(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 747 808**

(51) Int. Cl.:

A61K 9/08	(2006.01)	***B65D 65/40***	(2006.01)
A61K 47/02	(2006.01)	***B65D 81/26***	(2006.01)
A61K 47/10	(2007.01)	***A61K 9/00***	(2006.01)
A61K 47/18	(2007.01)		
A61K 47/24	(2006.01)		
A61K 47/26	(2006.01)		
A61K 47/38	(2006.01)		
A61K 47/61	(2007.01)		
A61K 31/715	(2006.01)		
A61K 51/06	(2006.01)		

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.05.2015** **PCT/EP2015/059674**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2015** **WO15169728**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2015** **E 15718956 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019** **EP 3139903**

(54) Título: **Solución oftálmica acuosa y método para tratar el síndrome del ojo seco**

(30) Prioridad:

07.05.2014 EP 14167381

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.03.2020

(73) Titular/es:

CROMA-PHARMA GESELLSCHAFT M.B.H. (100.0%)
Industriezeile 6
2100 Leobendorf, AT

(72) Inventor/es:

PRINZ, MARTIN

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 747 808 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

Solución oftálmica acuosa y método para tratar el síndrome del ojo seco

Campo técnico

La presente invención se refiere a una solución oftálmica acuosa. La presente invención también se refiere a un recipiente que contiene la solución oftálmica acuosa. La presente invención se refiere además a dicha solución en un método para tratar el síndrome del ojo seco usando la nueva solución oftálmica acuosa. El método es útil para aliviar los signos y/o síntomas del ojo seco. El método implica administrar a un sujeto que lo necesite una solución oftálmica acuosa que contiene un quitosano tiolado.

Antecedentes de la invención

El síndrome del ojo seco (DES), también conocido como enfermedad del ojo seco, es una enfermedad de la superficie ocular altamente prevalente. Aproximadamente 40 millones de estadounidenses se ven afectados con algún tipo de ojo seco, una parte importante de los cuales que tienen 50 años o más tienen ojo seco de moderado a severo (Schaumberg, Sullivan et al., 2003, Prevalence of dry eye syndrome among US women, Am J Ophthalmol (136): 318-326; Schaumberg, Dana et al., 2009, Prevalence of dry eye disease among US men: estimates from the Physicians' Health Studies, Arch Ophthalmol (127): 763-768).

En general, la enfermedad del ojo seco puede ser cualquier síndrome asociado con la inestabilidad y disfunción de la película lagrimal (tal como el aumento de la evaporación lagrimal y/o la reducción de la secreción acuosa). Entre las indicaciones a las que se refiere el término general "enfermedad del ojo seco" se encuentran: queratoconjuntivitis seca (KCS), ojo seco relacionado con la edad, síndrome de Stevens-Johnson, síndrome de Sjogren, penfigoide cicatricial ocular, lesión corneal, infección de la superficie ocular, Síndrome de Riley-Day, alacrima congénita, trastornos o deficiencias nutricionales (incluidas las deficiencias de vitaminas), efectos secundarios farmacológicos, destrucción glandular y tisular, trastornos autoinmunes y otros inmunodeficientes e incapacidad para parpadear en pacientes comatosos. También se incluyen los síntomas del ojo seco causados por la exposición ambiental a partículas en el aire, humo, smog y aire excesivamente seco; así como la intolerancia a las lentes de contacto y el estrés ocular causado por el trabajo en la computadora o los juegos de computadora.

Hay otras enfermedades que tienen un alto grado de comorbilidad con la enfermedad del ojo seco: conjuntivitis alérgica (estacional y crónica), blefaritis y disfunción de la glándula de Meibomio. Estas condiciones afectan la calidad y la estabilidad de la película lagrimal, lo que resulta en signos y síntomas de ojo seco.

Los procedimientos de corrección de la visión asistida por láser, tal como la queratectomía fotorrefractiva (PRK), la queratectomía subepitelial asistida por láser (LASEK) y la queratomileusis in situ asistida por láser (LASIK) también influyen negativamente en la funcionalidad de la película lagrimal y con frecuencia causan enfermedad del ojo seco (temporal).

Actualmente, el tratamiento de DES abarca tanto tratamientos farmacológicos como no farmacológicos, incluido el manejo ambiental, evitar factores exacerbantes, la higiene de los párpados, la suplementación de lágrimas (lágrimas artificiales), secretagogos (para aumentar la producción de lágrimas), tapones puntuales, agentes antiinflamatorios (ciclosporina, esteroides), cámara de humedad e incluso autotrasplante de glándulas salivales (Behrens, Doyle et al., 2006, Dysfunctional tear syndrome: a Delphi approach to treatment recommendations, Cornea (25): 900-907). Las opciones disponibles actualmente para tratar el DES son inadecuadas. Incluso la suplementación con lágrimas no es una opción de tratamiento ideal, ya que requiere que el sujeto repita la instalación de lágrimas artificiales muchas veces durante el día.

Se han revelado varios polímeros como posibles ayudas para proporcionar algún beneficio para aliviar los síntomas de DES y, de hecho, algunas lágrimas artificiales contienen uno o más polímeros, incluidos los 5 productos de venta libre (OTC) más vendidos actualmente para el ojo seco dentro de la UE (Celluvisc®, Systane®, Hylo-Comod®, Optive® y Artelac®). Estos polímeros están destinados a proteger las membranas mucosas oculares y proporcionar lubricación a la superficie ocular. Los ejemplos incluyen derivados de celulosa, ácido hialurónico, polioles líquidos, alcohol polivinílico, povidona, carbopol e hidroxipropil-guar. Los polímeros utilizados en productos para tratar DES tienen un tiempo de residencia relativamente corto en la superficie ocular y requieren una instilación frecuente. Para aumentar el tiempo de residencia ocular, algunas formulaciones contienen vaselina o aceite mineral; sin embargo, debido a borrosidad significativa, estos productos altamente viscosos solo se pueden usar en la noche antes de dormir. (Abelson et al., 2008, Tear Substitutes. En: Albert and Miller, eds. Principles and Practices of Ophthalmology, 3ra edición, vol. 1 Philadelphia: W.B. Saunders Company, 287-292). Todos los demás sustitutos de la lágrima deben ser instilados repetidamente durante el día.

Se han descrito algunas mejoras potenciales para estos polímeros. Una mejora potencial podría ser usar un polímero que tenga propiedades mucoadhesivas significativas para aumentar el tiempo de residencia de la formulación en la superficie ocular sin causar una borrosidad significativa. El quitosano, un polímero policatiónico que se deriva del polímero natural quitina, es bien conocido por sus propiedades mucoadhesivas. El tiempo de residencia ocular de las formulaciones oftálmicas que contienen quitosano se puede aumentar no solo debido a sus

propiedades de mejora de la viscosidad sino también debido a las interacciones de quitosano con mucinas cargadas negativamente en la superficie ocular (Wadhwa, Paliwal et al., 2009, Chitosan and its role in ocular therapeutics, Mini Rev Med Chem (9): 1639-1647). Además, el quitosano tiene actividad antimicrobiana contra diversos microorganismos patógenos (Felt, Carrel et al., 2000, Chitosan as tear substitute: a wetting agent endowed with antimicrobial efficacy, J Ocul Pharmacol Ther (16): 261-270; Dai, Tanaka et al., 2011, Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects, Expert Rev Anti Infect Ther (9): 857-879).

Se ha descrito que la tiolación de polímeros aumenta aún más sus propiedades mucoadhesivas. El documento EP 1126881 B1 describe un polímero mucoadhesivo que comprende al menos un grupo tiol no terminal. El uso de polisacáridos tiolados para preparar un implante para el aumento de tejido se describe en el documento WO 2008/077172, en el que dichos polímeros tiolados se caracterizan por la formación de enlaces disulfuro que conducen a una estabilización de la red polimérica. La aplicación prioritaria del documento WO 2008/077172, A 2136/2006, revela campos de aplicación adicionales para polímeros tiolados.

Se ha descrito la modificación de quitosano por unión covalente de ligandos que llevan grupos tiol (es decir, tiolación). También se ha revelado que la tiolación aumenta las propiedades mucoadhesivas del quitosano (Kast and Bernkop-Schnurch, 2001, Thiolated polymers--thiomers: development and in vitro evaluation of chitosan-thioglycolic acid conjugates, Biomaterials (22): 2345-2352; Bernkop-Schnurch, Hornof et al., 2004, Thiolated chitosans, Eur J Pharm Biopharm (57): 9-17; Bernkop-Schnurch, 2005, Thiomers: a new generation of mucoadhesive polymers, Adv Drug Deliv Rev (57): 1569-1582; Schmitz, Grabovac et al., 2008, Synthesis and characterization of a chitosan-N-acetyl cysteine conjugate, Int J Pharm (347): 79-85). También se evaluó la eficacia antimicrobiana de algunos quitosanos tiolados (W02009132226 Al; WO2009132227 Al; WO2009132228 Al; Geisberger, Gyenge et al., 2013, Chitosan-thioglycolic acid as a versatile antimicrobial agent, Biomacromolecules (14): 1010-1017). Gerhard Garhofer y col. (Cataract & Refractive Surgery Today Europe, 2011) describe las gotas oculares de quitosano-N-acetilcisteína con altos tiempos restantes en la superficie ocular.

N-acetilcisteína (NAC) es un derivado del grupo tiol que lleva el aminoácido L-cisteína. NAC es un agente reductor con actividad antioxidante. También es bien conocido por su capacidad para reducir la viscosidad del moco al reducir los enlaces disulfuro de mucina. Debido a estas propiedades mucolíticas, NAC se usa ampliamente para reducir la viscosidad del moco en los trastornos broncopulmonares con producción excesiva de moco. Las formulaciones oftálmicas tópicas que contienen el agente mucolítico y antioxidante NAC se usan para el tratamiento de enfermedades corneales tal como la disfunción de la glándula meibomiana y DES (Lemp, 2008, Management of dry eye disease, Am J Manag Care (14): S88-101; Akyol-Salman, Azizi et al., 2010, Efficacy of topical N-acetylcysteine in the treatment of meibomian gland dysfunction, J Ocul Pharmacol Ther (26): 329-333). El documento EP 0 551 848 B1 describe una composición farmacéutica oftálmica para el tratamiento de DES que contiene NAC en una concentración entre 3% y 5% (p/v) y alcohol polivinílicol.

Se ha revelado que la tiolación de quitosano usando NAC aumenta su tiempo de residencia ocular en ojos de conejo en comparación con el quitosano no tiolado (Dangl, Hornof et al., 2009, In vivo Evaluation of Ocular Residence Time of ^{124}1-labelled Thiolated Chitosan in Rabbits Using MicroPET Technology, ARVO Meeting Abstracts (50): 3689).

Se ha revelado que el HCl de N-(N-acetilcisteinil-)quitosano tiene algún efecto beneficioso sobre la superficie ocular del ojo del ratón en modelos de ojo seco de ratón (Hongyok, Chae et al., 2009, Effect of chitosan-N-acetylcysteine conjugate in a mouse model of botulinum toxin B-induced dry eye, Arch Ophthalmol (127): 525-532; Hornof, Goyal et al., 2009, Thiolated Chitosan for the Treatment of Dry Eye - Evaluation in Mice Using the Controlled-Environment Chamber Model, ARVO Meeting Abstracts (50): 3663).

A continuación se enumeran otras publicaciones que revisan y analizan diversos usos de los polímeros tiolados:

Hornof et al., Mucoadhesive ocular insert based on thiolated poly(acrylic acid): development and in vivo evaluation in humans; Journal of Controlled Release 89 (2003) 419-428; Hornof, M., In vitro and in vivo evaluation of novel polymeric excipients in the ophthalmic field, Thesis, University of Vienna, 2003; Bernkop-Schnurch et al., Permeation enhancing polymers in oral delivery of hydrophilic macromolecules: Thiomer/GSH systems, J. Contr. Release 93(2003) 95-103; M. Hornof et al., In Vitro Evaluation of the Permeation Enhancing Effect of Polycarbophil-Cystein Conjugates on the Cornea of Rabbits, J. Pharm. Sci. 91 (12) 2002, 2588-2592; y Clausen et al., The Role of Glutathione in the Permeation Enhancing Effect of Thiolated Polymers, Pharm. Res. 19 (5) 2002, 602-608; Yamashita et al., Synthesis and Evaluation of Thiol Polymers, J. Macromol.Sc. 26 (1989), 9, 1291-1304; Zheng et al., Disulfide Cross-Linked Hyaluronan Hydrogels, Biomacromolecules 3 (6) 2002, 1304-1311; Wang et al., Chitosan-NAC Nanoparticles as a Vehicle for Nasal Absorption Enhancement of Insulin, J. Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater 88B: 150-161, 2009; WO 2008/094675 A2; US 5,412,076 A.

Sin embargo, hasta ahora no se ha descrito ninguna formulación que contenga quitosano tiolado que cumpla con los requisitos de estabilidad a largo plazo, tolerabilidad, seguridad, efectividad en el tratamiento del síndrome del ojo seco y un mejor cumplimiento del paciente. Como resultado de la ineficacia e inconveniencia de las terapias actuales del tratamiento del ojo seco, sigue existiendo la necesidad de un método para tratar el síndrome del ojo seco que cumpla con los requisitos enumerados anteriormente.

Compendio de la invención

La presente invención está dirigida a una solución oftálmica acuosa estéril que contiene 0,05% a 0,5% (p/p) de N-(N acetilcisteinil)quitosano o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo, en una solución portadora, en donde el N-(N-acetilcisteinil-)quitosano tiene un contenido de grupos tiol libres en una cantidad de 80 µmol/g de polímero a 280 µmol/g de polímero.

La presente invención, además, está dirigida a un recipiente que comprende dicha solución oftálmica acuosa.

La presente invención también se dirige a dicha solución oftálmica acuosa en la prevención o tratamiento de los signos y/o síntomas del síndrome del ojo seco. Por consiguiente, la presente invención también está dirigida a dicha solución oftálmica en un método para tratar dichas enfermedades y síntomas en un sujeto que necesita dicho tratamiento. El método comprende el paso de identificar primero a un sujeto que padece síndrome del ojo seco o síntomas del ojo seco, luego administrar al sujeto una cantidad efectiva de la solución oftálmica acuosa que contiene N- (N-acetilcisteinil-)quitosano o una sal aceptable para el uso farmacéutico del mismo.

En particular, la presente invención es adecuada para tratar los signos y/o síntomas del ojo seco causados por o relacionados con una o más de queratoconjuntivitis seca (KCS), ojo seco relacionado con la edad, síndrome de Stevens-Johnson, síndrome de Sjogren, penfigoide cicatricial ocular, lesión de córnea, infección, síndrome de Riley-Day, alacrima congénita, tratamientos con PRK, LASEK y/o LASIK, conjuntivitis alérgica, blefaritis y disfunción de la glándula meibomiana, trastornos o deficiencias nutricionales (incluida la deficiencia de vitaminas), efectos secundarios farmacológicos, destrucción glandular y tisular, trastornos autoinmunes y otros trastornos inmunodeficientes, e incapacidad para parpadear en pacientes comatosos. También se incluyen los síntomas del ojo seco causados por la exposición ambiental a partículas en el aire, humo, smog y aire excesivamente seco; así como la intolerancia a las lentes de contacto y el estrés ocular causado por el trabajo en la computadora o los juegos de computadora.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una comparación de la estabilidad de los grupos tiol libres en una solución oftálmica acuosa que contiene 0,1% (p/p) de N-(N-acetilcisteinil-)quitosano.HCl durante el almacenamiento a largo plazo a 25°C y 40% de humedad relativa utilizando diferentes envases como se describe en el Ejemplo 3. Las barras grises representan el contenido del grupo tiol en diferentes puntos de tiempo (punto de inicio, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses y 12 meses) durante el almacenamiento en el grupo 1 (envasado y almacenamiento con absorbente de oxígeno), las barras blancas representan la estabilidad del grupo tiol en el grupo 2 (envasado y almacenamiento sin absorbente de oxígeno).

La Figura 2 muestra la estabilidad de los grupos tiol libres en una solución oftálmica acuosa que contiene 0,1% (p/p) de N-(N-acetilcisteinil-)quitosano.HCl durante el almacenamiento a corto plazo de unidades de dosis única en condiciones de aire, humedad y temperatura ambiente durante 30 días como se describe en el Ejemplo 4.

La Figura 3 muestra un dibujo esquemático de una subestructura de N-(N-acetilcisteinil-)quitosano.HCl.

La Figura 4 muestra los resultados de las mediciones del grupo tiol (sin TCEP: barras grises, después de la reducción con TCEP: barras blancas; valores medios de 3 mediciones con desviaciones estándar) del polímero 1 y el polímero 6 que se sintetizaron como se describe en el ejemplo 6 y se analizaron como se describe en el ejemplo 7.

La Figura 5 muestra los resultados de la determinación de la viscosidad dinámica (sin TCEP: barras grises, después de la reducción con TCEP: barras blancas) de una solución al 0,5% (p/p) de polímero 1 y polímero 6, que se sintetizaron como se describe en ejemplo 6 y analizado como se describe en el ejemplo 7.

Las Figuras 6, 7 y 8 muestran la determinación del rango viscoelástico lineal de una red de N-(N-acetilcisteinil-)quitosano.HCl-mucina.

La Figura 9 muestra el área calculada bajo los valores de la curva (0-96h) derivados de las curvas individuales de concentración de radioactividad en el tiempo de los ojos tratados con ^{124}I-quitosano-NAC, ^{124}I-quitosano. HCl y Na^{124}I, respectivamente.

La Figura 10 muestra los valores del área bajo la curva (AUC) (0-72 h) calculados a partir de curvas de concentración de radioactividad en el tiempo individual (% AD * h/g) de ojos tratados con ^{124}I-quitosano-NAC y hialuronano tiolado marcado con ^{124}I (HA-cisteamina).

Descripción detallada de la invención

Los inventores han descubierto inesperadamente una solución oftálmica estable que es efectiva en el tratamiento del síndrome del ojo seco o en la mejora de uno o más signos y/o síntomas del ojo seco en pacientes que padecen el

síndrome del ojo seco y/o en la mejora de la calidad de la película lagrimal en pacientes con enfermedad del ojo seco. La solución oftálmica acuosa estéril de la presente invención contiene 0,05% a 0,5% (p/p) de N-(N-acetilcisteinil-)quitosano o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo, en una solución portadora, en donde el N-(N-acetilcisteinil-)quitosano tiene un contenido de grupos tiol libres en una cantidad de 80 µmol/g de polímero a 280 µmol/g de polímero. Preferentemente, como sal aceptable para uso farmacéutico se emplea la sal de clorhidrato.

A continuación, el término "quitosano-NAC" significa tanto N-(N-acetilcisteinil-)quitosano como sales aceptables para uso farmacéutico del mismo.

El método de la presente invención es una mejora con respecto al tratamiento actual más comúnmente usado de la enfermedad del ojo seco: lágrimas artificiales (es decir, solución salina o soluciones que contienen polímeros) y agentes antiinflamatorios (ciclosporina).

La presente invención es adecuada para tratar cualquier síndrome del ojo seco. En términos generales, el síndrome del ojo seco o la enfermedad del ojo seco como perteneciente a la presente invención puede ser cualquier síndrome asociado con la inestabilidad y/o disfunción de la película lagrimal (tal como el aumento de la evaporación lagrimal y/o la reducción de la secreción acuosa).

Particularmente, la presente invención es adecuada para tratar enfermedades del ojo seco causadas por o relacionadas con una o más de queratoconjuntivitis seca, ojo seco relacionado con la edad, síndrome de Stevens-Johnson, síndrome de Sjogren, penfigoide cicatricial ocular, lesión corneal, infección, síndrome de Riley-Day, alacrima congénita, tratamientos con PRK, LASEK y/o LASIK, conjuntivitis alérgica, blefaritis y disfunción de la glándula meibomiana, trastornos o deficiencias nutricionales (incluidas las deficiencias de vitaminas), efectos secundarios farmacológicos, destrucción glandular y tisular, trastornos autoinmunes, trastornos inmunodeficientes, e incapacidad para parpadear en pacientes comatosos. También se incluyen los síntomas del ojo seco causados por la exposición ambiental a partículas en el aire, humo, smog y aire excesivamente seco; así como la intolerancia a las lentes de contacto y el estrés ocular causado por el trabajo en la computadora o los juegos de computadora.

Como se indicó en los antecedentes, hay otras enfermedades que tienen un alto grado de comorbilidad con la enfermedad del ojo seco: conjuntivitis alérgica (estacional y crónica), blefaritis y disfunción de la glándula de Meibomio. Estas afecciones afectan la calidad y la estabilidad de la película lagrimal, lo que resulta en signos y síntomas de ojo seco.

Los procedimientos de corrección de la visión asistida por láser, tal como la queratectomía fotorrefractiva (PRK), la queratectomía subepitelial asistida por láser (LASEK) y la queratomileusis in situ asistida con láser (LASIK) también influyen negativamente en la funcionalidad de la película lagrimal y con frecuencia causan enfermedad del ojo seco (temporal).

La presente solución oftálmica en un método de tratamiento comprende los pasos de: (i) identificar a un sujeto que padece enfermedad del ojo seco; y (ii) administrar a los ojos del sujeto una solución oftálmica acuosa que comprende una solución oftálmica acuosa que contiene quitosano-NAC; en donde dicha enfermedad del ojo seco es causada por o relacionada con una o más de las enfermedades, síndromes y factores de estrés mencionados anteriormente.

Una ventaja significativa de la formulación de la presente invención es que, después de una instilación única en el ojo del sujeto, el quitosano-NAC tiene un efecto restaurador sobre el espesor de la película lagrimal durante hasta 24 horas. Esto significa que un sujeto no tiene que instilar constantemente el producto en el ojo como sería necesario para la terapia de reemplazo de lágrimas, tal como cuando se usan lágrimas artificiales. La dosis tópica diaria de la solución oftálmica acuosa de quitosano-NAC, eficaz para reducir los síntomas del ojo seco y/o para mejorar la composición de la película lagrimal, se puede dividir entre una o varias administraciones de dosis unitarias. Un sujeto usaría el producto según sea necesario, pero generalmente esto no sería más de dos veces al día y en muchos casos el producto se usaría solo una vez al día. Un régimen preferente para la solución de quitosano-NAC de la presente invención es una gota de solución al 0,1% (p/p) por ojo una vez al día. Por lo tanto, una ventaja significativa de la formulación de la presente invención es que podría ser un producto de una vez al día y garantizaría un mejor cumplimiento del paciente.

Después del tratamiento con los presentes métodos, uno o más signos y/o síntomas de ojo seco se reducen o alivian en el sujeto. Los síntomas del ojo seco incluyen sequedad, ardor, picazón ocular, molestias oculares, fotofobia, sensación de cuerpo extraño, visión borrosa, arenilla y alteraciones o pérdidas visuales, incluida visión borrosa, velocidad de lectura reducida, fotofobia y pérdida de agudeza visual. Los signos del ojo seco se evalúan mediante mediciones tales como: tinción corneal y/o conjuntival (usando fluoresceína, verde de lisamina o rosa de Bengala), prueba de tira de Schirmer, hilos Zone-Quick, osmolaridad de la película lagrimal, tiempo de ruptura lagrimal y altura del menisco lagrimal.

Una razón por la cual los signos y/o síntomas de DES se mejoran usando la formulación de la presente invención es posiblemente el efecto restaurador de la formulación sobre el grosor de la película lagrimal ocular, que puede ser causado por una interacción química del quitosano tiolado con las mucinas de la superficie ocular o la presencia de

un recubrimiento protector sobre la superficie ocular que se forma mediante la reticulación de quitosano-NAC después de la aplicación a la superficie ocular, o una combinación de ambos efectos.

La "cantidad efectiva" de la solución oftálmica acuosa que contiene el polímero de quitosano-NAC administrado a un sujeto es una cantidad efectiva para reducir los signos y/o síntomas clínicos de la enfermedad del ojo seco. Esta cantidad es de 0,05% a 0,5% (p/p) de polímero de quitosano-NAC, en una solución portadora.

En una cantidad inferior al 0,05%, el quitosano-NAC está en una concentración tan baja que no se vería ningún efecto clínico en un paciente. En mucho más del 0,5%, la tolerancia del paciente comienza a sufrir y cualquier efecto de quitosano que mejora la penetración es más pronunciado. La concentración del quitosano-NAC en la solución oftálmica acuosa es preferentemente del 0,05 al 0,3% (p/p), más preferentemente del 0,05 al 0,2% (p/p), mucho más preferente del 0,08 al 0,16% (p/p). A una concentración muy inferior al 0,05%, las propiedades mucoadhesivas y, en consecuencia, el efecto clínico no son tan pronunciados. A una concentración muy superior al 0,3%, la alta viscosidad de la formulación de quitosano-NAC conduce a la formación de "aglomeraciones" después de la aplicación ocular y la solución no se extiende de manera uniforme en la superficie ocular. Las soluciones de quitosano-NAC en un rango de concentración de 0,05% a 0,3% se distribuyen uniformemente en la superficie ocular como lo demuestran los estudios in vivo con yodo-^{124} quitosano-NAC radiomarcado (ver ejemplos 9 y 10). La concentración de quitosano-NAC en la solución oftálmica acuosa es más preferentemente de aproximadamente 0,1%, ya que tanto el efecto clínico como la tolerancia del paciente son óptimos.

Un gran porcentaje de los grupos tiol unidos en el quitosano-NAC que están presentes en la solución oftálmica acuosa debe estar en forma de grupos tiol libres, es decir, tioles no reticulados como se define a continuación. Es importante que la mayoría de estos grupos tiol permanezcan libres para reaccionar solo después de la instilación en la superficie ocular. En algunos casos, la cantidad de grupos tiol libres podría ser bastante baja y aún proporcionar algún beneficio farmacéutico para el ojo cuando se instila. El polímero de quitosano-NAC en la formulación de la presente invención tiene un contenido de grupos tiol libres en una cantidad de 80 µmol/g de polímero a 280 µmol/g de polímero; preferentemente con un intervalo de grupos tiol libres de aproximadamente 105 µmol/g de polímero a 250 µmol/g de polímero, más preferentemente de 110 µmol/g de polímero a 250 µmol/g de polímero y mucho más preferentemente de preferentemente 140 a 250 µmol/g de polímero.

En una concentración de grupos tiol libres muy por debajo de 80 µmol/g, las interacciones poliméricas entre quitosano-NAC y mucinas son débiles y comparables con el HCl de quitosano no modificado, sin embargo, en concentraciones muy altas de grupos tiol libres de 300 µmol/g y más, las propiedades fisicoquímicas del quitosano polimérico central se cambia de tal manera que el polímero no es útil para la preparación de una solución oftálmica acuosa debido a su carácter catiónico reducido y su solubilidad limitada en agua.

Esta cantidad de grupos tiol libres inmovilizados en el quitosano-NAC debe estar presente cuando la formulación oftálmica de la presente invención está lista para usarse en los ojos del paciente con ojo seco. Esto significa que los grupos tiol libres presentes en la solución oftálmica acuosa de la presente invención deben sobrevivir tiempos de almacenamiento relativamente largos.

Por lo tanto, el producto de ojo seco resultante debe ser estable y retener los grupos tiol libres mencionados anteriormente durante al menos aproximadamente 12 meses, más preferentemente al menos aproximadamente 18 meses, y aún más preferentemente al menos aproximadamente 24 meses.

El experto en la técnica puede determinar la cantidad de grupos tiol libres inmovilizados en quitosano-NAC en una solución oftálmica acuosa de una manera conocida, tal como a través del reactivo de Ellman (véase el ejemplo 1).

Además del hecho de que es importante una gran cantidad de grupos tiol libres en el polímero de quitosano-NAC en la solución oftálmica acuosa, también es preferente una baja cantidad de tioles reticulados (disulfuros) en el polímero de quitosano-NAC en la solución de la presente invención. Durante la preparación y el almacenamiento de la solución oftálmica acuosa se puede producir la reticulación de grupos tiol inmovilizados en el quitosano-NAC. Una baja cantidad de tioles reticulados presentes en la formulación es un parámetro preferente de la formulación de polímero de quitosano-NAC de la presente invención.

Por lo tanto, según una realización preferente de la presente invención, la cantidad de grupos tiol reticulados en el N-(N-acetilcisteinil-)quitosano es 30% o menos del total de grupos tiol en el mismo, preferentemente 25% o menos, mucho más preferentemente 15 % o menos.

Especialmente, en esta realización preferente, la cantidad de grupos tiol reticulados en el N-(N-acetilcisteinil-)quitosano es 30% o menos del total de grupos tiol en el mismo, preferentemente 25% o menos, mucho más preferentemente 20% o menos después del almacenamiento de la solución durante al menos 12 meses a temperatura ambiente.

Si la cantidad de grupos tiol reticulados presentes en la fórmula fuera demasiado alta, las propiedades de la solución oftálmica acuosa podrían cambiar fuera de los parámetros deseados, por ejemplo, la viscosidad de la solución

oftálmica acuosa podría ser demasiado alta para ser adecuada para las gotas oculares.

Como se explica a continuación con más detalle, se ha encontrado que es posible producir un quitosano-NAC cuyos grupos tiol no están reticulados o solo están mínimamente reticulados, tal como con una cantidad de grupos tiol reticulados de menos del 5%, preferentemente 4 % o menos del total de grupos tiol. Especialmente si dicho quitosano-NAC se emplea para la fabricación de la solución oftálmica de la presente invención, los grupos tiol libres tienden a ser estables durante todo el ciclo de vida de la solución.

Por lo tanto, se ha descubierto que al emplear tal quitosano-NAC durante la producción de la formulación, el aumento de grupos tiol reticulados es <10% de la cantidad de grupos tiol libres inicialmente presentes en la materia prima de quitosano-NAC. Además, durante el almacenamiento de la solución durante 12 meses o incluso 18 meses, el aumento de los grupos tiol reticulados es <15% de la cantidad de grupos tiol libres inicialmente presentes en la formulación. Finalmente, incluso si se abre un segundo recipiente de la solución (como se define a continuación) que proporciona una barrera de oxígeno, 30 días después de la apertura, el aumento de los grupos tiol reticulados es <15% de la cantidad de grupos tiol libres inicialmente presentes en la formulación antes de la apertura.

Esencialmente, la formulación oftálmica de quitosano tiolado de la presente invención se realiza de acuerdo con los siguientes pasos:

1. La quitina se aísla de las conchas de crustáceos, tal como las conchas de camarones o cangrejos de nieve;

2. El quitosano se prepara a partir de quitina a través de un proceso químico que es bien conocido en la técnica como, por ejemplo, la desacetilación alcalina;

3. El quitosano es tiolado por la unión covalente de un ligando que contiene tiol, tal como con el uso de N-acetilcisteína como se establece en este documento;

4. El quitosano-NAC se formula luego en forma de una solución oftálmica acuosa como se expone en el presente documento;

5. La solución oftálmica acuosa que contiene quitosano-NAC se coloca luego en un recipiente adecuado que asegure su estabilidad como se establece aquí.

Como se describe en detalle aquí, químicamente, el quitosano es un biopolímero policatiónico con propiedades biológicas favorables tales como alta biocompatibilidad y baja toxicidad. La fuente de las materias primas para producir el quitosano para la formulación de la presente invención no es crítica siempre que el quitosano resultante sea bastante puro y libre de contaminantes. Por ejemplo, el quitosano también se puede producir a partir de una fuente no animal. El quitosano de la presente invención puede procesarse por diversos métodos siempre que el quitosano tenga las propiedades requeridas y establecidas en la presente memoria descriptiva. Más comúnmente, la materia prima para el quitosano proviene de la quitina en las conchas de los crustáceos. La quitina se puede obtener durante la cosecha de fuentes de alimentos crustáceos, tal como langosta, cangrejo y camarones. Una fuente preferente de materia prima de quitina para el quitosano procesado y utilizado en la formulación de acuerdo con la presente invención son las conchas del cangrejo de nieve (Chionoecetes opilio). Se podrían usar varias fuentes de crustáceos para obtener la quitina para hacer el quitosano siempre que el suministro sea adecuado. La preparación de quitosano a partir de fuentes biológicas de materia prima es bien conocida y divulgada en numerosas publicaciones científicas, por ejemplo (Chang, Tsai et al., 1997, Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution, Carbohydr Res (303): 327-332; Dutta, Dutta et al., 2004, Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications, J Sci Ind Res (63): 20-31).

El quitosano-NAC se puede sintetizar haciendo reaccionar el quitosano con un ligando que lleva un grupo tiol. Los métodos para la tiolación se describen en numerosas publicaciones científicas, por ejemplo (Seki, Aoi et al., 1999, Partially deacetylated chitin or chitosan derivative with selectively substituted free amino group by amino acid and peptide and having substantially no substituted hydroxide group, and its manufacture, JP2000-302803; Bernkop-Schnurch, Hornof et al., 2004, Thiolated chitosans, Eur J Pharm Biopharm (57): 9-17; Schmitz, Grabovac et al., 2008, Synthesis and characterization of a chitosan-N-acetyl cysteine conjugate, Int J Pharm (347): 79-85; Zhu, Su et al., 2012, Synthesis of thiolated chitosan and preparation nanoparticles with sodium alginate for ocular drug delivery, Mol Vis (18): 1973-1982).

El quitosano-NAC usado en la presente invención necesita ser soluble en agua en el rango de concentración útil para la preparación de la solución oftálmica acuosa y las soluciones resultantes deben ser transparentes e incoloras. La formación de sal de quitosano-NAC con ácidos orgánicos o inorgánicos aumenta la solubilidad acuosa del quitosano. Las sales adecuadas de quitosano tiolado de la presente invención incluyen cualquier sal aceptable para uso farmacéutico con ácidos orgánicos tales como ácido acético, cítrico, fórmico y tartárico, así como ácidos minerales tales como HCl y H_2SO_4. La sal clorhidrato de quitosano-NAC es una realización preferente de la presente invención.

Lo importante es que tales vías de reacción y condiciones de reacción se usen para que, después de la síntesis y purificación, esencialmente todos los grupos tiol inmovilizados en la estructura principal de quitosano estén

presentes en forma libre y no en forma reticulada como disulfuros, es decir, solo estén mínimamente reticulados. Prácticamente todos los tioles unidos en el quitosano tiolado de la presente invención están en forma de grupos tiol libres, es decir, no están reticulados. Una cantidad mínima de reticulación durante la síntesis solo es aceptable siempre que la viscosidad del quitosano tiolado permanezca dentro de los parámetros establecidos y su solubilidad acuosa sea suficiente para la preparación de una solución oftálmica acuosa.

Se ha descubierto que es posible fabricar quitosano-NAC con un grado de reticulación muy bajo o incluso cero grado de reticulación de los grupos tiol exponiendo el quitosano-NAC a un agente reductor después de su síntesis, por ejemplo después de la hidrólisis alcalina de los restos de tioacetilo. El agente reductor puede seleccionarse del grupo de DTT, TCEP o $NaBH_4$, prefiriéndose $NaBH_4$. Además, se ha encontrado que la etapa de reducción debe llevarse a cabo a temperatura elevada, tal como 30°C o más o preferentemente 40°C o más. Además, deben emplearse altas cantidades de agentes reductores, tal como con una relación estequiométrica de agente reductor y polímero de estructura principal de quitosano de 2:1 o más.

Los polímeros de quitosano-NAC con un grado de grupos tiol reticulados de menos del 5%, preferentemente 4% o menos del total de los grupos tiol pueden sintetizarse de acuerdo con esta realización.

La viscosidad en solución acuosa del quitosano-NAC final de la presente invención preferentemente cae dentro de un cierto rango, y los presentes inventores han descubierto inesperadamente que la viscosidad del quitosano-NAC solo cae dentro de este rango preferente si durante la producción del quitosano-NAC el quitosano-NAC se procesa bajo ciertas condiciones y dentro de ciertos parámetros, particularmente de acuerdo con las condiciones de reducción establecidas anteriormente, que conducen a polímeros que están mínimamente reticulados. La viscosidad del producto resultante se encuentra preferentemente dentro de un rango aceptable, de modo que el quitosano-NAC será más útil en la formulación de gotas para ojos resultante. Por lo tanto, la viscosidad cinemática (0,5% en agua a 25°C) del polímero de quitosano-NAC está preferentemente dentro del intervalo de aproximadamente 1 a 15 mm^2/s, más preferentemente dentro del intervalo de aproximadamente 2 a 10 mm^2/s. Si la viscosidad es demasiado alta, entonces no se puede preparar una solución de gotas para ojos con el rango de concentración preferente de quitosano-NAC en la formulación, ya que el polímero permanecerá como una masa viscosa insoluble en el recipiente.

El quitosano-NAC necesita ser purificado para ser útil en la formulación de la presente invención (tal como después del paso # 3 anterior y, especialmente, después del tratamiento del quitosano-NAC con el agente reductor). El quitosano-NAC debe lavarse de tal manera que el producto resultante sea puro. Un método conocido se describe en Kast y Bernkop-Schnurch, 2001, Thiolated polymers - thiomers: development and in vitro evaluation of chitosan-thioglycolic acid conjugates, Biomaterials (22): 2345-2352.

Otro método sería lavar el quitosano-NAC con disolventes polares seguido de secado para eliminar los disolventes. Un disolvente preferente es el alcohol isopropílico, ya que no es tóxico, está fácilmente disponible y es económico, sin embargo, otros disolventes y otros alcoholes distintos del alcohol isopropílico también podrían funcionar. Este lavado puede repetirse según sea necesario, dependiendo del volumen de disolvente utilizado cada vez. Preferentemente, la etapa de lavado y secado se repite al menos una vez.

El paso de secado se puede llevar a cabo a temperatura ambiente y con humedad estándar, pero este proceso puede llevar mucho tiempo. Por lo tanto, el proceso de secado se realiza preferentemente a una temperatura elevada y/o bajo presión reducida. El secado del quitosano-NAC se realiza preferentemente a una temperatura elevada de al menos aproximadamente 40ºC a aproximadamente 70ºC y preferentemente durante al menos aproximadamente cinco horas. Se lleva a cabo un proceso de secado más preferente a temperaturas de al menos aproximadamente 50°C a aproximadamente 60°C durante aproximadamente 10 a 24 horas. Un proceso de purificación de múltiples etapas preferente sería lavar el polímero de quitosano-NAC tres veces con alcohol isopropílico y recuperar el sólido por centrifugación seguido de secado a aproximadamente 60°C durante aproximadamente 15 a 20 horas.

La solución oftálmica acuosa según la presente invención puede contener al menos un excipiente oftálmico compatible. Se puede emplear cualquier excipiente adecuado, por ejemplo, para ajustar la tonicidad, la viscosidad de la solución o para estabilizar el pH, para aumentar la solubilidad del principio activo, para aumentar la comodidad ocular después de la aplicación, o para estabilizar la formulación en general.

El pH de la solución oftálmica acuosa se ajusta agregando cualquier ácido, base o tampón de ajuste de pH aceptable para uso fisiológico y oftálmico para tener un pH dentro del rango de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7. Un pH muy por debajo de aproximadamente 5,5 estaría fuera de los parámetros fisiológicos aceptables (la solución causaría una sensación de ardor o escozor intenso en el ojo). A un pH muy superior a 7, es difícil formar una solución estable del quitosano-NAC donde no se precipita fuera de la solución. Por lo tanto, debido a la facilidad de formular una solución estable, se prefiere un pH 5 inferior a 7. El pH preferente de la solución oftálmica acuosa de la presente invención está entre aproximadamente 5,8 y aproximadamente 6,8, siendo mucho más preferente un pH de 6,0 a 6,6.

Los ejemplos de ácidos adecuados usados en la formulación de la presente invención incluyen ácido acético, bórico,

cítrico, láctico, fosfórico, clorhídrico y similares, y los ejemplos de bases incluyen hidróxido de sodio, fosfato de sodio, borato de sodio, citrato de sodio, acetato de sodio, lactato de sodio, trometamina, THAM (trishidroximetilamino-metano) y similares. Una realización preferente de la presente invención es un sistema tampón de ácido bórico y borato de sodio, que también contiene un poliol tal como manitol para aumentar la capacidad de tampón en el intervalo de pH más preferente de 6,0 a 6,6.

Los ejemplos de excipientes adecuados usados en la formulación de la presente invención para aumentar la estabilidad de la formulación incluyen etilendiaminotetraacetato disódico (Na_2-EDTA), metabisulfito de sodio, manitol, polietilenglicol y similares.

La osmolaridad de la formulación oftálmica tópica de la presente invención es generalmente de aproximadamente 150 a aproximadamente 400 miliosmolar (mOsM), más preferentemente de aproximadamente 200 a aproximadamente 350 mOsM, siendo la osmolaridad de aproximadamente 250 a aproximadamente 330 mOsM la más preferente. La osmolaridad se puede ajustar usando cantidades apropiadas de agentes iónicos o no iónicos aceptables fisiológica y oftálmicamente. El cloruro de sodio es un agente osmótico común. Además, se pueden usar cantidades equivalentes de una o más sales formadas por cationes tal como potasio, amonio y similares, y aniones tal como cloruro, citrato, ascorbato, borato, fosfato, bicarbonato, sulfato, tiosulfato, bisulfato y similares además de o en lugar de cloruro de sodio para lograr la osmoralidad dentro del rango indicado anteriormente. Además, los agentes no iónicos tales como manitol, dextrosa, sorbitol, glicerol, glucosa y similares también pueden usarse para ajustar la osmolaridad. El cloruro de sodio y el manitol son los agentes preferentes para ajustar la presión osmótica.

La formulación oftálmica puede contener lubricantes para proporcionar un alto nivel de confort ocular adecuado para la aplicación regular necesaria en el tratamiento de DES. Existen muchos tipos de agentes lubricantes, tales como polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, polioles líquidos, ácido hialurónico y sus sales farmacéuticamente aceptables, lubricina y derivados de celulosa; sin embargo, los agentes preferentes son polietilenglicol e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC).

En una realización preferente, la solución oftálmica según la presente invención contiene los siguientes excipientes además del clorhidrato de N-(N-acetilcisteinil-)quitosano:

Ácido bórico en una cantidad de 1,0 a 16,0 mg/ml, preferentemente de 8 a 16 mg/ml;

Polietilenglicol 400 en una cantidad de 0,01 a 5,0 mg/ml, preferentemente de 1 a 5 mg/ml;

Na_2-EDTA en una cantidad de 0,01 a 0,5 mg/ml;

Manitol en una cantidad de 0,01 a 5,5 mg/ml, preferentemente de 0,1 a 4 mg/ml;

Cloruro de sodio en una cantidad de 0,01 a 9 mg/ml, preferentemente de 1 a 3 mg/ml; e

Hidroxipropil metilcelulosa en una cantidad de 0,01 a 20 mg/ml, preferentemente de 1 a 3 mg/ml.

La solución oftálmica según la presente invención tiene que ser estéril y puede esterilizarse de cualquier manera adecuada. Un método de esterilización preferente particular es la filtración estéril. La solución oftálmica según la presente invención puede contener conservantes, tal como cloruro de benzalconio, aunque esto es menos preferente.

La solución oftálmica acuosa que contiene quitosano-NAC puede administrarse a los ojos de un paciente por cualquier medio adecuado para la administración tópica. Ésta está preferentemente en forma de una solución acuosa de gotas para ojos. Esta solución puede estar en un recipiente de un solo uso que es estéril hasta que se abre y, por lo tanto, no necesita tener un conservante, o puede tener la forma de un recipiente de usos múltiples que permanece estéril después de abrirse o en un recipiente de usos múltiples con una formulación que contiene un conservante.

Los grupos tiol de los polímeros de quitosano-NAC tienden a formar enlaces disulfuro en soluciones acuosas, reduciendo así las propiedades mucoadhesivas del quitosano-NAC. Se descubrió que esta tendencia depende de la presencia de oxígeno en la solución oftálmica acuosa.

Se ha encontrado que es posible estabilizar los grupos tiol libres del quitosano-NAC empleados según la presente invención en solución acuosa aún más cuando se almacena la solución en condiciones libre de oxígeno, o en condiciones esencialmente libre de oxígeno. La atmósfera libre de oxígeno puede ser una atmósfera de nitrógeno, una atmósfera de vacío o una atmósfera que consiste en gases nobles.

Por lo tanto, cuando la solución se coloca en un recipiente, debe hacerse en ausencia de oxígeno. Además, después de que el recipiente se llena con la solución oftálmica acuosa de la presente invención, debe permanecer libre de oxígeno. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un recipiente que mantiene la solución oftálmica acuosa libre de oxígeno durante el almacenamiento. Por consiguiente, un aspecto de la presente invención comprende un recipiente esencialmente libre de oxígeno que contiene la solución oftálmica acuosa. Como "esencialmente libre de oxígeno", debe entenderse una atmósfera con una cantidad de 1,5% de oxígeno o menos.

La concentración de oxígeno disuelto en solución durante la producción de la formulación y el llenado en los recipientes es inferior a 1,0 mg/L, más preferentemente inferior a 0,5 mg/L, incluso más preferentemente en el intervalo de 0,1 mg/L.

En una realización preferente, el recipiente está hecho de un material que es impermeable al oxígeno, de modo que después del llenado, la solución oftálmica permanece esencialmente libre de oxígeno durante un período prolongado de tiempo. Dichos recipientes pueden ser polímeros de vidrio o revestidos de vidrio, polímeros de metal o revestidos de metal. En otra realización preferente, el recipiente está hecho de un polímero que contiene un absorbente de oxígeno que evitaría que el oxígeno ingrese a la solución a través de las paredes del recipiente. Dichos absorbentes de oxígeno incluyen sales de hierro, sulfitos, ácido ascórbico, sales de ácidos grasos insaturados, complejos de metal-poliamida o sistemas basados en paladio/H_2. Por ejemplo, el documento WO 09/32526 describe una película que tiene una capa de barrera de oxígeno activa que comprende una composición de eliminación de oxígeno mezclada de una resina termoplástica que tiene dobles enlaces carbono-carbono sustancialmente en su cadena principal, una sal de metal de transición y un polímero de barrera de oxígeno con propiedades de barrera al oxígeno.

Además, el recipiente en sí puede fabricarse con un material hermético a los gases con un eliminador de oxígeno incorporado y un sistema de cierre sin aire.

En una realización preferente, se proporciona un primer recipiente que contiene la solución oftálmica y un segundo recipiente que contiene dicho primer recipiente.

Así, por ejemplo, el recipiente que contiene la solución oftálmica de la presente invención está contenido dentro de una bolsita o bolsa hermética a los gases. En particular, una bolsita o bolsa hecha de aluminio o un laminado de aluminio o una composición de aluminio puede contener uno o más subrecipientes (es decir, "primeros recipientes") que contienen la solución oftálmica de acuerdo con la invención. El segundo recipiente, es decir, la bolsita o bolsa también puede contener un absorbente de oxígeno adicional (por ejemplo, PKT KH-20 Pharmakeep® o eliminador de oxígeno Stabilox®) como se usa en algunos envasados estándar. Incluso en el caso de que la bolsita se selle al vacío o en una atmósfera inerte, puede ser necesario agregar un absorbente de oxígeno para eliminar el oxígeno residual del subrecipiente. La bolsita puede contener uno o más recipientes de dosis única o recipientes de dosis múltiples, por ejemplo cinco recipientes de dosis única por bolsita. En el caso del recipiente de múltiples dosis, debe preservar la solución oftálmica de acuerdo con la presente invención en una condición estéril y en una condición esencialmente libre de oxígeno.

El quitosano-NAC contenido en el recipiente de acuerdo con la invención tiene preferiblemente un contenido de grupos tiol libres de 80 µmol/g de polímero a 250 µmol/g de polímero, preferiblemente 105 µmol/g de polímero a 250 µmol/g de polímero después del almacenamiento de al menos 12 meses a temperatura ambiente. Esto significa que, según la presente invención, los grupos tiol libres permanecen en el quitosano-NAC y que la formulación resultante es estable durante un período prolongado de tiempo. Este período de tiempo es preferiblemente al menos aproximadamente 12 meses, más preferiblemente al menos 18 meses e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 24 meses. Esta preferencia de larga estabilidad se debe al hecho de que algunos productos terminan teniendo largos tiempos de almacenamiento y retrasos en la entrega comercial y las cadenas de suministro que podrían dar como resultado que un producto menos estable esté fuera de los parámetros aceptables.

Además, preferentemente la cantidad de grupos tiol reticulados en el quitosano-NAC contenido en el recipiente de acuerdo con la invención es 30% o menos del total de grupos tiol en el mismo, preferentemente 25% o menos, mucho más preferente 20% o menos después de almacenarse durante al menos 12 meses, más preferentemente al menos 18 meses. Como se mencionó anteriormente, la estabilidad de los grupos tiol libres en la solución es especialmente buena si se emplea un quitosano-NAC con solo un grado mínimo de grupos tiol reticulados para fabricar la soluciónn.

En la realización descrita anteriormente donde hay un segundo recipiente, por ejemplo una bolsita hermética a los gases, que contiene uno o más primeros recipiente/s, por ejemplo recipientes de un solo uso hechos de LDPE, el contenido de grupos tiol libres en la solución permanece preferentemente dentro del intervalo definido por la presente invención después de abrir el primer recipiente durante al menos 30 días. El tiempo terapéutico necesario para, por ejemplo 5 recipientes son 5 días, por lo que esta duración de estabilidad es más que suficiente.

Como se mencionó anteriormente, se encontró que especialmente si se emplea un quitosano-NAC con solo un grado mínimo de grupos tiol reticulados para fabricar la solución oftálmica de la presente invención, los grupos tiol libres permanecieron estables incluso después de que se abrió el segundo recipiente que proporciona la barrera de oxígeno, es decir, se descubrió que 30 días después de la apertura del segundo recipiente, el aumento de los grupos tiol reticulados era <15% de la cantidad de grupos tiol inicialmente presentes en la solución antes de la apertura.

La presente invención se refiere principalmente a las soluciones oftálmicas en el tratamiento de sujetos humanos, pero también puede emplearse en el tratamiento de otros sujetos mamíferos, tales como perros y gatos, con fines veterinarios.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes de la invención a los procedimientos específicos descritos en los mismos.

Ejemplos

Ejemplo 1: determinación del contenido del grupo tiol

La cuantificación de los grupos tiol se basa en un método de química en húmedo que emplea 5,5'-ditio-bis(ácido 2-nitrobenzoico, DTNB, "reactivo de Ellman"). Los grupos tiol libres reaccionan con el reactivo bajo la formación de un disulfuro mixto, mientras que se libera un equivalente de ácido 2-nitro-5-tiobenzoico. En medio alcalino tamponado (pH = 8,05), el tiolato resultante proporciona una solución de color claramente amarillo, cuya absorción se puede medir fotométricamente a 450 nm.

Se pesaron 119,0 - 121,0 mg de la solución de muestra que contenía clorhidrato de N- (N-acetilcisteinil-)quitosano al 0,1% en recipientes Eppendorf de 1,5 ml. Se determinaron tres valores de cada solución. Se pesaron con precisión 25,0 mg de N-acetilcisteína y se resolvieron en 25,0 ml de tampón de borato (pH 6,75). Esta solución se diluyó luego para una curva de calibración. Se usó un tampón de borato para el valor en blanco. A cada solución se le añadió tampón fosfato pH 8,0 hasta un volumen final de 600 µl. Se agregaron a cada solución 600 µl de solución de Ellman recién preparada (que contenía 20 mg de 5,5'-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzoico) en 100 ml de tampón de fosfato (pH 8,0) (solución estándar, solución de muestra y valor en blanco). Las soluciones se mezclaron bien y se incubaron durante 1,5 horas bajo protección UV. Posteriormente, las soluciones de muestra que contenían clorhidrato de N-(N-acetilcisteinil-)quitosano se centrifugaron a 13400 rpm durante 5 minutos. Finalmente, 1,1 ml de cada solución (solución estándar, solución de muestra y valor en blanco) se transfirieron a semimicrocubetas y se probaron a 450 nm en un espectrofotómetro frente al valor en blanco.

Se determinó que el contenido medio de grupos tiol libres del quitosano tiolado en las soluciones de muestra era del 2,61% (p/v) que corresponde a un valor de 178,5 µM de grupos tiol libres/g de polímero.

Ejemplo 2: Composición de la formulación:

La siguiente solución oftálmica acuosa se preparó usando clorhidrato de N-(N-acetilcisteinil-) quitosano con un contenido de grupos tiol libres de 158 µM/g polímero y una viscosidad cinemática (25 °C, solución acuosa al 0,5%) de 5,63 mm^2/s. Todos los demás ingredientes son aditivos farmacéuticos. La solución se esterilizó por filtración estéril.

La formulación de gotas para los ojos tenía la siguiente composición:

Tabla 1 Composición de la solución oftálmica acuosa

Compuesto	**Cantidad [mg]**
Clorhidrato de N-(N-acetilcisteinil-)quitosano	1,0
Ácido bórico	12,4
Polietilenglicol 400 (PEG 400)	3,0
Na_2-EDTA	0,42
Manitol	2,0
NaCl	2,0
HPMC	1,5
NaOH	Cantidad suficiente
Aqua bidestillata	Añada cantidad suficiente para preparar 1 ml

Las propiedades físico-químicas de la formulación estaban dentro de las siguientes especificaciones:

Tabla 2 Propiedades físico-químicas de la solución oftálmica acuosa

Valor de pH-	6,0 – 6,6
Osmolalidad *[mOsmol/kg]*	250 - 330
Contenido de grupos tiol libres *[µMol/g de polímero]*	140 - 250
Contenido de quitosano tiolado *[mg/ml]*	0,90 – 1,10
Esterilidad	estéril

Este ejemplo muestra que el quitosano-NAC puede formularse de acuerdo con la presente invención para cumplir los requisitos para preparaciones oftálmicas.

Ejemplo 3: estabilidad a largo plazo de la solución oftálmica acuosa:

Grupo 1: Se preparó una formulación de acuerdo con la presente invención que contenía 1 mg de clorhidrato de N-(N-acetilcisteinil-)quitosano/ml en condiciones inertes y posteriormente se vertió asépticamente usando tecnología de soplado-llenado-sellado en tarjetas de cinco recipientes de dosis única fabricados a partir de LDPE (polietileno de baja densidad) hasta un volumen de 0,3 ml. Cada tarjeta fue empaquetada en una bolsita de aluminio que contenía un absorbente de oxígeno (PKT KH-20 Pharmakeep®).

Grupo 2: Se preparó una formulación de acuerdo con la presente invención que contenía 1 mg de clorhidrato de N-(N-acetilcisteinil-)quitosano/ml, se vertió en tarjetas de cinco recipientes de dosis única y se envasó en bolsitas de aluminio como se describió anteriormente, pero en este grupo las bolsitas de aluminio no contenían absorbentes de oxígeno.

Las muestras de formulaciones preparadas en condiciones de fabricación para el grupo 1 y el grupo 2 se almacenaron en condiciones controladas a una temperatura de 25 °C y 40% de humedad relativa durante 18 meses. El contenido de grupos tiol libres se midió como se describe en el ejemplo 1 en intervalos de tiempo regulares. Al mismo tiempo, la concentración de oxígeno dentro de la bolsa se midió con un analizador de gases de oxígeno (PBI Dansensor CheckPoint II). Los resultados de las mediciones del grupo tiol se muestran en la Figura 1 (grupo 1: barras grises, grupo 2: barras blancas). Los resultados indican que cuando la formulación oftálmica acuosa de la presente invención que contiene polímero de quitosano-NAC se almacena en una atmósfera esencialmente libre de oxígeno con niveles máximos de oxígeno de menos de 1,5% (como lo proporciona un absorbente de oxígeno) el contenido de tiol libre permanece alto, dentro de parámetros aceptables por un período de al menos 18 meses. Sorprendentemente, incluso cuando se almacenó sin un absorbente de oxígeno, el contenido del grupo tiol de la solución se mantuvo estable durante un período de tiempo de aproximadamente 1 mes. Después de 4 meses, el contenido del grupo tiol todavía se mantenía dentro de los parámetros aceptables, pero se observó una disminución del contenido del grupo tiol del 20%. Los niveles de oxígeno en las bolsitas del grupo 2 estuvieron en el rango de 3,0 a 5,7% durante todo el período de almacenamiento de 18 meses.

Ejemplo 4: estabilidad a corto plazo de la solución oftálmica acuosa después de la extracción de recipientes de dosis única de la bolsa de aluminio

Se preparó una formulación de acuerdo con la presente invención que contenía 1 mg de clorhidrato de N-(N-acetilcisteinil-)quitosano/ml en condiciones inertes y posteriormente se vertió asépticamente en tarjetas de cinco recipientes de dosis única fabricados a partir de LDPE (polietileno de baja densidad) hasta un volumen de 0,3 ml con tecnología de soplado, llenado y sellado. Cada tarjeta fue empaquetada en una bolsita de aluminio que contenía un absorbente de oxígeno (PKT KH-20 Pharmakeep®). Dentro de un mes después de la producción, las tarjetas se retiraron de las bolsitas y se almacenaron en cajas plegables cerradas bajo condiciones de aire ambiente, humedad y temperatura durante 30 días. El contenido de grupos tiol libres en la formulación se midió el día 0, día 5, día 12, día 19 y día 30.

Los resultados se muestran en la Figura 2 (valores medios de 3 lotes con desviaciones estándar). Estos resultados indican que el producto permanece dentro de los parámetros deseados durante un período de tiempo de 30 días cuando se almacena en unidades de dosis única de LDPE en presencia de oxígeno en condiciones de aire ambiente. La disminución de los grupos tiol libres después de 30 días fue aproximadamente del 10%. Se observaron resultados similares incluso cuando la bolsita de aluminio que contenía las tarjetas se almacenó durante 5 meses a una temperatura de 40 °C antes de retirar las tarjetas.

Ejemplo 5: Síntesis de clorhidrato de N-(N-acetilcisteinil-)quitosano

Los polímeros de clorhidrato de N-(N-acetilcisteinil-)quitosano (Figura 3) con diferentes grados de tiolación se sintetizaron mediante la unión covalente de N,S-diacetilcisteína a las aminas primarias de quitosano mediante sustitución nucleófila, seguido de la liberación de grupos tiol libres en medios alcalinos. Se usaron diferentes quitosanos como materias primas para la síntesis (ver Tabla 3). El proveedor proporcionó datos sobre la fuente y el grado de desacetilación. El peso molecular se determinó mediante detección triple acoplada por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando el Viscotek TDA305 de Malvern Instruments. Las muestras se disolvieron en ácido acético al 5% y se separaron isocráticamente en columnas ViscoGEL.

Tabla 3 Lista de especificaciones de materia prima de quitosano

Materia prima (proveedor)	Fuente	Grado de desacetilación	Peso molecular
Quitosano (Sres. Primex)	Pandalus borealis	85 - 95%	25 kDa - 250 kDa
Quitosano (Sres. HMC$^+$)	Chionoecetes opilio	89% 93%	100 kDa – 250 kDa

HCl de Quitosano (Sres. HMC+)	Chionoecetes opilio	88%	20 kDa
HCl de Quitosano (Sres. Aoxing)	Fuente animal sin especificar	91%	150 kDa

El grado de tiolación resultante depende de la relación en peso de quitosano y el éster activo de N'S-diacetilcisteína, así como de las condiciones de reacción (valor de pH y temperatura durante la sustitución nucleófila). Se sintetizaron polímeros de quitosano-NAC con un grado de tiolización en el intervalo de 40 μM/g de polímeros a 400 μM/g de polímeros.

Para la síntesis de los 5 lotes diferentes de polímero de quitosano-NAC enumerados en la Tabla 4, se emplearon las siguientes condiciones de reacción: se usó quitosano con un peso molecular de 100 kDa a 250 kDa (proveedor HMC +) como material de partida. La relación en peso entre el quitosano y el éster activo de N'S-diacetilcisteína fue 1: 1 (% en peso) y la relación en peso entre el quitosano y el agente reductor borohidruro de sodio fue 1:2 (% en peso). La reducción con borohidruro de sodio se llevó a cabo a una temperatura elevada de aproximadamente 40 °C.

Tabla 4 Caracterización de los polímeros de quitosano-NAC en términos de peso molecular y grado de tiolización.

Peso molecular	Grado de tiolización
145 kDa	220 μM/g de polímero
165 kDa	225 μM/g de polímero
200 kDa	210 μM/g de polímero
235 kDa	220 μM/g de polímero
200 kDa	220 μM/g de polímero

Todos los polímeros de quitosano-NAC enumerados en la Tabla 4 fueron adecuados para la preparación de una solución oftálmica acuosa de acuerdo con la presente invención en términos de solubilidad en agua, viscosidad y contenido de grupos tiol.

Ejemplo 6: Condiciones de reacción para la síntesis de quitosano-NAC mínimamente reticulado

La unión covalente de N,S-diacetilcisteína a las aminas primarias de quitosano fue seguida por hidrólisis alcalina de los restos tioacetilo a pH 8 ± 0,2. Los enlaces disulfuro intramoleculares e intermoleculares resultantes se redujeron luego en condiciones inertes a 40ºC usando un gran exceso de borohidruro de sodio (quitosano: borohidruro de sodio = 1:2 (% en peso)). Posteriormente, se destruyó el exceso de borohidruro de sodio mediante la adición de HCl 5N que simultáneamente generó la sal de clorhidrato de quitosano-NAC a pH 1 ± 0,1. El producto blanquecino se precipitó con 2-propanol, se recuperó por centrifugación y se secó de acuerdo con un procedimiento definido.

Como se muestra en numerosos experimentos, las temperaturas elevadas, así como cantidades sorprendentemente altas de reactivo reductor, fueron esenciales para una reducción cuantitativa y reproducible, ya que los polímeros de quitosano-NAC reticulados con disulfuro forman hidrogeles o se vuelven insolubles en sistemas acuosos (ver Tabla 5).

Temperatura	**Quitosano : $NaBH_4$ [% en peso]**	**Solución acuosa de baja viscosidad**	**Quitosano –NAC polímero No.**
20°C	1:1	NO	1
	1:2	NO	2
30°C	1:1	NO	3
	1:2	NO	4
40°C	1:1	NO	5
	1:2	SI	6

La única opción para utilizar potencialmente los polímeros 1-5 para la fabricación de la solución oftálmica acuosa de acuerdo con esta invención era degradar térmicamente estos derivados reticulados de disulfuro a 60 °C durante más de 4 días (dependiendo del grado y tipo (inter y intramolecular) de entrecruzamiento) para cumplir con las

especificaciones en términos de viscosidad cinemática de una solución acuosa al 0,5% en peso, que preferiblemente está en el rango de 1 a 15 mm^2/s. Además, el proceso de secado lleva mucho tiempo. Por el contrario, el polímero No. 6 de quitosano-NAC mínimamente reticulado sintetizado en condiciones de reacción optimizadas cayó dentro del intervalo preferido de la viscosidad después de un tiempo de secado de menos de 20 horas a 60 °C.

Ejemplo 7: Caracterización de quitosano-NAC mínimamente reticulado

Los polímeros de quitosano-NAC Nos. 1 y 6 según el ejemplo 6 se caracterizaron en términos de contenido relativo de grupos tiol libres, peso molecular y viscosidad dinámica antes y después de la reducción selectiva y cuantitativa de cualquier disulfuro presente en los polímeros finales con tris(2- carboxietil)fosfina (TCEP).

Determinación del contenido relativo de grupo tiol: los polímeros de quitosano-NAC solubilizados como soluciones acuosas de 1,5% (p/p) se incubaron con/sin TCEP (3 mg/ml) durante 90 minutos a temperatura ambiente. Después de la acidificación con IN HCl, los polímeros de quitosano-NAC se precipitaron repetidamente con 2-propanol y se recuperaron por centrifugación. El residuo se disolvió en agua destilada seguido de la adición de 2,2'-ditiodipiridina que genera una tiona estable tras la reacción con restos de tiol libres. Esta sustancia tautomérica podría cuantificarse fácilmente mediante análisis UV a 343 nm.

Medición de la viscosidad dinámica: los polímeros de quitosano-NAC solubilizados como soluciones acuosas de 0,5% (p/p) se incubaron con/sin TCEP (2 mg/ml) durante 90 minutos a temperatura ambiente. La caracterización reológica se realizó mediante medición rotacional a una velocidad de corte constante de $5s^{-1}$ a 25 °C.

Medición del peso molecular (análisis SEC): para determinar la influencia de las condiciones de reacción sobre el peso molecular de la estructura principal de quitosano, se preparó una sal de HCl de quitosano no modificada utilizando las condiciones de reacción idénticas para la síntesis del polímero 6 como se describe en el ejemplo 6 pero sin la adición del éster activo de N'S-diacetilcisteína. Los polímeros de quitosano y quitosano-NAC solubilizados en ácido acético al 5% en una concentración del 0,1% (p/p) se incubaron con/sin TCEP (1 mg/ml) durante 90 minutos a temperatura ambiente. Los pesos moleculares se separaron isocráticamente a una velocidad de flujo de 0,7 ml/min y se determinaron por detección triple usando el Viscotek TDA305 de Malvern Instruments.

Los resultados de las mediciones del grupo tiol del polímero 1 y el polímero 6 se muestran en la Figura 4 (sin TCEP: barras grises, después de la reducción con TCEP: barras blancas; valores medios de 3 mediciones con desviaciones estándar). Los resultados de la determinación de la viscosidad dinámica de una solución al 0,5% (p/p) de polímero 1 y polímero 6, respectivamente, se muestran en la Figura 5 (sin TCEP: barras grises, después de la reducción con TCEP: barras blancas).

Estos resultados indican que incluso la presencia de una cantidad relativamente pequeña de estructuras reticuladas de disulfuro (9% de todos los grupos de N-acetilcisteína inmovilizados en el polímero en el caso del polímero 1, sin tratamiento con TCEP) tuvo un impacto masivo en la viscosidad del Polímero de quitosano-NAC en una solución acuosa, mientras que el quitosano-NAC mínimamente reticulado con solo alrededor del 3% de sus grupos tiol se presentan como disulfuros solubilizados como una solución acuosa de baja viscosidad que era adecuada para la preparación de gotas para los ojos.

Además, la correlación entre las propiedades reológicas de los polímeros y el contenido de reticulación de disulfuro se confirmó mediante análisis SEC. Los polímeros de quitosano-NAC mínimamente reticulados (polímero 6) mostraron una ligera disminución del peso molecular del 20-30% después de la reducción cuantitativa por TCEP. Después de la reducción cuantitativa, el peso molecular del polímero 6 fue comparable al peso molecular del HCl de quitosano no modificado. Sin embargo, la cantidad principal de quitosano-NAC parcialmente reticulado (9%) (polímero 1) exhibió pesos moleculares más allá de los límites de exclusión de las columnas e incluso la fracción analizable (aproximadamente 20%) produjo pesos moleculares cuatro veces superiores a su peso inicial. Después de la reducción cuantitativa con TCEP, el peso molecular del polímero 1 estaba en el mismo rango que el peso molecular del HCl de quitosano no modificado. Como se esperaba, la reacción de HCl de quitosano no modificado con TCEP no dio lugar a ninguna disminución del peso molecular.

Ejemplo 8: prueba de mucoadhesión

Las propiedades mucoadhesivas de los polímeros de quitosano-NAC con diferentes grados de grupos tiol libres se evaluaron midiendo su interacción con mucinas aisladas. Los polímeros de quitosano-NAC se sintetizaron como se describe en el ejemplo 5 y se usaron para preparar formulaciones oftálmicas acuosas como se describe en el ejemplo 2. El HCl de quitosano no modificado se usó como control.

Las formulaciones oftálmicas acuosas que contenían quitosano-NAC o HCl de quitosano, respectivamente, se incubaron a 32 °C durante 30 minutos con soluciones acuosas de mucinas gástricas de cerdo purificadas en gradiente de cloruro de cesio y aisladas. La concentración final de polímero en cada muestra fue del 0,15% (p/p). Se dejó que se formaran los agregados durante la noche y se retiraron de la solución mediante centrifugación al día siguiente. Después de la centrifugación, los agregados se resuspendieron en agua destilada para las mediciones reológicas. La estabilidad de las suspensiones resultantes se evaluó mediante pruebas de barrido de amplitud oscilatoria (Reómetro MCR 101, sistema de medición de placa cónica) a una frecuencia angular de 10 rad/s para

determinar el rango lineal viscoelástico.

Los resultados de este ejemplo mostraron que los polímeros de quitosano-NAC con un grado de tiolación en el rango de aproximadamente 80 µM a 250 µM por g de polímero interactuaron fuertemente con las mucinas como lo demuestra una amplia región viscoelástica lineal y la gran diferencia entre el módulo de almacenamiento G' y el módulo de pérdida G". Un ejemplo se muestra en la Figura 8 (contenido de grupos tiol libres 80 µmol/g).

El efecto descrito anteriormente dependía del grado de tiolación. El HCl de quitosano no modificado y el quitosano-NAC con un grado de modificación de 40 µM de grupos tiol/g de polímero mostraron solo una interacción débil con las mucinas como lo demuestra un rango viscoelástico lineal inexistente y muy estrecho, respectivamente. Los resultados se muestran en la Figura 6 (sin tiolación, HCl de quitosano no modificado), Figura 7 (contenido de grupos tiol libres 40 µmol/g) y Figura 8 y se describen en la Tabla 6. Solo cuando el grado de tiolación fue de aproximadamente 80 µM/g de polímero, el quitosano-NAC comenzó a exhibir fuertes propiedades mucoadhesivas como lo demuestra la fuerte interacción con las mucinas.

Tabla 6 Determinación de la fuerza de interacción polímero-mucina

Materia prima	Contenido de grupos tiol libres [µmol/g de tiómero]	Deformación γ (rango LVE) [%]
HCl de quitosano	-	-
Quitosano-NAC	40	15
Quitosano -NAC	80	90

Ejemplo 9: Determinación del tiempo de residencia ocular de soluciones oftálmicas acuosas que contienen 0,1% de quitosano-NAC radiomarcado después de la instilación ocular simple en conejos

El objetivo del estudio fue obtener datos farmacocinéticos de quitosano-NAC marcado con ^{124}I en una concentración de 0,1% (p/p) después de la aplicación tópica única de la sustancia de prueba en una solución tampón fisiológica en el ojo de conejos blancos de Nueva Zelanda. Dentro de este estudio piloto, los cuatro animales de prueba recibieron una instilación tópica única de ^{124}I-quitosano-NAC 0,1% (p/p) en el ojo derecho. Como controles, dos animales recibieron adicionalmente una sola aplicación tópica de ^{124}I-quitosano-HCl 0,1% (p/p) en el ojo izquierdo y los dos animales restantes recibieron ^{124}I-NaI tamponado en el ojo izquierdo. Se realizaron mediciones dinámicas de microPET (ventana de energía de 350 - 650 keV, ventana de tiempo de 6 ns) durante 1 hora después de la administración de las sustancias de prueba. Además, se realizaron exploraciones estáticas de 15 minutos a las 3, 6 y 9 horas, exploraciones estáticas de 30 minutos a las 24 horas y exploraciones estáticas de 60 minutos a las 48, 72 y 96 horas después de la administración de la sustancia de prueba. Como parámetro de resultado principal, se monitorizaron las concentraciones de radiactividad en los sitios de aplicación. Primero se generó un factor de calibración para convertir unidades de imágenes microPET en concentraciones de radiactividad absolutas midiendo un fantoma de cilindro de calibración lleno con una concentración conocida de radiactividad de solución Na^{124}I. La concentración de la sustancia de prueba radioactiva se cuantificó a partir de cada imagen usando el software de análisis de imágenes AMIDE2. Se colocó una región de interés elipsoidal (ROI) en el borde de los ojos en la imagen de transmisión sagital, por lo que el área con alta captación de actividad ubicada en el carúnculo (esquina interna del ojo) se excluyó de las ROI. De las curvas de concentración de radioactividad (TAC)- tiempo TOI definido, lo que significa que se calculó la concentración de radiactividad (µCi/g) en función del tiempo en el tejido definido por la ROI. El porcentaje de dosis aplicada por gramo de tejido (% AD/g) se calculó como la concentración promedio de tejido (µCi/g) dividido por la radioactividad totalmente aplicada (µCi) al comienzo del experimento. Los valores de área bajo la curva se calcularon a partir de las curvas de concentración de radioactividad en el tiempo usando el software PRISMS (GraphPad Software, La Jolla, CA).

Como un parámetro de control de calidad adicional, se midió el contenido del grupo tiol en la solución de quitosano-NAC marcada con ^{124}I antes de la administración.

Los resultados se muestran en la Figura 9. Na ^{124}I se eliminó rápidamente del ojo y apenas se detectó a las 6 horas después de la aplicación. La administración única de soluciones de ^{124}I-quitosano-NAC al 0,1% (p/p) produjo un aumento de las concentraciones de actividad en el ojo administrado en comparación con ^{124}I-quitosano-HCl, lo que indica un aumento en las propiedades mucoadhesivas. A las 24 horas después de la administración, la concentración de actividad en los ojos tratados con 0,1% (p/p) de ^{124}I- quitosano-NAC fue casi 2,2 veces mayor en comparación con los ojos ^{124}I-quitosano-HCl (2,16 ± 0,36 frente a 1,21 ± 0,26% AD/g, respectivamente). Esta diferencia se mantuvo durante el siguiente período de observación, de modo que a las 48 horas después de la administración se encontraron 2,35 ± 0,15% AD/g (^{124}I-quitosano-NAC) frente a 1,06 ± 0,30% AD/g (^{124}I-quitosano-HCl). Las concentraciones de actividad para ambas sustancias de prueba aplicadas disminuyeron y fueron casi comparables a las 96 horas después de la administración.

La determinación del contenido del grupo tiol para las soluciones de quitosano-NAC marcadas con ^{124}I utilizadas para este estudio (dos soluciones preparadas en dos días diferentes) mostró que aproximadamente 110 µM y 130 µM de grupos tiol/g de polímero, respectivamente, permanecieron libres, es decir, forma no oxidada después del radiomarcado con reactivo de Bolton-Hunter.

Ejemplo 10: Comparación del tiempo de residencia ocular de soluciones oftálmicas acuosas que contienen quitosano-NAC radiomarcado al 0,1% o HA-cisteamina radiomarcada al 0,1% después de la instilación ocular simple en conejos

Además del estudio mencionado anteriormente, se obtuvieron datos farmacocinéticos de quitosano-NAC marcado con ^{124}I y hialuronano tiolado marcado con ^{124}I (HA-cisteamina) después de la aplicación tópica de la sustancia de prueba en una concentración de 0,1% (p / p) en una solución de tampón fisiológico en el ojo de conejos blancos hembra de Nueva Zelanda. En este estudio, los sujetos de prueba recibieron una instilación tópica única de 0,1% (p / p) de ^{124}I-HA-cisteamina (n = 3) o 0,1% (p / p) de ^{124}I-quitosano-NAC (n = 2) en el ojo derecho mientras que el ojo izquierdo se mantuvo sin tratamiento. Se realizaron mediciones repetidas de microPET durante hasta 3 días (72 horas) después de la aplicación de las sustancias de prueba. Como parámetro principal del estudio, se monitorearon las concentraciones de radiactividad en los sitios de aplicación. Por lo tanto, las mediciones dinámicas de microPET (ventana de energía de 350 - 650 keV, ventana de tiempo de 6 ns) se realizaron durante 1 hora después de la administración de las sustancias de prueba. Además, se realizaron exploraciones estáticas de 15 minutos a las 6 horas, exploraciones estáticas de 30 minutos a las 24 horas y exploraciones estáticas de 60 minutos a las 48 y 72 horas después de la administración de la sustancia de prueba.

El análisis cuantitativo de las imágenes de microPET obtenidas se realizó como se describió anteriormente y los resultados mostrados en la Figura 10 se dan como valores de área bajo la curva (AUC) calculados a partir de las curvas de concentración de radioactividad en el tiempo (% AD * h / g). La determinación del contenido del grupo tiol en las soluciones de quitosano-NAC marcadas con ^{124}I y ^{124}I-HA-cisteamina utilizadas para este estudio mostró que aproximadamente 154 µM y 54 µM de grupos tiol / g de polímero, respectivamente, permanecieron en forma libre, es decir, forma no oxidada después del radiomarcado.

Ejemplo 11: Comparación del comportamiento farmacocinético de las soluciones de quitosano-NAC marcadas con ^{124}I después de una instilación ocular simple en conejos

La distribución ocular de las soluciones de quitosano-NAC marcadas con ^{124}I que contenían quitosano-NAC marcado con ^{124}I en concentraciones de 0,05%; 0,1%; 0,3% y 0,5% (p/p), respectivamente, después de que una única instilación se evaluó mediante evaluación cualitativa de imágenes de proyección de escaneo microPET de datos sumados en diferentes puntos de tiempo. Los resultados se enumeran en la Tabla 7.

Tabla 7 Evaluación cualitativa de la distribución ocular de 4 soluciones diferentes de quitosano-NAC marcadas radiactivamente

Concentración (% p/p) de quitosano-NAC marcado con ^{124}I en la solución de prueba oftálmica	Evaluación cualitativa t= 0-1h	Evaluación cualitativa t= 6h	Evaluación cualitativa t=22-24h
0,05%	Distribución uniforme en la superficie ocular, notable acumulación en el conducto lagrimal (aclaramiento)	Distribución uniforme en la superficie ocular; clara reducción de la actividad en comparación con t = 0-1	No determinado
0,1%	Distribución uniforme en la superficie ocular, alguna acumulación en el conducto lagrimal (aclaramiento)	Distribución uniforme en la superficie ocular	Distribución uniforme en la superficie ocular
0,3%	Distribución uniforme en la superficie ocular	Distribución uniforme en la superficie ocular	Distribución uniforme en la superficie ocular
0,5%	Distribución desigual en la superficie ocular con las mayores concentraciones de radioactividad en el saco conjuntival y el canto interno del ojo	Distribución desigual en la superficie ocular con las mayores concentraciones de radioactividad en el saco conjuntival y el canto interno del ojo; actividad claramente reducida en	Distribución desigual en la superficie ocular con las mayores concentraciones de radioactividad en el saco conjuntival y el canto interno del ojo;

		comparación con la solución de prueba al 0,3% en el mismo punto de tiempo.	actividad reducida en comparación con la solución de prueba al 0,3% en el mismo punto de tiempo.

La evaluación cualitativa de la distribución de la superficie ocular de 4 soluciones diferentes de quitosano-NAC marcado radiactivamente mostró claramente que las soluciones con concentraciones de 0,1% y 0,3% de quitosano-NAC mostraron los mejores resultados con respecto a la distribución uniforme en la superficie ocular de los conejos durante 24 h. La solución que contenía 0,05% se eliminó más rápidamente de la superficie ocular. La solución que contenía 0,5% de quitosano-NAC no estaba distribuida de manera uniforme en el ojo y también se eliminó más rápidamente de la superficie ocular.

Ejemplo 12: Efecto del quitosano-NAC sobre el grosor de la película lagrimal en pacientes con síndrome de ojo seco

El objetivo de este estudio fue investigar el efecto de las gotas oculares que contienen 0,1% de quitosano-NAC (grupos de tiol libres de 171 µmol/g) sobre el grosor de la película lagrimal en pacientes con síndrome de ojo seco después de una dosis única y después de un tratamiento de 5 días. Para este propósito, se planificaron 2 cohortes: en la Cohorte I, se colocaron gotas oculares de quitosano-N-acetilcisteína una vez en un ojo elegido al azar, mientras que el otro ojo recibió placebo. Las mediciones del espesor de la película lagrimal se realizaron con tomografía de coherencia óptica (OCT) antes de la instilación y 10 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas y 24 horas después de la instilación. Los resultados (espesor medio de la película lagrimal en µm, rango entre paréntesis, n = 16) son

Tabla 8 Resultados de las mediciones del espesor de la película lagrimal de la cohorte I

Tiempo	Quitosano-NAC	Placebo
pre-dosis	3,9 (3,3-4,8)	4,0 (3,0-5,3)
10 min	4,7 (3,4-7,0)	4,2 (2,0-6,3)
8h	4,7 (3,5-6,5)	4,2 (3,0-6,5)
10h	5,2 (3,5-7,9)	4,3 (3,3-5,5)
12h	4,6 (3,7-7,6)	4,1 (2,9-6,9)
24h	4,7 (4,0-8,1)	4,7 (2,8-6,3)

En la Cohorte II, 16 pacientes fueron aleatorizados para recibir gotas para los ojos de quitosano-NAC al 0,1% una vez al día en el ojo derecho y dos veces al día en el ojo izquierdo o viceversa. El otro ojo recibió placebo para la segunda instilación. Las mediciones del grosor de la película lagrimal con OCT se realizaron todos los días de estudio antes de la instilación matutina y el día posterior a la última instilación. El índice de enfermedad de la superficie ocular (OSDI) se evaluó como variable de eficacia secundaria en la cohorte II en la selección y en el día 6.

Los resultados de las mediciones del espesor de la película lagrimal en la cohorte II se muestran en la Tabla 9 (espesor de película lagrimal medio (µm) del grupo "una vez al día" y "dos veces al día" en la Cohorte II; rango entre paréntesis, n = 16).

Tabla 9 Resultados de las mediciones del espesor de la película lagrimal de la cohorte II

Día de estudio	Dos veces al día (BID)	Una vez al día (QD)
1	3,7 (2,7-6,1)	3,4 (2,8-6,0)
2	4,3 (2,7-6,6)	3,9 (2,7-7,5)
3	4,1 (3,0-7,4)	3,9 (2,9-8,5)
4	4,3 (2,7-6,9)	4,1 (2,5-7,2)
5	4,4 (2,9-7,7)	4,1 (3,3-8,4)
6	4,4 (3,3-7,3)	4,0 (2,9-7,2)

En base a un análisis de regresión durante todo el período posterior a la dosis de 24 horas, el aumento en el grosor de la película lagrimal fue estadísticamente significativo si el grupo de tratamiento de la cohorte I se comparó con el grupo placebo (Análisis de regresión para identificar las diferencias entre tratamientos a lo largo del tiempo, p <0,0001). Estos resultados muestran que las gotas para ojos de quitosano-NAC causaron un aumento estadísticamente significativo del grosor de la película lagrimal durante un período de tiempo de 24 horas, lo que sugiere un tiempo de residencia corneal prolongado. El grosor de la película lagrimal se restableció a un nivel encontrado en sujetos sanos (Werkmeister, Alex et al., 2013, Measurement of tear film thickness using ultrahigh-resolution optical coherence tomography, Invest Ophthalmol Vis Sci (54): 5578-5583). En la cohorte II, las instilaciones una vez al día fueron suficientes para restaurar el espesor de la película lagrimal y no fueron inferiores a las aplicaciones dos veces al día.

En la cohorte II, el índice medio de enfermedad de la superficie ocular en la selección fue de 38,5 y mejoró a 13,0 en el día 6, lo que corresponde a una disminución del 60,5%. Esto indica que la gravedad subjetiva de DES evaluada con el OSDI mejoró después de cinco días de tratamiento con gotas para los ojos de quitosano-NAC 0,1%.

REIVINDICACIONES

1. Una solución oftálmica acuosa estéril que comprende 0,05% a 0,5% (p/p) de N- (N-acetilcisteinil-)quitosano o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo en una solución portadora, en donde el N-acetilcisteinil-)quitosano tiene un contenido de grupos tiol libres en una cantidad de 80 µmol/g de polímero a 280 µmol/g de polímero.

2. La solución oftálmica según la reivindicación 1, en la que la concentración del N- (N-acetilcisteinil-)quitosano o dicha sal farmacéuticamente aceptable del mismo en dicha solución es de 0,05 a 0,3% (p/p), preferentemente de 0,05 a 0,2 % (p/p), más preferentemente 0,08 - 0,16% (p/p).

3. La solución oftálmica según la reivindicación 1 o 2, en la que dicha sal farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en sales de ácidos orgánicos tales como ácido acético, cítrico, fórmico y tartárico, y sales de ácidos minerales tales como HCl y H_2SO_4.

4. La solución oftálmica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el N-(N-acetilcisteinil-)quitosano tiene un contenido de grupos tiol libres en una cantidad de 105 µmol/g de polímero a 250 µmol/g de polímero, preferentemente de de 110 µmol/g de polímero a 250 µmol/g de polímero, mucho más preferentemente de preferentemente 140 a 250 µmol/g de polímero.

5. La solución oftálmica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la cantidad de grupos tiol reticulados en el N-(N-acetilcisteinil-)quitosano es 30% o menos del total de grupos tiol en el mismo, preferentemente 25% o menos, mucho más preferentemente 15% o menos.

6. La solución oftálmica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende al menos un excipiente seleccionado del grupo que consiste en ácido bórico y sus sales, sales de ácido cítrico, sales de ácidos acéticos, polietilenglicol, Na_2-EDTA, manitol, sorbitol, glicerol, cloruro de sodio, metabisulfito de sodio, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, lubricina, ácido hialurónico y sus sales farmacéuticamente aceptables o mezclas de los mismos.

7. La solución oftálmica según la reivindicación 6, que comprende:

   0,05% a 0,5% (p/p), preferentemente 0,05% a 0,3% (p/p) de N-(N-acetilcisteinil-)quitosano o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

   Ácido bórico en una cantidad de 1,0 a 16,0 mg/ml, preferentemente de 8 a 16 mg/ml;

   Polietilenglicol 400 en una cantidad de 0,01 a 5,0 mg/ml, preferentemente de 1 a 5 mg/ml;

   Na_2-EDTA en una cantidad de 0,01 a 0,5 mg/ml;

   Manitol en una cantidad de 0,01 a 5,5 mg/ml, preferentemente de 0,1 a 4 mg/ml;

   Cloruro de sodio en una cantidad de 0,01 a 9 mg/ml, preferentemente de 1 a 3 mg/ml; e

   Hidroxipropilmetilcelulosa en una cantidad de 0,01 a 20 mg/ml, preferentemente de 1 a 3 mg/ml.

8. La solución oftálmica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el N-(N-acetilcisteinil-)quitosano utilizado para la preparación de la solución exhibe a una concentración de 0,5% en agua a 25 ºC, una viscosidad cinemática dentro del intervalo de 1 a 15 mm^2/s, preferentemente de 2 a 10 mm^2/s.

9. La solución oftálmica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la solución exhibe una presión osmótica de 150 a 400 mOsM, preferentemente de 200 a 330 mOsM, mucho más preferentemente de 250 a 330 mOsM.

10. La solución oftálmica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la solución presenta un valor de pH de 5,8 a 6,8, preferentemente de 6,0 a 6,6.

11. Recipiente que comprende una solución oftálmica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en una atmósfera esencialmente libre de oxígeno.

12. Recipiente según la reivindicación 11, que comprende un primer recipiente que contiene la solución oftálmica y un segundo recipiente que contiene dicho primer recipiente.

13. Recipiente según las reivindicaciones 11 o 12, en el que dicho recipiente y/o dicho primer recipiente y/o dicho segundo recipiente está/están en forma de una bolsita hermética a gases, en particular una bolsita hecha de aluminio o un laminado de aluminio o composición de aluminio.

14. Recipiente según la reivindicación 13, en el que dicha bolsita hermética a gases contiene uno o más subrecipientes de dosis única que contienen dicha solución oftálmica.

15. Recipiente según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que dicho recipiente y/o dicho primer recipiente y/o dicho segundo recipiente contienen un material absorbente de oxígeno.

16. El recipiente según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en el que dicho N-(N-acetilcisteinil-)quitosano contenido en el mismo tiene un contenido de grupos tiol libres de 80 µmol/g de polímero a 250 µmol/g de polímero, preferentemente 105 µmol/g de polímero a 250 µmol/g polímero, después de ser almacenado durante al menos 12 meses a temperatura ambiente.

17. El recipiente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, en el que la cantidad de grupos tiol reticulados en el N-(N-acetilcisteinil-)quitosano es 30% o menos del total de grupos tiol en el mismo, preferentemente 25% o menos, mucho más preferente 20% o menos después de ser almacenado durante al menos 12 meses a temperatura ambiente.

18. Una solución oftálmica acuosa estéril según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para el uso específico en la prevención o tratamiento del síndrome del ojo seco o signos y/o síntomas del ojo seco.

19. La solución oftálmica acuosa estéril para el uso específico de acuerdo con la reivindicación 18, en donde dichos signos y/o síntomas de ojo seco son causados por o relacionados con queratoconjuntivitis seca (KCS), ojo seco relacionado con la edad, síndrome de Stevens-Johnson, síndrome de Sjogren, penfigoide cicatricial ocular, lesión corneal, infección, síndrome de Riley-Day, alacrima congénita, tratamientos con, PRK, LASEK y/o LASIK, conjuntivitis alérgica, blefaritis y disfunción de la glándula de Meibomio, trastornos o deficiencias nutricionales (incluidas las vitaminas), efectos secundarios farmacológicos, destrucción glandular y tisular, trastornos autoinmunes y otros inmunodeficientes, intolerancia a los lentes de contacto, exposición ambiental a partículas en el aire, exposición ambiental al humo, exposición ambiental al smog y exposición ambiental al aire excesivamente seco, la incapacidad de parpadear en pacientes comatosos o el estrés ocular causado por el trabajo en la computadora o los juegos de computadora.

20. La solución oftálmica acuosa estéril para el uso específico según la reivindicación 18 o 19, caracterizada porque se administra no más de dos veces al día, preferentemente una vez al día.

Figura 1

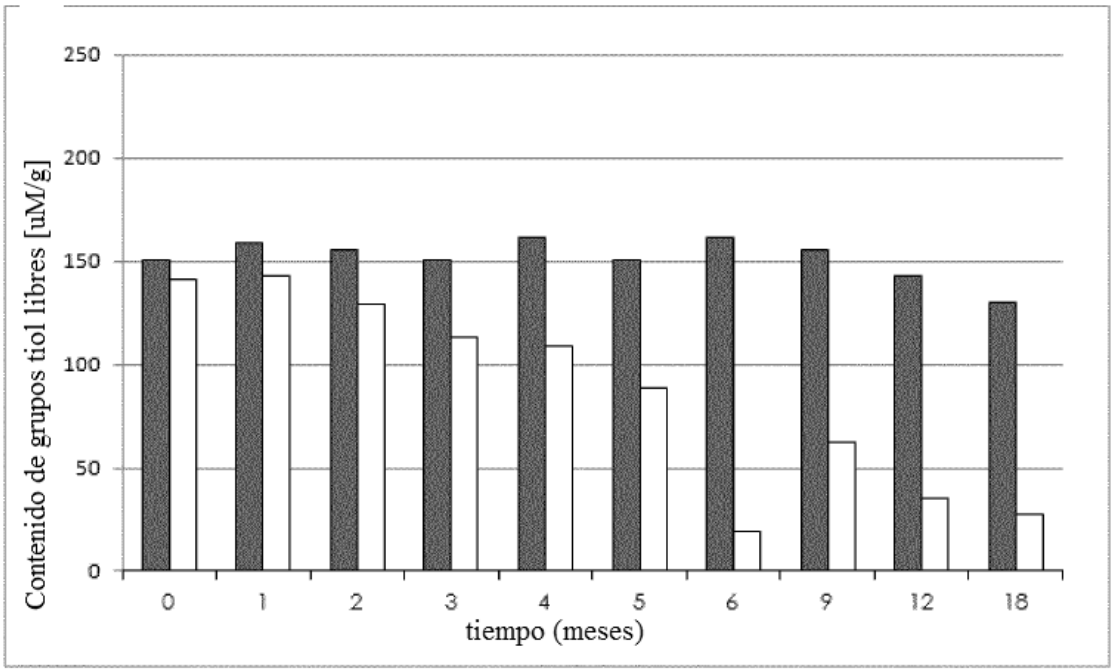

Figura 2

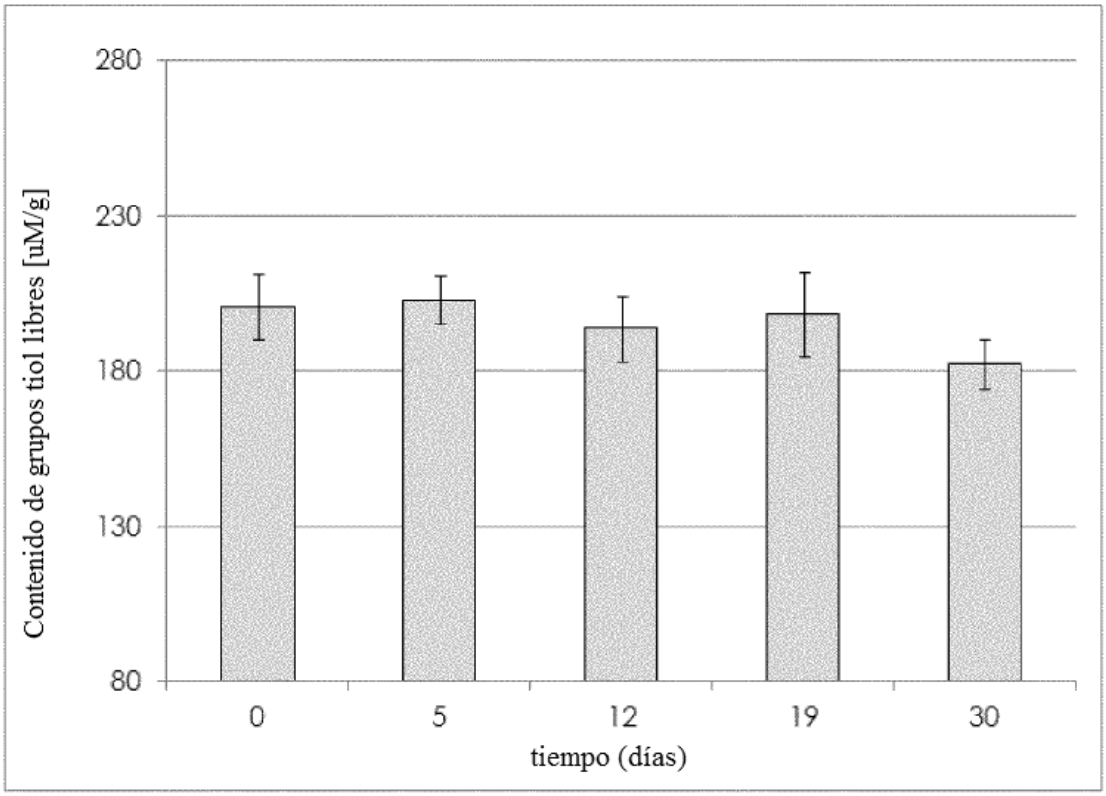

Figura 3

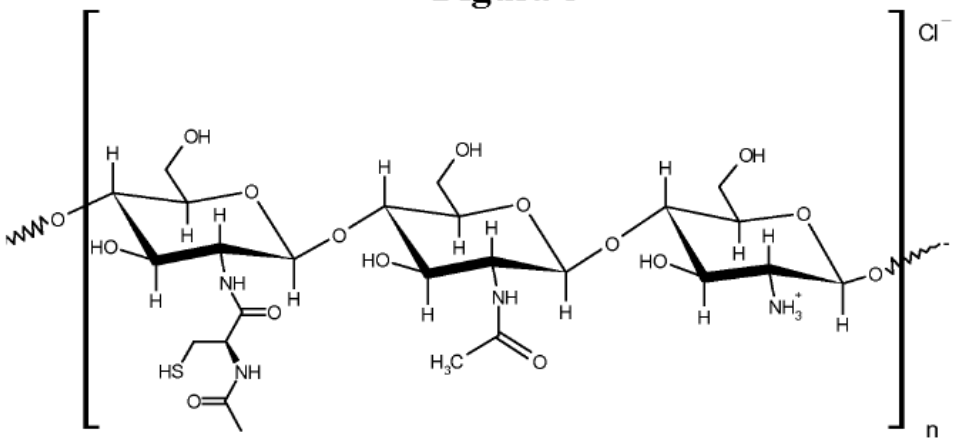

Figura 4

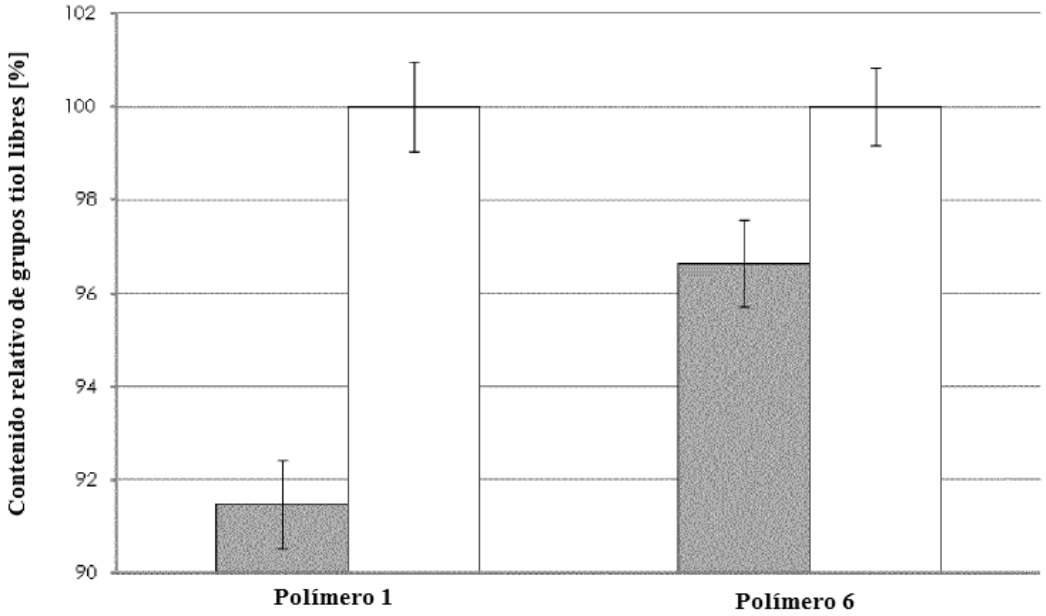

Figura 5

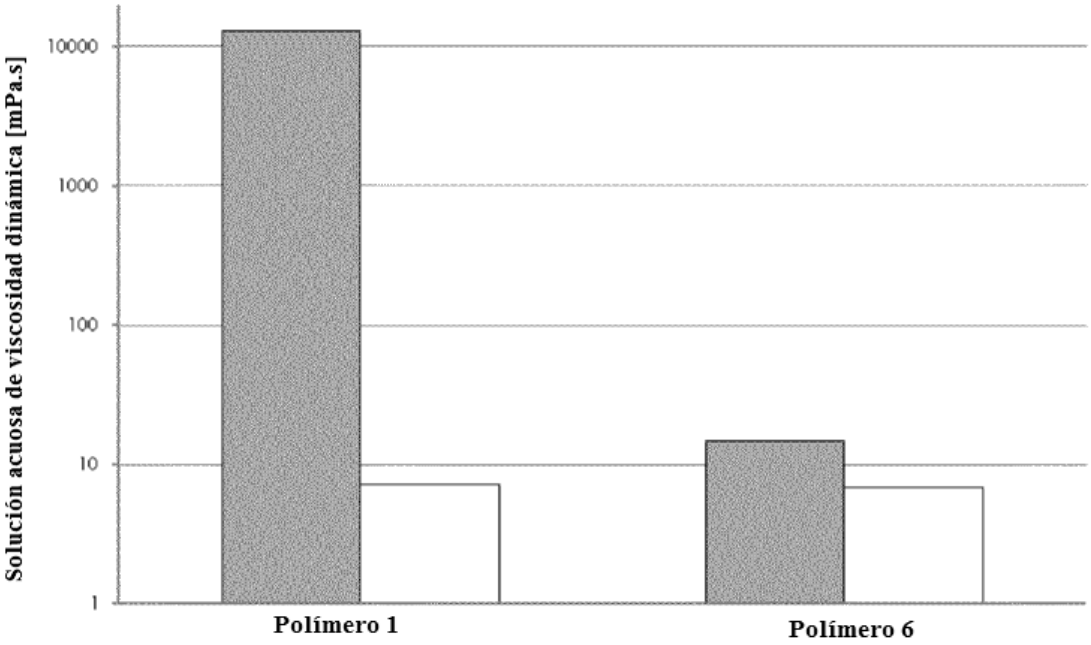

Figura 6

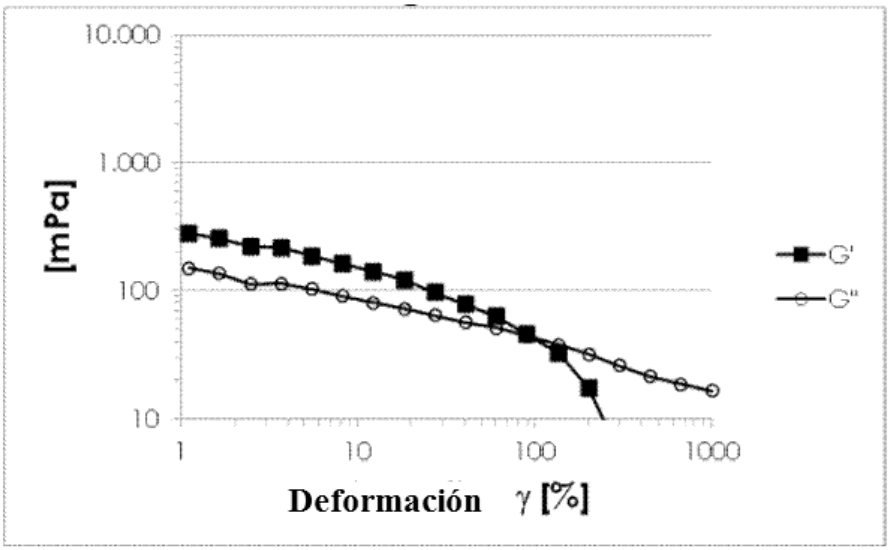

Figura 7

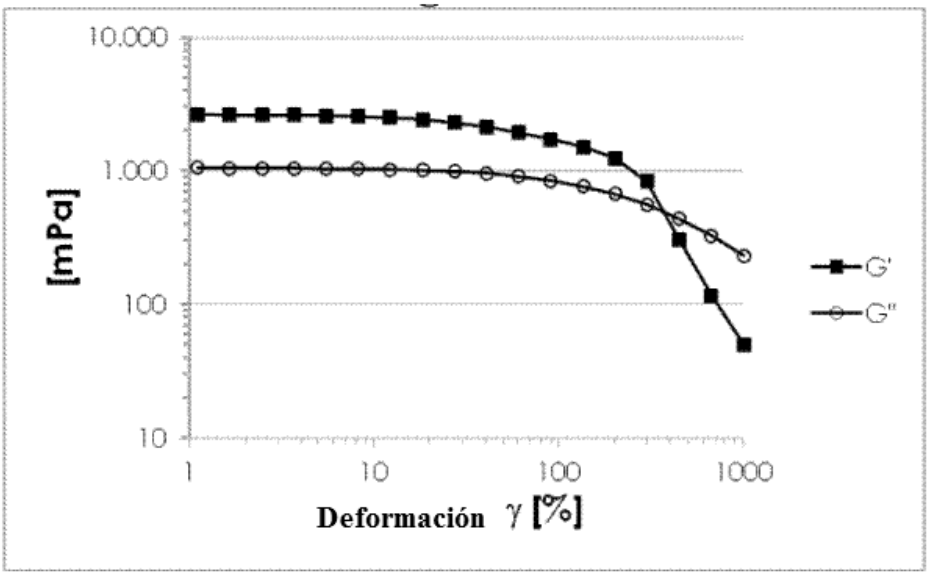

Figura 8

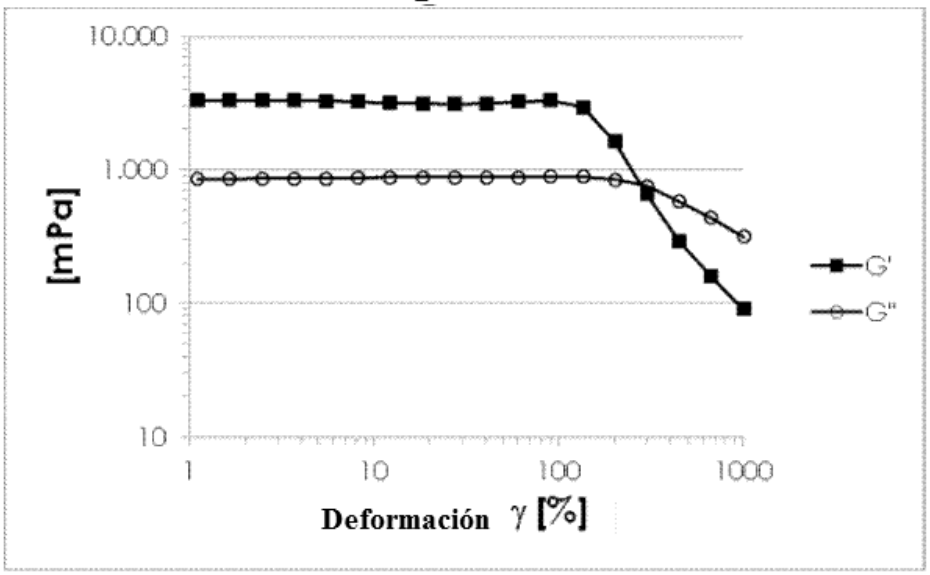

Figura 9

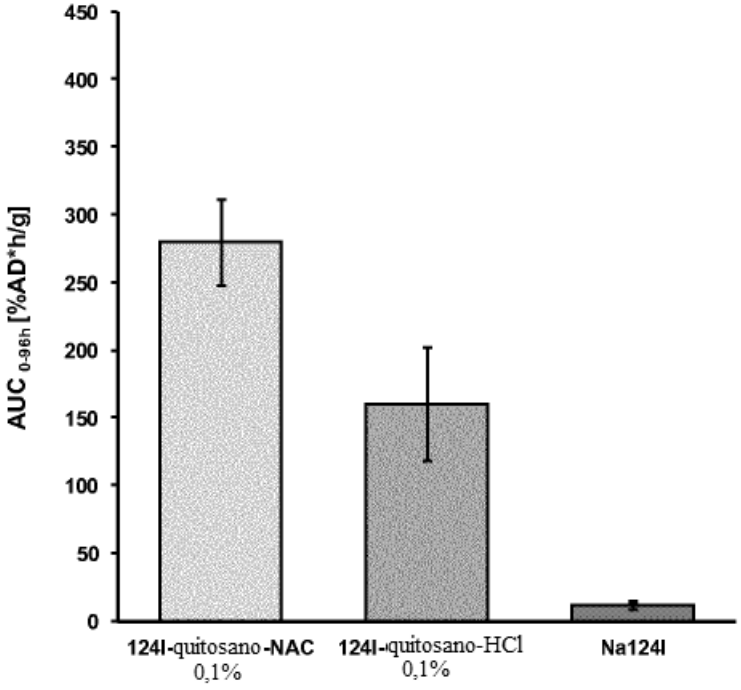
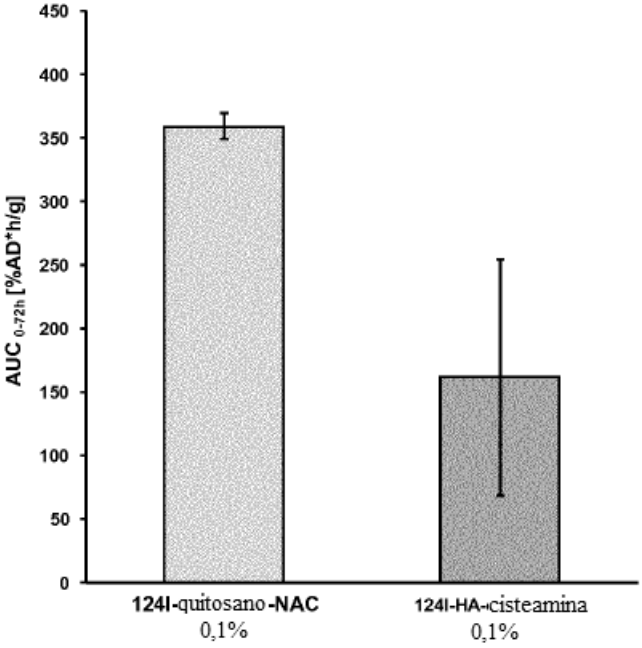
Figura 10