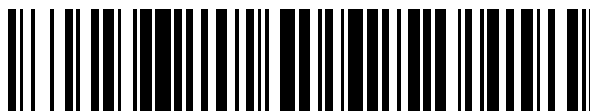


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 254**

51 Int. Cl.:

A61K 41/00 (2006.01)
A61K 47/69 (2007.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 31/525 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2015** **PCT/IT2015/000117**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2016** **WO16174688**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2015** **E 15754041 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018** **EP 3288588**

54 Título: **Agentes de reticulación mejorados de fibras de colágeno para su uso en el tratamiento de la ectasia corneal**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.12.2018

73 Titular/es:
SOOFT ITALIA S.P.A. (100.0%)
Contrada Molino, 17
63833 Montegiorgio CFM), IT

72 Inventor/es:
CAVALLO, GIOVANNI;
STAGNI, EDOARDO;
BIONDI, MARCO y
BIONDI, PIERO

74 Agente/Representante:
TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 693 254 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

Agentes de reticulación mejorados de fibras de colágeno para su uso en el tratamiento de la ectasia corneal

La presente invención se refiere al campo farmacéutico médico y, más específicamente, al campo técnico de composiciones oftálmicas tópicas a administrar para realizar la reticulación (CXL) del colágeno corneal útil en el tratamiento del queratocono, concretamente, una formulación mejorada de una composición oftálmica que contiene riboflavina incluida en ciclodextrinas que permiten una mejor penetración en el estroma corneal en comparación con las composiciones de la técnica anterior.

En particular, la riboflavina se incluye en hidroxipropil- β -ciclodextrinas (HP- β -CD).

La córnea es una barrera transparente convexa que sirve para mantener la estructura intacta del ojo y enfocar la luz sobre la retina. La fuerza estructural, forma e integridad de la córnea se debe al colágeno corneal. La resistencia de las cadenas de colágeno entrelazadas se debe a los enlaces cruzados covalentes establecidos entre y dentro de las cadenas de colágeno y entre el colágeno y las glicoproteínas en la matriz. En la estructura fisiológicamente robusta de las córneas, la enzima lisil oxidasa realiza la reticulación del colágeno en un proceso llamado desaminación oxidativa utilizando oxígeno molecular presente en el tejido. Sin embargo, la fuerza biomecánica del colágeno corneal puede reducirse por una serie de afecciones, incluido el efecto iatrogénico de la intervención quirúrgica, prótesis o medicamentos, a menudo la causa de la debilidad corneal puede ser congénita, idiopática o debida a causas microbianas o traumatismo. En caso de debilidad corneal, deben aplicarse y aprovecharse las estrategias de intervención para restablecer o mejorar la fuerza de las fibras de colágeno corneal.

El fortalecimiento del colágeno corneal debilitado puede realizarse por medios químicos, físicos y fotoquímicos. Se han investigado medios químicos tales como glutaraldehído, formaldehído, gliceraldehído, ribosa, glucosa y alcoholes alifáticos beta-nitro introducidos en la córnea. La mayoría de los métodos que utilizan dichos agentes químicos de reticulación se han abandonado debido a problemas de toxicidad y eficacia. Los métodos físicos para fortalecer el colágeno corneal incluyen el tratamiento deshidrotérmico (deseccación del agua del colágeno), calentamiento térmico y radiación UVC o gamma. Sin embargo, muchas de estas técnicas han demostrado inconvenientes, como la desnaturalización y degradación del colágeno, el daño o la muerte de queratocitos y los efectos secundarios potencialmente tóxicos.

El método más prometedor para reticular el colágeno corneal comprometido es la reticulación fotoquímica, que se ha empleado en el uso clínico en humanos para el tratamiento del queratocono y la ectasia durante algún tiempo. Este método utiliza un fotosensibilizador, generalmente monofosfato de riboflavina, y luz UVA para crear oxígeno singlete en el colágeno estromal. El oxígeno singlete reacciona para convertir las cadenas laterales de lisina de las fibrillas de colágeno en restos de alisina que se condensan espontáneamente para reticular las fibrillas de colágeno. Esencialmente, esto imita la reacción causada por la enzima natural lisil oxidasa. Se ha demostrado que la reticulación fotoquímica de la córnea detiene y revierte con éxito la progresión del colágeno comprometido en el queratocono y la ectasia, y miles de pacientes han recibido este tratamiento con pocos acontecimientos adversos graves.

El tratamiento fotoquímico, a veces denominado terapia fotodinámica, se ve afectado por tres elementos: 1) luz de excitación, 2) moléculas fotosensibilizadoras y 3) oxígeno molecular. El objetivo de la reacción química es producir oxígeno singlete y la cantidad de cada una de las tres variables de la reacción (luz, fotosensibilizador, oxígeno) determina la velocidad y la cantidad de oxígeno singlete producido. Durante la reacción, el oxígeno molecular en el tejido se agota. El oxígeno molecular disponible en el tejido ha sido a menudo el aspecto más limitante de la terapia fotoquímica y fotodinámica. Cuando el contenido de oxígeno en el tejido es demasiado bajo, la reacción fotoquímica produce poco oxígeno singlete. En cambio, la reacción convierte el agua en peróxido de hidrógeno que es citotóxico y puede estimular la respuesta de cicatrización de la herida con consecuencias negativas. Cuando el contenido de oxígeno en el tejido es relativamente alto, la reacción fotoquímica produce oxígeno singlete a una velocidad que se aproxima a 100:1 oxígeno singlete respecto al peróxido de hidrógeno. Por lo tanto, mantener el nivel de oxígeno molecular alto es un aspecto crítico de la reticulación fotoquímica. Una rápida producción de ROS es importante ya que la cantidad de oxígeno disminuye con el progreso del tiempo. Cuando la solución se calienta, se espera que la concentración de oxígeno disminuya a medida que disminuye la solubilidad del oxígeno a medida que aumenta la temperatura.

La longitud de onda de la luz de excitación determina las características de absorción del fotosensibilizador. La profundidad de penetración de la luz UVA en la córnea es una función de la absorbancia del fotosensibilizador en varias longitudes de onda y la concentración y distribución de las moléculas fotosensibilizadoras. Esta profundidad de penetración es un valor crítico en la reticulación de la córnea porque una penetración muy escasa produce una reticulación superficial, tal vez insuficiente, y una penetración excesiva puede dañar el endotelio.

Para la riboflavina, la absorbancia máxima se produce en el espectro de luz UV a aproximadamente 365 nm y 445 nm. En estas longitudes de onda, la luz de excitación se absorbe rápidamente y penetra hasta la menor profundidad en el tejido. La córnea normal es nominalmente de alrededor de 500 micrómetros de profundidad, y una capa de

células endoteliales define la parte posterior de la córnea.

Además, la dinámica del procedimiento para la penetración de la luz y la conversión de oxígeno molecular en oxígeno singlete depende de la concentración del fotosensibilizador en el tejido y la concentración de oxígeno en el

Hay varias precauciones que deben observarse cuando se utiliza luz UVA y riboflavina para la reticulación de la córnea.

En primer lugar, la luz UVA puede tener efectos citotóxicos en todas las células vivas, y en particular, las células endoteliales de la córnea en la capa posterior de la córnea pueden ser destruidas por el exceso de luz UVA o por especies reactivas de oxígeno (ROS).

A continuación, la riboflavina activada puede producir peróxido de hidrógeno citotóxico si las moléculas de oxígeno no están disponibles. Dicho peróxido de hidrógeno citotóxico puede destruir o inactivar las células sanas. El peróxido de hidrógeno también actúa como un potente mensajero químico a otras células para iniciar las respuestas de cicatrización de heridas. Estas respuestas de cicatrización de heridas en la córnea pueden provocar edema, inflamación y diferenciación de los queratocitos en miofibroblastos con la producción de tipos de colágeno que no son ópticamente transparentes. De hecho, la opacidad corneal y la cicatrización pueden resultar de la formación de miofibroblastos.

Por lo tanto, una reacción más rápida asegura un acontecimiento menos tóxico y, en consecuencia, un mecanismo de acción mejor y más eficiente.

La desepitelización corneal se realiza para promover la infusión de riboflavina en el estroma del ojo. El procedimiento de desepitelización está destinado a garantizar que se introduzca suficiente fosfato de riboflavina en el ojo para evitar el exceso de radiación UVA en el endotelio. En este caso, la concentración de riboflavina actúa como un filtro solar UVA para el endotelio más profundo. Los acontecimientos adversos adicionales pueden incluir infección/úlceras postoperatoria y opacidad estromal. Algunos pacientes refieren molestias significativas, dolor y peor visión que duran aproximadamente una semana, y una visión significativamente peor que antes del procedimiento de reticulación y que duran varios meses. La mayoría de los efectos secundarios adversos son el resultado de la extirpación quirúrgica del epitelio corneal antes de la introducción de la riboflavina. La capacidad de predecir el resultado clínico, es decir, la mejora de la mejor agudeza visual corregida (BCVA) de un paciente o la prevención de la reducción de BCVA a largo plazo, no es alta.

En la técnica anterior, se han descrito varios compuestos alternativos para su uso para la reticulación corneal en el tratamiento del queratocono.

La solicitud de patente internacional. WO 2004/058289 divulga composiciones oftálmicas que comprenden EDTA, EDTA sódico, EDTA sal de potasio para tratar afecciones oculares de la córnea tales como el queratocono.

Wollensak Gregor et al. en "Collagen cross-linking of human and porcine sclera", Journal cataract and refractive surgery, 2004, vol. 30, páginas 689-695, divulga el proceso de reticulación de la esclerótica con gliceraldehído, glutaraldehído o riboflavina.

Spoerl E et al. en "Techniques for stiffening the cornea", J. Refract Surg. 1999, 15: 711-713, divulga la reticulación corneal realizada con fotosensibilizadores, como la riboflavina, y reticuladores químicos, como el glutaraldehído y la solución de Karnovsky. Filippello M. et al (Journal of cataract and refractive surgery, vol. 38, N.º 2, 2012, páginas 283-291) divulga una composición que comprende riboflavina, EDTA, trometamina, para la reticulación mediada por UV de las fibras corneales en el contexto del tratamiento del queratocono. La aplicación de un fotosensibilizador como riboflavina-5-fosfato a un tejido, p. ej. córnea, piel, tendón, cartílago o hueso, seguida de fotoactivación se describe en la patente US-7.331.350, produciendo un sello de tejido-tejido para reparar una herida o para sellar un trasplante de tejido. Dicho método descrito se puede aplicar a diferentes tipos de procedimientos quirúrgicos, como la cirugía de trasplante de córnea, cirugía de cataratas, cirugía con láser, queratoplastia, queratoplastia penetrante, cirugía refractiva, remodelación de la córnea.

La solicitud de patente US 2008/0015660 describe un método para realizar la oculoplastia para el tratamiento de distrofias corneales/queratocónicas que incluyen la aplicación de una solución de riboflavina como fotosensibilizador en la superficie del ojo humano e irradiar la región de tratamiento con radiación fotoactivadora controlada.

El objeto de la solicitud de patente internacional WO 2009/001396 es una solución ocular que contiene aproximadamente 0,05-0,25 % p/p de fosfato de riboflavina y aproximadamente 20 % p/p de dextrano para el uso en la técnica de reticulación corneal para el tratamiento del queratocono. La contribución innovadora del dextrano a esta solución es garantizar una buena mucoadhesividad a la superficie ocular que permita un mejor rendimiento del contacto y, por lo tanto, de la impregnación del estroma corneal por la solución de riboflavina.

La solicitud de patente europea EP 2 253 321 ha divulgado recientemente una formulación muy simple relacionada con un colirio para el tratamiento de pacientes que padecen córnea cónica. En dicha formulación, que solo contiene riboflavina-5-fosfato, cloruro de sodio, cloruro de benzal y agua estéril, la riboflavina-5-fosfato y el cloruro de benzal, que actúan como agentes tensioactivos, facilitan la penetración del colirio en el epitelio corneal; en comparación con los colirios estándar para el tratamiento de la córnea cónica, el producto obtenido por esta composición descrita tiene la ventaja de que no requiere la eliminación del epitelio corneal.

Una solución técnica similar se obtiene mediante la irradiación con UV-A de una mezcla de riboflavina/colágeno en presencia de oxígeno abundante que causa una rápida reticulación que tiene como resultado la adhesión de la mezcla in situ, lo que lleva a la adhesión a la estructura ocular subyacente. Dicho sello de tejido de la córnea y la esclerótica se divulga en la Solicitud de Patente Internacional WO 2009/073600 con el fin de obtener un aumento estructural del tejido ocular para estabilizar mejor las enfermedades corneales progresivas.

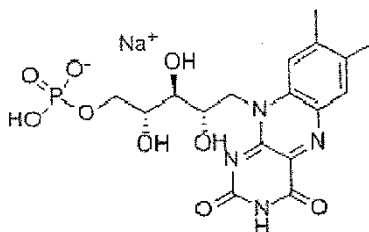
Para superar el problema de la eliminación del epitelio corneal (deseptelización), para facilitar la absorción de riboflavina y la completa imbibición del estroma corneal antes de comenzar la irradiación con UV-A, que puede crear, aunque raramente, complicaciones a nivel corneal, dolor, además de hacer más difícil la tarea del oculista, la solicitud internacional de patente PCT/IT2009/000392, divulga el uso de EDTA asociado a trometamina y/o uno o más fotopotenciadores elegidos entre: amarillo de acridina, amarillo de quinidina, azul de metileno, eritrosina, ya sea solos o mezclados, con fosfato de riboflavina, para la preparación de composiciones oftálmicas para el método de la reticulación corneal en el tratamiento del queratocono o de otros trastornos ectásicos para favorecer el paso de la composición oftálmica al estroma a través del epitelio corneal. La invención resuelve el problema técnico de la escasa capacidad de la riboflavina para difundirse a través del epitelio y, por lo tanto, alcanzar el estroma corneal. De hecho, mediante la adición de la asociación divulgada de EDTA y trometamina, y/o uno o más fotopotenciadores divulgados, el compuesto a base de fosfato de riboflavina facilita la absorción epitelial asociada a la CXL corneal, evitando el recurso a la eliminación del epitelio corneal, permitiendo una eliminación o reducción no invasiva de la córnea de la anestesia y la consiguiente curación rápida sin dolor o posible complicación para los pacientes.

Sin embargo, a pesar de los importantes avances en el campo relevante de las soluciones de riboflavina, todavía existe la necesidad de composiciones oftálmicas más eficaces liberadas para embeber el estroma corneal en la práctica de la reticulación corneal para el tratamiento del queratocono.

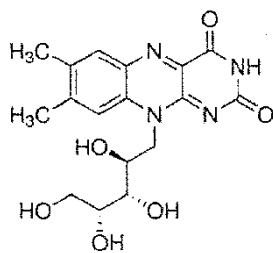
Por lo tanto, sería deseable mejorar aún más la absorción de riboflavina, para reducir el tiempo de administración de riboflavina, sin requerir la eliminación del epitelio corneal, obteniendo así una reticulación corneal no invasiva con la eliminación o reducción de la anestesia, que no necesita una terapia postratamiento particular, sin edema debido a la eliminación del epitelio, y la consiguiente curación rápida sin dolor o posibles complicaciones para el paciente.

Por lo tanto, existe una gran necesidad de formulaciones alternativas de composición de riboflavina para usarse en la reticulación corneal.

Hasta ahora, la mayoría de los agentes de reticulación corneal más eficientes emplean fosfato de riboflavina, que es una molécula polar de carga negativa. Tal característica no permite penetrar fácilmente las membranas oculares. Un mejor enfoque, o al menos una mejora del estado de la técnica actual, usaría riboflavina, que es una molécula lipófila, que impregna mucho mejor las membranas oculares, sin embargo, el uso de dicha molécula es muy resistente porque esta molécula es insoluble en agua.



Riboflavina-5-fosfato sódico



Riboflavina

La reticulación fotoquímica inducida por el fosfato de riboflavina y la radiación UV-A que induce la fotopolimerización de las fibrillas de colágeno del estroma aumenta su rigidez y resistencia a la queratoectasia progresiva del queratocono y sigue siendo la técnica más prometedora para reticular el colágeno corneal comprometido.

La reticulación (CXL) del colágeno corneal se realiza con radiación ultravioleta A (UVA) a 370 nm y el fosfato de riboflavina fotosensibilizador (vitamina B2). Según Wollensak (Wollensak, 2006), el fotosensibilizador se excita en su estado triplete generando especies reactivas de oxígeno (ROS), que son principalmente oxígeno singlete y en mucho menor grado radicales de aniones superóxido. Las ROS pueden reaccionar a su vez con diversas moléculas que inducen enlaces covalentes químicos que forman puentes entre grupos amino de fibrillas de colágeno (reacción fotoquímica tipo II). El efecto biomecánico se produce inmediatamente después de la irradiación, lo que lleva a un aumento de alrededor del 300 % de la rigidez biomecánica de la córnea. La longitud de onda óptima de la radiación ultravioleta (UV) en la que la riboflavina y el fosfato de riboflavina presentan una absorción máxima es de 370 nm.

Debido a las propiedades químicas y físicas peculiares de la molécula de riboflavina, tanto la estabilidad como la degradación son el problema más preocupante en el campo del desarrollo de fármacos y la preparación a base de riboflavina.

La riboflavina y el fosfato de riboflavina son muy sensibles a la luz y a altas temperaturas, y por lo tanto, estos factores deben considerarse cuidadosamente para garantizar su estabilidad y la actividad en las preparaciones farmacéuticas. Se han identificado varios factores que afectan a la estabilidad de la riboflavina y su funcionalidad. Estos factores incluyen la fuente de radiación, la intensidad de la radiación y la longitud de onda, el pH, la presencia de oxígeno, la concentración del tampón y la fuerza iónica, la polaridad y viscosidad del disolvente, y el uso de estabilizantes y agentes que forman complejos.

Se han realizado algunos intentos para estabilizar y proteger las moléculas fotosensibles de la fotodegradación debida a la exposición a la luz, por ejemplo, combinándolas con algunos agentes absorbentes de luz, es decir, liposomas y ciclodextrinas, según lo propuesto por Gregoriadis y Loukas en la patente EP0762871.

Sin embargo, la necesidad de administrar una molécula altamente insoluble, como la riboflavina, pero más lipófila que el fosfato de riboflavina, contrarresta su capacidad de interactuar con la luz para producir ROS que forman puentes entre los grupos amino de las fibrillas de colágeno, lo que conduce a un aumento de la rigidez de la córnea.

Fotodegradación

De acuerdo con los mecanismos implicados en las reacciones fotoquímicas de las flavinas, tanto los estados singletes excitados como los tripletes excitados de la riboflavina están implicados en las reacciones de fotodegradación [1].

Las reacciones fotoquímicas implicadas en la degradación de la riboflavina se ven afectadas por varios factores, como la fuente de radiación, la intensidad y las longitudes de onda. De hecho, las características de emisión de la fuente de radiación son un factor importante que desempeña un papel importante en la fotodegradación de la riboflavina. En la oscuridad, la riboflavina es estable y permanece sin cambios en condiciones específicas durante períodos prolongados de tiempo. En la forma seca, la riboflavina no se ve muy afectada por la luz, mientras que en la solución se degrada rápidamente dando diversos fotoproductos a través de una variedad de reacciones en condiciones aerobias y anaerobias.

La fotodegradación de la riboflavina se ve afectada en gran medida por el pH del medio y los fotoproductos así obtenidos también dependen del pH. Por lo tanto, el pH de la solución tiene un efecto significativo sobre la fotoestabilidad de la riboflavina. En condiciones de pH ácido y neutro, la riboflavina se fotodegrada a lumichrome, mientras que en medios alcalinos forma lumichrome junto con lumiflavina.

También se observó que la tasa de fotólisis de la riboflavina es más lenta en el rango de pH de 5-6 y luego se incrementa tremendamente (aproximadamente 80 veces) en la región alcalina alcanzando un máximo a pH 10. Esto es probablemente debido a la mayor reactividad del triplete de flavina en esta región [2].

Las formas no ionizadas de riboflavina son más susceptibles a la fotodegradación en comparación con las formas ionizadas y el rango de pH óptimo para mantener las preparaciones de vitaminas es de 5-6.

También la concentración de los tampones y la fuerza iónica desempeñan un papel importante en la fotodegradación de la riboflavina en solución acuosa. Diferentes estudios han demostrado el efecto catalítico de las especies de tampón que incluyen fosfato, sulfato, acetato y carbonato en las soluciones de riboflavina [3], mientras que el borato y el citrato producen un efecto estabilizador [4]. Las soluciones que contienen aniones divalentes tienen la tendencia a catalizar la fotodegradación de fármacos al descomponer el complejo activado [5].

Además, la velocidad de la fotólisis de la riboflavina se ve afectada por la polaridad del disolvente, lo que causa cambios en la conformación de la cadena lateral de ribitilo que sufre degradación [6-7]. Se ha observado que la fotodegradación de la riboflavina es más rápida en disolventes orgánicos en comparación con las soluciones acuosas. Esto podría vincularse a las propiedades físicas de los disolventes tales como polaridad, constante dieléctrica, viscosidad, etc.

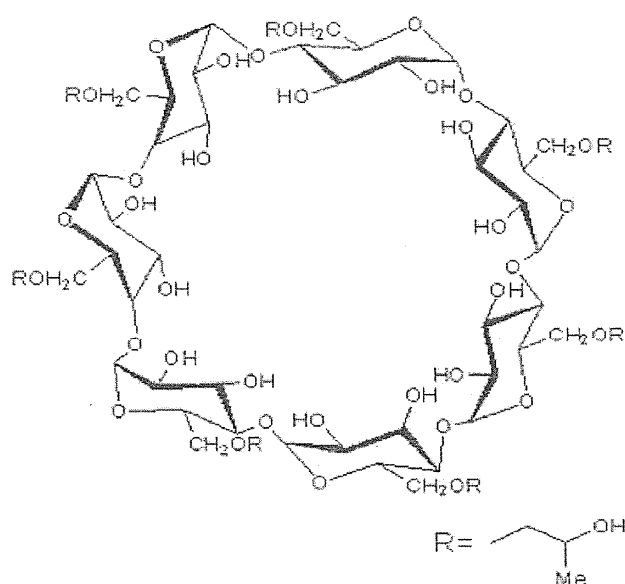
Para estabilizar la riboflavina a partir de estabilizadores de fotodegradación, se han utilizado estabilizadores, medios de extinción y agentes que forman complejos.

Entre los estabilizadores, el mayor efecto estabilizador se ha observado en la etilendiamina disódica (EDTA) (96,2 %), seguido de la tiourea (88,2 %), metilparabeno (86,4 %), DL-metionina (76,3 %), tiosulfato de sodio (72,9 %), ácido ribonucleico (59,3 %) y glutatión reducido (26,2 %). Cuando las soluciones de riboflavina se expusieron a una luz fluorescente de 40 W (lámpara fluorescente Sylvania con una intensidad mantenida a 1350 pies-candelas), se observó que el efecto fotoestabilizante de estos agentes dependía de su concentración, ya que se observó un aumento del efecto con un aumento de la concentración. De manera similar, se ha observado que el pH del medio y las especies de tampón (por ejemplo, tampón fosfato) influyen en la velocidad de fotodegradación de la riboflavina en presencia y ausencia de EDTA [8].

Cuando absorbe la luz, la riboflavina pasa al estado singlete excitado y luego al estado triplete excitado. Estos estados excitados finalmente vuelven al estado fundamental emitiendo fluorescencia, fosforescencia o calor. La caída de estos estados al estado fundamental puede deberse a la auto-extinción de la molécula de riboflavina (medio de extinción interno) o sus fotoproductos. A menudo, se añaden medios de extinción externos a las preparaciones de riboflavina para alterar el rendimiento cuántico de la fotorreacción sin extinguir la fluorescencia de la riboflavina [9].

El uso de diversos agentes que forman complejos es otra estrategia para fotoestabilizar la riboflavina. Se sabe que la cafeína forma complejos moleculares con la riboflavina y, por lo tanto, disminuye su velocidad de reacciones químicas [10] y de fotodegradación [11].

Se han estudiado diferentes tipos de ciclodextrinas en cuanto a la formación de complejos con riboflavina para lograr su estabilización [12-13].



2-Hidroxipropil- β -ciclodextrina

Las ciclodextrinas son oligosacáridos con forma de toroide con superficies externas hidrófilas y una cavidad interna lipófila. Pueden formar complejos de inclusión huésped-hospedador con compuestos hidrófobos que aumentan su solubilidad [14-15]. Los estudios han demostrado que el tratamiento previo con soluciones de ciclodextrina puede mejorar la permeabilidad corneal de algunos medicamentos como la pilocarpina [16]. Sultana et al. informaron de su uso en formulaciones que contienen corticosteroides, cloranfenicol, diclofenaco y ciclosporina [17]. Roy et al. [18] y Terekhova et al. han demostrado que la riboflavina puede formar complejos con ciclodextrinas; sin embargo, sus estudios se limitaron a la dinámica de la formación de complejos utilizando α y β ciclodextrinas.

Se han investigado los efectos de varias ciclodextrinas sobre la solubilidad y permeabilidad de la riboflavina a través de la córnea bovina y se describen en Morris et al. 2013 [19]. Se observó que la α -ciclodextrina, y además la β -ciclodextrina, incrementaba la solubilidad de la riboflavina, ofreciendo una mejora significativa en la solubilidad acuosa de la riboflavina, pero la γ -ciclodextrina y la hidroxipropil- β -ciclodextrina no aumentaron la solubilidad del fármaco a un nivel significativo, en comparación con su solubilidad en agua.

Las consideraciones de tamaño y las constantes de asociación parecen dar una explicación razonable al rendimiento superior de la β -ciclodextrina en la solubilización de la riboflavina.

La cavidad de la ciclodextrina determina qué moléculas son capaces de formar complejos de inclusión. Cuando la cavidad es pequeña, como ocurre con la α -ciclodextrina (4,7-5,3 Å), muchas moléculas de fármaco resultan demasiado grandes para encajar y no pueden formar complejos de inclusión: cuando la cavidad es demasiado grande, las moléculas de fármaco pueden estar unidas con demasiada holgura [14]. La β -ciclodextrina es adecuada para muchas aplicaciones farmacéuticas, con un tamaño de cavidad de 6,0-6,5 Å, que puede acomodar una amplia gama de medicamentos.

Por otro lado, se determinó que el tamaño de la molécula de riboflavina es 10 x 12 Å, lo que es demasiado grande para caber completamente en cualquier cavidad de ciclodextrina; sin embargo, el anillo aromático con grupos metilo unidos se acomodaría adecuadamente dentro de la cavidad de β -ciclodextrina y se uniría a través de una afinidad hidrófoba débil. La cavidad de la α -ciclodextrina sería demasiado pequeña para acomodar el anillo aromático de la riboflavina, aunque podría ocurrir una formación de complejos parcial a través de los grupos metilo. De acuerdo con este modelo, la participación de otras partes de la molécula de riboflavina, como la cadena de ribitol y el anillo de pirimidina, es poco probable que participe en la formación de un complejo de inclusión. En el caso de la γ -ciclodextrina, la acomodación sería demasiado floja.

Permeabilidad corneal de la riboflavina.

Morris et al. investigaron el efecto de las ciclodextrinas sobre la permeabilidad de la riboflavina a través de córneas bovinas frescas. El estudio ha revelado que la permeabilidad de la riboflavina a través de la córnea bovina aumentó significativamente cuando se usaban soluciones de β -ciclodextrina en comparación con la riboflavina en agua desionizada, pero una HP- β - y γ -ciclodextrina no ofreció una mejora significativa en la permeación del fármaco.

El análisis microscópico fue realizado por Morris et al. para establecer el efecto de las ciclodextrinas sobre la integridad de la córnea bovina fresca. Todas las muestras tratadas con α -, β -, HP- β - y γ -ciclodextrinas muestran una tendencia similar de aumento de la disrupción epitelial, lo que se hace más evidente al aumentar el tiempo de exposición a las soluciones de ciclodextrina.

Además, puede suponerse que tal capacidad de permeación aumentada mediada por ciclodextrina puede deberse, o promoverse parcialmente, por la extracción de colesterol mediada por ciclodextrina. De hecho, se ha descrito previamente que las ciclodextrinas extraen el colesterol y otros lípidos de las membranas celulares. [20-21]. La extracción de colesterol de la córnea bovina mediante soluciones de ciclodextrina que habían estado en contacto con el tejido biológico se confirmó mediante HPLC, lo que demuestra la extracción de colesterol empleando β -ciclodextrinas y HP- β -ciclodextrinas [19]. Sin embargo, el resultado ha demostrado que las HP- β -ciclodextrinas tienen una capacidad mucho menor para extraer el colesterol que las β -ciclodextrinas, por lo que se espera que tengan una menor capacidad de difusión y capacidad para impregnar las membranas oculares.

Sorprendentemente, el solicitante ha observado que la composición oftálmica que comprende riboflavina formando complejos en HP- β -ciclodextrinas como fotosensibilizante, aunque se hace más estable por la formación de complejos, después de la irradiación, produce una mayor cantidad de anión superóxido que la composición que comprende fosfato de riboflavina, actualmente utilizado en el procedimiento de reticulación corneal. Además, aunque la menor capacidad para extraer colesterol de las HP- β -ciclodextrinas, el solicitante ha observado inesperadamente que los complejos HP- β -ciclodextrinas de riboflavina tienen una mayor capacidad para penetrar el estroma corneal para realizar la reticulación del colágeno.

Sumario

Por lo tanto, el equilibrio correcto entre solubilidad, fotoestabilidad, fotodegradación y capacidad de permeación de la riboflavina como fotosensibilizador para ser empleado en la reacción de reticulación es un elemento crucial para

asegurar el mejor rendimiento y resultado del tratamiento terapéutico.

En particular, para lograr el mejor resultado, cuando el agente de reticulación alcanza la superficie ocular, tiene que ser soluble y estable y capaz de producir ROS, aunque estas dos características técnicas parecen contrarrestarse entre sí.

El propósito de la presente invención es proporcionar agentes de reticulación mejorados, basados en riboflavina, para ser administrados en la práctica del tratamiento del queratocono, o de otras enfermedades corneales ectásicas, que tienen características mejoradas, reduciendo considerablemente el tiempo requerido para el tratamiento y mejorar el rendimiento y los resultados terapéuticos.

El objetivo de la presente invención es, por lo tanto, proporcionar nuevas formulaciones, útiles para el tratamiento de la ectasia corneal, basadas en riboflavina formando complejos en soluciones de ciclodextrina, caracterizadas por una mejor penetración transepitelial en el estroma corneal y por una rigidez de la estructura del colágeno aumentada si se compara con la Formulación del estado de la técnica.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es el gráfico que muestra la variación de la absorbancia a 560 nm de la muestra de fosfato de riboflavina + NTB cuando se activa con una intensidad de luz incidente diferente, respectivamente 99 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, 223 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, 633 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$.

La Figura 2 es el gráfico que muestra la variación de la absorbancia a 560 nm de la solución de 5'-monofosfato de riboflavina sódica.2H₂O (muestra 1) y el complejo de riboflavina-hidroxipropil- β -ciclodextrina (muestra 2) cuando se irradia con 99 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ de luz incidente.

La Figura 3 es el gráfico que muestra la variación de la absorbancia a 560 nm de la solución de 5'-monofosfato de riboflavina sódica.2H₂O solución en presencia de EDTA H₄ 0,100 % p/v y trometamina 0,135 % (muestra 3) y el complejo de riboflavina-hidroxipropil- β -ciclodextrina (muestra 4) en presencia de EDTA H₄ 0,100 % p/v y trometamina 0,135 % p/v cuando se irradia con 99 ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$ de luz incidente.

La Figura 4 es el gráfico que muestra la variación de la absorbancia a 560 nm de la solución de 5'-monofosfato de riboflavina sódica.2H₂O en presencia de EDTA H₄ 0,200 % p/v y trometamina 0,235 % p/v (muestra 5) y el complejo de riboflavina-hidroxipropil- β -ciclodextrina (muestra 6) en presencia de EDTA H₄ 0,200 % p/v y trometamina 0,235 % p/v cuando se irradia con 633 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ de luz incidente.

La Figura 5 es el gráfico que muestra la variación de la absorbancia a 560 nm de la solución de 5'-monofosfato de riboflavina sódica.2H₂O (muestra 1) y el complejo de riboflavina-hidroxipropil- β -ciclodextrina (muestra 2) cuando se irradia con 99 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ de luz incidente.

La Figura 6 es el gráfico que muestra la variación de la absorbancia a 560 nm de la solución de 5'-monofosfato de riboflavina sódica.2H₂O en presencia de EDTA H₄ 0,100 % p/v y trometamina 0,135 % (muestra 3) y el complejo de riboflavina-hidroxipropil- β -ciclodextrina (muestra 4) en presencia de EDTA H₄ 0,100 % p/v y trometamina 0,135 % p/v cuando se irradia con 633 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ de luz incidente.

La Figura 7 es el gráfico que muestra la variación de la absorbancia a 560 nm de la solución de 5'-monofosfato de riboflavina sódica.2H₂O en presencia de EDTA H₄ 0,200 % p/v y trometamina 0,235 % (muestra 5) y el complejo de riboflavina-hidroxipropil- β -ciclodextrina (muestra 6) en presencia de EDTA H₄ 0,200 % p/v y trometamina 0,235 % p/v cuando se irradia con 633 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ de luz incidente. La riboflavina-hidroxipropil- β -ciclodextrina produce más superóxido que la proporción equimolar de fosfato de riboflavina

La Figura 8 es el gráfico que muestra la permeación de la riboflavina en córneas de conejo de complejos de riboflavina/ β -ciclodextrina que comprenden una cantidad diferente de riboflavina y β -ciclodextrina, respectivamente, (1) 0,1 % p/p de riboflavina y 2,6 % p/p de β -ciclodextrina, (2) 0,1 % p/p de riboflavina y 1,3 % p/p de β -ciclodextrina, (3) 0,05 % p/p de riboflavina y 1,3 % p/p de β -ciclodextrina, en comparación con la permeación corneal después del tratamiento de reticulación corneal clásico con solución de fosfato de riboflavina sal sódica deshidratada 0,0147 % p/p, EDTA sódica 0,1 % p/p, trometamina 0,05 % p/p instilada en los ojos durante 15 minutos, seguida de irradiación UV-A durante 5 minutos y eliminación del epitelio corneal.

La Figura 9 es el gráfico que muestra el efecto de los procedimientos de esterilización (filtración de 0,22 micrómetros, vapor a 121 °C 20 min a 1 atm) sobre la permeación de riboflavina en córneas de conejo de una formulación de complejo de riboflavina/hidroxipropil- β -ciclodextrina en comparación con la permeación de la córnea tras el tratamiento clásico de reticulación corneal.

La Figura 10 es la gráfica que muestra el efecto de la cantidad diferente de EDTA H₄ y trometamina sobre la permeación de riboflavina en córneas de conejo de una formulación de un complejo de riboflavina/hidroxipropil- β -ciclodextrina en comparación con la permeación corneal después del tratamiento clásico de reticulación corneal.

Descripción de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona fotosensibilizadores mejorados para ser utilizados para realizar la reticulación mediada por riboflavina-UV de las fibras de colágeno corneal.

En una primera realización de tal aspecto, el fotosensibilizador es riboflavina incluida en β -ciclodextrinas hidroxipropiladas (HP- β -CD).

El fosfato sódico de riboflavina (peso molecular 456, cargado negativamente) es la molécula hidrófila preferente de fotosensibilización y fotopolimerización utilizada principalmente para realizar la reticulación corneal; sin embargo, su alta solubilidad en agua está asociada a una deficiente capacidad para difundir a través del epitelio y, por lo tanto, alcanzar el estroma corneal, sin embargo la riboflavina (peso molecular 376), molécula lipófila con mayor capacidad de difusión a través del epitelio y, por lo tanto, que alcanza el estroma corneal, tiene una solubilidad muy baja en agua.

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos solubles en agua que consisten en seis, siete y ocho subunidades de glucopiranosas con enlaces $\alpha(1-4)$, son moléculas con forma de toroide con superficies externas hidrófilas y una cavidad interna lipófila. Son capaces de formar complejos de inclusión huésped-huésped con compuestos hidrófobos que los hacen más solubles.

Se utilizan diferentes tipos de ciclodextrinas en las formulaciones oftálmicas para mejorar la solubilidad acuosa y la permeabilidad corneal de la riboflavina. Como se discutió anteriormente, se ha demostrado que la solución acuosa de β -ciclodextrina (10-30 mg/ml) puede mejorar la solubilidad de la riboflavina, mientras que los otros oligosacáridos, incluso en concentraciones más altas, son menos efectivos, y que la β -ciclodextrina mejora la permeabilidad de la riboflavina, mientras que la α -ciclodextrina, la γ -ciclodextrina y la hidroxipropil- β -ciclodextrina no ofrecieron una mejora significativa en la permeación del fármaco.

Contrariamente a lo descrito en la bibliografía, el solicitante aporta pruebas de que el complejo de inclusión de riboflavina en hidroxipropil- β -ciclodextrina mejora la capacidad de permeación de córneas de la riboflavina, produciendo así una alternativa inventiva como agente fotosensibilizador con respecto a otros complejos de riboflavina-ciclodextrina y con respecto al fosfato de riboflavina utilizado actualmente que, como hidrófilo y con carga negativa, no es fácilmente absorbido por las membranas oculares.

De acuerdo con la invención, la riboflavina en forma de complejo en β -ciclodextrinas hidroxipropiladas actúa como un fotosensibilizador que se usa para realizar la reticulación mediada por riboflavina-UV de las fibras de colágeno de la córnea.

En otro aspecto, la presente invención proporciona formulaciones oftálmicas mejoradas adaptadas a la imbibición corneal asociada a la reticulación mediada por riboflavina y radiación UV de fibras de colágeno corneal que comprenden riboflavina en forma de complejo en β -ciclodextrinas hidroxipropiladas.

La composición oftálmica de acuerdo con la invención comprende además EDTA H4 (ácido etilendiamina tetraacético) y trometamina. Se sabe del documento WO2010/023705 que el EDTA, o el EDTA sódico y la trometamina forman juntos un par iónico entre el carboxilo no salificado del EDTA y la trometamina que tiene una notable capacidad de penetración de membrana. La contribución innovadora e inesperada propuesta por la presente invención, confirmada por los datos experimentales detallados a continuación, es que la liberación del anión superóxido determinada por el uso de la composición oftálmica como fotosensibilizador depende de la cantidad de EDTA en la formulación. La cantidad de anión superóxido producido aumenta a medida que aumenta la concentración de EDTA.

De acuerdo con la invención, la composición oftálmica desarrollada adecuadamente para realizar la reticulación corneal que comprende riboflavina incluida en ciclodextrinas es más eficaz debido a su capacidad para producir una mayor cantidad de anión superóxido que la formulación de la técnica anterior que comprende fosfato de riboflavina en proporción equimolar.

La presencia de EDTA H4 mejora notablemente la capacidad de producir aniones superóxido, y dicho efecto es más marcado en la composición que contiene riboflavina en forma de complejo.

La composición oftálmica de acuerdo con la invención comprende:

- complejo de riboflavina/hidroxipropil- β -ciclodextrina a una concentración entre 2 y 3 % en peso, preferiblemente entre 2,5 y 2,9 % en peso, más preferiblemente 2,7 % en peso;
- una cantidad de EDTA, o una de sus sales, en el rango de 0,05-0,25 % en peso total, preferiblemente EDTA, o su sal, está en el rango de 0,08-0,22 % en peso total;
- una cantidad de trometamina que varía de 0,12 a 0,3 % en peso total, preferiblemente de 0,134 a 0,285 % en peso total.

En una realización particularmente preferida, la composición oftálmica comprende EDTA H4 0,08-0,22 % en peso total, incluso más preferiblemente la cantidad de EDTA H4 es 0,1 % del peso total de la composición.

La presencia de trometamina también garantiza que la formulación esté adecuadamente tamponada para alcanzar el valor de pH óptimo de la composición que varía entre 6,0 y 7,3, preferiblemente entre 6,6 y 7,2.

Cabe señalar que la composición oftálmica puede ser hipotónica, isotónica o incluso hipertónica debido a la adición

adicional y eventual de osmolito suficiente, como sales u otros agentes adecuados, para lograr el valor de osmolaridad deseado, dependiendo del sistema en el que se encuentre la composición al que se aplica.

La composición oftálmica de acuerdo con la invención comprende además principios activos, agentes tamponantes, conservantes, vehículos, diluyentes, excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones oftálmicas de la presente invención se pueden preparar en forma técnica de colirios, gotas oftálmicas, enjuagues oculares, pomadas y, en cualquier caso, en todas las formas técnicas farmacéuticas que permitan una aplicación corneal según las técnicas conocidas.

La característica técnica de la composición de acuerdo con la invención permite mejorar el rendimiento de la composición de la técnica anterior superando el inconveniente relativo debido al anión fosfato de riboflavina. De hecho, en la técnica anterior, las composiciones oftálmicas dedicadas a realizar la reticulación corneal con el uso de fosfato de riboflavina garantizan un nivel aceptable de solubilidad de la molécula de riboflavina, de lo contrario no son solubles, pero se sabe que el fosfato de riboflavina afecta adversamente a la estabilidad y la fotodegradación, influyendo en la producción de ROS y en la vía de la reticulación corneal. Por lo tanto, el uso de una riboflavina en forma de complejo en las ciclodextrinas, y en particular en HP- β -ciclodextrinas, manteniendo un buen nivel de solubilidad y una capacidad mejorada para producir ROS, puede ser un agente alternativo y más eficiente para el uso en el procedimiento terapéutico de reticulación que permite modificar los parámetros de la reticulación, la modalidad y el tiempo de aplicación para lograr un mejor cumplimiento para el paciente.

A continuación se proporcionan ejemplos proporcionados a modo de ilustración, sin que esto implique ningún límite a la presente invención. Otros aspectos, ventajas y modificaciones dentro del ámbito de la invención serán evidentes para los expertos en la materia a los que pertenece la invención.

A continuación se presentan las formulaciones; la dosificación de los componentes individuales se expresa en porcentaje en peso.

Formulación 1	
Ingredientes	% p/p
Complejo riboflavina/HP- β -ciclodextrina	2,7
en la que: Riboflavina	0,1
HP- β -ciclodextrina	2,6
Trometamina	0,134
EDTA H4	0,1
Agua destilada	Hasta 100 g
pH	6,6

Formulación 2	
Ingredientes	% p/p
Complejo riboflavina/HP- β -ciclodextrina	2,7
en la que: Riboflavina	0,1
HP- β -ciclodextrina	2,6
Trometamina	0,138
EDTA H4	0,1
Agua destilada	Hasta 100 g
pH	6,8

Formulación 3	
Ingredientes	% p/p
Complejo riboflavina/HP- β -ciclodextrina	2,7
en la que: Riboflavina	0,1
HP- β -ciclodextrina	2,6
Trometamina	0,142
EDTA H4	0,1
Agua destilada	Hasta 100 g
pH	7,0

Formulación 4	
Ingredientes	% p/p
Complejo riboflavina/HP- β -ciclodextrina	2,7
en la que: Riboflavina	0,1
HP- β -ciclodextrina	2,6
Trometamina	0,150

Formulación 4	
Ingredientes	% p/p
EDTA H4	0,1
Agua destilada	Hasta 100 g
pH	7,2

Formulación 5	
Ingredientes	% p/p
Complejo riboflavina/HP- β -ciclodextrina	2,7
en la que: Riboflavina	0,1
HP- β -ciclodextrina	2,6
Trometamina	0,235
EDTA H4	0,2
Agua destilada	Hasta 100 g
pH	6,6

Formulación 6	
Ingredientes	% p/p
Complejo riboflavina/HP- β -ciclodextrina	2,7
en la que: Riboflavina	0,1
HP- β -ciclodextrina	2,6
Trometamina	0,242
EDTA H4	0,2
Agua destilada	Hasta 100 g
pH	6,8

Formulación 7	
Ingredientes	% p/p
Complejo riboflavina/HP- β -ciclodextrina	2,7
en la que: Riboflavina	0,1
HP- β -ciclodextrina	2,6
Trometamina	0,260
EDTA H4	0,2
Agua destilada	Hasta 100 g
pH	7,0

Formulación 8	
Ingredientes	% p/p
Complejo riboflavina/HP- β -ciclodextrina	2,7
en la que: Riboflavina	0,1
HP- β -ciclodextrina	2,6
Trometamina	0,134
EDTA H4	0,1
Agua destilada	Hasta 100 g
pH	7,2

5 La composición oftálmica de acuerdo con la invención se esteriliza de acuerdo con un procedimiento estándar conocido por los expertos, preferiblemente por filtración o por calentamiento a 121°C, 1 atm, durante 10-15 minutos.

10 PARTE EXPERIMENTAL

Los datos de los estudios experimentales que muestran las principales ventajas al usar el complejo de riboflavina/HP- β -ciclodextrina y la composición oftálmica que comprende dicho complejo de inclusión para realizar la reticulación corneal realizada por el solicitante se presentan a continuación. El trabajo experimental estuvo enfocado a:

1. comparar la estabilidad del complejo de riboflavina/HP- β -ciclodextrina con respecto al fosfato de riboflavina a diferentes valores de pH;
2. determinar y comparar la capacidad de producir ROS de riboflavina en el complejo HP- β -ciclodextrina con respecto al fosfato de riboflavina;
3. evaluar la capacidad del complejo de riboflavina/HP- β -ciclodextrina de permear córneas de conejo *ex vivo*.
4. comparar la capacidad del complejo de riboflavina/HP- β -ciclodextrina frente al complejo de riboflavina/ β -ciclodextrina en córneas de conejo de permear córneas de conejo *ex vivo*.

ESTUDIO 1 - Comparación de la estabilidad del complejo de riboflavina/HP- β -ciclodextrina con respecto al fosfato de riboflavina a diferentes valores de pH.

Preparación del complejo de inclusión de riboflavina y soluciones de control

Para la inclusión de riboflavina en HP- β -ciclodextrina, se disolvieron 100 mg de riboflavina en 200 ml de agua destilada mediante agitación magnética durante la noche.

Se añadieron 2,6 g de HP- β -ciclodextrina y se disolvieron a 70 °C mediante rotavapor durante al menos 8 horas.

La mezcla y el calentamiento en rotavapor se repitieron dos veces más. Se obtuvo una solución transparente de color amarillo intenso.

La composición del complejo de riboflavina-HP- β ciclodextrina así obtenida se proporciona en la tabla a continuación.

Composición diluida	Cantidad en g	% p/v
Riboflavina	0,100	0,05
HP- β -ciclodextrina	2,6	1,3
Agua destilada	200	

La solución de riboflavina incluida en HP- β -ciclodextrina se liofilizó y el producto amarillo obtenido se utilizó para fabricar composiciones de colirio de acuerdo con las formulaciones 1 a 8 como se describió anteriormente para probarse en los siguientes experimentos descritos. Dichas formulaciones se compararon con composiciones de control que tienen el mismo pH, que comprenden la misma cantidad de EDTA H4 y trometamina y en las que la riboflavina en forma de complejo se reemplazó por fosfato de riboflavina. Las formulaciones relativas se dan a continuación.

Formulación 1 c	
Ingredientes	% p/p
Fosfato de riboflavina	0,126
Trometamina	0,134
EDTA H4	0,1
Agua destilada	Hasta 100 g
pH	6,6

Formulación 2 c	
Ingredientes	% p/p
Fosfato de riboflavina	0,126
Trometamina	0,138
EDTA H4	0,1
Agua destilada	Hasta 100 g
pH	6,8

Formulación 3 c	
Ingredientes	% p/p
Fosfato de riboflavina	0,126
Trometamina	0,142
EDTA H4	0,1
Agua destilada	Hasta 100 g
pH	7,0

Formulación 4 c	
Ingredientes	% p/p
Fosfato de riboflavina	0,126
Trometamina	0,150
EDTA H4	0,1
Agua destilada	Hasta 100 g
pH	7,2

Formulación 5 c	
Ingredientes	% p/p
Fosfato de riboflavina	0,126
Trometamina	0,235

Formulación 5 c	
Ingredientes	% p/p
EDTA H4	0,2
Agua destilada	Hasta 100 g
pH	6,6

Formulación 6 c	
Ingredientes	% p/p
Fosfato de riboflavina	0,126
Trometamina	0,242
EDTA H4	0,2
Agua destilada	Hasta 100 g
pH	6,8

Formulación 7 c	
Ingredientes	% p/p
Fosfato de riboflavina	0,126
Trometamina	0,260
EDTA H4	0,2
Agua destilada	Hasta 100 g
pH	7,0

Formulación 8 c	
Ingredientes	% p/p
Fosfato de riboflavina	0,126
Trometamina	0,280
EDTA H4	0,2
Agua destilada	Hasta 100 g
pH	7,2

- 5 Todas las composiciones de riboflavina, tanto en forma de complejos como de control (1-8 y 1C-8C) se esterilizaron con vapor de acuerdo con el método estándar conocido por los expertos en el campo (temperatura: 121 °C; presión: 1 atm; tiempo: al menos 20 minutos).

- 10 Para la inclusión de riboflavina en β -ciclodextrina, se siguió el mismo protocolo que para la inclusión en HP- β -ciclodextrina: se disolvieron 100 mg de riboflavina en 200 ml de agua destilada por agitación magnética durante la noche. Se añadieron 2,6 g de β -ciclodextrina y se disolvieron a 70 °C mediante rotavapor durante al menos 8 horas.

La mezcla y el calentamiento en rotavapor se repitieron dos veces más. Se obtuvo una solución transparente de color amarillo intenso.

- 15 La composición del complejo de riboflavina- β ciclodextrina así obtenida se proporciona en la tabla a continuación.

Composición diluida	Cantidad en g	% p/v
Riboflavina	0,100	0,05
β -ciclodextrina	2,6	1,3
Agua destilada	200	

- 20 La solución de riboflavina incluida en β -ciclodextrina se liofilizó y el producto amarillo obtenido se utilizó para fabricar las composiciones oftálmicas.

Composición diluida	Cantidad en g	% p/v
Riboflavina	0,100	3,7
β -ciclodextrina	2,6	96,3
Peso total de la inclusión	2,7	

La formulación de las composiciones oftálmicas que comprenden el complejo riboflavina- β -ciclodextrina se presenta en la siguiente tabla.

25

Ingredientes		% p/p	%
Complejo riboflavina/ β -ciclodextrina		2,7	
en la que:			
	Riboflavina	0,1	0,1
	β -ciclodextrina	2,6	2,6

Ingredientes	% p/p	%
Trometamina	0,134	0,134
EDTA H4	0,1	0,1
Agua destilada	Hasta 100 g	
pH	6,8	

El complejo riboflavina/ β -ciclodextrina en polvo se disuelve inicialmente en la solución, pero en aproximadamente una hora, el producto precipita. Este comportamiento es probablemente debido a la poca solubilidad de la β -ciclodextrina en agua, o más concretamente, a la menor solubilidad de la β -ciclodextrina que la de la HP- β -ciclodextrina. La solubilización completa del complejo riboflavina/ β -ciclodextrina diluyendo el producto dos veces hasta obtener respectivamente una concentración final de riboflavina de 0,050 % y una concentración final de ciclodextrina β de 1,2 % confirma la hipótesis.

A continuación se presentan las formulaciones y las características principales de las dos composiciones oftálmicas que comprenden complejo de riboflavina/ β -ciclodextrina que en la condición experimental han mostrado una buena estabilidad.

Ingredientes	Cantidad en g	% p/p
Complejo riboflavina/ β -ciclodextrina en la que: Riboflavina β -ciclodextrina	2,7	0,050 1,30
Trometamina	0,134	0,134
EDTA H4	0,1	0,1
Agua destilada	Hasta 100 g	
Osmolalidad		26
pH antes de la esterilización		7,4
Esterilización con vapor 20 min, 1 atm, 121 °C		
pH después de la esterilización		7,0

Ingredientes	Cantidad en g	% p/p
Complejo riboflavina/ β -ciclodextrina en la que: Riboflavina β -ciclodextrina	2,7	0,050 1,30
Trometamina	0,268	0,268
EDTA H4	0,20	0,20
Agua destilada	Hasta 100 g	
Osmolalidad		35
pH antes de la esterilización		7,0
Esterilización con vapor 20 min, 1 atm, 121 °C		
pH después de la esterilización		7,0

Determinación del título de riboflavina

La determinación del título de riboflavina antes y después de la esterilización se evaluó de acuerdo con el método estándar, los resultados se muestran en las tablas a continuación.

Tabla 1 - Título de riboflavina en las composiciones 1-8 que comprenden un complejo de inclusión de riboflavina y HP- β -ciclodextrina.

Composición	Características técnicas	Esterilización	Riboflavina % en peso
1	Complejo de inclusión de riboflavina y HP- β -ciclodextrina (0,1 % p/p-2,6 % p/p), EDTAH4 0,1 % p/p, Tris 0,134 %, pH 6,6	20 min, 1 atm, 121 °C	89,0
2	Complejo de inclusión de riboflavina y HP- β -ciclodextrina (0,1 % p/p-2,6 % p/p), EDTAH4 0,1 % p/p, Tris 0,138 %, pH 6,8	20 min, 1 atm, 121 °C	89,0
3	Complejo de inclusión de riboflavina y HP- β -ciclodextrina (0,1 % p/p-2,6 % p/p), EDTAH4 0,1 % p/p, Tris 0,142 %, pH 7,0	20 min, 1 atm, 121 °C	91,9

Composición	Características técnicas	Esterilización	Riboflavina % en peso
4	Complejo de inclusión de riboflavina y HP- β -ciclodextrina (0,1 % p/p-2,6 % p/p), EDTAH4 0,1 % p/p, Tris 0,150 %, pH 7,2	20 min, 1 atm, 121 °C	93,9
4	Complejo de inclusión de riboflavina y HP- β -ciclodextrina (0,1 % p/p-2,6 % p/p), EDTAH4 0,1 % p/p, Tris 0,150 %, pH 7,2	no	98,0
5	Complejo de inclusión de riboflavina y HP- β -ciclodextrina (0,1 % p/p-2,6 % p/p), EDTAH4 0,2 % p/p, Tris 0,235 %, pH 6,6	20 min, 1 atm, 121 °C	96,0
6	Complejo de inclusión de riboflavina y HP- β -ciclodextrina (0,1 % p/p-2,6 % p/p), EDTAH4 0,2 % p/p, Tris 0,242 %, pH 6,8	20 min, 1 atm, 121 °C	79,2
7	Complejo de inclusión de riboflavina y HP- β -ciclodextrina (0,1 % p/p-2,6 % p/p), EDTAH4 0,2 % p/p, Tris 0,260 %, pH 7,0	20 min, 1 atm, 121 °C	78,6
8	Complejo de inclusión de riboflavina y HP- β -ciclodextrina (0,1 % p/p-2,6 % p/p), EDTAH4 0,2 % p/p, Tris 0,280 %, pH 7,2	20 min, 1 atm, 121 °C	79,0
8	Complejo de inclusión de riboflavina y HP- β -ciclodextrina (0,1 % p/p-2,6 % p/p), EDTAH4 0,2 % p/p, Tris 0,280 %, pH 7,2	no	98,0

Tabla 2 - Título de riboflavina en las composiciones 1C-8C que comprenden fosfato de riboflavina en solución acuosa

Composición	Características técnicas	Esterilización	Riboflavina % en peso
1C	Fosfato de riboflavina 0,126 % p/p, EDTAH4 0,1 % p/p, Tris 0,134 %, pH 6,6	20 min, 1 atm, 121 °C	98,5
2C	Fosfato de riboflavina 0,126 % p/p, EDTAH4 0,1 % p/p, Tris 0,138 %, pH 6,8	20 min, 1 atm, 121 °C	98,2
3C	Fosfato de riboflavina 0,126 % p/p, EDTAH4 0,1 % p/p, Tris 0,142 %, pH 7,0	20 min, 1 atm, 121 °C	95,4
4C	Fosfato de riboflavina 0,126 % p/p, EDTAH4 0,1 % p/p, Tris 0,150 %, pH 7,2	20 min, 1 atm, 121 °C	96,4
4C	Fosfato de riboflavina 0,126 % p/p, EDTAH4 0,1 % p/p, Tris 0,150 %, pH 7,2	no	100
5C	Fosfato de riboflavina 0,126 % p/p, EDTAH4 0,2 % p/p, Tris 0,235 %, pH 6,6	20 min, 1 atm, 121 °C	96,1
6C	Fosfato de riboflavina 0,126 % p/p, EDTAH4 0,2 % p/p, Tris 0,242 %, pH 6,8	20 min, 1 atm, 121 °C	100
7C	Fosfato de riboflavina 0,126 % p/p, EDTAH4 0,2 % p/p, Tris 0,260 %, pH 7,0	20 min, 1 atm, 121 °C	96,5
8C	Fosfato de riboflavina 0,126 % p/p, EDTAH4 0,2 % p/p, Tris 0,280 %, pH 7,2	20 min, 1 atm, 121 °C	98,9
8C	Fosfato de riboflavina 0,126 % p/p, EDTAH4 0,2 % p/p, Tris 0,134 %, pH 7,2	no	98,5

- 5 El marco relativo a la estabilidad de la riboflavina incluida en la HP- β -ciclodextrina se completa con la Tabla 3, donde se presentan los datos del porcentaje de riboflavina después de la esterilización durante tiempos prolongados a 121 °C en diferentes condiciones.

Tabla 3 - Estabilidad de la riboflavina en la inclusión de HP- β -ciclodextrina en diferentes condiciones.

En presencia de EDTAH4-Trometamina (EDTAH4 0,1 % p/p, Tris 0,134 %)		
Características técnicas	Esterilización	Riboflavina % en peso
Complejo de inclusión riboflavina y HP- β -ciclodextrina (0,1 % p/p-2,6 % p/p)	20 min, 1 atm, 121 °C	89,3
Complejo de inclusión riboflavina y HP- β -ciclodextrina (0,1 % p/p-2,6 % p/p)	30 min, 1 atm, 121 °C	88,88
Complejo de inclusión riboflavina y HP- β -ciclodextrina (0,1 % p/p-2,6 % p/p)	45 min, 1 atm, 121 °C	82,6

En presencia de EDTAH4-Trometamina (EDTAH4 0,1 % p/p, Tris 0,134 %)		
Características técnicas	Esterilización	Riboflavina % en peso
En presencia de EDTAH4 (0,1 % p/p), Tris (0,05 % p/p) y tampón fosfato (Na_2HPO_4 0,150 % p/p – NaH_2PO_4 0,122 % p/p)		
Características técnicas	Esterilización	Riboflavina % en peso
Complejo de inclusión riboflavina y HP- β -ciclodextrina (0,1 % p/p-2,6 % p/p)	20 min, 1 atm, 121 °C	52,8
Complejo de inclusión riboflavina y HP- β -ciclodextrina (0,1 % p/p-2,6 % p/p)	30 min, 1 atm, 121 °C	41,9
Complejo de inclusión riboflavina y HP- β -ciclodextrina (0,1 % p/p-2,6 % p/p)	45 min, 1 atm, 121 °C	32,2
En presencia de tampón fosfato (Na_2HPO_4 0,150 % p/p – NaH_2PO_4 0,122 % p/p)		
Características técnicas	Esterilización	Riboflavina % en peso
Complejo de inclusión riboflavina y HP- β -ciclodextrina (0,1 % p/p-2,6 % p/p)	20 min, 1 atm, 121 °C	56,6
Complejo de inclusión riboflavina y HP- β -ciclodextrina (0,1 % p/p-2,6 % p/p)	30 min, 1 atm, 121 °C	46,5
Complejo de inclusión riboflavina y HP- β -ciclodextrina (0,1 % p/p-2,6 % p/p)	45 min, 1 atm, 121 °C	35,4
En presencia de tampón borato (tetraborato sódico 1,40 % p/p – ácido bórico 0,125 % p/p)		
Características técnicas	Esterilización	Riboflavina % en peso
Complejo de inclusión riboflavina y HP- β -ciclodextrina (0,1 % p/p-2,6 % p/p)	20 min, 1 atm, 121 °C	72,4
En presencia de agua destilada		
Características técnicas	Esterilización	Riboflavina % en peso
Complejo de inclusión riboflavina y HP- β -ciclodextrina (0,1 % p/p-2,6 % p/p)	20 min, 1 atm, 121 °C	99,1
Complejo de inclusión riboflavina y HP- β -ciclodextrina (0,1 % p/p-2,6 % p/p)	30 min, 1 atm, 121 °C	97,8
Complejo de inclusión riboflavina y HP- β -ciclodextrina (0,1 % p/p-2,6 % p/p)	45 min, 1 atm, 121 °C	96,6

La estabilidad del fosfato de riboflavina en las composiciones oftálmicas de control para el uso en la reticulación corneal, después de la esterilización durante tiempos prolongados a 121 °C y en diferentes condiciones, se muestra en la Tabla 4.

5

Tabla 4 - Estabilidad del fosfato de riboflavina en diferentes condiciones.

En presencia de EDTAH4 (0,1 % p/p), Tris (0,05 % p/p) y tampón fosfato (Na_2HPO_4 0,150 % p/p – NaH_2PO_4 0,122 % p/p)		
Características técnicas	Esterilización	Riboflavina % en peso
Fosfato de riboflavina (0,1 % p/p-2,6 % p/p)	20 min, 1 atm, 121 °C	67,0
Fosfato de riboflavina (0,1 % p/p-2,6 % p/p)	30 min, 1 atm, 121 °C	60,0
Fosfato de riboflavina (0,1 % p/p-2,6 % p/p)	45 min, 1 atm, 121 °C	50,0
En presencia de tampón fosfato (Na_2HPO_4 0,150 % p/p – NaH_2PO_4 0,122 % p/p)		
Características técnicas	Esterilización	Riboflavina % en peso
Fosfato de riboflavina (0,1 % p/p-2,6 % p/p)	20 min, 1 atm, 121 °C	65,0
Fosfato de riboflavina (0,1 % p/p-2,6 % p/p)	30 min, 1 atm, 121 °C	40,0
Fosfato de riboflavina (0,1 % p/p-2,6 % p/p)	45 min, 1 atm, 121 °C	39,0
En presencia de tampón borato (tetraborato sódico 1,40 % p/p – ácido bórico 0,125 % p/p)		
Características técnicas	Esterilización	Riboflavina % en peso
Fosfato de riboflavina (0,1 % p/p-2,6 % p/p)	20 min, 1 atm, 121 °C	68,0
En presencia de agua destilada		
Características técnicas	Esterilización	Riboflavina % en peso
Fosfato de riboflavina (0,1 % p/p-2,6 % p/p)	20 min, 1 atm, 121 °C	95,0
Fosfato de riboflavina (0,1 % p/p-2,6 % p/p)	30 min, 1 atm, 121 °C	92,0

En presencia de EDTAH4 (0,1 % p/p), Tris (0,05 % p/p) y tampón fosfato (Na_2HPO_4 0,150 % p/p – NaH_2PO_4 0,122 % p/p)		
Fosfato de riboflavina (0,1 % p/p-2,6 % p/p)	45 min, 1 atm, 121 °C	90,0

ESTUDIO 2 - Determinación de la capacidad para producir ROS por la riboflavina incluida en HP- β -ciclodextrina.

- 5 La comparación de la capacidad de producir ROS de las composiciones que comprenden fosfato de riboflavina y complejo de inclusión de riboflavina en HP- β -ciclodextrina se llevó a cabo mediante un método para medir los radicales de oxígeno después de la reducción del nitroazul de tetrazolio (NTB) a azul de Formazán.

- 10 La justificación del método se basa en el hecho de que algunas moléculas orgánicas, tanto naturales como sintéticas, cuando se irradian con una longitud de onda particular, se activan y, al interactuar con el oxígeno, producen un anión superóxido. Concretamente, la molécula de riboflavina (fotoactivador) irradiada a 366 nm reacciona con el oxígeno, se produce un anión superóxido que reduce el NBT (detector) a azul de Formazán, dando como resultado una variación de color de amarillo a azul, la intensidad del color azul se detecta a 560 nm. Como la cantidad de anión superóxido producido se correlaciona con la cantidad de NBT reducido, a partir de la tasa de absorción de NBT reducido se obtiene la cantidad de ROS, por lo que la producción de ROS se puede expresar como función del tiempo de irradiación (minutos).

- 20 La medición de ROS se realiza mediante una cámara de fotoactivación que permite irradiar en condiciones controladas las soluciones de fotoactivador y detector. Los parámetros controlados son especificidad de emisión, radiancia uniforme, intensidad de irradiación, tiempo de irradiación.

Configuración de las condiciones experimentales y preparación de composiciones de control.

Las composiciones de control experimentales se prepararon como se describe a continuación:

25

Solución madre de fotoactivador:	
Solución madre de fosfato de riboflavina dihidrato	
Ingredientes	% p/p
5'-monofosfato de riboflavina sódica dihidrato	0,147
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,685
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,285
Agua destilada	Hasta 100 g
pH	7,2

Solución madre de detector:	
Solución madre de NBT	
Ingredientes	
Nitroazul de tetrazolio	61,27 mg
Agua destilada	30 ml

- 30 5'-(dihidrógenofosfato) de riboflavina, sal monosódica, muestra de control deshidratada (fotoactivador):

Se mezclaron tres mililitros de solución madre de 5'-(dihidrógenofosfato) de riboflavina, sal monosódica con 1 ml de agua destilada.

- 35 Muestra de control NBT (detector):

Un mililitro de solución madre de NBT se mezcló con 3 ml de agua destilada.

Muestra de referencia:

- 40 Se mezclaron tres mililitros de solución madre de 5'-(dihidrógenofosfato) de riboflavina, sal monosódica (fotoactivador) con 1 ml de solución madre de NBT (detector).

- 45 El 5'-(dihidrógenofosfato) de riboflavina, sal monosódica, la muestra de control, la muestra de control NBT y la muestra de referencia se irradian a diferentes intensidades de luz incidente ($99 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, $223 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, $633 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) (366 nm de longitud de onda) en la cámara de fotoactivación, y se registra la absorbancia a 560 nm. Durante la irradiación se midió la temperatura de las soluciones. Al final de las mediciones, la temperatura de la solución resultó haber aumentado en 0,8 °C para una mayor intensidad de luz de irradiación incidente. Por lo tanto, razonablemente el efecto de la temperatura es marginal en estas medidas de absorbancia.

- 50 La variación de la absorbancia a 560 nm para las tres muestras se presenta en las siguientes tablas.

Tabla 5 - Variación de la absorbancia del 5'-(dihidrógeno fosfato) de riboflavina, sal monosódica, muestra de control

Tiempo min	Intensidad de luz incidente 99 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ Absorbancia a 560 nm	Intensidad de luz incidente 223 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ Absorbancia a 560 nm	Intensidad de luz incidente 633 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ Absorbancia a 560 nm
0	0,008	0,008	0,008
2	0,009	0,009	0,010
4	0,009	0,010	0,013
6	0,009	0,012	0,014
8	0,009	0,012	0,015
10	0,010	0,014	0,015
12	0,010	0,014	0,016
14	0,010	0,015	0,018
16	0,010	0,016	0,019

Resultados

- 5 La irradiación de la solución que comprende solo fosfato de riboflavina no causa un cambio apreciable de la absorción. Esta tendencia se confirma a diferentes intensidades de luz.

Tabla 6 - Variación de la absorbancia de la muestra de control NBT

Tiempo min	Intensidad de luz incidente 99 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ Absorbancia a 560 nm	Intensidad de luz incidente 223 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ Absorbancia a 560 nm	Intensidad de luz incidente 633 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ Absorbancia a 560 nm
0	0,002	0,002	0,002
2	0,002	0,002	0,002
4	0,002	0,002	0,003
6	0,002	0,002	0,003
8	0,002	0,003	0,004
10	0,002	0,003	0,004
12	0,002	0,003	0,005
14	0,002	0,003	0,005
16	0,002	0,004	0,005

10 Resultados

La irradiación de la solución que comprende solo NBT no causa un cambio apreciable de la absorción. Esta tendencia se confirma a diferentes intensidades de luz.

15 Tabla 7 - Variación de la absorbancia de la muestra de referencia (Fosfato de riboflavina + NTB)

Tiempo min	Intensidad de luz incidente 99 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ Absorbancia a 560 nm	Intensidad de luz incidente 223 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ Absorbancia a 560 nm	Intensidad de luz incidente 633 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ Absorbancia a 560 nm
0	0,008	0,008	0,008
2	0,027	0,043	0,090
4	0,044	0,085	0,189
6	0,066	0,120	0,299
8	0,088	0,152	0,417
10	0,112	0,192	0,533
12	0,135	0,214	0,645
14	0,160	0,234	0,738
16	0,184	0,257	0,816
Δ absorbancia en 16 min	0,176	0,249	0,808
Anión superóxido μM en 16 min	46,9	66,4	215,4
Anión superóxido $\mu\text{M}/\text{min}$	2,93	4,15	13,46
μM Anión superóxido $\text{min}/\mu\text{W}/\text{cm}^2$	0,029	0,018	0,021

Resultados

La irradiación de la solución que comprende la muestra de referencia con fosfato de riboflavina y NBT provoca un

cambio apreciable de la absorción. Esta tendencia se confirma a diferentes intensidades de luz y es proporcional en la solución irradiada a mayor potencia.

1. La muestra de referencia irradiada produce ROS, la producción de aniones superóxido en 16 minutos determina un cambio considerable de absorbancia;
2. La producción de ROS es proporcional a la intensidad de la luz incidente y aumenta al aumentar la potencia de la luz.
3. La producción de ROS expresada como cantidad de superóxido de anión por minuto y por unidad de intensidad de irradiación ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$) es bastante similar a las tres intensidades de luz aplicadas, por lo tanto, en el experimento llevado a cabo, las concentraciones de fosfato de riboflavina y NBT están en la proporción correcta.

El resultado se muestra gráficamente en la figura 1.

Capacidad de producir ROS por composición que comprende complejo de inclusión de riboflavina y HP- β -ciclodextrina - comparación con la composición que comprende fosfato de riboflavina.

Para comparar la capacidad de producir ROS se prepararon las siguientes composiciones:

A. En tampón fosfato

Muestra 1	
Ingredientes	% p/p
5'-monofosfato de riboflavina sódica dihidrato	0,147
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,067
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,285
Agua destilada	Hasta 100 g
pH	7,2

Muestra 2	
Ingredientes	% p/p
Complejo de riboflavina-HP- β -ciclodextrina que corresponde a riboflavina	2,7 0,1
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,067
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,285
Agua destilada	Hasta 100 g
pH	7,2

Las dos muestras se irradiaron en la cámara de fotoactivación a $99 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ de luz incidente, y la absorbancia a 560 nm se registró de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente. Los resultados de la medición de la absorbancia relativa se muestran en la tabla 8: La representación gráfica se muestra en la figura 2.

Tabla 8 - Comparación de la absorbancia en presencia de tampón fosfato

Tiempo min	Muestra 1	Muestra 2
0	0,008	0,008
2	0,027	0,096
4	0,044	0,156
6	0,066	0,222
8	0,088	0,291
10	0,112	0,365
12	0,135	0,434
14	0,160	0,507
16	0,184	0,674
Anión superóxido μM en 16 min	48,96	179,68
Anión superóxido $\mu\text{M}/\text{min}$	3,06	11,23
μM Anión superóxido $\text{min}/\mu\text{W}/\text{cm}^2$	0,0309	0,133

Resultados

La comparación entre la muestra 1 y la muestra 2 muestra que, en el tampón fosfato, la muestra 2 que comprende

riboflavina incluida en ciclodextrinas produce una cantidad de anión superóxido superior a 3,68 veces la cantidad de anión superóxido producida por la muestra 1 que contiene fosfato de riboflavina.

El resultado demuestra que la riboflavina formando complejo con las ciclodextrinas no solo tiene la capacidad de producir anión superóxido, sino que dicha capacidad es significativamente mayor que la que tiene la relación equimolar de fosfato de riboflavina.

Cabe destacar que las dos composiciones comprenden una cantidad equimolar de riboflavina, por lo tanto, cualquier diferencia en la producción de anión superóxido se debe a una reactividad diferente relacionada con diferentes características técnicas de las dos composiciones.

B. En presencia de EDTA H4 0,1 % p/p - trometamina 0,134 % p/p.

Muestra 3	
Ingredientes	% p/p
5'-monofosfato de riboflavina sódica.2H ₂ O	0,147
EDTA H4	0,1
Trometamina	0,135
Agua destilada	Hasta 100 g

Muestra 4	
Ingredientes	% p/p
Complejo de riboflavina-HP-β-ciclodextrina que corresponde a riboflavina	2,7 0,1
EDTA H4	0,1
Trometamina	0,135
Agua destilada	Hasta 100 g

Las dos muestras se irradiaron en la cámara de fotoactivación a 99 μW/cm² de luz incidente y la longitud de onda de 366 nm y la absorbancia a 560 nm se registró de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente. Los resultados de la medición de la absorbancia relativa se muestran en la tabla 9: La representación gráfica se muestra en la Figura 3.

Tabla 9 - Comparación de la absorbancia en presencia de EDTA H4 0,1 % p/p/trometamina 0,134 % p/p

Tiempo min	Muestra 3	Muestra 4
0	0,008	0,008
2	0,404	1,060
4	0,841	2,149
6	1,253	2,895
8	1,549	fuera de rango
10	2,065	fuera de rango
12	2,389	fuera de rango
14	2,689	fuera de rango
16	0,184	fuera de rango
Anión superóxido μM en 16 min	717066	772000
Anión superóxido μM/min	44816	128667
μM Anión superóxido min/μW/cm ²	0,450	1,299

Resultados

La comparación entre la muestra 3 y la muestra 4 muestra que en presencia de EDTA 0,1 % y trometamina 0,135 % (p/p) la muestra 4 que comprende riboflavina incluida en ciclodextrinas produce 2,87 veces la cantidad de anión superóxido que la muestra 3 que comprende la fracción equimolar de fosfato de riboflavina que no forma complejos.

El resultado demuestra que la riboflavina en forma de complejos en ciclodextrinas no solo tiene la capacidad de producir anión superóxido (como ya se demostró en el punto A en el tampón fosfato), sino que dicha capacidad es significativamente mayor que la ejercida por la muestra 2.

Cabe destacar que en las muestras 2 y 4 el contenido de riboflavina es el mismo; las dos muestras difieren en la presencia de tampón fosfato (muestra 2) y EDTA - trometamina (muestra 4), por lo tanto, la presencia de EDTA H4 y

trometamina aumenta más de $11 \cdot 10^4$ veces la capacidad de la riboflavina en forma de complejos para producir ROS. Además, la presencia de tampón fosfato en la composición disminuye la capacidad de producir aniones superóxido.

- 5 C. En presencia de EDTA H4 0,2 % p/p - trometamina 0,235 % p/p.

Muestra 5	
Ingredientes	% p/p
5'-monofosfato de riboflavina sódica.2H ₂ O	0,147
EDTA H4	0,2
Trometamina	0,235
Agua destilada	Hasta 100 g

Muestra 6	
Ingredientes	% p/p
Complejo de riboflavina-HP-β-ciclodextrina que corresponde a riboflavina	2,7 0,1
EDTA H4	0,2
Trometamina	0,235
Agua destilada	Hasta 100 g

- 10 Las dos muestras se irradiaron en la cámara de fotoactivación a $99 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ de luz incidente a 366 nm de longitud de onda y la absorbancia a 560 nm se registró de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente. Los resultados de la medición de la absorbancia relativa se muestran en la tabla 10: La representación gráfica se muestra en la figura 4.

15 Tabla 10 - Comparación de la absorbancia en presencia de EDTA H4 0,2 % p/p/trometamina 0,235 % p/p

Tiempo min	Muestra 5	Muestra 6
0	0,008	0,008
2	0,544	1,072
4	1,109	2,125
6	1,511	2,900
8	1,945	fuera de rango
10	2,080	fuera de rango
12	2,305	fuera de rango
14	2,800	fuera de rango
16	3,051	fuera de rango
Anión superóxido μM en 16 min	813600	773328
Anión superóxido $\mu\text{M}/\text{min}$	50850	128888
μM Anión superóxido $\text{min}/\mu\text{W}/\text{cm}^2$	0,514	1,302

Resultados

- 20 La comparación entre la muestra 5 y la muestra 6 muestra que en presencia de EDTA 0,2 % y trometamina 0,235 % (p/p), la muestra 6 que comprende riboflavina incluida en ciclodextrinas produce 2,53 veces la cantidad de anión superóxido que la muestra 5 que comprende fosfato de riboflavina que no forma complejos.

- 25 El experimento descrito en el punto A-C se repitió usando fotoactivación a $633 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ de intensidad de luz incidente. Los resultados de las mediciones de absorbancia se muestran en la tabla 11 - 13 y se muestran gráficamente en las Figuras 5-7.

Tabla 11 - Comparación de la absorbancia en presencia de tampón fosfato

Tiempo min	Muestra 1	Muestra 1
0	0,008	0,008
2	0,090	0,167
4	0,189	0,364
6	0,299	0,575
8	0,417	0,797
10	0,533	1,010
12	0,645	1,215
14	0,738	1,426

Tiempo min	Muestra 1	Muestra 1
16	0,816	1,630
Anión superóxido μM en 16 min	217,6	434,7
Anión superóxido $\mu\text{M}/\text{min}$	13,6	27,2
μM Anión superóxido $\text{min}/\mu\text{W}/\text{cm}^2$	0,0215	0,0429

Tabla 12 - Comparación de la absorbancia en presencia de EDTA H4 0,1 % p/p/trometamina 0,135 % p/p

Tiempo min	Muestra 3	Muestra 4
0	0,008	0,008
2	1,217	3,046
4	2,255	fuera de rango
6	3,306	fuera de rango
8	fuera de rango	fuera de rango
10	fuera de rango	fuera de rango
12	fuera de rango	fuera de rango
14	fuera de rango	fuera de rango
16	fuera de rango	fuera de rango
Anión superóxido μM al final de la reacción	881,6	812,3
Anión superóxido $\mu\text{M}/\text{min}$	146,9	406,1
μM Anión superóxido $\text{min}/\mu\text{W}/\text{cm}^2$	0,232	0,641

Tabla 13 - Comparación de la absorbancia en presencia de EDTA H4 0,2 % p/p/trometamina 0,235 % p/p

Tiempo min	Muestra 3	Muestra 4
0	0,008	0,008
2	1,710	3,068
4	3,004	fuera de rango
6	fuera de rango	fuera de rango
8	fuera de rango	fuera de rango
10	fuera de rango	fuera de rango
12	fuera de rango	fuera de rango
14	fuera de rango	fuera de rango
16	fuera de rango	fuera de rango
Anión superóxido μM al final de la reacción	801,1	818,1
Anión superóxido $\mu\text{M}/\text{min}$	133,5	409,1
μM Anión superóxido $\text{min}/\mu\text{W}/\text{cm}^2$	0,210	0,646

5

Resultados

El experimento ha demostrado que también después de la fotoactivación por $633 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ de intensidad de luz incidente, la muestra que comprende riboflavina incluida en ciclodextrinas produce un anión superóxido en mayor cantidad que la muestra que contiene fosfato de riboflavina; sin embargo, la intensidad de la luz incidente es tan alta que la reacción debe detenerse después de 4-6 minutos.

10

En conclusión, un complejo de riboflavina incluido en HP β -CD cuando se irradia con cualquier intensidad de luz (99, 223, $669 \mu\text{W}/\text{cm}^2$), tanto en presencia como en ausencia de EDTA, produce más anión superóxido que la solución de fosfato de riboflavina equimolar irradiada a la misma intensidad de luz en presencia o ausencia de EDTA.

15

ESTUDIO 3 - Determinación de la capacidad de permeación *ex vivo* en ojo de conejo. Comparación del complejo riboflavina/HP- β -ciclodextrina frente al complejo de riboflavina/ β -ciclodextrina.

Para cada punto experimental se usaron dos conejos (Nueva Zelanda, 2-2,5 kg, macho, 9 semanas) (cuatro ojos). Los conejos se anestesiaron mediante inyección intramuscular de una mezcla de clorhidrato de tiletamina y clorhidrato de zolazepam (Zoletil 100®, Virbac, Milán); a continuación los conejos se sacrificaron mediante administración intravenosa de 0,3 ml/kg de Tanax® (Intervet Italia, Milán).

20

El enucleado ocular se realizó inmediatamente después del sacrificio; los ojos explantados se colocaron verticalmente sobre un soporte adecuado; en la superficie del ojo se colocó un "anillo de silicona corneal" que actuaba como un depósito de las formulaciones de riboflavina probadas. En dicho depósito, se añade 1 ml de la

25

formulación de riboflavina a analizar.

Con el fin de identificar los parámetros óptimos de las formulaciones que tienen las características técnicas requeridas para determinar la mejor permeación de la córnea con riboflavina, se han realizado varios experimentos.

- 5 Como control, la permeación de riboflavina obtenida con una solución de riboflavina, indicada como C, (sal sódica deshidratada de fosfato de riboflavina 0,0147 % p/p, EDTA sódico 0,1 % p/p, trometamina 0,05 % p/p) se instila en los ojos durante 15 minutos seguidos por radiación UV-A durante 5 minutos y la eliminación del epitelio corneal (denominado procedimiento Epi-off) como se describe en el documento WO 2010/023705.

- 10 Las córneas explantadas se almacenan a -20 °C antes de proceder con el análisis cuantitativo por HPLC/MS-MS.

En el momento del análisis cuantitativo, las córneas de conejo se descongelaron, se pesaron, se cortaron y se homogeneizaron en hielo con Ultra-TURRAX® y luego se sonicaron en una solución de acetonitrilo:agua bidestilada (50:50) para extraer la riboflavina y finalmente se centrifugaron durante 15 minutos. Min. a 10.000 rpm y a una temperatura de 4 °C.

- 15

El análisis de HPLC/MS-MS se realizó mediante el sistema de HPLC Agilent serie 1100 acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo Agilent 6410.

- 20 Los parámetros de HPLC se presentan a continuación.

Artículo	Descripción
Columna analítica	Phenomenex, Kinetex, 4,6 x 50 mm, 2,6 µm, C8 HILIC
Precolumna	Phenomenex, Gemini-NX, 4 x 2,0 mm
Temperatura del horno de la columna	25 °C
Solución de HPLC (A)	Solución de tampón de formiato de amonio 100 mM pH 3,2
Solución de HPLC (B)	Acetonitrilo
Composición de la fase móvil	A = 10%
	B = 90%
Caudal	0,1 ml/min
Temperatura del inyector automático	+4 °C
Volumen de inyección	20 µl
Tiempos de retención	Aproximadamente 0,5 minutos
Tiempo total de ejecución	3 minutos

Espectrometría de masas

- 25 A. La detección se hace en el modo de ion positivo mediante una interfaz API/ESI y control de la reacción múltiple (MRM)

Transiciones de masa: 377 → 243 m/z para riboflavina

B. Las condiciones de operación y los parámetros de la EM se describen a continuación:

Parámetros de la EM	
Temperatura del gas	350 °C
Flujo de gas	6 l/min
Nebulizador	2,06 bar
Capilar	3500 V
Energía de colisión	30 V
Tiempo de permanencia	200 mseg
Fragmentador	160

- 30 Los experimentos llevados a cabo y las formulaciones de riboflavina probadas relativas se presentan a continuación.

Experimento 1 - Absorción corneal del complejo riboflavina/β-ciclodextrina

- 35 C - fosfato de riboflavina sal sódica deshidratada 0,0147 % p/p, EDTA sódico 0,1 % p/p, trometamina 0,05 % p/p, instilado en los ojos durante 15 minutos, seguido de irradiación UV-A durante 5 minutos y eliminación del epitelio corneal;

- 40 1 - complejo de riboflavina/β-ciclodextrina (riboflavina 0,1 % p/v, β-ciclodextrina 2,6 %) en EDTA 0,1 % p/v, trometamina 0,05 % p/v (dicha composición no es soluble, el complejo precipita);
 2 - complejo de riboflavina/β-ciclodextrina (riboflavina 0,1 % p/v, β-ciclodextrina 1,3 %) en EDTA 0,1 % p/v, trometamina 0,05 % p/v (dicha composición permanece en solución durante un breve tiempo, después de lo cual el complejo precipita);
 3 - complejo de riboflavina/β-ciclodextrina (riboflavina 0,05 % p/v, β-ciclodextrina 1,3 %) en EDTA 0,1 % p/v,

trometamina 0,05 % p/v (Figura 8).

Experimento 2 - Absorción corneal del complejo de riboflavina/HP-β-ciclodextrina

5 C - fosfato de riboflavina sal sódica deshidratada 0,0147 % p/p, EDTA sódico 0,1 % p/p, trometamina 0,05 % p/p, instilado en los ojos durante 15 minutos, seguido de irradiación UV-A durante 5 minutos y eliminación del epitelio corneal;

- 10 1 - complejo de riboflavina/HP-β-ciclodextrina (riboflavina 0,1 % p/v, HP-β-ciclodextrina 2,6 %) en EDTA H4 0,1 % p/v, trometamina 0,134 % p/v, esterilizado por filtración, pH 7,4;
2 - complejo de riboflavina/HP-β-ciclodextrina (riboflavina 0,1 % p/v, HP-β-ciclodextrina 2,6 %) en EDTA H4 0,1 % p/v, trometamina 0,134 % p/v, esterilizado a 121 °C, pH 6,8 (Figura 9).

15 Experimento 3 - Absorción corneal del complejo de riboflavina/HP-β-ciclodextrina con una concentración más baja de HP-β-ciclodextrina.

C - fosfato de riboflavina sal sódica deshidratada 0,0147 % p/p, EDTA sódico 0,1 % p/p, trometamina 0,05 % p/p, instilado en los ojos durante 15 minutos, seguido de irradiación UV-A durante 5 minutos y eliminación del epitelio corneal;

- 20 1 - complejo de riboflavina/HP-β-ciclodextrina (riboflavina 0,1 % p/v, HP-β-ciclodextrina 1,2 % p/v) en EDTA H4 0,1 % p/v, trometamina 0,134 % p/v esterilizado a 121 °C, pH 7.0;
2 - complejo de riboflavina/HP-β-ciclodextrina (riboflavina 0,1 % p/v, HP-β-ciclodextrina 1,2 % p/v) en EDTA 0,1 % p/v, trometamina 0,134 % p/v esterilizado a 121 °C, pH 7.0 (Figura 10).

25 Resultados

La determinación de la capacidad de permeación *ex vivo* en el ojo de conejo, ha confirmado que las formulaciones en las que la riboflavina forma complejos en la HP-β-ciclodextrina son más efectivas tanto en la capacidad de absorción como en la estabilidad. El mejor resultado se obtiene utilizando el complejo de riboflavina en el complejo HP-β-ciclodextrina (riboflavina 0,1 % p/v, HP-β-ciclodextrina 2,6 %) en EDTA H4 0,1 % p/v, trometamina 0,134 % p/v. Además, la esterilización por calentamiento de la composición usada parece mejorar el rendimiento de la composición en comparación con la esterilización por filtración.

35 Conclusión

Los resultados generales del estudio permiten concluir que la composición oftálmica desarrollada adecuadamente para realizar la reticulación corneal que comprende riboflavina incluida en las HP beta ciclodextrinas es más efectiva debido a su capacidad para producir una mayor cantidad de anión superóxido que la formulación de la técnica anterior que comprende fosfato de riboflavina. De hecho, inesperadamente se ha demostrado que el tampón fosfato disminuye la capacidad de producir aniones superóxido, mientras que hasta ahora se sabía que la presencia de fosfato podría disminuir la estabilidad de la riboflavina, pero no hubo indicios sobre el efecto en la producción de superóxido, lo que es fundamental para la reticulación corneal de fibras de colágeno en el tratamiento de la ectasia ocular.

La característica técnica de la composición de acuerdo con la invención permite mejorar el rendimiento de la composición de la técnica anterior superando el inconveniente relativo debido al anión fosfato de riboflavina. De hecho, el grupo fosfato de la riboflavina en la composición oftálmica es necesario para la solubilidad de la molécula, de lo contrario no es soluble, pero afecta negativamente a la estabilidad y la fotodegradación del mismo, lo que influye en la producción de ROS y en la vía de la reticulación de la córnea.

La presencia de EDTA H4 mejora notablemente la capacidad de producir aniones superóxido, y dicho efecto es más marcado en la composición que contiene riboflavina en forma de complejo; además, esta capacidad se puede modular modificando la concentración de EDTA y Tris.

Por lo tanto, como se demostró ampliamente, el complejo de inclusión de riboflavina en HP-β-ciclodextrina es un agente fotosensibilizador mejorado en la reticulación mediada por riboflavina-UV de las fibras de colágeno corneal y las composiciones oftálmicas que lo comprenden permiten superar algunos inconvenientes de las composiciones de la técnica anterior.

60 BIBLIOGRAFÍA

1. Song, P. S. Chemistry of flavins in their excited states. In Flavins and Flavoprotein; Kamin, H., Ed.; University Park Press: Baltimore, USA, 1971; pp 37-61.
2. Ahmad I. et al. Int. J. Pharm. 2004. 280; 199-208.
3. Schuman Jorns M., et al., Eur. J. Biochem. 1975, 57, 35-48.

4. Ahmad I. et al. J. Photochem. Photobiol., B: Biol. 2008, 93, 82-87.
5. Yoshioka, S.; Stella, V. J. Stability of Drugs and Dosage Forms; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, USA, 2000; pp 97-99.
6. Moore W. W., Ireton R. C. Photochem. Photobiol. 1977, 25, 347-356.
- 5 7. Koziol J. Photochem. Photobiol. 1966, 5, 55-62.
8. Asker A. F., Habib M. J. Drug Dev. Ind. Pharm. 1990, 16, 149-156.
9. Holmström B., Oster G. J. Am. Chem. Soc. 1961, 83, 1867-1871.
10. Guttman D. E. J. Pharm. Sci. 1962, 51, 1162-1166.
11. Sato Y. et al. Chem. Pharm. Bull. 1982, 30, 1803-1810.
- 10 12. Loukas, Y. L. J. Pharm. Biomed. Anal. 2001, 26, 255-263.
13. de Jesus M. B. et al. E. J. Pharm. Pharmacol. 2012, 64, 832-842.
14. Challa R. et al. AAPS PharmSciTech. 2005, 6, 329-357.
15. Grove C. et al. J. Cosmet. Sci. 2003, 54, 537-550.
16. Sultana Y. et al. Curr. Drug Delivery. 2006, 3, 207-217.
- 15 17. Roy D.K. et al. Spectrochim. Acta. 2009,73,201-204.
18. Terekhova I. V. et al. J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem. 2011, 69, 167-172.
19. Morrison W. J. et al. Molecular pharmaceutics 2013, 10, 756-762.
20. Zaidi T. et al. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2008, 49, 1000-1009.
- 20 21. Ohtani Y. Et al. Eur. J. Biochem. 1989, 186, 17-22.

REIVINDICACIONES

1. Complejo de riboflavina en β -ciclodextrinas hidroxipropiladas para el uso en el tratamiento médico como fotosensibilizador en la reticulación mediada por riboflavina-UV de las fibras de colágeno corneal.
2. Complejo de riboflavina en β -ciclodextrinas hidroxipropiladas para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 para la preparación de composiciones oftálmicas para realizar la reticulación corneal favoreciendo el paso de la composición oftálmica al estroma a través del epitelio corneal en el tratamiento del queratocono u otros trastornos ectásicos.
3. Complejo de riboflavina en β -ciclodextrinas hidroxipropiladas para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, en el que el complejo comprende 0,05 % p/v de riboflavina y 1,3 % p/v de β -ciclodextrinas hidroxipropiladas.
4. Una composición oftálmica **caracterizada por** el hecho de que comprende el complejo de riboflavina en hidroxipropil- β -ciclodextrina, EDTA H4, o una de sus sales, y trometamina, y que tiene un valor de pH que varía entre 6,0 y 7,3.
5. Composición oftálmica de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el complejo de riboflavina en hidroxipropil- β -ciclodextrina varía entre 2 y 3 % en peso total, el EDTA H4, o una de sus sales, varía entre 0,05 y 0,25 % en peso total y la trometamina varía entre 0,12 y 0,3 % en peso total.
6. Composición oftálmica de acuerdo con las reivindicaciones 4 y 5, en la que el complejo de riboflavina en la hidroxipropil- β -ciclodextrina varía entre 2,5 y 2,9 % en peso total, el EDTA H4, o una sal del mismo, varía entre 0,08 y 0,22 % en peso total y la trometamina varía entre 0,134 y 0,285 % en peso total.
7. Composición oftálmica de acuerdo con las reivindicaciones 4 a 6, que tiene la siguiente formulación:
 - complejo de riboflavina en hidroxipropil- β -ciclodextrina 2,5-2,7 % en peso total,
 - EDTA H4 0,1 % en peso total,
 - trometamina 0,130-0,150 % en peso total,
 - agua destilada hasta equilibrio.
8. Composición oftálmica de acuerdo con las reivindicaciones 4 a 7, que comprende además principios activos, agentes tamponantes, conservantes, vehículos, diluyentes, excipientes farmacéuticamente aceptables.
9. Composición oftálmica de acuerdo con las reivindicaciones 4 a 8 en la forma técnica de colirio, gotas oftálmicas, enjuague ocular, pomada y en todas las formas farmacéuticas que permiten una aplicación corneal según las técnicas conocidas.
10. Una composición oftálmica **caracterizada por** el hecho de que comprende el complejo de riboflavina en hidroxipropil- β -ciclodextrina, EDTA H4, o una de sus sales, trometamina, y que tiene un valor de pH que varía entre 6,0 y 7,3 para el uso en el tratamiento del queratocono o de otros trastornos ectásicos por reticulación corneal para favorecer el paso de la composición oftálmica al estroma a través del epitelio corneal.

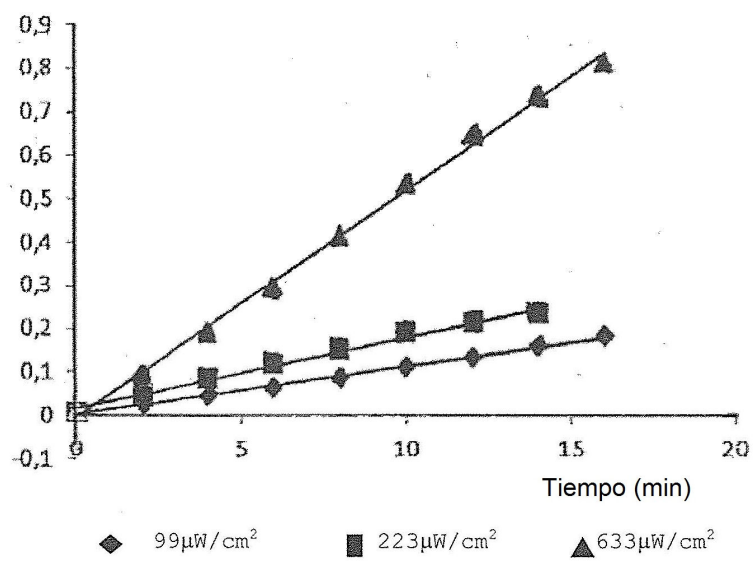


Figura 1

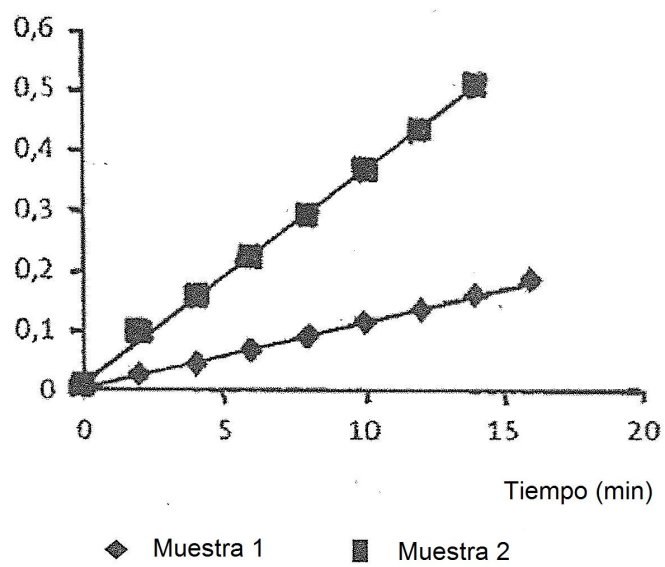


Figura 2

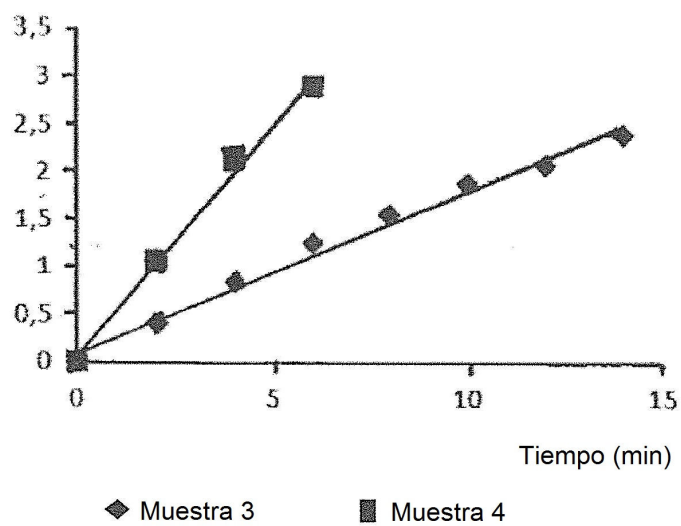


Figura 3

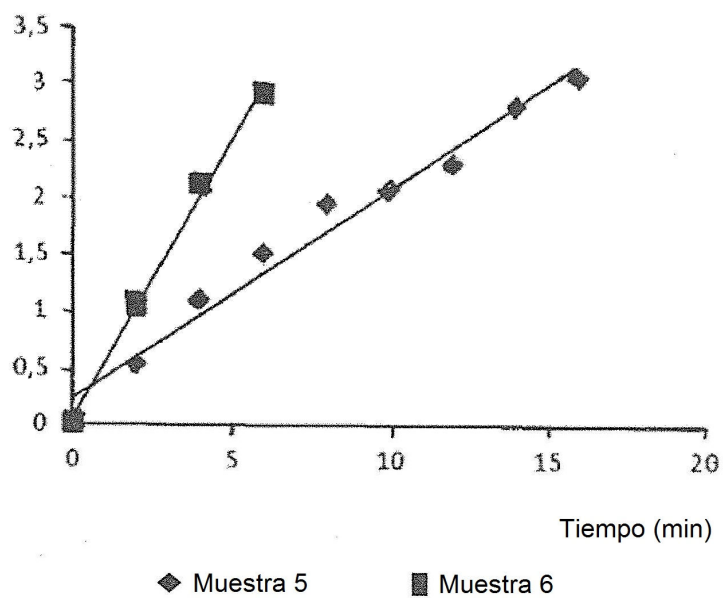


Figura 4

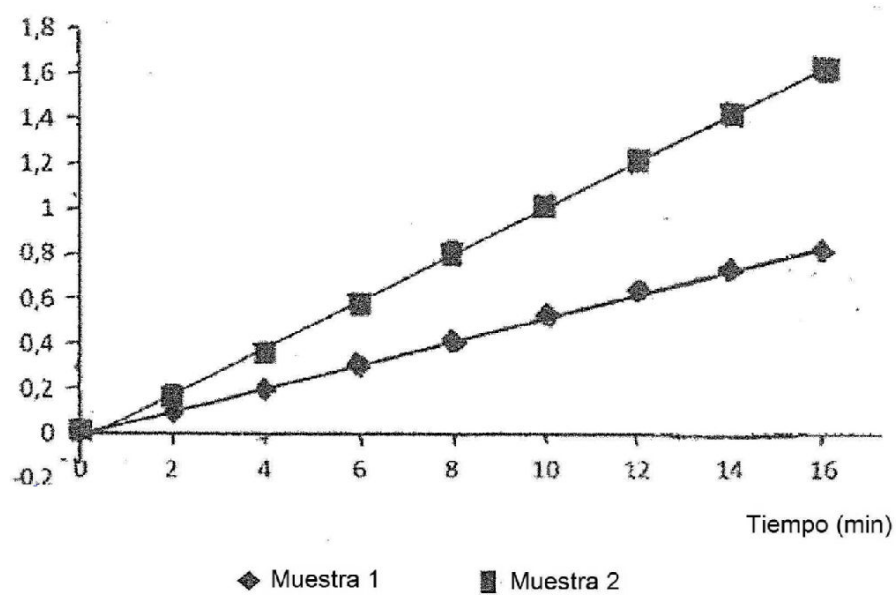


Figura 5

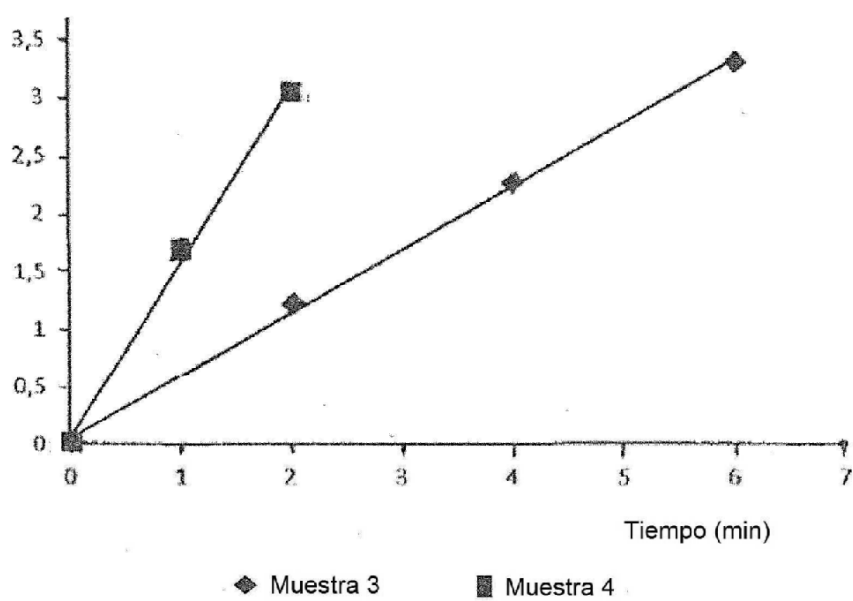


Figura 6

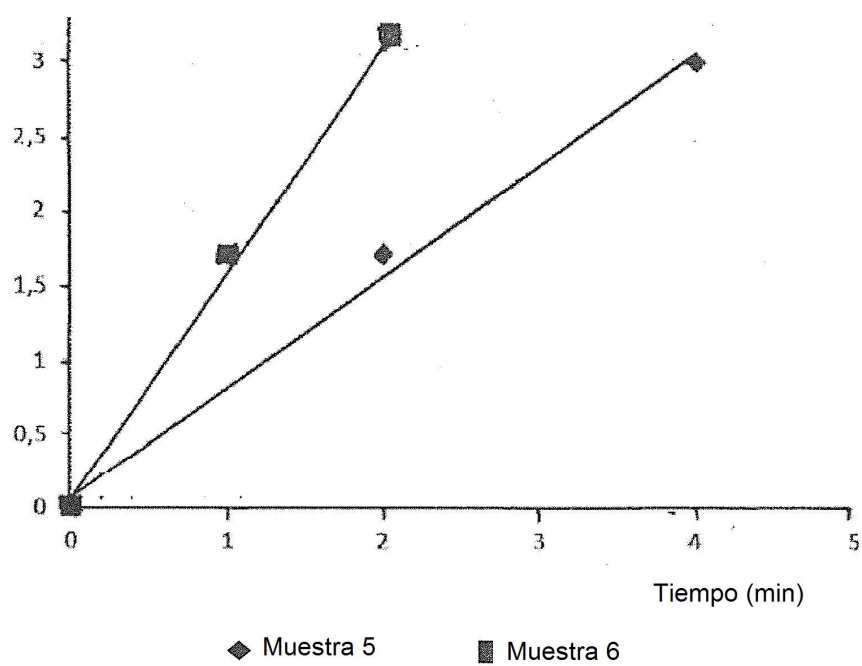


Figura 7

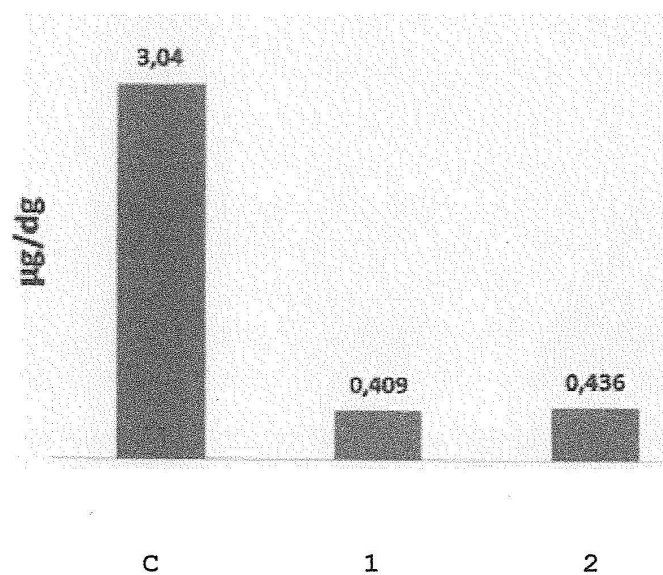


Figura 8

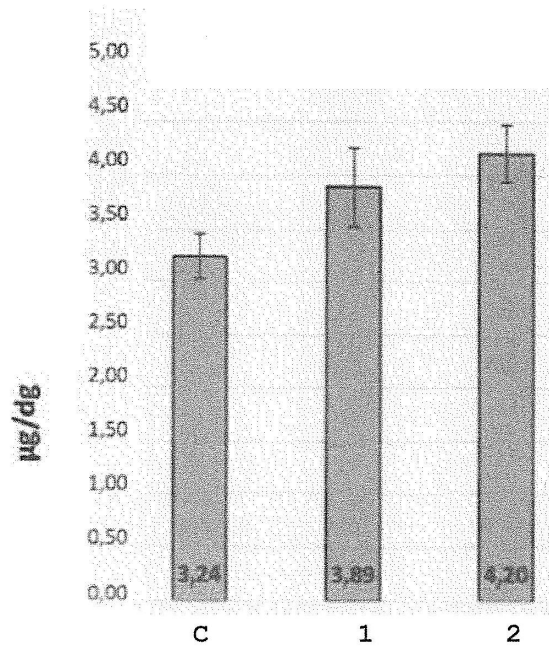


Figura 9

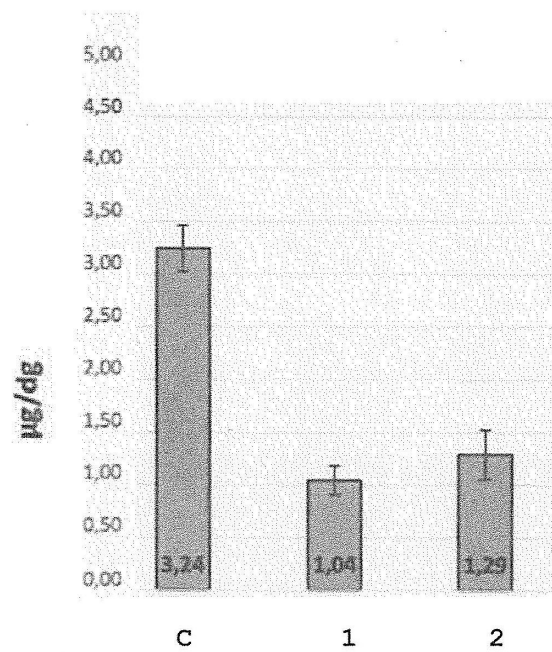


Figura 10