

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 203**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/437** (2006.01)

**A61K 31/519** (2006.01)

**A61P 27/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2009 E 09737257 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2349260**

54 Título: **Inhibidores de quinasas Jano para el tratamiento de ojo seco y otras enfermedades relacionadas con el ojo**

30 Prioridad:

**02.10.2008 US 102242 P**

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

**18.03.2016**

73 Titular/es:

**INCYTE HOLDINGS CORPORATION (100.0%)  
1801 Augustine Cut-Off  
Wilmington, DE 19803, US**

72 Inventor/es:

**FRIEDMAN, PAUL A.;  
FRIDMAN, JORDAN S.;  
LUCHI, MONICA E. y  
WILLIAMS, WILLIAM V.**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 564 203 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

**Inhibidores de quinasas Jano para el tratamiento de ojo seco y otras enfermedades relacionadas con el ojo.**

**ÁREA DEL INVENTO**

5 Este invento suministra métodos, botiquines y composiciones para el tratamiento del ojo seco y otras enfermedades relacionadas con el ojo utilizando compuestos que inhiben una o más quinasas de Jano (JAKs - Janus kinases).

10 El invento se relaciona al tema definido en las reivindicaciones; la siguiente especificación es sujeta a esta definición.

**ANTECEDENTES DEL INVENTO**

15 El síndrome de ojo seco (DES - Dry eye síndrome, también conocido como queratoconjuntivitis seca) es uno de los problemas más comunes tratados por los médicos oculares. Un informe oficial reciente de la Conferencia del Ojo Seco (DEWS - Dry Eye Workshop) definió al ojo seco como " Una enfermedad multifactorial de las lágrimas y de la superficie ocular que da lugar a los síntomas de malestar, trastornos de la visión, y la inestabilidad de la película lagrimal con el daño potencial a la superficie ocular. Se acompaña de aumento de la osmolaridad de la película lagrimal y la inflamación de la superficie ocular" ("una enfermedad multifactorial de las lágrimas y de la superficie ocular que resulta en síntomas de incomodidad, perturbación visual, e inestabilidad de la lámina lacrimal con un daño potencial a la superficie ocular. Es acompañada de una osmolaridad incrementada de la lámina lacrimal e inflamación de la superficie ocular"). DES afecta al 10% de la población entre las edades de 20 a 45 años de edad, con este porcentaje incrementándose mientras la edad avanza. Aunque una amplia variedad de productos de lágrimas artificiales está disponible, estos productos suministran solamente un alivio transitorio de los síntomas. Por tal motivo, existe una necesidad de agentes, composiciones y métodos terapéuticos para tratar al ojo seco. Éste invento aborda, entre otras, a esta necesidad.

**RESUMEN DEL INVENTO**

Este invento suministra, *entre otros*, un método para tratar al trastorno del ojo seco en un paciente que necesita ese tratamiento, que comprende la administración al paciente de un monto terapéuticamente efectivo de un agente. En algunas secciones, el agente utilizado en los métodos de este invento es un compuesto que puede inhibir la actividad de una o más quinasas de Jano (JAKs -Janus kinases). La familia de las quinasas de Jano de quinasas proteínicas de tirosina, así como, los Transductores de Señales y los Activadores de Transcripción (STATs - Signal Transducers and Activators of Transcription), interactúan en la señalización de una amplia gama de citoquinas. Generalmente, los receptores de citoquinas no tienen una actividad intrínseca de las quinasas de tirosina, y por lo tanto, requieren que las quinasas asociadas con los receptores propaguen una cascada de fosforilación. Las JAKs cumplen esta función. La citoquinas se enlazan con sus receptores, causando una dimerización de los receptores, y esto le permite a las JAKs el fosforilarse entre sí así como con motivos específicos de tirosina dentro de los receptores de citoquinas. Los STATs que reconocen estos motivos de fosfotirosina son recaudados para el receptor, y son, disociados entonces, de los receptores, y son activados por un evento de fosforilación de tirosina que depende de JAKs. En el momento de su activación, los STATs se disocian de los receptores, se dimerizan, y se translocan al núcleo para enlazarse a sitios específicos del ADN y alteran la transcripción (Scott, M. J., C. J. Godshall, et al. (2002). "Jaks, STATs, Cytokines, and Sepsis" ("JAKs, STATs, Citoquinas y Sepsis") Clin Diagn Lab Immunol 9(6): 1153-9).

50 La familia de JAKs juega un rol en la regulación que depende de citoquinas de la proliferación y función de las células involucradas en la respuesta inmunológica. Actualmente, existen 4 miembros de la familia de JAKs de mamíferos: JAK1 (también conocida como la quinasa-1 de Jano (Janus kinase-1)), JAK2 (también conocida como la quinasa-2 de Jano (Janus kinase-2)), JAK3 (también conocida como la quinasa de Jano, leucocito; JAKL; L-JAK y quinasa-3 de Jano (Janus kinase-3)) y TYK2 (también conocida como la quinasa de tirosina proteínica 2 (protein-tyrosine kinase 2)). Las proteínas JAK varían en tamaño desde 120 a 140 kDa y comprenden 7 dominios de homología conservada de JAK (JH - JAK homology); uno de estos es un dominio funcional de quinasas catalíticas, y otro es un dominio de pseudo quinasas que hacen potencialmente una función regulatoria y/o sirven como un lugar de acoplamiento para los STATs (Scott, Godshall et al. 2002, supra).

60 Mientras que JAK1, JAK2 y TYK2 se expresan ubicuamente, existen informes de que JAK3 se expresa preferencialmente en un eliminador natural (NK - natural killer) de células y células T que no descansan, sugiriendo un rol en la activación linfoide (Kawamura, M., D. W. McVicar, et al. (1994). "Molecular cloning of L-JAK, a Janus family protein-tyrosine kinase expressed in natural killer cells and activated leukocytes" ("Clonación molecular de L-JAK, una quinasa de tirosina proteínica de la familia de Jano expresada en células eliminadoras naturales y en leucocitos activados"). Proc Natl Acad Sci Estados Unidos 91(14): 6374-8).

No sólo las respuestas inmunológicas e inflamatorias estimuladas por las citoquinas contribuyen a la defensa normal del anfitrión, sino que también juegan roles en la patogénesis de enfermedades: patologías tales como inmunodeficiencia combinada severa (SCID - severe combined immunodeficiency) que surgen de la hipoactividad y supresión del sistema inmunológico, y una respuesta inmunológica/inflamatoria hiperactiva o inapropiada contribuye a la patología de enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide y psoriásica, el asma y el lupus eritematoso sistémico, la enfermedad de intestinos inflamatorios, la esclerosis múltiple, la diabetes mellitus de tipo I, la miastenia gravis, la tiroiditis, las nefropatías de inmunoglobulinas, la miocarditis, así como enfermedades tales como la escleroderma y la osteoartritis (Ortmann, R. A., T. Cheng, et al. (2000). "Janus kinases and signal transducers and activators of transcription: their roles in cytokine signaling, development and immunoregulation" ("Las quinazas de Jano y los transductores de señales y los activadores de transcripción: sus roles en la señalización, el desarrollo y la inmunorregulación de citoquinas"). *Arthritis Res* 2(1): 16-32).

La dirección farmacológica de la quinasa de Jano 3 (JAK3 – Janus kinases 3) ha sido utilizada exitosamente para controlar los rechazos de aloinjertos y la enfermedad del anfitrión versus el injerto (GVHD - graft versus host disease). Adicionalmente a su interacción en la señalización de los receptores de citoquinas, JAK3 también interactúa en la ruta de señales CD40 de monocitos sanguíneos periféricos. Durante la maduración inducida por CD40 de células dendríticas (DCs - dendritic cells) mieloides, se observó que se indujo la actividad de JAK3, un incremento en su expresión de moléculas co - estimuladoras, la producción de IL-12, y una capacidad estimuladora alógena potente. Un inhibidor de JAK3 diseñado racionalmente, WHI-P-154, previno estos efectos contrarrestando las DCs a un nivel inmaduro, sugiriendo que terapias inmunosupresoras dirigidas a la quinasa de tirosina JAK3 también podrían afectar la función de las células mieloides (Saemann, M. D., C. Diakos, et al. (2003). "Prevention of CD40-triggered dendritic cell maturation and induction of T-cell hyporeactivity by targeting of Janus kinase 3" ("Prevención de la maduración de células dendríticas activada por CD40 y la inducción de la hipo-reactividad de las células T al usar a las quinazas de Jano 3 como objetivo"). *Am J Transplant* 3(11): 1341-9). En el sistema de modelo de ratón, JAK3 también demostró ser un objetivo molecular importante para el tratamiento de la diabetes mellitus (tipo 1) autoinmune que depende de insulina. El inhibidor de JAK3 diseñado racionalmente, JANEX-1, exhibió una actividad inmunomoduladora potente y retraso la ocurrencia de la diabetes en el modelo de ratón NOD de diabetes autoinmune de tipo I (Cetkovic-Cvrlje, M., A. L. Dragt, et al. (2003). "Targeting JAK3 with JANEX-1 for prevention of autoimmune type 1 diabetes in NOD mice" ("Usando a JAK3 como objetivo con JANEX-1 para la prevención de diabetes autoinmune de tipo I en ratones NOD"). *Clin Immunol* 106(3): 213-25).

Las deficiencias en la expresión de los miembros de la familia de JAK son asociados con algunos estados de enfermedad. Los ratones *Jak1* <sup>-/-</sup> son retrasados, no pueden ser amamantados, y mueren perinatalmente (Rodig, S. J., M. A. Meraz, et al. (1998). "Disruption of the *Jak1* gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses" ("La interrupción del gen *Jak1* demuestra roles obligatorios y no redundantes de los Jaks en las respuestas biológicas inducidas por las citoquinas"). *Cell (Célula)* 93(3): 373-83). Los embriones de ratones *Jak2* <sup>-/-</sup> son anémicos y mueren alrededor del día 12.5 después del coito debido a la ausencia de una eritropoyesis definitiva. Los fibroblastos deficientes de JAK2 no responden al IFN gamma, aunque respuestas a IFN alfa/beta y a IL-6 no son afectadas. Las funciones de JAK2 en la transducción de señales de un grupo específico de receptores de citoquinas requerida en la eritropoyesis definitiva (Neubauer, H., A. Cumano, et al. (1998). *Cell (Célula)* 93(3): 397-409; Parganas, E., D. Wang, et al. (1998). *Cell (Célula)* 93(3): 385-95.). JAK3 parece jugar un rol en el desarrollo normal y la función de los linfocitos B y T. Se ha reportado que las mutaciones de JAK3 han sido responsables de inmunodeficiencias combinadas severas (SCID - severe combined immunodeficiency) recesivas autosómicas en humanos (Candotti, F., S. A. Oakes, et al. (1997). "Structural and functional basis for JAK3-deficient severe combined immunodeficiency" ("Base estructural y funcional para la inmunodeficiencia combinada severa por deficiencia de JAK3"). *Blood (Sangre)* 90(10): 3996-4003).

De acuerdo al rol de las quinazas de Jano en trastornos inflamatorios y autoinmunes, este invento suministra, *entre otros*, un método para tratar a los trastornos de ojo seco que comprende la administración a un paciente de un inhibidor de JAKs. En un aspecto adicional, este invento suministra un método para el tratamiento de conjuntivitis, uveítis, coroiditis, ciclitis, escleritis, epiescleritis, o iritis; el tratamiento de inflamaciones o dolores relacionados con el trasplante de córnea, LASIK (queratomileusis in situ asistido con láser - laser assisted in situ keratomileusis), queratectomía fotorrefractiva, o LASEK (queratomileusis subepitelial asistida con láser - laser assisted sub-epithelial keratomileusis); la inhibición de la pérdida de agudeza visual relacionada con trasplantes de córnea, LASIK, queratectomía fotorrefractiva, o LASEK; o la inhibición del rechazo de trasplantes en un paciente, que comprende la administración al paciente de un inhibidor de JAKs. En algunas secciones, el agente es administrado post operativamente al paciente. En un aspecto adicional, este invento suministra una inserción oftálmica que incluye a un inhibidor de JAKs. En otro aspecto adicional, este invento suministra un botiquín para tratar una enfermedad de ojo seco que comprende una composición farmacéutica o una composición oftálmica que incluye a un inhibidor de

JAK e instrucciones que incluyen una orientación para administrar al inhibidor de JAKs a un paciente que necesita tratamiento para una enfermedad de ojo seco.

5

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

10 Este invento suministra, *entre otras cosas*, un método para el tratamiento de la enfermedad de ojo seco en un paciente que lo necesita, que comprende la administración al paciente de un monto terapéuticamente efectivo de un agente.

15 Tal como se utiliza aquí, "la enfermedad de ojo seco" tiene la intención de cubrir los estados de enfermedad resumidos en un informe oficial reciente de la Conferencia del Ojo Seco (DWES - Dry Eye Workshop), que define al ojo seco como "a multifactorial disease of the tears and ocular surface that results in symptoms of discomfort, visual disturbance, and tear film instability with potential damage to the ocular surface. It is accompanied by increased osmolarity of the tear film and inflammation of the ocular surface" ("Una enfermedad multifactorial de la superficie lacrimonal y ocular que resulta en síntomas de incomodidad, perturbación visual, e inestabilidad de la lámina lacrimonal con un daño potencial a la superficie ocular. Es acompañada por una osmolaridad incrementada de la lámina lacrimonal y la inflamación de la superficie ocular") Lemp, "The Definition and Classification of Dry Eye Disease: Report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop" ("La Definición y Clasificación de la Enfermedad de Ojo Seco: Informe del Subcomité de Definición y Clasificación de la Conferencia Internacional del Ojo Seco"), *The Ocular Surface (La Superficie Ocular)*, 5(2), 75-92 abril - 2007.

20 El ojo seco a veces es denominado queratoconjuntivitis seca. En algunas secciones, el tratamiento del trastorno de ojo seco involucra mejorar un síntoma particular de la enfermedad de ojo seco, tal como la incomodidad del ojo, la perturbación visual, la inestabilidad de la lámina lacrimonal, la hiperosmolaridad de las lágrimas, y la inflamación de la superficie ocular.

25 Tal como se resumió en el informe de DEWS, el ojo seco puede ser clasificado en 2 clases diferentes: ojo seco por deficiencia de lágrimas acuosas y ojo seco por evaporación, que a su vez cubre varias subclases. Asimismo, en algunas secciones, la enfermedad de ojo seco es un ojo seco por deficiencia de lágrimas acuosas (ADDE - aqueous tear-deficient dry eye). En secciones adicionales, la enfermedad de ojo seco es un ojo seco por evaporación. En secciones adicionales, la enfermedad de ojo seco es seleccionada de cualquiera de las subclases de ADDE o de la enfermedad de ojo seco por evaporación, o sus combinaciones apropiadas. Tal como se indicó por el autor del informe de DEWS, sin embargo, las varias clases y subclases no son excluyentes entre sí. Por lo tanto, el ojo seco podría ocurrir por medio de mecanismos diferentes en diferentes subclases o un estado de enfermedad de ojo seco que se origina en una subclase podría conllevar a eventos que causan un ojo seco por medio de un mecanismo en otra subclase.

30 La primera clase de ojo seco, el ojo seco por deficiencia de lágrimas acuosas (ADDE), es conocido como un ojo seco por deficiencia de lágrimas y una de deficiencia de lágrimas lacrimales. En ADDE, se cree que el ojo seco se causa debido a una falla de la secreción de lágrimas lacrimales. Aunque no se desea depender exclusivamente de ninguna teoría, se cree que la sequedad resulta de una secreción y volumen reducidos de las lágrimas lacrimales, causando una hiperosmolaridad de las lágrimas. La hiperosmolaridad de la lámina lacrimonal puede causar la hiperosmolaridad de las células epiteliales de la superficie ocular, estimulando eventos inflamatorios que involucran a varias quinasas y a senderos de señalización.

35 Dos subclases de ADDE son el ojo seco del síndrome de Sjogren (SSDE - Sjogren syndrome dry eye), donde las glándulas lacrimales son el objetivo de un proceso autoinmune, y el ojo seco que no pertenece al síndrome de Sjogren (NSSDE - non-Sjogren syndrome dry eye). Asimismo, en algunas secciones, la enfermedad del ojo es SSDE. En otras secciones, la enfermedad del ojo seco es un ojo seco que no pertenece al síndrome de Sjogren. En SSDE, se cree que las células activadas T pueden infiltrarse en las glándulas lacrimales, causando la muerte celular de las células acinares y ductulares y la hiposecreción de lágrimas. Las 2 formas principales de SSDE son las formas primaria y secundaria. La SS primaria puede ocurrir en combinación con boca seca (xerostomía). La SSDE secundaria ocurre con los síntomas de la SSDE primaria junto con una enfermedad conectiva autoinmune tal como artritis reumatoide (RA - rheumatoid arthritis), lupus eritematoso sistémico, poliarteritis nodosa, la granulomatosis de Wegener, la esclerosis sistémica, la esclerosis biliar primaria, o una enfermedad mixta de tejidos conectivos. Los criterios del diagnóstico para que cada una de estas enfermedades colectivas son conocidos en la industria. Además, el SSDE primario podría asociarse con manifestaciones sistémicas de enfermedades que podrían involucrar a los pulmones, a los riñones, al hígado, a los vasos sanguíneos y a las articulaciones.

40 En el NSSDE, las características autoinmunes sistémicas del ojo seco del síndrome de Sjogren son excluidas. Las formas de NSSDE incluyen a deficiencias primarias de las glándulas lacrimales (incluyendo el ojo seco relacionado

con la edad, alacrimia congénita, y disautonomía familiar), a deficiencias secundarias lacrimales (incluyendo infiltraciones inflamatorias de la glándula lacrimal por granulomas sarcoideos, células linfomatosas, y células T relacionadas con el sida; aquellas asociadas con la enfermedad del injerto versus el anfitrión; y aquella resultantes de la ablación de las glándulas lacrimales o la denervación de las glándulas lacrimales), la obstrucción de los ductos de las glándulas lacrimales (incluyendo aquella causada por una conjuntivitis cicatrizante incluyendo a la tracoma, penfigoide cicatricial ocular y al penfigoide de la membrana de la mucosa, eritema multiforme, y quemaduras químicas o térmicas), hiposecreción por reflejos (incluyendo un bloqueo sensorial de los reflejos, tal como aquel asociado con el uso de lentes de contacto, diabetes mellitus y queratitis neurotrófica y un bloqueo motriz de los reflejos, incluyendo aquel asociado con daños al nervio craneal VII, neimomatosis múltiple, y la exposición a medicamentos sistémicos tales como antihistamínicos, bloqueadores beta, antiespasmódicos, diuréticos, antidepresivos tricíclicos, inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina, y otras drogas psicotrópicas).

La segunda clase más importante de la enfermedad de ojo seco es el ojo seco por evaporación, que es causado por la pérdida excesiva de agua de la superficie ocular expuesta en la presencia de una función secretoria lacrimal normal. Causas intrínsecas del ojo seco por evaporación incluyen la difusión de la glándula de Meibomio (MGD - Meibomian gland dysfunction) (incluyendo aquella causada por un número reducido de glándulas debido a una MGD adquirida por una deficiencia congénita; MGD asociada con distichiasis, el síndrome de linfedema de distichiasis, y metaplasia; MGD hipersecretora asociada con la seborrea del Meibomio, MGD hipersecretora asociada con la terapia retinoide, MGD obstructiva primaria y secundaria, MGD obstructiva focal o difusa, MGD obstructiva simple o cicatricial, MGD obstructiva a trófica o inflamatoria; la MGD simple primaria o secundaria a la blefaritis delantera, acné rosácea, dermatitis seborreica, el síndrome de Ectrodactyly, el síndrome de Turner, la toxicidad sistémica del ácido retinóico de 13-cis, bifenilos policlorados, y epinefrina; y MGD cicatricial primaria o secundaria a quemaduras químicas, penfigoides, acné rosácea, varias formas de eritemas, VKC y AKC), enfermedades de la apertura del párpado y congruencia o dinámica del párpado/globo ocular (tal como aquel que ocurre con la craneoestenosis, endocrina y otras formas de proptosis, miopía y post cirugía plástica de los párpados), y una tasa baja de parpadeo (incluyendo aquella causada por una enfermedad extrapiramidal tal como la enfermedad de Parkinson). Causas extrínsecas del ojo seco por evaporación incluyen a trastornos de la superficie ocular (incluyendo xeroftalmia causada por una deficiencia en la vitamina A; y que se asocia con medicamentos tópicos y conservantes tales como la anestesia tópica y el cloruro de benzalconio), el uso de lentes de contacto, enfermedades de la superficie ocular (incluyendo enfermedades de alergia a los ojos), conjuntivitis alérgica (incluyendo conjuntivitis alérgica no estacional, queratoconjuntivitis de primavera y queratoconjuntivitis atópica), y el uso de antihistamínicos.

Pacientes que tienen la necesidad del tratamiento para la enfermedad de ojo seco pueden ser identificados por una variedad de métodos de diagnóstico conocidos en la industria, incluyendo los métodos de diagnóstico resumidos en Bron, et al., "Methodologies to Diagnose and Monitor Dry Eye Disease: Report of the Diagnostic Methodology Subcommittee of the International Dry Eye Workshop (2007)" ("Metodologías, Diagnóstico y Monitoreo de la Enfermedad del Ojo Seco: Informe del Subcomité de Metodología de Diagnóstico de la Conferencia Internacional del Ojo Seco (2007)"), *The Ocular Surface (La Superficie Ocular)*, 5(2), 108-152 (abril 2007). Estos incluyen, pero no se limitan a: (1) cuestionario de síntomas (por ejemplo, Begley, et al., "Use of the dry eye questionnaire to measure symptoms of ocular irritation in patients with aqueous tear deficient dry eye" (El uso del cuestionario del ojo seco para medir los síntomas de irritación ocular en pacientes con ojo seco por deficiencia de lágrimas acuosas", *Cornea*, 2002;21:664-70); (2) coloración de la superficie ocular para revisar el daño superficial (por ejemplo, rosa de bengala o coloración de fluoresceína u otro método de coloración tal como aquellas técnicas resumidas en Barr et al., "Corneal scarring in the Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK) Study: baseline prevalence and repeatability of detection" ("Estudio de la Cicatrización Córnea en la Evaluación Longitudinal Colaborativa del Queratocono (CLEK): Prevalencia de la Línea Base y Repetitividad de la Detección", *Cornea* 1999;18(1):34-46; Lemp, "Report of the National Eye Institute/Industry Workshop on clinical trials in dry eyes" ("Informe del Instituto Nacional Ocular /Conferencia de la Industria en Ensayos Clínicos del Ojo Seco"), *CLAO J* 1995;21(4):221-31; Nichols, et al., "The repeatability of clinical measurements of dry eye" ("La repetitividad de las medidas clínicas del ojo seco"), *Cornea* 2004;23:272-85; Bron, et al., "Grading of corneal and conjunctival staining in the context of other dry eye tests" (Calificación de la coloración córnea y conjuntiva en el contexto de otras pruebas para el ojo seco", *Cornea* 2003;22(7):640-50); (3) medición del tiempo de rompimiento de la lámina lacrimal para la detección de la estabilidad de la lámina lacrimal (por ejemplo, Abelson, et al., "Alternate reference values for tear film break-up time in normal and dry eye populations" ("Valores referenciales alternos para el tiempo de rompimiento de la lámina lacrimal en poblaciones normales y con ojo seco", *Adv Exp Med Biol* 2002;506,Parte B:1121-1125; Bron AJ, et al., "Grading of corneal and conjunctival staining in the context of other dry eye tests" ("Calificación de la coloración córnea y conjuntiva en el contexto de otras pruebas para el ojo seco"), *Cornea* 2003;22:640-50; Cho et al, "Review of the tear break-up time and a closer look at the tear break-up time of Hong Kong Chinese" ("Revisión del tiempo de rompimiento lacrimal y una vista más de cerca al tiempo de rompimiento lacrimal de la población china en Hong Kong"), *Optom Vis Sci* 1993;70(1):30-8; Craig et al. "Tear lipid layer structure and stability following expression of the meibomian glands" ("La estructura de la capa lacrimal de lípidos y la estabilidad después de la expresión de las glándulas de Meibomio"). *Ophthalmic (Oftálmica) Physiol Opt* 1995, 15(6):569-74; Eliason, et al., "Staining of the conjunctiva and conjunctival tear film" ("Coloración de la conjuntiva y la lámina lacrimal conjuntiva"), *Br J Ophthalmol* 1990;74:519-22; Farrell et al., "A classification for dry eyes following comparison of tear thinning time with Schirmer tear test" ("Una clasificación para ojos secos después de la comparación del tiempo de dilución lacrimal con la prueba lacrimal de Schirmer,") *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1992; 70(3):357-60; Johnson et al., "The effect of instilled

fluorescein solution volume on the values and repeatability of TBUT measurements" ("El efecto del volumen de la solución de fluoresceína inculcada en los valores y repetitividad de las medidas TBUT"), *Cornea* 2005;24:811-7; Lemp et al., "Corneal desiccation despite normal tear volume" ("Disertación de córnea a pesar de un volumen lacrimal normal"), *Ann Ophthalmol* 1970;284:258-261; Lemp "Report of National Eye Institute/Industry Workshop on clinical trials in dry eyes" ("Informe del Instituto Nacional Ocular/Conferencia de la Industria acerca de ensayos clínicos de ojos secos"), *CLAO J* 1995;21:221-232; Madden et al. Comparative study of two non-invasive tear film stability techniques (Estudio comparativo de dos técnicas no invasivas de estabilidad de la lámina lacrimal). *Curr Eye Res* 1994; 13(4):263-9; Marquardt et al., "Modification of tear film break-up time test for increased reliability" ("Modificación de la prueba del tiempo de ruptura de la lámina lacrimal para incrementar la confiabilidad") en Holly ed. *The Preocular Tear Film in Health, Disease and Contact Lens Wear (La Lámina Lacrimal Pre-Ocular en la Salud, Enfermedad y el Uso de Lentes de Contacto)*. Lubbock, Texas: Dry Eye Institute (Texas: Instituto del Ojo Seco), 1986:57-63; Mengher et al., "Non-invasive tear film break-up time: sensitivity and specificity" ("Prueba no invasiva del tiempo de ruptura de la lámina lacrimal: sensibilidad y especificidad"), *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1986; 64(4):441-4; Nichols et al., "The repeatability of clinical measurements of dry eye" ("La repetitividad de las mediciones clínicas del ojo seco") *Cornea* 2004;23:272-85; Pflugfelder et al. "Evaluation of subjective assessments and objective diagnostic tests for diagnosing tear-film disorders known to cause ocular irritation" ("La evaluación de mediciones subjetivas y pruebas objetivas de diagnóstico para diagnosticar a las enfermedades de la lámina ocular conocidas por causar irritaciones oculares"). *Cornea* 1998; 17(1):38-56; Vitali et al. "The European Community Study Group on diagnostic criteria for Sjogren's syndrome. Sensitivity and specificity of tests for ocular and oral involvement in Sjogren's syndrome" ("El Grupo de Investigación de la Comunidad Europea acerca de los criterios de diagnóstico para el síndrome de Sjogren"). 1992; *Ann Rheum Dis* 53(10):637-47; Welch et al., "An approach to a more standardized method of evaluating tear film break-up time" ("Una técnica para un método más estandarizado para evaluar el tiempo de ruptura de la lámina lacrimal") *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 2485/B324.; (4) la prueba de Schirmer (una estimulación de flujo lacrimal estimulado en forma de reflejos mediante la inserción de un papel filtro en la bolsa conjuntiva) (por ejemplo, van Bijsterveld, "Diagnostic tests in the sicca syndrome" ("Pruebas de diagnóstico para el síndrome de mucosas secas") *Arch Ophthalmol* 1969;82:10-14; Holly et al., "Lacrimation kinetics as determined by a novel technique" ("La cinética de la acción lacrimal tal como se determina mediante una técnica nueva"), en Holly FJ (ed). *The preocular tear film (La lámina lacrimal pre - ocular)*. Lubbock TX, Lubbock Dry Eye Institute, 1986, pp 76-88); (5) mediciones de la osmolaridad lacrimal (por ejemplo, Farris, "Tear osmolality--a new gold standard?" ("Osmolaridad lacrimal—¿un nuevo estándar dorado?") *Adv Exp Med Biol* 350:495-503, 1994; Nelson et al., "Tear film osmolality determination: an evaluation of potential errors in measurement" ("Determinación de la osmolaridad de la lámina lacrimal: una evaluación de errores potenciales en mediciones") *Curr Eye Res Sep*;5(9):677-81, 1986; Sullivan et al., "4th International Conference on the Lacrimal Gland, Tear Film & Ocular Surface and Dry Eye Syndromes, 11/20/04" ("4ª Conferencia Internacional de la Glándula Lacrimal, la Lámina Lacrimal, la Superficie Ocular y los Síndromes del Ojo Seco"); White et al., "Human basic tear fluid osmolality. I. Importance of sample collection strategy" ("Osmolaridad del fluido lacrimal básico humano. I. Relevancia de la estrategia para la recaudación de muestras"), *Acta Ophthalmol (Copenh)* Aug;71(4):524-9, 1993; (6) medición del radio del menisco lacrimal, altura y área transversal para diagnosticar una deficiencia lacrimal acuosa (por ejemplo, Cermak et al, "Is complete androgen insensitivity syndrome associated with alterations in the meibomium gland and ocular surface" ("¿Está asociado el síndrome de completa insensibilidad andrógena con las alteraciones de la glándula del Meibomio y de la superficie ocular?"), *Cornea* 2003;22:516-521; Farrell et al., "A clinical procedure to predict the value of temporary occlusion therapy in keratoconjunctivitis sicca" ("Un procedimiento clínico para predecir el valor de la terapia de oclusión temporal en la queratoconjunctivitis seca") *Ophthalm Physiol Opt* 2003;23:1-8; Glasson et al., "Differences in clinical parameters and tear film of tolerant and intolerant contact lens wearers" ("Diferencias en los parámetros clínicos y en la lámina lacrimal de usuarios tolerantes e intolerantes de lentes de contacto"), *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:5116-5124; Mainstone et al., "Tear meniscus measurement in the diagnosis of dry eye" ("Medición del menisco lacrimal en el diagnóstico del ojo seco"), *Curr Eye Res* 1996; 15:653-661; Nichols et al., "The repeatability of clinical measurements of dry eye" ("La repetitividad de las mediciones clínicas del ojo seco"), *Cornea* 2004a; 23:272-285; Nichols et al., "The lack of association between signs and symptoms in patients with dry eye disease" ("La falta de asociación entre las señales y síntomas en pacientes con la enfermedad de ojo seco"), *Cornea* 2004b; 23:762-770; Oguz et al., "The height and radius of the tear meniscus and methods for examining these parameters" ("La altura y el radio del menisco lacrimal y métodos para examinar a estos parámetros"), *Cornea* 2000;19:497-500; Yokoi et al., "Non-invasive methods of assessing the tear film" ("Métodos no invasivos para evaluar a la lámina lacrimal"), *Exp Eye Res* 2004;78:399-407); (7) interferometría de la capa de lípidos de la lámina lacrimal para diagnosticar al ojo seco por deficiencia lacrimal acuosa (ATD - aqueous tear deficient) o por una deficiencia lacrimal de los lípidos pre - corneales (Danjo et al., "Observation of precorneal tear film in patients with Sjogren's syndrome" ("Observación de la lámina lacrimal pre - corneal en pacientes con el síndrome de Sjogren"), *Acta Ophthalmol Scand* 1995;73:501-5; Doane, "An instrument for in vivo tear film interferometry" ("Un instrumento para interferometría in vivo de la lámina lacrimal"), *Optom Vis Sci* 1989; 66: 383-8; Goto et al., "Computer-synthesis of an interference color chart of human tear lipid layer by a colorimetric approach" ("Síntesis informática de un gráfico a color de interferencia de la capa de lípidos lacrimales humanos mediante un método colorimétrico"), *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4693-7; Goto et al., "Differentiation of lipid tear deficiency dry eye by kinetic analysis of tear interference images" ("Diferenciación del ojo seco debido a deficiencias lacrimales de los lípidos por medio de un análisis cinético de imágenes de interferencia lacrimal"), *Arch Ophthalmol* 2003;121:173-80; Goto E, et al., "Kinetic analysis of tear interference images in aqueous tear deficiency dry eye before and after punctal occlusion" ("Análisis cinético de imágenes de interferencia lacrimal en el ojo seco por deficiencia lacrimal acuosa y después de

una oclusión lacrimal"). Invest Ophthalmol Vis Sci 2003;44:1897-905; Goto et al., "Color mapping of tear lipid layer thickness distribution from the image analysis in DR-1 tear lipid layer interference images" ("Mapeo a color de la distribución del grosor de la capa de lípidos lacrimales proveniente del análisis de imágenes en las imágenes de interferencia de la capa de lípidos lacrimales DR-1") (abstracto ARVO). ARVO 2004; Guillon, "Tear film photography and contact lens wear" ("Fotografía de la lámina lacrimal y el uso de lentes de contacto"), J Br Contact Lens Assoc 1982;5:84-7; King-Smith et al., "Three interferometric methods for measuring the thickness of layers of the tear film" ("Tres métodos de interferometría para medir el grosor de las capas de la lámina lacrimal"), Optom Vis Sci 1999;76:19-32; Korb, et al., "Increase in tear film lipid layer thickness following treatment of meibomian gland dysfunction" ("Incrementos en el grosor de la capa de lípidos de la lámina lacrimal después del tratamiento de la disfunción de la glándula de Meibomio"), Adv Exp Med Biol 1994;350:293-8; Korb et al., "The effect of two novel lubricant eye drops on tear film lipid layer thickness in subjects with dry eye symptoms" ("El efecto de dos nuevas gotas oculares lubricantes en el grosor de la capa de lípidos de la lámina lacrimal en sujetos con síntomas del ojo seco"), Optom Vis Sci 2005; 82: 594-601; Mathers et al., "Assessment of the tear film with tandem scanning confocal microscopy" ("Evaluación de la lámina lacrimal con microscopios confocales para la detección en conjunto"), Cornea 1997;16:162-8; Maruyama et al., "Effect of environmental conditions on tear dynamics in soft contact lens wearers" ("El efecto de las condiciones ambientales en la dinámica lacrimal para usuarios de lentes de contacto suaves"), Invest Ophthalmol Vis Sci 2004;45(8):2563-8; Tiffany, "Refractive index of meibomian and other lipids" ("Índice refractivo de los lípidos del Meibomio y de otros lípidos"), Curr Eye Res 1986;5:887-9; Tiffany et al., "Meniscometry using the Tearscope-plus" ("Medición de los meniscos utilizando a Tearscope-plus") (abstracto ARVO). Invest Ophthalmol Vis Sci 2001;42, s37; Yokoi et al., "Correlation of tear lipid layer interference patterns with the diagnosis and severity of dry eye" ("La correlación de los patrones de interferencia de la capa de lípidos lacrimales con la diagnosis y la gravedad del ojo seco"), Am J Ophthalmol 1996;122:818-24; Yokoi et al., "Assessment of meibomian gland function in dry eye using meibometry" ("Evaluación de la función de la glándula del Meibomio en el ojo seco utilizando mediciones del Meibomio"), Arch Ophthalmol 1999;117:723-9); (8) el sistema de análisis de estabilidad lacrimal (TSAS - Tear Stability Analyses System) para diagnosticar la inestabilidad lacrimal (por ejemplo, Goto et al., "Tear Film Stability Analysis System: Introducing a new application for videokeratography" ("Sistema de Análisis de la Estabilidad de la Lámina Lacrimal: La Presentación de una Nueva Aplicación para Videoqueratografía"), Cornea 2004a; Nov;23(8):S65-S70; Goto et al., "Evaluation of the tear film stability after laser in situ keratomileusis using the tear film stability analysis system" ("La evaluación de la estabilidad de la lámina lacrimal después de una queratomileusis in situ con láser utilizando el sistema de análisis de estabilidad de la lámina lacrimal"), Am J Ophthalmol 2004b Enero;137(1):116-20; Kojima et al., "A new noninvasive tear stability analysis system for the assessment of dry eyes" ("Un nuevo sistema no invasivo de análisis de la estabilidad lacrimal para la evaluación de ojos secos") Invest Ophthalmol Vis Sci 2004;May;45(5):1369-74); (9) mediciones del Meibomio para evaluar la disfunción de la glándula del Meibomio (por ejemplo, Chew et al., "An instrument for quantifying meibomian lipid on the lid margin: the Meibometer" ("Un instrumento para cuantificar a los lípidos del Meibomio en el borde del párpado: el Meibometro"), Curr Eye Res 1993a;12:247-254; Chew et al., "The casual level of meibomian lipids in humans" ("El nivel casual de lípidos del Meibomio en los humanos"), Current Eye Research (Investigación Ocular Actual) 1993b;12:255-259; Komuro et al., "Assessment of meibomian gland function by a newly developed laser meibometer" ("Evaluación de la función de la glándula del Meibomio por medio de un meibometro láser desarrollado recientemente"), Adv Exp Med Biol 2002;506:517-520; Yokoi et al., "Assessment of meibomian gland function in dry eye using meibometry" ("La evaluación de la función de la glándula del Meibomio en el ojo seco utilizando meibometría") Arch Ophthalmol 1999;117:723-729); (10) meibografía o meiboscopia para medir la disfunción de la glándula del Meibomio (por ejemplo, Kaercher, "Ocular symptoms and signs in patients with ectodermal dysplasia syndromes" (Síntomas y señales oculares en pacientes con síndromes de displasia ectodérmica"), Grafes Arch Clin Exp Ophthalmol 2004;495-500; Jester et al., "In vivo biomicroscopy and photography of meibomian glands in a rabbit model of meibomian gland dysfunction" ("biomicroscopía y fotografía in vivo de las glándulas del Meibomio en modelos del conejo en relación a la disfunción de la glándula del Meibomio"), Invest Ophthalmol Vis Sci 1982;22:660-7; Mathers et al., "Video imaging of the meibomian gland" ("Toma de vídeo imágenes de la glándula del Meibomio"), Arch Ophthalmol 1994;112:448-9; Pflugfelder, et al., "Evaluation of subjective assessments and objective diagnostic tests for diagnosing tear-film disorders known to cause ocular irritation" ("Calificación de evaluaciones subjetivas y pruebas de diagnósticos objetivos para diagnosticar enfermedades de la lámina lacrimal que son conocidas por causar irritación ocular"), Cornea 1998;17(1):38-56; Robin et al., "In vivo transillumination biomicroscopy and photography of meibomian gland dysfunction" ("Transiluminación biomicroscópica y fotográfica in vivo de la disfunción de la glándula del Meibomio"). Ophthalmology 1985;92:1423-6; Shimazaki et al., "Meibomian gland dysfunction in patients with Sjogren syndrome" ("Disfunción de la glándula del Meibomio en pacientes con el síndrome de Sjogren,") Ophthalmology (oftalmología) 1998;105(8):1485-8; Yokoi et al., "A newly developed video-meibography system featuring a newly designed probe" ("Un sistema desarrollado recientemente de meibografía por medio de vídeo que presenta a una sonda diseñada recientemente"), Jpn J Ophthalmol 2007; 51: 53-6); (11) la técnica de citología por medio de cepillos (por ejemplo, Fukagawa et al., "Histological evaluation of brush cytology of rabbit conjunctive" ("Evaluación histológica de la citología por medio de cepillos de la conjuntiva de conejos"), Nippon Ganka Gakkai Zasshi 1993;97:1173-8; Fujihara et al., "Evaluation of human conjunctival epithelium by a combination of brush cytology and flow cytometry: an approach to the quantitative technique" ("La evaluación del epitelio conjuntivo humano por medio de una combinación de citología con cepillos y citometría de flujos: un método para la técnica cuantitativa"), Diagn Cytopathol 1997;17:456-60; Miyoshi et al., "Interleukin-8 concentrations in conjunctival epithelium brush cytology samples correlate with neutrophil, eosinophil infiltration, and corneal damage" ("Concentraciones de interleucina-8 en muestras de citología por medio de cepillos del epitelio conjuntivo tienen

correlación con el daño de los neutrófilos, con la infiltración de eosinófilos y daños de la córnea”), *Cornea* 2001;20:743-7; Takano et al., "Inflammatory cells in brush cytology samples correlate with the severity of corneal lesions in atopic keratoconjunctivitis" ("Células inflamatorias en muestras de citología por medio de cepillos tienen correlación con la gravedad de las lesiones corneales en la queratoconjunctivitis atópica"), *Br J Ophthalmol* 2004;88:1504-5; Tsubota et al., "Brush cytology for the evaluation of dry-eye" ("Citología por medio de cepillos para la evaluación del ojo seco"), *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 1990a ;94:224-30; Tsubota et al., "Conjunctival brush cytology" ("Citología conjuntiva por medio de cepillos"), *Acta Cytol* 1990 b;34:233-5; Tsubota et al., "Detection by brush cytology of mast cells and eosinophils in allergic and vernal conjunctivitis" ("Detección por medio de citología de cepillos de mastocitos y eosinófilos y la conjuntivitis vernal"); *Cornea* 1991;10:525-31); (12) citometría de flujos en la citología de impresión para detectar inflamaciones conjuntivas (por ejemplo, Baudouin et al., "Flow cytometry in impression cytology specimens. A new method for evaluation of conjunctival Inflammation" ("Citometría de flujos en especímenes de citología de impresiones. Un nuevo método para la evaluación de la inflamación conjuntiva"), *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997a;38:1458-1464; Bourcier et al., "Expression of CD40 and CD40 ligand in the human conjunctival epithelium" ("La expresión de CD40 y los ligandos de CD40 en el epitelio conjuntivo humano"), *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:120-126; Brignole et al., "Expression of Fas antigen (CD95) in the human conjunctival epithelium. Positive correlation with class II HLA DR expression in inflammatory conditions" ("La expresión del antígeno Fas (CD95) en el epitelio conjuntivo humano. Una correlación positiva con la expresión HLA DR de clase II en condiciones inflamatorias"), *Exp Eye Res* 1998;67:687-697; Brignole et al., "Flow cytometric analysis of inflammatory markers in conjunctival epithelial cells of patients with dry eyes" ("Análisis de citometría de flujos de marcadores inflamatorios en células epiteliales conjuntivas de pacientes con ojos secos") *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:1356-1363; Brignole et al., "Flow cytometric analysis of inflammatory markers in KCS: 6-month treatment with topical cyclosporin A" ("Análisis de citometría de flujos de marcadores inflamatorios en KCS: un tratamiento de 6 meses con ciclosporina A tópica"), *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:90-95; Brignole et al., "Flow cytometry in conjunctival impression cytology: a new tool for exploring ocular surface pathologies" ("Citometría de flujos en citologías de impresión conjuntiva: una nueva herramienta para explorar patologías de la superficie ocular"), *Exp Eye Res* 2004;78:473-481; Fujihara et al., "Evaluation of human conjunctival epithelium by a combination of brush cytology and flow cytometry: an approach to the quantitative technique" ("Evaluación del epitelio conjuntivo humano por medio de una combinación de citología por medio de cepillos y citometrías de flujos: un método para la técnica cuantitativa") *Diagn Cytopathol* 1997;17:456-460; Pisella et al., "Flow cytometric analysis of conjunctival epithelium in ocular rosacea and keratoconjunctivitis sicca" ("Análisis de citometría de flujos del epitelio conjuntivo en rosácea ocular y en queratoconjunctivitis seca"). *Ophthalmology (Oftalmología)* 2000;107:1841-1849; Pisella, et al., "Conjunctival proinflammatory and proapoptotic effects of latanoprost, preserved timolol and unpreserved timolol: an ex vivo and in vitro study" ("Efectos pro inflamatorios y proapoptóticos conjuntivos del lantanoprost, tiamolol conservado y tiamolol no conservado: un estudio ex vivo e in vitro"). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1360-1368); (13) la prueba de Ferning para diagnosticar la calidad de las lágrimas (la concentración de electrolitos), la KCS y la hiperosmolaridad (por ejemplo, Albach et al., "Diagnosis of keratoconjunctivitis sicca in rheumatoid arthritis. The value of various tests" ("Diagnóstico de la queratoconjunctivitis seca en la artritis reumatoide. El valor de varias pruebas"), *Ophthalmologie* 1994 abril;91(2):229-34; Golding et al., "X-ray and scanning electron microscopic analysis of the structural composition of tear ferns" ("Análisis microscópico de electrones por medio de radiografías y por detección de la composición estructural de los helechos lacrimales"), *Cornea* 1994 Enero;13(1):58-66; Norm, "Quantitative tear ferning. Clinical investigations" ("Prueba cuantitativa de helechos lacrimales. Investigaciones clínicas"), *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1994 Jun;72(3):369-72; Pearce et al., "Spatial location studies on the chemical composition of human tear ferns" ("Estudios de ubicaciones espaciales en la composición química de helechos lacrimales humanos"), *Ophthalmic Physiol Opt* 2000;Jul;20(4):306-13; Pensyl et al., "The repeatability of tear mucus ferning grading" ("IL repetitividad de la clasificación de helechos de la mucosa lacrimal"), *Optom Vis Sci* 1998 Aug;75(8):600-4; Rolando, "Tear mucus ferning test in normal and keratoconjunctivitis sicca eyes" ("Pruebas de helechos de mucosa lacrimal en ojos normales y con queratoconjunctivitis seca"). *Chibret Int J Ophthalmol* 1984;2(4):32-41; Rolando et al., "Tear mucus ferning test in keratoconjunctivitis sicca" ("Prueba de helechos de la mucosa lacrimal en queratoconjunctivitis seca"), en: Holly FJ, Lamberts DW, MacKeen DL (eds.): *The preocular tear film in health, disease, and contact lens wear (La lámina lacrimal pre - ocular en salud, enfermedad y el uso de lentes de contacto)*,. 1st Intern Tear Film Symposium (1er Simposio de la Lámina Lacrimal Interna). Lubbock (Texas, Estados Unidos), Dry Eye Institute (Instituto del Ojo Seco), 1986, 203-210; Rolando et al., "The effect of hyperosmolarity on tear mucus ferning" ("El efecto de la hiperosmolaridad en los helechos de mucosa lacrimal"), *Fortschr Ophthalmol* 1986;83:644-646; Rolando et al., "Tear mucus crystallization in children with cystic fibrosis" ("Cristalización de la mucosa lacrimal en niños con fibrosis quística"), *oftalmológica* 1988;197(4):202-6); (14) Índice de Protección Ocular (OPI - Ocular Protection Index para evaluar la protección de la superficie ocular y el riesgo del daño de la superficie ocular (por ejemplo, Ousler et al., "Factors that influence the inter-blink interval (IBI) as measured by the ocular protection index (OPI)" ("Factores que influyen al intervalo entre parpadeos (IBI - inter-blink interval) tal como se midió por el índice de protección ocular (OPI)", (representación del póster) *ARVO* 2002; Nally et al., "Ocular discomfort and tear film break-up time in dry eye patients: A correlation" ("Incomodidad ocular y el tiempo de ruptura de la lámina lacrimal en pacientes con ojo seco: una correlación"), *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:4:1436; Abelson et al., "Alternate reference values for tear film break-up time in normal and dry eye populations" ("Valores de referencia alterna para el tiempo de ruptura de la lámina lacrimal en poblaciones normales y con ojo seco"), *Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes 3 Part B*" (Glándula Lacrimal, Lámina Lacrimal, y los Síndromes de Ojo Seco Parte B"), *Adv Exp Med Biol* 2002; 506:1121-1125; Abelson et al., "Dry eye syndrome: diagnosis, clinical trials, and pharmaceutical treatment—'improving clinical trials'. *Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes 3 Part*

B" ("Síndrome del ojo seco: diagnosis, ensayos clínicos, y tratamiento farmacéutico—'mejorando a los ensayos clínicos'. Glándula Lacrimal, Lámina Lacrimal y los Síndromes de Ojo Seco 3 Parte B", *Adv Exp Med Biol* 2002; 506:1079-86); (15) Fluorofotometría (fluorometría) de flujos lacrimales para evaluar cambios en el flujo lacrimal en la deficiencia lacrimal acuosa (ATD - aqueous tear deficiency) (por ejemplo, Gobbels et al., "Tear secretion in dry eyes as assessed by objective fluorophotometry" ("Secreción lacrimal en ojos secos tal como fue evaluado por la fluorofotometría dirigida"). *Ger J Ophthalmol* 1992; 1:350-353; Kuppens et al., "Basal tear turnover and topical timolol in glaucoma patients and healthy controls by Fluorophotometry" ("Rotación lacrimal basal y timolol tópico en pacientes con glaucoma y controles saludables por medio de Fluorofotometría"), *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33:3442-3448; Mishima, "Some physiological aspects of the precorneal tear film" ("Algunos aspectos fisiológicos de la lámina lacrimal pre - corneal"), *Arch Ophthalmol* 1965;73:233-241; Mishima S, "Determination of tear volume and tear flow" ("Determinación del volumen lacrimal y flujo lacrimal"), *Invest Ophthalmol* 1966; 5:264-275; Mathers et al., "Tear film and evaporation in patients with and without dry eye" ("Lámina lacrimal y la evaporación en pacientes que tienen y que no tienen ojo seco"), *oftalmología* 1996; 103:664-669; Mathers et al., "Tear film changes associated with normal aging" ("Cambios de la lámina lacrimal asociados con el envejecimiento normal"), *Cornea* 1996; 15:229-334; Mathers, "Evaporation from the ocular surface" ("Evaporación de la superficie ocular"), *Exp Eye Res* 2004; 78:389-394; Van Best et al., "Measurement of basal tear turnover using a standardized protocol" ("Mediciones de la rotación lacrimal basal usando un protocolo estandarizado"), *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1995; 233:1-7; McNamara et al., "Fluorometry in contact lens research: The next step" ("Fluorometría en investigación de lentes de contacto: El próximo paso"), *Optom Vis Sci* 1998; 75:316-322; Pearce, "An improved fluorophotometric method for tear turnover assessment" ("Un método fluorofotométrico mejorado para la evaluación de la rotación lacrimal"), *Optom Vis Sci* 2001; 78:30-36), y combinaciones de estas pruebas de diagnóstico.

Estos métodos también pueden ser utilizados para evaluar la eficacia de los agentes del invento para tratar los trastornos de ojo seco.

En algunas secciones, el agente es administrado antes de la operación a un paciente que va a experimentar uno de los siguientes procedimientos: trasplantes corneales, LASIK, queratectomía fotorrefractiva y LASEK. En algunas secciones, el agente elimina o reduce la inflamación o el dolor durante y después del procedimiento. En algunas secciones, el agente es administrado alrededor de un día a alrededor de 2 días antes del procedimiento. En algunas secciones, el agente es administrado después de la operación a un paciente que va a experimentar uno de los siguientes procedimientos: trasplante corneal, LASIK, queratectomía fotorrefractiva y LASEK. En algunas secciones, el inhibir la pérdida de agudeza visual significa aminorar la pérdida de la agudeza visual. En algunas secciones, el tratamiento post - operativo o pre - operativo disminuye el monto de cicatrices y depósitos fibrosos después del procedimiento. En algunas secciones, el inhibir la pérdida de agudeza visual significa que el paciente retiene su agudeza visual. En algunas secciones, el inhibir el rechazo del trasplante significa que el agente es inmunosupresor, previniendo por lo tanto, un rechazo total del implante de córnea.

En algunas secciones, uno o más agentes terapéuticos adicionales, u otros agentes, pueden ser utilizados en combinación con el agente en los métodos de este invento. El uno o más agentes terapéuticos pueden ser administrados a un paciente simultáneamente o secuencialmente. En algunas secciones, el monto del agente terapéutico adicional, cuando es administrado en una composición, es de alrededor del 0.01% al 5% por masa, desde alrededor del 0.1 por ciento al 2% por masa, o desde el 0.5 por ciento al 50% por masa. En algunas secciones, el agente terapéutico adicional es acetónido de fluocinolona (Retisert®), o rimexolona (AL-2178, Vexol, Alcon).

En algunas secciones, el agente terapéutico adicional es ciclosporina (Retisert®).

En algunas secciones, el agente terapéutico adicional es un cortico-esteroide. En algunas secciones, el cortico-esteroide es triamcinolona, dexametasona, fluocinolona, cortisona, prednisolona, o fluorometolona.

En algunas secciones, el agente terapéutico adicional es seleccionado de Dehydrex™ (Holles Labs), Civamide (Opko), hialuronato de sodio (Vismed, Lantibio/TRB Chemedica), ciclosporina (ST-603, Sirion Therapeutics), ARG101(T) (testosterona, Argentis), AGR1012(P) (Argentis), ecabet de sodio (Senju-Ista), gefarnato (Santen), ácido 15-(s)-hidroxieicosatetraenoico (15(S)-HETE), cevimelina, doxiciclina (ALTY-0501, Alacrity), minociclina, iDestrin™ (NP50301, Nascent Pharmaceuticals), ciclosporina A (Nova22007, Novagali), oxitetraciclina (duramicina, MOL11901, Lantibio), CF101 (2S,3S,4R,5R)-3,4-dihidroxi-5-[6-[(3-yodofenil)metilamino]purin-9-il]-N-m-etil-oxolano-2-carboxamida, Can-Fite Biopharma), voclosporina (LX212 o LX214, Lux Biosciences), ARG103 (Agentis), RX-10045 (análogo de resolquina sintética, Resolvix), DYN15 (Dyanmis Therapeutics), rivoglitazona (DE011, Daiichi Sanko), TB4 (RegeneRx), OPH-01 (Ophthalmis Mónaco), PCS101 (Pericor Science), REV1-31 (Evolutec), Lacritina (Senju), rebamipida (Otsuka-Novartis), OT-551 (Othera), PAI-2 (University of Pennsylvania y Temple University), pilocarpina,

tacrolimus, pimecrolimus (AMS981, Novartis), etabonato de loteprednol, rituximab, tetrasódico de diquafosol (INS365, Inspire), KLS-0611 (Kissei Pharmaceuticals), dehidroepiandrosterona, anakinra, efalizumab, micofenolato sódico, etanercept (Embrel®), hidroxiclороquina, NGX267 (TorreyPines Therapeutics), o talidomida.

5 En algunas secciones, el agente terapéutico adicional es un agente anti-angiogénico, un agonista colinérgico, un modulador de los receptores TRP-1, un bloqueador del canal del calcio, un secretagogo de mucina, un estimulante de MUC1, un inhibidor de la calcineurina, un corticosteroide, un agonista de los receptores de P2Y2, un agonista de los receptores de muscarínicos, otro inhibidor de JAK, un inhibidor de quinasas Bcr-Abl, un inhibidor de quinasas Flt-3, un inhibidor de quinasas RAF, un inhibidor de quinasas FAK tal como, por ejemplo, aquellos descritos en WO 10 2006/056399. En algunas secciones, el agente terapéutico adicional es un derivado de tetraciclina (por ejemplo, minociclina o doxiciclina).

15 En algunas secciones, el agente o agentes terapéuticos adicionales son gotas demulcentes para ojos (también conocidas como "lágrimas artificiales"), que incluyen, pero no se limitan a, composiciones que contienen alcohol de polivinilo, hidroxipropil - metilcelulosa, glicerina, polietilenglicol (por ejemplo, PEG 400), o carboximetil celulosa. Las lágrimas artificiales pueden ayudar en el tratamiento del ojo seco al compensar a la humedad y capacidad de lubricación reducidas de la lámina lacrimal. En algunas secciones, el agente terapéutico adicional es un medicamento mucolítico, tal como la N-acetil-cisteína, que puede interactuar con las mucoproteínas y, por lo tanto, reduce la viscosidad de la lámina lacrimal.

20 En algunas secciones, el agente terapéutico adicional incluye agentes antibióticos, antivirales, fungicidas, anestésicos y antiinflamatorios incluyendo a antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, y agentes antialérgicos. Ejemplos de medicamentos adecuados incluyen a aminoglicósidos tales como amikacina, gentamicina, tobramicina, estreptomycin, netilmicina, kanamicina y; fluoroquinolonas como ciprofloxacina, norfloxacina, ofloxacina, trovafloxacina, lomefloxacina, levofloxacino y enoxacina; naftiridina; sulfonamidas; polimixina; cloranfenicol; neomicina; paramomomicina; colistimetato; bacitracina; vancomicina; tetraciclinas; rifampicina y sus derivados ("rifampinas"); cicloserina; betalactámicos; cefalosporinas; anfotericinas; fluconazol; flucitosina; natamicina; miconazol; ketoconazol; corticosteroides; diclofenaco; flurbiprofeno; ketorolaco; suprofen; comolina; lodoxamida; levocabastina; nafazolina; antazolina; feniramimane; o antibiótico de azalida.

25 Ejemplos de inhibidores de Bcr-Abl incluyen los compuestos, y sus sales farmacéuticamente aceptables, del género y de las especies presentadas en la patente de Estados Unidos número 5,521,184, WO 04/005281, EP2005/009967, EP2005/010408, y No. Ser. De Estados Unidos 60/578,491.

30 Ejemplos adecuados de inhibidores de Flt-3 incluyen a compuestos, y sus sales farmacéuticamente aceptables presentados en WO 03/037347, WO 03/099771, y WO 04/046120.

35 Ejemplos de inhibidores de RAF incluyen a compuestos, y sus sales farmacéuticamente aceptables, presentados en WO 00/09495 y WO 05/028444.

40 Ejemplos adecuados de inhibidores de FAK incluyen a compuestos, y sus sales farmacéuticamente aceptables, presentados en WO 04/080980, WO 04/056786, WO 03/024967, WO 01/064655, WO 00/053595, y WO 01/014402.

45 Cuando se utiliza como farmacéuticos, los agentes pueden ser administrados en la forma de una composición farmacéutica. Estas composiciones pueden ser preparadas en una forma bien conocida en la industria farmacéutica, y pueden administrarse por medio de una variedad de rutas, dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y dependiendo del área que va a ser tratada. La administración puede ser tópica (incluyendo transdérmica, epidérmica, oftálmica y a las membranas de la mucosa incluyendo entregas intranasales, vaginales y rectales), pulmonar (por ejemplo, por medio de inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo por medio de un nebulizador; intratraqueal o intranasal), oral o parenteral. La administración parenteral incluye a la administración intravenosa, intra-arterial, subcutánea, intra-peritoneal, intramuscular o por medio de inyecciones o infusiones; o intra- craneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular. La administración parenteral puede ser en la forma de una sola dosis, o puede ser, por ejemplo, por medio de una bomba de perfusión continua. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas para la administración tópica podrían incluir a parches, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos. Portadores farmacéuticos convencionales, acuosos, polvos o bases de aceites, espesantes o similares podrían ser necesarios o deseables.

50 En algunas secciones, el agente es administrado como una composición oftálmica. Así mismo, en algunas

secciones, los métodos comprenden la administración del agente y de un portador oftálmicamente aceptable. En algunas secciones, la composición oftálmica es una composición líquida, una composición semisólida, una inserción, una lámina, micropartículas o nanopartículas.

5 En algunas secciones, la composición oftálmica es una composición líquida. En algunas secciones, la composición oftálmica es una composición semi-sólida. En algunas secciones, la composición oftálmica es una composición tópica. Las composiciones tópicas incluyen, pero no se limitan a, composiciones líquidas y semi-sólidas. En algunas secciones, la composición oftálmica es una composición tópica. En algunas secciones, la composición tópica  
10 comprende una solución acuosa, una suspensión acuosa, un ungüento o un gel. En algunas secciones, la composición oftálmica es aplicada tópicamente en el frente del ojo, bajo el párpado superior, en el párpado inferior y en el fondo del ojo. En algunas secciones, la composición oftálmica es esterilizada. La esterilización puede lograrse por técnicas conocidas como por ejemplo la filtración y esterilización de la solución o por medio del calentamiento de la solución en la ampolla lista para su uso. Las composiciones oftálmicas del invento pueden contener además  
15 excipientes farmacéuticos adecuados para la preparación de formulaciones oftálmicas. Ejemplos de aquellos excipientes son agentes conservantes, agentes amortiguadores, agentes quelantes, agentes antioxidantes y sales para regular la presión osmótica.

20 Tal como se utiliza en este documento, el término "portador oftálmicamente aceptable" se refiere a cualquier material que puede contener y liberar al agente y que es compatible con el ojo. En algunas secciones, el portador oftálmicamente aceptable es agua o una solución o suspensión acuosa, pero también incluye a aceites tales como aquellos utilizados para hacer ungüentos y matrices poliméricas tales como los utilizados en inserciones oculares. En algunas secciones, la composición podría ser una suspensión acuosa que contiene al agente. Las composiciones oftálmicas líquidas, incluyendo a los ungüentos y a las suspensiones, podrían tener una viscosidad que es apropiada  
25 para la ruta seleccionada de administración. En algunas secciones, la composición oftálmica tiene una viscosidad en el rango de alrededor de 1000 a alrededor de 30,000 centipoise.

30 En algunas secciones, la composición líquida comprende además a un polímero. Estos polímeros pueden ser utilizados para mejorar la biodisponibilidad, incrementar la viscosidad, o reducir el desecho que sale del ojo para una formulación líquida. En algunas secciones, los polímeros incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en Wagh, et al., "Polymers used in ocular dosage form and drug delivery systems" ("Polímeros utilizados en forma de dosis y sistemas de entrega de medicamentos"), Asian J. Pharm., Páginas 12-17 (enero. 2008), en algunas secciones, el polímero es hialuronato de sodio, quitosano, una ciclodextrina (por ejemplo, hidroxipropil (3-ciclodextrina), ácido poligalacturónico, xiloglucano, goma de xantano, goma gellan, un tiómero, un poli (orto-éster) (por ejemplo, tal como se describe en Einmahl, Adv. Drug. Deliv. Rev. 53:45-73 (2001), o un polisacárido de la semilla del tamarindo (por ejemplo, como se describe en Ghelardi, et al., Antimicrob. Agents Chemother. 48:3396-3401 Z r (2004).

40 En algunas secciones, las composiciones oftálmicas pueden comprender además uno o más surfactantes, adyuvantes, amortiguadores, antioxidantes, ajustadores de la tonicidad, conservantes (por ejemplo, EDTA, BAK (cloruro de benzalconio), clorito de sodio, perborato de sodio, policuaternio-1), espesantes o modificadores de la viscosidad (por ejemplo, celulosa de carboximetilo, celulosa de hidroximetilo, alcohol polivinílico, polietilenglicol, glicol 400, celulosa de hidroxietilo propilenglicol, hidroxipropil-guar, ácido hialurónico, y celulosa de hidroxipropilo) y similares. Aditivos en la formulación podrían incluir, pero no se limitan a, cloruro de sodio, bicarbonato de sodio, ácido sórbico, parabeno de metilo, clorhexidina, aceite de castor y perborato de sodio.

50 Las composiciones oftálmicas acuosas (soluciones o suspensiones) generalmente no contienen constituyentes fisiológicamente u oftálmicamente dañinos. En algunas secciones, agua purificada o desionizada es utilizada en la composición. El pH puede ser ajustado al agregar cualquier ácido, base o amortiguador fisiológicamente u oftálmicamente aceptable que ajuste el pH a dentro del rango de alrededor de 5.0 a 8.5. Ejemplos oftálmicamente aceptables de ácidos incluyen a ácidos acéticos, bóricos, cítricos, lácticos, fosfóricos, hidroclicóricos y similares, y ejemplos de bases incluyen a hidróxido de sodio, fosfato de sodio, borato de sodio, citrato de sodio, acetato de sodio, lactato de sodio, trometamina, tris hidroximetilamino-metano, y similares. Las sales y amortiguadores incluyen a citrato/dextrosa, bicarbonato de sodio, cloruro de amonio y las mezclas de los ácidos y bases ya mencionados.

60 En algunas secciones, la presión osmótica de la composición oftálmica podría ser desde 10 miliosmoles (mOsM) a alrededor de 400 mOsM, o desde 260 a alrededor de 340 mOsM. En algunas secciones, la presión osmótica puede ser ajustada al usar montos apropiados de sales u excipientes fisiológicamente y oftálmicamente aceptables. En secciones adicionales, el cloruro de sodio puede ser utilizado para aproximar al fluido fisiológico. En otras secciones, la composición comprende a cloruro de sodio que varía desde alrededor de 0.01 por ciento a alrededor de 1% por masa, o desde alrededor de 0.05 por ciento a alrededor de 0.45 por ciento por masa, basándose en la masa total de la composición. Montos equivalentes de una o más sales compuestas de cationes tales como potasio, amonio y

similares y aniones tales como cloruro, citrato, vitaminas C, borato, fosfato, bicarbonato, sulfato, tiosulfato, bisulfato, bisulfato de sodio, sulfato de amonio, y similares también pueden ser utilizados adicionalmente o en vez de cloruro de sodio para alcanzar las osmolalidades dentro del rango ya mencionado. Asimismo, un azúcar tal como manitol, dextrosa, sorbitol, glucosa y similares también pueden ser utilizados para ajustar la osmolalidad.

5

En algunas secciones, los métodos involucran formar o suministrar un depósito del agente en contacto con la superficie externa del ojo. Un depósito se refiere a una fuente del agente que no se remueve rápidamente por las lágrimas u otros mecanismos del espesamiento del ojo. Esto permite que concentraciones continuas y altamente sostenidas del agente estén presentes en el fluido en la superficie externa del ojo mediante una sola aplicación. Sin desear depender exclusivamente de ninguna teoría, se cree que la absorción y penetración podría depender de la concentración disuelta del medicamento y la duración de contacto del tejido externo con el fluido que contiene al medicamento. En la medida en que el medicamento es removido por el despeje del fluido ocular y/o la absorción en el tejido ocular, más medicamento es suministrado, por ejemplo, disuelto, en el fluido ocular reabastecido proveniente del depósito. Asimismo, el uso de un depósito podría facilitar aún más la carga del tejido ocular para más agentes insolubles. En algunas secciones, el depósito podría permanecer durante hasta 8 horas o más. En algunas secciones, las formas de depósitos oftálmicos incluyen, pero no se limitan a, suspensiones poliméricas acuosas, ungüentos e inserciones sólidas.

10

15

20

En algunas secciones, una composición semi-sólida es una formulación líquida que se incrementa en viscosidad cuando se aplica al ojo, usualmente debido a un polímero en la formulación líquida. Estos incrementos en viscosidad podrían darse debido a un cambio en temperatura, pH, o concentración de electrolitos. En algunas secciones, el polímero incluye, pero no se limita a, aquellos descritos para las formas de dosis semi-sólidas en Wagh, et al., "Polymers used in ocular dosage form and drug delivery systems" ("Polímeros utilizados en formas de dosis oculares y los sistemas de entrega de medicamentos"), Asian J. Pharm., Páginas 12-17 (enero. 2008).

25

30

En algunas secciones, el polímero es un acetofalato de celulosa, ácido poliacrílico, goma gellan, ácido hialurónico, quitosano, sales del ácido algínico (por ejemplo, alginato de sodio), o un copolímero del bloque de óxido de etileno y óxido de propileno (por ejemplo, Pluronic®, BASF; poloxámero). En algunas secciones, el ácido poliacrílico es un ácido acrílico reticulado (por ejemplo, Carbopol®). En algunas secciones, la composición semi-sólida comprende una mezcla de carbopol y un polímero de bloque de óxido de etileno y óxido de propileno; una mezcla de celulosa de metilo y de celulosa de hidróxietilo; o una mezcla de polietilenglicol y un con polímero del bloque de óxido de etileno y de óxido de propileno.

35

40

En algunas secciones, la composición oftálmica es un ungüento o un gel. En algunas secciones, la composición oftálmica es un portador de entrega que se basa en aceites. En algunas secciones, la composición comprende una base de petróleo o lanolina a la cual se agrega el ingrediente activo, usualmente como desde un 0.1 por ciento a un 2%, y excipientes. Bases comunes podrían incluir, pero no se limitan a, aceites minerales, vaselina y sus combinaciones. En algunas secciones, el ungüento es aplicado en la forma de una franja en el párpado inferior.

45

En algunas secciones, la composición oftálmica es una inserción oftálmica. En algunas secciones, la inserción oftálmica es biológicamente inerte, suave, bio-erosionable, visco elástica, estable para su esterilización después de su exposición a agentes terapéuticos, resistente a infecciones provenientes de bacterias en el aire, bio - erosionable, bio - compatible y/o visco - elástica. En algunas secciones, la inserción comprende una matriz oftálmicamente aceptable, por ejemplo, una matriz polimérica. La matriz es comúnmente un polímero y el agente es generalmente dispersado ahí o enlazado a la matriz polimérica. En algunas secciones, el agente puede liberarse lentamente de la matriz por medio de la disolución o hidrólisis del enlace covalente. En algunas secciones, el polímero es bio-erosionable (soluble) y su tasa de disolución podría controlar a la tasa de liberación del agente allí dispersado. En otra forma, la matriz polimérica es un polímero biodegradable que se descompone, como por ejemplo, por hidrólisis para liberar de esa forma al agente allí enlazado o allí disperso. En secciones adicionales, la matriz y el agente pueden ser rodeados con un recubrimiento polimérico adicional para controlar aún más su liberación. En algunas secciones, la inserción comprende un polímero biodegradable tal como policaprolactona (PCL), un co-polímero de acetato de etileno/vinilo (EVA - ethylene/vinyl acetate), cianoacrilato alquilo-polivinílico, poliuretano, un nylon, o poli (DL-lactida-co-glicolida) (PLGA), o un copolímero de cualquiera de estos. En algunas secciones, el agente es dispersado en un material matricial o dispersado en la composición monomérica utilizada para hacer al material matricial antes de su polimerización. En algunas secciones, el monto del agente varía desde alrededor de 0.1 a alrededor de 50%, o desde alrededor del 2 a alrededor del 20%. En algunas secciones, la matriz polimérica biodegradable o bio-erosionable es utilizada para que la inserción gastada no tenga que ser removida. En la misma forma en que el polímero biodegradable o bio-erosionable es degradado o disuelto, el agente es liberado.

50

55

60

65

En secciones adicionales, la inserción oftálmica comprende a un polímero, incluyendo, pero sin limitarse a, aquellos

descritos en Wagh, et al., "Polymers used in ocular dosage form and drug delivery systems" ("Polímeros utilizados en formas de dosis oculares y en sistemas de entrega de medicamentos"), Asian J. Pharm., Páginas 12-17 (enero. 2008).

5 En algunas secciones, la inserción comprende un polímero seleccionado de polivinilpirrolidona (PVP), un polímero o co-polímero de acrilato o metacrilato (por ejemplo, la familia de polímeros de Eudragit® de Rohm o Degussa), hidroximetilcelulosa, ácido poliacrílico, poli (amidoamina) dendrímeros, poli (dimetil siloxano), óxido de polietileno, poli (lactida -co-glicólido), poli (2-hidroxiethyl-metacrilato), poli (alcohol de vinilo), o poli (fumarato de propileno). En algunas secciones, la inserción comprende a Gelfoam® R. En algunas secciones, la inserción es un ácido poliacrílico que conjuga a cisteína de 450 kDa.

15 En algunas secciones, la composición oftálmica es una lámina oftálmica. Polímeros adecuados para aquellas láminas incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en Wagh, et al., "Polymers used in ocular dosage form and drug delivery systems" ("Polímeros utilizados en formas de dosis oculares y en sistemas de entrega de medicamentos"), Asian J. Pharm., Páginas 12-17 (enero. 2008). En algunas secciones, la lámina es un lente de contacto suave tal como aquellos hechos de co-polímeros de N,N-dietilacrilamida y ácido metacrílico reticulado con dimetacrilato de etilenglicol.

20 En algunas secciones, la inserción comprende un núcleo que comprende al agente y a un tubo exterior (refiérase, por ejemplo, a la publicación de la patente de Estados Unidos número 20040009222). En algunas secciones, el tubo exterior puede ser permeable, semi-permeable o impermeable al medicamento. En algunas secciones, el núcleo del medicamento podría incluir una matriz polimérica que no afecta significativamente la tasa de liberación del medicamento. En algunas secciones, el tubo exterior, la matriz polimérica del núcleo del medicamento, o ambos podrían ser bio-erosionables. En algunos casos, el producto co - extruido puede ser segmentado en dispositivos de entrega de medicamentos. En algunas secciones, los dispositivos podrían dejarse descubiertos para que sus extremos respectivos estén abiertos, o los dispositivos podrían estar cubiertos con, por ejemplo, una capa que es permeable para el agente, semi-permeable para el agente o bio-erosionable. En ciertas secciones, el agente y por lo menos un polímero son agregados y mezclados en forma de polvos. En algunas secciones, la inserción es formada al enviar un material polimérico a un primer dispositivo de extrusión, enviando a un agente a un 2° dispositivo de extrusión, para co- extruyendo una masa que incluye al material polimérico y al agente, y formando la masa en por lo menos un dispositivo de entrega de medicamentos co- extruidos que comprenden un núcleo que incluye al agente y a una capa externa que incluye al material polimérico. En ciertas secciones, el agente enviado al 2° dispositivo de extrusión está en la mezcla agregada con por lo menos un polímero. En ciertas secciones, el agente y por lo menos un polímero están mezclados y agregados en forma de polvo. En ciertas secciones, este acto incluye el enviar más de un medicamento al 2° dispositivo de extrusión. En ciertas secciones, el material polimérico es uno que es impermeable, semi-permeable o permeable para el agente. El material polimérico puede ser bio-erosionable y/o remediable por medio de radiación. En instancias posteriores, la inserción podría ser irradiada.

45 En ciertas secciones, la inserción es una forma tubular y podría estar segmentada en una pluralidad de productos más cortos. En ciertas secciones, la inserción comprende además una cobertura de la pluralidad de productos más cortos con una o más capas incluyendo por lo menos a una de las capas que es permeable para el agente, una capa que es semi-permeable para el agente y una capa que es bio-erosionable. El material polimérico podría incluir cualquier polímero bio - compatible, tal como policaprolactona (PCL), un co- polímero de acetato de etileno/vinilo (EVA - ethylene/vinyl acetate), cianoacrilato de polialquilo, poliuretano, un nylon, o poli (dl-lactida-co-glicólido) (PLGA) o cualquiera de sus co-polímeros.

50 En algunas secciones, la inserción comprende un monto terapéuticamente efectivo de por lo menos un agente cubierto por, o dispersado en, una matriz polimérica, donde el agente está en una forma granular o en partículas. En algunas secciones, el agente es liberado de la formulación como un medicamento proveniente de los gránulos disueltos en, o dentro de, la matriz, dispersado a lo largo de la matriz, y es liberado en el fluido fisiológico de sus alrededores. En algunas secciones, la tasa de liberación es limitada principalmente por la tasa de disolución del agente proveniente de los gránulos/partículas en la matriz; los pasos de dispersión a lo largo de la matriz y de difusión en el fluido cercano son principalmente no limitantes en lo que se refiere a la tasa de liberación. En ciertas secciones, la matriz polimérica no es bio-erosionable, mientras que en otras secciones es bio-erosionable. Matrices poliméricas de ejemplo que no son bio-erosionables pueden formarse a partir de poliuretano, poli - silicona, poli (acetato de etileno-co-vinilo) (EVA - ethylene-co-vinyl acetate), alcohol de polivinilo, y sus derivados y copolímeros. Matrices poliméricas bio-erosionables de ejemplo pueden formarse a partir de polianhídridos, ácidos poli - lácticos, ácidos poliglicólicos, poliortoésteres, polialquilcianoacrilatos y sus derivados o copolímeros.

65

5 En algunas secciones, la inserción comprende un material colágeno. En algunas secciones, la inserción podría ser una inserción soluble de medicamentos oftálmicos (SODI - soluble ophthalmic drug insert, por ejemplo, una lámina oval polimérica que puede ser introducida en la bolsa conjuntiva superior para la entrega de medicamentos; una inserción elíptica tal como OCUSERT® (un sistema terapéutico ocular de la pilocarpina, desarrollado por Alza Corporation) que es hecho de acetato de vinilo de etileno; OCUFIT® (desarrollado por Escalon Ophthalmics Inc., Skillman, NS), que es un elastómero de silicona en forma de vara; ; Lacrisert®, una inserción en forma de vara hecha de celulosa; Sistemas Nuevos de Entrega de Medicamentos Oftálmicos (NODS - New Ophthalmic Drug Delivery Systems, hecho de poli (alcohol de vinilo); y las inserciones descritas en Fabrizio, Advanced Drug Delivery Reviews (Revisiones Avanzadas de Entrega de Medicamentos) 16: 95 -106, 1998.

15 En secciones adicionales, la inserción puede ser colocada, dependiendo en la ubicación del mecanismo utilizado, para mantener a la inserción en su posición, ya sea por el paciente, o por el doctor. En secciones adicionales, la inserción comprende a colágeno, gelatina o un polímero, donde el polímero es seleccionado de policaprolactona (PCL), un copolímero de acetato de etileno/vinilo (EVA - ethylene/vinyl acetate), polialquilocianoacrilato, poliuretano, un nylon, poli (DL-lactida-co-glicolida) (PLGA), o sus co - polímeros. En algunas secciones, la inserción es implantada bajo el párpado superior. En algunas secciones, la inserción es implantada en el segmento posterior del ojo, en el espacio de las coroides, o en la esclerótica. En algunas secciones, la inserción es implantada por vía intravítrea o por la sub-retina. En algunas secciones, la inserción es injertada sub-retinalmente. Los métodos de administración y las técnicas para su preparación se establecen en Remington's Pharmaceutical Sciences (Ciencias Farmacéuticas de Remington).

30 En otras secciones, la inserción suministra una liberación sostenida del agente al vítreo del ojo. Tal como se utiliza aquí, "liberación sostenida" se refiere a que la composición libera al agente sobre un período extendido de tiempo en una forma controlada. En algunas secciones, la inserción libera al agente a una tasa que permite que la concentración del agente acuoso permanezca en una menor concentración que la del agente vítreo durante la liberación. En algunas secciones, la concentración del agente acuoso varía desde alrededor de 0.002 microgramos/mililitros a alrededor de 0.01 microgramos/mililitros, o desde alrededor de 0.01 microgramos/mililitros a alrededor de 0.05 microgramos/mililitros, o menos que alrededor de 0.05 microgramos/mililitros. En algunas secciones, el agente es liberado a una tasa de alrededor de 1 µg/día a alrededor de 50 µg/día, o desde alrededor de 1 µg/día a alrededor de 10 µg/día. En algunas secciones, la inserción comprende además un agente terapéutico adicional, tal como aquellos mencionados anteriormente, por ejemplo, acetónido de fluocinolona (tal como aquella que se encuentra en la inserción oftálmica Retisert®).

45 En algunas secciones, la composición oftálmica comprende a microesferas o nanopartículas. En algunas secciones, las microesferas contienen gelatina. En algunas secciones, las microesferas son inyectadas al segmento posterior del ojo, en el espacio de las coroides, en el esclerótico, en la intravítrea o sub-retinalmente. En algunas secciones, las microesferas o nanopartículas comprenden un polímero incluyendo, pero sin limitarse, a aquellos descritos en Wagh, et al., "Polymers used in ocular dosage form and drug delivery systems" ("Polímeros utilizados en formas de dosis oculares y sistemas de entrega de medicamentos"), Asian J. Pharm., Páginas 12-17 (enero. 2008).

55 En algunas secciones, el polímero es quitosano, un ácido policarboxílico tal como el ácido poli acrílico, partículas de albúmina, ésteres del ácido hialurónico, ácido poliitacónico, poli (butil) cianoacrilato, policaprolactona, poli (isobutil) caprolactona, poli (ácido láctico- co -ácido glicólico) o poli (ácido láctico). En algunas secciones, las micro esferas o nano partículas comprenden a partículas sólidas de lípidos.

60 En algunas secciones, la composición oftálmica comprende una resina de intercambio iónico. En algunas secciones, la resina de intercambio iónico es una resina orgánica sintética o zeolita inorgánica. En algunas secciones, la resina de intercambio iónico incluye, pero no se limita a, aquellas descritas en Wagh, et al., "Polymers used in ocular dosage form and drug delivery systems" ("Polímeros utilizados en formas de dosis oculares y sistemas de entrega de medicamentos"), Asian J. Pharm., Páginas 12-17 (enero 2008).

65 En algunas secciones, la resina de intercambio iónico es un ácido poli - acrílico parcialmente neutralizado.

5 En algunas secciones, la composición oftálmica es una suspensión polimérica acuosa. En algunas secciones, el agente o un agente suspensor polimérico es suspendido en un medio acuoso (por ejemplo, que tiene las propiedades que se describieron anteriormente). En algunas secciones, el agente es suspendido. En algunas secciones, el agente está en una solución. En secciones adicionales, el agente suspensor sirve para suministrar estabilidad a la suspensión, para incrementar el tiempo de residencia de la forma de la dosis en el ojo, o para mejorar la liberación sostenida del medicamento en términos de tiempos de liberación más largos y una curva de liberación más uniforme. Ejemplos de agentes suspensores poliméricos incluyen, pero no se limitan a, dextranos, glicoles de polietilenos, polivinilpirrolidona, geles de polisacáridos, Gelrite®, polímeros celulósicos similares a la metilcelulosa de hidroxipropilo, y polímeros que contienen carboxis tales como polímeros o copolímeros de ácido acrílico, así como, otros demulcentes poliméricos. En algunas secciones, el agente suspensor polimérico es un agua bebible, un polímero insoluble en agua, especialmente un polímero reticulado que contiene a carboxis. En algunas secciones, el agente suspensor polimérico comprende desde por lo menos alrededor del 90% a alrededor del 99.9 por ciento, o desde alrededor del 95% a alrededor del 99.99 por ciento por masa basándose en la masa total de los monómeros presentes, de uno o más monómeros insaturados monoetilénicamente que contienen carboxis. En algunas secciones, el monómero insaturado monoetilénicamente que contiene carboxis incluye a ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido etacrílico, ácido metilacrílico (ácido crotonico), ácido cis- a-metilcrotonico (ácido angélico), ácido trans-a-metilcrotonico (ácido tíglico), ácido a-butilcrotonico, ácido a-fenilacrílico, ácido a-bencilacrílico, ácido a-ciclohexilacrílico, ácido fenilacrílico (ácido cinámico), ácido cumárico (ácido o-hidroxicinámico), y ácido umbélico (ácido p-hidroxicumárico). En algunas secciones, los polímeros podrían ser reticulados por un agente reticular polifuncional (por ejemplo, un agente reticular difuncional). En secciones adicionales, el monto de la articulación debería ser suficiente para formar partículas poliméricas insolubles, pero no tan grande como para interferir indebidamente con la liberación sostenida del agente. En algunas secciones, los polímeros son reticulados sólo ligeramente. En algunas secciones, el agente reticular es contenido en un monto de alrededor de 0.01 por ciento a alrededor del 5%, o desde alrededor de 0.1 por ciento a alrededor del 5.0 por ciento, o desde alrededor del 0.2 por ciento a alrededor del 1%, basándose en la masa total de los monómeros presentes. En algunas secciones, los agente reticulares son monómeros difuncionales de poliéter no polialqueniilos reticulares tales como divinil - glicol, 2,3-dihidroxihexa-1,5-dieno, 2,5-hexadieno-dimetil-1,5, divinilbenceno, N, N-dialilacrilamida, N, N-dimetilacrilamida; agentes reticulares de polialqueniilpoliéter que contienen 2 o más agrupaciones de éter de alqueniilos por molécula, por ejemplo, agrupaciones de éter de alqueniilos que contienen a grupos co - terminales  $H_2C=C<$ , preparados al eterificar un alcohol polihídrico que contiene por lo menos 4 átomos carbonos y por lo menos 3 grupos de hidroxilos con un haluro de alqueniilo tal como bromuro de alilo o similares, por ejemplo, sacarosa de poli - alilo, pentaeritritol de polialilo o similares; agentes reticulares macroméricos diolefinicos no hidrofílicos que tienen masas moleculares que varían desde alrededor de 400 a alrededor de 8000, tal como diacrilatos insolubles y poliácrilatos y metacrilatos de dioles y polioles, productos de reacción de acrilato o metacrilato de hidroxialquilo de diisocianato de prepolímeros terminados con isocianato derivados de dioles de poliéster, dioles de polieter o dioles de polisiloxano con hidroxialquilmecacrilatos y similares.

40 En algunas secciones, los polímeros reticulados podrían ser hechos de un monómero o monómeros insaturados monoetilénicamente que contienen carboxis como el único monómero insaturado monoetilénicamente presente, junto con un agente o agentes reticulares. En algunas secciones, los polímeros son aquellos en los cuales hasta alrededor de un 40%, y preferiblemente desde alrededor de un 0% a alrededor de un 20% por masa, del monómero homo no meros insaturados monoetilénicamente han sido reemplazados por uno o más monómeros insaturados monoetilénicamente que contienen carboxis que contienen solamente sustituyentes fisiológicamente y oftálmicamente inocuos, incluyendo ésteres de ácidos acrílicos y metacrílicos tales como metacrilato de metilo, acrilato de etilo, acrilato de butilo, 2-etilhexilacrilato, metacrilato de octilo, 2-hidroxietilmetacrilato, 3-hidroxipropilacrilato, y similares, acetato de vinilo, N-vinilpirrolidona, y similares (refiérase a Mueller et al. patente de Estados Unidos número 4,548,990, para una lista adicional más extensa de monómeros insaturados monoetilénicamente). En algunas secciones, los polímeros incluyen a policarbofil (Noveon AA-1), Carbopol®, y DuraSite®. En algunas secciones, los polímeros reticulados son preparados por medio de la suspensión o emulsión que polimeriza a los monómeros, usando catalizadores convencionales de polimerización radical libre, a un tamaño de partícula seca no mayor de 50  $\mu m$  en un diámetro esférico equivalente. En algunas secciones, el tamaño promedio de partícula seca es desde alrededor de uno a alrededor de 30  $\mu m$ , o desde alrededor de 3 a alrededor de 20  $\mu m$  en un diámetro esférico equivalente. En algunas secciones, las partículas poliméricas son obtenidas al triturar mecánicamente partículas poliméricas más grandes. En secciones adicionales, aquellos polímeros tendrán una masa molecular de desde alrededor de 250.000 a alrededor de 4'000.000, y desde 3.000'000.000 hasta 60 4.000'000.000. En otras secciones, las partículas de polímeros reticulados son monodispersos, lo que significa que tienen una distribución de tamaños de partículas tales que por lo menos alrededor del 80%, alrededor del 90% o alrededor del 95%, de las partículas caen dentro de una banda de micrómetros de una distribución importante de tamaño de partículas. En secciones adicionales, el tamaño de partículas mono-dispersas significa que no existe más de alrededor del 20%, alrededor del 10%, o alrededor del 5% de partículas de un tamaño por debajo de 1  $\mu m$ . En algunas secciones, la suspensión polimérica acuosa comprende desde alrededor de 0.05 a alrededor de 1%, desde 65 alrededor de 0.1 a alrededor de 0.5 por ciento, o desde alrededor del 0.1 a alrededor del 0.5 por ciento, del agente y

desde alrededor del 0.1 por ciento a alrededor del 10%, desde alrededor del 0.5 a alrededor del 6.5 por ciento, desde alrededor del 0.5 a alrededor del 2.0 por ciento, desde alrededor del 0.5 por ciento a alrededor del 1.2 por ciento, desde alrededor del 0.6 a alrededor del 0.9 por ciento, o desde alrededor del 0.6 a alrededor de 0.8 por ciento de un agente suspensor polimérico. Lo que se refiere en singular, debe entenderse que una o más especies de agentes suspensores poliméricos pueden ser utilizados con el monto total cayendo dentro de los rangos especificados. En una sección, el monto de partículas poliméricas reticuladas ligeramente insolubles, el pH, y la presión osmótica puede ser correlacionados entre sí con el grado de reticulación para dar una composición que tiene una viscosidad en un rango que varía desde alrededor de 500 a alrededor de 100.000 centipoise, y preferiblemente desde alrededor de 1.000 a alrededor de 30.000 o desde alrededor de 1.000 a alrededor de 10.000 centipoise, tal como fue medido a la temperatura del cuarto (a alrededor de 25 °C) utilizando un medidor de viscosidad Brookfield Digital LVT Viscometer equipado con un husillo número 25 y un adaptador de muestras pequeñas que varía desde 13 a 12 revoluciones por minuto. En algunas secciones, la viscosidad varía desde alrededor de 10 a alrededor de 400 centipoise, desde alrededor de 10 a alrededor de 200 centipoise o desde alrededor de 10 a alrededor de 25 centipoise.

En algunas secciones, las suspensiones poliméricas acuosas pueden ser formuladas para que retengan la misma o sustancialmente la misma viscosidad en el ojo que ellas tenían antes de su administración al ojo. En algunas secciones, podrían ser formuladas para que exista una gelificación incrementada cuando ocurra el contacto con los fluidos lacrimales. Por ejemplo, cuando una formulación que contiene a DuraSite® u otro polímero tipo ácido poli acrílico es administrada al ojo a un pH menor que alrededor de 6.7, el polímero podría hincharse cuando entre en contacto con el fluido lacrimal puesto que tiene un pH más alto (alrededor de 7). Esta gelificación o incremento en gelificación podría conllevar a un atrapamiento de las partículas suspendidas, extendiendo, por lo tanto, el tiempo de estadía de la composición en el ojo. En algunas secciones, el agente es liberado lentamente en la misma forma en que las partículas suspendidas se disuelven a lo largo del tiempo. En algunas secciones, esta ruta de entrega incrementa el confort del paciente e incrementa el tiempo del contacto entre el agente y los tejidos oculares, incrementando, por lo tanto, la magnitud de la absorción del medicamento y la duración de acción de la formulación en el ojo. Los agentes contenidos en estos sistemas de entrega de medicamentos serán liberados de los geles a tasas que dependen de aquellos factores tales como el medicamento en sí y su forma física, la magnitud de la carga del medicamento y el pH del sistema, así como de cualquier adyuvante de entrega del medicamento, tal como resinas de intercambio iónico compatibles con la superficie ocular, que también podrían estar presentes.

En algunas secciones, el tratamiento comprende la administración de una composición farmacéutica al paciente, la composición contiene al agente y a un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas secciones, la composición farmacéutica es una forma de dosis oral. En algunas secciones, la composición farmacéutica comprende, como el ingrediente activo, a uno o más de los agentes mencionados anteriormente en combinación con uno o más portadores (excipientes) farmacéuticamente aceptables. Al hacer las composiciones del invento, el agente es mezclado comúnmente con un excipiente, diluido por un excipiente o enclaustrado dentro de un portador en la forma de, por ejemplo, una cápsula, un sobre, papel u otro contenedor. Cuando el excipiente sirve como un diluyente, puede ser un material sólido, semisólido o líquido, que actúa como un vehículo, portador o medio para el ingrediente activo. Por lo tanto, las composiciones pueden estar en la forma de tabletas, pastillas, polvos, píldoras, sobres, bolsas, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (en forma de un medio sólido o en un medio líquido), ungüentos que contienen, por ejemplo, hasta el 10% de la masa del compuesto activo, cápsulas de gelatina suave y dura, supositorios, soluciones estériles inyectables y polvos estériles empacados.

Al preparar la formulación, el agente puede ser triturado para suministrar un tamaño apropiado de partículas antes de combinarse con los otros ingredientes. Si el agente es sustancialmente insoluble, puede ser triturado a un tamaño de partículas menor que 200 mesh. Si el agente es sustancialmente soluble en agua, el tamaño de las partículas puede ser ajustado por medio de trituración para suministrar una distribución sustancialmente uniforme en la formulación, por ejemplo, a alrededor de 40 mesh.

Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen a lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábica, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe y celulosa de metilo. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente: agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio y aceites minerales; agentes humectantes; agentes emulsificantes y de suspensión, agentes conservantes tales como benzoatos de metilo y de propilhidroxi; agentes impulsores; y agentes saborizantes. Las composiciones pueden ser formuladas para suministrar una liberación rápida, sostenida y retrasada del ingrediente activo después de su administración al paciente al utilizar procedimientos conocidos en la industria.

Las composiciones pueden ser formuladas en una forma de dosis unitaria, donde cada dosis contiene desde

alrededor de 5 a alrededor de 1.000 mg (1 g), más usualmente desde alrededor de 100 a alrededor de 500 mg, del agente. El término "formas de dosis unitarias" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado.

El agente puede ser efectivo en un amplio rango de dosis y es administrado generalmente en un monto farmacéuticamente efectivo. Se debe entender, sin embargo, que el monto del agente administrado realmente se determinará usualmente por un médico, de acuerdo a las circunstancias relevantes, incluyendo la condición que está siendo tratada, la ruta escogida de administración, el compuesto real administrado, la edad, el peso, y la respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente, y similares.

Para preparar composiciones sólidas tales como tabletas, el agente es mezclado con un excipiente farmacéutico para formar una composición pre-formulada sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de este invento. Cuando se hace referencia a estas composiciones pre-formuladas como homogéneas, el agente es comúnmente disperso uniformemente a lo largo de la composición para que la composición pueda subdividirse fácilmente en formas de dosis unitarias igualmente efectivas tales como tabletas, pastillas y cápsulas. Esta pre-formulación sólida es subdividida entonces en formas de dosis unitarias del tipo descrito anteriormente que contienen desde, por ejemplo, alrededor de 0.1 a alrededor de 1.000 mg del agente.

Las tabletas o pastillas de este invento pueden ser cubiertas o compuestas de otra forma para suministrar una forma de dosis compatible con la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, la tableta o pastilla puede comprender una dosis interna y un componente de dosis externo, siendo el componente de dosis externo en la forma de un sobre que cubre la dosis interna. Los 2 componentes pueden estar separados por medio de una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permitir que el componente interior pase intacto al duodeno o para que su liberación se retrase. Una variedad de materiales pueden ser utilizados para aquellas capas entéricas o recubrimientos, los cuales pueden incluir a varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Las formas líquidas en las cuales el agente y las composiciones de este invento pueden ser incorporados para su administración oral o por medio de inyección incluyen soluciones acuosas, jarabes adecuadamente saborizados, suspensiones acuosas o de aceites, y emulsiones con sabores con el uso de aceites comestibles tales como el aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de nuez, así como elixires y portadores farmacéuticos similares.

Las composiciones para la inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en solventes orgánicos o acuosos farmacéuticamente aceptables o sus mezclas y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas podrían contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados tal como se describió anteriormente. En algunas secciones, las composiciones son administradas por la ruta oral o respiratoria nasal para un efecto local o sistémico. Las composiciones pueden ser nebulizadas por medio del uso de un gas inerte. Las soluciones nebulizadas pueden ser respiradas directamente desde el dispositivo nebulizador o el dispositivo nebulizador puede adherirse a una máscara facial, o por medio de una máquina de respiración a presión positiva intermitente. La composición tipo solución, suspensión, o en polvo puede administrarse oralmente o nasalmente desde dispositivos que entregan la formulación en una forma apropiada.

El monto del agente o composición administrado a un paciente variará dependiendo de lo que está siendo administrado, el propósito de la administración, tal como profilaxis o terapia, el estado del paciente, la forma de administración, y similares. En las aplicaciones terapéuticas, las composiciones pueden administrarse a un paciente que ya padece de una enfermedad en un monto suficiente para curar o por lo menos detener parcialmente los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Dosis efectivas dependerán en la condición de la enfermedad que se está tratando así como el juicio del médico tratante dependiendo de factores tales como la gravedad de la enfermedad, la edad, la masa y la condición general del paciente y similares.

Las composiciones administradas a un paciente pueden ser en la forma de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente. Estas composiciones pueden ser esterilizadas por medio de técnicas de esterilización convencionales o podrían ser filtradas para que estas sean esterilizadas. Soluciones acuosas pueden ser empacadas para su uso en su forma natural, o liofilizadas, siendo la preparación liofilizada en combinación con un portador acuoso esterilizado antes de su administración. El pH de las preparaciones del agente variarán

comúnmente desde 3 a 11, más preferiblemente desde 5 a 9 y más preferiblemente aún desde 7 a 8. Se deberá entender que el uso de ciertos excipientes, portadores o estabilizadores ya mencionados resultarán en la formación de sales farmacéuticas.

5

La dosis terapéutica de los agentes puede variar de acuerdo, por ejemplo, al uso particular para el cual el tratamiento está siendo realizado, la forma de administración del compuesto, la salud y condición del paciente, y el juicio del médico que prepara la receta. La proporción o concentración de un agente en una composición farmacéutica puede variar dependiendo de varios factores incluyendo la dosis, las características químicas (por ejemplo, la hidrofobicidad), y la ruta de administración. Por ejemplo, los agentes pueden ser suministrados en una solución acuosa de amortiguamiento fisiológico que contiene alrededor de 0.1 a alrededor del 10% masa/volumen del compuesto para su administración parenteral. Algunos rangos comunes de dosis varían desde alrededor de 1 µg/kilogramos a alrededor de 1 g/kilogramos de masa corporal por día. En algunas secciones, el rango de dosis varía desde alrededor de 0.01 miligramos/kilogramos a alrededor de 100 mg/kilogramos de masa corporal por día. La dosis posiblemente dependerá de tales variables como el tipo y la magnitud de la progresión de la enfermedad o del trastorno, el estado general de la salud del paciente en particular, la eficacia biológica relativa del compuesto seleccionado, la formulación del excipiente y su ruta de administración. Dosis efectivas pueden ser extrapoladas de curvas de respuestas a las dosis derivadas de sistemas de pruebas de modelos in vitro o animales.

20

Las composiciones pueden incluir además uno o más agentes farmacéuticos adicionales, ejemplos de los cuales fueron listados anteriormente en este documento.

25

Tal como se utiliza aquí, el término "individuo" o "paciente", usado intercambiamente, se refiere a cualquier animal, incluyendo mamíferos, preferiblemente ratones, ratas, otros roedores, conejos, perros, gatos, puercos, ganado, ovejas, caballos o primates, y más preferiblemente humanos.

30

Tal como se utiliza en este documento, la frase "monto terapéuticamente efectivo" se refiere al monto del compuesto activo o agente farmacéutico que provoca la respuesta biológica o medicinal en un tejido, sistema, animal, individuo o humano que está siendo buscada por el investigador, veterinario, doctor médico u otro trabajador clínico, que incluye uno o más de lo siguiente:

35

(1) prevenir la enfermedad; por ejemplo, prevenir una enfermedad, condición o trastorno en un individuo que podría estar predispuesto a la enfermedad, condición o trastorno pero que todavía no experimenta o muestra la patología o sintomatología de la enfermedad;

40

(2) inhibir la enfermedad; por ejemplo, inhibir una enfermedad, condición o trastorno en un individuo que está experimentando o mostrando la patología o sintomatología de la enfermedad, condición o trastorno (es decir, contrarrestar el desarrollo adicional de la patología y/o sintomatología), y

45

(3) aliviar la enfermedad; por ejemplo, aliviar una enfermedad, condición o trastorno en un individuo que está experimentando o mostrando la patología o sintomatología de la enfermedad, condición o trastorno (es decir, revertir la patología y/o sintomatología).

50

Inhibidores de JAK para su uso en agentes en los métodos del invento

El agente es seleccionado de 3-ciclopentil-3-[4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanenitrilo y sus sales farmacéuticamente aceptables. En algunas secciones el agente es seleccionado de (3R)-3-ciclopentil-3-[4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanenitrilo y sus sales farmacéuticamente aceptables.

55

Los compuestos aquí descritos pueden ser asimétricos (por ejemplo, que tienen uno o más estereocentros). Todos los estereoisómeros, tales como enantiómeros o diastereómeros, son apropiados a menos que se indique de otra forma. Los compuestos de este invento que contienen átomos carbonos sustituidos asimétricamente pueden ser aislados en formas ópticamente activas o racémicas. Los métodos para preparar formas ópticamente activas a partir de materiales de inicio ópticamente activos son conocidas en la industria, tales como por medio de la resolución de mezclas racémicas o por medio de síntesis estereoselectiva.

60

La resolución de mezclas racémicas de compuestos puede ejecutarse por medio de cualquiera de numerosos métodos conocidos en la industria. Un método de ejemplo incluye la re - cristalización fraccional usando un ácido resolvente quiral que es un ácido orgánico que forma sales ópticamente activas. Activos resolventes adecuados para

65

los métodos de re - cristalización fraccional son, por ejemplo, ácidos ópticamente activos, tales como las formas D y L del ácido tartárico, el ácido diacetiltartárico, el ácido dibenzoiltartárico, el ácido mandélico, el ácido málico, el ácido láctico o los varios ácidos canforsulfónicos ópticamente activos tales como el ácido a-canforsulfónico. Otros agentes resolventes adecuados para los métodos de cristalización fraccional incluyen a las formas puras, desde un punto de vista estereoisomérico, de a-metil-bencilamina (por ejemplo, las formas S y R, o las formas puras desde un punto de vista diastereomérico), 2-fenilglicinol, norefedrina, efedrina, N-metilefedrina, ciclohexiletamina, 1,2-diaminociclohexano, y similares.

La resolución de las mezclas racémicas también puede ejecutarse por medio de elución en una columna empacada con un agente resolvente ópticamente activo (por ejemplo, dinitrobenzoilfenilglicina). Una composición solvente de elución adecuada puede determinarse por una persona con conocimiento en la industria.

Los compuestos del invento también pueden incluir a formas tautoméricas. Las formas tautoméricas resultan del intercambio de un solo enlace con un enlace doble adyacente junto con la migración concomitante de un protón. Las formas tautoméricas incluyen a tautómeros prototrópicos los cuales están en estados de protonación isomérica que tienen la misma fórmula empírica y carga total. Ejemplos de tautómeros prototrópicos incluyen a parejas de cetona—enol, parejas de amidas-ácido imídico, parejas de lactama – lactima, parejas de amidas-ácido imídico, parejas de enamina - imina, y formas anulares donde un protón puede ocupar 2 o más posiciones de un sistema heterocíclico, por ejemplo, 1H- y 3H-imidazol, 1H-, 2H- y 4H- 1,2,4-triazol, 1H- y 2H- isoindol, y 1H-y 2H-pirazol. Las formas tautoméricas pueden estar en equilibrio o aseguradas estéricamente en una forma específica por medio de una sustitución apropiada.

Los compuestos del invento incluyen además hidratos y solvatos, así como formas anhídras y no solvatadas.

Los compuestos del invento también pueden incluir a todos los isótopos de átomos que ocurren en los compuestos intermedios o finales. Los isótopos incluyen aquellos átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números de masa. Por ejemplo, los isótopos de hidrógeno incluyen al tritio y al deuterio. El término, “compuesto”, es utilizado en este documento con el propósito de incluir a todos los estereoisómeros, isómeros geométricos, tautómeros e isótopos de las estructuras mostradas. Todos los compuestos, y sus sales farmacéuticamente aceptables, pueden encontrarse juntas con otras sustancias tales como el agua y solventes (por ejemplo, hidratos y solvatos) o pueden ser aisladas.

En algunas secciones, los compuestos del invento, y sus sales, están sustancialmente aisladas. El término “sustancialmente aislados” significa que el compuesto es por lo menos parcialmente o sustancialmente separado del entorno en el cual se creó o se detectó. Una preparación parcial puede incluir, por ejemplo, una composición enriquecida en el compuesto del invento. Una separación sustancial puede incluir a composiciones que contienen por lo menos alrededor del 50%, por lo menos alrededor del 60%, por lo menos alrededor de 70%, por lo menos alrededor del 80%, por lo menos alrededor del 90%, por lo menos alrededor del 95%, por lo menos alrededor del 97%, o por lo menos alrededor del 99% en relación a la masa del invento, o su sal. Los métodos para aislar a los compuestos y sus sales son rutinarios en la industria.

Las expresiones, “temperatura ambiente” y “temperatura del cuarto”, tal como se utiliza en este documento, se entienden en la industria, y se refieren generalmente a una temperatura, por ejemplo una temperatura de reacción, que es alrededor de la temperatura del cuarto en el cual se está ejecutando la reacción, por ejemplo, una temperatura desde alrededor de 20 °C a alrededor de 30 °C.

La frase “farmacéuticamente aceptable” es utilizada en este documento para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosis que están, dentro del marco de un buen juicio médico, adecuado para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin una toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otros problemas o complicaciones excesivos, con mesurado con una tasa razonable de beneficio/riesgo.

Este invento también incluye sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos aquí descritos. Tal como se utiliza aquí, “la sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a derivados de los compuestos presentados donde el compuesto padre es modificado al convertir a una partícula de un ácido o base existente a su forma de sal. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos minerales u orgánicos de recibos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables de este invento incluyen a sales convencionales no tóxicas del

compuesto padre formado, por ejemplo, de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Las sales farmacéuticamente aceptables de este invento pueden sintetizarse del compuesto padre que contiene una partícula básica o ácida por medios convencionales químicos. Generalmente, aquellas sales pueden ser preparadas al reaccionar a formas ácidas o básicas libres de estos compuestos con un monto estequiométrico de la base o del ácido apropiado en agua o en un solvente orgánico, o en una mezcla de estos dos; generalmente, un medio no acuoso como el éter, el acetato etílico, el etanol, el isopropanol, o el acetonitrilo (MeCN) son preferidos. Listas de sales adecuadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences (Ciencias Farmacéuticas de Remington), 17<sup>ma</sup> ed., Mack Publishing

Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418 y Journal of Pharmaceutical Science (La Revista de Ciencia Farmacéutica), 66.

### Síntesis

Agentes para su uso en los métodos del invento, incluyen a sus sales, que pueden ser preparadas utilizando técnicas conocidas de síntesis orgánica y pueden sintetizarse de acuerdo a cualquiera de varias rutas sintéticas posibles.

Las reacciones para preparar a los agentes pueden ejecutarse en solventes adecuados que pueden ser seleccionados fácilmente por una persona con conocimiento en la industria de la síntesis orgánica. Los Solventes adecuados pueden ser sustancialmente no reactivos con los materiales de inicio (reactivos), los materiales intermedios o los productos a las temperaturas en las cuales se ejecutan las reacciones, por ejemplo, las temperaturas que pueden variar desde la temperatura de congelamiento de un solvente a la temperatura de ebullición del solvente. Una reacción específica puede ser ejecutada en un solvente o una mezcla de más de un solvente. Dependiendo del paso específico de reacción, solventes adecuados para un paso específico de reacción pueden ser seleccionados por una persona con conocimiento en la industria.

La preparación de compuestos puede incluir la protección y desprotección de varios grupos químicos. La necesidad de protección y desprotección, y la selección de grupos protectores adecuados, puede determinarse fácilmente por una persona con conocimiento en la industria. La química de los grupos protectores puede encontrarse, por ejemplo, en T.W. Green y P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis (Grupos Protectores en Síntesis Orgánica), 3<sup>a</sup> Ed., Wiley & Sons, Inc., New York (1999).

Las reacciones pueden ser monitoreadas de acuerdo a cualquier método conocido en la industria. Por ejemplo, la formación del producto puede ser monitoreada por medios espectroscópicos, tales como la espectroscopia por medio de resonancia magnética nuclear (por ejemplo, <sup>1</sup>H o <sup>13</sup>C), espectroscopia por medio de infrarrojos, espectrofotometría (por ejemplo, UV- visible), o espectrometría de masa, o por medio de cromatografía tal como la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC - high performance liquid chromatography) o cromatografía de capas delgadas.

La sal del ácido maléico de (R)-3-(4-(7H-Pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-ciclopentilpropanenitrilo, la sal del ácido sulfúrico de (R)-3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-ciclopentilpropanenitrilo, y la sal de ácido fosfórico de (R)-3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-ciclopentilpropanenitrilo pueden prepararse tal como se estableció en la publicación de Estados Unidos número 2008-0312259, publicada el 18 de diciembre de 2008 (la aplicación de patente de Estados Unidos con el número de serie 12/137,892, presentada el 12 de junio de 2008). Métodos sintéticos de ejemplo para preparar a ciertos agentes, para su uso de acuerdo al invento, son suministrados en la sección B más adelante.

### Botiquines y Sus Usos

Este invento también incluye a botiquines farmacéuticos útiles, por ejemplo, para el tratamiento o prevención de una enfermedad de ojo seco que comprende una composición farmacéutica u oftálmica que comprende un monto terapéuticamente efectivo de un agente tal como aquellos descritos anteriormente; e instrucciones que comprenden cómo administrar la composición a un paciente que lo necesite. La dirección puede ser para un médico que administra el agente al paciente o una dirección para auto-administrarse el agente. Las instrucciones pueden ser en forma de papel, tal como la etiqueta o una inserción del producto. Alternamente, las instrucciones podrían almacenarse electrónicamente, tal como en una página web. Aquellos botiquines pueden incluir además, si se

desease, uno o más de varios componentes convencionales de botiquines farmacéuticos, tales como, por ejemplo, contenedores con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, contenedores adicionales, etcétera, tal como será aparente fácilmente para aquellas personas con conocimiento en la industria. Las instrucciones, ya sea en forma de inserciones o de etiquetas, que indican las cantidades de los componentes que van hacer administrados, guías para la administración, y/o guías para mezclar a los componentes, también pueden incluirse en el botiquín.

En un aspecto adicional, este invento suministra el uso de un agente tal como se describió en secciones anteriores, para su uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad de ojo seco. En otro aspecto, este invento suministra un agente para su uso en el tratamiento de una enfermedad de ojo seco en un individuo.

El invento será descrito en mayor detalle en forma de ejemplos específicos. Los siguientes ejemplos son ofrecidos para propósitos ilustrativos, y no es su intención el limitar al invento en ninguna forma. Aquellas personas con conocimiento en la industria reconocerán fácilmente la variedad de parámetros no críticos que pueden ser cambiados o modificados para producir esencialmente los mismos resultados. Los compuestos de los ejemplos han demostrado ser inhibidores de JAK de acuerdo a por lo menos un estudio aquí descrito.

## EJEMPLOS

### **Sección A: Modelos Animales y Métodos del Ensayo**

#### **Ejemplo A: Modelos Animales para el Tratamiento del Ojo Seco, la Uveítis y la Conjuntivitis**

Los agentes pueden ser evaluados en uno o más modelos pre-clínicos de ojo seco conocidos para aquellas personas con conocimiento en la industria incluyendo, pero sin limitarse a, el modelo de la glándula lacrimal de concaivalina A (ConA) de conejo, el modelo de ratón de escopolamina (subcutánea o transdérmica), el modelo de glándulas lacrimales del ratón botulínico, o cualquiera de un número de modelos espontáneos autoinmunes de roedores que resulten en una disfunción de la glándula ocular (por ejemplo, NOD-SCID, MRL/lpr, o NZB/NZW) (Barabino et al., Experimental Eye Research (Investigación Ocular Experimental) 2004, 79, 613-621 y Schrader et al., Developmental Ophthalmology (Oftalmología del Desarrollo), Karger 2008, 41, 298 - 312).

Las conclusiones de estos modelos podrían incluir la histopatología de las glándulas oculares y de los ojos (córnea, etcétera) y posiblemente la prueba clásica de Schirmer o sus versiones modificadas (Barabino et al.) que miden la producción de lágrimas. La actividad podría ser evaluada al dosificar por medio de varias rutas de administración (por ejemplo, sistémica o tópica) que podría empezar antes o después de que exista una enfermedad que se pueda medir.

Los agentes pueden evaluarse en uno o más modelos pre-clínicos de uveítis conocida para aquellas personas con conocimiento en la industria. Estos incluyen, pero no se limitan a, modelos de uveítis autoinmune experimental (EAU - experimental autoimmune uveitis) y uveítis inducida por endotoxinas (EIU - endotoxin induced uveitis). Los experimentos con EAU pueden realizarse en conejos, ratas o ratones y podrían involucrar una inmunización pasiva o activa. Por ejemplo, cualquiera de un número de antígenos retinales podría ser utilizado para sensibilizar a los animales con relación a un inmunógeno relevante después de lo cual los animales podrían ser aproximados ocularmente con el mismo antígeno. El modelo EIU es más agudo e involucra la administración local o sistémica de 1 lipopolisacárido con dosis no letales. Puntos clave de ambos modelos EIU y EAU podrían involucrar a exámenes oftalmoscópicos, histopatología, entre otros. Estos modelos son revisados por Smith et al. (Immunology and Cell Biology (inmunología y biología celular) 1998, 76, 497-512).

La actividad es evaluada por medio de dosis a través de rutas múltiples de administración (por ejemplo, sistémica o tópica) que podrían empezar antes o después de que exista una enfermedad que se pueda medir. Algunos modelos listados anteriormente también podrían desarrollar escleritis/epiescleritis, coroiditis, ciclitis o iritis y son, por lo tanto, útiles para investigar la actividad potencial de los compuestos para el tratamiento terapéutico de estas enfermedades.

Los agentes también pueden ser evaluados en uno o más modelos pre-clínicos de conjuntivitis conocidos para

aquellas personas con conocimiento en la industria. Estos incluyen, pero no se limitan a, modelos de roedores que utilizan a conejillos de indias, ratas o ratones. Los modelos con conejillos de indias incluyen aquellos que utilizan a inmunizaciones activas o pasivas y/o protocolos que prueban al sistema inmunológico con antígenos tales como ovoalbúmina o ambrosía (revisado en Groneberg, D.A., et al., *Allergy (Alergia)* 2003, 58, 1101-1113.

Los modelos de ratas y ratones son similares en diseño general a aquellos de los conejillos de indias (los cuales también son revisados por Groneberg). La actividad podría ser evaluada por medio de dosis a través de varias rutas de administración (por ejemplo, sistémica o tópica) que podría empezar antes de o después de que exista una enfermedad que se pueda medir. Los puntos finales de aquellos estudios podrían incluir, por ejemplo, análisis histológico, inmunológico, bioquímico o molecular de tejidos oculares tales como el conjuntivo.

### **Ejemplo B: Ensayo de Quinasas de JAK In Vitro**

Los compuestos aquí probados para detectar su actividad inhibitoria de los objetivos JAK de acuerdo al siguiente ensayo in vitro descrito en Park et al., *Analytical Biochemistry (Bioquímica Analítica)* 1999, 269, 94-104. El dominio catalítico de las JAK1 (a.a. 828-1132) y JAK3 (a.a. 781-1132) y Jak3 (a.a. 781-1124) humanas con una marcación His de una terminal N se expresan usando al baculovirus en células de insectos y purificadas. La actividad catalítica de JAK1, JAK2 o JAK3 es probada en ensayos al medir la fosforilación de un péptido biotinilado. El péptido fosforilado es detectado por la fluorescencia homogénea resuelta mediante el tiempo (HTRF - homogenous time resolved fluorescence). El  $IC_{50S}$  de compuestos es medido para cada quinasa en las reacciones que contienen a la enzima, a ATP y al péptido 500nM en un amortiguador de 50mM Tris (pH 7.8) con 100mM de NaCl, 5 mM DTT, y 0.1 miligramos/mililitros (0.01 por ciento) de BSA. La concentración ATP en las reacciones fue de 90  $\mu$ M para Jak1, 30  $\mu$ M para Jak2 y 3  $\mu$ M para Jak3. Las reacciones fueron ejecutadas a la temperatura del cuarto durante una hora y luego se paró con 20  $\mu$ l de 45 mM de EDTA, 300nM de SA-APC, 6nM de Eu-Py20 en un amortiguador del ensayo (Perkin Elmer, Boston, MA). Enlaces al anticuerpo marcado como europio ocurrieron durante 40 minutos y la señal HTRF es medida en un lector de platos Fusión (Perkin Elmer, Boston, MA). Los compuestos que tienen un  $IC_{50}$  de 10  $\mu$ M o menos para cualquiera de los objetivos JAK mencionados son considerados como activos.

### **Ejemplo C: Ensayos Celulares**

Uno o más de los compuestos aquí mencionados son probados para detectar su actividad inhibitoria de los objetivos JAK de acuerdo a por lo menos uno de los siguientes ensayos celulares.

Las líneas de células del cáncer que dependen de citoquinas y por lo tanto de la transducción de señales de JAK/STAT, para su crecimiento, son colocadas en platos a 6000 células por pozo (en un formato de platos de 96 pozos) en RPMI 1640, con un 10% de FBS, y 1 ng/mililitros de citoquinas apropiadas. Los compuestos son agregados a las células en un DMSO/medio (concentración final de 0.2 por ciento de DMSO) e incubados durante 72 horas a 37 °C, con un 5% de  $CO_2$ . El efecto del compuesto en la viabilidad celular es evaluado utilizando el ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente de CellTiter-Glo (Promega) seguido de una cuantificación por medio de TopCount (Perkin Elmer, Boston, MA). Los efectos colaterales potenciales de los compuestos son medidos en paralelo utilizando una línea celular que no sea controlada por las JAKs con la misma lectura del ensayo. Los compuestos que tienen a un  $IC_{50}$  de 10  $\mu$ M o menos con una selectividad para la proliferación controlada por JAKs son considerados activos. Todos los experimentos son realizados por duplicado.

Las líneas celulares que se acaban de mencionar también pueden ser utilizadas para examinar los efectos de los compuestos en la fosforilación de quinasas de JAK o sustratos potenciales corriente abajo tales como las proteínas STAT, Akt, Shp2, o Erk. Estos experimentos pueden realizarse después de una privación de citoquinas durante la noche, seguida por una pre-incubación breve con el compuesto (2 horas o menos) y estimulación de citoquinas de aproximadamente una hora o menos. Las proteínas son extraídas entonces de las células y analizadas por medio de técnicas familiares para aquellas personas con conocimiento en la industria incluyendo a Western blotts o ELISAs utilizando anticuerpos que pueden diferenciar entre proteínas fosforiladas y totales. Estos experimentos pueden utilizar células normales o cancerígenas para investigar la actividad de los compuestos en la biología de supervivencia de las células tumorales o en mediadores de enfermedades inflamatorias. Por ejemplo, en relación a las enfermedades inflamatorias, citoquinas tales como IL-6, IL-12, IL-23, o IFN pueden ser utilizadas para estimular

la activación de JAKs que resulta en la fosforilación de proteínas STAT y potencialmente en perfiles de transcripciones (evaluados por medio de ensayos o de tecnología qPCR) o la producción y/o secreción de proteínas, tales como la IL-17. La capacidad de los compuestos para inhibir a estos efectos regulados por las citoquinas puede medirse utilizando técnicas ordinarias para aquellas personas con conocimiento en la industria.

5

Los compuestos aquí descritos también pueden ser probados en modelos celulares diseñados para evaluar su potencia y actividad en contra de mutaciones de JAKs, por ejemplo, la mutación JAK2V617F encontrada en las enfermedades proliferativas de mieloides. Estos experimentos utilizan a menudo células dependientes de citoquinas de linaje hematológico (por ejemplo, BaF/3) en los cuales las quinasas de JAK de tipo silvestre o mutante son expresadas en forma ectópica (James, C., et al. *Nature* (naturaleza) 434:1144-1148; Staerk, J., et al. *JBC* 280:41893-41899). Los puntos finales incluyen los efectos de los compuestos en la supervivencia celular, la proliferación y las proteínas fosforiladas de JAK, STAT, Akt o Erk.

10

15

Ciertos compuestos aquí mencionados pueden ser evaluados de acuerdo a su actividad inhibidora de la proliferación de células T. Tal ensayo puede ser considerado un 2º ensayo de proliferación controlada por citoquinas (es decir, JAKs) y también un ensayo simplificado de la supresión inmunológica o inhibición de la activación inmunológica. El siguiente es un resumen breve de cómo estos experimentos pueden realizarse. Las células periféricas mononucleares sanguíneas (PBMCs - Peripheral blood mononuclear cells) son preparadas para muestras completas de sangre humana utilizando el método de separación de Ficoll Hypaque y se pueden obtener a células T (fracción 2000) a partir de PBMCs por medio de un elutriador. Células T humanas aisladas recientemente pueden ser mantenidas en un medio de cultivo (RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero bovino fetal, 100 U/microlitros de penicilina, 100 µg/mililitros de estreptomycin) a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/mililitros a 37 °C durante 2 días. Para un análisis estimulado de proliferación celular, las células T primero son tratadas con fitohemaglutinina (PHA - Phytohemagglutinin) a una concentración final de 10 µg/mililitros durante 72 horas. Después de lavarse una vez con PBS, 6000 células/pozo son puestas en platos de 96 pozos y tratadas con compuestos a diferentes concentraciones en el medio de cultivo en la presencia de 100 U/mililitros de IL-2 humana (ProSpec-Tany TechnoGene; Rehovot, Israel). Los platos son incubados a 37 °C durante 72 horas y el índice de proliferación es evaluado utilizando reactivos luminiscentes CellTiter-Glo siguiendo el protocolo sugerido del fabricante (Promega; Madison, WI).

20

25

30

35

#### **Ejemplo D: Prueba de Respuesta de Hipersensibilidad Retrasada Murina de Contacto con la Piel**

40

Los compuestos aquí mencionados también pueden ser probados por sus eficacias (para inhibir a los objetivos de JAK) en el modelo de prueba de hipersensibilidad retrasada purina controlada por las células T. La respuesta purina de hipersensibilidad de tipo retrasado (DTH - delayed-type hypersensitivity) de contacto con la piel es considerada un modelo válido de dermatitis clínica de contacto, y otros trastornos mediados por los linfocitos T de la piel, tales como psoriasis (*Immunol Today* (Hoy). 1998 enero; 19(1):37-44). El DTH murino comparte varias características con la psoriasis, incluyendo la infiltración inmunológica, el incremento acompañante de citoquinas inflamatorias, y la hiperproliferación de queratinocitos. Además, muchas clases de agentes que son eficaces en el tratamiento de psoriasis en la clínica también son inhibidores efectivos de la respuesta DTH en ratones (*Agents Actions* (Agentes, Acciones). 1993 enero;38(1-2):116-21).

45

50

En los días 0 y 1, ratones con Balb son sensibilizados con una aplicación tópica, a su abdomen afeitado con el antígeno 2,4-dinitro-fluorobenceno (DNFB). En el día 5, el grosor de los oídos son medidos utilizando un micrómetro de ingeniería. Esta medida es registrada y utilizada como una línea base. Ambas orejas del animal se les hace una aplicación tópica de DNFB con un total de 20 µl (10 µl en el pabellón auricular interno y 10 µl en el pabellón auricular externo) a una concentración de 0.2 por ciento. Después de 24 a 72 horas de la aplicación, las orejas son medidas nuevamente. El tratamiento con los compuestos de prueba es aplicado durante las fases de sensibilización y de aplicación (desde el día -1 al día 7) o antes y a través de la fase de aplicación (usualmente en la tarde del día 4 al día 7). El tratamiento de los compuestos de prueba (en una concentración diferente) es administrado sistémicamente o tópicamente (la aplicación tópica del tratamiento en las orejas). Las eficacia las de los compuestos de prueba son indicadas con una reducción en la hinchazón de las orejas en comparación a la situación sin el tratamiento. Los compuestos que causan una reducción del 20% o más son considerados eficaces. En algunos experimentos, los ratones tienen las aplicaciones pero no son sensibilizados (control negativo).

55

60

65

El efecto inhibidor (la activación inhibidora de los senderos de JAK-STAT) de los compuestos de prueba pueden ser

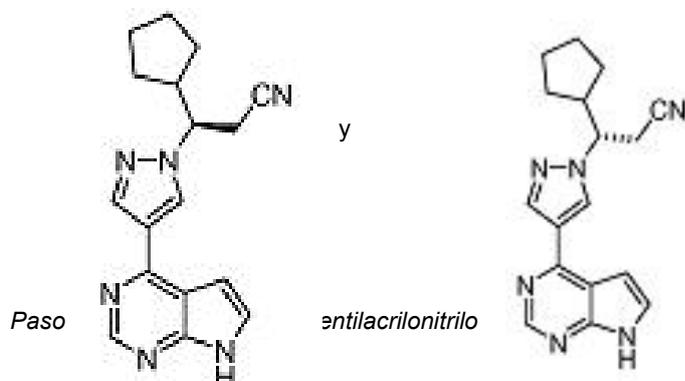
confirmados por medio de un análisis inmunohistoquímico. La activación de los senderos JAK-STAT resulta en la formación y translocación de factores funcionales de transcripción. Además, el influjo de células inmunológicas y la proliferación incrementada de queratinocitos también debería suministrar cambios únicos del perfil de expresión en la oreja que pueden ser investigados y cuantificados. Las secciones de las orejas fijadas con formalina y adheridas con parafina (cosechadas después de la fase de aplicación en el modelo DTH) son sujetas a análisis inmunohistoquímicos utilizando un anticuerpo que interactúa específicamente con STAT3 fosforilados (clon 58E12, Cell Signaling Technologies). Las orejas de los ratones son tratadas con los compuestos de prueba, con portadores, o dexametasona (un tratamiento clínicamente eficaz para la psoriasis), o sin ningún tratamiento, en el modelo DTH para comparaciones. Los compuestos de prueba y la dexametasona podrían producir cambios de transcripciones similares cualitativamente y cuantitativamente, y los compuestos y la dexametasona pueden reducir el número de células que se infiltran. Las administraciones sistémica y tópica de los compuestos de prueba pueden producir efectos inhibidores, es decir, una reducción en el número de células que se infiltran y la inhibición de los cambios de transcripciones.

### Ejemplo E: Actividad Antiinflamatoria In Vivo

Los compuestos aquí mencionados pueden ser evaluados en modelos con roedores o sin roedores diseñados para replicar una respuesta simple o compleja de inflamación. Por ejemplo, los modelos con roedores de artritis pueden ser utilizados para evaluar el potencial terapéutico del compuesto dosificado preventivamente o terapéuticamente. Estos modelos incluyen, pero no se limitan a, artritis inducida por colágeno a ratones o ratas, artritis inducida por adyuvantes a ratas, y artritis inducida por anticuerpos de colágeno. Enfermedades autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, esclerosis múltiple, diabetes mellitus de tipo I, uveoretinitis, tiroiditis, miastenia gravis, nefropatías de la inmunoglobulina, miocarditis, sensibilización de las vías respiratorias (asma), lupus o colitis también pueden ser utilizadas para evaluar el potencial terapéutico de los compuestos aquí descritos. Estos modelos son bien establecidos en la comunidad de investigación y son familiares para aquellas personas con conocimiento en la industria. (Current Protocols in Immunology (Protocolos Actuales en Inmunología), Vol 3., Coligan, J.E. et al, Wiley Press.; Methods in Molecular Biology: Vol. 225 (Métodos en Biología Molecular: Volumen 225), Inflammation Protocols. (Protocolos de Inflamación), Winyard, P.G. y Willoughby, D.A., Humana Press, 2003.).

### SECCIÓN B. EJEMPLOS DE COMPUESTO

Ejemplo 67: (3R)- y (3S)-3-Ciclopentil-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanenitrilo



A una solución de 1.0 M de terc-butóxido de potasio en THF (235 ml) a 0 °C se le agregó en forma de gotas una

solución de cianometilfosfonato dietílico (39.9 mililitros, 0.246 milimoles) en THF (300 ml). El baño frío fue removido y la reacción fue recalentada a la temperatura del cuarto seguido por un re-enfriamiento a 0 °C, en cuyo momento una solución de ciclopentanecarbaldehído (22.0 gramos, 0.224 moles) en THF (60 ml) se agregó en forma de gotas. El baño fue removido y la reacción fue recalentada a la temperatura ambiente y agitada durante 64 horas. La mezcla fue dividida entre éter dietílico y agua, la porción acuosa fue extraída con 3 porciones de éter, seguido por 2 porciones de acetato etílico. Los extractos combinados fueron lavados con salmuera, y luego secados sobre sulfato de sodio, filtrados y concentrados al vacío para permitir una mezcla que contenía 24.4 gramos de isómeros de olefina que fue utilizada sin más purificaciones (89%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.69 (dd, 1H, trans olefina), 6.37 (t, 1H, cis olefina), 5.29 (dd, 1H, trans olefina), 5.20 (d, 1H, cis olefina), 3.07-2.95 (m, 1H, producto cis), 2.64-2.52 (m, 1H, producto trans), 1.98-1.26 (m, 16H).

*Paso 2. (3R)- y (3S)-3-Ciclopentil-3-[4-(7-[2-(trimetilsilil)etoxi]metil-7H-pirrol-2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanenitrilo*

Una solución de 4-(1H-pirazol-4-il)-7-[2-(trimetilsilil)etoxi]metil-7H-pirrol-2,3-d]pirimidina (15.0 gramos, 0.0476 moles) en ACN (300 ml) se agregó 3-ciclopentilacrilonitrilo (15 g, 0.2 sermones) (como una mezcla de isómeros cis y trans), seguido por DBU (15 ml, 0.10 moles) la mezcla resultante fue agitada a la temperatura del cuarto durante la noche. El ACN se evapora. La mezcla fue diluida con acetato etílico, y la solución fue lavada con 1.0 N HCl. La capa acuosa fue extraída de vuelta con 3 porciones de acetato etílico. Los extractos orgánicos combinados fueron lavados con salmuera, secados sobre sulfato de sodio, filtrados y concentrados. El producto crudo fue purificado por medio de cromatografía de gel de sílice (gradiente de acetato / hexanos etílicos) para generar un jarabe transparente viscoso, que fue disuelto en etanol y evaporado varias veces para remover al acetato etílico, para generar 19.4 gramos de aducto racémico (93%). Los enantiómeros fueron separados por medio de HPLC preparativo, (OD-H, 15% de etanol/hexanos) y utilizado por separado en el siguiente paso para generar a su producto final correspondiente. Los productos finales (refiérase al paso 3) provenientes de cada uno de los enantiómeros separados demostraron ser inhibidores activos de JAK; sin embargo, el producto final proveniente del 2° pico para eludir por medio del HPLC preparativo fue más activo que su enantiómero.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.85 (s, 1H), 8.32 (s, 2H), 7.39 (d, 1H), 6.80 (d, 1H), 5.68 (s, 2H), 4.26 (dt, 1H), 3.54 (t, 2H), 3.14 (dd, 1H), 2.95 (dd, 1H), 2.67-2.50 (m, 1H), 2.03-1.88 (m, 1H), 1.80-1.15 (m, 7H), 0.92 (t, 2H), -0.06 (s, 9H); MS(ES):437 (M+1).

*Paso 3. (3R)- y (3S)-3-Ciclopentil-3-[4-(7H-pirrol-2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanenitrilo*

A una solución de 3-ciclopentil-3-[4-(7-[2-(trimetilsilil)etoxi]metil-7H-pirrol-2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanenitrilo (6 g, 0.015 moles, enantiómero R o S tales como se aisló anteriormente) en DCM (40 ml) se agregó TFA (16 ml) y esto se agitó durante 6 horas. El solvente y el TFA se removieron al vacío. El residuo fue disuelto en DCM y concentrado utilizando un evaporador rotatorio 2 veces más para remover lo más posible de TFA. Después de esto, el residuo fue agitado con etilendiamina (4 ml, 0.06 moles) en etanol (30 ml) durante la noche. El solvente fue removido al vacío, se agregó agua y el producto fue extraído en 3 porciones de acetato etílico. Los extractos combinados fueron lavados con salmuera, secados sobre sulfato de sodio, decantados y concentrados para generar al producto crudo que fue purificado por medio de cromatografía de columna de destellos (eluyéndose con un gradiente de metanol/DCM). La mezcla resultante fue purificada aún más por medio de un HPLC preparativo/MS (C18 eluyéndose con un gradiente de ACN/H<sub>2</sub>O que contenía un 0.15 por ciento de NH<sub>4</sub>OH) para proporcionar al producto (2.68 gramos, 58%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>6</sub>-dmsO): δ 12.11 (br s, 1H), 8.80 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.60 (d, 1H), 6.98 (d, 1H),

# ES 2 564 203 T3

4.53 (dt, 1H), 3.27 (dd, 1H), 3.19 (dd, 1H), 2.48-2.36 (m, 1H), 1.86-1.76 (m, 1H), 1.68-1.13 (m, 7H);  
MS(ES):307(M+1).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

- 5
1. Un agente para su uso para el tratamiento de la enfermedad de ojos secos en un paciente donde dicho agente es 3-ciclopentil-3-[4-(7H-pirrolol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanenitrilo, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
- 10
2. El agente para su uso de acuerdo a la reivindicación 1, donde dicho agente es (3R)-3-ciclopentil-3-[4-(7H-pirrolol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanenitrilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
- 15
3. El agente para su uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, donde dicha enfermedad de ojo seco es:
- (a) Ojo seco por deficiencia de lágrimas acuosas;
- 20
- (b) Ojo seco por evaporación;
- (c) Ojo seco del síndrome de Sjogren; u Ojo seco que no pertenece al síndrome de Sjogren.
- 25
4. El agente para su uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho tratamiento comprende el alivio de un síntoma seleccionado de incomodidad del ojo, perturbación visual, inestabilidad de la lámina lacrimal, e hiperosmolaridad lacrimal e inflamación de la superficie ocular.
- 30
5. El agente para su uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho tratamiento comprende la administración de una composición farmacéutica a dicho paciente, donde dicha composición comprende a dicho agente y a un portador farmacéuticamente aceptable.
- 35
6. El agente para su uso de acuerdo a la reivindicación 5, donde dicha composición farmacéutica es una forma de dosis oral.
7. El agente para su uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho tratamiento comprende la administración de una composición oftálmica a dicho paciente, donde dicha composición comprende a dicho agente y a un portador oftálmicamente aceptable.
- 40
8. El agente para su uso de acuerdo a la reivindicación 7, donde dicha composición oftálmica es (a) una composición tópica; o (b) una formulación acuosa, una suspensión acuosa, un ungüento o un gel.
- 45
9. El agente para su uso de acuerdo a la reivindicación 7, donde dicha composición oftálmica es una inserción oftálmica.
10. El agente para su uso de acuerdo a la reivindicación 9, donde:
- 50
- (a) Dicha inserción oftálmica comprende a microesferas;
- (b) Dichas microesferas son inyectadas al segmento posterior del ojo, en el espacio de las coroides, en la esclerótica, en la intravítrea, o por debajo de la retina;
- 55
- (c) Dicha inserción oftálmica comprende a un colágeno, gelatina, un polímero, donde dicho polímero es seleccionado de policaprolactona (PCL), un co-polímero de acetato de etileno/vinilo (EVA - ethylene/vinyl acetate), cianoacrilato, poliuretano, un nylon, poli(dl-lactida-co-glicolida) (PLGA), o un co-polímero de cualquiera de los elementos que se acaban de mencionar; o
- 60
- (d) Dicha inserción oftálmica es implantada debajo del párpado superior, en el segmento posterior del ojo, en el espacio de las coroides, en la esclerótica, en la intravítrea o por debajo de las retinas.
- 65

11. El agente para su uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 10, donde además comprende la administración de por lo menos un agente terapéutico adicional.

5

12. El agente para su uso de acuerdo a la reivindicación 11, donde:

10 (a) Dicho agente terapéutico adicional es acetónido de fluocinolona, rimexolona, ciclosporina, riaminolona, dexametasona, fluocinolona, cortisona, prednisolona, fluorometolona, civamida, testosterona, Ecab de sodio, ácido 15-(s)-hidroxieicosatetraenóico, 2S,3S,4R,5R)-3,4-dihidroxi-5-[6-[(3-yodofenil)metilamino]purin-9-il]-N-metil-oxolano-2-carboxamida, gefarnato, cevilemina, doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina, ciclosporina, rosiglitazona, rebamipida lacritina, pilocarpina, tacrolimus, pimecrolimus, loteprednol etabonato, rituximab, tetrasódico diquafosol, dehidroepiandrosterona, anakinra, efalizumab, micofenolato sódico, etanercept, hidroxiclороquina, o talidomida; o

15

(b) Dicho agente terapéutico adicional es hialuronato de sodio, ácido hialurónico, alcohol de polivinilo, hidroxipropil-metilcelulosa, glicerina, polietilenglicol o carboximetilcelulosa.

20

13. El uso de un agente para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad de ojo seco; donde dicho agente que es 3-ciclopentil-3-[4-(7H-pirroló [2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanenitrilo, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

25

14. Un uso de acuerdo a la reivindicación 13, donde el agente es (3R)-3-ciclopentil-3-[4-(7H-pirroló[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanenitrilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

30

35

40

45

50

55

60

65