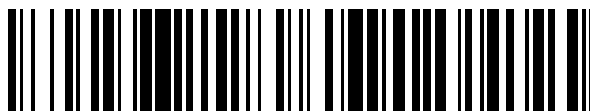


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 641**

51 Int. Cl.:

A61K 9/107 (2006.01)
A61K 38/13 (2006.01)
A61K 31/7016 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61K 47/44 (2007.01)
A61K 47/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.10.2015 PCT/KR2015/011048**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2016 WO16060532**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2015 E 15850677 (4)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 3213763**

54 Título: **Composición oftálmica que comprende ciclosporina y trehalosa**

30 Prioridad:

17.10.2014 KR 20140141089

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.07.2020

73 Titular/es:

**HUONS CO., LTD. (100.0%)
 C-902, 253, Pangyo-ro Bundang-gu Seongnam-si
 Gyeonggi-do 13486, KR**

72 Inventor/es:

**LIM, JONG HWAN;
 HONG, SUNG-WOON;
 KO, DAE WOONG;
 NAM, SEUNG KWAN;
 AHN, MI SUN;
 HWANG, DEOK-KYU;
 KIM, YEONG-MOK y
 UM, KEY-AN**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 773 641 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

Composición oftálmica que comprende ciclosporina y trehalosa

5 CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente descripción se refiere a una composición oftálmica, un procedimiento para prepararla, cuya composición es para el uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades oculares.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Las lágrimas del ojo están formadas por tres capas, una capa de aceite, una de agua y una de mucina, y la película lagrimal presenta la estructura de tres capas. El síndrome del ojo seco o las enfermedades de ojos secos (en lo sucesivo, denominadas "ojos secos") vienen en una amplia gama de conceptos y, en muchos casos, se desconocen sus causas. Por consiguiente, los ojos secos se definen, más que como una enfermedad, como una condición anormal de los ojos que resultan de una película lagrimal inestable causada por una disminución o un cambio en la cantidad o la calidad de las lágrimas y hacen que la película lagrimal se rompa más rápido de lo normal.

[0003] Según la definición, las categorías de ojos secos incluyen enfermedades como queratoconjuntivitis sicca, trastorno epitelial queratoconjuntival, secreción reducida de fluidos lagrimales, síndrome de Stevens-Johnson, síndrome de ojos secos, síndrome de Sjogren, deficiencia lagrimal, hiperemia ocular, inestabilidad de la película lagrimal o edema ocular. Además, las categorías de los ojos secos incluyen la conjuntivitis alérgica, la conjuntivitis viral o los ojos secos después de una cirugía de cataratas. Además, recientemente, con el número creciente de usuarios de lentes de contacto, el hecho de pasar tiempo en entornos controlados por aire artificial y la oportunidad de ver terminales de pantallas de vídeo (VDT) con el amplio uso de televisores y ordenadores, los factores que promueven los ojos secos han aumentado drásticamente, y, como resultado, las categorías de ojos secos incluyen ojos secos relacionados con el uso de lentes de contacto u ojos secos relacionados con la operación de VDT.

[0004] Además, aquellos que sufren de ojos secos tienen, en muchos casos, un trastorno con queratoconjuntivitis sicca. Particularmente, cuando hay una deficiencia lagrimal en la capa de mucosa, el daño corneal es grave y causa un trastorno epitelial queratoconjuntival, y las categorías del trastorno epitelial queratoconjuntival incluyen ojos secos, defecto epitelial corneal, defecto epitelial conjuntival, erosión epitelial corneal, grosor corneal reducido, infiltrado corneal, perforación corneal o exfoliación epitelial corneal, y el trastorno epitelial queratoconjuntival resulta en una úlcera corneal, queratitis, conjuntivitis, queratopatía punctata superficial, queratoconjuntivitis sicca, queratoconjuntivitis límbica superior, queratitis filamentosa, úlcera corneal y enfermedades oculares infecciosas del epitelio conjuntival y corneal. El trastorno epitelial queratoconjuntival puede ser causado por una lesión ocular, una microcirugía o el uso de lentes de contacto duros.

[0005] El tratamiento de los ojos secos se concentra en permitir el mantenimiento de la menos un volumen predeterminado de lágrimas mediante un procedimiento conservador, como el reabastecimiento de lágrimas artificiales con gotas oculares o el bloqueo temporal o de por vida de los conductos lagrimales, aunque recientemente, con la expansión del concepto de tratamiento, la tendencia del tratamiento de los ojos secos se mueve hacia el tratamiento activo con el uso de medicamentos que promueven la secreción de fluido lagrimal incluso para los casos leves de ojos secos, en lugar del tratamiento pasivo con la finalidad de aliviar el síndrome. En concordancia con esta tendencia, el uso de agentes inmunosupresores para tratar los ojos secos se vuelve más frecuente. El agente inmunosupresor incluye ciclosporina, sirolimus, tacrolimus y sus derivados. Entre ellos, uno de los medicamentos comercialmente disponibles son las gotas oculares en forma de emulsión de ciclosporina A 0,05% (Restasis®). Se sabe que esto es efectivo en el tratamiento del síndrome de ojos secos y que está relacionado con el trastorno epitelial queratoconjuntival, pero, al mismo tiempo, se sabe que causa muchos efectos secundarios, y la reacción anormal más común es la sensación de quemadura en los ojos y la hiperemia conjuntival, aunque también se han informado casos de descarga ocular, epifora, dolor ocular, una sensación de cuerpo extraño, prurito, una sensación de puntada filosa, deterioro de la visión (a menudo, visión borrosa) en algunos pacientes. Según el ensayo cuyo autor es Ji Eun Lee y col., como resultado del contacto con el 0,05% de ciclosporina durante 10 minutos, se ha observado un aumento de la apoptosis y una viabilidad celular reducida, y, para el uso sin efecto tóxico de las células epiteliales corneales, la duración de la exposición al 0,05% de ciclosporina debería ser inferior a 10 minutos (J Korean Ophthalmol Soc 48(10): 1399-1409, 2007), y la viabilidad celular se redujo significativamente a 0,05% (5 mg/mL) o más de ciclosporina (Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol (2006) 244: 382-389).

[0006] Además de la ciclosporina, el uso de una cantidad excesiva de agentes inmunosupresores causa efectos secundarios como anemia, leucopenia, trombocitopenia y pérdida del cabello. Sin embargo, en concordancia con la tendencia reciente, para el tratamiento de casos graves de ojos secos, así como también de los síntomas clínicos de incomodidad, incluso en casos leves, se recurre al uso activo de agentes inmunosupresores para tratar los ojos secos. Además, por lo general, los pacientes con ojos secos tienen muchos tipos de medicamentos y dosis frecuentes, y se sabe que estos factores reducen el cumplimiento del medicamento, así como también el efecto del tratamiento.

65

[0007] Por el otro lado, la trehalosa es un disacárido en el que dos moléculas de glucosa se unen entre sí en su residuo reductor, y presenta tres isómeros ópticos, α , α -trehalosa, α , β -trehalosa y β , β -trehalosa. En el mundo natural, la trehalosa está ampliamente presente en bacterias, plantas y animales, y en la industria alimentaria, la trehalosa presenta una amplia gama de aplicaciones debido a sus características superiores, como una dulzura relativamente baja, el antienviejamiento del almidón y la prevención de la degradación de proteínas durante el congelamiento/secado. Además, la Publicación de patente coreana No. 10-2002-0021320 (publicada el 20 de marzo de 2002) describe donde una composición que contiene trehalosa como único ingrediente activo presenta un efecto en el tratamiento del síndrome de Sjogren.

10 **[0008]** Sin embargo, hasta el momento, no hay ningún informe al respecto de los efectos de una composición oftálmica que contenga dos ingredientes, ciclosporina y trehalosa, especialmente para la prevención, reducción y tratamiento adicional de una amplia variedad de ojos secos. Y, además, tampoco hay reseña alguna de un efecto sinérgico de los dos ingredientes cuando se los combina, ni de la relación de peso o intervalo del % de peso para mostrar el efecto sinérgico.

15 DESCRIPCIÓN

Problema técnico

20 **[0009]** El problema a ser resuelto por la presente descripción es proporcionar una composición oftálmica que ejerza un efecto equivalente o superior con una cantidad reducida de ciclosporina, y presente un efecto combinado superior en los ojos secos que pueden ocurrir a través de varios canales y se ponen en varios estados o condiciones, en lugar de una única enfermedad.

25 Solución Técnica

[0010] Para lograr el objeto, la presente descripción proporciona una composición oftálmica que contiene ciclosporina y trehalosa, en la que los dos ingredientes se mezclan en una relación o intervalo de % en peso predeterminados. Los inventores descubrieron que esta composición oftálmica ejercía un efecto equivalente o superior con una cantidad reducida de ciclosporina, y que tenía un efecto que no puede ser ejercido por una composición que contiene ciclosporina sola o trehalosa sola como ingrediente activo, por ejemplo, un efecto combinado superior en los ojos secos que pueden ocurrir a través de varios canales, por ejemplo, inducidos con aire seco, inflamación ocular o preservativos y que se ponen en varios estados o condiciones, y lograron la invención mediante su preparación como un complejo de ciclosporina-trehalosa.

35 **[0011]** Por lo tanto, la presente descripción proporciona una composición oftálmica que incluye ciclosporina y trehalosa como ingredientes activos, un procedimiento para prepararlas, cuya composición es para el uso en la prevención, reducción o tratamiento de enfermedades oculares (preferentemente, ojos secos).

40 **[0012]** Más específicamente, la presente descripción proporciona una composición oftálmica que incluye ciclosporina y trehalosa como ingredientes activos, y preferentemente una composición oftálmica para prevenir, reducir o tratar ojos secos, mediante la administración de una composición oftálmica que incluye una cantidad farmacéuticamente efectiva de ciclosporina y trehalosa a mamíferos (preferentemente, humanos).

45 **[0013]** Además, la presente descripción proporciona el uso de ciclosporina y trehalosa para preparar una composición oftálmica (preferentemente, una composición oftálmica para prevenir, reducir o tratar los ojos secos).

[0014] En la composición oftálmica según la presente descripción, cuando los dos ingredientes activos se mezclan en una relación predeterminada, se produce un efecto sinérgico y, además, se maximiza, y preferentemente una relación de peso de la ciclosporina:trehalosa es de 1:20 - 200, 1:20 - 190, 1:20 - 180, 1:20 - 170, 1:20 - 160, 1:20 - 150, 1:20 - 140, 1:20 - 130, 1:20 - 120, 1:20 - 110, 1:20 - 100, 1:20 - 90, 1:20 - 80, 1:20 - 70, 1:20 - 60, 1:20 - 50, 1:20 - 40, 1:20 - 30, 1:20, 1:30 - 200, 1:30 - 190, 1:30 - 180, 1:30 - 170, 1:30 - 160, 1:30 - 150, 1:30 - 140, 1:30 - 130, 1:30 - 120, 1:30 - 110, 1:30 - 100, 1:30 - 90, 1:30 - 80, 1:30 - 70, 1:30 - 60, 1:30 - 50, 1:30 - 40, 1:30, 1:40 - 200, 1:40 - 190, 1:40 - 180, 1:40 - 170, 1:40 - 160, 1:40 - 150, 1:40 - 140, 1:40 - 130, 1:40 - 120, 1:40 - 110, 1:40 - 100, 1:40 - 90, 1:40 - 80, 1:40 - 70, 1:40 - 60, 1:40 - 50, 1:40, 1:50 - 200, 1:50 - 190, 1:50 - 180, 1:50 - 170, 1:50 - 160, 1:50 - 150. Cuando la relación de peso es menor a 1:20, el efecto combinado en los ojos secos que se pone en varios estados o condiciones no es de esperar, no puede esperarse y, cuando la relación de peso es mayor a 1:200, se vuelve imposible mantener tanto la presión osmótica efectiva (alrededor de 230 a 320 mOsmol/kg) de las gotas oculares como la nanoemulsión transparente.

60 **[0015]** Adicionalmente, cuando los dos ingredientes activos se mezclan en un intervalo de % de peso particular, se produce un efecto sinérgico y, además, se maximiza, y la ciclosporina está presente en más del 0,01% en peso, sobre la base del peso total de la composición oftálmica. Sin embargo, preferentemente, la ciclosporina está presente en menos de un 0,1% en peso y, cuando la ciclosporina está presente en más de un 0,1% en peso, hay efectos secundarios, como una sensación de quemadura y visión borrosa. Preferentemente, la ciclosporina está presente en

más del 0,01% en peso y menos de, o en una cantidad igual a, el 0,05% en peso, más del 0,01% en peso y menos del 0,05% en peso, más de o igual al 0,02% en peso y menos de o igual al 0,05% en peso, más de o igual al 0,02% en peso y menos del 0,05% en peso, más de o igual al 0,02% en peso y menos de o igual al 0,05% en peso, más del 0,01% en peso y menos de o igual al 0,04% en peso, más de o igual al 0,02% en peso y menos de o igual al 0,04% en peso, más del 0,01% en peso y menos de o igual al 0,03% en peso, más de o igual al 0,02% en peso y menos de o igual al 0,03% en peso, o 0,02% en peso, sobre la base del peso total de la composición oftálmica.

[0016] Además, la trehalosa puede estar presente en una cantidad superior o igual al 0,5% en peso, sobre la base del peso total de la composición oftálmica. Por ejemplo, la trehalosa puede estar presente en un 0,5% en peso o más, en un 0,6% en peso o más, en un 0,7% en peso o más, en un 0,8% en peso o más, en un 0,9% en peso o más, en un 1% en peso o más, en un 1,1% en peso o más, en un 1,2% en peso o más, en un 1,3% en peso o más, en un 1,4% en peso o más, en un 1,5% en peso o más, en un 1,6% en peso o más, en un 1,7% en peso o más, en un 1,8% en peso o más, en un 1,9% en peso o más, en un 2% en peso o más, en un 2,1% en peso o más, en un 2,2% en peso o más, en un 2,3% en peso o más, en un 2,4% en peso o más, en un 2,5% en peso o más, en un 2,6% en peso o más, en un 2,7% en peso o más, en un 2,8% en peso o más, en un 2,9% en peso o más, en un 3% en peso o más, en un 3,1% en peso o más, en un 3,2% en peso o más, en un 3,3% en peso o más, en un 3,4% en peso o más, en un 3,5% en peso o más, en un 3,6% en peso o más, en un 3,7% en peso o más, en un 3,8% en peso o más, en un 3,9% en peso o más, en un 4% en peso o más, en un 4,1% en peso o más, en un 4,2% en peso o más, en un 4,3% en peso o más, en un 4,4% en peso o más, en un 4,5% en peso o más, en un 4,6% en peso o más, en un 4,7% en peso o más, en un 4,8% en peso o más, en un 4,8% en peso o más, en un 4,9% en peso o más, en un 5% en peso o más, en un 7,5% en peso o menos, del 0,5 al 7,5% en peso, del 0,5 al 7% en peso, del 0,5 al 6,5% en peso, del 0,5 al 6% en peso, del 0,5 al 5,5% en peso, del 0,5 al 5% en peso, del 0,5 al 4,5% en peso, del 0,5 al 4% en peso, del 0,5 al 3,5% en peso, del 0,5 al 3% en peso, del 0,6 al 7,5% en peso, del 0,6 al 7% en peso, del 0,6 al 6,5% en peso, del 0,6 al 6% en peso, del 0,6 al 5,5% en peso, del 0,6 al 5% en peso, del 0,6 al 4,5% en peso, del 0,6 al 4% en peso, del 0,6 al 3,5% en peso, del 0,6 al 3% en peso, del 0,7 al 7,5% en peso, del 0,7 al 7% en peso, del 0,7 al 6,5% en peso, del 0,7 al 6% en peso, del 0,7 al 5,5% en peso, del 0,7 al 5% en peso, del 0,7 al 4,5% en peso, del 0,7 al 4% en peso, del 0,7 al 3,5% en peso, del 0,7 al 3% en peso, del 0,8 al 7,5% en peso, del 0,8 al 7% en peso, del 0,8 al 6,5% en peso, del 0,8 al 6% en peso, del 0,8 al 5,5% en peso, del 0,8 al 5% en peso, del 0,8 al 4,5% en peso, del 0,8 al 4% en peso, del 0,8 al 3,5% en peso, del 0,8 al 3% en peso, del 0,9 al 7,5% en peso, del 0,9 al 7% en peso, del 0,9 al 6,5% en peso, del 0,9 al 6% en peso, del 0,9 al 5,5% en peso, del 0,9 al 5% en peso, del 0,9 al 4,5% en peso, del 0,9 al 4% en peso, del 0,9 al 3,5% en peso, del 0,9 al 3% en peso, del 1 al 7,5% en peso, del 1 al 7% en peso, del 1 al 6,5% en peso, del 1 al 6% en peso, del 1 al 5,5% en peso, del 1 al 5% en peso, del 1 al 4,5% en peso, del 1 al 4% en peso, del 1 al 3,5% en peso, del 1 al 3% en peso, sobre la base del peso total de la composición oftálmica. Cuando la trehalosa está presente en menos del 0,5% en peso, el efecto combinado en los ojos secos que se ponen en varios estados y condiciones no puede esperarse, y cuando la trehalosa está presente en más del 7,5% en peso, es imposible mantener tanto la presión osmótica efectiva (alrededor de 230 a 320 mOsmol/kg) de las gotas oculares como la nanoemulsión transparente.

[0017] Por ejemplo, la composición oftálmica puede incluir más del 0,01% en peso y menos del 0,1% en peso de ciclosporina y del 0,5 al 7,5% en peso de trehalosa, más del 0,01% en peso y menos del 0,05% en peso de ciclosporina y del 0,5 al 5% en peso de trehalosa, más del 0,01% en peso y menos del 0,05% en peso de ciclosporina y del 0,5 al 3,5% en peso de trehalosa, el 0,02% en peso o más y menos del 0,05% en peso de ciclosporina y del 0,5 al 5% en peso de trehalosa, el 0,02% en peso o más y menos del 0,05% en peso de ciclosporina y del 0,5 al 3,5% en peso de trehalosa, el 0,02% en peso o más y menos del 0,05% en peso de ciclosporina y del 1 al 3% en peso de trehalosa, el 0,02% en peso de ciclosporina y del 1 al 3% en peso de trehalosa.

[0018] Preferentemente, para la acción sinérgica de la ciclosporina y la trehalosa, la composición oftálmica según la presente descripción incluye, preferentemente, ciclosporina y trehalosa dentro de la relación de peso y/o intervalo de % en peso antes mencionados.

[0019] En la presente descripción, sobre la premisa de que el ingrediente activo del mismo % sobre la base del % en peso de la composición total se incluye en la composición oftálmica, en comparación con una composición oftálmica que contiene ciclosporina sola o trehalosa sola como ingrediente activo, el término "acción sinérgica" puede incluir un efecto mejorado o realzado en la misma enfermedad ejercido por la composición oftálmica que contiene ciclosporina sola o trehalosa sola como ingrediente activo, un efecto que aparece en una enfermedad que no es ejercido por la composición oftálmica que contiene ciclosporina sola o trehalosa sola como ingrediente activo o un efecto secundario aliviado o una desventaja involucrada en la composición oftálmica que contienen ciclosporina sola o trehalosa sola como ingrediente activo. Por ejemplo, la acción sinérgica puede incluir un efecto de tratamiento notablemente incrementado, en comparación con la administración de ciclosporina sola o trehalosa sola, los efectos en la reducción del daño corneal, la recuperación de la cantidad de secreción ocular, la reducción de la inflamación ocular, la mejora de la calidad lagrimal, la irritación ocular (eritema, edema y un aumento de la descarga de la conjuntiva), la reducción, mantenimiento, lubricación y humidificación de la película lagrimal, y un efecto en el aumento de la cantidad de secreción de mucina debido al incremento de la actividad de las células calciformes en las que las células calciformes son responsables de la secreción de mucina, en todos los modelos de ojos secos inducidos con aire seco, el modelo de ojos secos inducidos con inflamación y el modelo de ojos secos inducidos con un preservativo.

[0020] En la presente descripción, se puede usar la "ciclosporina" o la "trehalosa" sin importar su procedimiento de preparación y origen, siempre y cuando no se dificulte el objeto de la presente descripción.

5 **[0021]** Además, la ciclosporina puede incluir, como su sustancia activa, ciclosporina A, derivados de la ciclosporina A, ciclosporina B, ciclosporina C, ciclosporina D y las mezclas de las mismas y, preferentemente, puede incluir ciclosporina A. La trehalosa puede incluir, como su sustancia activa, tres isómeros ópticos, α , α -trehalosa, α , β -trehalosa, β , β -trehalosa y las mezclas de las mismas.

10 **[0022]** Además, en la presente descripción, los términos "ciclosporina" o "trehalosa" se definen como términos que abarcan sus derivados farmacéuticamente aceptables, los cuales se reconocerán como que tienen o proporcionan la misma función y/o actividad biológica que la ciclosporina o la trehalosa, y pueden incluir un promedicamento de ciclosporina o trehalosa, su solvato y su cocrystal, siempre y cuando no se dificulte el objeto de la presente descripción.

15 **[0023]** El término "promedicamento" se refiere a la ciclosporina o trehalosa formada en una cantidad que puede detectarse experimentalmente dentro de un período de tiempo predeterminado a través del metabolismo después de la administración.

[0024] El término "solvato" hace referencia a un compuesto que incluye además una cantidad estequiométrica
20 o no estequiométrica de solventes sostenidos por una fuerza molecular no covalentes. Si el solvente es agua, el solvato es hidrato.

[0025] El término "cocrystal" se refiere a una forma cristalina que incluye al menos un compuesto en una red de
25 cristal. El cocrystal incluye un complejo molecular cristalino de al menos dos compuestos no volátiles mantenidos juntos en una red de cristal a través de una interacción no iónica. En la presente descripción, el cocrystal incluye un cocrystal farmacéutico que es un complejo molecular cristalino que incluye ciclosporina o trehalosa, y al menos un compuesto no volátil adicional (en lo sucesivo, denominado contramolécula). En el cocrystal farmacéutico, la contramolécula puede ser una molécula farmacéuticamente aceptable no tóxica como, por ejemplo, un aditivo alimentario, un preservativo, un excipiente médico u otros API. En algunas realizaciones, el cocrystal farmacéutico mejora algunas propiedades
30 físicas de los medicamentos (por ejemplo, solubilidad, tasa de disolución, disponibilidad/estabilidad biológica), mientras que no degrada la integridad de la estructura química de API.

[0026] La ciclosporina, incluyendo sus derivados farmacéuticamente aceptables, y la trehalosa, incluyendo sus
35 derivados farmacéuticamente aceptables, pueden prepararse mediante una variedad de procedimientos químicos y enzimáticos conocidos en la técnica, o pueden obtenerse a partir de productos comercialmente disponibles.

[0027] La composición oftálmica según la presente descripción se puede preparar mediante la mezcla de los ingredientes activos, la ciclosporina y la trehalosa.

40 **[0028]** La composición oftálmica según la presente descripción se puede preparar como una composición farmacéutica, una composición cuasi medicamento y una composición de alimento saludable.

[0029] La composición oftálmica según la presente descripción puede incluir un aditivo, como un vehículo, un
45 excipiente o diluyente farmacéuticamente (o sitológicamente) aceptable, y las características que deben tomarse en cuenta para el aditivo incluyen, entre otros, la compatibilidad con ciclosporina y trehalosa, biocompatibilidad y temperatura de procesamiento.

[0030] La composición oftálmica según la presente descripción se puede preparar como una preparación no
50 oral, como una solución oftálmica, una pomada ocular, una inyección y un colirio, o una preparación oral, como píldoras, cápsulas y gránulos, el tipo de administración preferido es una solución oftálmica y el tipo de administración más preferido es el de gotas oculares.

[0031] En el caso de prepararse como una solución oftálmica, la solución oftálmica se puede proporcionar en
55 cualquier tipo de administración usada para una solución oftálmica, por ejemplo, una solución oftálmica acuosa, como una solución oftálmica acuosa, una solución oftálmica de emulsión acuosa, una solución oftálmica viscosa y una solución oftálmica disuelta. o una solución oftálmica no acuosa, como una solución oftálmica no acuosa y una solución oftálmica de emulsión no acuosa.

[0032] En el caso de ser preparada como una solución oftálmica de emulsión acuosa, la solución oftálmica
60 puede incluir varios aditivos conocidos en la técnica, por ejemplo, un agente de ajuste de tonicidad, un agente de tampón, un agente estabilizante, un agente de ajuste de pH, un agente engrosador, un preservativo, un agente quelante, un agente solubilizante y un solvente, siempre y cuando no se dificulte el objeto de la presente descripción. El agente de tampón se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en un agente de tampón de fosfato, un agente de tampón de borato, un agente de tampón de citrato, un agente de tampón de tartrato, un agente de tampón
65 de acetato (por ejemplo, acetato de sodio), trometamina y aminoácido, aunque no se limita a los mismos.

Preferentemente, puede usarse un agente de tampón de fosfato. El agente de ajuste de tonicidad se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en azúcares, como sorbitol, glucosa, eritritol y manitol, alcoholes polihídricos como glicerina, polietilenglicol y polipropilenglicol, y sales como el cloruro de sodio, aunque no se limita a los mismos. El preservativo se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, paraoxibenzoato de alquilo, como paraoxibenzoato de metilo y paraoxibenzoato de etilo, alcohol de bencilo, alcohol de fenetilo, ácido sórbico y su sal, timerosal, policuaturnio, bromuro de benzododecinio, complejo de oxiclora y clorobutanol, aunque no se limita a los mismos. El agente estabilizante se puede seleccionar de entre ciclodextrina y sus derivados, un polímero soluble en agua, como la poli(vinilpirrolidona), y tensoactivos como el polisorbato 80 (tween 80®), el polisorbato 20 y el tiloxapol, aunque no se limita a los mismos. El agente de ajuste de pH se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en ácido hidroclicórico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, monoetanolamina, agua de amonio e hidróxido de amonio, aunque no se limita a los mismos. El agente engrosador se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, hidropropilmetilcelulosa y carboximetilcelulosa, polivinilalcohol, carbómero, povidona, poloxámero, policarbofilo y su sal, aunque no se limita a los mismos. El agente quelante se puede seleccionar, entre otras fuentes, de entre glicerina, DMSO, DMA, N-metilpirrolidona, etanol, bencilalcohol, isopropilalcohol, varios pesos moleculares de polietilenglicol o propilenglicol. Puede haber algunas superposiciones entre las sustancias que se pueden usar para el solvente o el agente solubilizante, y es posible usar cualquier sustancia tanto para el solvente como el agente solubilizante, a continuación, si la sustancia actúa como un solvente en la preparación, se hará referencia al mismo como un solvente y, si la sustancia no actúa como un solvente, se hará referencia al mismo como un agente solubilizante. De manera alternativa, el agente solubilizante puede ser un tensoactivo en algunas variaciones. Pueden usarse combinaciones tensoactivas, incluyendo varios tipos de tensoactivos. Por ejemplo, pueden usarse tensoactivos no iónicos, aniónicos (es decir, jabón, sulfonato), catiónicos (es decir, CTAB), zwitteriónicos, poliméricos y anfotéricos. Por ejemplo, los tensoactivos disponibles incluyen, entre otros, aquellos que presentan un HLB de 10, 11, 12, 13, 14 o más. Los ejemplos de tensoactivos incluyen, entre otros, un producto de polioxietileno de aceite vegetal hidrogenado, aceite de ricino polietoxilado o aceite de ricino hidrogenado polietoxilado, aceite de ricino polioxilo o sus derivados, éster de ácido grado de polioxietileno-sorbitán y derivados del aceite de ricino de polietoxileno. Según una realización particular, la composición oftálmica de la presente descripción puede incluir más del 0,01% en peso y menos del 0,1% en peso de ciclosporina, del 0,5 al 7,5% en peso de trehalosa, del 1 al 10% en peso de un agente solubilizante, del 0,01 al 2% en peso de un solvente, con lo restante siendo de un agente de tampón y un agente de ajuste de tonicidad, sobre la base del peso total de la composición.

[0033] La solución oftálmica de emulsión acuosa puede prepararse preferentemente en un tipo de nanoemulsión y, en este caso, puede incluir varios aditivos conocidos en la técnica, por ejemplo, aceite y un tensoactivo, siempre y cuando no se dificulte el objeto de la presente descripción. El aceite incluye al menos uno seleccionado de entre el grupo que consiste en propilenglicol, monocaprilato, laurato de propilenglicol, triglicéridos de cadena media (C8-C10), gliceril-1,3-dioleato, monooleato de glicerilo y linoleato de glicerilo. El tensoactivo incluye al menos uno seleccionado de entre el grupo que consiste en macrogolglícéridos de oleilo, macrogolglícéridos de linoleilo, polioxilglícéridos de caprilocaproilo, aceite de ricino polioxil 35, aceite de ricino hidrogenado polioxil 35, aceite de ricino hidrogenado polioxil 40, aceite de ricino hidrogenado polioxil 40, un producto de condensación de óxido de etileno con ácido 12-hidroxisteárico y polisorbato 80 (Croda, Reino Unido).

[0034] Más preferentemente, la solución oftálmica de emulsión acuosa se puede preparar como gotas oculares de tipo nanoemulsión transparente y, para prepararla, puede hacerse referencia, por ejemplo, al Registro de patente coreana No. 10-0938500, aunque dicha preparación no se limita a la misma.

[0035] La composición oftálmica según la presente descripción se puede usar para reducir, prevenir o tratar enfermedades oculares y, preferentemente, para reducir, prevenir o tratar un trastorno causado por ojos secos.

[0036] El "trastorno causado por ojos secos" puede incluir queratoconjuntivitis sicca, trastorno epitelial queratoconjuntival, secreción reducida de fluidos lagrimales, síndrome de Stevens-Johnson, síndrome del ojo seco, síndrome de Sjogren, deficiencia lagrimal, hiperemia ocular, inestabilidad de la película lagrimal o edema ocular; conjuntivitis alérgica, conjuntivitis viral u ojos secos después de una cirugía de cataratas; y ojos secos relacionados con el uso de lentes de contacto u ojos secos relacionados con la operación de VDT.

[0037] Además, la frase "trastorno epitelial queratoconjuntival" puede incluir ojos secos, defecto epitelial corneal, defecto epitelial conjuntival, erosión epitelial corneal, grosor corneal reducido, infiltrado corneal, perforación corneal o exfoliación epitelial corneal; úlcera corneal, queratitis, conjuntivitis, queratopatía punctata superficial, queratoconjuntivitis sicca, queratoconjuntivitis límbica superior, queratitis filamentosa, queratitis filamentosa, úlcera corneal y enfermedades oculares infecciosas del epitelio corneal y conjuntival; trastorno epitelial queratoconjuntival asociado a una lesión ocular, microcirugía o uso de lentes de contacto duras.

[0038] En el tratamiento y/o la prevención de mamíferos, en particular, humanos, la dosis de la composición oftálmica según la presente descripción puede ser determinada, de manera general, por aquellas personas que

trabajan en la industria médica o aquellas personas que tienen un conocimiento ordinario relacionado. Por ejemplo, cuando la composición según la presente descripción se usa como gotas oculares para un paciente adulto con ojos secos, una dosis preferida de la composición oftálmica que incluye ciclosporina y trehalosa como ingredientes activos puede ser, por ejemplo, la administración en una dosis de 1~4 gotas (alrededor de 0,025~0,1 mL) de gotas oculares
5 incluyendo un 0,02% en peso de ciclosporina y de 1 a 3% en peso de trehalosa, 1~10 veces por día, pero no se limita a esta cantidad, y aquellos que trabajan en la industria médica o aquellos que tienen un conocimiento ordinario relacionado pueden determinar una dosis real más óptima en base no solo a la edad, peso, género y reacción de un paciente, sino también la condición que se espera con este tratamiento.

10 **[0039]** La composición oftálmica según la presente descripción puede rellenarse y proporcionarse en un contenedor esterilizado, y puede proporcionarse con instrucciones sobre su uso, y las instrucciones pueden unirse mecánicamente al contenedor relleno con la composición oftálmica o un segundo contenedor que sirve de paquete del contenedor, o pueden envasarse juntos en el segundo contenedor.

15 Efectos ventajosos

[0040] La composición oftálmica según la presente descripción, que contiene ciclosporina y trehalosa, en la que se mezclan dos ingredientes en una relación predeterminada y/o una cantidad predeterminada, presenta un efecto combinado superior en los ojos secos que pueden ocurrir a través de varios canales, por ejemplo, inducidos con aire
20 seco, inducidos con inflamación e inducidos con un preservativo, y se ponen en varios estados o condiciones. Más específicamente, la composición oftálmica ejerce un efecto equivalente o superior con una cantidad reducida de ciclosporina. Adicionalmente, en comparación con la ciclosporina sola y la trehalosa sola, la composición oftálmica produce un efecto de tratamiento sinérgico mucho más grande que cuando se administran, y tiene efectos en la reducción del daño corneal, la recuperación de la cantidad de secreción lagrimal, la reducción de la inflamación ocular,
25 la mejora de la calidad lagrimal, irritación ocular (eritema, edema y aumento de la descarga de la conjuntiva), la reducción, el mantenimiento, la lubricación y la humidificación de la película lagrimal y, en particular, tiene un efecto en el aumento de la cantidad de secreción de mucina debido a la actividad creciente de las células calciformes, en la que las células calciformes son responsables de la secreción de mucina.

30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0041]

La FIG. 1 muestra cambios de la inhibición de daño corneal en un modelo de ojos secos inducidos con aire seco y
35 tratados con el complejo.

La FIG. 2 muestra cambios de la inhibición de secreción lagrimal en el modelo de ojos secos inducidos con Concanavalina A y tratados con el complejo.

La FIG. 3 muestra cambios del alivio de la inflamación corneal en el modelo de ojos secos inducidos con Concanavalina A y tratados con el complejo.

40 La FIG. 4 muestra los cambios de la prueba de Schirmer (arriba) y los del TBUT (abajo) en el modelo de ojos secos inducidos con cloruro de benzalconio y tratados con el complejo.

La FIG. 5 muestra el número de células calciformes en el modelo de ojos secos inducidos con cloruro de benzalconio y tratados con el complejo. La FIG. 6 muestra los cambios en la inflamación (arriba) y la medida de la irritación ocular (abajo) en el modelo de ojos secos inducidos con cloruro de benzalconio y tratados con el complejo.

45 La FIG. 7 muestra la viabilidad celular en el modelo de ojo seco tratado con el complejo.

MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCIÓN

[0042] En lo sucesivo, la presente descripción se describirá con más detalles a través de los ejemplos. Estos
50 últimos pretenden describir la presente descripción con más detalles.

<Ejemplo 1. Preparación de la sustancia de ensayo>

[0043] Según cada proporción de ingrediente de A a J en la siguiente Tabla 1 (composición que incluye
55 ciclosporina A y trehalosa en varias concentraciones), la ciclosporina se solubilizó mediante la mezcla con un agente solubilizante de aceite de ricino de polioxil 35. La glicerina se mezcló con la solución de tampón de fosfato, cuyo pH se estableció en 7,2, según cada proporción, y la solución de ciclosporina solubilizada se dispersó para preparar una emulsión. La presión osmótica se ajustó a alrededor de 300 mOsmol/kg usando trehalosa y un agente de ajuste de tonicidad en la solución de emulsión de ciclosporina preparada.

60

[Tabla 1]

Componentes	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Ciclosporina A	0	0,01%	0,02%	0,05%	0	0	0,01%	0,02%	0,01%	0,02%
Trehalosa	0	0	0	0	1%	3%	1%	1%	3%	3%
Aceite de ricino polioxil 35	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%
Etanol	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
Glicerina	0,8%	0,8%	0,8%	0,8%	0,8%	0,8%	0,8%	0,8%	0,8%	0,8%
Solución de tampón de fosfato	Óptima	Óptima	Óptima	Óptima	Óptima	Óptima	Óptima	Óptima	Óptima	Óptima
Agente de ajuste de tonicidad	Óptimo	Óptimo	Óptimo	Óptimo	Óptimo	Óptimo	Óptimo	Óptimo	Óptimo	Óptimo

<Ejemplo de ensayo 1. Efecto del tratamiento en el modelo de ojos secos inducidos con aire seco>

Sustancia de ensayo

5

[0044] Las composiciones A, C, D, E, F, I, J preparadas según el ejemplo 1 descrito anteriormente se usaron como una sustancia de ensayo en el experimento.

Animal experimental

10

[0045] Los animales experimentales, ratas Sprague-Dawley (SD) machos de 6 semanas de edad, de Dae Han Bio Link Co. Ltd. (Eum-seong, Chungbuk), se colocaron en jaulas para ratas, siendo que cada jaula contenía cuatro ratas. Los animales se usaron en el experimento después de la climatización durante alrededor de 1 semana. El entorno de laboratorio de animales se controló a una temperatura de 23.62°C, una humedad relativa del 55.61%, una frecuencia de ventilación de 12 veces/hora, un ciclo de iluminación de 12 horas y una iluminancia de 150 a 300 Lux. Los animales experimentales se alimentaron con una dieta sólida en palés de Purina Rat Chow® Biopia Co., Ltd. (Gunpo, Gyeonggi), y se permitió que las ratas bebieran libremente agua purificada y esterilizada.

15

Inducción de ojo seco y tratamiento con la sustancia de ensayo

20

[0046] Se aplicaron 20 μ l de la sustancia de ensayo a cada uno de los dos ojos del animal experimental 30 minutos antes de la exposición al viento del soplador de aire. A los 30 minutos de hacer la aplicación en los ojos, se administraron 20 mg/kg de atropina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) en la cavidad abdominal, para inhibir la secreción lagrimal, y el animal fue puesto bajo anestesia mediante la inyección de Zoletil® (Virbac Korea, Seúl, Corea) en los músculos, a fin de mantener la postura uniforme y controlar el pestañeo. El animal anestesiado se fijó en frente del soplador de aire para exponer los dos ojos en ángulo recto al viento, y se controló la distancia a fin de exponer los ojos al aire de una humedad relativa del 25 al 35%, a la velocidad de viento de 2 m/s. La sustancia de ensayo se aplicó de manera repetida por un total de diez veces durante 3 horas, en el intervalo de 20 minutos, desde el momento de la exposición al aire seco (0 minutos) y, después de la aplicación en los ojos, los párpados se cerraron durante alrededor de 10 segundos para repartir el material por los ojos y, a continuación, los ojos se expusieron al aire. Durante el período experimental, se observó que fue posible evitar que el animal experimental pierda su postura o cierre los ojos, y su postura se corrigió con frecuencia.

25

30

Medición de la medida de daño corneal

35

[0047] La medida de daño corneal se evaluó mediante el método de "Kim y col., (2010) Comparative effectiveness of distilled water and isotonic saline in a rat model of dry eyes. Journal of Biomedical Research 11(4):211-218". 5 μ l de fluoresceína (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) preparados a un 1% en una solución salina equilibrada (solución de sodio equilibrada) se aplicaron al saco conjuntival del animal en el que se indujo el ojo seco y al cual se aplicó la sustancia de ensayo, y el animal permaneció con los ojos cerrados durante 1 hora usando una venda. El tinte residual que no penetró se lavó con una solución salina y el ojo se enucleó. En el ojo enucleado, se observó una región (área) de penetración fluorescente verde de fluoresceína penetrada en la córnea, bajo una lámpara de tungsteno, y se tomó una fotografía de esto. La región de penetración de la fluoresceína se indicó numéricamente mediante el análisis de la foto que usa la imagen J 1.38xprogram. A fin de cuantificar la fluoresceína permeada en la córnea, la córnea reseca se depositó en una solución salina tamponada de potasio (1 ml) y se eludió durante 24 horas. A continuación, el nivel de emisión fluorescente verde (intensidad) se evaluó mediante la medición de la fluorescencia a una excitación de 485 nm y una emisión de 538 nm usando un fluorofotómetro. Cuando la penetración corneal y el nivel de emisión de fluoresceína son altos, esto significa que la córnea ha perdido una función de barrera y, por consiguiente, como la penetración y el nivel de emisión son inferiores, se determina que el efecto de la sustancia de ensayo es superior.

40

45

50

Ensayo patológico

[0048] Una vez concluido el ensayo, todos los animales experimentales fueron sacrificados mediante sofocación bajo gas de dióxido de carbono. El ojo enucleado se fijó en una solución de Davidson durante 7~24 horas, y se fijó en un 10% de formalina neutral durante al menos 24 horas para preparar una rebanada de tejido, lo cual fue seguido de una tinción de hematoxilina-eosina, y tanto el daño epitelial como el grosor corneal se midieron bajo un microscopio óptico con una ampliación de x100. El tejido conjuntival reseca en la autopsia se fijó en un 10% de solución de formalina neutral para preparar una rebanada de tejido, lo cual fue seguido de una tinción de ácido peryódico de Schiff (en lo sucesivo, tinción de PAS), y el número de células calciformes que contenían o secretaban glicoproteínas de tipo mucina se contó bajo un microscopio óptico con una ampliación de x100.

55

60

Resultados

65

[0049] Según la condición experimental, el ojo seco se induce con un principio similar al del ojo seco causado

por el aire acondicionado o el aire seco en interiores. Para el grupo de control, se usó el grupo tratado con la composición A, preparada según el ejemplo 1. La región (área) de penetración (%) y el nivel de emisión (intensidad) (%) de la córnea con tinción fluorescente se calculó como un valor relativo cuando tanto la región (área) de penetración (%) como el nivel de emisión (intensidad) (%) de la córnea con tinción fluorescente del grupo de control se establecieron en un 100%.

Región de penetración (área)(%) o nivel de emisión (intensidad)(%)= $[I-(\text{grupo de control}-\text{grupo de ensayo})/\text{grupo de control}] *100$

10 **[0050]** La inhibición del daño corneal (%) se calculó mediante la siguiente ecuación, a partir del total de los promedios de la región de penetración corneal (área)(%) y el nivel de emisión (intensidad)(%).

Inhibición del daño corneal (%)= $[(\text{grupo de control}-\text{grupo de ensayo})/\text{grupo de control}] *100$

15 **[0051]** Los ojos secos inducidos con aire seco durante 3 horas aumentaron en gran medida la intensidad de la fluorescencia de la superficie corneal, y la penetración de una sustancia fluorescente fue profunda. Los resultados se mostraron en la FIG. 1, y se pudo observar que la inhibición del daño corneal (%) de la composición J correspondiente al complejo según la presente descripción alcanzó un total de alrededor del 40%. En cambio, se pudo observar que la composición (la composición C y D), incluyendo la ciclosporina A sola como un ingrediente activo, casi no tuvo ningún efecto en el tratamiento del daño corneal, y la composición D tuvo un efecto de deterioro en el daño corneal. Además, la composición (composición E, F), incluyendo trehalosa sola como un ingrediente activo, mostró un efecto efectivo en el daño corneal, pero mostró un efecto preventivo incluso inferior en el daño corneal, en comparación con el efecto de la composición J correspondiente al complejo según la presente descripción. Además, en el caso de la composición I, incluyendo tanto la ciclosporina A y la trehalosa en una relación de peso de ciclosporina A:trehalosa de 1:300, el efecto preventivo en el daño corneal fue inferior que aquel de la composición que incluía trehalosa sola. Además, como resultado del tratamiento de ojos secos causados por el aire seco con la sustancia de ensayo preparada según el ejemplo 1, se pudo observar que el grupo tratado con el complejo (composición J) de la presente descripción tuvo un aumento significativo en el número de células calciformes que contenían o secretaban glicoproteínas de tipo mucina.

30 <Ejemplo de ensayo 2. Efecto del tratamiento en el modelo de ojos secos inducidos con Concanavalina A>

Sustancia de ensayo

[0052] Las composiciones A, B, C, D, E, F, G, H, J preparadas según el ejemplo 1 descrito anteriormente se usaron como una sustancia de ensayo en el experimento.

Animal experimental

[0053] Los animales experimentales, conejos blancos de Nueva Zelanda (NZW) hembras con un peso entre 1,8 y 2,0 kg de Samtako Bio Korean (Osan, Gyeonggi), fueron colocados en jaulas para conejos, siendo que cada jaula contenía un conejo. Los animales se usaron en el experimento después de la climatización durante alrededor de 1 semana.

[0054] El entorno de laboratorio de animales se controló a una temperatura de 23±2°C, una humedad relativa del 55-60%, una frecuencia de ventilación de 12 veces/hora, un ciclo de iluminación de 12 horas y una iluminancia de 150 a 300 Lux. Los conejos fueron alimentados con una dieta sólida en palés para conejos, NIH#32M, de Samtako Bio Korea, y a estos animales se les permitió beber libremente de agua purificada y esterilizada. 24 horas antes del inicio del ensayo, se examinaron los dos ojos del conejo y se usaron solo animales que no presentaban dalo ocular, por ejemplo, daño corneal.

Concanavalina A y tratamiento con la sustancia de ensayo

[0055] Después de poner al animal experimental bajo anestesia mediante la inyección de 50 mg/kg de Zoletil® y 6 mg/kg de xilazina en los músculos, se inyectaron 50 μ l de Concanavalina A (en lo sucesivo, Con A), preparados en la concentración de 10 mg/ml en una solución salina fisiológica, a cada una de las glándulas lagrimales principales y las glándulas lagrimales accesorias de los párpados superiores de los dos ojos usando una jeringa de insulina (aguja calibre 31). En 24 horas después de la inyección de Con A, cada sustancia de ensayo se aplicó en los ojos durante 3 días, 4 veces por día, y después de la aplicación en los ojos, los párpados se cerraron durante alrededor de 10 segundos, a fin de que la sustancia de repartiera uniformemente por los ojos. La observación y las imágenes de los síntomas generales de los ojos se efectuó una vez al día.

Medición de la cantidad de secreción lagrimal (prueba de Schirmer)

[0056] Para evaluar las reducciones en la cantidad de secreción lagrimal, el extremo de un lado de un papel de cloruro de cobalto (papel de Schirmer) se colocó en el canto lateral del párpado inferior, haciendo que las lágrimas

fluyeran hacia abajo para mantenerlo húmedo durante 30 segundos. Cuando la cantidad de secreción lagrimal se reduce, se promueve el ojo seco, por lo que se determinó que el efecto de la sustancia de ensayo aumentaba con el incremento de la cantidad de secreción. El grupo tratado con la composición A, preparada según el ejemplo 1, se usó como grupo de control.

5

Inhibición de la secreción lagrimal (%)=[1-(grupo de ensayo-grupo de control)/grupo de control] *100

Determinación de la medida de inflamación y tinción corneal

10 **[0057]** La medida de inflamación y tinción corneal se determinó mediante el método de "Pauly y col. (2007) New tools for the evaluation of toxic ocular surface changes in the rat. Investigative Ophthalmology & Visual Science".

[0058] La parte dañada de la córnea se tiñó con fluoresceína el 4to día después de aplicar la sustancia de ensayo al ojo, la medida de tinción de fluoresceína de cada una de las partes superior, mediana e inferior de la córnea se puntuó según los siguientes criterios y un promedio del total se calculó para cada parte.

15

(Criterios de determinación)

[0059]

20 0: sin tinción.

1: tinción escasa, cada punto teñido está separado del otro.

2: tinción con densidad intermedia, algunos puntos teñidos están cerca de otros.

3: tinción densa, cada punto teñido está cerca del otro.

25 **[0060]** El grupo tratado con la composición A, preparada según el ejemplo 1, se usó como grupo de control. El alivio de la inflamación corneal (%) se calculó mediante la sustitución del valor promedio del total de cada parte (partes superior, mediana e inferior de la córnea) obtenidos según los criterios de determinación para la siguiente ecuación:

Ensayo patológico

30

[0061] En el 10^{mo} día después de la administración de la sustancia de ensayo, se efectuó la evaluación del ojo seco y la evaluación de la irritación ocular, y los conejos fueron sacrificados bajo gas de dióxido de carbono. La córnea y el tejido conjuntival reseca en la autopsia se fijaron en un 10% de solución de formalina neutral para preparar una rebanada de tejido, lo cual fue seguido de una tinción de PAS, y el número de células calciformes que contenían o secretaban glicoproteínas de tipo mucina se contó bajo un microscopio óptico con una ampliación de x100.

35

Alivio de la inflamación corneal (%)=(grupo de control-grupo de ensayo)/grupo de control*100

Resultados

40

[0062] La Con A, un material de inducción de inflamación, se administró a las glándulas lagrimales del conejo, causando una reducción en la cantidad de secreción lagrimal y daño corneal debido a la inflamación, y una inflamación ocular tal como la inflamación en las glándulas lagrimales. Como resultado del tratamiento de la inflamación ocular inducida con Con A, con la sustancia de ensayo preparada según el ejemplo 1, la inhibición de la secreción lagrimal (%) y el alivio de la inflamación corneal (%) se mostró respectivamente en las FIG. 2 y 3.

45

[0063] En comparación con el grupo tratado solo con ciclosporina y el grupo tratado solo con trehalosa (composición B, C, D, E, F), se descubrió que el grupo tratado con el complejo (composición G, H, J) presentaba un aumento significativo en la secreción lagrimal. Al contrario del modelo de ojos secos inducidos con aire seco, el grupo tratado solo con trehalosa (composición E, F) no mostró ninguna inhibición de reducción del volumen lagrimal causada por la inflamación ocular, y no tuvo ningún efecto sobre el alivio de la inflamación ocular. Además, el grupo tratado solo con ciclosporina (composición B, C, D) tuvo un efecto en el alivio de la inflamación corneal, pero no mostró ninguna inhibición de la reducción del volumen lagrimal. En cambio, como resultado del tratamiento con el complejo (composición G, H, J) de la presente descripción, se pudo observar que hubo un efecto sinérgico en el alivio de la inflamación.

55

[0064] Además, como resultado del tratamiento de la inflamación ocular inducida con Con A con la sustancia de ensayo preparada según el ejemplo 1, se pudo observar que el número de células calciformes que contenían o secretaban glicoproteínas de tipo mucina aumentó significativamente en el grupo tratado con el complejo de la invención (composición G, H, J).

60

<Ejemplo de ensayo 3. Efecto del tratamiento en el modelo de ojos secos inducidos con cloruro de benzalconio>

Sustancia de ensayo

65

[0065] Las composiciones A, D, J preparadas según el ejemplo 1 descrito anteriormente se usaron como una sustancia de ensayo en el experimento.

Animal experimental

5

[0066] Los animales experimentales, conejos blancos de Nueva Zelanda (NZW) hembras con un peso entre 1,8 y 2,0 kg de Samtako Bio Korean (Osan, Gyeonggi), fueron colocados en jaulas para conejos, siendo que cada jaula contenía un conejo. Los animales se usaron en el experimento después de la climatización durante alrededor de 1 semana.

10

[0067] El entorno de laboratorio de animales se controló a una temperatura de 23±2°C, una humedad relativa del 55-60%, una frecuencia de ventilación de 12 veces/hora, un ciclo de iluminación de 12 horas y una iluminancia de 150 a 300 Lux. Los conejos fueron alimentados con una dieta sólida en palés para conejos, NIH#32M, de Samtako Bio Korea, y a estos animales se les permitió beber libremente de agua purificada y esterilizada. 24 horas antes del inicio del ensayo, se examinaron los dos ojos del conejo y se usaron solo animales que no presentaban dolo ocular, por ejemplo, daño corneal.

15

Cloruro de benzalconio y tratamiento con la sustancia de ensayo

20

[0068] Para inducir el ojo seco, se administraron 100 μ l de un 0,1% de cloruro de benzalconio (en lo sucesivo, BAK) en el saco conjuntival dos veces al día (a las 9 a.m. y a las 9 p.m.) durante 15 días.

25

[0069] En el 5^{to} día después de la administración de BAK, ya sea que el ojo seco haya sido inducido determinado por la inspección del tiempo de ruptura de las lágrimas (en lo sucesivo, TBUT), la cantidad de secreción lagrimal, tinción fluorescente y el grado de irritación, y los conejos con ojos secos inducidos se agruparon mediante aleatorización. La sustancia de ensayo se administró dos veces por día (a las 9 a.m. y a las 9 p.m.) durante 10 días desde el 5^{to} día después de la administración de BAK.

30

[0070] Se observaron los ojos en búsqueda de síntomas generales y una reacción anormal de los ojos una vez al día.

Evaluación del ojo seco

35

[0071] La evaluación del ojo seco (TBUT, cantidad de secreción lagrimal, tinción fluorescente) se efectuó antes de la administración de la sustancia de ensayo (5^{to} día después de la administración de BAK), y 5 días (correspondientes al 10^{mo} día después de la administración de BAK) y 10 días (correspondiente al 15^{to} día después de la administración de BAK) después de la administración de la sustancia de ensayo.

40

[0072] Para el TBUT, el tiempo en que una capa fluorescente por fluoresceína comienza a romperse después de aplicar 5 μ l de fluoresceína preparada al 0,1% en el saco conjuntival se midió bajo un microscopio de lámpara de hendidura. Para el TBUT, se obtuvo un promedio después de tres mediciones.

45

[0073] Para la cantidad de secreción lagrimal, el extremo de un lado de un papel de cloruro de cobalto (papel de Schirmer) se colocó en el canto lateral del párpado inferior, haciendo que las lágrimas fluyeran hacia abajo para mantenerlo húmedo durante 30 segundos, y se midió la longitud.

50

[0074] En la tinción fluorescente, la medida de daño corneal se determinó mediante el puntaje de la medida de tinción de fluoresceína según los siguientes criterios para cada una de las partes superior, mediana e inferior de la córnea, y la medida de daño corneal se calculó a partir de un valor promedio de las puntuaciones totales de cada parte.

(Criterios de determinación)

55

[0075]

- 0: sin tinción.
- 1: tinción escasa, cada punto teñido está separado del otro.
- 2: tinción con densidad intermedia, algunos puntos teñidos están cerca de otros.
- 3: tinción densa, cada punto teñido está cerca del otro.

60

Evaluación de la irritación ocular

65

[0076] La evaluación de la lesión ocular mediante la administración de la sustancia de ensayo se efectuó antes de la administración de la sustancia de ensayo (5^{to} día después de la administración de BAK) y 5 días y 10 días después de la administración de la sustancia de ensayo, mediante la medición del eritema, el edema y la descarga de

la conjuntiva, como se indica a continuación. Según los siguientes criterios de determinación, se puntuaron los resultados de irritación ocular (eritema, edema conjuntival y descarga) y, usando un valor promedio de ellos, se calculó la irritación ocular (%). La irritación ocular (%) se calculó en base al puntaje de irritación ocular promedio de la composición A, establecida en 100%.

5 Irritación ocular (%) = (irritancia de la composición A - irritancia de la sustancia de ensayo)/irritancia de la composición A * 100

- Eritema (conjuntiva palpebral y conjuntiva ocular solamente)

10

- 0: vasos sanguíneos normales
- 1: algunos vasos sanguíneos muestran signos obvios de hiperemia ocular
- 2: amplio color carmesí, con los vasos sanguíneos respectivos no observados con facilidad
- 3: escarlata pálido

15

- Edema conjuntival

20

- 0: sin hinchazón
- 1: un poquito más hinchado de lo normal (incluyendo la membrana nictitante).
- 2: notablemente hinchado, acompañado de un movimiento parcial hacia afuera del párpado
- 3: párpado hinchado que parece medio ojo cerrado
- 4: párpado hinchado que parece más de medio ojo cerrado

25 - Descarga ocular

30

- 0: sin descarga
- 1: una ligera cantidad de descarga (excepto una pequeña cantidad observada en la esquina interna del ojo)
- 2: una cantidad de descarga que es suficientemente grande para mojar las pestañas y los párpados
- 3: una cantidad de descarga que es suficientemente grande para mojar un área considerable alrededor del ojo, las pestañas y los párpados

Ensayo patológico

35 **[0077]** En el 10^{mo} día después de la administración de sustancia de prueba, se efectuó la evaluación del ojo seco y la evaluación de la irritación ocular, y después, a continuación, todos fueron sacrificados mediante sofocación bajo gas de dióxido de carbono. La córnea y el tejido conjuntival resecado en la autopsia se fijaron en un 10% de solución de formalina neutral para preparar una rebanada de tejido, lo cual fue seguido de una tinción de PAS, y las células calciformes que contenían o secretaban glicoproteínas de tipo mucina se observaron bajo un microscopio

40 óptico con una ampliación de x100.

Resultados

45 **[0078]** El BAK es un material ampliamente usado como preservativo y se está usando como un preservativo de gotas oculares líquidas, pero es un material que se sabe que causa ojo seco cuando se aplica en los ojos en cantidades excesivas. Se caracteriza por un ojo seco que se produce por un mecanismo de acción diferente de los modelos de ojos secos inducidos con aire seco y Con A, y lesiones que duran un tiempo relativamente largo. A diferencia de otros modelos, a medida que se desarrollan los síntomas, se produce la inestabilidad y ruptura prematura de la película lagrimal debido al aumento de la cantidad de lágrimas o la secreción reducida de glicoproteínas de tipo

50 mucina, y el daño potencial de la superficie corneal está acompañado por un factor combinado de la superficie del globo ocular, promoviendo el ojo seco. Se pudo observar que el grupo tratado con el complejo (composición J) mostró la supresión de la secreción lagrimal excesiva inducida por BAK, en comparación con el grupo tratado solo con ciclosporina A (composición D) (arriba en la FIG. 4) y la inhibición del acortamiento del tiempo de ruptura de la película lagrimal. Es bien sabido que el TBUT acortado es el resultado de las reducciones en la sustancia mucina en la lágrima

55 y la cantidad de secreción lagrimal (abajo en la FIG. 4). Es decir, en este experimento, se espera que el tratamiento con el complejo mantenga la presión osmótica lagrimal a través de la inhibición del aumento excesivo en la cantidad de lágrimas y aumente la cantidad de liberación de mucina (FIG. 5), lo que lleva a un aumento del TBUT (abajo en la FIG. 4), como resultado, una mejora en la calidad de la lágrima.

60 **[0079]** Además, como resultado de detectar la medida de daño corneal mediante tinción fluorescente, podría observarse que el grupo tratado con el complejo (composición J) fue dramáticamente efectivo a la hora de curar el daño corneal, en comparación con el grupo tratado solo con ciclosporina A (composición D) (arriba en la FIG. 6).

[0080] Además, el complejo redujo la inflamación causada por el tratamiento con BAK, y tuvo un efecto en la reducción de la irritación ocular (edema e inyección conjuntival, aumento de descarga) que aparecen por el BAK (abajo

en la FIG. 6).

<Ejemplo 2 y ejemplo de ensayo 4. Efecto sobre las células epiteliales corneales en el modelo de ojo seco>

5 **Sustancia de ensayo**

[0081] Las composiciones A, D, E, F, G, H, I, J preparadas según el ejemplo 1 descrito anteriormente se usaron como una sustancia de ensayo en el experimento. Además, para el experimento, se preparó y se usó una composición que incluía un 0,05% de ciclosporina y un 1% o un 3% de trehalosa, según el ejemplo 1.

10

Cultivo celular y tratamiento

[0082] Las células epiteliales corneales se cultivaron en un medio de cultivo a 37°C, y el medio de cultivo celular con un 10% de suero bovino fetal, el factor de crecimiento epidérmico y los antibióticos agregados al medio modificado Eagle de Dulbecco (DMEM, GibcoBRL, EE.UU.) se reemplazó en un intervalo de 2 a 3 días, y cuando las células exhibieron un crecimiento confluyente, el medio de cultivo se eliminó por completo y se lavó una vez con una solución salina tamponada de fosfato (PBS) y, a continuación, se trató con un 0,25% de tripsina-EDTA para separar las células, las cuales se usaron en el experimento.

15

20 **Medición de la viabilidad celular**

[0083] Para evaluar la viabilidad celular de las células epiteliales corneales en el entorno seco, las células epiteliales corneales se lavaron PBS una vez y se pusieron en contacto con la sustancia de ensayo durante 10 minutos para eliminar el medicamento, y las células epiteliales corneales se dejaron bajo un entorno seco durante 15 minutos. La medicación fue seguida de un cultivo durante 18 a 24 horas, y la viabilidad celular se calculó mediante el método MTT. Viabilidad celular(%)= la absorbancia de cada pozo/absorbancia del pozo del grupo de control/3100 se llevó a cabo tres veces para cada concentración.

25

Resultados de los ensayos

30

[0084] Todas y cada una de las sustancias de ensayo se expusieron a las células epiteliales corneales durante 10 minutos y se expusieron bajo un entorno seco durante 15 minutos.

[0085] Como resultado, el tratamiento con ciclosporina y trehalosa juntos arrojó resultados superiores en términos de la viabilidad de queratocitos, en comparación con el grupo tratado solo con trehalosa y el grupo tratado solo con ciclosporina, y mostró una definida tendencia en ascenso en base a la concentración de ciclosporina. (p < 0,05)

35

REIVINDICACIONES

1. Una composición oftálmica que comprende ciclosporina y trehalosa como ingredientes activos, donde una relación de peso de ciclosporina:trehalosa es de 1:20 - 200 y la ciclosporina está presente en más de un 0,01% en peso, menos del 1% en peso, y la trehalosa está presente en un 0,5 a un 7,5% en peso, en base a la composición total.
2. La composición oftálmica según la reivindicación 1, donde la ciclosporina está presente en un 0,02 a un 0,05% en peso, y la trehalosa está presente en un 1 a un 3% en peso.
3. La composición oftálmica según la reivindicación 1, donde la relación de peso de ciclosporina:trehalosa es de 1:50 - 150.
4. La composición oftálmica según la reivindicación 1 para su uso en la reducción, el tratamiento o la prevención de trastornos causados por ojos secos.
5. La composición oftálmica para su uso según la reivindicación 4, donde el trastorno causado por ojos secos se selecciona de entre el grupo que consiste en queratoconjuntivitis sicca, trastorno epitelial queratoconjuntival, secreción reducida de fluidos lagrimales, síndrome de Stevens-Johnson, síndrome del ojo seco, síndrome de Sjogren, deficiencia lagrimal, hiperemia ocular, inestabilidad de la película lagrimal o edema ocular; conjuntivitis alérgica, conjuntivitis viral u ojo seco después de una cirugía de cataratas; y ojo seco relacionado con el uso de lentes de contacto.
6. La composición oftálmica para su uso según la reivindicación 5, donde el trastorno epitelial queratoconjuntival se selecciona de entre el grupo que consiste en ojo seco, defecto epitelial corneal, defecto epitelial conjuntival, erosión epitelial corneal, grosor corneal reducido, infiltrado corneal, perforación corneal o exfoliación epitelial corneal úlcera corneal, queratitis, conjuntivitis, queratopatía punctata superficial, queratoconjuntivitis sicca, queratoconjuntivitis límbica superior, queratitis filamentosa, úlcera corneal y enfermedades oculares infecciosas del epitelio corneal y conjuntival; daño ocular, microcirugía o trastorno epitelial queratoconjuntival relacionado con el uso de lentes de contacto duros.
7. La composición oftálmica según la reivindicación 1, donde la composición oftálmica se formula como gotas oculares.
8. La composición oftálmica según la reivindicación 7, donde la composición oftálmica son gotas oculares de nanoemulsión transparente.

FIG. 1

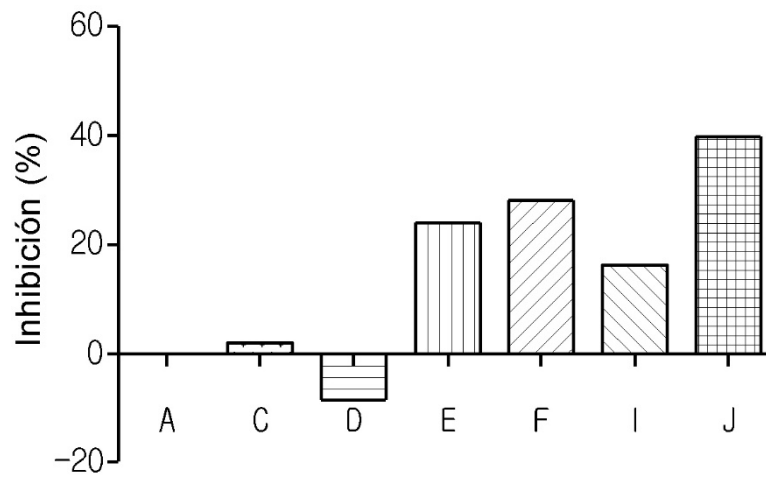


FIG. 2

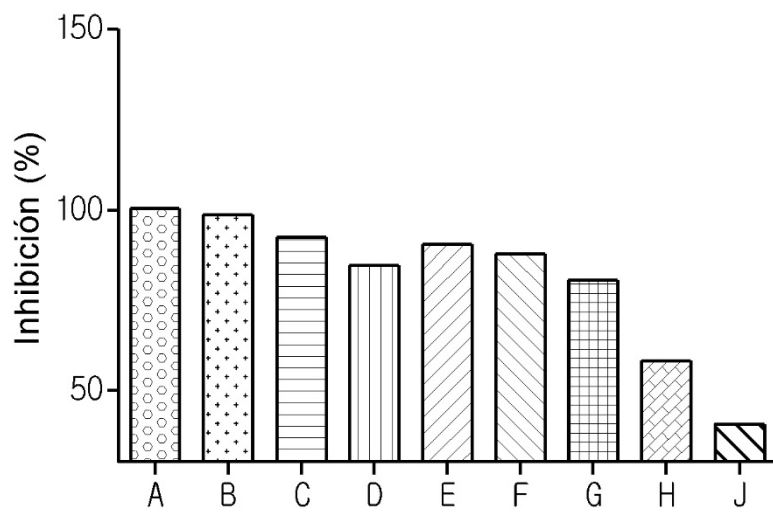


FIG. 3

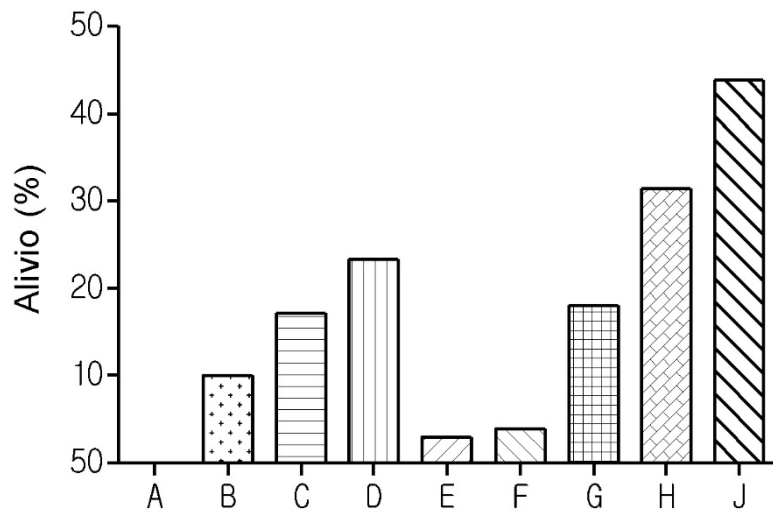


FIG. 4

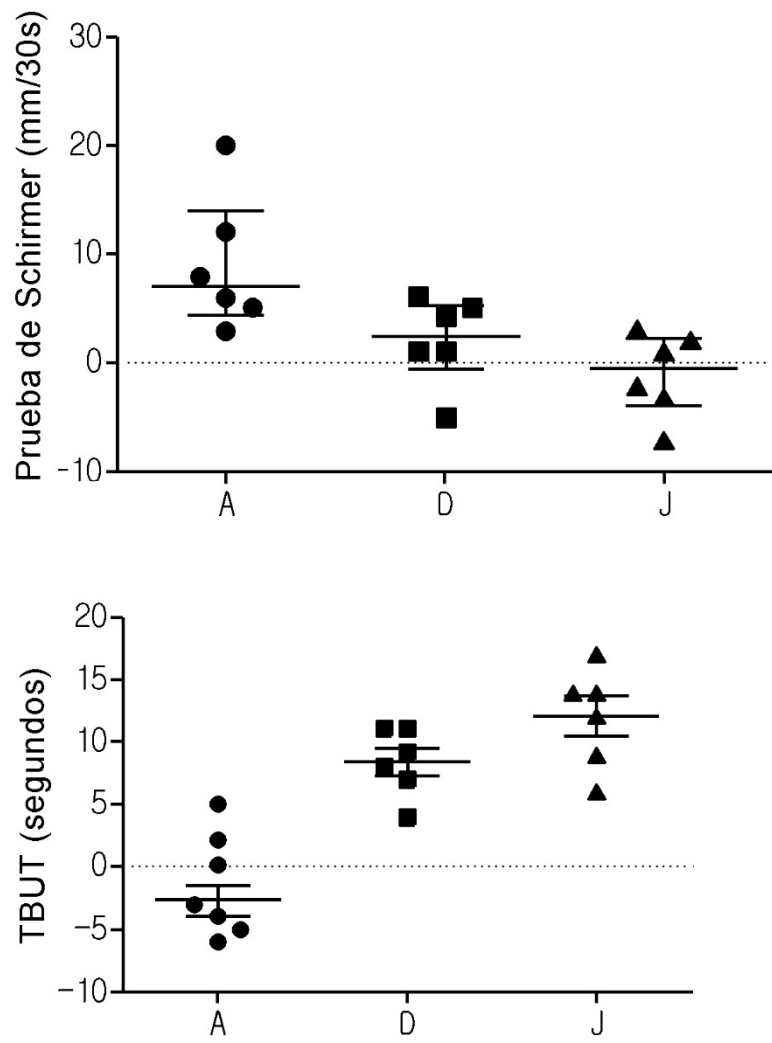


FIG. 5

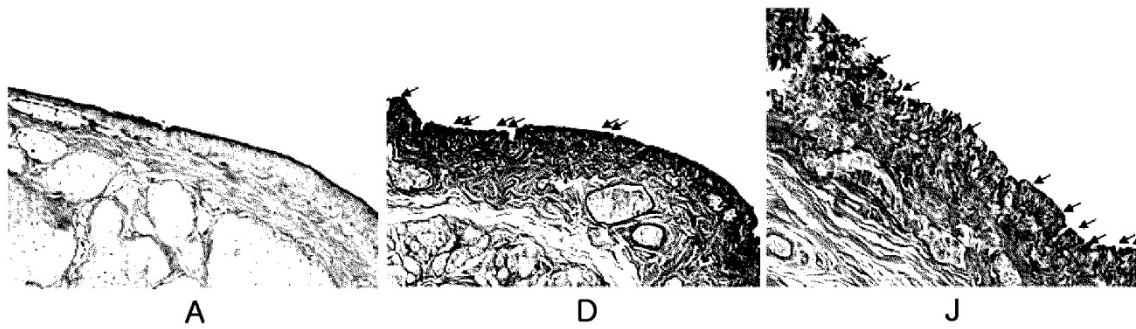


FIG. 6

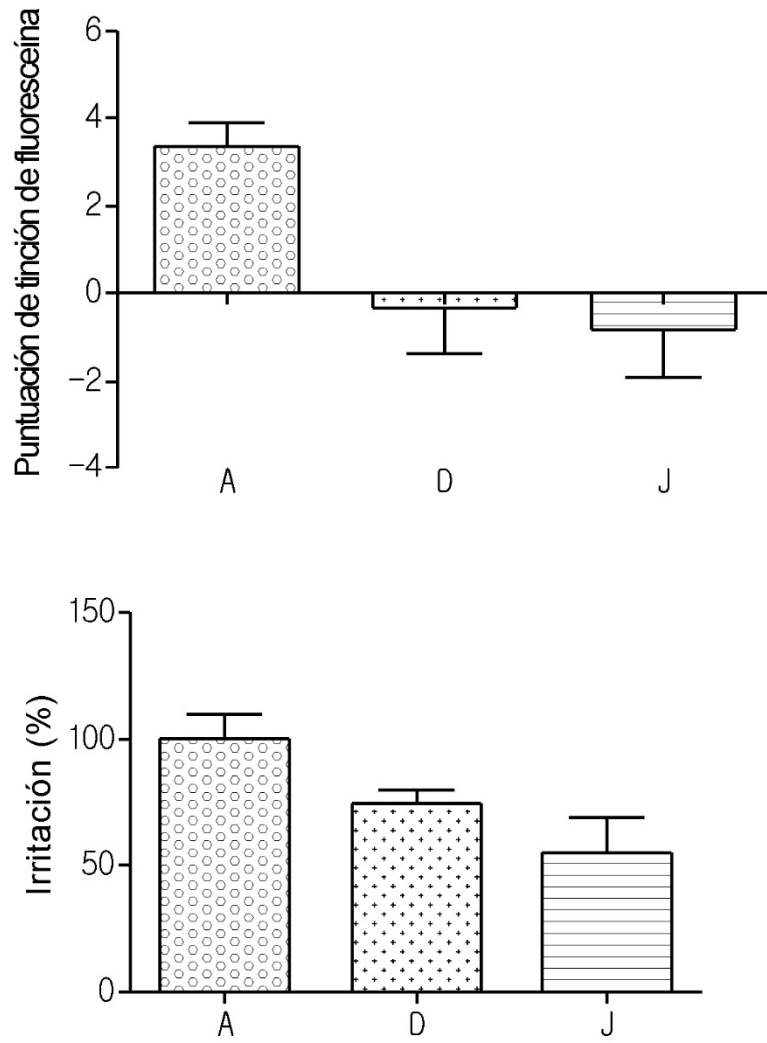


FIG. 7

