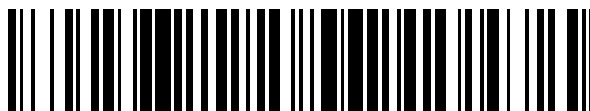


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 752 823**

51 Int. Cl.:

A61K 31/55 (2006.01)

A61P 27/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2007 E 16176695 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 3150209**

54 Título: **Tratamiento de alergias oculares**

30 Prioridad:

31.03.2006 US 788185 P
19.03.2007 US 688016

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

06.04.2020

73 Titular/es:

VISTAKON PHARMACEUTICALS, LLC (100.0%)
7500 Centurion Parkway, Suite 100
Jacksonville FL 32256, US

72 Inventor/es:

PARASRAMPURIA, JAGDISH;
INGERMAN, AVNER;
JANSSENS, FRANS y
MEGENS, ANTON

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 752 823 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

Tratamiento de alergias oculares

5 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención está dirigida al tratamiento o prevención de afecciones oculares. Más específicamente, la invención está dirigida a composiciones oftálmicas que comprenden alcaftadina.

10 FONDO

15 Los trastornos alérgicos de la superficie ocular incluyen una amplia variedad de condiciones patológicas que incluyen conjuntivitis alérgica estacional ("SAC"), conjuntivitis alérgica perenne ("PAC"), queratoconjuntivitis vernal y queratoconjuntivitis atópica. Se estima que más del 20% de la población general padece de alguna forma de alergia ocular. De estos, aproximadamente 90% sufre de SAC, PAC o ambos.

20 La reacción alérgica ocular es una respuesta inflamatoria de hipersensibilidad IgE-dependiente (Tipo I) que afecta más comúnmente a los adultos entre 20 y 40 años de edad. En individuos susceptibles, la exposición inicial de alérgeno a la superficie ocular estimula la producción de anticuerpos inmunológicos específicos de alérgeno (IgE). IgE se une al receptor FcεR-1 unido a membrana de mastocitos no tratados previamente en la mucosa ocular. El mastocito es un granulocito, que contiene un número de mediadores preformados, incluyendo histamina y proteoglicanos. Una vez que se activa el mastocito, se forman mediadores químicos recién formados, que incluyen la prostaglandina D2, los leucotrienos, y el factor de agregación de plaquetas. La posterior exposición de alérgenos a los mastocitos recubiertos de IgE conduce a la liberación de mediadores preformados, así como recién formados, 25 contenidos dentro de los gránulos de los mastocitos.

30 Los síntomas clínicos de la conjuntivitis alérgica incluyen picor, enrojecimiento, hinchazón de los párpados, quemosis y lagrimeo. La histamina es el mediador principal de la respuesta alérgica. Después de la desgranulación de mastocitos, la histamina se une a receptores localizados en la conjuntiva. La unión de histamina a los receptores H1 en las células nerviosas induce prurito. La activación de los receptores H1 y H2 en el vaso-endotelio induce vasodilatación y aumenta la permeabilidad vascular facilitando la migración de los mediadores inflamatorios, tales como IL-1α e IL-1β, en el vaso sanguíneo y el posterior reclutamiento de leucocitos en el tejido conjuntival. La activación de los receptores de histamina conduce a la hiperemia ocular, quemosis, la tapa de la inflamación y exudación de líquido de los vasos sanguíneos en el tejido circundante, que a su vez causa la inflamación. La 35 quimiotaxis de los leucocitos, tales como eosinófilos y neutrófilos en el tejido conjuntival a su vez conduce a más daños en los tejidos.

40 Históricamente, los antihistamínicos han sido el pilar para el tratamiento de la enfermedad alérgica ocular. Estas terapias varían en potencia, especificidad y duración de la acción. La primera generación de antihistamínicos tales como feniramina y antazolina son conocidos por su rápido inicio de acción. Desafortunadamente, estos compuestos también causan malestar ocular y su eficacia disminuye después de sólo unas pocas horas. Antagonistas H1 de segunda generación como levocabastina y emadastina presentan menos malestar ocular y tienen una duración algo más larga de la acción. Sin embargo, estos compuestos han limitado los efectos anti-inflamatorios, y hacen poco para inhibir los componentes de la fase tardía de la respuesta inflamatoria. 45

En la actualidad, los tratamientos más eficaces para el tratamiento de la alergia ocular son fármacos como la olopatadina, ketotifeno y azelastina, que tienen propiedades estabilizadoras tanto antihistamínicas como de mastocitos. Estas terapias son generalmente bien toleradas y sus efectos pueden durar hasta 8 a 12 horas. Aunque se han notado superiores a los compuestos que efectúan solamente un solo componente de respuesta alérgica, 50 estos compuestos a menudo no logran proporcionar alivio a más de un síntoma de alergia ocular.

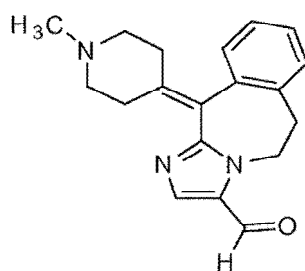
55 El efecto de un fármaco en el enrojecimiento ocular, quemosis y el hinchazón de los párpados ofrece una mejora significativa sobre las terapias existentes. Además, dado que la mayoría de los agentes anti-alérgicos oftálmicos nuevos tienen duraciones limitadas de acción, se requiere una dosificación dos veces al día. Una preparación tópica con una duración de acción más larga será ventajosa, ya que puede ser inculcada una vez al día. Por lo tanto, las nuevas terapias que pueden ofrecer ventajas en áreas como la eficacia y la duración de la acción, a la vez que ofrece perfiles de seguridad similares, son necesarios. La presente invención se dirige a estos y otros objetivos.

60 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

65 La invención incluye composiciones oftálmicas y kit que comprenden alcaftadina. La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones que no entran dentro de estas reivindicaciones son para propósitos de referencia solamente. Las invenciones descritas en el presente documento se basan al menos en parte en el descubrimiento sorprendente que alcaftadina trata o previene una serie de diferentes síntomas de alergia

ocular que lo hacen especialmente útil para el tratamiento o la prevención de la alergia ocular. Las composiciones oftálmicas y kits de la presente invención, alivian los síntomas clínicos de la alergia ocular y la inflamación ocular con absorción sistémica mínima del fármaco activo. Esta combinación inusual de propiedades, junto con un excelente perfil de seguridad y tolerabilidad cuando se formula para la administración tópica en el ojo, hace que el fármaco sea especialmente útil para el tratamiento o prevención de la alergia ocular. Específicamente, la invención incluye una composición oftálmica que comprende alcaftadina, sus sales farmacéuticamente aceptables, sus N-óxidos, hidratos, solvatos, polimorfos, o mezclas de los mismos en donde la composición oftálmica comprende un 0,25% en peso de alcaftadina.

La alcaftadina, también conocida por el nombre químico 6,11-dihidro-11-(1-metil-4-piperidinilideno)-5H-imidazo[2,1-b][3]benzazepina-3-carboxaldehído, tiene la fórmula química siguiente:



Fórmula 1

El compuesto y los métodos para su preparación se describen en Patente de Estados Unidos nº 5,468,743. Las composiciones oftálmicas preferidas de la invención contienen el compuesto de alcaftadina de Fórmula 1, pero pueden estar, alternativamente, presentes como una sal de alcaftadina. Las sales farmacéuticamente aceptables de alcaftadina se pueden formar a partir de ácidos orgánicos e inorgánicos. Los ácidos adecuados incluyen, pero no se limitan a ácido acético, ácido benzoico 4-acetamido, ácido bencenosulfónico, canforsulfónico, cítrico, 2,3:4,6-di-O-isopropilideno-2-ceto-L-gulónico monohidrato de ácido, fórmico, fumárico, clorhídrico, bromhídrico, láctico, maleico, L-(-)málico, málico, malónico, mandélico, metanosulfónico, naftalenosulfónico, nítrico, oxálico, ftálico, fosfórico, propiónico, DL-piroglutámico, sacarina, salicílico, succínico, sulfúrico, tartárico, trifluoro acético, L-(+)tartárico, y toluenosulfónico.

Tal como se utiliza aquí, el término "alergia ocular" se refiere a un trastorno alérgico de la superficie ocular causada por alérgenos patógenos. La conjuntivitis alérgica es la alergia ocular preferida e incluye una amplia variedad de condiciones patológicas que incluyen conjuntivitis alérgica estacional ("SAC"), conjuntivitis alérgica perenne ("PAC"), queratoconjuntivitis vernal y queratoconjuntivitis atópica.

"Síntomas clínicos" de la alergia ocular incluyen pero no se limitan a el picor ocular, enrojecimiento ocular, hinchazón de los párpados, quemosis, lagrimeo e inflamación nasal, congestión nasal, rinorrea, prurito nasal y del oído/prurito del paladar, y los estornudos. Se prefiere que los métodos en los que se usan las composiciones oftálmicas, traten o prevengan al menos dos síntomas clínicos, más preferiblemente al menos tres, incluso más preferiblemente más de cuatro. Por ejemplo, los métodos en los que se usan las composiciones oftálmicas tratan o previenen al menos uno de los siguientes síntomas clínicos asociados con el picor alérgico conjuntivitis ocular, enrojecimiento ocular, quemosis, lagrimeo, hinchazón de la congestión tapa nasal o rinorrea. Preferiblemente, las composiciones oftálmicas tratan o previenen picor ocular y enrojecimiento ocular; tratar o prevenir el picor ocular, enrojecimiento ocular y quemosis; tratar o prevenir el picor ocular, enrojecimiento ocular, quemosis, y lagrimeo; tratar o prevenir el picor ocular, enrojecimiento ocular, quemosis, lagrimeo e hinchazón de la tapa; tratar o prevenir el picor ocular, enrojecimiento ocular, quemosis, lagrimeo, inflamación de la tapa, y la congestión nasal; tratar o prevenir el picor ocular, enrojecimiento ocular, quemosis, lagrimeo, inflamación del párpado, congestión nasal y rinorrea; tratar o prevenir la congestión nasal y rinorrea.

El término "paciente", como se usa aquí, se refiere a animales, incluyendo mamíferos, preferiblemente seres humanos. La "cantidad eficaz" de alcaftadina, sus sales farmacéuticamente aceptables, sus N-óxidos, hidratos, solvatos, polimorfos, o mezclas de los mismos, es la cantidad que la sustancia requerida para tratar o prevenir los síntomas de la alergia ocular. La cantidad eficaz puede variar de paciente a paciente, dependiendo de la capacidad de alcaftadina, sus sales farmacéuticamente aceptables, sus N-óxidos, hidratos, solvatos, polimorfos, o mezclas de los mismos, solos o en combinación con uno o más fármacos de combinación para obtener una respuesta deseada por parte del paciente. Otros factores que determinan la cantidad eficaz incluirán, pero no se limitan al estado de enfermedad o la gravedad de la afección a aliviar, los niveles hormonales, la edad, el sexo, el peso del paciente, el estado de ser del paciente y la gravedad de la afección patológica a tratar, la medicación concurrente o dietas especiales aplicadas por el paciente en particular, y otros factores que los expertos en la técnica reconocerán, con la dosificación apropiada siendo en última instancia a discreción del médico a cargo. Los

regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica mejorada. Una cantidad eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de los componentes son superados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Se prefiere que para la mayoría de los pacientes, una gota 50 µl de una solución ocular 0,25% contiene 0,125 mg de alcaftadina. Suponiendo que el 100% del fármaco se absorbe sistémicamente, una persona de 70 kg, usando gotas para los ojos de forma bilateral, es decir, en cada ojo, una vez al día, estarían expuestos a una dosis de 0,25 µg/d, o 3,57 µg/kg por día. Es razonable suponer que la exposición sistémica real será menor, ya que es probable que no toda la cantidad será absorbida. Se prefiere que la cantidad eficaz de alcaftadina, sus sales farmacéuticamente aceptables, sus N-óxidos, hidratos, solvatos, polimorfos, o sus mezclas, es de entre menos de aproximadamente 0,25 mg y mayor que o igual a aproximadamente 0,015 mg, más preferiblemente, entre aproximadamente 0,030 mg y aproximadamente 0,14 mg, más preferiblemente entre aproximadamente 0,075 mg y aproximadamente 0,125 mg

El término "farmacéuticamente aceptable" tal como se utiliza aquí se refiere a materiales que generalmente no son tóxicos o perjudiciales a un paciente cuando se utiliza con alcaftadina, sus sales farmacéuticamente aceptables, sus N-óxidos, hidratos, solvatos, polimorfos, o mezclas de los mismos, cuando la alcaftadina, sus sales farmacéuticamente aceptables, sus N-óxidos, hidratos, solvatos, polimorfos, o mezclas de los mismos, se formulan como composiciones oftálmicas, como se define aquí.

La alcaftadina, sus sales farmacéuticamente aceptables, sus N-óxidos, hidratos, solvatos, polimorfos, o mezclas de los mismos, se administra al ojo del paciente en forma de una composición oftálmica, tal como se define en el presente documento. En realizaciones preferidas, el fármaco se administra tópicamente in la forma de una composición oftálmica seleccionada del grupo que consiste en soluciones oftálmicas o suspensiones (es decir, gotas para los ojos), pomadas oftálmicas o geles oftálmicos.

Además, la presente divulgación incluye un método para tratar o prevenir un síntoma clínico de la inflamación ocular, que comprende la administración al ojo de un paciente una cantidad eficaz de alcaftadina, sus sales farmacéuticamente aceptables, sus N-óxidos, hidratos, solvatos, polimorfos, o mezclas de los mismos, en el que la cantidad eficaz está entre menos de aproximadamente 7,1 mg/kg por día y aproximadamente 3,5 mg/kg por día. Los términos alcaftadina, síntoma clínico, paciente, farmacéuticamente aceptable, sales farmacéuticamente aceptables, y la cantidad efectiva tienen sus significados antes mencionados e intervalos preferentes. El término inflamación ocular se refiere a la inflamación de cualquier parte de la porción anterior del ojo. Tal inflamación ocular puede ser causada por cualquiera de las siguientes o cualquier combinación de ojo seco, de lentes de contacto, las infecciones bacterianas, las infecciones por hongos o infecciones virales. Las causas preferidas de la inflamación ocular son las infecciones bacterianas o infecciones virales.

Además, la presente divulgación incluye un método para tratar o prevenir de un síntoma mecanicista asociado con la alergia ocular o inflamación ocular que comprende la administración al ojo de un paciente de una cantidad eficaz de alcaftadina, sus sales farmacéuticamente aceptables, sus N-óxidos, hidratos, solvatos, polimorfos, o mezclas de los mismos. Los términos alcaftadina, paciente farmacéuticamente aceptable, sales farmacéuticamente aceptables, cantidad eficaz, alergia ocular, y la inflamación ocular tienen sus significados antes mencionados e intervalos preferentes. "Síntomas mecanicistas" son reacciones celulares que, o bien obtienen o suprimen los síntomas de un estado de enfermedad tales como la alergia ocular o inflamación ocular. Síntomas mecanicistas incluyen, pero no se limitan a la pérdida vascular, una reducción en la integridad de las uniones estrechas epiteliales de la conjuntiva, la modulación del receptor H₄, y la degradación de mastocito. Los métodos preferidos tratan o previenen al menos dos síntomas mecanicistas, tratar más preferiblemente o prevenir al menos tres síntomas mecanicistas, incluso más preferiblemente para tratar o prevenir por lo menos cuatro síntomas mecanicistas. Por ejemplo, los métodos preferidos en los que los compuestos o composiciones de la invención se usan para tratar o impedir la fuga vascular, una reducción en la integridad de la conjuntiva apretada epitelial; tratar o prevenir la fuga vascular, una reducción en la integridad de las uniones estrechas epiteliales de la conjuntiva, y la modulación del receptor H₄; tratar o prevenir la fuga vascular, una reducción en la integridad de las uniones estrechas epiteliales de la conjuntiva, la modulación del receptor H₄, y la degradación de los mastocitos.

Más aún, la presente divulgación incluye un método para tratar o prevenir un síntoma nasal de la alergia ocular, que comprende la administración a la nariz de un paciente una cantidad eficaz de alcaftadina, sus sales farmacéuticamente aceptables, sus N-óxidos, hidratos, solvatos, polimorfos, o mezclas de los mismos. Los términos alcaftadina, paciente, farmacéuticamente aceptables, sales farmacéuticamente aceptables, alergia ocular, y la cantidad efectiva tienen sus significados antes mencionados e intervalos preferentes. "Los síntomas nasales de la alergia" son un subconjunto de síntomas clínicos como se definió anteriormente e incluyen inflamación nasal, congestión nasal, rinorrea, prurito nasal y estornudos. Los síntomas nasales preferidas son rinorrea y congestión nasal.

Además, la presente divulgación incluye un método para el tratamiento o prevención de un síntoma clínico de la alergia ocular, que comprende la administración al ojo de un paciente de una composición oftálmica que comprende alcaftadina, sus sales farmacéuticamente aceptables, sus N-óxidos, hidratos, solvatos, polimorfos, o mezclas de los mismos. Los términos alcaftadina, síntoma clínico, alergia ocular, paciente, farmacéuticamente

aceptable, y sales farmacéuticamente aceptables tienen sus significados antes mencionados e intervalos preferentes.

Tal como se utiliza aquí, el término "composición oftálmica" se refiere a cualquier formulación farmacéuticamente aceptable, dispositivo de aplicación, mecanismo o sistema adecuado para la administración al ojo. El término "composiciones oftálmicas" incluye, pero no se limitan a soluciones, suspensiones, geles, ungüentos, lentes de contacto, implantes, aerosoles, depósitos o cualquier otro tipo de formulación, dispositivo o mecanismo adecuado para corto plazo o la aplicación a largo plazo de alcaftadina, sales farmacéuticamente aceptables, sus N-óxidos, hidratos, solvatos, polimorfos, o mezclas de los mismos, en el ojo. En contraste con las formulaciones orales o inyectables, composiciones oftálmicas exhiben características técnicas específicas asociadas con su aplicación a los ojos, incluyendo el uso de vehículos oftálmicos farmacéuticamente aceptables que evitan la inducción de diversas reacciones tales como, por ejemplo, irritación de la conjuntiva y la córnea, el cierre de los párpados, la secreción de lágrimas y reacciones dolorosas. Composiciones oftálmicas preferidas de acuerdo con la invención son ventajosamente en la forma de soluciones o suspensiones oftálmicas (es decir, gotas para los ojos), pomadas oftálmicas o geles oftálmicos que contienen alcaftadina, sus sales farmacéuticamente aceptables, sus N-óxidos, hidratos, solvatos, polimorfos, o mezclas de los mismos. Dependiendo de la forma particular seleccionada, las composiciones pueden contener varios aditivos tales como agentes tampón, agentes isotónicos, solubilizantes, conservantes, agentes que aumentan la viscosidad, agentes quelantes, agentes antioxidantes, y reguladores de pH.

Ejemplos de conservantes adecuados incluyen, pero no se limitan a clorobutanol, deshidroacetato de sodio, cloruro de benzalkonio, cloruro de piridinio de cetil, alcohol fenetilo, ésteres de ácido parahidroxibenzoico, y cloruro de bencetonio. Los agentes que aumentan la viscosidad se pueden seleccionar, por ejemplo, de metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alcohol polivinílico, carboximetilcelulosa, sulfato de condroitina, y sus sales solubilizantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, polioxietileno aceite de ricino hidrogenado, polietilenglicol, polisorbato 80, y monoestearato de polioxietileno. Agentes quelantes típicos incluyen, pero no se limitan a ácido cítrico edetato de sodio, agentes estabilizantes como se define en Solicitud de Patente EE.UU. n° 60/783.557, presentada el 17 de marzo de 2006, titulada "Métodos para la Estabilización de Composiciones farmacéuticas oxidativamente inestables" y su correspondiente presentación no provisional. Los estabilizantes incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, edetato de sodio y sulfito de hidrógeno de sodio.

Reguladores de pH útiles se seleccionan comúnmente, por ejemplo, de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, carbonato de sodio, ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido acético, y ácido clorhídrico. El pH de las composiciones oftálmicas puede variar de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, más preferiblemente de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5. Incluso más preferiblemente, el pH de las composiciones oftálmicas es de aproximadamente 7,0. Los tampones útiles incluyen, pero no se limitan a tampones de borato, tampones de fosfato, tampones de carbonato, y tampones de acetato. La concentración de tampón en las composiciones oftálmicas puede variar desde aproximadamente 1 μM a aproximadamente 150 μM o más, dependiendo de la memoria intermedia particular elegida. Preferiblemente, la concentración de tampón es de menos de 100, más preferiblemente de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 25 μM , con una concentración de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 20 μM más preferida.

Tal como se utiliza aquí, el término "vehículo" se pretende que incluya cualquier vehículo, diluyente o excipiente adecuado para uso oftálmico. "Excipiente" se refiere a un ingrediente que proporciona uno o más de a granel, imparte características de procesamiento satisfactorias, ayuda a controlar la velocidad de disolución, y de otra manera da características deseables adicionales a las composiciones. Se incluyen dentro de este término, entre otras cosas, compuestos bien conocidos por personas de experiencia ordinaria en la técnica, como se describe, por ejemplo, en el Handbook of Pharmaceutical Excipients, (American Pharmaceutical Association, Washington, DC, y Pharmaceutical Press, Londres, Inglaterra, 4ª ed., 2003). En particular, los excipientes se seleccionan de tal manera que la composición oftálmica no provoca una secreción de lágrimas que arrastran el ingrediente activo. Los excipientes aceptables son bien conocidos para una persona experta en la técnica, quien sabrá cómo seleccionarlos en función de la formulación deseada.

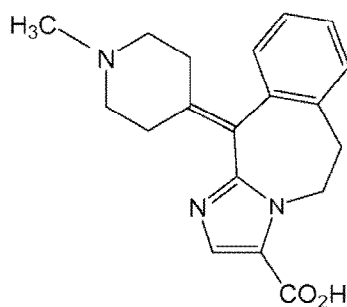
Cuando se expresan concentraciones, cantidades, porcentajes, y otros datos numéricos o se presentan en este documento en un formato de intervalo, es de entenderse que un formato de dicho rango se usa meramente por conveniencia y brevedad y por lo tanto se han de interpretar de forma flexible para incluir no sólo los valores numéricos recitan explícitamente como los límites del rango, sino también para incluir cada uno de los valores numéricos individuales o subintervalos comprendidos dentro de ese intervalo como si cada valor numérico y subintervalo se recita de manera explícita. Como una ilustración, un intervalo de concentración de "alrededor de 1% en peso a aproximadamente 10% en peso" debe interpretarse para incluir no sólo la concentración recitada explícitamente de aproximadamente 1% en peso a aproximadamente 10% en peso, sino también las concentraciones individuales y los subrangos dentro del rango indicado. Por lo tanto, incluido en este intervalo numérico son las concentraciones individuales, tales como 2% en peso, 5% en peso, y 8% en peso, y subintervalos, tales como de 1% en peso a 3% en peso, de 5% en peso a 9% en peso, etc. Tal como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" significa más o menos aproximadamente el diez por ciento del valor indicado, de manera que "aproximadamente el 50% en peso" indica aproximadamente el 45% al 55% en peso.

Típicamente, la concentración de alcaftadina en las composiciones oftálmicas de la presente invención es del 0,25% en peso. Una gota de 50 μL de una solución ocular de 0,25% contiene 0,125 mg de alcaftadina. Suponiendo que el 100% del fármaco se absorbe sistémicamente, una persona de 70 kg, usando gotas para los ojos de forma bilateral, es decir, en cada ojo, una vez al día, estarían expuestos a una dosis de 0,25 mg/d, o 3,57 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por día. Es razonable suponer que la exposición sistémica real será menor, ya que es probable que no toda la cantidad será absorbida.

Aún más, la invención incluye un kit que comprende una composición oftálmica que comprende alcaftadina, sus sales farmacéuticamente aceptables, sus N-óxidos, hidratos, solvatos, polimorfos, o mezclas de los mismos, contenidos dentro de un contenedor preparado a partir de un material de envase farmacéuticamente aceptable. Los términos de composición oftálmica, alcaftadina, sales farmacéuticamente aceptables tienen sus significados antes mencionados e intervalos preferentes. Materiales de embalaje farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a polietileno de baja densidad ("PEBD"), polietileno de alta densidad ("HDPE"), polipropileno, poliestireno, policarbonato, poliésteres (tales como tereftalato de polietileno y naftalato de polietileno), nilón, poli(cloruro de vinil), poli(cloruro de vinilideno), poli(tetrafluoroetileno) y otros materiales conocidos por los de experiencia ordinaria en la técnica. Botellas flexibles preparadas de PEBD o HDPE son particularmente preferidas. Las fuentes comerciales de tales materiales incluyen, pero no se limitan a polietileno de especialidad DuPont 20 Series, fabricado por DuPont, Polietileno Tenite 1830F Natural, fabricado por Eastman Chemical Company, polietileno Purell 1840, fabricado por Basell. El material particularmente preferido es DUPONT™ 20-6064 (E.I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, DE), un material de embalaje de PEBD preferido, se utiliza comúnmente para la preparación de frascos cuentagotas flexibles que contienen composiciones oftálmicas por un proceso de moldeo por inyección y soplado, y está aprobado para tal uso por la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos. Los Kits pueden contener múltiples dosis de composiciones oftálmicas que contienen alcaftadina o dosis de uso único de alcaftadina.

Antes del llenado, tales botellas se esterilizan de manera rutinaria por irradiación $\text{ga}\mu\text{Ma}$ o con gas óxido de etileno, por métodos ampliamente conocidos por expertos en la técnica. Los solicitantes han encontrado sorprendentemente, sin embargo, que es preferible esterilizar botellas de PEBD con gas óxido de etileno, en lugar de con radiación $\text{ga}\mu\text{Ma}$, ya que botellas esterilizadas con radiación $\text{ga}\mu\text{Ma}$ podrían experimentar una disminución de la estabilidad del ingrediente activo.

Ácido 6,11-dihidro-11-(1-metil-4-piperidinilideno)-5H-imidazo[2,1-b][3]benzazepina-3-carboxílico ("CAS#147083-93-0") tiene la siguiente fórmula química



Fórmula II

El compuesto de Fórmula II se describe en la patente de Estados Unidos nº 5.468.743.

EJEMPLOS

La invención se demuestra en los siguientes ejemplos. Los ejemplos son para fines de ilustración y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: Soluciones oftálmicas de alcaftadina

Las soluciones oftálmicas que contienen alcaftadina se prepararon de acuerdo con la Tabla I. Para asegurar la esterilidad, las soluciones se pasaron a través del filtro de esterilización de 0,22 micras antes de llenarse en botellas de polietileno de baja densidad que se habían sometido previamente a esterilización con óxido de etileno.

TABLA 1

| INGREDIENTE | Conc. mg/mL | Conc. mg/mL | Conc. mg/mL |
|----------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Alcaftadina | 1,0 | 2,5 | 5,0 |
| Fosfato de sodio dibásico USP | 11,1 | 11,1 | 11,1 |
| Fosfato de potasio monobásico NF | 5,1 | 5,3 | 5,6 |
| Cloruro de sodio USP | 2,4 | 2,3 | 2,1 |
| Cloruro de benzalkonio NF | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Disodio de edetato USP | 1,1 | 1,1 | 1,1 |
| Agua purificada USP | Q.S. | Q.S. | Q.S. |

15 Ejemplo 2: Actividad anti-alérgica

El efecto de alcaftadina contra las reacciones de fase aguda de la conjuntivitis alérgica (edema y eritema) se comparó con el efecto de otros anti-alérgenos conocidos en cobayos que fueron sensibilizados sistémicamente a escamas de la piel de conejo y enfrentados tópicamente 17 días más tarde con alérgenos de conejo.

Cobayas albinos machos anestesiados (DunK_n-Hartley) con un peso de 230-250 g fueron inyectados por vía intramuscular en el cuádriceps izquierdo con 50 µl de alérgenos purificados de conejo. Los alérgenos de conejo consistieron en escamas de conejo tras absorción de Al(OH)₃ (Halab, Bruselas, Bélgica), que habían sido homogeneizadas y lavadas de conservante (0.5% (V/V) fenol) con solución de salina fisiológica estéril.

Alcaftadina se administró a cada ojo en dosis que varían de 0,005 mg/kg a 1,0 mg/kg a las 24 horas y 1 hora antes de la exposición. Otros compuestos de ensayo incluyen oxatomida, ketotifeno, astemizol, cetirizina, loratadina y terfenadina, administrados en dosis de 0,1 mg/kg y 1,0 mg/kg.

En el día 17 post sensibilización, al ojo izquierdo se aplicó mediante la instilación de 25 µl de suero de conejo 100 % normal. Al mismo tiempo que la exposición al alérgeno, el ojo derecho se instiló con 25 µl de 1,5 mg/ml de dihidrocloruro de histamina (98%, Sigma) disuelto en agua filtrada-Millipore desionizada.

Treinta minutos después de la exposición, edema y eritema se evaluaron en la conjuntiva tarsal y bulbar de ambos ojos y obtuvo como ausente (0), débil (1), moderado (2), grave (3) o muy grave (4) por un técnico capacitado. Alcaftadina alivió significativamente los síntomas alérgicos agudos que comienzan a dosis de 0,1 mg/kg. En esta prueba, se descubrió que alcaftadina era más potente (sobre una base de mg/kg equivalente) de oxatomida, ketotifeno y terfenadina y significativamente más potente que astemizol, cetirizina y loratadina.

40 Ejemplo 3: Actividad de alcaftadina tópica en la conjuntivitis alérgica

Se ha demostrado que Alcaftadina previene los signos y síntomas de la conjuntivitis alérgica en un modelo murino de la anafilaxia activa.

Ratones machos SWR/J (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine), con edades entre 5-7 semanas y un peso de entre 12,55 y 17,73 gramos, se sensibilizaron con una dosis de 100 µl de una suspensión de 50 µg alérgeno corto de ambrosía (Greer Labs, Inc., Lenoir, NC) y 1 mg de hidróxido de aluminio (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) por inyección intraperitoneal en dos semanas y antes del tratamiento y la aplicación.

En el día 14, primero se les dio a los ratones exámenes de referencia para asegurarse de que no presentaran irritación significativa antes de la administración del tratamiento y la aplicación. Los ratones fueron dosificados por vía tópica en el ojo con una solución oftálmica de alcaftadina de 0,0625%, control positivo (solución oftálmica que comprende combinación de ketotifeno 0,05% y feniramina 0,5%), o placebo antes de una aplicación ocular con 1,5 mg de alérgeno corto de ambrosía en salina tamponada con fosfato.

Quince (15) minutos después de la exposición al alérgeno, los ratones se evaluaron por signos clínicos de la conjuntivitis alérgica al examinar para enrojecimiento conjuntival, quemosis, lagrimeo y edema palpebral. Gravedad de los signos clínicos fue examinado por un técnico entrenado utilizando una escala estandarizada 0-2. Alcaftadina era más eficaz que el control positivo en la prevención de picor, enrojecimiento, quemosis y edema de párpado. alcaftadina fue tan eficaz como el control positivo y más eficaz que el placebo en la prevención de desgarramiento.

65 Ejemplo 4: Efectos de la solución oftálmica de alcaftadina en seres humanos-

El efecto anti-alérgico de una dosis única de cada una de las tres concentraciones de soluciones oftálmicas

de alcaftadina del Ejemplo 1 se evaluó en un desafío de alérgeno conjuntival ("CAC") realizado en voluntarios adultos con una historia de la conjuntivitis alérgica. Los sujetos fueron seleccionados después de dos visitas para confirmar la reactividad a la exposición al alérgeno. Los sujetos cualificados para el estudio si tenían una prueba cutánea positiva y la reacción ocular a por lo menos uno de varios alérgenos comunes tales como el pelo de gato, caspa de gato, polen de árboles, polen de hierba, y similares. Los sujetos fueron desafiados con alérgenos, al infundir alérgeno reconstituido comercialmente disponible en cada ojo en dos visitas separadas 16 horas y 15 minutos después de la instilación de alcaftadina bilateral, solución oftálmica de clorhidrato de olopatadina PATANOL® al 0,1% (Alcon, Inc., Forth Worth, TX) o vehículo, y la respuesta clínica se evaluó.

10 *Prevención del picor ocular*

Los pacientes a los que se había administrado alcaftadina 16 horas antes de la exposición exhibieron una inhibición relacionada con la dosis del picor ocular. Todas las concentraciones de alcaftadina mostraron menores puntuaciones medias de picor en base a la evaluación del asunto mediante una escala de 5 puntos (es decir, menos picor) de vehículo o Patanol a los 3, 5 y 7 minutos después de la exposición. Al ser desafiado 15 minutos posteriores al tratamiento, los sujetos a los que se había administrado alcaftadina mostraron una inhibición relacionada con la dosis de picor ocular, en comparación con el placebo y el grupo de tratamiento con 0,25% tenían puntuaciones de picor más bajas que vehículo o PATANOL.

20 *Prevención del enrojecimiento conjuntivo*

Los pacientes a los que se había administrado alcaftadina 16 horas antes de la exposición también mostraron una inhibición relacionada con la dosis de enrojecimiento conjuntival. Las evaluaciones fueron realizadas a los 7, 15 y 20 minutos después de la exposición sobre la base de las evaluaciones del investigador de enrojecimiento utilizando una escala de 5 puntos. Todas las concentraciones de alcaftadina mostraron diversos grados de reducción en las puntuaciones medias de enrojecimiento conjuntival en la mayoría de los puntos de evaluación. Al ser desafiado a los 15 minutos después del tratamiento, el grupo de tratamiento 0,25% tenían puntuaciones más bajas que vehículo o Patanol.

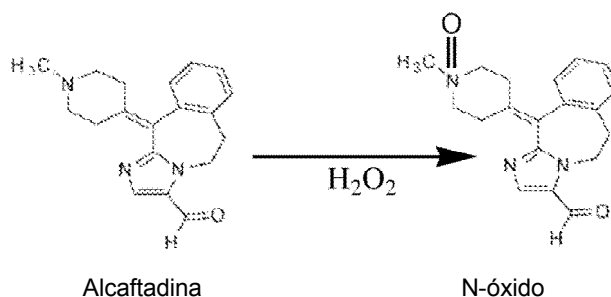
30 *Prevención de síntomas nasales*

Se observaron resultados similares para la prevención de los síntomas nasales inducidos por CAC. Los síntomas nasales de estornudos, rinorrea, prurito (nasal y del oído/paladar hendido) y la congestión nasal fueron evaluados por los sujetos utilizando escalas estandarizadas.

Todas las concentraciones de alcaftadina mostraron algún grado de alivio de la congestión nasal y rinorrea en diversos puntos temporales. Estos números a menudo alcanzaron significación estadística frente al placebo y en algunos casos de control activo ($p \leq 0,05$). Resultados similares han sido obtenidos para los parámetros de picor en la nariz, el paladar y el oído. No se demostró en este estudio ningún efecto sobre el estornudo. Sin embargo, la incidencia básica de estornudos (pre-tratamiento) era probablemente demasiado baja para que se detectase un efecto terapéutico, en su caso. En resumen, una reducción significativa de rinorrea, congestión nasal, prurito y del paladar/oreja se detectó en la mayoría de los puntos de tiempo tanto en aparición como en visitas de duración.

45 **Ejemplo 5: Efecto de la esterilización con irradiación γ Ma**

La alcaftadina es susceptible a la oxidación y el producto de degradación primaria ha sido identificado como la estructura de N-óxido abajo. La existencia de las estructuras de N-óxido, al haberse confirmado que el pico de degradación oxidativa primaria tiene el mismo tiempo de retención relativo de HPLC como estructuras de N-óxido producidas sintéticamente y también confirmó el uso de espectroscopia de masas.



Para investigar los efectos del proceso de irradiación γ Ma se utiliza para esterilizar las botellas de PEBD, la estabilidad química de alcaftadina se estudió usando diferentes lotes de botellas, ya sea γ Ma irradiado o no esterilizado.

Materiales y métodos:

Los siguientes materiales se utilizaron en este estudio.

- 5 Solución de alcaftadina de 2,5 mg/ml
 Botellas de PEBD de 5 ml no esterilizada (DUPONT 20-6064) de Bänder Glas GmbH (Alemania)
 Botellas de PEBD de 5 ml no esterilizada (DUPONT 20-6064) de Rexam (Francia)
 Esterilizada (gaμMa irradiada a 25 kGy) botellas de PEBD (DuPont 20-6064) de Bänder Glas GmbH viales de
 centelleo - 20 ml de vidrio transparente con tapa recubierta de teflón
 10 Unidad de filtro de jeringa Millex GV

Resultados:

15 Resultados de estabilidad química de la solución de alcaftadina almacenada en cualquiera de las botellas no esterilizadas (Rexam o Bunder Glas) o botellas gaμMa-irradiadas (Bunder Glas) se resumen en la Tabla 2. Todas las muestras se analizaron por HPLC después de 6 y 14 días de almacenamiento a 50°C. La exposición de luz no se controló durante el almacenamiento. La solución se almacenan en botellas de Rexam (sin esterilización), botellas Bunder Glas (esterilizadas con irradiación y o sin esterilización) y en viales de vidrio.

20

Tabla 2

| Descripción de contenedor | Proceso de esterilización | Condición de almacenamiento | Tiempo (días) | Alcaftadina (mg/mL) | N-Óxido (%) |
|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------|---------------------|-------------|
| Solución inicial | N/A | N/A | NA | 2,47 | 0,02 |
| Viales de cristal | N/A | 5°C | 6 | 2,52 | 0,008 |
| Viales de cristal | N/A | 50°C | 6 | 2,57* | 0,024 |
| Rexam | Ninguno | 50°C | 6 | 2,46 | 0,015 |
| | | | 14 | 2,48 | 0,033 |
| Bunder Glas | Ninguno | 50°C | 6 | 2,48 | 0,018 |
| | | | 14 | 2,48 | 0,042 |
| Bunder Glas | □ Irradiación | 50°C | 6 | 2,41 | 0,199 |
| | | | 14 | 2,39 | 0,202 |

*Muestra mostró evaporación significativa, consistente con el valor de ensayo más alto observado

35

Conclusiones:

40 Alcaftadina almacenada en botellas irradiadas con radiación gaμMa Bunder Glas observó una elevación significativa de los niveles de formación de N-óxido en comparación con los frascos y botellas de vidrio y Rexam Bunder Glas no esterilizados. Estos datos sugieren que el proceso de esterilización por irradiación gaμMa puede ser la causa primaria de la oxidación mediante la inducción de cambios químicos o físicos en la botella de polietileno.

Ejemplo 6: Efecto de esterilización con óxido de etileno

45

Tanto botellas no esterilizadas de Rexam y Bunder Glas se esterilizaron con óxido de etileno. Se iniciaron estudios de estabilidad y se determinaron niveles de óxido de etileno en <1 ppm (bajo condiciones ambientales) utilizando un método de ensayo de extracción de agua (ANSI/AAMI/ISO: 10993-7) por AppTec (Marietta, Georgia).

Materiales y métodos:

50

La solución de alcaftadina de 2,5 mg/ml se utilizó en este estudio. Las botellas se esterilizan con óxido de etileno de acuerdo con el protocolo expuesto en la Tabla 3:

55

60

65

TABLA 3

| Fase | Parámetro | Punto de ajuste |
|------------------------|-----------------------------------------|---------------------|
| PRECONDICIONAMIENTO | Temperatura | 40°C |
| | % Rel. Humedad | 60% |
| | Tiempo | ≥ 16 horas |
| | Tiempo de transferencia → Esterilizador | 45 minutos |
| Procesamiento de ETO | Temperatura | 45°C |
| Vacío inicial | Presión | 70 mbarA |
| Inyección de vapor | Presión | 42 mbars |
| Dwell de vapor | Tiempo | 45 minutos |
| Exposición de ETO | Inyección de nitrógeno | 250 mbarA |
| | Inyección de ETO | 744 mbarA |
| | Tiempo de dwell de gas | 3 Horas |
| | Concentración de ETO (calculada) | 800 6 50 mg/l |
| Eliminación de gas | Presión | 75 mbarA |
| 2 lavados de nitrógeno | Presión | 75 → 500 → 75 mbarA |
| 1 lavado de aire | Presión | 75 → 500 → 75 mbarA |
| Aeración | Temperatura | 40°C |
| | Tiempo | 10 días |

Resultados:

Los resultados de estabilidad químicos para alcaftadina almacenada en botellas de Rexam y Bunder Glas esterilizadas por óxido de etileno y se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4

| Descripción de contenedor | Proceso de esterilización | Tiempo (días) a 50°C | Alcaftadina (mg/ml) | N-Óxido (%) |
|---------------------------|---------------------------|----------------------|---------------------|-------------|
| Viales de cristal | N/A | 5 | 2,48 | 0,022 |
| | | 14 | 2,51 | 0,028 |
| Bunder Glas | Óxido de Etileno | 5 | 2,46 | 0,052 |
| | | 14 | 2,48 | 0,074 |
| Rexam | Óxido de Etileno | 5 | 2,50 | 0,018 |
| | | 14 | 2,58 | 0,025 |

Conclusiones: En base a los 14 días de almacenamiento a 50°C bajo condiciones de luz ambiental, alcaftadina tiene niveles significativamente más bajos de N-óxido en botellas de Bunder Glas esterilizadas en óxido de etileno que botellas irradiadas con radiación gamma. En este estudio, la cantidad de formación de N-óxido en botellas de Rexam es similar a la observada en los viales de vidrio (0,025% y 0,028%, respectivamente) y ligeramente mayor en las botellas Bunder Glas (0,074%) después de 14 días de almacenamiento a 50°C.

Ejemplo 7: Efecto de alcaftadina en la desgranulación de mastocitos

El potencial de estabilización de células de alcaftadina se evaluó mediante la línea celular RBL-CCR1 (Receptor de leucemia-quimioquinas de basófilos de ratón-1) como un modo de investigación de su capacidad para efectuar la estabilización de los mastocitos. El uso de líneas de células de basófilos para evaluar fármacos antialérgicos para el potencial de estabilización celular está bien establecida. Fisiológicamente, basófilos son similares a los mastocitos, conteniendo mediadores inflamatorios preformados que se liberan a través de un proceso similar que implica la desgranulación de reticulación de IgE. Debido a que estas líneas celulares son fácilmente disponibles, presentan eficiencias respecto a la conducción de ensayos de estabilización en líneas de mastocitos.

Las células cultivadas de RBL-CCR1 se sensibilizó a la IgE anti-DNP. Después de la sensibilización, las células se trataron con varias concentraciones de alcaftadina o su principal metabolito activo (0,083%, 0,0083% y el 0,00083%) o vehículo oftálmico (placebo), y se estimularon con DNP y/o MIP-1α (proteína inflamatoria de macrófagos-1 alfa, un promotor de la desgranulación) para inducir degranulación. También se empleó una solución de control con placebo 10x y 100x (solución oftálmica de vehículos) en D-DEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco).

La estimulación con DNP-HSA (2,4- hapteno dinitrofenilo conjugado a albúmina de suero humano) solo y MIP-1 α solo no indujo niveles significativos de la desgranulación. Sin embargo, la co-estimulación induce una respuesta enérgica en la degranulación. Con los tres estímulos de desgranulación, (DNP-HAS solo, MIP-1 α solo, y co-estimulación) la concentración más alta de fármaco original, metabolito, y placebo provocó desgranulación inesperada y significativa.

En el ensayo de co-estimulación, las concentraciones de alcaftadina de 0,0083% y el 0,00083% fueron superiores en estabilización celular en comparación con el control de co-estimulación y controles negativos (placebo 10x [vehículo 3,3% en D-MEM] y placebo 100x [vehículo de 0,33% en D-MEM], respectivamente). Esta superioridad era estadísticamente significativa ($p < 0,0001$ para ambas concentraciones). El tratamiento con ácido 6,11-dihidro-11-(1-metil-4-piperidinilideno)-5H-imidazo[2,1-b][3]benzazepina-3-carboxílico (CAS # 147083-93-0) a concentraciones de 0,0083% y el 0,00083% fue también superior a la estabilización de células en comparación con el control de co-estimulación y controles negativos (placebo 10x y placebo 100x, respectivamente). De nuevo, se alcanzó significación estadística ($p < 0,0001$ para ambas concentraciones). El tratamiento con placebo 10x solo también indicó cierta estabilización en comparación con el control de co-estimulación y el efecto era estadísticamente significativo ($p < 0,05$).

La adición de la alcaftadina o ácido 6,11-dihidro-11-(1-metil-4-piperidinilideno)-5H-imidazo[2,1-b][3]benzazepina-3-carboxílico (CAS # 147083-93-0) mejoró el efecto de estabilización en el nivel de dosis 10x, lo que demuestra el efecto positivo de los agentes de ensayo en la estabilización de la membrana. Estabilización no se observó en el nivel de dilución 100x. En general, los resultados de este estudio sugieren la alcaftadina y el ácido 6,11-dihidro-11-(1-metil-4-piperidinilideno)-5H-imidazo[2,1-b][3]benzazepina-3-carboxílico (CAS # 147083-93-0) son agentes estabilizantes de membrana efectiva.

Ejemplo 8: Efecto de alcaftadina en receptor H₄ humana

Se investigó la actividad farmacológica de alcaftadina o el ácido 6,11-dihidro-11-(1-metil-4-piperidinilideno)-5H-imidazo[2,1-b][3]benzazepina-3-carboxílico (CAS # 147083 -93-0) en el receptor H₄ de histamina humana (H₄R). El H₄R es el cuarto receptor de la histamina que ha sido identificado y parece que se expresa principalmente en los eosinófilos, células T, células dendríticas, basófilos y mastocitos, tipos de células íntimamente involucradas con el desarrollo y perpetuación de las respuestas alérgicas. H₄R se ha demostrado apta para mediar los mastocitos, eosinófilos y la quimiotaxis de células dendríticas y puede afectar a la producción de citoquinas de las células dendríticas y las células T. Los antagonistas para el receptor son claramente anti-inflamatorios in vivo y son eficaces en modelos animales de asma y colitis. Alcaftadina y ácido 6,11-dihidro-11-(1-metil-4-piperidinilideno)-5H-imidazo[2,1-b][3]benzazepina-3-carboxílico (CAS # 147083-93-0) se ensayaron usando células transfectadas con el receptor para la unión al H₄R y para una indicación en cuanto a si eran agonistas o antagonistas del receptor.

Alcaftadina y ácido 6,11-dihidro-11-(1-metil-4-piperidinilideno)-5H-imidazo[2,1-b][3]benzazepina-3-carboxílico (CAS # 147083-93-0) se prepararon a 10 μ M en 100% de dimetilsulfóxido (DMSO) para los ensayos de unión y en 10 μ M de tampón de fosfato Na/K, pH 7,0, para los ensayos celulares. Los sedimentos celulares de las células SK-N-MC transfectadas con receptor H₄ humano se homogeneizaron en 20 μ M Tris-HCl/0,5 μ M de ácido etilendiaminetetraacético (EDTA) pH 8,0 (tampón TE). Sobrenadantes recogidos después de centrifugación a 800 g se vuelve a centrifugar a 30,000 g durante 30 min. Los sedimentos se re-homogeneizaron en tampón TE. Para los estudios de unión de competición, las membranas se incubaron con 10 nM de histamina [³H], con o sin compuestos de ensayo durante 45 min a 25°C. La unión no específica se definió con 100 μ M de histamina fría. Los valores de K_i se calcularon sobre la base de un valor de K_d determinado experimentalmente de 5 nM para la histamina [³H] y una concentración de ligando de 10 nM de acuerdo con Cheng y Prusoff. Se mostró que siete concentraciones de compuesto abarcan 10⁻¹¹ a 10⁻⁵ M realizándose cada concentración por triplicado. Los triplicados se promediaron y se generó una curva de IC₅₀ (concentración inhibitoria de 50%). Este ensayo se realizó dos veces y los resultados se presentan como la media de las dos realizaciones. Las líneas celulares SK-N-MC se crearon expresando una construcción de gen informador y la región codificante completa de receptor H₄ humano. El gen informador era β -galactosidasa bajo el control de elementos de respuesta de monofosfato de adenosina cíclica (cAMP). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos la noche antes del ensayo. Los antagonistas se añadieron 10 min antes de la adición de histamina, que se añadió directamente al medio celular. Forskolina (concentración final 5 μ M) se añadió 10 min después de la adición de histamina. Las células se devolvieron al incubador durante 6 horas a 37°C. El medio se aspiró y las células se lisaron con 25 μ l de tampón de ensayo de 0,1x (fosfato de sodio 10 μ M, pH 8, 0,2 μ M MgSO₄, 0,01 μ M MnCl₂) y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Las células se incubaron a continuación durante 10 min con 100 μ l de tampón de ensayo 1x que contiene 0,5% de Triton y 40 μ M β -mercaptoetanol. El color se desarrolló utilizando 25 μ l de 1 mg/ml de solución de sustrato (clorofenol rojo β -D-galactopiranosido; Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). El color se cuantificó en un lector de microplacas a una absorbancia 570 nm. Para la determinación agonista se añadieron una titulación de compuestos a partir de 10⁻¹¹ a 10⁻⁴ M por duplicado en ausencia de histamina. Los valores de los duplicados se promediaron y se utilizan para calcular la CE₅₀ (concentración efectiva 50) para la inhibición de la producción cíclica de AMP por forskolina. Este ensayo se repitió tres veces. Para la determinación de antagonista de una titulación de histamina de 10⁻¹⁰ hasta 10⁻³ M se llevó a cabo por duplicado en presencia del compuesto 1,2, 3,7, 11, 33 y 100 μ M. Los

duplicados se promediaron y las EC_{50} para la histamina en cada una de las diferentes concentraciones del compuesto se utilizaron para una parcela Schild para derivar los valores de pA_2 , que son el logaritmo negativo de la concentración de compuesto necesaria para desplazar la EC_{50} de histamina por 2 veces.

5 La alcaftadina y el ácido 6,11-dihidro-11-(1-metil-4-piperidinilideno)-5H-imidazo[2,1-b][3]benzazepina-3-carboxílico (CAS # 147083-93-0) se ensayaron para determinar su capacidad para desplazar unión de [3H]-histamina a membranas de células SK-N-MC establemente transfectadas con el receptor H_4 de histamina. La competencia con histamina [3H] indica que los compuestos pueden unirse al receptor. Las curvas de unión mostraron que alcaftadina se une al receptor con un valor promedio de K_i de 2,9 μM , mientras que ácido 6,11-dihidro-11-(1-metil-4-piperidinilideno)-5H-imidazo[2,1-b][3]benzazepina-3-carboxílico (CAS # 147083-93-0) no se une al receptor en concentraciones de hasta 10 μM .

15 Para evaluar si la alcaftadina o el ácido 6,11-dihidro-11-(1-metil-4-piperidinilideno)5H-imidazo[2,1-b][3]benzazepina-3-carboxílico (CAS # 147083-93-0) eran agonistas del receptor H_4 , ensayos funcionales se realizaron en células SK-N-MC transfectadas con el receptor H_4 de histamina humana. Se evaluó la capacidad de los compuestos para inhibir los aumentos de cAMP inducida por la forskolina. Los resultados mostraron que la histamina es un agonista del receptor y causa una inhibición dependiente de la dosis de los niveles de cAMP inducida por la forskolina. Sin embargo, ni alcaftadina o 6, 11-dihidro-11-(1-metil-4-piperidinilideno)-5H-imidazo[2,1-b][3]benzazepina-3-ácido carboxílico (CAS # 147083-93-0) mostraron ninguna inhibición de los niveles de cAMP y por lo tanto tampoco es un agonista del receptor H_4 en concentraciones de hasta 100 μM .

25 Para evaluar si alcaftadina o el ácido 6,11-dihidro-11-(1-metil-4-piperidinilideno)5H-imidazo[2,1-b][3]benzazepina-3-carboxílico (CAS # 147083-93-0) eran antagonistas del receptor H_4 , la capacidad de los compuestos desplazan la EC_{50} de la inhibición de la histamina de los aumentos de cAMP inducida por la forskolina se evaluó en las células SK-N-MC transfectadas con el receptor H_4 de histamina humana. Los resultados mostraron que concentraciones crecientes de alcaftadina causaron desplazamientos paralelos y hacia la derecha en las curvas de respuesta de dosis de histamina (HA) que conducen a un aumento en la EC_{50} para la modulación de histamina y el receptor H_4 . Este efecto indica que alcaftadina es un antagonista competitivo del receptor. La x-intersección de trama Schild da un valor pA_2 de 5,6, que representa el logaritmo negativo de la concentración de antagonista necesitan inducir un cambio de 2 veces en la EC_{50} de histamina. En teoría, el valor de pA_2 debe ser igual a la pK_i , la cual se observa (5,6 frente a 5,5). Alcaftadina o ácido 6,11-dihidro-11-(1-metil-4-piperidinilideno)5H-imidazo[2,1-b][3]benzazepina-3-carboxílico (CAS # 147083-93-0) no causó ningún cambio en concentraciones de hasta 100 μM , lo cual es consistente con su incapacidad de unirse al receptor.

35 Estos resultados indican que alcaftadina se une al receptor H_4 con un valor promedio K_i de 2,9 μM . Ni alcaftadina o ácido 6,11-dihidro-11-(1-metil-4-piperidinilideno)5H-imidazo[2,1-b][3]benzazepina-3-carboxílico (CAS # 147083-93-0) es un agonista del receptor H_4 en concentraciones de hasta 100 μM . Sin embargo, alcaftadina, pero no alcaftadina o ácido 6,11-dihidro-11-(1-metil-4-piperidinilideno)5H-imidazo[2,1-b][3]benzazepina-3-carboxílico (CAS # 147083-93-0) (hasta 100 μM), es un antagonista del receptor H_4 de histamina humana con un valor K_i de 2,9 μM y valor pA_2 de 5,6.

Ejemplo 9: Efectos de alcaftadina sobre la integridad del epitelio conjuntival

45 Para investigar la capacidad de alcaftadina para mantener la integridad del epitelio conjuntival, los cambios en la expresión de las proteínas de unión estrecha ZO-1 y E-cadherina (una inducción para E-cadherina y los cambios cualitativos de la céntrica a difundirse por ZO-1) fueron evaluados después de la exposición al alérgeno conjuntival específico. Estos cambios están asociados con un aumento de la permeabilidad de la conjuntiva y otros tejidos epiteliales. Este experimento in vivo examinó el efecto que alcaftadina (administración tópica de 1 y 2 horas antes de la provocación) tuvo en la modulación de estas proteínas.

50 Los ratones se sensibilizaron con la ambrosía corta (SRW) en hidróxido de aluminio a través de la administración intraperitoneal (Día 0, 7 y 15) y la instilación de gotas para los ojos (Día 8 y 15). En el día 20, los ratones fueron sensibilizados con más gotas para los ojos que contienen sólo SRW. En el Día 27, los ratones se trataron tópicamente con alcaftadina de 5 μl o vehículo a 1 y 2 horas antes de la exposición. La SRW fue infundida por vía tópica a ambos ojos. La expresión de estas proteínas en los ojos tratados previamente también fueron monitoreados. Los cambios en la expresión de las proteínas de unión estrecha ZO-1 y E-cadherina se observaron después de la exposición de alérgeno post conjuntival de 1 hora con SRW. Las proteínas se detectaron utilizando anticuerpos monoclonales conjugados con FITC específicos para ZO-1 y E-cadherina y se visualizaron mediante microscopía confocal (Ziess). Ojos no tratados eran de ratones que no habían sido sensibilizados o desafiados.

60 Las proteínas ZO-1 y E-cadherina no tratadas (sin desafío y sin tratamiento) mostraron propiedades cualitativas focales. Sin embargo, la comparación de esto a proteínas tratadas con vehículo, las proteínas tratadas con vehículo mostraron cambios cualitativos difusos. La transición de la tinción focal a difusa se asocia con aumento de la permeabilidad del epitelio. Al comparar proteínas ZO-1 y E-cadherina no tratadas con proteínas tratadas por alcaftadina, los resultados muestran una diferencia mínima en las propiedades cualitativas. Imágenes de proteínas

65

ZO-1 y E-cadherina mostraron ninguna o mínima diferencia entre no tratamiento de alcaftadina (control negativo) y tratamiento, mientras que no hubo ninguna diferencia clara y distinta con el tratamiento con vehículo.

Estos resultados sugieren que alcaftadina mantiene la integridad de las uniones estrechas epiteliales de la conjuntiva (tipificada por expresión focal ZO-1) e inhibe la inducción de la expresión de E-cadherina normalmente observada después de la exposición al alérgeno conjuntival específica.

Ejemplo 10: Efecto de alcaftadina en fuga vascular e infiltrados celulares

La inflamación alérgica se puede separar en dos fases distintas, la fase temprana y la fase tardía. La respuesta inflamatoria de fase temprana se produce rápidamente después de la desgranulación de los mastocitos y se caracteriza por la brecha celular endotelial vascular y fuga (es decir, inflamación) y el picor. La respuesta inflamatoria de fase tardía llega a su punto máximo aproximadamente 24 horas después de la desgranulación de los mastocitos y se caracteriza por la aparición de infiltrados celulares (eosinófilos y neutrófilos). Se sabe que tanto eosinófilos como neutrófilos tienen un efecto profundo en potenciar la fase tardía de la respuesta inflamatoria. Al llegar al sitio de la inflamación, estas células liberan varias peroxidasas y otros factores antimicrobianos que funcionan para matar a los patógenos invasores, pero, en el caso de inflamación severa o crónica, daños rodean los tejidos y causan liberación posterior de mediadores pro-inflamatorios.

Se evaluó la solución oftálmica de alcaftadina para determinar si el tratamiento tópico podría reducir la inflamación alérgica de fase temprana y de fase tardía en un modelo murino de conjuntivitis alérgica. Fuga de Tinte Azul de Evans se utilizó para evaluar el impacto sobre la permeabilidad vascular durante la respuesta inflamatoria de fase temprana. La conjuntiva se tomó a las 24 horas, se tiñó y se evaluó la presencia de neutrófilos y la infiltración de eosinófilos para evaluar la actividad anti-inflamatoria de fase tardía.

Todos los ratones fueron sensibilizados con ambrosía corta (SRW) en hidróxido de aluminio a través de la administración intraperitoneal (Día 0, 7 y 14) y la instilación de gotas para los ojos (Día 8 y 15). En el día 20, los ratones se sensibilizaron de nuevo con gotas para los ojos de SRW.

En el día 27, dos administraciones tópicas de la dosis clínica de alcaftadina 2,5 mg/ml de vehículo se instilaron a 1 y 2 horas antes del desafío. Alcaftadina y el vehículo se administraron por vía tópica a una dosis saturante de 5 ml como grupos de tratamiento en base a un código de aleatorización. Los grupos de tratamiento fueron los siguientes:

1. Control negativo. Sensibilizado, Ningún desafío, ningún tratamiento (control negativo) (N=12)
2. Sensibilizado, Desafío, ningún tratamiento (control positivo) (N=12)
3. Sensibilizadas, Desafío, tratamiento de alcaftadina 2,5 mg/ml (N=10)
4. Sensibilizadas, Desafío, tratamiento con vehículo (N=12)

La fuga vascular se determinó por medio de Extravasación de Tinte Azul Evans tras exposición al alérgeno para animales N=6, excepto el brazo de tratamiento de alcaftadina, donde animales N=4 fueron sacrificados y se prueban (dos animales murieron durante el procedimiento). Los grupos de tratamiento se compararon mediante la prueba T y $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. La disección se llevó a cabo en los animales restantes, N=6 por grupo de tratamiento, 24 horas después del desafío de alérgeno post conjuntivo (CAC) para evaluar eosinófilos y el reclutamiento de neutrófilos en la zona forniceal. Los tejidos se procesaron en bloques ya sean congelados o de plástico antes de seccionarse en un microtomo. El número de eosinófilos y neutrófilos se determinó tanto por microscopía de luz de Giemsa o secciones teñidas H&E como por inmunohistoquímica usando anticuerpos monoclonales específicos de células. Los grupos de tratamiento se compararon mediante la prueba T y $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

No hubo diferencia significativa entre el control negativo (grupo sin desafío- Grupo 1) y el grupo desafiado, pero sin tratar (Grupo 2). Sin embargo, como era de esperar, hubo una diferencia numérica con el Grupo 2 que tiene una puntuación más alta de fuga vascular. Hubo una diferencia significativa entre el tratamiento con vehículo (grupo 4) y grupos de tratamiento con alcaftadina (Grupo 3) ($p < 0,05$), previniendo la alcaftadina con éxito la pérdida vascular en comparación con el vehículo. Como se esperaba, hubo una diferencia significativa entre el control negativo (grupo sin desafío-Grupo 1) y el grupo sin tratar, pero desafiado (Grupo 2). Alcaftadina (Grupo 3) no impidió eosinófilos o el reclutamiento de neutrófilos en comparación con los controles.

En cuanto a la permeabilidad vascular, no se observó la inducción típica de fuga vascular en el grupo 2 (desafiado y sin tratar). Sin embargo, alcaftadina inhibió significativamente la fuga vascular después de CAC en comparación con los ratones tratados solo con vehículo. Basándose en las observaciones de los estudios anteriores, el bajo nivel de fuga vascular en el Grupo 2 es atípico y es más probable debido al error experimental asociado con experimentos in vivo. La fuga vascular disminuida en los animales tratados con alcaftadina apoya un papel terapéutico para alcaftadina en este modelo de exposición al alérgeno conjuntival.

En la evaluación de eosinófilos o el reclutamiento de neutrófilos, la diferencia significativa entre los controles

negativos y positivos sugiere que el modelo funcionó como se esperaba. Sin embargo, en la dosis utilizada, la alcaftadina no inhibe eosinófilos o el reclutamiento de neutrófilos en la respuesta de fase tardía, en el modelo murino de la conjuntivitis alérgica después de la exposición de alérgenos en ratones sensibilizados.

5 Los resultados de este estudio indican que alcaftadina inhibió significativamente la fuga vascular después de la exposición al alérgeno conjuntival. Sin embargo, no parece inhibir eosinófilos o el reclutamiento de neutrófilos en la respuesta de fase tardía, en el modelo murino de la conjuntivitis alérgica después de la exposición de alérgenos en ratones sensibilizados.

10 **Ejemplo 11: Niveles sistémicos en pacientes de alcaftadina**

Los pacientes fueron dosificados en forma bilateral con soluciones oftálmicas de 0,25% de alcaftadina durante siete días. Los niveles de plasma de los pacientes se evaluaron antes de la dosis y 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, y 18 horas post instilación de medicación en los días uno y siete. Las concentraciones plasmáticas de alcaftadina llegaron rápidamente a C_{max} y se redujeron por debajo del límite inferior de cuantificación (0,01 ng/mL) por 3 horas después de la dosificación. Los valores medios de C_{max} (el valor máximo medido en cualquier punto de tiempo) eran bastante bajos, con una media de 0,051 ng/ml en el Día 1 y 0,060 ng/mL en el Día 7; las concentraciones plasmáticas máximas eran de menos de 0,12 ng/ml para todos los sujetos.

20 **Ejemplo 12: Niveles sistémicos de ácido 6,11-dihidro-11-(1-metil-4-piperidinilideno)-5H-imidazo[2,1-b][3]benzazepina-3- carboxílico en Pacientes**

Los pacientes fueron dosificados bilateralmente con soluciones oftálmicas 0,25% de ácido 6,11-dihidro-11-(1-metil-4-piperidinilideno)-5H-imidazo[2,1-b][3]benzazepina-3- carboxílico durante siete días. Los niveles plasmáticos de los pacientes se evaluaron pre-dosis, y 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, y 18 horas post instilación de medicación en los días uno y siete. Las concentraciones plasmáticas de ácido 6,11-dihidro-11-(1-metil-4-piperidinilideno)5H-imidazo[2,1-b][3]benzazepina-3-carboxílico alcanzaron C_{max} rápidamente y se redujeron hasta por debajo del límite inferior de cuantificación (0,1 ng/ml) por 12 horas después de la dosificación. Los valores medios de C_{max} de 3,228 ng/ml en el día 1 y 2,715 ng/ml en el Día 7; las concentraciones máximas en plasma era de 7,23 ng/mL.

35

REIVINDICACIONES

5 **1.** Una composición oftálmica que comprende alcaftadina, sus sales farmacéuticamente aceptables, sus N-óxidos, hidratos, solvatos, polimorfos o mezclas de los mismos, en donde la composición oftálmica comprende el 0,25% en peso de alcaftadina.

10 **2.** Un kit que comprende una composición oftálmica que comprende alcaftadina, sus sales farmacéuticamente aceptables, sus N-óxidos, hidratos, solvatos, polimorfos o mezclas de los mismos contenidos dentro de un recipiente preparado a partir de un material de envasado farmacéuticamente aceptable, en donde el recipiente es una botella flexible preparada a partir de polietileno de baja densidad o polietileno de alta densidad.

3. El kit de la reivindicación 2, en el que la botella flexible se prepara a partir de polietileno de baja densidad.

15 **4.** El kit de la reivindicación 3, en donde la botella flexible es una botella cuentagotas flexible.

20