

**"SISTEMA LIPÍDICO NANOESTRUCTURADO QUE CONTIENE
BESIFLOXACINA, COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA Y USOS"**

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención pertenece al campo de las ciencias farmacéuticas y la nanotecnología, ya que trata de la preparación de sistemas lipídicos nanoestructurados que contienen antibióticos para el tratamiento de infecciones oftálmicas. Se describen un sistema lipídico nanoestructurado que contiene besifloxacin y, opcionalmente, sulfato de polimixina B, y su aplicación en la terapia y/o prevención de infecciones bacterianas oculares.

FUNDAMENTOS DE LA INVENCION

[0002] Las bacterias son la principal causa de infecciones oculares a nivel mundial. Estas infecciones pueden dañar las estructuras superficiales y profundas del ojo humano o animal, causando posible ceguera y discapacidad visual. Por lo tanto, son necesarios un diagnóstico y tratamiento inmediato.

[0003] En atención primaria, en humanos, la conjuntivitis, la queratitis y la blefaritis se encuentran entre las principales causas de consulta médica (BERTINO, 2009, TEWELDEMEDHIN, 2017). Esta enfermedad afecta a muchas personas e impone cargas económicas y sociales. Se estima que la conjuntivitis aguda afecta a 6 millones de personas anualmente en los Estados Unidos (UDEH; SHNEIDER; OHSFELDT, 2008). En Brasil, hay pocos datos epidemiológicos sobre esta enfermedad. El número de casos de conjuntivitis creció sustancialmente a principios de 2018 en al menos cuatro estados del país: Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais y

Pernambuco. Además, Salvador, Fortaleza y Petrópolis registraron números de casos muy por encima de lo normal en enero de este año (BBC BRASIL, 2018).

[0004] Schneider et al. (2014) informaron que el costo total de la conjuntivitis alcanzó casi 800 millones de dólares en los Estados Unidos, considerando los costos sociales que incluyen los costos indirectos asociados con días de trabajo perdidos, días de escuela perdidos, costos de propagación de la enfermedad asociados con diagnósticos inexactos y los costos de la resistencia a los antibióticos. Además, la publicación de Smith y Waycaster (2009) reveló que los costos directos o indirectos en el diagnóstico y tratamiento de la conjuntivitis bacteriana se estimaron en 589 millones de dólares en Estados Unidos.

[0005] En el caso de las infecciones oftálmicas en animales, la Organización Mundial de la Salud reveló que las enfermedades infecciosas serán el segundo mayor desafío que enfrentará el sector salud animal en los próximos cinco años debido al aumento de la resistencia a los antibióticos. Así, las enfermedades infecciosas representarán la mayor preocupación en salud animal, a escala global, especialmente en mercados emergentes como Brasil.

[0006] La selección de fármacos para el tratamiento de las principales enfermedades infecciosas bacterianas oculares del segmento anterior del ojo se limita a la aplicación tópica de antibióticos tanto para humanos como para animales. Bremond-Gignac et al. (2011) indicaron los fármacos disponibles para el tratamiento: fluoroquinolonas, aminoglucósidos, penicilinas, cloranfenicol, tetraciclinas y eritromicina/azitromicina.

[0007] Las fluoroquinolonas son los antibióticos más comunes utilizados por vía tópica en la terapia farmacológica de la conjuntivitis bacteriana debido a su amplio espectro de acción (CHEN et al., 2018). En el caso de queratitis considerada no grave, se requiere monoterapia con un antibiótico fluoroquinolónico de cuarta generación como moxifloxacino o gatifloxacina. Sin embargo, la queratitis bacteriana grave requiere una terapia intensiva con fluoroquinolona o aminoglucósido y cefalosporina (McDONALD et al., 2014; SCHECHTER, PAREKH, TRATTLER, 2015).

[0008] Respecto al tratamiento de la blefaritis, no existen guías establecidas respecto a regímenes terapéuticos, pero ensayos clínicos recientes han demostrado que los antibióticos (tópicos o sistémicos) y los corticosteroides tópicos pueden producir una mejoría significativa en los signos y síntomas de la blefaritis (PFLUGFELDER, KARPECKI, PEREZ, et al., 2014).

[0009] Sin embargo, es preocupante el aumento de las tasas de infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos, como el *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos estima que 2 millones de personas están infectadas con estos patógenos resistentes (EUROSURVEILLANCE TEAM, 2013).

[0010] Se ha informado que aproximadamente el 80% de los aislamientos oculares de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina en los Estados Unidos son resistentes a las fluoroquinolonas de segunda generación, ciprofloxacina y ofloxacina (ASBELL et al., 2008; HAAS et al., 2011, COMSTOCK et al., 2014). Respecto a las infecciones

oftálmicas resistentes en animales, no existen datos en la literatura. Afortunadamente, se ha demostrado que el antibiótico besifloxacin es eficaz contra las cepas resistentes.

[0011] El antibiótico besifloxacin, una fluoroquinolona de cuarta generación para uso oftálmico tópico exclusivo, ha demostrado ser eficaz contra cepas susceptibles y resistentes de bacterias tanto grampositivas como gramnegativas. La besifloxacin fue sintetizada por la empresa japonesa SSP Co. Ltd y aprobada para comercialización en 2009 por la Food and Drug Administration (FDA) bajo el nombre Besivance™ (6 mg/mL) por la compañía farmacéutica Bausch & Lomb Inc. En 2010, la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA) aprobó el nuevo antibiótico para su uso en Brasil. Este fármaco ha sido indicado en el tratamiento de la conjuntivitis, habiendo demostrado eficacia en diferentes ensayos clínicos (COMSTOCK et al., 2014; MAH; SANFILIPPO, 2016).

[0012] La besifloxacin tiene la fórmula química $C_{19}H_{21}ClFN_3O_3$, masa molar igual a 430,40 g/mol, presenta baja solubilidad en agua (0,143 mg/mL) y pKas de 5,64 (medio ácido, grupo hidroxilo) y 9,67 (medio básico, grupo amina primaria). Respecto a su estructura química, la besifloxacin posee un importante grupo 1-n ciclopropil, responsable del amplio espectro de actividad frente a bacterias aeróbicas. Este sustituyente también aparece en otras fluoroquinolonas como ciprofloxacina de segunda generación, gatifloxacina y gemifloxacino de tercera generación y moxifloxacino de cuarta generación (LAL et al., 2014) (Figura 1).

[0013] Además, la besifloxacin tiene un átomo de flúor en la posición 6 de la molécula, un farmacóforo importante; átomo de cloro, en la posición 8, responsable de aumentar la potencia del antimicrobiano frente a las enzimas bacterianas ADN girasa (topoisomerasa II) y topoisomerasa IV, que son esenciales en los procesos de transcripción y replicación bacteriana (CAMBAU et al., 2009). Esta doble unión a dominios y conformaciones específicas subyace a la actividad bactericida de las fluoroquinolonas (HOOPER; JACOBY, 2016; MAH; SANFILIPPO, 2016). Por tanto, la ADN girasa es el objetivo principal en la mayoría de las bacterias Gram-negativas y la topoisomerasa IV es el objetivo principal en las bacterias Gram-positivas (MITSCHER et al., 2008; PETRI, 2006).

[0014] Un estudio realizado por Haas et al. (2010) demostró que la besifloxacin presentó una concentración inhibitoria mínima menor en comparación con moxifloxacino, gatifloxacina, ciprofloxacina, azitromicina y tobramicina para *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. pneumoniae*. Por tanto, este antibiótico reveló una potente acción antimicrobiana contra estas bacterias. Además, Comstock et al. (2014), en el estudio clínico, revelaron que la besifloxacin tenía actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *S. epidermidis* resistentes a la meticilina con tasas significativas de erradicación de los microorganismos. Además, la besifloxacin mostró una mayor eficacia contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas resistentes a otras fluoroquinolonas.

[0015] Haas et al. (2010) evaluaron posteriormente la actividad bactericida de besifloxacin y otros agentes

antimicrobianos (oxacilina, tobramicina, azitromicina, ciprofloxacina, moxifloxacina y gatifloxacina) frente a microorganismos que frecuentemente causan conjuntivitis bacteriana: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*. Los resultados revelaron que la besifloxacina, a diferencia de las otras fluoroquinolonas probadas, mostró alta potencia y actividad bactericida. Esta actividad se demostró incluso contra cepas que presentaban múltiples mutaciones en los genes responsables de codificar la ADN girasa y la topoisomerasa IV (HAAS et al., 2011). Además, un estudio realizado por Zhang y Ward (2008) demostró que la besifloxacina también actúa como agente antiinflamatorio en monocitos in vitro. Esta actividad puede mejorar su eficacia en el tratamiento de infecciones oculares concomitantes con inflamación.

[0016] A pesar de las ventajas terapéuticas presentadas, la besifloxacina puede tener limitada su eficacia terapéutica debido a su baja solubilidad en agua. Esta propiedad química representa el principal desafío en el desarrollo de preparaciones que contengan besifloxacina. Además, las preparaciones convencionales como soluciones, suspensiones o ungüentos oftálmicos tienen una biodisponibilidad limitada del fármaco debido a los mecanismos de protección del ojo, sus barreras biológicas, metabólicas y fisiológicas (DUBALD et al., 2018; BARANOWSKI, 2014). Para superar estos desafíos, los sistemas lipídicos nanoestructurados (SLN), como los portadores lipídicos nanoestructurados (PLN), han surgido como una estrategia prometedora para el desarrollo de productos oftálmicos que

ofrecen mayor eficacia y seguridad a los pacientes.

[0017] En vista de la necesidad de una terapia adecuada para las infecciones bacterianas oftálmicas, el desarrollo de un sistema lipídico nanoestructurado (SLN) que contenga besifloxacin representa una estrategia prometedora debido al aumento de la solubilidad del fármaco y al aumento de su eficacia y seguridad. Además, tiene el potencial de prevenir la aparición de cepas bacterianas resistentes.

[0018] Hasta la fecha, un SLN que contiene besifloxacin no está disponible comercialmente ni descrito en publicaciones académicas o de patentes y, por lo tanto, es el objeto de la presente invención.

ESTADO DE LA TÉCNICA

[0019] La aplicación de la nanotecnología en el desarrollo de formas farmacéuticas ha logrado un crecimiento significativo. Aproximadamente 50 productos basados en nanotecnología han sido aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) desde 1995, y alrededor de 70 están en la fase de estudio clínico. Se pronostica que el mercado de nanotecnología para productos farmacéuticos se expandirá a una tasa de crecimiento anual compuesta del 12,5% entre 2015 y 2023. Si se confirma el pronóstico, el mercado pasará de una valoración de 4.100 millones de dólares en 2014 a 11.900 millones de dólares en 2023 (Transparency Market Research, 2016).

[0020] El transporte de antibióticos en sistemas lipídicos nanoestructurados se ha explorado como una de las estrategias más prometedoras para obtener productos con mayor eficacia y seguridad. Estos sistemas han supuesto un avance significativo en el desarrollo de nuevos productos

farmacéuticos debido a sus propiedades intrínsecas, como tamaño en el rango nanométrico, carga superficial, permeabilidad mejorada y alta relación área superficial/volumen. Estas propiedades permiten maximizar la interacción del antibiótico con las bacterias, inhibir la formación de biofilms, mejorar la penetración a través de biofilms y ser más efectivos contra infecciones intracelulares.

[0021] El sistema lipídico nanoestructurado (SLN) permite el transporte de fármacos hidrófobos como la besifloxacin. Además, permite la mejora de su farmacocinética y farmacodinámica a través de diferentes vías de administración, como la vía tópica ocular. Estas mejoras se refieren a ventajas como la liberación modificada del fármaco, mayor eficacia, reducción de efectos adversos y mejor protección del fármaco frente a procesos enzimáticos u oxidativos (YUKUYAMA et al., 2017). Además, las preparaciones optimizadas a escala de laboratorio y las tecnologías actuales para la producción a escala piloto permiten la transposición a la producción industrial sin modificar las propiedades de los sistemas lipídicos nanoestructurados.

[0022] A continuación, se revisan los antecedentes de la presente invención. Se debe tener en cuenta que la simple mezcla de cualquiera de los componentes no constituye una fórmula farmacéutica. Una formulación farmacéutica exitosa se compone de una mezcla de componentes únicos con interacciones particulares.

[0023] Youssef et al. (2020) desarrollaron un sistema lipídico nanoestructurado que contiene

ciprofloxacina (SLN-ciprofloxacina) para el tratamiento de la endoftalmitis bacteriana. Este portador se preparó utilizando Precirol® ATO 5 y ácido oleico como lípido sólido y lípido líquido, respectivamente. Se utilizaron polisorbato 80 y poloxámero 188 como tensioactivos. La preparación optimizada presentó un tamaño de partícula igual a $193,1 \pm 5,1$ nm y IP $0,43 \pm 0,01$. El flujo transcorneal de SLN-ciprofloxacina en un ensayo ex vivo reveló un aumento de 4 veces en comparación con la solución de ciprofloxacina, y la permeabilidad transcorneal de SLN-ciprofloxacina fue 3,5 veces mayor en comparación con el fármaco libre.

[0024] Los poros presentes en la córnea facilitan el transporte intracelular de partículas del SLN con un rango de tamaño de 200-300 nm. Además, la fase lipídica puede interactuar con el segmento lipídico de la película lagrimal, aumentando el tiempo de retención. En consecuencia, una mayor cantidad de nanopartículas se puede internalizar por endocitosis, lo que podría reducir potencialmente el daño al tejido ocular debido a infecciones y tratamientos con antibióticos (DE OLIVEIRA et al., 2020, GARRIGUE et al., 2017).

[0025] Se desarrolló un sistema lipídico nanoestructurado que contiene dexametasona (SLN-dexametasona) para el tratamiento del ojo seco. La formulación final contenía colesterol, Labrafac™ lipofílico WL1349 y polisorbato 80 en su composición. El tamaño de partícula fue igual a $19,51 \pm 0,5$ nm; índice de polidispersidad (IP), igual a 0,08; y una eficiencia de encapsulación igual al $99,6 \pm 0,5\%$. El SLN marcado con una sustancia fluorescente demostró un aumento de la

internalización de las nanopartículas en las células epiteliales corneales humanas primarias en ensayos in vitro. Este SLN mostró una distribución adecuada de nanopartículas en la superficie corneal después de 4 h a 37 °C, mostrando un posible aumento en la biodisponibilidad del fármaco y un mayor tiempo de residencia en la superficie ocular. Además, el SLN-dexametasona fue más eficaz para reducir las citocinas inflamatorias en comparación con la dexametasona libre. La nanopartícula desarrollada se consideró una candidata potencialmente comercializable para enfermedades oculares inflamatorias como el síndrome del ojo seco (KUMARI et al., 2021).

[0026] Con el objetivo de evitar complicaciones como la opacificación capsular después de la cirugía de cataratas, Yan et al. (2021) desarrollaron un portador de gel sensible a la temperatura que contiene un sistema lipídico nanoestructurado que contiene genisteína, dexametasona y moxifloxacino. El SLN-genisteína mostró tamaño de partícula, índice de polidispersidad, potencial zeta y eficiencia de encapsulación iguales a $39,47 \pm 0,69$ nm, $0,213 \pm 0,016$, $-4,32 \pm 0,84$ mV y $92,75 \pm 2,72\%$, respectivamente. Los estudios de liberación in vitro revelaron una liberación completa de moxifloxacino al cabo de 10 días.

[0027] En el trabajo de Yan et al. (2021), la dexametasona mostró una liberación modificada a una tasa constante hasta el día treinta y la genisteína mostró una liberación acumulada del 63% durante cuarenta días. Además, el hidrogel termorresponsivo que contiene un sistema lipídico nanoestructurado inhibió la proliferación, migración y transición epitelial-mesenquimal de las células

epiteliales del cristalino del ojo en ensayos in vitro. Por tanto, la preparación demostró ser prometedora para reducir la opacificación capsular después de la cirugía de cataratas.

[0028] El trabajo de Kassae y Mahboobian (2022) describe una nanoemulsión que contiene besifloxacin para administración ocular.

[0029] Como nanoemulsión, el portador de Kassae y Mahboobian presenta una matriz lipídica simple compuesta por un solo lípido líquido (triéster de glicerol) que difiere del empleado en esta invención (triglicéridos del ácido cáprico caprílico). Además de comprender componentes distintos a los utilizados en la presente invención, se obtuvieron mediante emulsificación de baja energía, mientras que a la solución técnica aquí descrita se le aplica un proceso de alta energía.

[0030] El trabajo de Baig et al. (2020) describe el desarrollo de un portador lipídico nanoestructurado catiónico que contiene besifloxacin. Se combinaron un lípido sólido (Compritol®888 ATO) y un lípido líquido (Labrafac® PG) con un solo tensioactivo (Gelucire®50/13) y un agente catiónico (bromuro de cetiltrimetilamonio). Los portadores, que contienen componentes diferentes a los aquí utilizados, en calidad y cantidad, se prepararon mediante el método de ultrasonidos, que también es diferente al utilizado en la invención aquí descrita (homogeneización a alta presión).

[0031] El estudio de Bhattacharjee et al. (2020) describe un liposoma de gel que contiene besifloxacin. Estos liposomas se prepararon mediante el método de hidratación de película fina. Los autores seleccionaron lecitina de soja y

colesterol como componentes de la matriz lipídica. Esta preparación se incorporó al gel Carbopol 940 (1% m/v) para obtener un gel liposomal que contiene besifloxacin. La nanopartícula resultante difiere de la que es objeto de la presente invención en cuanto a tipo, composición y método de obtención.

[0032] El trabajo de Dos Santos et al. (2020) enseña el desarrollo de liposomas catiónicos que contienen besifloxacin. Los liposomas se prepararon mediante el método de hidratación de la película lipídica. Los investigadores utilizaron fosfatidilcolina, colesterol, esterilamina y espermina. Al igual que el documento anterior, la nanopartícula de Dos Santos et al. difiere de la que es objeto de la presente invención en cuanto a tipo, composición y método de obtención.

[0033] El documento BR1020180762494 describe la preparación de una nanoemulsión que contiene rifampicina para el tratamiento de la infección oftálmica causada por *Mycobacterium tuberculosis* mediante el método de homogeneización a alta presión. La nanoemulsión se preparó utilizando un lípido líquido (ácido oleico) y un tensioactivo (polisorbato 80) en concentraciones muy particulares 1,0 m/m y 0,9 m/m, respectivamente. Además, la nanoemulsión de rifampicina puede recubrirse con sulfato de polimixina B. Nuevamente, la nanoemulsión de BR1020180762494 se diferencia del SLN de la presente invención en cuanto al tipo de formulación, la calidad y cantidad de los componentes y el método de obtención, además de que el antibiótico transportado también es diferente.

[0034] El documento BR1020140230505 describe un

portador lipídico nanoestructurado catiónico que contiene acetato de dexametasona y sulfato de polimixina B para uso oftálmico. Las nanopartículas comprenden: un ácido graso insaturado, un ácido graso saturado, lecitina, un tensioactivo no iónico, acetato de dexametasona, un agente espesante, un tensioactivo catiónico y sulfato de polimixina B.

[0035] A pesar de las amplias enseñanzas, la composición y concentración de los componentes utilizados en la preparación de nanopartículas lipídicas descritas en BR1020140230505 son particularmente aplicables a la encapsulación de acetato de dexametasona. Por lo tanto, no sería posible extrapolar la solución de BR1020140230505 para preparar un SLN que contenga el antibiótico besifloxacin, como se describe a continuación.

[0036] El documento US20160128944A1 divulga una nanopartícula que comprende un núcleo que comprende uno o más agentes activos, incluyendo besifloxacin, un tensioactivo y una o más capas de recubrimiento que comprenden uno o más lípidos. A pesar de la mención de varias composiciones lipídicas de besifloxacin que contienen el fármaco, un tensioactivo y un lípido, ninguna de ellas comprende un lípido líquido, un lípido sólido, un tensioactivo y un cotensioactivo, formulados en un SLN mediante homogeneización a alta presión.

[0037] En comparación con los portadores lipídicos nanoestructurados de los documentos anteriores, el SLN de la presente invención, específico para encapsular besifloxacin, permanece estable durante 90 días después de su preparación, significativamente por encima de otros

similares ya descritos. Este efecto inesperado tiene el potencial de permitir el desarrollo de besifloxacin en un producto más efectivo y seguro para la prevención y el tratamiento de infecciones bacterianas oculares y con una larga estabilidad en el almacenamiento.

[0038] El SLN que contiene besifloxacin que se describe aquí de una manera sin precedentes fue diseñado mediante el uso de métodos bien establecidos en la industria farmacéutica y componentes aprobados por los organismos reguladores, lo que favorece una rápida adopción a escala industrial.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0039] La presente invención proporciona sistemas lipídicos nanoestructurados (SLN) que contienen besifloxacin encapsulada en una matriz lipídica compleja compuesta por un lípido sólido, un lípido líquido, un tensioactivo y un cotensioactivo.

[0040] En ciertas concretizaciones del sistema lipídico nanoestructurado que contiene besifloxacin, el lípido sólido es aceite de palma hidrogenado, el lípido líquido es triglicérido del ácido cáprico caprílico (TACC), el tensioactivo es fosfatidilcolina y el cotensioactivo es monooleato de polioxietilén sorbitán.

[0041] En otro aspecto de la invención, las proporciones de aceite de palma hidrogenado, triglicéridos del ácido cáprico caprílico (TACC), fosfatidilcolina y monooleato de polioxietilén sorbitán en el SLN que contiene besifloxacin están de acuerdo con la ecuación general:

$$DHM = 130 + 74,1 Sof + 152 TACC + 187,7Lip - 314,4 Tw + 153 TACC * TACC + 69,1Tw * Tw - 42,63Sof * TACC - 18,82Sof * Lip - 64,0 TACC *$$

$Tw - 37,4Lp * Tw$.

[0042] En concretizaciones preferidas de la invención, el SLN contiene 25 mg de besifloxacin y comprende de 3,0 a 7,0% (m/m) de aceite de palma hidrogenado, de 1,0 a 2,0% (m/m) de triglicéridos del ácido cáprico caprílico (TACC), de 1,0 a 2,0% (m/m) de fosfatidilcolina y de 2,0 a 4,0% (m/m) de monooleato de polioxietilén sorbitán.

[0043] En otra concretización de la invención, el SLN que contiene besifloxacin está recubierto adicionalmente con un agente antibacteriano catiónico. En un aspecto preferencial, el agente catiónico es sulfato de polimixina B, que se puede aplicar para recubrir el SLN a una concentración entre 1000 y 5000 UI/mL.

[0044] Otro aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el SLN que contiene besifloxacin, uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables y/o uno o más ingredientes farmacéuticos activos adicionales.

[0045] En otra concretización de la invención, se prevén usos del SLN que contiene besifloxacin o de la composición farmacéutica que lo comprende para preparar un medicamento para tratar infecciones bacterianas oftálmicas. En concretizaciones preferenciales, dicha infección bacteriana oftálmica afecta a un animal de ganado, un animal de compañía y/o un paciente humano, causando, por ejemplo, conjuntivitis, queratitis, blefaritis o endoftalmitis. La infección bacteriana es causada tanto por bacterias Gram-positivas como Gram-negativas. Entre los principales microorganismos que afectan al ojo se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*,

Streptococcus pneumoniae, *Haemophilus influenzae* y *Pseudomonas aeruginosa*.

[0046] En otra concretización de la invención, se proporciona un método para tratar un mamífero, que comprende administrar al mamífero que necesita el tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz del SLN que contiene besifloxacinina o de la composición farmacéutica que lo comprende. En ciertas concretizaciones, el mamífero requiere tratamiento para, por ejemplo, conjuntivitis, queratitis, blefaritis o endoftalmitis causadas por una infección bacteriana.

[0047] En concretizaciones preferenciales, el mamífero es un animal de ganado, un animal de compañía o un paciente humano que requiere tratamiento para una infección bacteriana oftálmica causada por bacterias Gram-positivas o Gram-negativas. Entre los principales microorganismos que afectan al ojo se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Pseudomonas aeruginosa*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0048] Para ayudar a identificar las principales características de la presente invención, se presentan las siguientes figuras:

La figura 1 ilustra la fórmula bidimensional de besifloxacinina, extraída del sitio web ChemSpider.com.

[0049] La figura 2 representa la microscopía óptica, en la que A: Besifloxacinina en medio acuoso. B: Softisan®154. C: mezcla de Softisan®154 (1,0 g) y besifloxacinina (5,0 mg). D: mezcla de Softisan®154 (1,0 g) con exceso de besifloxacinina (6,0 mg).

[0050] La figura 3 se refiere a la estructura molecular de los principales componentes de Softisan®154: ácido esteárico y ácido palmítico/triglicéridos (Fuente: *European Chemical Agency*).

[0051] La figura 4 ilustra los efectos cuadráticos y lineales sobre el diámetro hidrodinámico medio (DHM).

[0052] La Figura 5 presenta gráficos de contorno del modelo matemático CLN-BF para DHM, que contiene las siguientes variables: Softisan®154, TACC, Lipoid® S100 y Tween 80.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0053] A menos que se especifique lo contrario, los términos utilizados en esta especificación tienen sus significados ordinarios en la técnica, dentro del contexto de la divulgación y en el contexto específico en el que se utiliza cada término. A continuación, o en otras partes de la especificación, se analizan ciertos términos que se utilizan para describir la divulgación para brindar orientación adicional al profesional con respecto a la descripción de la divulgación. Las publicaciones citadas en este documento y el material del que se citan se incorporan específicamente por referencia en su totalidad.

[0054] Se apreciará que una misma cosa puede decirse de diferentes maneras. En consecuencia, se pueden utilizar términos alternativos y sinónimos para cualquiera o más de los términos analizados aquí. No se debe dar ninguna importancia especial al hecho de si un término se desarrolla o se discute aquí. Se proporcionan sinónimos para ciertos términos, pero el ejemplo de algunos sinónimos no excluye el posible uso de otros que pueden no estar enumerados aquí.

[0055] En esta invención, se proporcionan sistemas lipídicos nanoestructurados (SLN) que comprenden besifloxacin encapsulada por una capa lipídica compuesta de aceite de palma hidrogenado (Softisan 154), triglicéridos del ácido cáprico caprílico (TACC), monooleato de polioxietilén sorbitán (polisorbato 80 o Tween 80), fosfatidilcolina (Lipoid S100). Dicho SLN puede recubrirse además con un agente antibacteriano catiónico, por ejemplo, polimixina B.

[0056] Como se utiliza en esta invención, las expresiones "sistema lipídico nanoestructurado" o "portador lipídico nanoestructurado" denotan partículas lipídicas que tienen una estructura formada por uno o más lípidos farmacéuticamente aceptables, en presencia de uno o más tensioactivos farmacéuticamente aceptables, cuyo diámetro medio de partícula es menor de 1000 nanómetros (nm), medido mediante técnicas de medición de tamaño de partícula convencionales bien conocidas por los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, difracción láser o dispersión dinámica de luz.

[0057] En algunas concretizaciones de la invención, el SLN tiene un tamaño de partícula medio, denotado por el diámetro hidrodinámico medio (DHM), medido por dispersión de luz dinámica, igual o menor que aproximadamente 200 nm. En formas de concretización de la invención, el DHM es de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 nm, de aproximadamente 50 a aproximadamente 190 nm, o de aproximadamente 70 a aproximadamente 180 nm. En una forma preferencial de la invención, el DHM del SLN es de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 100 nm.

[0058] Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "lípidos farmacéuticamente aceptables" abarca un amplio espectro de aceites y grasas como, por ejemplo, ácidos grasos, mono-, di- o triglicéridos de cadena media o larga, o mezclas de los mismos. Los lípidos farmacéuticamente aceptables de la invención pueden estar en estado sólido o líquido a temperatura ambiente.

[0059] Por ejemplo, los lípidos sólidos aplicables en el presente contexto pueden seleccionarse entre triglicéridos de ácidos grasos saturados (Witepsol® E85), aceite de palma hidrogenado (Softisan® 154), triestearina (Dynasan® 118), monoestearato de glicerilo y ácido esteárico. Los lípidos líquidos relevantes pueden ser monocaprilato de glicerol tipo I (Imwitor® 988), miristato de isopropilo y triglicéridos de ácido cáprico y caprílico (Miglyol® 812).

[0060] En una concretización preferencial, el SLN está compuesto de un lípido sólido farmacéuticamente aceptable, que es aceite de palma hidrogenado, y un lípido líquido farmacéuticamente aceptable, que son triglicéridos de ácido cáprico y caprílico.

[0061] Como se utiliza en este documento, la expresión "tensioactivo farmacéuticamente aceptable" denota una sustancia farmacéuticamente aceptable, o una combinación de las mismas, que reduce la tensión superficial de un líquido y disminuye la tensión interfacial entre dos líquidos. Los tensioactivos son generalmente compuestos orgánicos que son anfipáticos, lo que significa que contienen grupos hidrófobos (sus "colas") y grupos hidrófilos (sus "cabezas"). Por lo tanto, suelen ser poco solubles en

disolventes orgánicos y agua.

[0062] Un tensioactivo se puede clasificar por la presencia o ausencia de grupos formalmente cargados en su cabeza. Un tensioactivo no iónico no tiene grupos de carga en su cabeza. La cabeza de un tensioactivo iónico lleva una carga neta, si la carga es negativa, el tensioactivo es aniónico; si la carga es positiva es catiónico; si contiene una cabeza con dos grupos de cargas opuestas es zwitteriónico.

[0063] En el contexto de esta invención, tensioactivos y estabilizadores son sinónimos utilizados indistintamente a lo largo de la descripción. Los tensioactivos aplicables en el contexto de la invención incluyen monooleato de polioxietilén sorbitán (polisorbato 80 o Tween 80), poloxámero 407 (Kolliphor® P 407), poloxámero 188 (Kolliphor® P 188), monooleato de sorbitán (Span 80) y fosfatidilcolina de soja (Lipoid®S 100). Los tensioactivos particularmente relevantes para la invención son la fosfatidilcolina de soja (Lipoid®S 100) y el monooleato de polioxietilén sorbitán (Tween 80).

[0064] En el contexto de la invención, la expresión "agente antibacteriano catiónico" representa un grupo de compuestos con una carga neta positiva que se unen a la pared celular cargada negativamente de las bacterias y desestabilizan la integridad estructural de la pared y reducen la viabilidad bacteriana. El recubrimiento del SLN que contiene besifloxacin con un agente antibacteriano catiónico aumenta el tiempo de residencia del producto en la superficie ocular, aumenta la biodisponibilidad del fármaco y favorece el efecto antibiótico promovido por la

besifloxacin.

[0065] Los agentes antibacterianos catiónicos aplicables a la presente invención pueden seleccionarse, por ejemplo, entre compuestos de bajo peso molecular, polímeros sintéticos o polipéptidos. En ciertas concretizaciones de la invención, el SLN que contiene besifloxacin está recubierto adicionalmente con una corona formada por un agente antibacteriano catiónico, que es, en particular, polimixina B.

[0066] El SLN que contiene besifloxacin de la presente invención se puede preparar, por ejemplo, mediante un método de homogeneización a alta presión. En este protocolo, las fases oleosa y acuosa se calientan bajo agitación por separado, hasta que la besifloxacin se disuelve completamente y los tensioactivos se dispersan. En general, la solubilización es seguida por la dispersión de la fase acuosa en la fase oleosa y la posterior exposición a un alto cizallamiento. El protocolo se completa transfiriendo la mezcla al homogeneizador de alta presión.

[0067] Considerando sus características, los sistemas lipídicos nanoestructurados presentan estabilidad con aspecto homogéneo, tamaño de partícula e índice de polidispersidad dependiente de los siguientes factores: propiedades físico-químicas de los componentes; concentración de excipientes y fármaco; método de preparación y rendimiento del equipo; orden de adición de fases; temperatura; velocidad; tiempo de emulsificación y homogeneización; y condiciones de almacenamiento (DEKIC; PRIMORAC, 2017).

[0068] Para lograr la estabilidad de SLN, se deben

combinar componentes específicos en una concentración adecuada y procesarse de una manera particular. Por lo tanto, cada fórmula es única y solo puede lograrse mediante pruebas empíricas exhaustivas.

[0069] Entre estos factores, la proporción adecuada de lípido(s) y tensioactivo(s) es de importancia fundamental para la estabilidad de los SLN. Los principales fenómenos de inestabilidad, resultantes de combinaciones inadecuadas de excipientes de fármacos, se refieren a la coalescencia, floculación, maduración de Ostwald, cremación y sedimentación (ALI et al., 2017).

[0070] El término "estabilidad", tal como se utiliza a lo largo del texto, se refiere al mantenimiento de las características físicas del SLN, como, por ejemplo, el tamaño, la morfología y la uniformidad de la distribución del tamaño de las partículas del SLN. Las formas de evaluar cada uno de estos parámetros son ampliamente conocidas por los expertos en la materia y se resumen particularmente en el trabajo de Phan y Haes (2019).

[0071] Una forma eficiente de probar y determinar las proporciones apropiadas de lípido sólido, lípido líquido, tensioactivo y cotensioactivo es a través de herramientas de optimización de experimentos estadísticos, como, por ejemplo, el diseño compuesto central, entre otras. Utilizando herramientas de este tipo, es posible establecer la influencia de uno o más componentes del SLN (es decir, variables independientes) sobre un parámetro representativo de la calidad del SLN, como, por ejemplo, el diámetro hidrodinámico medio (DHM), y proporcionar una ecuación general capaz de prever todas las configuraciones de las

variables independientes que darán como resultado valores deseados para la variable dependiente.

[0072] En una concretización preferencial, el SLN que contiene besifloxacina incluye Softisan®154 como lípido sólido, TACC como lípido líquido, Lipoid®S100 (aceite de palma hidrogenado) como tensioactivo y Tween 80 (monooleato de polioxietilén sorbitán) como cotensioactivo. En la concretización preferencial, las proporciones de los componentes que darán como resultado SLN estables y dentro del rango de DHM deseable se dan mediante la fórmula general:

$$\begin{aligned} DHM = & 130 + 74,1 Sof + 152 TACC + 187,7 Lip - 314,4 Tw + 153 TACC * TACC \\ & + 69,1 Tw * Tw - 42,63 Sof * TACC - 18,82 Sof * Lip - 64,0 TACC \\ & * Tw - 37,4 Lip * Tw \end{aligned}$$

dónde:

DHM representa el diámetro hidrodinámico medio de las partículas de SLN, medido mediante dispersión de luz dinámica;

Sof representa el porcentaje de masa de aceite de palma hidrogenado (Softisan® 154) en relación a la masa de la composición;

TACC representa el porcentaje de masa de triglicéridos de ácido cáprico y caprílico (Miglyol® 812) en relación a la masa de la composición;

Lip representa el porcentaje de masa de fosfatidilcolina de soja (Lipoid®S 100) en relación a la masa de la composición;

y Tw representa el porcentaje de masa de monooleato de polioxietilén sorbitán (Tween 80) en relación con la masa de la composición.

[0073] En una concretización preferencial, el SLN

tiene la siguiente constitución:

- Aceite de palma hidrogenado en una concentración de 3,0 a 7,0% m/m;
- Triglicéridos del ácido cáprico caprílico en una concentración de 1,0 a 2,0% m/m;
- Fosfatidilcolina en una concentración de 1,0 a 2,0% m/m;
- Monooleato de polioxietilén sorbitán en una concentración de 2,0 a 4,0% m/m.

[0074] En otro aspecto de la invención, el SLN se recubre adicionalmente con polimixina B. En esta concretización, el recubrimiento se realiza con 1000 a 5000 UI/mL de sulfato de polimixina B.

[0075] En una concretización, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los SLN descritos en este documento y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones pueden prepararse y formularse utilizando métodos y excipientes convencionales, tales como los descritos, por ejemplo, en las farmacopeas británica, europea y estadounidense, Remington's Pharmaceutical Sciences (REMINGTON; GENNARO, 1990), Martindale: The Extra Pharmacopoeia (MARTINDALE; RAYNOLDS, 1996) y en Prista's Pharmaceutical Technology (PRISTA et al., 1996).

[0076] Las composiciones farmacéuticas preferenciales pueden formularse para administración tópica, particularmente para aplicación oftálmica. Las formas oftálmicas tópicas (como colirios) son estériles y pueden ser preparaciones líquidas, semisólidas o sólidas, que pueden contener además uno o más ingredientes farmacéuticos

activos destinados a ser aplicados en la conjuntiva, el saco conjuntival o los párpados.

[0077] En una concretización adicional, la invención proporciona el uso de SLN que contiene besifloxacina para preparar un medicamento para tratar enfermedades infecciosas bacterianas que afectan a los ojos, por lo tanto, oftálmicas u oculares. Entre las infecciones tratables con un medicamento que contiene el SLN de la presente invención se encuentran aquellas causadas por bacterias Gram-positivas o Gram-negativas, tales como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Dichas infecciones bacterianas causan, por ejemplo, conjuntivitis, queratitis, blefaritis y endoftalmitis.

[0078] Como se utiliza en este documento, el término "tratar" incluye extinguir, inhibir sustancialmente, retardar o revertir la progresión de una enfermedad o trastorno, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos de una enfermedad o trastorno, o prevenir sustancialmente la aparición de los síntomas clínicos de una enfermedad o trastorno.

[0079] En otra concretización de la invención, se proporciona un método para tratar un mamífero que comprende administrar al mamífero que necesita el tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz del SLN que contiene besifloxacina o de la composición farmacéutica que lo comprende, como se describió anteriormente. En concretizaciones preferenciales, el mamífero es un animal de ganado, un animal de compañía o un paciente humano que requiere tratamiento para una infección bacteriana oftálmica

causada por bacterias Gram-positivas o Gram-negativas, tales como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Pseudomonas aeruginosa*. En ciertas concretizaciones, la enfermedad causada por la infección bacteriana y tratada mediante el método proporcionado en este documento es, por ejemplo, conjuntivitis, queratitis, blefaritis o endoftalmitis.

[0080] Como se utiliza en este documento, la expresión "terapéuticamente eficaz" denota una cantidad de un ingrediente activo (por ejemplo, besifloxacin) eficaz para lograr un efecto clínico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz varía según la naturaleza de la condición a tratar, la duración de la actividad deseada y la edad y condición del sujeto; en última instancia, la determina el profesional de la salud.

[0081] Los siguientes ejemplos pretenden ser puramente ejemplificativos de la invención. Se presentan de tal forma que se proporcione al experto en la materia una descripción completa de cómo se prepara, evalúa y utiliza el SLN de esta invención. Un experto en la materia, a la luz de la presente divulgación, reconocerá que se pueden realizar muchos cambios a las concretizaciones específicas que se divulgan y aun así obtener un resultado similar o equivalente sin alejarse del espíritu y alcance de la invención.

EJEMPLOS DE IMPLEMENTACIÓN

Ejemplo 1: Preparación de un sistema lipídico
nanoestructurado que contiene besifloxacin - Desarrollo y
optimización

MATERIAL

- Besifloxacin, Jinan Shengqi Pharmaceutical Co., Ltd., China con un contenido especificado del 99,93%.

Lípidos líquidos:

- El dibehenato de glicerol (Compritol® 888), glicéridos de estearoilo de polioxilo-32 (Gelucire® 50/13), diestearato de glicerol (Precirol® ATO 5), glicéridos de laurilo de polioxilo-32 (Gelucire® 44/14), dioleato de poliglicerilo-3 (Plurol® Oleique CC 497), dicaprilato/dicaprato de propilenglicol (Labrafac™ PG), monolinoleato de glicerilo (Maisine® CC), triglicéridos de ácido cáprico/caprílico (Labrafac™ lipofílico WL 1349) fueron amablemente donados por Gatefossé (Francia).
- Los monoglicéridos diacetilados (Dynacet® 285), monocaprilato de glicerol tipo I (IMWITOR®988), monocapriilo/caprato de glicerol tipo I (IMWITOR® 742), diéster de propilenglicol (Mygliol® 840) y triglicéridos de ácido cáprico y caprílico (Miglyol® 812) fueron amablemente donados por IOI Oleo Chemical (Alemania).
- Aceite de semilla de algodón (Super Refined Cottonseed NF-LQ-MH), aceite de ricino (Super Refined Sesame NF-LQ-MH), aceite de girasol (Super Refined Sunflower USP-LQ-MH), aceite de maíz (Super Refined Corn NF-LQ®), aceite de oliva (Super Refined Olive-LQ-MH), aceite de sésamo (Super Refined Sesame NF-LQ-MH), aceite de soja (Super Refined Soybean USP NP-LQ), palmitato de isopropilo (Cromadol IPP), miristato de isopropilo (Cromadol IPM) fueron

amablemente donados por Croda (Brasil).

- Aceite de almendras (Almond oil N.F), Welch, Holme & Clark
- El caprilato/caprato de glicerilo (Capmul® MCM EP), el tricaprilato y tricaprato de glicerilo (Captex 300 EP/NF®) y los triglicéridos de ácido oleico (Captex® GTO) fueron amablemente donados por Abitec (EE. UU.).
- El ácido oleico y el aceite mineral fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Brasil).

Lípidos sólidos:

- Los triglicéridos de ácidos grasos saturados (Witepsol® E85), aceite de palma hidrogenado (Softisan® 154) y triestearina (Dynasan® 118) fueron amablemente donados por IOI Oleo Chemical (Alemania).
- El ácido esteárico y el monoestearato de glicerilo fueron adquiridos de Synth (Brasil).

Tensioactivos:

- La fosfatidilcolina de soja (Lipoid® S100) se adquirió de Lipoid GMBH.
- El monooleato de polioxietilén sorbitán (polisorbato 80) se adquirió de Sigma-Aldrich.
- El poloxámero 407 (Kolliphor® P 407) y el poloxámero 188 (Kolliphor® P 188), tensioactivos no iónicos, fueron gentilmente donados por BASF (Brasil).
- El Span 80 (monooleato de sorbitán) fue donado por CRODA (Brasil).

MÉTODOS

Determinación de la solubilidad de besifloxacin en lípidos

líquidos

[0082] La solubilidad de besifloxacin en lípidos líquidos se determinó mediante el método de saturación adaptado de Kasongo et al. (2011). Se transfirió una cantidad equivalente a 1,0 mg de besifloxacin a un vaso de precipitados de 20,0 mL que contenía 1,0 g de lípido líquido. La mezcla se colocó en un baño calefactor a 75 ± 5 °C y 200 rpm agitando durante 60 min. Transcurrido el tiempo se realizó una inspección visual y una inspección mediante microscopía óptica (Motic SMZ/165 Series, Motic®, China) para detectar la presencia o ausencia de partículas en el lípido. La solubilidad del fármaco en el lípido se determinó por su concentración más alta en la que no se observaron partículas suspendidas.

Determinación de la solubilidad de besifloxacin en lípidos sólidos

[0083] La solubilidad de besifloxacin en lípidos sólidos se evaluó según Kasongo et al. (2011). Se añadió 1,0 mg de besifloxacin a 1,0 g de lípido sólido; la mezcla se calentó a 10 °C por encima del punto de fusión de cada lípido, bajo agitación constante. Se tomaron alícuotas y se observaron bajo un microscopio óptico; se ajustó la concentración de besifloxacin hasta que se observaron partículas del antibiótico.

Desarrollo y optimización de un sistema lipídico nanoestructurado que contiene besifloxacin

[0084] Se preparó una cantidad igual a 100,0 g de la formulación como se muestra en la Tabla 4. La fase oleosa y la fase acuosa se calentaron por separado en un baño a $70,0 \pm 5,0$ °C, bajo agitación utilizando un agitador básico RTC

(IKA®, Ika Works, Inc. Alemania) a 200 rpm, hasta la completa solubilización de la besifloxacin y la dispersión de los tensioactivos. La fase acuosa se dispersó en la fase oleosa bajo agitación magnética a 400 rpm durante 1 min. La mezcla se sometió a alto cizallamiento utilizando un equipo T25 Ultra-Turrax® (IKA®, Ika Works, Inc. Alemania) a 4.000 rpm durante 5 min; luego de esta etapa, la mezcla formada fue transferida al homogeneizador tipo pistón-orificio de alta presión (Nano DeBEE, BEE International, Inc. Estados Unidos) utilizando una presión de 10.000 Psi (68,95 MPa) y 5 ciclos sucesivos.

Determinación del diámetro hidrodinámico medio (DHM) y del índice de polidispersidad (IP)

[0085] El diámetro hidrodinámico medio de partícula (Z-ave) y el índice de polidispersidad (IP) se determinaron mediante el método de dispersión dinámica de luz (DLS) en el equipo Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). Este método determina el DHM basándose en fluctuaciones en la intensidad de la luz láser dispersa cuando incide sobre el sistema emulsionado. Las lecturas se realizaron por triplicado después de diluir la muestra en una proporción de 1:100 en agua Milli-Q. Se utilizó un ángulo de 90° y una cubeta de poliestireno con un paso óptico de 1 cm.

Determinación del potencial zeta (PZ)

[0086] El potencial zeta se determinó utilizando el equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). En este equipo, la movilidad electroforética se convierte en potencial zeta utilizando la ecuación de Henry (ecuación 1)

$$UE = \frac{2\varepsilon z f(\kappa a)}{3\eta} \quad (1)$$

donde ε es la constante dieléctrica y η es la viscosidad del disolvente a 25 °C, UE es la movilidad electroforética, z es el potencial zeta y $f(\kappa a)$ es la función de Henry. La intensidad de campo aplicada fue de 20 V/cm. La conductividad del agua Milli-Q se ajustó a 50 μ S/cm utilizando una solución de NaCl al 0,9% (m/v).

Determinación del pH

[0087] El valor de pH de las formulaciones se determinó utilizando un medidor de pH (SevenExcellence™, Mettler Toledo® Inc. Estados Unidos) previamente calibrado con un estándar ácido (pH: 4,00) y básico (pH: 7,00), utilizando un electrodo de inmersión directa a $20,0 \pm 5,0^\circ$ C.

RESULTADOS

Evaluación de la solubilidad de la besifloxacin en lípidos líquidos

[0088] La Tabla 1 muestra la solubilidad de besifloxacin en diferentes lípidos líquidos. Los lípidos que solubilizaron mayor cantidad del fármaco fueron: Imwitor®988 (1 mg/g) y miristato de isopropilo (<1 mg/g), sorprendentemente. Los demás lípidos indicados en la Tabla 1 no solubilizaron la besifloxacin.

Tabla 1 - Perfil de solubilidad de besifloxacin en lípidos líquidos.

Lípidos líquidos	Solubilidad	Cantidad (mg/g)
Monocaprilato de glicerol tipo I (Imwitor®988)	+	=1
Miristato de isopropilo	+	≤1
Capmul MCM EP	-	0
Captex 300 EP/NF	-	0
Captex GTO	-	0
Cetiol OE	-	0
Monoglicéridos diacetilados	-	0
Aceite de maíz	-	0
Aceite de semilla de algodón	-	0
Aceite de semilla de uva	-	0
Aceite de avellana		0
Aceite mineral	-	0
Aceite de oliva	-	0
Aceite de girasol	-	0
Aceite de ricino	-	0
Aceite de sésamo	-	0
Aceite de soja	-	0
Aceite de germen de trigo	-	0
Palmitato de isopropilo	-	0
3-dioleato de poliglicerilo	-	0
Dicaprilato/dicaprato de propilenglicol	-	0
Triglicéridos de ácidos cápricos/caprílicos	-	0

+: ausencia de partículas

[0089] Los lípidos normalmente utilizados en preparaciones oftálmicas son aceites vegetales y los triglicéridos de cadena corta y media debido a su reducida toxicidad (LALLEMAND et al., 2012). La capacidad de solubilización de los lípidos depende de la longitud de la cadena, la polaridad y la flexibilidad de la cadena de acilo, la saturación e insaturación de la cadena, la temperatura de fusión y la estructura del fármaco (SINAROV et al., 2020; KATEV et al., 2021).

[0090] Imwitor®988 es una mezcla compuesta por 45-75% de monoglicéridos, 20-50% de diglicéridos de cadena media (C8 y C11) y 10% son principalmente triglicéridos (IOI OLEOCHEMICAL, 2021) (Figura 3). Imwitor®988 tiene un carácter anfifílico con una sola cadena de hidrocarburo y un grupo principal hidrófilo. De esta forma, Imwitor®988 puede actuar como agente de disolución de fármacos. Este lípido se utiliza con frecuencia en sistemas auto-emulsionantes para administración oral, actuando como lípido secundario o cotensioactivo (DEVRAJ et al., 2013; KAZI et al., 2020; ABDALLAH et al., 2020). A pesar de presentar una solubilidad mínima (1 mg de besifloxacin/g de Imwitor®988), Imwitor®988 no está actualmente aprobado para uso oftálmico.

Evaluación de la solubilidad de la besifloxacin en lípidos sólidos

[0091] La microscopía óptica es el método más utilizado para seleccionar lípidos sólidos (MONTEIRO et al., 2017; PATIL-GADHE; POKHARKAR 2016; KASONGO et al., 2011). En la Tabla 2 se presentan los resultados de la solubilidad de besifloxacin en diferentes lípidos sólidos utilizando microscopía óptica (Motic SMZ/165 Series, Motic, China). Los

lípidos se clasificaron según la presencia de partículas de besifloxacin. Se seleccionó Softisan®154 porque no contiene partículas como se muestra en la Figura 2.

Tabla 2 - Perfil de solubilidad de besifloxacin en lípidos sólidos.

Lípidos sólidos	Cantidad mg/g	Punto de fusión (°C)
Softisan® 154	5	53-58
Gelucire® 50/13	1	44-50
Precirol® ATO 5	1	56-66
Compritol® 888 ATO	-	70-75
Dynasan® P60	1	58-62
Dynasan® 118	1	72-75
Witepsol® E85	-	42-44
Gelucire ®44/10	-	44
Monoestearato de glicerilo	1	55 - 65
Ácido esteárico	1	50-60

[0092] Las figuras 2A, 2B, 2C y 2D muestran imágenes de portaobjetos de microscopía óptica de partículas de besifloxacin dispersas en agua y Softisan®154, en diferentes proporciones. La figura 2A muestra partículas de besifloxacin aglomeradas y no solubilizadas en el medio acuoso. La figura 2B muestra la disposición de Softisan®154 libre de besifloxacin. En la Figura 2C, no es posible observar ninguna partícula de besifloxacin en Softisan®154. Este resultado confirmó sorprendentemente la solubilidad de la besifloxacin en este lípido, en una cantidad aproximada de 5,0 mg/g. Sin embargo, en la Figura 2D, se puede observar la presencia de partículas de besifloxacin, lo que demuestra

que cantidades superiores a 5,0 mg/g de besifloxacin no serán solubilizadas por Softisan®154.

[0093] Softisan®154 es un aceite de palma hidrogenado compuesto principalmente de glicéridos de cadena larga, ácido esteárico (C18) y ácido palmítico (C16) (Figura 3). Es un excipiente utilizado como fase oleosa en formulaciones de liberación modificada (Uronnachi et al., 2020; Monteiro et al., 2017; Shazly et al., 2017, Stelzner et al., 2018). También se puede utilizar como coadyuvante de recubrimiento en formulaciones de liberación modificada; como modificador de viscosidad para formulaciones líquidas y semisólidas a base de aceite; en la preparación de supositorios, para reducir la sedimentación de componentes suspendidos y mejorar el proceso de solidificación; y en la formulación de rellenos líquidos y semisólidos para cápsulas de gelatina dura (Handbook of Green Chemicals, 2004).

*Desarrollo y optimización del sistema lipídico
nanoestructurado que contiene besifloxacin: preparaciones
preliminares*

[0094] Los sistemas lipídicos nanoestructurados preliminares presentaron una fase oleosa constituida por Softisan®154 para solubilizar una mayor cantidad de besifloxacin entre los lípidos evaluados, como se mencionó en los ítems anteriores. Respecto a los tensioactivos, se probaron polisorbato 80, poloxámero 407, poloxámero 188, Span 80 y Lipoid®S 100 por presentar menor toxicidad, menor incidencia hemolítica y menor irritación de los tejidos oculares, además de su aplicación y aceptación por parte de las agencias reguladoras en el desarrollo de preparaciones oftálmicas y colirios comercializados.

[0095] En la Tabla 3 se presentan los sistemas lipídicos nanoestructurados desarrollados utilizando Softisan®154 como único componente de la fase oleosa en las concentraciones de 3,0 y 5,0% (m/m) y tensioactivos hidrofílicos de forma independiente en una concentración de 1,0% (m/m). Las preparaciones que contenían Tween 80 y poloxámero 407 mostraron separación de fases después de 24 horas de preparación. Se observó una incompatibilidad del poloxámero 188 con los demás componentes de la formulación. Por lo tanto, el poloxámero 188, un tensioactivo prometedor, fue descartado para las etapas posteriores.

Tabla 3 - Sistema lipídico nanoestructurado que contiene besifloxacin con tensioactivos independientes.

Composición	% (m/m)	Estabilidad
SLN 1		
Softisan 154	3,0	< 24 h
Tween 80	1,0	
Agua purificada	96,0	
SLN 2		
Softisan 154	5,0	< 24 h
Tween 80	1,0	
Agua purificada	94,0	
SLN 3		
Softisan 154	3,0	< 24 h
Poloxámero 407	1,0	
Agua purificada	96,0	
SLN 4		
Softisan 154	5,0	< 24 h
Poloxámero 407	1,0	
Agua purificada	94,0	

SLN 5		
Softisan 154	5,0	Separación de fases inmediatamente después de la preparación
Poloxámero 188	1,0	
Agua purificada	94,0	

[0096] Para lograr la estabilidad de los sistemas lipídicos nanoestructurados que contienen besifloxacin, se introdujo en la formulación un tensioactivo lipofílico, Lipoid® S100, a una concentración de 1,0% (m/m), manteniendo los tensioactivos hidrofílicos a una concentración de 1,0% y 3,0% (m/m) para el poloxámero 407 y el Tween 80, respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4 - Sistemas lipídicos nanoestructurados (SLN) que contienen besifloxacin con una mezcla de tensioactivos.

Composición	% (m/m)	Estabilidad
SLN 6		
Softisan 154	3,0	<24 h
Lipoid S 100	1,0	
Poloxámero 407	1,0	
Agua purificada	95,0	
SLN 7		
Softisan 154	3,0	<24 h
Lipoid S 100	1,0	
Tween 80	3,0	
Agua purificada	93,0	

[0097] El uso de Lipoid®S100 no permitió lograr la estabilidad del sistema lipídico nanoestructurado que contiene besifloxacin conteniendo únicamente Softisan 154 como fase lipídica. Se observó inestabilidad incluso utilizando una alta concentración de tensioactivo (concentración de tensioactivo mayor que la fase oleosa).

Este resultado inesperado reveló que las preparaciones consistentes en una matriz lipídica formada únicamente con lípidos sólidos (Softisan®154) tenían su estabilidad comprometida y, sorprendentemente, no permitieron el desarrollo del sistema lipídico nanoestructurado.

[0098] Por lo tanto, la modificación de la matriz lipídica se realizó mediante la introducción de lípido líquido. Esto permite reducir el punto de fusión del lípido sólido, manteniendo la matriz lipídica en forma sólida a temperatura ambiente y corporal. Los lípidos líquidos preferentemente utilizados en preparaciones oftálmicas son los aceites vegetales y los triglicéridos de cadena corta y media debido a su buena tolerabilidad por los tejidos oculares. Aunque Imwitor 988 es una posible alternativa de uso debido a su capacidad para solubilizar besifloxacin como se demostró previamente, no se han informado estudios de toxicidad en tejidos oculares.

[0099] Por consiguiente, en la presente invención, se decidió utilizar triglicéridos del ácido cáprico caprílico (TACC) como lípido líquido. Se ha demostrado que el TACC no es irritante o tiene un bajo potencial de irritación después de una exposición prolongada al ojo en ensayos in vivo. Además, no mostraron la capacidad de inducir hipersensibilidad después del tratamiento.

[0100] La adición de TACC a la preparación, inesperadamente, permitió lograr la estabilidad del sistema. En referencia a los tensioactivos, además de Lipoid®S100, Tween 80 y poloxámero 407, también se introdujo Span 80.

[0101] La Tabla 5 muestra la composición de las preparaciones con la introducción de lípidos líquidos

(triglicéridos del ácido cáprico caprílico), así como la adición de tensioactivo lipofílico, Span 80.

Tabla 5 - Composición de los sistemas lipídicos nanoestructurados que contienen besifloxacin.

Fórmulas	Composición % (m/m)						
	BSF	Softisan® 154	TACC	Lipoid® S100	Tween 80	Poloxámero 407	Span 80
F1B	-	3,0	1,0	1,0	1,0	-	-
F1	0,015	3,0	1,0	1,0	1,0	-	-
F2B	-	3,0	1,0	1,0	3,0	-	-
F2	0,015	3,0	1,0	1,0	3,0	-	-
F3B	-	3,0	1,0	1,0	-	1,0	-
F3	0,015	3,0	1,0	1,0	-	1,0	-
F4B	-	3,0	1,0	1,0	-	3,0	-
F4	0,015	3,0	1,0	1,0	-	3,0	-
F5B	-	5,0	1,7	1,0	4,0	-	-
F5	0,025	5,0	1,7	1,0	4,0	-	-
F6B	-	5,0	1,7	1,0	-	4,0	-
F6	0,025	5,0	1,7	1,0	-	4,0	-
F7B	-	5,0	1,62	1,62	1,12	-	0,56
F7	0,025	5,0	1,62	1,62	1,12	-	0,56
F8B	-	5,0	1,62	1,62	3,32	-	1,66
F8	0,025	5,0	1,62	1,62	3,32	-	1,66

F1B, F2B, F3B, F4B, F5B, F6B, F7B y F8B: Preparaciones sin besifloxacin; F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7 y F8: Preparaciones que contienen besifloxacin. BSF: Besifloxacin. TACC: Triglicéridos del ácido cáprico caprílico.

[0102] La Tabla 6 presenta los valores del diámetro hidrodinámico medio (DHM) y del índice de polidispersidad

(IP) en el intervalo de tiempo de 3 meses de las preparaciones preliminares que contienen besifloxacina preparadas de acuerdo con la Tabla 5.

Tabla 6 - Diámetro hidrodinámico medio (DHM) e índice de polidispersidad (IP) de las preparaciones que contienen besifloxacina después de 24 horas de preparación.

Fórmulas	DHM (nm)	IP	PZ (mV)	Estabilidad
				máxima (días)**
F1B	222,0 ± 7,5	0,34 ± 0,01	-5.9 ± 0.5	<7
F1	223,1 ± 5,1	0,22 ± 0,01	-4.4 ± 0,8	<7
F2B	180,6 ± 1,2	0,18 ± 0,01	-6.0 ± 0.5	=90
F2	180,9 ± 1,9	0,19 ± 0,01	-5,6 ± 1,1	=90
F3B	211,4 ± 9,1	0,19 ± 0,01	-1,5 ± 0.1	<7
F3	210,2 ± 0,4	0,23 ± 0,01	-1,7 ± 0.5	<7
F4B	105,5 ± 4,6	0,27 ± 0,05	+ 0,8 ± 0.1	<7
F4	102,9 ± 3,4	0,21 ± 0,03	+ 0,6 ± 0.1	<7
F5B	87,6 ± 0.8	0,15 ± 0,04	- 6,0 ± 0.1	<21
F5	85,4 ± 0,7	0,21 ± 0,01	+3,2 ± 0,1	<21
F6B	55,5 ± 2,2	0,13 ± 0,01	-1,86 ± 0,1	<7
F6	52,4 ± 2,7	0,03 ± 0,01	+5,8 ± 0,1	<7
F7B	Separación de fases después de la preparación			<1
F7	Separación de fases después de la preparación			<1
F8B	Separación de fases después de la preparación			<1
F8	Separación de fases después de la preparación			<1

F1B, F2B, F3B, F4B, F5B, F6B, F7B y F8B: Preparaciones sin besifloxacina; F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7 y F8: Preparaciones que contienen besifloxacina; *pH de las preparaciones: 5,5 a 5,8. ** Ausencia de separación de

fases; condiciones de prueba: 20 ± 5 °C; Medidas, envasado en botellas y vidrio borosilicato.

[0103] Sorprendentemente, solo las formulaciones F2B y F2 mostraron estabilidad durante 90 días. Las preparaciones conteniendo poloxámero 407 y Lipoid®S100 (F3B, F3, F4B, F4, F6B y F6) mostraron valores de DHM entre $52,4 \pm 2,7$ y $211,4 \pm 9,1$ nm e índice de polidispersidad entre $0,03 \pm 0,01$ y $0,19 \pm 0,01$ (Tabla 6). Estas preparaciones mostraron separación de fases en un intervalo de tiempo igual a 7 días. Además, las preparaciones que contenían Tween 80, Span 80 y Lipoid®S100 (F7B, F7, F8B y F8) mostraron separación de fases inmediatamente después de la preparación. Por lo tanto, el poloxámero 407 y el Span 80 se descartaron para las siguientes etapas.

[0104] Los valores de DHM de las preparaciones obtenidas utilizando Tween 80 y Lipoid®S100 (F1B, F1, F5B y F5) variaron entre $85,4 \pm 0,7$ y $223,1 \pm 5,1$ nm con distribución monomodo. Los índices de polidispersidad variaron entre $0,15 \pm 0,04$ y $0,34 \pm 0,01$. Se observó separación de fases en el período de 7, 21 y 90 días para las preparaciones F1B y F1, F5B y F5, F2B y F2, respectivamente.

[0105] Como se mencionó anteriormente, excepcionalmente, solo las preparaciones F2B (blanca sin el fármaco) y F2 (preparación con el fármaco) (Tabla 7) presentaron un aspecto homogéneo, DHM (nm) e IP sin cambios, en el período de 90 días envasadas en botella de borosilicato a una temperatura de 20 ± 5 °C (Tabla 8).

[0106] La adición de triglicéridos del ácido cáprico caprílico a una concentración de 1,0% (m/m) en la

preparación, manteniendo la concentración de 1,0% (m/m) y 3,0% (m/m) de Lipoid®S100 y Tween 80, respectivamente, permitió lograr estabilidad durante 3 meses. Esta condición única se logró sólo con la presencia de estos tres componentes y en las concentraciones específicas, en la formulación. Las otras formulaciones que no presentaron estos tres componentes en las concentraciones descritas no se mantuvieron estables. La estabilidad física de las preparaciones es una característica esencial para que un producto farmacéutico pueda comercializarse.

Tabla 7 - Composición del sistema lipídico nanoestructurado
F2B (sin besifloxacin) y F2 (con besifloxacin)

	F2B (% m/m)	F2 (% m/m)
Besifloxacin	-	0,015
Softisan®154	3,00	3,00
TACC	1,00	1,00
Lipoid®S100	1,00	1,00
Tween 80	3,00	3,00
Agua purificada	92,00	88,16

[0107] Los resultados mostraron estabilidad de estas preparaciones debido a su aspecto homogéneo, DHM e IP sin ningún cambio en su aspecto visual evidente y se observó una distribución monomodal de las partículas. La preparación F2B mostró valores de DHM entre $180,1 \pm 1,2$ y $185,6 \pm 2,6$ nm; y IP entre $0,18 \pm 0,01$ y $0,19 \pm 0,01$. La formulación F2 presentó valores de DHM entre $178,6 \pm 1,1$ y $185,7 \pm 2,4$ nm; y IP entre $0,19 \pm 0,01$ y $0,23 \pm 0,02$.

Tabla 8 - Diámetro hidrodinámico medio (DHM) e índice de polidispersidad (IP) de los sistemas nanoestructurados que contienen besifloxacin.

Tiempo (días)	Evaluación	Formulaciones	
		F2B	F2
1	Aspecto	Uniforme	Uniforme
	DHM (nm)	180,6 ± 1,2	180,9 ± 1,9
	IP	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,01
	Distribución	Monomodo	Monomodo
7	Aspecto	Uniforme	Uniforme
	DHM (nm)	185,6 ± 0.6	183,8 ± 1.8
	IP	0,19 ± 0,01	0,18 ± 0,01
	Distribución	Monomodo	Monomodo
15	Aspecto	Uniforme	Uniforme
	DHM (nm)	182,2 ± 1.1	182,6 ± 2,3
	IP	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01
	Distribución	Monomodo	Monomodo
30	Aspecto	Uniforme	Uniforme
	DHM (nm)	180,1 ± 1,2	178,6 ± 1,6
	IP	0,18 ± 0,01	0,20 ± 0,02
	Distribución	Monomodo	Monomodo
60	Aspecto	Uniforme	Uniforme
	DHM (nm)	183,6 ± 1,7	183,1 ± 2,8
	IP	0,18 ± 0,01	0,21 ± 0,02
	Distribución	Monomodo	Monomodo
90	Aspecto	Uniforme	Uniforme
	DHM (nm)	185,4 ± 2,0	185,7 ± 2,4
	IP	0,19 ± 0,01	0,23 ± 0,02
	Distribución	Monomodo	Monomodo

[0108] Considerando los sorprendentes resultados

obtenidos en la primera etapa de desarrollo que revelaron una composición única y específica del sistema lipídico nanoestructurado estable (F2B y F2), se realizó la optimización de este sistema que contiene besifloxacin utilizando una herramienta estadística, el diseño compuesto central. Las variables independientes fueron la concentración de Softisan®154, TACC, Lipoid®S100 y Tween 80 (Tabla 9).

[0109] La variable dependiente (respuesta) fue el tamaño de partícula (DHM). Se diseñaron 31 experimentos en total utilizando Minitab 18 (Tabla 10).

Tabla 9 - Variables y nivel del experimento en el desarrollo del sistema lipídico nanoestructurado que contiene besifloxacin.

Variables Independientes	Nivel		
	-1	0	+1
Softisan® 154	3,0	5,0	7,0
TACC	1,0	1,5	2,0
Lipoid® S100	1,0	1,5	2,0
Tween 80	2,0	3,0	4,0

TACC: triglicéridos del ácido cáprico caprílico

Tabla 10 - Matriz de ensayo del diseño compuesto central y valores de DHM e IP del sistema lipídico nanoestructurado que contiene besifloxacin

Preparación	Softisan® 154 (% m/m)	TACC (% m/m)	Lipoid® S100 (% m/m)	Tween 80 (% m/m)	BSF (mg)	DHM (nm)	IP
F1	5,0	1,5	2	3,0	25	97,9	0,14
F2	7,0	1	2	4,0	35	84,1	0,19
F3	3,0	1	1	4,0	15	107,5	0,28

F4	5,0	1,5	1,5	3,0	25	105,4	0,13
F5	3,0	1	2	4,0	15	58,58	0,14
F6	3,0	2	2	4,0	15	336,4	0,25
F7	7,0	2	1	4,0	35	213,9	0,24
F8	5,0	2	1,5	3,0	25	239,7	0,23
F9	3,0	2	1	2,0	15	1274	0,07
F10	7,0	2	1	2,0	35	913,0	0,15
F11	5,0	1,5	1,5	3,0	25	101,7	0,16
F12	7,0	1	1	2,0	35	139,0	0,19
F13	3,0	1,5	1,5	3,0	15	138,5	0,18
F14	5,0	1,5	1,5	4,0	25	127,8	0,18
F15	3,0	2	2	2,0	15	110,8	0,15
F16	5,0	1,5	1,5	3,0	25	109,1	0,15
F17	5,0	1,5	1,5	3,0	25	105,8	0,17
F18	7,0	2	2	4,0	35	105,8	0,14
F19	7,0	2	2	2,0	35	1274	0,07
F20	5,0	1,5	1,5	3,0	25	84,41	0,16
F21	5,0	1,5	1,5	3,0	25	93,28	0,16
F22	7,0	1	2	2,0	35	116,1	0,17
F23	7,0	1,5	1,5	3,0	35	107,4	0,18
F24	5,0	1	1,5	3,0	25	81,0	0,14
F25	5,0	1,5	1	3,0	25	161,0	0,15
F26	3,0	1	1	2,0	15	102,7	0,16
F27	5,0	1,5	1,5	2,0	25	254,6	0,20
F28	3,0	1	2	2,0	15	182,5	0,18
F29	3,0	2	1	4,0	15	325,3	0,24
F30	7,0	1	1	4,0	35	143,0	0,17
F31	5,0	1,5	1,5	3,0	25	113,2	0,15

Tabla 11 - Análisis de varianza para probar la significancia de la regresión para los datos obtenidos en la prueba para evaluar DHM.

Fuente	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Teste F	Valor- p
Modelo	10	154612	15461	29,92	0,000
Lineal	4	109257	27314	52,87	0,000
Softisan 154	1	17076	17076	33,05	0,000
TACC	1	103701	103701	200,71	0,000
Lipoid S100	1	1127	1127	2,18	0,158
Tween 80	1	26291	26291	50,89	0,000
Cuadrado	2	54640	27320	52,88	0,000
TACC*TACC	1	4822	4822	9,33	0,007
Tween 80 * Tween 80	1	15730	15730	30,44	0,000
Interacción de factores	2	32866	8217	15,90	0,000
Softisan 154 * TACC	1	20363	20363	39,41	0,000
Softisan 154 * Lipoid S100	1	4322	4322	8,37	0,010
TACC * Tween 80	1	8429	8429	16,31	0,001
Lipoid S100 * Tween 80	1	3920	3920	7,59	0,014
Error	17	8783	517		
Falta de ajuste	11	7502	682	3,19	0,083
Error puro	6	1281	214	*	*
Total	27	163395			

Ecuación 2

$$DHM = 130 + 74,1 Sof + 152 TACC + 187,7Lip - 314,4 Tw + 153 TACC * TACC + 69,1Tw * Tw - 42,63Sof * TACC - 18,82Sof * Lip - 64,0 TACC * Tw - 37,4Lp * Tw$$

Soft: Softisan®154; **TACC:** triglicéridos del ácido cáprico caprílico; **Lip:** Lipoid®S100; **Tw:** Tween 80

[0110] El R^2 , el R^2 ajustado (R^2 -aj) y el R^2 previsto (R^2 -prev) fueron, respectivamente, 94,62%, 91,46% y 80,89%. El gráfico de probabilidad normal de los residuos fue lineal, revelando un comportamiento distribuido normalmente. El modelo lineal, el modelo cuadrático y la interacción de los factores fueron significativos ($p < 0,05$; $\alpha = 0,05$). Se revelaron inesperadamente interacciones entre los componentes de la fórmula: interacción de Softisan®154 * TACC; Softisan®154 * Lipoid®S100; TACC * Tween 80; Lipoid®S100 * Tween 80. Estas interacciones permiten la reducción del tamaño de partícula, siendo la interacción con mayor influencia en este sentido la interacción entre TACC y Tween 80 (coeficiente igual a -64,0). Además, se revelaron efectos cuadráticos de TACC (+153) y Tween 80 (+69,1) (Ecuación 2). Estos efectos indican que el rango de concentración de estos componentes en la fórmula debe seleccionarse de manera que el tamaño de partícula se mantenga en valores < 200 nm. Los efectos cuadráticos observados de TACC y Tween 80 sobre DHM fueron sorprendentes (Figura 4).

[0111] Como ejemplo de la condición única de la presente innovación, las preparaciones que contenían 2,0% de TACC y 2% de Tween 80 mostraron un fenómeno de gelificación debido a los polimorfos formados durante el proceso de enfriamiento. De esta forma, queda patente la excepcionalidad de la formulación estable.

[0112] En la Tabla 12 se presentan las formulaciones optimizadas con DHM menor que 200 nm utilizadas para verificar la validez del modelo matemático. Los gráficos de contorno (Figura 5) muestran la relación entre la

concentración de los componentes de la formulación y el DHM. Las regiones con valores de DHM más bajos son aquellas con coloración verde claro.

Tabla 12 - Formulaciones optimizadas: diámetro hidrodinámico medio (DHM) previsto y observado, índice de polidispersidad (IP) y potencial zeta (PZ).

	N1	N2
	(% m/m)	(% m/m)
Softisan®154	3,00	5,00
TACC	1,00	1,67
Lipoid®S100	1,00	1,67
Tween 80	2,11	3,50
Agua	92,89	88,16
DHM observado (nm) ± DE	85,1 ± 2,2	93,6 ± 1,7
DHM previsto (nm)	90	136
IP ± DE	0,18 ± 0,01	0,15 ± 0,01
PZ (mV) ± DE	- 16,7 ± 0,3	-15,9 ± 0,3
pH	7,00	7,00

DE: desviación estándar; N1: 15,0 mg de BSF; N2: 25,0 mg de BSF; TACC: triglicéridos del ácido cáprico caprílico

[0113] Para verificar el modelo matemático obtenido en el análisis estadístico, se elaboraron las formulaciones N1 y N2. Estas presentaron un valor de DHM observado cercano al valor teórico. Por tanto, se puede concluir que el modelo matemático permitió prever valores de DHM. Por tanto, los valores prácticos están cerca de los valores previstos, lo que demuestra la validez del modelo matemático.

[0114] El enfoque racional permitió desarrollar con éxito el primer sistema lipídico nanoestructurado que contiene besifloxacin con DHM inferior a 200 nm. El diseño compuesto central se utilizó de manera efectiva para

optimizar la formulación. Este diseño reveló concentraciones específicas de tres componentes (TACC, Lipoid®S100 y Tween 80) en la formulación. Softisan®154, lípido sólido y cuarto componente, no alteró la estabilidad de la formulación. La estabilidad física de las preparaciones es una característica esencial para que un producto farmacéutico basado en nanotecnología pueda ser comercializado.

[0115] En este sentido, sorprendentemente, la utilización de 0,025% m/m de besifloxacin, 5% m/m de Softisan®154, 1,67% m/m de triglicéridos del ácido cáprico caprílico, 3,5% m/m de Tween 80 y 1,67% m/m de Lipoid® S100 permitió la obtención del portador lipídico nanoestructurado que encapsula besifloxacin. Así, la invención reveló que la presencia de lípido líquido en la matriz lipídica era esencial para obtener la preparación.

[0116] Cabe destacar que, a pesar de haber sido seleccionado el TACC como un lípido líquido, que comprende la familia de los triglicéridos de cadena media, los lípidos vegetales (aceite de soja, aceite de almendras, aceite de girasol) y los monoglicéridos (Imwitor 988) pueden presentar características similares en la estabilidad de la formulación. Dicho hecho puede basarse en la desorganización de la matriz lipídica favorecida por la mezcla de lípidos sólidos y líquidos. Cuanto mayor sea esta desorganización, mayor será la eficacia de encapsular el fármaco en esta matriz. Considerando este fenómeno, todos los aceites vegetales tienen el potencial de componer la matriz lipídica y estabilizar la preparación (sistema lipídico nanoestructurado que contiene besifloxacin).

Referencias bibliográficas

[0117] BERTINO, J.S.; ZHANG, J.Z. Besifloxacin, a new ophthalmic fluoroquinolone for the treatment of bacterial conjunctivitis. **Expert Opinion Pharmacotherapy**, v. 10, n. 15, p. 2545-2454, 2009.

[0118] UDEH, B. L.; SCHNEIDER, J. E.; OHSFELDT, R. L. Cost Effectiveness of a Point-of-Care Test for Adenoviral Conjunctivitis. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 336, n. 3, p. 254-264, 1 sept. 2008.

[0119] SCHNEIDER, J.E. et al. Epidemiology and Economic Burden of Conjunctivitis: A Managed Care Perspective. **Journal of Managed Care Medicine**, v. 17, n. 1, p. 78-83, 2014.

[0120] SMITH AF, WAYCASTER C. Estimate of the direct and indirect annual cost of bacterial conjunctivitis in the United States. **BMC Ophthalmology**, v. 9, n. 13, 2009.

[0121] BREMOND-GIGNAC, D. et al. A European Perspective on Topical Ophthalmic Antibiotics: Current and Evolving Options. **Therapeutic advances in Ophthalmology**, 2011.

[0122] CHEN, F.V. et al. Patient demographic and microbiology trends in bacterial conjunctivitis in children. **Journal of AAPOS**, v. 22, n. 1, 2018.

[0123] McDONALD, E.M. et al. Topical antibiotics for the management of bacterial keratitis: an evidence-based review of high quality randomised controlled trials. **British Journal of Ophthalmology**, v. 98, p. 1470-1477, 2014.

[0124] SCHECHTER, B.A.; PAREKH, J.G.; TRATTLER, W. Besifloxacin Ophthalmic Suspension 0.6% in the Treatment of Bacterial Keratitis: A Retrospective Safety Surveillance Study. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v.

31, n. 2, p. 114-21, 2015.

[0125] PFLUGFELDER, S.C.; KARPECKI, P.M.; PEREZ, V.L. Treatment of blepharitis: recent clinical trials. **The Ocular surface**, v. 12, n. 4, p. 273-284, 2014.

[0126] Eurosurveillance editorial team. CDC publishes report on antibiotic resistance threats in the United States for the first time. Euro Surveill. 2013, v. 18, n. 38. Disponible en: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20588>>. Aceso el 10 de septiembre de 2021.

[0127] ASBELL, P.A. et al. Ocular TRUST: nationwide antimicrobial susceptibility patterns in ocular isolates. **American Journal of Ophthalmology**, v. 145, n. 6, p. 951-958, 2008.

[0128] HAAS, W. et al. Monitoring antibiotic resistance in ocular microorganisms: results from the Antibiotic Resistance Monitoring in Ocular microorganisms (ARMOR) 2009 surveillance study. **American Journal of Ophthalmology**, v. 152, n. 4, p. 567-574. e563, 2011.

[0129] COMSTOCK, T.L. et al. Clinical outcomes with besifloxacin ophthalmic suspension 0.6% in the treatment of bacterial conjunctivitis due to potentially consequential pathogens. **Clinical Optometry**, v. 6, p. 25-35, 2014.

[0130] MAH, F. S.; SANFILIPPO, C. M. Besifloxacin: Efficacy and Safety in Treatment and Prevention of Ocular Bacterial Infections. **Ophthalmology Therapy**. n. 5, p. 1-20, 2016.

[0131] LAL, S.C. et al. Besifloxacin the Fourth Generation Fluoroquinolone: A Review. **Journal Drug Delivery Therapy**, n. 4, p. 39-44, 2014.

[0132] CAMBAU, E. et al. Target Specificity of the New Fluoroquinolone Besifloxacin in Streptococcus Pneumoniae, Staphylococcus Aureus and Escherichia Coli. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, n. 63, p. 443-450, 2009.

[0133] HOOPER, D.C.; JACOBY, G.A. Topoisomerase Inhibitors: Fluoroquinolone Mechanisms of Action and Resistance. **Cold Spring Harbor in Perspective Medicine**, v. 1, n. 6, p. 1-21, 2016.

[0134] MITSCHER LA, LEMKE TL, GENTRY EJ. Antibiotics and antimicrobial agents. In: Lemke TL, Williams DA editors. **Foye's principles of medicinal chemistry**. Lippincott Williams & Wilkins, 2008, 6th ed., p. 1375.

[0135] PETRI W.A. Sulfonamidas, quinolonas e agentes para infecção do trato urinário. In: Goodman & Gilman. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. McGrawHill, 2006, 11th ed., p. 1671.

[0136] HAAS, W. et al. Bactericidal activity of besifloxacin against Staphylococci, Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenza. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 7, p. 1441-1447, 2010.

[0137] HAAS, W. et al. Monitoring antibiotic resistance in ocular microorganisms: results from the Antibiotic Resistance Monitoring in Ocular Microorganisms (ARMOR) 2009 surveillance study. **American Journal of Ophthalmology**, v. 152, n. 4, p. 567-574. e563, 2011.

[0138] ZHANG, J.Z.; WARD, K.W. Besifloxacin, a novel fluoroquinolone antimicrobial agent, exhibits potent inhibition of pro-inflammatory cytokines in human THP-1 monocytes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 1, 2008.

[0139] DUBALD, M. et al. Ophthalmic Drug Delivery Systems for Antibiotherapy - A Review. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 1, 2018.

[0140] TRANSPARENCY MARKET RESEARCH. **Nanotechnology Drug Delivery Market** (By Technology - Nanocrystals, Nanoparticles, Liposomes, Micelles, Nanotubes, and Others; By Application - Neurology, Oncology, Cardiovascular/Physiology, Anti-inflammatory/Immunology, Anti-infective, and Others) - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends, and Forecast 2015 - 2023. Disponible en: <
<https://www.transparencymarketresearch.com/nanotechnology-drug-delivery.html>> Aceso el 07 de agosto de 2021.

[0141] YUKUYAMA, M.N. et al. Challenges and Future Prospects of Nanoemulsion as a Drug Delivery System. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 3, p. 495-508, 2017.

[0142] YOUSSEF, A.; DUDHIPALA, N.; MAJUMDAR, S. Ciprofloxacin Loaded Nanostructured Lipid Carriers Incorporated into In-Situ Gels to Improve Management of Bacterial Endophthalmitis. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 6, 2020.

[0143] DE OLIVEIRA, I. F., et al. Cutting-edge advances in therapy for the posterior segment of the eye: Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 589, p. 119831, 2020.

[0144] GARRIGUE, J.-S. et al. Relevance of Lipid-Based Products in the Management of Dry Eye Disease. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 33, n. 9, 2017.

[0145] YAN, T. et al. Thermoresponsive GenisteinNLC-dexamethasone-moxifloxacin multi drug delivery system in

lens capsule bag to prevent complications after cataract surgery. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 2021.

[0146] KASSAEE, S. N.; MAHBOOBIAN, M. M. Besifloxacin-loaded ocular nanoemulsions: Design, formulation and efficacy evaluation. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 12, n. 1, p. 229-239, 2022.

[0147] Baig, M. S. et al. Development and evaluation of cationic nanostructured lipid carriers for ophthalmic drug delivery of besifloxacin. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 55, p. 101496, 2020.

[0148] BHATTACHARJEE, A. et al. Development and optimization of besifloxacin hydrochloride loaded liposomal gel prepared by thin film hydration method using 32 full factorial design. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 585, p. 124071, 2020.

[0149] DOS SANTOS, G. A. et al. Besifloxacin liposomes with positively charged additives for an improved topical ocular delivery. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-18, 2020.

[0150] HENOSTROZA, M. A. B.; BOU-CHACRA, N. A.; LOURENCO, F. R.; ARAUJO, G. L. B. Nanoemulsões oftálmicas e uso. 2018, Brasil. **BR1020180762494, título: "Nanoemulsões oftálmicas e uso"**, Institución de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

[0151] BOU-CHACRA, N. A.; LOURENCO, F. R.; ARAUJO, G. L. B.. Processo de obtenção de um sistema nanoestruturado catiônico, sistema nanoestruturado catiônico e seu uso. 2014, Brasil. **BR1020140230505, título: "Processo de obtenção de um sistema nanoestruturado catiônico, sistema nanoestruturado catiônico e seu uso"**, Institución de

registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

[0152] CHAWRAI, S.; PRASAD, S.; BAJAJ, K. Coated particles and compositions comprising same. 2014, United States. **US20160128944A1**, título: **"Coated particles and compositions comprising same"**. Institución de registro: United States Patent and Trademark Office.

[0153] DEKIC, L.; PRIMORAC, M. (Ed.). Microemulsions and Nanoemulsions as Carriers for Delivery of NSAIDs. In: ČALIJA, B. **Microsized and Nanosized Carriers for Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Formulation Challenges and Potential Benefits**. 1st ed. (Belgrado): Elsevier, 2017. cap. 3, p. 72.

[0154] ALI, H. H.; HUSSEIN, A. A. Oral nanoemulsions of candesartan cilexetil: formulation, characterization and in vitro drug release studies. **AAPS Open**, v. 3, n. 4, 2017.

[0155] PHAN, H.T.; HAES, A.J. What does nanoparticle stability mean? **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 123, n. 27, p. 16495-16507, 2019.

[0156] British pharmacopoeia. Vol. 1. London: Medicines and Healthcare products Regulatory Agency; 2018.

[0157] European pharmacopoeia. 9th ed, Strassbourg: Council of Europe: 2018.

[0158] United States Pharmacopeia and National Formulary. Buffer solutions. In: USP 43 NF 38; 2020.

[0159] REMINGTON, J. P., AND GENNARO, A. R. Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Co., 18th ed. 1990.

[0160] MARTINDALE, W. AND REYNOLDS, J. E. F. Martindale: The Extra Pharmacopoeia. London, The

Pharmaceutical Press 31st ed, 1996)

[0161] PRISTA, L. V. N., ALVES, A. C., MORGADO, R. M. R. Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica. 4^a edição. Fundação Calouste Gulbenkian. Serviço de Educação e Bolsas, 1996.

[0162] KASONGO, W.A. Selection and Characterization of Suitable Lipid Excipients for use in the Manufacture of Didanosine-Loaded Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 12, diciembre de 2011.

[0163] LALLEMAND, F. et al. Successfully improving ocular drug delivery using cationic nanoemulsion, Novasorb. **Journal of Drug Delivery**, v. 2012, n. 1, p. 1-16, 2012.

[0164] Katev, V.; Vinarov, Z.; Tcholakova, S. Mechanisms of drug solubilization by polar lipids in biorelevant media. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 159, p. 105-733, 2021.

[0165] DEVRAJ, R. et al. In vitro assessment of drug-free and fenofibrate-containing lipid formulations using dispersion and digestion testing gives detailed insights into the likely fate of formulations in the intestine. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 4, p. 748-760, 2013.

[0166] KAZI, M. et al. Pharmaceutics Development, Characterization Optimization, and Assessment of Curcumin-Loaded Bioactive Self-Nanoemulsifying Formulations and Their Inhibitory Effects on Human Breast Cancer MCF-7 Cells. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

[0167] ABDALLAH, Q. M. et al. Utilization of novel self-nanoemulsifying formulations (SNEFs) loaded paclitaxel

for the treatment prosperity of bladder cancer. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 56, p. 101514, 2020.

[0168] URONNACHI, E. et al. Solidified Reverse Micellar Solution-Based Lipid Microparticles of Miconazole Nitrate: Formulation Design, Biopharmaceutical Characterization, and Dissolution Studies. **Journal of Pharmaceutical Innovation**, 2020.

[0169] SHAZLY, G. A. Characterization, In Vitro Release, and Antibacterial Activity Assessment. 2017.

[0170] STELZNER, J. J. et al. Squalene containing solid lipid nanoparticles, a promising adjuvant system for yeast vaccines. **Vaccine**, v. 36, n. 17, abril de 2018.