas tienen propiedades similares. En oftalmología, la ciclosporina A ha sido principalmente útil para los pacientes con diversos desordenes inflamatorios de la superficie ocular, incluyendo el ojo seco, pero ésta también ha sido utilizada sistemáticamente para tratar enfermedades inflamatorias intraoculares y enfermedades autoinmunes, tales como la uveítis. En 2003, las gotas para los ojos a base de aceite de ciclosporina A al 0.05% (p/v) (Restasis®; Alcon, Texas) llegaron a estar comercialmente disponibles para el tratamiento tópico del síndrome del ojo seco (Uttine, C.A., Stern, M., Akpek, E.K., 2010. Análisis Clínico: Uso Oftálmico Tópico de la Ciclosporina A. Inmunología Ocular & Inflamación 18, 352-361). Sin embargo, utilizar aceites y surfactantes para administrar la ciclosporina A de manera tópica provee una baja biodisponibilidad del medicamento y puede causar visión borrosa, sensación de ardor, picazón e irritación de la conjuntiva. Estos efectos

colaterales pueden evitarse suministrando la ciclosporina A en forma de gotas acuosas para los ojos.

[0010]La solubilidad acuosa de la ciclosporina A puede incrementarse a través de la formación de complejos de ciclodextrina y el tiempo de contacto de la Ciclosporina A con la superficie del ojo puede aumentarse mediante la formación de micro- y nano- partículas. Se ha reportado que la α -Ciclodextrina, α -ciclodextrina metilada y β -ciclodextrina metilada mejoran la solubilidad acuosa de la ciclosporina A (Miyake, K., Arima, H., Irie, T., Hirayama, F., Uekama, K., 1999. La absorción mejorada de la ciclosporina A por medio de la formación de complejos con dimetil-beta-ciclodextrina con conductos biliares canulados y no canulados en ratas. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 22, 66-72).

[0011]Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos que contienen monómeros de glucopiranososa de 6 (α -ciclodextrina), 7 (β -ciclodextrina) y 8 (γ -ciclodextrina) enlazados vía enlaces glucósidos-4, α -1. α -Ciclodextrina, β -ciclodextrina y γ -ciclodextrina son productos naturales formados por la degradación microbiana del almidón. La superficie exterior de las moléculas de ciclodextrina en forma de donut es hidrofílica, portando numerosos grupos hydroxil, pero su cavidad central es de alguna forma lipofílica (Kurkov, S.V., Loftsson, T., 2013. Ciclodextrinas. *Int J Pharm* 453, 167-180; Loftsson, T., Brewster, M.E., 1996. Aplicaciones farmacéuticas de las ciclodextrinas. 1. Solubilización y estabilización de los medicamentos. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85, 1017-1025). Adicional a las tres ciclodextrinas naturales, numerosos derivados solubles de la ciclodextrina han sido sintetizados y probados como transportadores de medicamentos, incluyendo polímeros de ciclodextrina (Stella, V.J., He, Q., 2008. Ciclodextrinas. *Tox. Pathol.* 36, 40-42).

[0012]En soluciones acuosas, las ciclodextrinas están en capacidad de formar complejos de inclusión con muchos medicamentos llevando una molécula del medicamento o más frecuentemente algún resto lipofílico de la molécula hacia la cavidad central. Esta propiedad ha sido utilizada para la formulación de medicamentos y para fines de suministro del medicamento. Se ha revisado la formación de complejos de inclusión de medicamento/ciclodextrina, su efecto en las propiedades físico-químicas de los medicamentos, la capacidad de las drogas de permear las biomembranas y el uso de las ciclodextrinas en los productos farmacéuticos (Loftsson, T., Brewster, M.E. 2010. Aplicaciones farmacéuticas de las ciclodextrinas: ciencia básica y desarrollo del producto. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 62, 1607-1621; Loftsson, T., Brewster, M.E., 2011. Aplicaciones farmacéuticas de las ciclodextrinas: efectos en la permeación del medicamento a través de membranas biológicas” *J. Pharm. Pharmacol.* 63, 1119-1135; Loftsson, T., Järvinen, T., 1999. Las Ciclodextrinas en el suministro de medicamento oftálmico. *Advanced Drug Delivery Reviews* 36, 59-79).

[0013]Se conoce que las ciclodextrinas incrementan tanto la estabilidad química como la estabilidad física de las proteínas y péptidos en las soluciones acuosas. Además, las ciclodextrinas son conocidas por incrementar solubilidad acuosa de fármacos proteicos y peptídicos poco solubles (J. Horsky y J. Pitha, Complejos de inclusión de proteínas: interacción de las ciclodextrinas con los péptidos que contienen estudios de aminoácidos aromáticos por medio de espectrofotometría competitiva. *J. Inclusión Phenom. Mol. Recognit. Chem.*, 18, 291-300, 1994). Las ciclodextrinas y los complejos de ciclodextrina autoasociados para formar agregados y los agregados de complejo de medicamento/ciclodextrina han sido formulados como transportadores de medicamento (Bonini, M., Rossi, S., Karlsson, G., Almgren, M., Lo Nostro, P., Baglioni, P., 2006. Auto ensamblaje de beta-ciclodextrina en agua. Parte 1: Crio-TEM y dispersión de la luz dinámica y estática.

Langmuir 22, 1478-1484; He, Y., Fu, P., Shen, X., Gao, H., 2008. Agregados a base de ciclodextrinas y caracterización por microscopio. Micron 39, 495-516; Loftsson, T., 2014. Nanopartículas de ciclodextrina autoensambladas y suministro del medicamento. J Incl Phenom Macro 80, 1-7; Messner, M., Kurkov, S.V., Jansook, P., Loftsson, T., 2010. Agregados y nanopartículas de ciclodextrina autoensamblados. Int J Pharm 387, 199-208). Previamente se ha mostrado que los agregados de medicamento/ciclodextrina mejoran el suministro de medicamento tópico al ojo (Thorsteinn Loftsson y Einar Stefánsson, Nanotecnología de las ciclodextrinas para la administración de medicamento oftálmico, US Pat. No. 7,893,040 (Feb. 22, 2011); Thorsteinn Loftsson y Einar Stefánsson, Nanotecnología de las ciclodextrinas para la administración de medicamento oftálmico, US Pat. 8,633,172 (enero 21, 2014); Thorsteinn Loftsson y Einar Stefánsson, Nanotecnología de las ciclodextrinas para la administración de medicamento oftálmico, US Pat. No. 8.999.953 (Abril 7, 2015)). No todos los medicamentos, especialmente no todos los péptidos y proteínas, son capaces de formar agregados de medicamento/ciclodextrina de tamaño suficiente para ser retenido en la superficie del ojo antes luego de su administración tópica.

[0014] Ahora se ha descubierto sorprendentemente que, mientras la α -Ciclodextrina es un excelente solubilizador de ciclosporinas, la adición de γ -ciclodextrina a soluciones acuosas de ciclosporina/ α -Ciclodextrina promueve la formación de nano- y micro-partículas que contienen complejos de ciclosporina/ciclodextrina.

RESUMEN

[0015] En un primer aspecto, se proporciona en el presente una composición oftálmica acuosa que comprende:

- (a) una ciclosporina que sea efectiva oftalmológicamente;

(b) α -ciclodextrina en una cantidad efectiva para formar un complejo soluble en agua con dicha ciclosporina;

(c) γ -ciclodextrina en una cantidad efectiva para producir la formación de agregados del complejo de ciclosporina/ α -ciclodextrina;

(d) partículas de ciclosporina/ciclodextrina con diámetros de desde alrededor de 100 nm hasta alrededor de 100 μ m, que comprenden ambas, dicha γ -ciclodextrina y dicha γ -ciclodextrina;

(e) agua; y

(f) opcionalmente, un agente polimérico estabilizante;

la concentración total de dicha ciclosporina en la composición siendo desde alrededor del 0.01% (p/v) hasta alrededor del 1.0% (p/v), la concentración total de dicha α -ciclodextrina en la composición siendo desde alrededor del 1% (p/v) hasta alrededor del 25% (p/v), la concentración total de γ -ciclodextrina en la composición siendo desde alrededor del 1% (p/v) hasta alrededor del 25% (p/v), y la fracción total de ciclosporina en partículas con diámetros mayores a alrededor de 300 nm no siendo inferiores a alrededor del 10%.

[0016] En un segundo aspecto, en el presente documento se suministra un método para provocar, inducir o mejorar la formación de lágrimas en un sujeto con necesidad de las mismas, dicho método comprende la administración tópica en el ojo o en los ojos de dicho sujeto de una cantidad de un compuesto según se define en el numeral anterior efectiva para provocar o inducir la formación de lágrimas.

[0017] Aún en un tercer aspecto, se suministra en el presente documento un compuesto oftálmico acuoso que comprende:

(a) una cantidad de ciclosporina A que sea efectiva oftalmológicamente;

(b) α -ciclodextrina, en una cantidad efectiva para formar un complejo soluble en agua con ciclosporina A;

(c) γ -ciclodextrina en una cantidad efectiva para producir la formación de agregados del complejo de ciclosporina A/ α -ciclodextrina;

(d) partículas de ciclosporina/ciclodextrina con diámetros de desde alrededor de 100 nm hasta alrededor de 100 μ m, que comprenden ambas, dicha γ -ciclodextrina y dicha γ -ciclodextrina;

(e) agua; y

(f) opcionalmente, un agente polimérico estabilizante

la concentración total de dicha ciclosporina A en la composición siendo desde alrededor del 0.01% (p/v) hasta alrededor del 1.0% (p/v), la concentración total de dicha α -ciclodextrina en la composición siendo desde alrededor del 1% (p/v) hasta alrededor del 25% (p/v), la concentración total de γ -ciclodextrina en la composición siendo desde alrededor del 1 (p/v) hasta alrededor del 25% (p/v), y la fracción total de ciclosporina A en partículas con diámetros mayores a alrededor de 300 nm no siendo inferiores a alrededor del 10%.

[0018] Aún en un cuarto aspecto, se suministra en el presente documento un método de formación de aglomerados de una ciclosporina, especialmente la ciclosporina A, dicho método comprende la solubilización de una ciclosporina terapéuticamente efectiva, en particular la ciclosporina A, en agua en una cantidad de α -ciclodextrina suficiente para disolver esencialmente y de manera completa dicha ciclosporina, y adicionar suficiente γ -ciclodextrina para formar agregados del complejo de ciclosporina (en especial ciclosporina A)/ α -ciclodextrina, opcionalmente con un agente estabilizador polimérico, para producir partículas de ciclosporina (en especial ciclosporina A)/ciclodextrina con diámetros desde alrededor de 100 nm hasta alrededor de 100 μ m, que comprenden tanto dicha α -ciclodextrina como dicha γ -ciclodextrina. El término “esencialmente y de manera completa” en el presente y en la solicitud completa significa al menos 75% hasta alrededor del 100% disuelto. En incorporaciones a manera de ejemplo, esto puede significar al menos alrededor

del 75%, al menos alrededor del 80%, al menos alrededor del 85%, al menos alrededor del 90%, al menos alrededor del 95%, y en una incorporación preferida es al menos alrededor del 90%.

[0019] Aún en un quinto aspecto, se suministra una composición oftálmica acuosa que comprende:

- (a) una cantidad de una ciclosporina, preferiblemente ciclosporina A, que sea terapéutica y oftalmológicamente efectiva;

- (b) α -ciclodextrina en una cantidad efectiva para formar un complejo soluble en agua con dicha ciclosporina;

- (c) γ -ciclodextrina en una cantidad efectiva para producir la formación de agregados del complejo de ciclosporina/ α -ciclodextrina;

- (d) partículas de ciclosporina/ciclodextrina con diámetros de desde alrededor de 100 nm hasta alrededor de 100 μ m, que comprenden ambas, dicha α -ciclodextrina y dicha γ -ciclodextrina;

- (e) agua; y

- (f) opcionalmente, un agente polimérico estabilizante;

la concentración total de dicha ciclosporina en la composición siendo desde alrededor del 0.01% (p/v) hasta alrededor del 1.0% (p/v), la concentración total de dicha α -ciclodextrina en la composición siendo desde alrededor del 1% (p/v) hasta alrededor del 25% (p/v), la concentración total de γ -ciclodextrina en la composición siendo desde alrededor del 1% (p/v) hasta alrededor del 25% (p/v), la fracción total de ciclosporina en partículas con diámetros mayores a alrededor de 300 nm no siendo inferiores a alrededor del 10%, para su uso en la provocación o mejora en la formación de lágrimas por medio de la administración tópica de una cantidad efectiva de las mismas en el ojo u ojos de un sujeto que las necesite.

[0020] Además, aún en un sexto aspecto, se suministra en el presente el uso de ciclosporina en la fabricación de un compuesto oftálmico acuoso que comprende:

(a) una cantidad de una ciclosporina, preferiblemente ciclosporina A, que sea terapéutica y oftalmológicamente efectiva;

(b) α -ciclodextrina en una cantidad efectiva para formar un complejo soluble en agua con dicha ciclosporina;

(c) γ -ciclodextrina en una cantidad efectiva para producir la formación de agregados del complejo de ciclosporina/ α -ciclodextrina;

(d) partículas de ciclosporina/ciclodextrina con diámetros de desde alrededor de 100 nm hasta alrededor de 100 μ m, que comprenden ambas, dicha α -ciclodextrina y dicha γ -ciclodextrina;

(e) agua; y

(f) opcionalmente, un agente polimérico estabilizante;

la concentración total de dicha ciclosporina en la composición siendo desde alrededor del 0.01% (p/v) hasta alrededor del 1.0% (p/v), la concentración total de dicha α -ciclodextrina en la composición siendo desde alrededor del 1% (p/v) hasta alrededor del 25% (p/v), la concentración total de γ -ciclodextrina en la composición siendo desde alrededor del 1% (p/v) hasta alrededor del 25% (p/v), la fracción total de ciclosporina en partículas con diámetros mayores a alrededor de 300 nm no siendo inferiores a alrededor del 10%, para provocar la formación de lágrimas mediante la administración tópica de una cantidad efectiva de las mismas en ojo u ojos de un sujeto que las necesite.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0021] Las patentes, solicitudes publicadas y literatura científica mencionada en el presente establecen el conocimiento de aquellos con habilidad en el arte y se incorporan al presente por remisión en sus totalidades en la misma medida como si se indicara que cada una fuera específica e individualmente incorporada por

remisión. Cualquier conflicto entre cualquier referencia citada en el presente y las enseñanzas específicas de esta especificación serán resueltas en favor de estas últimas. Igualmente, cualquier conflicto entre una definición del arte-entendido de una palabra o frase y una definición de la palabra o frase como se enseñó específicamente en la presente especificación será resuelto a favor de esta última.

[0022] Como se utiliza en el presente, bien sea en una frase transicional o en el cuerpo de una reivindicación, los términos “comprende(n)” y “que comprende(n)” deberán ser interpretados como si tuvieran un significado abierto. Esto es, los términos serán interpretados como sinónimos de las frases “que tiene al menos” o “que incluye al menos.” Cuando son utilizados en el contexto de un método, el término “que comprende” significa que el método incluye al menos las etapas enumeradas, pero puede incluir etapas adicionales. Cuando son utilizados en el contexto de una composición, el término “que comprende” significa que la composición incluye al menos las características o los componentes enumerados, y también puede incluir características o componentes adicionales.

[0023] Los términos “consiste esencialmente en” o “que consiste esencialmente en” tienen un significado parcialmente cerrado, esto es, no permiten la inclusión de etapas o características o componentes que puedan cambiar sustancialmente las características esenciales de un método o composición; por ejemplo, etapas o características o componentes que puedan interferir de manera significativa con las propiedades deseadas de los compuestos o composiciones que se describen en el presente documento, es decir, el método o composición está limitado a las etapas o materiales especificados y a aquellos que no afecten materialmente las características básicas y novedosas del método o composición.

[0024] Los términos “consiste de” y “consiste” son terminología cerrada y permiten únicamente la inclusión de las etapas o características o componentes enumerados.

[0025] Según se utiliza en el presente, las formas singulares “un”, “una” y “el” “la” también abarcan específicamente las formas plurales de los términos a los cuales se refieren, a menos que el contenido claramente lo dicte de otra forma.

[0026] El término “alrededor de” se utiliza en el presente para significar de manera aproximada, en la región de, aproximadamente, o alrededor de. Cuando el término “alrededor de” es utilizado en conjunción con un rango numérico, éste modifica ese rango extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos establecidos. En general, el término “alrededor de” o “aproximadamente” es utilizado en el presente para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor establecido mediante una variación del 20%.

[0027] Según se utiliza en el presente documento, la enumeración de un rango numérico para una variable tiene como intención comunicar que la variable puede ser igual a cualesquiera valores dentro de ese rango. Por lo tanto, para una variable que es intrínsecamente discreta, la variable puede ser igual a cualquier valor entero del rango numérico, incluyendo los puntos finales del rango. Así mismo, para una variable que es intrínsecamente continua, la variable puede ser igual a cualquier valor real del rango numérico, incluyendo los puntos finales del rango. Como ejemplo, una variable que se describe con valores entre 0 y 2, puede ser 0, 1 o 2 para variables que son intrínsecamente discretas, y puede ser 0.0, 0.1, 0.01, 0.001, o cualquier otro valor real para variables que son intrínsecamente continuas.

[0028] En la especificación y las reivindicaciones, la forma singular incluye los referentes en plural, a menos que el contexto claramente lo dicte de otra forma.

Según se utiliza en el presente, a menos que específicamente se indique de otra forma, la palabra “o” es utilizada en el sentido “inclusivo” de “y/o” y no el sentido “exclusivo” de “ya sea/o”.

[0029] Los términos técnicos y científicos utilizados en el presente tienen el significado que comúnmente entiende un experto en el arte al cual pertenece la presente descripción, a menos que se defina de otra forma. Se hace referencia en el presente documento a diversas metodologías y materiales conocidos por los expertos en la materia. Los trabajos de referencia estándar que establecen los principios generales de la farmacología incluyen *The Pharmacological Basis of Therapeutics (Las Bases Farmacológicas Terapéuticas)*, de Goodman y Gilman, 10 Ed., McGraw Hill Companies Inc., Nueva York (2001).

[0030] Según se utiliza en el presente, “tratamiento” significa la reducción, obstaculización o inhibición del desarrollo, o el control, inhibición, alivio o el revertir uno o más síntomas en el individuo al cual una composición como la descrita en el presente le haya sido administrada, en comparación con los síntomas de un individuo al que no se le haya administrado la composición. Un profesional apreciará que las composiciones y los métodos descritos en el presente deberán ser utilizados en concomitancia con evaluaciones clínicas continuas por parte de un profesional experto (médico o veterinario) para determinar la terapia a seguir. Tal evaluación ayudará e informará en la evaluación para bien sea incrementar, reducir o continuar con una dosis específica de tratamiento, y/o para alterar el modo de administración.

[0031] Los métodos descritos en el presente tienen por objeto ser utilizados con cualquier sujeto/paciente que pueda experimentar sus beneficios. Por lo tanto, los términos “sujetos” así como “pacientes”, “individuos” y “animales de sangre caliente” y “mamíferos” incluyen humanos así como sujetos no humanos, tales como

animales no humanos que puedan experimentar los mismos o similares desórdenes oculares, específicamente, perros, caballos y gatos. En particular, estos animales, como los humanos, pueden sufrir de condiciones en las cuales también se producen pocas lágrimas y pueden beneficiarse del método instantáneo de provocar o inducir la formación de lágrimas.

[0032] Las siguientes definiciones y explicaciones también son relevantes para esta solicitud.

[0033] Una condición ocular es una enfermedad, dolencia u otra condición que afecta o involucra al ojo, una de las partes o regiones del ojo, o los tejidos que lo rodean tales como las glándulas lacrimales. Hablando de manera amplia, el ojo incluye el globo ocular, y los tejidos y fluidos que constituyen el globo ocular, los músculos perioculares (tales como los músculos oblicuos y rectos), la porción del nervio óptico que está dentro o es adyacente al globo ocular y los tejidos que lo rodean tales como las glándulas lacrimales y los párpados.

[0034] Una condición ocular anterior es una enfermedad, dolencia o condición que afecta o involucra una región o sitio ocular anterior (es decir, frente al ojo), tal como un músculo periocular, un párpado, glándula lacrimal o un tejido o fluido del globo ocular que se encuentre localizado anterior a la pared posterior de la cápsula de la lente o músculos ciliares.

[0035] Por lo tanto, una condición ocular anterior afecta primariamente o involucra uno o más de lo siguiente: la conjuntiva, la córnea, la cámara anterior, el iris, la cámara posterior, (detrás de la retina pero frente a la pared posterior de la cápsula de la lente), la lente, o la cápsula de la lente, y los vasos sanguíneos y nervios que vascularizan o inervan una región o sitio ocular anterior. Una condición ocular

anterior también es considerada en el presente como que se extiende hacia el aparato lagrimal, en particular, las glándulas lagrimales que segregan lágrimas y sus ductos excretores que transportan el fluido de las lágrimas hacia la superficie del ojo.

[0036] Una condición ocular posterior es una enfermedad, dolencia o condición que primariamente afecta o involucra una región o sitio ocular posterior tales como la coroides y la esclerótica (en una posición posterior a un plano a través de la pared posterior de la cápsula de la lente), el vítreo, la cámara vítrea, la retina, el nervio óptico (es decir, el disco óptico), y los vasos y nervios sanguíneos que vascularizan o inervan una región o sitio ocular posterior.

[0037] De esta manera, una condición ocular posterior puede incluir una enfermedad, dolencia o condición como por ejemplo, la degeneración macular (tal como la degeneración macular no exudativa relacionada con la edad y la degeneración macular exudativa relacionada con la edad); la neovascularización coroidal; la neuroretinopatía macular aguda; el edema macular (tal como el edema macular cistoide y el edema macular diabético); la enfermedad oclusiva arterial de la retina; oclusión venosa retiniana central; enfermedad uveítica de la retina; desprendimiento de retina; trauma ocular que afecta un sitio o ubicación ocular posterior; una condición ocular posterior causada o influenciada por un tratamiento láser ocular; condiciones oculares posteriores causadas o influenciadas por una terapia fotodinámica; fotocoagulación; retinopatía de radiación; trastornos de la membrana epirretiniana; oclusión de la rama venosa de la retina; neuropatía óptica isquémica anterior; disfunción retiniana diabética no-retinopática, retinitis pigmentosa y glaucoma. El glaucoma se puede considerar una condición ocular posterior en razón de que la meta terapéutica consiste en prevenir la pérdida o

reducir el evento de la pérdida de visión debido al daño a o la pérdida de las células retinianas o de las células del nervio óptico (es decir, neuroprotección).

[0038]Una condición ocular anterior puede incluir una enfermedad, dolencia o condición tal como por ejemplo, la afaquia; la pseudofaquia; el astigmatismo; el blefaroespasma; la catarata; las enfermedades conjuntivas; la conjuntivitis; enfermedades de la córnea; las úlceras en la córnea; el síndrome del ojo seco; enfermedades del párpado; enfermedades del aparato lagrimal; la obstrucción del conducto lacrimal; la miopía; la presbiopía; los desórdenes de la pupila; desórdenes refractivos y el estrabismo. El glaucoma puede ser considerado también como una condición ocular anterior porque una meta clínica del tratamiento del glaucoma puede ser reducir la hipertensión del fluido acuoso en la cámara anterior del ojo (es decir, reducir la presión intraocular).

[0039]La presente descripción está relacionada y está dirigida a las composiciones oftálmicas para la administración de medicación tópica en el(los) ojo(s) y a los métodos para el tratamiento de una condición ocular, tales como una condición ocular anterior o una condición ocular posterior o una condición ocular que puede caracterizarse como las dos, una condición ocular anterior y una condición ocular posterior.

[0040]El síndrome del ojo seco (DES – por sus siglas en inglés), también conocido como enfermedad del ojo seco (DED – por sus siglas en inglés), queratoconjuntivitis sicca (KCS - por sus siglas en inglés) y queratitis sicca, es una condición ocular común causada por la disminución en la producción de lágrimas que da como resultado incomodidad y alteraciones visuales. El síndrome del ojo seco tiene etiología multifactorial que involucra inestabilidad de la película lagrimal, la osmolalidad incrementada de la película lagrimal y la inflamación de la superficie

ocular, con daño potencial a la superficie ocular. La terapia del ojo seco depende de su severidad. Las lágrimas artificiales pueden proporcionar una mejora temporal de los síntomas de la irritación del ojo y la visión borrosa. Pueden utilizarse corticosteroides para disminuir la inflamación de la superficie ocular. Sin embargo, el tratamiento más prometedor contra el síndrome del ojo seco es la ciclosporina A administrada tópicamente, la cual incrementa la producción de lágrimas y por lo tanto, alivia la inflamación. En pruebas clínicas, la ciclosporina A comercial al 0.05% / vehículo aceitoso fue efectivo en un 15% de los pacientes luego de 6 meses, comparado con el 5% en placebo.

[0041] La ciclosporina A es un péptido que inhibe la activación de las células-T y en consecuencia, inhibe la producción de citoquina inflamatoria (inhibición selectiva de IL-1). Así mismo, la Ciclosporina A inhibe la apoptosis mediante el bloqueo de la abertura del poro de la transición de permeabilidad mitocondrial y mediante el incremento de la densidad de las células caliciformes conjuntivas (Kunert, K.S., Tisdale, A.S., Gipson, I.K., 2002. Los números de células caliciformes y la proliferación epitelial en la conjuntiva de los pacientes con síndrome de ojo seco tratados con ciclosporina. Archivos de Oftalmología 120, 330-337). Las condiciones asociadas al ojo seco también beneficiarse de la administración tópica de la ciclosporina A. Por ejemplo, la cirugía refractiva de la córnea está casi contraindicada en pacientes con el ojo seco. El tratamiento con Ciclosporina A antes y después de la cirugía puede ayudar a estos pacientes a obtener una corrección quirúrgica de su error refractivo sin el riesgo del ojo seco. Las gotas para los ojos comercializadas contienen un 0.05% (p/v) de ciclosporina A emulsión oftálmica (Restasis®; Alcon, Texas). Las gotas para los ojos se aplican dos veces al día. Sin embargo, utilizar aceites y surfactantes para administrar tópicamente Ciclosporina A proporciona una baja biodisponibilidad del medicamento y puede causar visión borrosa, sensación de ardor, comezón e irritación de la conjuntiva. Estos efectos

colaterales pueden evitarse suministrando la ciclosporina A en la forma de gotas acuosas para los ojos. Además, la eficacia terapéutica de las gotas para los ojos de ciclosporina A podría incrementarse si la concentración de la ciclosporina A en las gotas para los ojos pudiera incrementarse 10-veces, desde 0.05% hasta 0.5% (p/v). La ciclosporina A también se conoce como *ciclosporin* o como *cyclosporine*.

Micropartículas para administración oftálmica

[0042]Esta descripción se refiere al suministro tópico mejorado de fármacos peptídicos y proteicos, en particular el *ciclosporin*, especialmente la ciclosporina A, al suministro en el ojo y los tejidos circundantes obtenidos al mantener el fluido lagrimal acuoso con el medicamento durante un periodo de tiempo mejorado. Cuando el fluido lagrimal acuoso es saturado con el medicamento, entonces las moléculas del medicamento tienen una máxima tendencia a la partición del fluido en la córnea, conjuntiva/esclerótica y demás tejidos que se encuentran en contacto con el fluido lagrimal. Estos tejidos se encuentran cubiertos por membranas lipofílicas. La difusión pasiva de medicamento a través de estas membranas es impulsada por el gradiente del potencial químico dentro de la membrana y, por lo tanto, una alta concentración del medicamento en la superficie de la membrana mejorará el suministro del medicamento a través de las membranas y hacia los tejidos circundantes. En condiciones normales, los medicamentos que son administrados en ojo como soluciones acuosas de gotas para los ojos se diluirán rápidamente y se lavarán de la superficie del ojo por el flujo constante del fluido lagrimal. La dilución del medicamento sobre la superficie del ojo reduce el flujo del medicamento desde la superficie hacia el ojo y los tejidos que lo rodean. Muchos medicamentos oftálmicos son compuestos poco solubles que no muestran la suficiente solubilidad en el fluido acuoso lagrimal. Tales medicamentos son administrados algunas veces como suspensiones de gotas acuosas para los ojos y esto resultará en concentraciones de medicamento algo sostenidas en la superficie

del ojo. Sin embargo, debido a su baja solubilidad en agua, su absorción desde la superficie del ojo será a una tasa limitada de disolución, es decir, la absorción del medicamento en el ojo será obstaculizada por la lenta disolución del medicamento sólido. La administración de tales medicamentos lipofílicos cuanto más medicamento soluble en agua/complejos de ciclodextrina, más aumenta la velocidad de disolución del medicamento sólido en el fluido lagrimal, previniendo la absorción de medicamento a una velocidad de disolución limitada. Las partículas en una suspensión de gotas para los ojos oftálmicas son lavadas más lentamente de la superficie del ojo que las moléculas del medicamento disueltas, en parte debido a la adhesión de las partículas a los tejidos que la rodean. La absorción mejorada se obtiene a través de la introducción de condiciones fisicoquímicas más favorables para la difusión pasiva del medicamento. La administración de suspensiones de gotas para los ojos de medicamento acuoso/ciclodextrina que contienen complejos de medicamento sólido/ciclodextrina garantizará altas concentraciones constantes de medicamento disuelto en el fluido lagrimal acuoso por un período de tiempo extendido.

[0043] Como se observa en los **ANTECEDENTES** más arriba en el presente documento, diversos factores pre-corneales limitarán la absorción ocular por el recorte del tiempo de contacto corneal de los medicamentos aplicados. Los factores más importantes son el drenaje de la solución instalada, la absorción no corneal y la lagrimación inducida. Estos factores, y las mismas barreras de membrana limitarán la penetración de un medicamento oftálmico administrado de manera tópica. Como resultado, únicamente un pequeño porcentaje de la dosis aplicada se entrega a los tejidos intraoculares. La mayor parte (50-100%) de la dosis administrada será absorbida en la circulación de sangre sistémica que puede producir diversos efectos colaterales. Luego de la instilación de una gota de los ojos aplicada (25-50 µl) en el área pre-corneal del ojo, la mayor parte de la solución del

medicamento es drenada rápidamente de la superficie del ojo y el volumen de la solución regresa al volumen normal de lágrima residente de alrededor 7 μl . Después de lo anterior, el volumen de la solución pre-ocular permanece constante, pero la concentración del medicamento disminuye debido a la dilución por la secreción lagrimal y la absorción corneal y no corneal. El valor de la constante de velocidad de primer orden para el drenaje de gotas para los ojos desde el área pre-corneal es por lo general de alrededor de 1.5 min^{-1} en humanos con una tasa de eliminación de la lágrima de alrededor de $1.2 \mu\text{l}/\text{min}$ y, en consecuencia, la vida media pre-corneal de los medicamentos aplicados de manera tópica está únicamente entre 1 y 3 minutos luego del drenaje inicial de la gota para los ojos desde la superficie del ojo.

Formación de partículas de medicamento/ciclodextrina

[0044] Las ciclodextrinas y los complejos de medicamento/ciclodextrina son capaces de auto-ensamblarse en soluciones acuosas para formar agregados de nano-tamaño y estructuras de tipo micelar que también están en capacidad de solubilizar medicamentos poco solubles a través de complejación de no inclusión y solubilización de tipo micelar (Messner, M., Kurkov, S.V., Jansook, P., Loftsson, T., 2010. Agregados y nanopartículas de ciclodextrina autoensamblados. *Int J Pharm* 387, 199-208). Las ciclodextrinas son conocidas por solubilizar la ciclosporina A en soluciones acuosas y se han descrito las soluciones de gotas acuosas para los ojos de ciclosporina A (Kanai, A., Alba, R.M., Takano, T., Kobayashi, C., Nakajima, A., Kurihara, K., Yokoyama, T., Fukami, M., 1989. El efecto sobre la córnea del vehículo de ciclodextrina alfa para las gotas para los ojos de ciclosporina. *Transplante. Proc.* 21, 3150-3152). Previamente hemos desarrollado y probado gotas para los ojos a base de ciclodextrina que contienen dexametasona (Johannesson, G., Moya-Ortega, M.D., Asgrimsdottir, G.M., Lund, S.H., Thorsteinsdottir, M., Loftsson, T., Stefansson, E., 2014. Cinética de las gotas para los ojos de suspensión de

nanopartículas de γ -ciclodextrina en el fluido lagrimal. *Acta Ophthalmologica* 92, 550-556; Tanito, M., Hara, K., Takai, Y., Matsuoka, Y., Nishimura, N., Jansook, P., Loftsson, T., Stefansson, E., Ohira, A., 2011. Gotas tópicas para los ojos de micropartículas de dexametasona-ciclodextrina para el edema macular diabético. *Invest Ophth Vis Sci* 52, 7944-7948) y dorzolamida (Johannesson, G., Moya-Ortega, M.D., Asgrimsdottir, G.M., Lund, S.H., Thorsteinsdottir, M., Loftsson, T., Stefansson, E., 2014. Cinética de las gotas para los ojos de suspensión de nanopartículas de γ -ciclodextrina en el fluido lagrimal. *Acta ophthalmologica* 92, 550-556; Gudmiundsdottir, B.S., Petursdottir, D., Asgrimsdottir, G.M., Gottfredsdottir, M.S., Hardarson, S.H., Johannesson, G., Kurkov, S.V., Jansook, P., Loftsson, T., Stefansson, E., 2014. Gotas para los ojos de nanopartículas de γ -ciclodextrina con dolorzamia: efecto en la presión intraocular en los hombres. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 30, 35-41) e irbesartan (Muankaew, C., Jansook, P., Stefansson, E., Loftsson, T., 2014. Efecto de la γ -ciclodextrina en la solubilización y complejación del irbesartan: influencia del pH y los excipientes. *Int J Pharm* 474, 80-90) en nanopartículas de ciclodextrina. Los estudios muestran que las nanopartículas incrementan el tiempo de contacto del medicamento con la superficie ocular y la biodisponibilidad ocular de los medicamentos.

[0045] Esta solicitud se refiere a la formulación de gotas para los ojos de ciclosporina a base de agua donde la α -ciclodextrina es utilizada para incrementar la solubilidad acuosa de la ciclosporina A y la γ -ciclodextrina es utilizada para formar nano y micro partículas de medicamento/ciclodextrina. Aunque la α -ciclodextrina es capaz de solubilizar la ciclosporina A a través de la formación de complejos solubles en agua de ciclosporina A/ α -ciclodextrina, los complejos formados tienen una pequeña tendencia a formar nano y micro partículas. La γ -ciclodextrina tiene una tendencia mucho menor a formar complejos con la ciclosporina A. Sin embargo, se ha observado de forma inesperada que la adición de la γ -ciclodextrina a una solución

de complejo acuoso de ciclosporina A/ α -ciclodextrina promovió la formación de agregados de complejo de ciclosporina A/ α -ciclodextrina.

[0046]A pesar de que las gotas para los ojos de ciclosporina A son el foco principal de esta solicitud, otros fármacos peptídicos solubles en lípidos y poco solubles en agua pueden ser incluidos en el sistema de suministro de medicamentos a base de ciclodextrina descrito, tales como otras ciclosporinas, somatostatina y análogos de la somatostatina, y pro-medicamentos peptídicos y solubles en lípidos.

[0047]La composición acuosa de las gotas para los ojos en el presente contiene ciclosporina en un complejo de ciclodextrina que contiene una mezcla α -ciclodextrina y γ -ciclodextrina, así como uno o más polímeros estabilizadores opcionales. La α -ciclodextrina solubiliza la ciclosporina mientras que la γ -ciclodextrina promueve la formación de agregados de complejos de ciclosporina/ciclodextrina. Al menos un polímero estabiliza la nano y la micro suspensión acuosa.

[0048]El agente estabilizador polimérico es seleccionado del grupo que consta de ésteres de ácidos grasos de polioxietileno, polioxietileno alquilfenil éteres, polioxietileno alquil éteres, derivados de la celulosa (alquil celulosas, hidroxialquil celulosas e hidroxialquil alquilcelulosas), polímeros de carboxivinil (es decir, carbómeros tales como Carbopol 971 y Carbopol 974), polímeros de polivinilo, alcoholes de polivinilo y polivinilpirrolidonas y los estabilizadores poliméricos relacionados indicados a continuación.

[0049]Los estabilizadores poliméricos útiles incluyen monoestearato de polietilenglicol, monoestearato de polietilenglicol, diestearato de polietilenglicol, hidroxipropil metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polivinilpirrolidona, polioxietilen

lauril éter, polioxietilen octildodecil éter, polioxietilen estearil éter, polioxietilen miristil éter, polioxietilen oleil éter, ésteres de sorbitán, polioxietilen alquil éter (p. ej., éteres macrogol tales como el cetomacrogol 1000), derivados de aceite de ricino de polioxietileno, ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán (por ejemplo, Tween 20 y Tween 80 (Especialidades Químicas de ICI)); glicoles de polietileno (por ejemplo, Carbowax 3550 y 934 (Union Carbide)), estearatos de polioxietileno, carboximetilcelulosa cálcica, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa, celulosa, alcohol de polivinilo (PVA), poloxámeros (por ejemplo, Pluronic F68 y F108, que son copolímeros de bloque de óxido de etileno y óxido de propileno); poloxaminas (por ejemplo, Tetronic 908, conocida también como Poloxamina 908, que es un copolímero de bloque tetrafuncional derivado de la adición secuencial de óxido de propileno y óxido de etileno a la etilendiamina (BASF Wynadotte Corporation, Parsippany, N.J.)); Tetronic 1508 (T-1508) (BASF Wynadotte Corporation), Tritons X-200, que es un alquil aril poliéter sulfonato (Rohm and Haas); fosfolípido derivatizado de PEG, colesterol derivatizado de PEG, vitamina A derivatizada de PEG vitamina E derivatizada de PEG, copolímeros aleatorios de vinil pirrolidona y acetato de vinilo, y similares.

[0050] Estabilizadores especialmente útiles son los poloxámeros. Los poloxámeros pueden incluir cualquier tipo de poloxámero conocido en el arte. Los poloxámeros incluyen poloxámero 101, poloxámero 105, poloxámero 108, poloxámero 122, poloxámero 123, poloxámero 124, poloxámero 181, poloxámero 182, poloxámero 183, poloxámero 184, poloxámero 185, poloxámero 188, poloxámero 212, poloxámero 215, poloxámero 217, poloxámero 231, poloxámero 234, poloxámero 235, poloxámero 237, poloxámero 238, poloxámero 282, poloxámero 284, poloxámero 288, poloxámero 331, poloxámero 333, poloxámero 334, poloxámero 335, poloxámero 338, poloxámero 401, poloxámero 402, poloxámero 403,

poloxámero 407, poloxámero 105 benzoato y poloxámero 182 dibenzoato. Los poloxámeros también son mencionados por su nombre comercial Pluronic, tal como Pluronic 10R5, Pluronic 17R2, Pluronic 17R4, Pluronic 25R2, Pluronic 25R4, Pluronic 31R1, Pluronic F 108 Cast Solid Surfacta, Pluronic F 108 NF, Pluronic F 108 Pastille, Pluronic F 108NF Prill Poloxamer 338, Pluronic F 127, Pluronic F 127 NF, Pluronic F 127 NF 500 BHT Prill, Pluronic F 127 NF Prill Poloxamer 407, Pluronic F 38, Pluronic F 38 Pastilla, Pluronic F 68, Pluronic F 68 Pastille, Pluronic F 68 LF Pastille, Pluronic F 68 NF, Pluronic F 68 NF Prill Poloxámero 188, Pluronic F 77, Pluronic F 77 Micropastille, Pluronic F 87, Pluronic F 87 NF, Pluronic F 87 NF Prill Poloxamer 237, Pluronic F 88, Pluronic F 88 Pastille, Pluronic F 98, Pluronic L 10, Pluronic L 101, Pluronic L 121, Pluronic L 31, Pluronic L 35, Pluronic L 43, Pluronic L 44 NF Poloxámero 124, Pluronic L 61, Pluronic L 62, Pluronic L 62 LF, Pluronic L 62D, Pluronic L 64, Pluronic L 81, Pluronic L 92, Pluronic L44 NF INH surfactant Poloxamer View 124, Pluronic N 3, Pluronic P 103, Pluronic P 104, Pluronic P 105, Pluronic P 123 Surfactant, Pluronic P 65, Pluronic P 84 y Pluronic P 85.

[0051] Los siguientes **EJEMPLOS** se detallan a manera de ilustración únicamente y no serán interpretados como limitantes en el espíritu o en el alcance, muchas modificaciones en ambas, materiales y en métodos serán evidentes para los expertos en la materia.

EJEMPLO 1

[0052] El efecto de las ciclodextrinas en la solubilidad de la ciclosporina A en el agua fue investigado. Una cantidad en exceso del medicamento fue adicionada a soluciones acuosas que contenían hasta un 20% (p/v) de ciclodextrina. Las soluciones fueron sonicadas (aplicación de energía sonora) a 40-50°C por 45-60 minutos en viales de vidrio sellado, y luego se les permitió enfriarse a la temperatura

del cuarto (22-23°C). Una pequeña cantidad de medicamento sólido se agregó luego a cada vial, se volvió a sellar el vial y se le permitió equilibrarse bajo agitación constante y protegido de la luz por 7 días a temperatura ambiente. Cuando las soluciones alcanzaron el equilibrio, fueron filtradas a través de un filtro de membrana de 0.45 µm y analizadas por cromatografía líquida de alta presión. La complejación aparente constante para los complejos de ciclosporina A/ciclodextrina ($K_{1:1}$) fue determinada utilizando el método de fase-solubilidad desarrollado por Higuchi y Connors (Higuchi, T., Connors, K.A., 1965. Técnicas de fase de solubilidad. Química de Instrumentación Analítica Avanzada 4, 117-212). La eficiencia de la complejación (CE – por sus siglas en inglés) fue determinada desde la pendiente de los diagramas de fase-solubilidad (tramas de solubilidad total del medicamento versus concentración total CD en mol/l) donde S_0 es la solubilidad intrínseca del medicamento:

$$CE = \frac{Pendiente}{1 - Pendiente} = K_{1:1} \cdot S_0$$

TABLA 1

[0053]Resultados de los estudios de solubilidad. Medio de tres determinaciones ± desviación estándar. La solubilidad de la ciclosporina A en agua pura bajo estas mismas condiciones se determinó de 0.043 ± 0.004 mg/ml.

Ciclodextrina	Tipo	CE	Solubilidad en presencia de 5% (p/v) ciclodextrina (mg/ml)	Solubilidad en presencia de 15% (p/v) ciclodextrina (mg/ml)
α-ciclodextrina	Bs	0.54	0.76 ± 0.016	4.22 ± 0.593

2-Hidroxipropil- α -ciclodextrina	A _P	0.031	0.084	0.46
γ -ciclodextrina	A _L	0.0049	0.062 ± 0.0006	0.11 ± 0.0015
2-Hidroxipropil- γ -ciclodextrina	A _L	0.0011	0.048 ± 0.004	0.062 ± 0.005
β -ciclodextrina	A _L	0.030	No determinado	No determinado
β -ciclodextrina aleatoriamente metilada	A _P	0.053	0.13	0.76

[0054] Los resultados en la **tabla 1** muestran que las ciclodextrinas tienen un efecto solubilizante en la ciclosporina A, y la solubilidad se incrementa con el incremento de la concentración de ciclodextrina en el medio acuoso. La α -ciclodextrina tiene un efecto solubilizante mayor en la ciclosporina A y muestra una CE más alta que las demás ciclodextrinas probadas. La solubilidad de la ciclosporina A mostró ser 4.2 mg/ml en solución acuosa pura con contenido de un 15% (p/v) de α -ciclodextrina. El diagrama de fase-solubilidad fue del tipo B_s (Higuchi, T., Connors, K.A., 1965. Técnicas de solubilidad de fase. Química Analítica Avanzada de la Instrumentación 4, 117-212). La solubilidad de la β -ciclodextrina en agua pura a temperatura ambiente es de sólo un 2% (p/v), y 0.094 mg/ml es la solubilidad máxima de la ciclosporina A en una solución acuosa de β -ciclodextrina al 2% (p/v). Para la γ -ciclodextrina y la 2-hidroxipropil- γ -ciclodextrina, la solubilidad más alta fue estimada en 0.14 mg/ml al 20% (p/v) para la γ -ciclodextrina y 0.066 mg/ml al 20% para 2-Hidroxipropil- γ -ciclodextrina. La concentración más alta de 2-hidroxipropil- α -ciclodextrina y aleatoriamente β -ciclodextrina-metilada probada fue de 15% (p/v) y, en esa concentración de ciclodextrina, la solubilidad de la ciclosporina A se determinó en 0.46 mg/ml y 0.72 mg/ml, respectivamente. La α -ciclodextrina fue seleccionada para desarrollo posterior puesto que ésta mostró un efecto

solubilizante mucho mayor hacia la ciclosporina A que las demás ciclodextrinas probadas. La γ -ciclodextrina también se probó más debido a su mayor capacidad de formar nanopartículas.

[0055] El análisis cuantitativo de la ciclosporina A fue ejecutado en un sistema de componente de cromatografía líquido de alto rendimiento de fase inversa Ultimate Serie 3000 de Dionex Softron GmbH (Germering, Alemania) que consiste en una bomba DGP-3600A, un estante solvente y un desgasificador SRD-3600, un muestreador con placa de pocillos WPS-3000TLS, un compartimiento de columnas TCC-3100, un detector de matriz de fotodiodos y una columna Phenomenex Luna C-18 de 150 mm x 4.60 mm y 5 micrones, con una columna de seguridad coincidente. La fase móvil consistió en acetonitrilo, metanol y agua (60:20:20), la tasa de flujo fue de 1 ml/min, la temperatura del horno de la columna fue de 80 °C y la longitud de onda de detección fue de 205 nm.

EJEMPLO 2

[0056] Se determinó la fracción de ciclosporina A presente en los agregados de ciclosporina A/ciclodextrina en el medio acuoso de gotas para los ojos. Las microsuspensiones de gotas acuosas para los ojos de ciclosporina A al 0.05% (p/v) fueron preparadas disolviendo cloruro de benzalconio (20 mg) y dihidrato de edetato disódico (100 mg) en 70 ml de una solución acuosa de alcohol de polivinilo al 1.4% (p/v). Luego, 50 mg de ciclosporina A y cantidades medidas de las diferentes ciclodextrinas (es decir, α -ciclodextrina pura, γ -ciclodextrina pura o mezclas de α -ciclodextrina y γ -ciclodextrina) fueron adicionadas a la solución y esta fue agitada hasta que se obtuvo una solución homogénea. El volumen fue ajustado entonces a 100.0 ml con una solución de alcohol de polivinilo al 1.4% (p/v) y calentado en un contenedor sellado en un autoclave a 121 °C durante 20 minutos. La suspensión se enfrió a temperatura ambiente bajo sonicación. A continuación, la suspensión fue

retirada del sonicador y se le permitió equilibrarse a la temperatura ambiente bajo constante agitación por 7 días, protegida de la luz. Las composiciones de las diferentes suspensiones de gotas acuosas para los ojos de ciclosporina A probadas (F1 a F7) están listadas en la **Tabla 2**. La formulación No. 5 de gotas para los ojos (F5) también fue preparada sin algunos de los excipientes en un esfuerzo por evaluar los efectos de los excipientes en la solubilización de la ciclodextrina de la ciclosporina A y la agregación de los complejos de la ciclosporina A/ciclodextrina. La composición de estas gotas para los ojos (F8 a F10) se suministra en la **Tabla 3**.

TABLA 2

[0057] Composición de las formulaciones de gotas para los ojos de ciclosporina A. Adicional a las ciclodextrinas, cada formulación contiene ciclosporina A al 0.05% (p/v), alcohol de polivinilo al 1.4% (p/v), cloruro de benzalconio al 0.02% (p/v) y dihidrato de edetato disódico al 0.1% (p/v).

Formulación	γ -ciclodextrina (% p/v)	α -ciclodextrina (% p/v)
F1	15.0	0.00
F2	13.0	1.00
F3	12.0	2.00
F4	11.0	3.00
F5	10.0	4.00
F6	9.00	5.00
F7	0.00	5.00

TABLA 3

[0058] Composición de las formulaciones de prueba. Cada formulación contenía, además de los excipientes listados, ciclosporina A al 0.05% (p/v), γ -ciclodextrina al 10% (p/v), y α -ciclodextrina al 4% (p/v).

Formulación	Excipientes
F8	Sin excipientes
F9	1.4% (p/v) alcohol de polivinilo
F10	0.020% (p/v) cloruro de benzalconio y 0.10% (p/v) EDTA

[0059] La formulación (4 ml) que está siendo probada fue centrifugada a 6000 rpm a temperatura ambiente (22-23° C) por 20 a 30 min. Si la formulación separada en dos capas, la capa superior fue analizada por medio de cromatografía líquida de alto desempeño (ver **EJEMPLO 1**). El contenido de medicamento en la fase sólida fue calculado de la siguiente forma:

$$\% \text{ de fracción sólida de medicamento} = \frac{(\text{Total medicamento} - \text{medicamento disuelto})}{\text{Contenido total de medicamento}} \times 100$$

La fracción sólida de medicamento fue determinada en cada una de las siete formulaciones (**Tabla 4**). Así mismo, la formulación F5 (que contiene γ -ciclodextrina al 10% p/v y α -ciclodextrina al 4% p/v) fue probada también con y sin los demás excipientes (es decir, alcohol de polivinilo, cloruro de benzalconio, y dihidrato de edetato disódico) para evaluar el efecto excipiente en la agregación.

TABLA 4

[0060] La fracción de medicamento sólido en las diferentes formulaciones de ciclosporina A.

Formulación	Fracción sólida de medicamento %
F1 (15% γ -ciclodextrina)	80.0
F2 (15% γ -ciclodextrina + 1% α -ciclodextrina)	62.9
F3 (12% γ -ciclodextrina + 2% α -ciclodextrina)	44.0
F4 (11% γ -ciclodextrina + 3% α -ciclodextrina)	34.0
F5 (10% γ -ciclodextrina + 4% α -ciclodextrina)	28.8
F6 (9% γ -ciclodextrina + 5% α -ciclodextrina)	30.6
F7 (5% α -ciclodextrina)	11.0
F8 (F5 sin alcohol de polivinilo, cloruro de benzalconio, y dihidrato de edetato disódico)	34.3
F9 (F5 únicamente con 1.4% alcohol polivinilo)	36.8
F10 (F5 únicamente con cloruro de benzalconio, y dihidrato de edetato disódico)	44.0

[0061] Para la formulación F7, la cual contiene únicamente α -ciclodextrina, la fracción sólida de medicamento fue baja y la mayor parte del medicamento se encontraba en la fase líquida. Cuando la formulación contiene una mezcla de γ -ciclodextrina y α -ciclodextrina, la fracción sólida de medicamento se incrementa, y cuando la formulación contiene únicamente γ -ciclodextrina, la mayor parte del medicamento se encuentra en la fase sólida. Las formulaciones F1, F2 y F3, las cuales contienen la cantidad más baja de α -ciclodextrina y la más alta de γ -ciclodextrina, separadas en 3 capas cuando son centrifugadas, donde la capa superior únicamente contiene ciclosporina A. Esto indica que algo del medicamento no formó complejos con la ciclodextrina y que por lo tanto no se disolvió en el medio acuoso. Otras formulaciones separadas en 2 capas durante el centrifugado, que muestran que una formulación debe contener al menos 3% de α -ciclodextrina para disolver totalmente la ciclosporina A. En las formulaciones F4, F5 y F6 más

medicamento estaba en la fase sólida que en la formulación F7, pero toda la ciclosporina A parecía haber sido disuelta. Esto significa que algo de ciclosporina A se encuentra en complejos de ciclosporina A/ciclodextrina y que los complejos formados tienen agregado en partículas que fueron precipitadas durante el centrifugado. Esto también muestra que la γ -ciclodextrina incrementa la agregación.

[0062] El efecto excipiente en la agregación también fue investigado. La formulación F5, que contiene γ -ciclodextrina 10% (p/v) y α -ciclodextrina al 4% (p/v), fue seleccionada para estos estudios en los cuales toda la ciclosporina A se disuelve y en la que la fracción sólida del medicamento se encontraba dentro de un rango adecuado. Para la formulación F8, que contenía ciclodextrina pero no excipientes, la fracción sólida del medicamento era similar a una formulación que contiene todos los excipientes, como F5. En la formulación F9, que contiene ciclodextrina y alcohol de polivinilo, la agregación se incrementó ligeramente. La fracción sólida del medicamento más grande fue hallada en la formulación F10, que contenía ciclodextrina así como ambos cloruro de benzalconio, y dihidrato de edetato disódico, pero no alcohol de polivinilo. Esto muestra que los excipientes tienen algún efecto en la agregación.

[0063] Se determinaron las propiedades fisicoquímicas de F1, F5 y F7. Los valores del pH de las formulaciones fueron determinadas a temperatura ambiente (22-23 °C). Las medidas de viscosidad de las formulaciones de gotas para los ojos fueron ejecutadas con un viscosímetro modelo Brookfield DV-1⁺ (USA) a 25±2 °C, y se determinó la osmolalidad de las formulaciones en un osmómetro de presión de vapor operado a 25 °C (**TABLA 5**).

TABLA 5

[0064]Viscosidad, valores de pH y osmolalidad de las formulaciones F1, F5 y F7. Medio de tres determinaciones $\pm$ SD

Formulación	F1	F5	F7
Valor pH	5.03	5.24	5.33
Viscosidad	3.49 ± 0.0770 cP	3.86 ± 0.0160 cP	2.23 ± 0.0159 cP
Osmolalidad	129 ± 1.04 mOsm/kg	127 ± 2.34 mOsm/kg	67.4 ± 0.0881 mOsm/kg

EJEMPLO 3

[0065]La caracterización del tamaño de las partículas de las formulaciones de gotas para los ojos fue ejecutada mediante la dispersión dinámica de luz (DLS – Pos sus siglas en inglés). Cada formulación fue filtrada a través de un filtro de membrana de $0.45 \mu\text{m}$ antes de las mediciones (para excluir partículas de más de $0.45 \mu\text{m}$) que fueron transportadas a 25°C , en un ángulo de dispersión de 180° y un rayo láser de 780 nm , y cada medición fue realizada por triplicado. Los tamaños de las partículas fueron determinados también utilizando un microscopio de luz sin filtración de la muestra, el cual da una mejor idea de cuántas partículas hay en la suspensión y qué tan grandes son. La **TABLA 6** muestra los datos de distribución de tamaños a partir de las mediciones DLS.

TABLA 6

[0066]Los resultados DLS de los análisis de tamaño de los complejos de ciclosporina A/ciclodextrina para la formulación F1-F10, datos reportados como el

diámetro hidrodinámico (d) en un rango de nano escala, el ancho de la población y la distribución de intensidad (%I)

Formulación	d (nm)	Ancho (nm)	%I
F1	203.0	95	28.7
	370.0	160	70
	1302	288	1.30
F2	412.0	199	96
	1534	497	4.0
F3	375.0	230	95.4
	1191	407	4.6
F4	4.96	4.0	23
	223	140	66.3
	588	279	8.42
	2103	573	2.26
F5	1.10	0.43	4.10
	5.14	4.25	29.5
	244.3	139	64.2
	731	37.8	2.26
F6	1.18	0.6	2.58
	5.34	4.27	25.3
	147	53.1	9.90
	252	110	50.9
	436.3	147	8.90
	918	305	3.48
F7	6.32	4.9	27.4
	155	79.3	72.7

F8	33.1	12.2	0.34
	156.1	138	99.7
F9	1.22	1.3	5.34
	5.37	5.2	26.4
	201	132	48.4
	434	185	15.5
	850	289	4.4
F10	1.53	0.73	12.8
	246	161	75.3
	362	125	5.28
	611	163	6.62

[0067] Las mediciones DLS de las formulaciones F1, F2 y F3 dieron 2 o 3 tamaños de poblaciones y el diámetro medio fue de 200-400 nm basado en la distribución de la intensidad. Cuando se observa en el microscopio, estas tres fórmulas contenían una cantidad mayor de partículas relativamente más grandes que las otras formulaciones. Esto se debió principalmente a la presencia de partículas de medicamento sólidas y no debido a la agregación de complejos de medicamento/ciclodextrina.

[0068] En las formulaciones F4, F5 y F6, la ciclosporina A está esencialmente disuelta por completo y las distribuciones por tamaño fueron mayores que en las otras formulaciones, varios tamaños de poblaciones fueron detectados y se determinaron los tamaños principales de partículas 4.9-5.3 nm y 150-250 nm. En la formulación F7, que contiene únicamente α -ciclodextrina, poblaciones de dos tamaños ocurren cuando los tamaños de partículas promedio fueron de 6 nm y 155 nm. Cuando esta formulación fue medida en un microscopio ligero, la formulación apareció despejada. Estos resultados indican que cuando la formulación contiene

únicamente α -ciclodextrina, los complejos de ciclosporina A/ciclodextrina no tienen una fuerte tendencia a formar agregados más grandes. Cuando la formulación contiene ambas α -ciclodextrina y γ -ciclodextrina, los complejos tienen una tendencia más fuerte a formar agregados y los agregados formados también son más grandes.

[0069]El efecto excipiente en la agregación fue probado en las formulaciones F8, F9 y F10. Cuando es medida en un microscopio de luz, todas estas formulaciones aparecen despejadas en su mayoría con muy pocas partículas grandes de 1-5 μm . Únicamente cuando son observadas por DLS, se pueden detectar algunas diferencias. En la formulación F8, donde ningún excipiente fue incluido excepto las ciclodextrinas, poblaciones de dos tamaños fueron detectadas con tamaños principales determinados en 33.1 nm y 156 nm. Cuando la formulación contenía cloruro de benzalconio y dihidrato de edetato disódico (F10), poblaciones de cuatro tamaños ocurren con tamaño principal de partícula determinada en 1.53, 246, 362 y 611 nm. Cuando la formulación contenía únicamente alcohol de polivinilo (F9), poblaciones de cinco tamaños fueron detectadas con tamaño principal de la partícula de 1.22, 5.37, 201, 434 y 850 nm. Estos resultados indican que los excipientes incrementan la formación de agregados en el medio acuoso de gotas para los ojos.

EJEMPLO 4

[0070]El microscopio electrónico de transmisión (TEM – por sus siglas en inglés) es el método analítico de selección para detectar la morfología y los tamaños de los complejos de medicamento/ciclodextrina incluyendo sus agregados. La morfología y tamaño de los agregados en las suspensiones seleccionadas de gotas acuosas para los ojos de ciclosporina A (es decir, F1, F5 y F7) fueron analizados.

Inicialmente, las muestras fueron centrifugadas a 4000 rpm, 20° C por 30 minutos (Modelo Rotina 35R, Hettuch, Alemania), entonces el sobrenadante se pipeteó y las rejillas recubiertas de formvar se hicieron flotar sobre una gotita de la preparación en Parafilm®, para permitir la absorción de las nanopartículas en la parrilla. Después de secar la parrilla con un papel de filtro, la parrilla fue transferida a una gota de la mancha negativa utilizando una solución acuosa de acetato de uranilo (1%) bajo vacío constante. Finalmente, las muestras fueron examinadas en un microscopio Modelo JEM-2100 de transmisión electrónica (JEOL, Tokio, Japón). Las micrografías TEM de las suspensiones de gotas para los ojos de ciclosporina A seleccionadas muestran agregados esféricos de complejos de ciclosporina A/ciclodextrina con el diámetro de 40-140 nm y 20-100 nm en F1 y F5, respectivamente. Los tamaños dominantes de nanopartículas de agregados de ciclosporina A/ciclodextrina en F7 fueron de menos de 10 nm. Sin embargo, pequeñas cantidades de partículas más grandes (120-140 nm) también fueron detectadas. El tamaño del agregado de las monografías TEM estuvo de acuerdo con la técnica DLS. La observación de los agregados esféricos indica que los agregados de complejos de ciclosporina A/ciclodextrina pueden mejorar la solubilidad del medicamento a través de complejos de no inclusión y/o estructuras similares a las micelares. El diámetro de las nanopartículas ensambladas en F5 estuvo en un rango de 100 a 400 nm. Los tamaños de las partículas observadas por TEM están de acuerdo con las obtenidas por DLS.

[0071]La morfología de F5 fue además analizada utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM - por sus siglas en inglés). Luego de una suave agitación, el material sólido de la suspensión acuosa de gotas para los ojos fue puesto en capas sobre un portaobjetos, y se permitió que la muestra se secara durante la noche en una secadora a temperatura ambiente. Posteriormente, esta capa fue recubierta con oro bajo una atmósfera de argón a temperatura ambiente.

Las muestras fueron observadas entonces en su morfología de superficie con un SEM (Modelo JSM-5410LV, JEOL, Tokio, Japón). El SEM mostró nanopartículas con un diámetro desde 100 a 400 nm que está de acuerdo con los resultados DLS y TEM.

EJEMPLO 5

[0072]La permeación de la ciclosporina A de F1, F5 y F7 a través de una serie de membranas semipermeables fue medida en un aparato Franz de difusión celular que consiste en un compartimiento donante y uno receptor. Las cámaras donantes y receptoras fueron separadas por una sola capa de membrana semipermeable con MWCO de 20, 50 o 100 kDa y un área de difusión de 1.77 cm². Las membranas fueron remojadas en agua Milli-Q durante la noche previamente a los estudios de permeación. Las fases del donante consisten en 2 ml de la formulación a ser probada (es decir, F1, F5 o F7). La fase receptora (12 ml) para la formulación F7 consiste en la formulación F7 sin ciclosporina A y alcohol de polivinilo, y las fases receptoras para las formulaciones F1 y F5 consisten en la formulación F5 sin ciclosporina A y alcohol de polivinilo. Esto es debido al hecho de que al menos un 3% (p/v) de α -ciclodextrina se requiere para disolver 0.5 mg/ml de ciclosporina A, y que las formulaciones F1 y F5 tienen una osmolalidad similar. El alcohol de polivinilo se excluyó de las fases receptoras debido al hecho de que el alcohol de polivinilo se adhiere a la celda de flujo, dando como resultado una densidad de luz UV baja y mediciones HPLC deficientes. La fase receptora fue desgasificada para eliminar el aire disuelto antes de que éste fuera colocado en el compartimiento del receptor. El estudio fue llevado a cabo a temperatura ambiente bajo agitación continua de la fase receptora mediante una barra de agitación magnética que gira a 300 rpm. Una muestra de 100 μ l del medio receptor fue retirada a 5, 6, 7, 8 y 9 horas y reemplazada inmediatamente por una fase receptora fresca. La concentración de

ciclosporina A en la muestra del receptor fue medida por HPLC (ver **EJEMPLO 1**). El flujo (J) fue calculado a partir de la pendiente (dq/dt) de la sección lineal de los perfiles de permeación, que son la cantidad de ciclosporina A en la cámara receptora (q) versus los perfiles de tiempo (t), y el coeficiente de permeabilidad (P_c) fue calculado a partir del flujo:

$$J = \frac{dq}{A \cdot dt} = P_c \cdot C_d$$

donde A es el área de superficie de la membrana (1.77 cm^2) y C_d es la concentración inicial de ciclosporina A disuelta en la fase donante.

[0073]El peso molecular de la ciclosporina A es de 1202.6 Da y los pesos moleculares de la α -Ciclodextrina y la γ -Ciclodextrina son 972.84 y 1297.12 Da, respectivamente. Las moléculas monoméricas de ciclosporina A y los complejos de ciclosporina A/ciclodextrina (1:1) son capaces de penetrar fácilmente a través de esas membranas. El estudio muestra que la ciclosporina A está principalmente presente como complejos de ciclosporina A/ciclodextrina que se han agregado en partículas con un diámetro más grande de 20 kDa y podrían por lo tanto no penetrar la membrana MWCO 20 kDa. Para la formulación F1, que contiene únicamente γ -ciclodextrina, la cantidad limitada de medicamento disuelto en el medio donante también podría ser la razón para esta falta de detección en la fase receptora, puesto que el medicamento debe ser disuelto para penetrar la membrana. La ciclosporina A en las tres formulaciones penetró las membranas con MWCO 50 y 100 kDa, mostrando que la mayoría de los agregados son más pequeños de 50 kDa. El coeficiente de flujo y permeabilidad para cada formulación fue calculado (**TABLA 7**). Las formulaciones F5 y F7 dieron valores de flujo similares, pero la formulación F1 arrojó unos valores de flujo más bajos. Nuevamente, esto se debe principalmente a la concentración más baja de ciclosporina A disuelta en el medio donante y el

hecho de que únicamente la ciclosporina A disuelta, libre o en los complejos de ciclodextrina, puede penetrar a través de las membranas.

TABLA 7

[0074]El coeficiente de flujo y permeabilidad (Pc por sus siglas en inglés) para la ciclosporina A en las formulaciones F1, F5 y F7 a través de membranas semipermeables con MWCO 50.000 y 100.000 Da.

Formulación	MWCO 50.000 Da		MWCO 100.000 Da	
	Flujo ($\mu\text{g/h/cm}^2$)	Pc (cm/h)	Flujo ($\mu\text{g/h/cm}^2$)	Pc (cm/h)
F1	6.58	6.58×10^{-2}	7.28	7.28×10^{-2}
F5	27.8	5.57×10^{-2}	28.8	5.76×10^{-2}
F7	32.1	6.41×10^{-2}	28.0	5.60×10^{-2}

EJEMPLO 6

[0075]El comportamiento de los agregados de ciclosporina A/medicamento además fue estudiado. Pequeñas muestras de F5 fueron filtradas a través de un filtro de membrana diluido de 0.45 μm con un volumen igual al de la fase móvil o únicamente centrifugado a 6000 rpm a temperatura ambiente por 20-30 min. Las concentraciones de ciclosporina A de las soluciones obtenidas fueron entonces determinadas por HPLC (ver **EJEMPLO 1**). Se le permitió a la formulación filtrada reposar durante un día y luego se centrifugó a temperatura ambiente por 20-30 min y la concentración de ciclosporina A se determinó por HPLC. Cuando la muestra está diluida, todos los agregados son disueltos y la concentración de ciclosporina A representa la cantidad total del medicamento en la suspensión. Cuando la suspensión es filtrada, la concentración de ciclosporina A debe estar cerca o ser la misma como cuando la suspensión es centrifugada, puesto que la mayoría de los

agregados deben ser filtrados de la solución al igual que durante la centrifugación. Este no fue el caso, sin embargo, y la concentración de ciclosporina A de la suspensión filtrada estuvo cerca a la diluida, no a la centrifugada (**TABLA 8**). Además, cuando la suspensión es filtrada, ésta se vuelve transparente, pero interesantemente, cuando la suspensión filtrada ha estado en reposo por un día, ocurre alguna agregación y la solución se vuelve no transparente nuevamente. Por lo tanto, la formulación filtrada fue centrifugada luego de estar en reposo a temperatura ambiente por un día y entonces la concentración de la ciclosporina A disuelta fue medida. Posteriormente, la concentración de ciclosporina A estuvo cerca de la centrifugada, no de la diluida. Esto indica que los complejos de la ciclosporina A/ciclodextrina están agregándose, pero las fuerzas que tienen estos complejos juntos en agregados son muy débiles y se rompen durante la filtración pero luego son reformadas en el filtrado.

TABLA 8

[0076]La concentración de la ciclosporina A en la formulación F5 luego de ser diluida, centrifugada, filtrada, filtrada y centrifugada luego de 1 día.

	Diluida con Fase móvil	Filtrada a través de filtro de 0.45 µm	Filtrada y entonces centrifugada luego de 1 día	Centrifugada
Concentración de ciclosporina A (mg/ml)	0.462	0.430	0.383	0.360

EJEMPLO 7

[0077] Se prepararon tres fórmulas de gotas para los ojos y sus propiedades físico-químicas determinadas según lo descrito en el **EJEMPLO 2 (TABLA 9)**. Las cantidades de α -ciclodextrina presentes en las gotas para los ojos, que es 4%, 12.5% y 15% fueron más que suficientes para solubilizar toda la ciclosporina A presente en las fórmulas de gotas para los ojos, que son, 0.05%, 0.2% y 0.4%, respectivamente. La solubilidad acuosa de la α -ciclodextrina y la γ -ciclodextrina es 13% y 25% (p/v), respectivamente. Pequeñas nanopartículas fueron formadas, y las gotas acuosas para los ojos se volvieron opalescentes, a la adición de la γ -ciclodextrina. Las gotas para los ojos fueron centrifugadas a una relativa baja velocidad que únicamente removió las partículas más grandes (en el rango bajo de las micropartículas) de la suspensión de gotas para los ojos mientras que las nanopartículas permanecieron en la solución (**EJEMPLO 3**). La fracción sólida, que está compuesta del complejo de micropartículas de ciclosporina A/ciclodextrina, estaba entre 23% y 29%.

TABLA 9

[0078] Composición de las Gotas para los Ojos

	A	B	C
Ciclosporina A	0.050%	0.20%	0.40%
α -Ciclodextrina	4.0%	12.5%	15.0%
γ -ciclodextrina	10.0%	12,5%	15.0%
Alcohol Polivinilo (PVA)	1.4%	1.6%	1.6%
Dihidrato de edetato disódico (EDTA)	0.10%	0.10%	0.10%
Cloruro de benzalconio (BAC)	0.02%	0.02%	0.02%

Agua purificada	qs	qs	qs
Viscosidad	3.9 cP	5.5 cP	7.0 cP
pH	5.2	5.4	5.4
Osmolaridad	129 mOsm/kg	284 mOsm/kg	366 mOsm/kg
Fracción del medicamento sólido en el complejo ciclosporina A/CD	29%	25%	23%

Dos voluntarios en buen estado de salud (un hombre y una mujer, ambos de 30 años) recibieron una gota de la fórmula B en el ojo izquierdo. Sin sensación de ardor, visión borrosa, comezón u otros efectos colaterales que fueran observados. Las gotas para los ojos fueron bien toleradas. La fórmula B contenía 4 veces la concentración del 0.05% de ciclosporina A que es vendida comercialmente como Restasis® gotas para los ojos. Se esperan pruebas posteriores para determinar que concentraciones aún más altas, tales como 0.50%, también son bien toleradas.

[0079] Aunque no se desea estar vinculado por ninguna teoría o mecanismo en particular, se cree que las gotas para los ojos acuosas descritas en el presente documento suministran una cantidad mayor y más efectiva de ciclosporina, en particular de ciclosporina A, por dosis, que puede, en un régimen de dosificación regular, por ejemplo, dos veces al día, más rápidamente y más a fondo lograr la producción de lágrimas más pronto y de forma más efectiva que de cualquier otra forma posible con la dosis inferior de producto basado en aceite comercializado. Esto puede deberse a una mejor penetración en el aparato lagrimal, incluyendo las glándulas lacrimales, que segregan lágrimas y sus ductos excretorios, que transportan el fluido lagrimal hacia la superficie del ojo para cubrir la conjuntiva y la córnea. Esto también puede deberse a la liberación sostenida que proporcionan las

gotas para los ojos del sujeto de ciclosporina y el efecto protector y calmante que los aglomerados proporcionan a la superficie del ojo.

[0080] Aunque esta descripción ha sido expresada con cierto detalle a manera de ilustración, los **EJEMPLOS**, y las incorporaciones preferidas, para fines de clarificación de entendimiento, se apreciará por una persona normalmente versada en la materia ordinaria que varias modificaciones, sustituciones, omisiones y cambios pueden ser efectuados sin salirse del espíritu del presente. En consecuencia, se entiende que el alcance del presente documento está limitado exclusivamente al alcance de las siguientes reivindicaciones, y equivalentes de las mismas.