

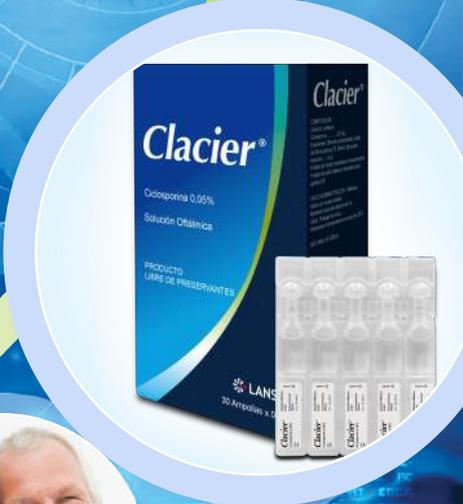
Evaluación de la Eficacia y Seguridad Clínica de la nueva Ciclosporina A: Nanoemulsión en el Tratamiento del Síndrome del Ojo Seco

Hyun Seung Kim, Tae-I im Kim, 2 Jin Hyoung Kim, 3 Kyung Chul Yoon, 4 Joon Hyon Young, 5 Ko Un Shin, 6 y Chul joven Choi⁶





Haciendo que el mundo
vea mejor



Clacier[®]

Ciclosporina: Sistema de administración de micelas para el ojo seco *Clacier*[®]

*Int. J. Nanomedicine 2016 Jun 21; 11: 2921-33.
Ciclosporine Amicellar delivery system for dry eyes.*

ANTECEDENTES:

Los objetivos de este estudio fueron desarrollar soluciones de micelas oftálmicas de ciclosporina A estable **MS-CsA (*Clacier*[®])** para el síndrome de ojo seco y evaluar sus propiedades fisicoquímicas y eficacia terapéutica.

* **MS**= Micelas
CsA= Ciclosporina

MATERIALES Y MÉTODOS:

Las soluciones **CsA-micela MS-CsA (*Clacier*[®])** se crearon por un método simple con **Cremophor EL, etanol, y buffer fosfato**. Investigamos el tamaño de partícula, pH y osmolaridad. Además, también se observó la estabilidad a largo plazo física y química del MS-CsA. Para confirmar la eficacia terapéutica, se evaluó la producción lagrimal inducida en conejos mediante el test de Schirmer (STT). Cuando se comparó con un producto comercial, Restasis, **MS-CsA (*Clacier*[®])** demostró una mejora en la densidad de las células caliciformes y la morfología epitelial de la conjuntiva, como se demostró en la tinción hematoxilina-eosina histológica.

RESULTADOS:

MS-CsA (*Clacier*[®]) tiene un tamaño de partícula menor (diámetro promedio de 14 – 18 nm) y una distribución estrecha. Los parámetros fisicoquímicos como el tamaño de partícula, pH, osmolaridad y concentración residual de CsA estuvieron dentro del rango esperado de 60 días. Los resultados del STT mejoraron significativamente en el grupo tratado con MS-CsA ($P < 0.05$) en comparación al grupo tratado con Restasis. El número de células caliciformes en las conjuntivas de los conejos luego de la administración de **MS-CsA (*Clacier*[®])** fue de 94.83 ± 8.38 , un resultado significativamente alto en comparación del 65.17 ± 11.51 observado con Restasis. La morfología epitelial de la conjuntiva de los ojos inducidos de los conejos disminuyó con la pérdida de células caliciformes. Sin embargo, luego de 5 días de tratamiento con formulaciones de la droga, las conjuntivas del conejo recuperaron el epitelio y mostraron un incremento relativo en el número de células caliciformes.

CONCLUSIÓN:

Los resultados de este estudio indican el uso potencial de **MS** para la aplicación oftálmica de CsA en el tratamiento de ojo seco.

PALABRAS CLAVE:

Ciclosporina A, Cremophor EL, solución de micelas, ojo seco, Restasis, *Clacier*[®]

INTRODUCCIÓN:

La ciclosporina A (CsA) es neutral y lipofílica. Está hecho de un undecapéptido cíclico de aminoácidos que contienen cuatro enlaces de hidrógeno intermolecular. Es aislado del gams *Tolyposcladium inflatum* y otros hongos imperfectos. CsA es una droga inmunosupresora poderosa, hoy en día utilizada regularmente para prevenir el rechazo a órganos trasplantados. Actúa inhibiendo selectivamente las células T, y por ende causa la supresión de la respuesta inmune mediada por células. Debido a su hidrofobicidad con pobre solubilidad en agua (0.012 mg/mL a 25°C), el CsA debe ser solubilizado en un medio no acuoso que incluye agentes tensoactivos, como el Cremophor EL, en el caso de Sandimmune® (Novartis International AG, Basel, Suecia). Como inmunosupresor, el CsA en baja concentración se mostró útil para pacientes con desordenes inflamatorios de la superficie ocular, incluyendo el síndrome del ojo seco[...].

Un producto comercial de CsA para formulación oftálmica es Restasis® (0.5 mg/mL CsA; Allergan Inc. Irvine, CA, EEUU). Este producto es un colirio emulsión aceite en agua que contiene una mezcla de aceite de ricino y Tween 80. Sin embargo, el efecto secundario más común del aceite de ricino es el ardor o irritación ocular debido al uso crónico de las gotas. Además, los eventos adversos como picazón, enrojecimiento, trastornos visuales, y dolor ocular que hacen que los pacientes no usen estas gotas. Una pobre tolerancia ocular, biodisponibilidad baja e inestabilidad son las mayores desventajas reportadas con Restasis. Estas dificultades se pueden superar a través de varias formulaciones. Muchos estudios han intentado mejorar la disponibilidad y tolerancia de CsA aplicado vía tópica a través del desarrollo de dichas formas como solvencia, pro fármacos, emulsiones y sistemas coloidales. No obstante, casi ninguno de los sistemas de aplicación ha sido completamente satisfactorio. Ikervis® (1 mg/mL CsA; Santen Pharmaceutical Co Ltd, Osaka, Japón), el cual ha sido recientemente introducido al mercado estadounidense, es una formulación CsA que ayuda a aliviar el síndrome de ojo seco. Sin embargo, su emulsión blanca lechosa, posee algunos retos, especialmente el cumplimiento del paciente.

Recientemente, hubo gran atención enfocada en las formulaciones con micelas. Las micelas han sido útiles en la solubilización de fármacos insolubles en agua, como el CsA. También el CsA en una estructura micelar se estabiliza en un ambiente biológico. Por ejemplo, las micelas nano escala como portadores de fármacos prometen ser utilizados en la administración oftálmica tópica, debido a su excelente biocompatibilidad y tolerancia ocular. Por lo tanto, una formulación de micela es efectiva al administrar CsA en las capas de la córnea y tejidos oculares, permitiendo una acción local satisfactoria del CsA. Sin embargo, ha habido pocos estudios sobre formulaciones de CsA-micelas utilizados para tratar el síndrome del ojo seco. Kuwao et al solubilizaron el CsA en solución acuosa isotónica y neutral utilizando micelas de estearato de polioxilo 40 – tensoactivo no iónico. A pesar que este trabajo era prometedor, la tolerancia ocular del estearato de polioxilo 40 aun no es conocida y no ha sido aún evaluada. Recientemente, ha habido estudios sobre la administración ocular de CsA nanomicelar transparente, pero estos han sido obstaculizados por dificultades en el proceso de fabricación, el cual requiere evaporación y deshidratación de la película. Además, estos estudios no eran capaces de confirmar la eficacia terapéutica, medida por la recuperación de células caliciformes y el incremento en la producción lagrimal acuosa. Por lo tanto, es esencial mayor investigación para el desarrollo de una formulación micelar adecuada.

Los tensoactivos no iónicos son utilizados principalmente en sistemas de administración oftálmica por su excelente compatibilidad y estabilidad. Además, de un impacto más leve en las membranas celulares en comparación a los creados por tensoactivos catiónicos o aniónicos más tóxicos, los tensoactivos no iónicos son menos irritantes. Entre los tensoactivos no iónicos, Tween 80 y Cremophor EL son por lo general no irritantes o se conoce que causan solo enrojecimiento leve en el ojo del conejo. Se demostró que el enrojecimiento leve desaparece dentro de unas horas (el ojo del conejo es más susceptible a sustancias irritantes que el ojo humano).

Sin embargo, el Cremophor EL acentúa la penetración del CsA a través de la córnea humana. Se halló que la presencia de Cremophor EL permitía mayor biodisponibilidad del fármaco comparado al Tween 80. **Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar las soluciones CsA-micelas MS-CsA (Clacier®) que contienen Cremophor EL** preparado utilizando un método simple. La eficacia del (Clacier®) al producir lagrimas fue comprobada en ojos de conejo (ojo seco inducido) analizando los cambios en el test de Schirmer (STT). La determinación de densidad de celular caliciformes y la evaluación de morfología del epitelio de las conjuntivas de conejos también se llevaron a cabo para investigar la concentración de los nuevos MS propuestos.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

El CsA se obtuvo de Concord Drugs Ltd (Hyderabad, India). El aceite de ricino polioxilo 35 (Cremophor EL) fue generosamente donado por BASF Co Ltd (Ludwigshafen, Alemania). La glicerina (pureza 99%), etanol (pureza 99.9%), fosfato dibásico de sodio (anhidro), fosfato monobásico de sodio (anhidro), y acetonitrilo de grado HPLC fue adquirido de Samchun Pure Chemical Co Ltd (Pyeongtaek, Corea del Sur). La emulsión Restasis fue adquirida de un mercado local. La atropina sulfato (AS) y hetaxilina-eosina (H&E) fueron adquiridas de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EEUU). En este estudio se utilizó agua purificada (Milli-Q; EMD Millipore, Billerica, MA, EEUU). Todos los demás químicos utilizados fueron de grado analítico.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES CsA-micelas

El **MS-CsA (Clacier®)** fue preparado utilizando un método simple. Se utilizaron en este estudio formulaciones, fue disuelto en tensoactivo con etanol (0, 0.5, y 1 peso%). El fosfato dibásico de sodio, el fosfato monobásico de sodio, y la glicerina (2.2 peso%) fueron disueltos en la fase acuosa. Ajustamos el volumen de la fase acuosa a 100 mL cuando ambas soluciones se mezclaron. Ambas soluciones fueron mezcladas con un agitador magnético hasta que se obtuvo un estado homogéneo. La mezcla homogénea fue seleccionada por inspección visual. Luego que se obtuvo la solución homogénea, se mezclaron dos soluciones. Si la formulación resultante no fuera miscible, mezclarlo con un agitador magnético dando una corrida adicional. El pH fue ajustado a 7.4, el cual era apropiado para administración tópica para el tejido ocular por ratio de fosfato (buffer fosfato de Sørensen, pH 7.4). La formulación de micelas fue filtrada por filtro de membrana de politetrafluoroetileno (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Reino Unido) de 0.2 µm de tamaño de poro. Todos los procesos se realizaron a temperatura ambiente.

CARACTERIZACIÓN DE MS-CsA

Análisis del tamaño de partícula

El diámetro y tamaño de distribución promedio de **MS-CsA (Clacier®)** y Restasis fue medido por dispersión dinámica de luz utilizando un espectrofotómetro para dispersión de luz electroforética (ELSZ; Otsuka Electronics, Hirakata, Japón). La fuente de laser fue el diodo semiconductor, y el ángulo de medición fue 165°. No diluimos el **MS-CsA (Clacier®)** o Restasis, pues ambos fueron medidos por ajuste de intensidad. Las mediciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Los tamaños de partícula se expresan como diámetro promedio en nanómetros.

Determinación de pH y osmolaridad

El pH fue examinado con un medidor de pH (S20-KS; Mettler Toledo, Columbus, OH, EEUU). Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente. La osmolaridad de MS-CsA y Restasis fue analizada por un osmómetro (K-700; Knauer, Berlin, Alemania). La temperatura interior del osmómetro fue controlada a 45°C. Se utilizó una ampolla Eichlösung de 2 mL de 400 mOsm/kg para la calibración del osmómetro.

Análisis de contenido de CsA

El contenido de CsA se determinó por HPLC. El análisis por HPLC de CsA fue realizado utilizando un método similar al utilizado en nuestro estudio previo. El sistema fue un set de HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU), el cual consistía de una bomba (bomba cuaternaria VL, modelo 1260), un muestreador automático (modelo 1260 ALS) y un detector ultravioleta (modelo 1260 VWD VL). Se utilizó una columna de fase reversa C18 (Eclipse XDB C18, 5 µm, 4.6 x 250 mm; Agilent) a 70°C. La fase móvil consistió en acetonitrilo: agua (90:10) y fue bombeada a una velocidad de flujo de 1 mL/min. El eluyente fue monitoreado a 210 nm seguido de inyecciones de 20 µL de la solución estándar CsA en etanol y muestras de MS. En intervalos de tiempo específico, cada muestra fue inmediatamente filtrada a través de un filtro de membrana de politetrafluoroetileno de 0.45 µm antes del análisis.

ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE MS-CsA (*Clacier*[®])

Para la prueba de estabilidad del **MS-CsA (*Clacier*[®])**, los MS fueron guardados a 4°C y también a temperatura ambiente. Las muestras fueron protegidas de la luz. Los parámetros de tamaño de partícula, pH y osmolaridad fueron escogidos para estudiar la estabilidad a lo largo de un periodo de 2 meses. Los tamaños de partícula fueron medidos utilizando el analizador de partículas ELSZ. Asimismo, se obtuvieron alícuotas apropiadas de las muestras en intervalos apropiados (0, 4, 7, 10, 14, 21, 30 y 60 días) y la concentración del CsA restante fue analizada por HPLC. El grado de agregación y la separación de fases fueron evaluados visualmente en intervalos específicos. Todos los demás cambios visibles fueron registrados.

ESTUDIO IN VIVO DE MS-CsA (*Clacier*[®]) EN CONEJOS CON SÍNDROME DE OJO SECO INDUCIDO

Tratamientos de animales

Durante el estudio se utilizaron conejos albinos de Nueva Zelanda machos, totalmente despiertos y no anestesiados (Samtako Bio Korea Inc. Osan, Corea del Sur), con un peso de 1.5 – 1.8 kg. Los animales fueron mantenidos individualmente en jaulas estándar a 19°C±1°C y 50%±5% de humedad relativa, con condiciones de luz apropiadas (ciclo de luz de 12 horas). Fueron alimentados con una dieta estándar y agua purificada. Podían mover sus cabezas con libertad, y sus movimientos oculares no fueron restringidos. Todos los experimentos recibieron la aprobación del Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad Yonsei, Incheon, Corea del Sur y fueron realizados según sus Lineamientos.

Los animales fueron divididos en 1 grupo de control y 3 grupos diferentes tratados con el fármaco, cada grupo consistía de 8 conejos. Inicialmente, los conejos pasaron el STT. Para inducirlos al ojo seco, se les instiló solución AS 1% (Sigma-Aldrich) en ambos ojos de los conejos. Tres grupos recibieron 50 µL de solución AS en el saco conjuntival inferior de ambos ojos a las 9 am, 2 pm y 7 pm. Cinco minutos después de cada aplicación de solución AS, cada grupo recibió 50 µL de solución salina (NS) en un ojo. El otro ojo recibió el tratamiento del fármaco, el cual fue MS-CsA (O4 u O7) o emulsión comercial CsA (Restasis). El cuarto grupo (de control) recibió 50 µL de solución AS o NS en cada ojo, como único tratamiento, a las 9am, 2 pm o 7 pm. Todos los tratamientos fueron continuados por 5 días.

Medición de producción lagrimal (Test de Schirmer)

La habilidad para medir la producción lagrimal es importante para el diagnóstico de muchos tipos de disfunción lagrimal, incluyendo ojo seco. El STT midió la porción acuosa de secreción lagrimal en respuesta a ambas estimulaciones conjuntivas. La producción lagrimal fue medida con el STT utilizando tiras reactivas estériles (ColorBarTM; Eagle Visión Inc. Memphis, TN, EEUU), que fueron hechas con tiras de papel filtro estandarizado de 5x35 mm con una barra de color azul que se mueve con las lágrimas. La prueba se realizó en ambos ojos (no anestesiados) de todos los animales, manteniendo la tira reactiva en el saco conjuntival externo por 2 minutos. La longitud mojada en milímetros de la tira fue considerada como resultado de la prueba. En nuestro estudio, luego de causar el ojo seco en ambos ojos, confirmamos la diferencia entre la administración de formulación del fármaco (**MS-CsA (*Clacier*[®])** y Restasis) y NS. El valor de diferencia lagrimal fue calculado de la ecuación 1:

$$\text{Valor de diferencia lagrimal (mm)} = St - Sc \quad (1)$$

Donde, St es el resultado de STT del ojo tratado con la formulación del fármaco, y Sc el resultado de STT del ojo tratado con NS. Esta ecuación fue corregida por variación debido a la diferencia individual. El STT se realizó a las 9am en el día 1, día 3 y día 5.

Análisis histológico

Se obtuvieron muestras de biopsia conjuntiva que medían aproximadamente 5x5 mm de la misma región en la conjuntiva bulbar, por cirujanos siguiendo procedimientos estándar, en los ojos controlados y los ojos tratados con las formulaciones del fármaco. Los tejidos oculares extraídos fueron fijados en solución de formalina e integrados en parafina. Los tejidos oculares fueron cortados en secciones de 4 µm de espesor a temperatura ambiente. Luego de ser desparafinados, las secciones de 4 µm fueron procesadas y montadas en portaobjetos cubiertos con gelatina. Estos luego fueron sometidos a tinción con H&E.

Determinación de morfología de células caliciformes

Se realizaron biopsias de conjuntiva para evaluar la densidad de las células caliciformes y morfología epitelial de la conjuntiva. La morfología se evaluó con un microscopio de campo claro (BX-51; Olympus, Tokio, Japón) con ampliación de 40x. La morfología epitelial de la conjuntiva fue evaluada, y el número de células caliciformes epiteliales de la conjuntiva fueron contadas en la longitud de tres tejidos separados por dos observadores ocultos independientes.

Para estudiar los efectos directos de AS y NS en la superficie ocular, se aplicó a la superficie ocular 50 µL de solución AS al 1% y 50 µL de NS al 0.9% por 5 días. Para evaluar el valor curativo, se aplicó 50 µL de la formulación del fármaco (MS-CsA y Restasis), según el método antes descrito. Luego se realizaron biopsias de la conjuntiva para evaluar la densidad de las células caliciformes y morfología epitelial de la conjuntiva.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t de student para el conteo de producción lagrimal y celular caliciformes. Se realizó las pruebas de varianzas (ANOVA) de un solo modo para comparar la media de más de dos grupos. El grado de significancia se estableció en $P < 0.05$. Todos los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Determinación de MS-CsA óptimo (0.05% - 0.1%)

En este estudio fue necesario encontrar formulaciones óptimas de MS transparente. **Se consideró el MS-CsA de varias formulaciones, se estableció como las concentraciones más apropiadas el CsA 0.05% y 0.1% para formulaciones oftálmicas, porque no se observó beneficios adicionales con concentraciones de CsA mayores. Además, el CsA 0.05% produjo las mejorías más consistentes en síntomas de pacientes, como la sequedad ocular.**

Se eligió etanol como disolvente en el rango aceptado por el USFDA para vía oftálmica. Todas las formulaciones contenían glicerina 2.2%. Condujimos un estudio de composiciones conteniendo varias concentraciones de etanol y Cremophor EL.

Los resultados obtenidos con varias formulaciones de micelas se resumen en la **Tabla 1**. Primero, las formulaciones de MS-CsA conteniendo 0.01 -1 (peso%) Cremophor EL sin etanol no fueron fabricadas (Z1 - Z4), porque en el proceso de disolver el CsA en un tensoactivo, el CsA no se humedeció lo suficiente en estas composiciones. Asimismo, las formulaciones de MS-CsA conteniendo 0.01 - 0.5 (peso%) Cremophor EL sin etanol (0.5% y 1%) no fueron transparentes (F1 - F3, O1 - O3). Estas formulaciones tenían diámetros de media amplia de 160 - 360 nm, sin distribución homogénea. Una vez que se crea un MS claro, la composición no parecía tener un efecto perceptible respecto al tamaño de partícula. Por lo tanto, se desarrollaron experimentos adicionales para MS-CsA con MSs de tamaño menor a 20 nm.

Para la prueba de estabilidad, se seleccionó el Z5 - Z7, F5 - F7 y O5 - O7. Todas estas muestras fueron muy estables, como fueron vistas en los resultados de prueba de estabilidad, luego de estas muestras se seleccionó el O7 para compararse con el Restasis. La producción lagrimal acuosa y la morfología de células caliciformes fueron los criterios de comparación utilizados para comparar el O7 con el Restasis. Van der Bijl et al mostraron que el Cremophor EL mejoró la permeabilidad de CsA a través de la córnea del conejo, y por esa razón se seleccionó el O7 con Cremophor EL 5%.

Tabla 1: Tamaño de partícula y transparencia de las diferentes soluciones de micelas.

Formulation	Composition (weight%)			Particle size (nm)	
	Cremophor EL	Ethanol	Glycerin	Mean diameter	Transparency
Ethanol 0 system					
Z1	0.01	0	2.2	-	-
Z2	0.05	0	2.2	-	-
Z3	0.5	0	2.2	-	-
Z4	1	0	2.2	-	-
Z5	3	0	2.2	17.50±0.26	✓
Z6	4	0	2.2	17.73±0.15	✓
Z7	5	0	2.2	17.27±0.31	✓
Ethanol 0.5% system					
F1	0.01	0.5	2.2	359.43±6.1	×
F2	0.05	0.5	2.2	192.13±3.76	×
F3	0.5	0.5	2.2	213.93±6.97	×
F4	1	0.5	2.2	14.73±0.21	✓
F5	3	0.5	2.2	17.3±0.1	✓
F6	4	0.5	2.2	17.53±0.38	✓
F7	5	0.5	2.2	17.33±0.29	✓
Ethanol 1% system					
O1	0.01	1	2.2	199.77±7.23	×
O2	0.05	1	2.2	168.1±2.4	×
O3	0.5	1	2.2	245.17±4.31	×
O4	1	1	2.2	14.53±0.4	✓
O5	3	1	2.2	17.37±0.25	✓
O6	4	1	2.2	17.53±0.06	✓
O7	5	1	2.2	17.2±0.3	✓

Nota: Las muestras Z1 – Z4 no formaron soluciones de micelas en este estudio. La transparencia fue evaluada visualmente. Los datos están expresados en media ± desviación estándar (n=3). “✓” es solución de micela transparente; “x” es solución de transparente; “-” es solución no formada.

A diferencia de el otro producto comercial, que es una emulsión opaca, el MS-CsA (Clacier®) que preparamos fue transparente. Se prevé que esta diferencia mejore el efecto terapéutico y reduzca la irritación. Los MSs que no contienen aceite, el cual es responsable de causar irritación en gotas oftálmicas, se prevé que reduzcan la irritación. En efecto, hemos registrado una patente (patente coreana 10-1211902) de unas gotas oftálmicas no irritantes que es el enfoque de este estudio. Además, las formulaciones de micelas propuestas en este estudio necesitan solo un simple equipo experimental de bajo costo. Esta novel formulación de MS-CsA (Clacier®) nano escala aumentará el potencial de administración ocular de CsA.

Tamaño de partícula y distribución de MS-CsA

Es bien conocido que la concentración micelar crítica (CMC) de una solución acuosa tenso activa se incrementa con la adición de un disolvente. A pesar que el etanol actúa como un disolvente a concentraciones altas, actúa como tensoactivo en concentraciones bajas y por ende recude la CMC. Asimismo, consideramos la existencia de otras moléculas y el entorno del péptido que puede afectar la CMC. Se determinó que la interferencia de otras moléculas puede también afectar el valor de CMC del Cremophor EL en plasma. Por esta razón, incluso cuando Cremophor EL tenga una concentración mayor que la CMC, no se forman necesariamente micelas. Por lo tanto, es importante considerar la interacción del tensoactivo con los péptidos, fármacos y varios excipientes. Determinamos empíricamente el rango en que se forman las micelas. En nuestro estudio, no se formó un MS transparente en formulaciones de Cremophor EL 0.5% de mayor concentración comparado al CMC de Cremophor EL (0.02 wt%). Como resultado, realizamos un experimento con formulaciones conteniendo más de 1% Cremophor EL.

Como lo muestra la **Tabla 1**, las formulaciones conteniendo 1% o más Cremophor EL fueron MSs claros, excepto del Z4 (como mencionó anteriormente en el manuscrito, el Z4 no fue fabricado). El diámetro promedio de MS-CsA oscilaba de 14 nm a 18 nm. En general, que la micela farmacéutica tiene un rango de tamaño de 10 – 80 nm (como nota, el tamaño de partícula de micelas tiene un rango de 5 – 100 nm). Las micelas con tamaño de partícula de 10 – 20 nm aumentan

particularmente la habilidad de penetrar varios tejidos, y este tamaño también les permite quedar estables in vivo por suficiente tiempo. Este tamaño también reduce los efectos secundarios biológicos, y dentro de este rango, se cree que los componentes que transportan abandonan el organismo fácilmente cuando la función terapéutica se completa.

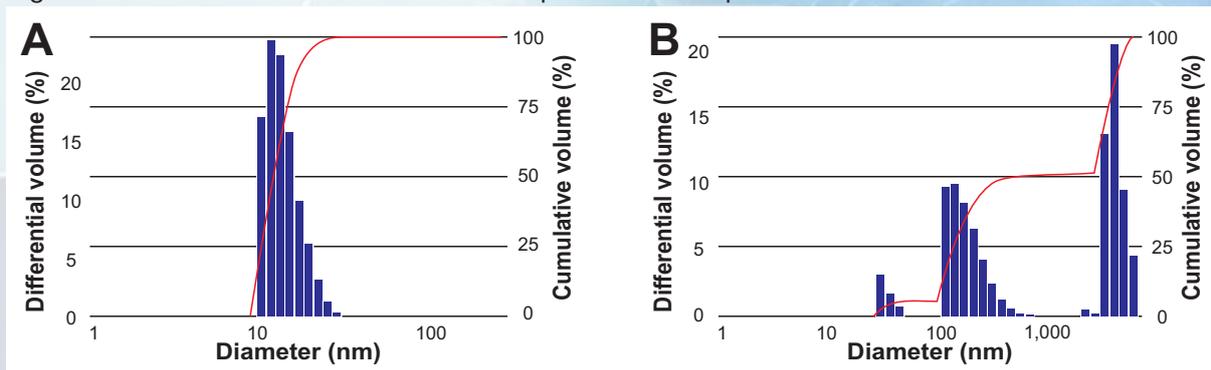


Figura 1: Distribución de tamaño (por volumen) de gotas oftálmicas de CsA obtenidas por DLS para (A) O7 MS y (B) Restasis.

Nota: Las barras se refieren al volumen diferencial (%) y las líneas se refieren al volumen acumulado (%).

Abreviaciones: CsA, Ciclosporina A; DLS, dispersión dinámica de luz; MS, solución de micelas. A diferencia del Restasis opaco, se asume que el **MS-CsA (Clacier®)** se distribuye homogéneamente. Esto puede verificarse en la **Figura 1**, la cual representa la distribución-volumen de la formulación O7 y Restasis. Los resultados de distribución indican que el Restasis obtuvo más picos que el **MS-CsA (Clacier®)**. Estos resultados probaron que el **MS-CsA (Clacier®)** tuvo partículas mas pequeñas y con distribución mas homogénea en comparación al producto comercial de CsA.

ESTUDIOS DE pH Y OSMOLARIDAD

La medicación oftálmica y las enfermedades oculares pueden alterar el pH corneal, afectando así las funciones del tejido ocular. Los cambios en el pH de la superficie ocular también pueden tener consecuencias terapéuticas y de diagnóstico. Los cambios de pH pueden afectar la eficacia del fármaco y los signos clínicos en el proceso de la enfermedad. Por lo tanto, fue esencial el análisis del pH de las gotas oftálmicas preparadas. Son importantes el pH y la capacidad del buffer de una preparación oftálmica, ya que la estabilidad de los fármacos oftálmicos comúnmente usados se controla por el pH de su entorno. Además de los efectos de estabilidad, el ajuste del pH puede influenciar el confort, seguridad y actividad de los productos oculares. Las lágrimas naturales tienen un pH de aproximadamente 7.4, y posee capacidad buffer (Farmacopea Estadounidense; USP 29 – FN 24, Preparaciones oftálmicas). Normalmente, la acción buffer de la lagrima es capaz de neutralizar las gotas oftálmicas aplicadas de manera tópica y por tanto pueden prevenir la molestia marcada. **Para maximizar el confort, una preparación oftálmica debe tener el mismo pH que el fluido lagrimal. Por lo tanto, fabricamos un MS-CsA (Clacier®) de pH 7.4 con máxima capacidad buffer dentro del rango permitido de osmolaridad.**

La osmolaridad lagrimal se relacionó significativamente con el síndrome de ojo seco, mientras la osmolaridad lagrimal se elevaba progresivamente se relacionaba al empeoramiento de la severidad de la enfermedad. A pesar que es importante considerar que la osmolaridad lagrimal no puede usarse como el único indicador del síndrome de ojo seco, la osmolaridad lagrimal como marcador biológico para la severidad de la enfermedad del ojo seco es un punto a considerarse. Por lo tanto, la osmolaridad de formulaciones del fármaco que se usan para las gotas oftálmicas deben confirmarse y controlarse. El fluido lagrimal es casi isotónico a la solución de cloruro de sodio 0.9%, el cual tiene una osmolaridad de aproximadamente 300 mOsm. Sin embargo, el ojo puede tolerar un rango de osmolaridad entre 0.6% y 2% de solución NaCl, por ende, podemos ajustar la osmolaridad dentro de este rango.

El pH y la osmolaridad del **MS-CsA (Clacier®)** estaban dentro del rango previsto. El rango de pH del **MS-CsA (Clacier®)** preparado fue de 7.41 – 7.47, y su rango de osmolaridad fue de 298.3 – 317.4. Estos resultados pueden ser considerados como el rango para minimizar la irritación en la aplicación de gotas oftálmicas. La irritación ocular es acompañada por parpadeos y mayor

secreción ocular, como mecanismo de defensa para recuperar las condiciones normales. Cuando se confronta con estas molestias, el mecanismo de defensa puede significar una pérdida rápida del fármaco con una reducción en la respuesta terapéutica. Por lo tanto, para prevenir estos problemas, se determinaron cuidadosamente rangos apropiados de pH y osmolaridad para nuestro MS- CsA.

ESTABILIDAD DEL MS-CsA (*Clacier*[®])

La estabilidad es un factor crítico que debe considerarse durante el diseño y desarrollo de la formulación. La estabilidad física y química es una de las barreras que limita el uso extendido de CsA como gotas oftálmicas farmacéuticas. Como polvo seco, el CsA es muy estable por al menos 2 años en ambiente oscuro y refrigerado (2°C – 8°C), y más de 7 meses a 40°C y 75% de humedad relativa. En contraste, es difícil preparar una solución acuosa de CsA, debido a su hidrofobicidad (logP= 2.92) y su solubilidad acuosa extremadamente baja (6.6 µg/mL). Por lo tanto, en otros estudios, el CsA se disolvió y administró en aceites vegetales, como el aceite ricino contenido en el Restasis. Sin embargo, estos aceites vegetales pueden presentar problemas de estabilidad, como ranciedad. Estas dificultades pueden superarse a través de formulaciones pensadas en mejorar la solubilidad acuosa de CsA (e.g. micelas) y asegurar la estabilidad. Por lo tanto, la estabilización del CsA en condiciones acuosas fue un factor importante en el desarrollo de formulaciones oftálmicas de CsA. Los resultados mostraron que las formulaciones de micelas de nuestro estudio contribuyen a la estabilización del CsA a un mayor grado.

La estabilidad de MSs fue evaluada utilizando MS-CsA de menos de 20 nm. Para este estudio se utilizó las muestras Z5 – Z7, F5 – F7 y O5 – O7. **El rango inicial de tamaño de partícula del MS-CsA (*Clacier*[®]) seleccionado fue 17.2 – 17.73 nm. El rango de tamaño de partícula de estas muestras se mantuvo en 18.53 – 19.63 nm luego de 60 días de almacenarse a temperatura ambiente, y también se mantuvo en 18.03 – 19.27 nm luego de 60 días de almacenarse a 4°C.**

Los resultados del análisis de tamaño de partícula durante los 60 días de almacenamiento a temperatura ambiente y a 4°C se presentan en la **Tabla 2**. Cabe resaltar que el **MS-CsA (*Clacier*[®])** no mostró cambios notables en tamaño de partícula durante los 60 días. Tampoco se observó cambios visibles como agregación y separación de fases, indicando concordancia con los resultados de tamaño. En otras palabras, estos MS-CsA fueron físicamente estable cuando se almacenaron en ambas temperaturas.

Tabla 2: Cambios en tamaño de partícula de **MS-CsA (*Clacier*[®])** almacenado a temperatura ambiente y a 4°C

Day	Ethanol 0 system			Ethanol 0.5% system			Ethanol 1% system		
	Z5	Z6	Z7	F5	F6	F7	O5	O6	O7
	Storage at room temperature								
4	18.13	18.47	19.03	18.07	18.83	18.7	18.53	18.93	18.2
7	19.43	19.97	20.27	19.73	19.47	19.57	19.83	20.27	20.93
10	18.77	18.8	18.2	19.3	18.97	19.37	18.9	19.2	19.57
14	20.33	20.07	20.1	19.97	19.8	19.83	21.73	20	19.83
21	20.8	20.73	20.8	21	20.37	20.13	20.6	20.8	20.07
30	20.8	21.03	21.17	20.63	20.53	20.37	20.4	20.1	20
60	18.53	19.27	19.47	19.07	19.63	19.5	19.4	19.5	18.93
	Storage at 4°C								
4	18.2	18.47	18.7	18.37	18.7	19.07	17.97	17.9	18.77
7	18.5	18.9	18.23	18.5	19.6	19.7	20.23	19.67	19.5
10	18.17	19	19.33	19.4	19.47	19.53	19.7	19.9	19.83
14	21.73	21.87	21	21.37	21.27	21.9	21.2	20.83	19.7
21	19.53	19.33	19.2	19.37	19.73	18.8	19.63	19.5	19.3
30	20.4	21.13	21.5	20.8	20.87	20.73	20.83	21.03	21.33
60	19.27	18.5	18.07	18.03	18.8	18.63	18.97	18.33	18.47

Nota: Los datos están expresados como media (n=3).
Abreviación: MS-CsA, solución micela de ciclosporina A.

La Tabla 3 muestra la estabilidad del MS-CsA respecto a los cambios en el pH y la osmolaridad durante los 60 días de almacenamiento a temperatura ambiente y a 4°C. El creciente índice del pH a temperatura ambiente fue de 0.992 – 1 y de 0.987 – 0.999 a 4°C. Además, el creciente índice de osmolaridad a temperatura ambiente fue de 0.947 – 1.02 y de 0.959 – 1.012 a 4°C. Los resultados de estabilidad del pH y osmolaridad no mostraron ningún cambio notable durante los 60 días.

Tabla 3: Análisis de pH y osmolaridad de diferentes formulaciones de micela

Formulation	pH			Osmolarity (mOsm)		
	Initial pH	After 60 days	Increasing ratio ^a	Initial osmolarity	After 60 days	Increasing ratio ^b
Stored at room temperature over 60 days						
Z5	7.41±0.01	7.39±0.02	0.997	317.4±7.64	303.7±4.62	0.957
Z6	7.42±0.02	7.38±0.06	0.995	316.77±12.86	299.87±3.26	0.947
Z7	7.43±0.03	7.4±0.03	0.996	311±10.65	298.57±3.95	0.96
F5	7.43±0.03	7.41±0.03	0.997	305.5±3.51	296.6±13.67	0.971
F6	7.47±0.02	7.41±0.02	0.992	298.30±9.54	304.4±5.03	1.02
F7	7.44±0.01	7.4±0.01	0.995	299.63±2.68	296.6±10.82	0.99
O5	7.42±0.03	7.42±0.05	1	309.53±12.11	301.67±4	0.975
O6	7.46±0.01	7.4±0.05	0.992	311.13±4.3	297.47±2.95	0.956
O7	7.45±0.03	7.39±0.07	0.992	306.37±3.46	300.3±3.02	0.98
Stored at 4°C over 60 days						
Z5	7.41±0.01	7.4±0.01	0.999	317.4±7.64	309.03±7.8	0.974
Z6	7.42±0.02	7.41±0.02	0.999	316.77±12.86	307.17±7.48	0.97
Z7	7.43±0.03	7.39±0.09	0.995	311±10.65	304.87±14.2	0.98
F5	7.43±0.03	7.41±0.08	0.997	305.5±3.51	297.7±7.57	0.974
F6	7.47±0.02	7.37±0.05	0.987	298.3±9.54	300.13±2.99	1.006
F7	7.44±0.01	7.41±0.04	0.996	299.63±2.68	303.27±10.05	1.012
O5	7.42±0.03	7.39±0.06	0.996	309.53±12.11	302±9.24	0.976
O6	7.46±0.01	7.39±0.07	0.991	311.13±4.3	298.27±3.7	0.959
O7	7.45±0.03	7.42±0.03	0.996	306.37±3.46	300.03±5.02	0.979

Nota: Índice creciente^a = pH luego de 60 días/pH inicial; Índice creciente^b = osmolaridad luego de 60 días/osmolaridad inicial. Los datos expresados como media ± desviación estándar (n=3). La información sobre los nombres de formulaciones se muestra en la **Tabla 1**.

La Figura 2 muestra la estabilidad química durante los 60 días de almacenamiento a temperatura ambiente y a 4°C. Las concentraciones iniciales de CsA restante fueron de 96.11%±2.26%, 97.21%±1.69%, y 96.91%±1.8% para Z7, F7 y O7, respectivamente. Incluso luego de 60 días de almacenamiento a temperatura ambiente, ninguna muestra tuvo una reducción marcada en las concentraciones de CsA restante. Estos resultados indican que no hubo cambios en la concentración de CsA durante los 60 días. Los resultados de estabilidad química cuando fueron almacenados a 4°C también mostraron una tendencia similar.

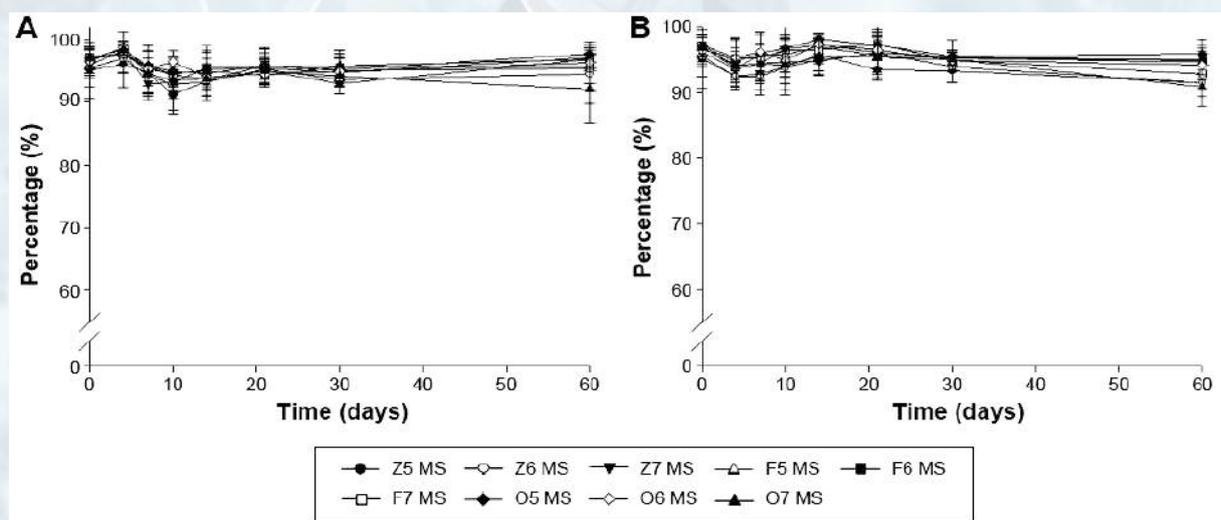


Figura 2: Cambios en estabilidad química (CsA restante) de MS-CsA almacenado a temperatura ambiente (A) y 4°C (B) en diferentes tiempos durante 60 días.

Nota: Datos expresados como media ± desviación estándar (n=3).

Abreviación: MS-CsA, solución micela de ciclosporina A.

Para resumir, no se observó ningún cambio distinto en tamaño de partícula, pH, osmolaridad o contenido del fármaco durante el estudio de estabilidad del MS-CsA (Clacier®). De hecho, el MS-CsA (Clacier®) que desarrollamos tiene estabilidad comprobada y se comercializa en Corea del Sur como MS-CsA (Clacier®). Anteriormente, cuando solicitamos a la Administración de Alimentos y Fármacos de Corea la aprobación del fármaco bajo el nombre **MS-CsA (Clacier®)**, realizamos un experimento adhiriéndonos a los lineamientos de la Conferencia Internacional de Armonización. Sin embargo, ya que el enfoque de este experimento fue la formulación, solo evaluamos su estabilidad en un periodo corto de tiempo. Estos resultados de estabilidad, que sugieren que el MS preparado por método simple sería estable por largos periodos de tiempo, indican que nuestras formulaciones de micelas recién desarrolladas cumplen con los requisitos de un sistema efectivo de aplicación ocular del fármaco.

MEDICIONES DE LA PRODUCCIÓN LAGRIMAL ACUOSA

En este estudio, indujimos los ojos secos en conejos y luego confirmamos la presencia de ojos secos inducidos en estos conejos. Luego observamos que las gotas oftálmicas de CsA eran capaces de acelerar la producción de lágrimas, confirmando su efecto terapéutico. Normalmente, la administración tópica de AS, que antagoniza todos los tipos de receptores muscarínicos, induce rápidamente a los síntomas típicos del ojo seco. Es por ello que ambos ojos en los conejos fueron tratados de igual manera con solución AS para inducir los ojos secos. Luego de inducir los ojos secos, un ojo fue tratado con formulaciones del fármaco (grupo 1, MS-CsA del O7; grupo 2, MS-CsA del O4; grupo 3, Restasis), mientras el otro ojo fue tratado con NS. Los resultados iniciales de STT de los tres grupos se definieron dentro del rango de ojos normales (referencia). Los resultados de STT desde 9.38 a 12.65 (promedio \pm desviación estándar) estuvieron dentro del rango de ojos normales en nuestro estudio. **En la Figura 3**, el recuadro gris (referencia) indica los resultados que corresponden a ojos normales.

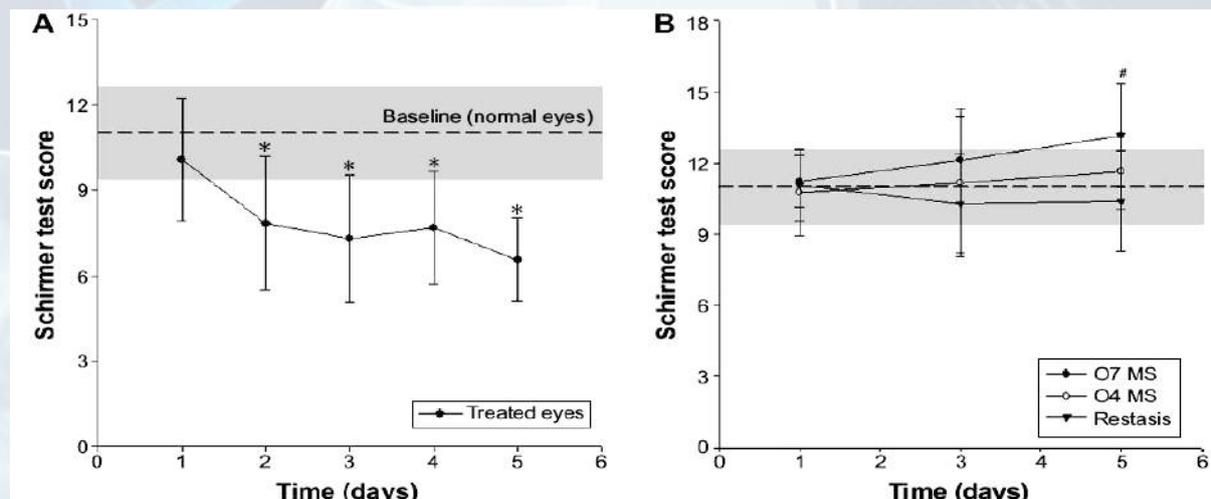


Figura 3: (A) Resultados de prueba STT en el grupo (de control) tratado con AS en diferentes momentos, y (B) según el tratamiento de formulación CsA en el modelo de conejo con ojo seco. Nota: * $P < 0.05$ vs resultado STT de día 1; # $P < 0.05$ (ANOVA unidireccional entre los tres grupos). Los datos se expresan como media \pm desviación estándar ($n=8$). Abreviación: AS, sulfato de atropina (solución 1%); STT, prueba de Schirmer; CsA, ciclosporina A; MS, solución de micela; ANOVA, análisis de varianza.

Los resultados de STT (reportados en milímetros de la tira húmeda 2 minutos después de insertarla) del grupo de control se reportaron en la **Figura 3**. Este mostró cambios visibles y significativos en la producción lagrimal durante 5 días del experimento in vivo. La reducción en producción lagrimal se observó en el segundo día luego de empezar el tratamiento. El resultado promedio de STT se redujo de 10.08 ± 2.13 mm (día 1) a 7.85 ± 2.36 (día 2) en ese momento (prueba T emparejada, $P=0.035$). El resultado de STT del grupo de control al final del experimento fue de 6.56 ± 1.47 .

La Tabla 4 resume los resultados de STT y valores de diferencia lagrimal de los tres grupos tratados con el fármaco. En el primer día, los resultados de STT entre los ojos tratados con el fármaco y los ojos tratados con NS fueron considerablemente similares, y los resultados estaban entre 10 o 11 mm, los cuales son valores esperados en ojos normales. Los valores de diferencia lagrimal de los

grupos 1 – 3 fueron 1.38 ± 1.79 mm, 0.84 ± 1.8 mm, y 1.25 ± 3.55 mm respectivamente. No obstante, luego de eso, ambos ojos de los grupos tratados con MS-CsA en un ojo mostró una diferencia significativa en el día 3 (grupo 1, $P=0.0007$; grupo 2, $P=0.0254$). Luego del tratamiento por 5 días hubo una mejora significativa ($P=0.0032$) en los resultados de STT de los ojos tratados con Restasis en comparación con los ojos no tratados. Sin embargo, el alcance de la mejora fue mucho mayor en los grupos tratados con O7 ($P=0.0003$) y O4 ($P=0.0003$), los cuales fueron mayores que los resultados iniciales de los grupos respectivos. En el último punto de la prueba, los valores de diferencia lagrimal entre grupo 1, grupo 2 y grupo 3 fueron distintos. Los valores de diferencia lagrimal de los grupos 1 – 3 fueron 6.35 ± 4.49 mm, 4.9 ± 2.96 mm, y 3.6 ± 3.27 mm, respectivamente. El valor de diferencia lagrimal del grupo 1 fue 1.76 veces el del grupo 3. En comparación a la emulsión convencional (Restasis), las formulaciones de MS-CsA mostraron mejora por los valores de diferencia lagrimal entre el día 1 y día 5.

Tabla 4: Resultados de la prueba de Schirmer con tratamiento

	Day 1	Day 3	Day 5
Group 1			
AS+O7	11.23 ± 1.1	12.13 ± 1.84^a	13.16 ± 2.21^a
AS+NS	9.85 ± 1.78	7.78 ± 2.16	6.81 ± 3.08
P_1	0.084	0.0007	0.0003
Tear-difference value	1.38 ± 1.79	4.35 ± 1.54	6.35 ± 4.49
Group 2			
AS+O4	10.76 ± 1.86	11.16 ± 3.12^b	11.65 ± 1.58^b
AS+NS	9.93 ± 1.59	7.25 ± 3.14	6.75 ± 2.45
P_2	0.3497	0.0254	0.0003
Tear-difference value	0.84 ± 1.8	3.91 ± 4.73	4.90 ± 2.96
Group 3			
AS+Restasis	11.06 ± 1.5	10.29 ± 2.07	10.4 ± 2.11^c
AS+NS	9.81 ± 2.74	7.58 ± 3.44	6.8 ± 1.94
P_3	0.2763	0.0767	0.0032
Tear-difference value	1.25 ± 3.55	2.71 ± 3.12	3.6 ± 3.27

Nota: $aP < 0.05$ vs AS+NS en grupo 1 en el mismo día; $bP < 0.05$ vs AS+NS en grupo 2 en el mismo día; $cP < 0.05$ vs AS+NS en grupo 3 en el mismo día. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar ($n=8$). Todas las soluciones se administran a $50 \mu\text{L}$.

Abreviaciones: AS, sulfato de atropina (solución al 1%); NS, solución salina normal

Los resultados de STT relevantes al tratamiento con las formulaciones del fármaco en prueba se ilustran en la **Figura 3B**. En el primer día, los resultados de STT de todos los grupos fueron similares significativamente (ANOVA, $P=0.8276$) y pertenecían al rango normal de ojos. En el día cinco, el ANOVA unidireccional ($P=0.0365$) mostró que hubo diferencias significativas estadísticamente entre las formulaciones, y la eficacia terapéutica de las mismas (basado en los resultados de STT) era posible de predecir. Curiosamente, se observó que solo el O7 produjo resultados mayores respecto a los ojos normales en el último momento del experimento, mientras las otras dos formulaciones produjeron resultados dentro de los rangos normales durante todo el tiempo del experimento. **El efecto incrementado de las formulaciones de micelas puede darse debido a la permeabilidad incrementada en relación a la cantidad de Cremophor EL. Estos resultados sugieren que las formulaciones de micelas en este estudio tienen el potencial para reducir la cantidad del ingrediente activo.**

DENSIDAD DE LAS CÉLULAS CALICIFORMES

Las glándulas lagrimales, conjuntiva y cornea se ven afectadas con la enfermedad de ojo seco. Por lo tanto, la superficie ocular es el objetivo ideal para la administración tópica de CsA para suprimir la inflamación ocular sin exposición sistémica de CsA significativa. **Las células caliciformes se ubican en la superficie de la mucina secretada a través de la conjuntiva, y una vez secretada, posee la habilidad de hidratar y solidificar la conjuntiva.** Esta película biológica produce una cubierta protectora sobre la superficie ocular para protegerla de una variedad de gérmenes, químicos y toxinas ambientales. Las células caliciformes de la conjuntiva son la fuente principal de mucoproteínas de la superficie ocular que lubrican y protegen la superficie ocular. Es probable que la pobre lubricación de la superficie ocular que resulta de una producción reducida de mucinas haga que la película lagrimal sea inestable. Por lo tanto, la densidad de las células caliciformes (número adecuado de células caliciformes) es un parámetro crítico que refleja la salud global de la superficie ocular. La emulsión de CsA (Restasis), pero no las lágrimas artificiales, incrementa la densidad de células caliciformes en la conjuntiva bulbar en pacientes con ojo seco.

Para evaluar los efectos del tratamiento secuencial con AS y formulaciones del fármaco en la densidad de células caliciformes en los conejos, se mancharon muestras de saco conjuntival con solución H&E. **La Tabla 5** muestra el número promedio de células de caliciformes de los grupos 1 y 3. El número de células caliciformes en conjuntivas tratadas con AS + **MS-CsA (Clacier®)** (94.83±8.38) o AS + Restasis (65.17±11.51) fue significativamente más alto que el número de células caliciformes tratadas con AS + NS (grupo 1, 43.67±4.76; grupo 3, 40.5±7.01). Las densidades de las células caliciformes del grupo 1 (tratadas con O7) y grupo 3 (tratadas con Restasis) mostraron una diferencia significativa (P<0.05). como resultado, las formulaciones de **MS-CsA (Clacier®)** tienen potencial para ser una herramienta útil para curar los ojos secos y puede ser empleado como una alternativa ideal [...] para el tratamiento del síndrome de ojo seco.

Tabla 5: Densidad promedio de las células caliciformes de la conjuntiva

Table 5 Average conjunctival goblet-cell density

	Goblet-cell density	Difference
Group 1		
AS+O7	94.83±8.38 ^{a,b}	51.17±6.43
AS+NS	43.67±4.76	
Group 3		
AS+Restasis	65.17±11.51 ^c	24.67±9.33
AS+NS	40.5±7.01	

Nota: aP<0.05 vs AS+NS en grupo 1 en el mismo día; bP<0.05 vs AS+NS en grupo 2 en el mismo día; cP<0.05 vs AS+NS en grupo 3 en el mismo día. Los datos se expresan como media ± desviación estándar (n=8). Todas las soluciones se administran a 50 µL.

Abreviaciones: AS, sulfato de atropina (solución al 1%); NS, solución salina normal

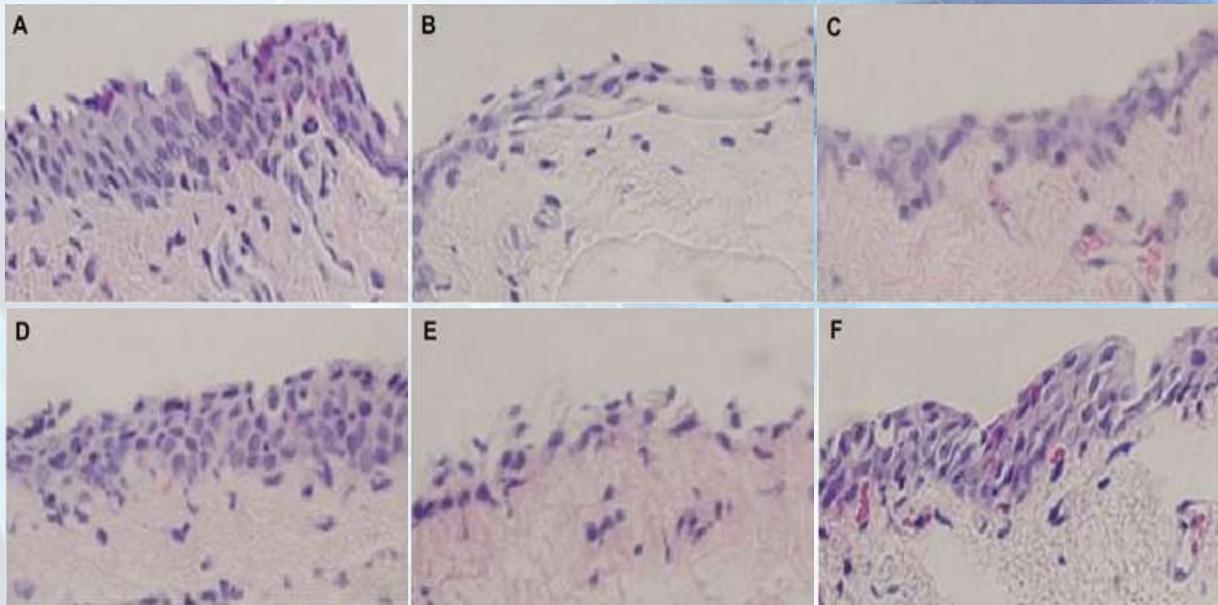
MORFOLOGÍA EPITELIAL DE LA CONJUNTIVA

Como se muestra en la **Figura 4**, las células caliciformes se tiñeron de púrpura y se localizaron en el epitelio superficial. El tratamiento con AS disminuyó la densidad de las células caliciformes, como en la enfermedad del ojo seco. Asimismo, los resultados fueron consistentes con los resultados de STT, como se mencionó anteriormente.

Las conjuntivas de conejos luego de 5 días de tratamiento con AS y NS se muestran en la **Figura 4**, C (grupo 1) y E (grupo 3), respectivamente. Estos epitelios se adelgazaron con la pérdida de células caliciformes. Sin embargo, las conjuntivas de conejos luego de 5 días de tratamiento con AS y formulaciones del fármaco recuperaron el epitelio, y hubo un incremento relativo en el número de

células caliciformes. **Las conjuntivas tratadas con formulación de MS-CsA Clacier® (Figura 4D) o emulsión comercial de CsA Restasis (Figura 4F) se componían de suficientes capas de células epiteliales y contenían numerosas células caliciformes.**

Figura 4: Imágenes de secciones histológicas de la conjuntiva de conejo teñida con H&E.



Nota: (A) Administración solo de solución salina; (B) administración solo de solución sulfato de atropina 1%; (C) administración de AS + NS en grupo 1; (D) administración de AS + O7 en grupo 1; (E) administración de AS + NS en grupo 3; (F) administración de AS + Restasis en grupo 3. Las células caliciformes se tiñen de púrpura y se localizan en el epitelio superficial. Los epitelios en (B), (C) y (E) se adelgazaron con la pérdida de células caliciformes. La morfología de células caliciformes (D) fue relativamente bien formada. Aumento de 40X. Todas las soluciones se administran a 50 μ L. Abreviaciones: AS, sulfato de atropina (solución al 1%); H&E, hematoxilina y eosina; NS, solución salina.

CONCLUSIÓN

Las gotas oftálmicas de CsA (Ciclosporina) son ampliamente conocidas como agente terapéutico para el síndrome de ojo seco en la industria farmacéutica. Sin embargo, eran casi inexistentes las preparaciones de medicamentos oftálmicos para este trastorno, excepto Restasis, debido a temas de estabilidad y conformidad del paciente. Para desarrollar un MS-CsA transparente capaz de mejorar el cumplimiento del paciente y tratar con eficacia al paciente con síndrome de ojo seco, se establecieron formulaciones de MS-CsA (Clacier®) compuesta por el tensioactivo no iónico Cremophor EL, etanol y buffer fosfato.

Estos estudios revelaron que el método de fabricación de MS-CsA (Clacier®) aporta una manera más simple y eficiente de preparar gotas oftálmicas característicamente más pequeñas y con tamaño de distribución más homogéneo que el Restasis.

MS-CsA (Clacier®) puede ser almacenado por 60 días sin ningún cambio químico o físico, como el pH, osmolaridad, tamaño de partícula y contenido.

El nuevo MS-CsA (Clacier®) desarrollado mostró un efecto terapéutico significativo, según evidencia histológica de mayor densidad de celular caliciformes y evidencia clínica de producción lagrimal mejorada en ojo seco.

Nuestros resultados implican considerablemente que el MS-CsA (Clacier®) es una terapia ideal para ojo seco.

Asimismo, el sistema de aplicación del MS-CsA (Clacier®) con su tiempo de proceso más corto y posible producción a gran escala, es un método favorable.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por el Programa de Investigadores En Trayectoria a través de una subvención de la Fundación Nacional de Investigación fundada por el Ministerio de Ciencia, ICT, y Planeamiento Futuro, Corea del Sur (NRF-2014R1A2A2A01005059). Los autores también fueron apoyados por Byung Joon Park, quien ayudó con las revisiones en inglés y contribuyó con ideas en la sección de “Resultados y Discusión”.

DECLARACIÓN

Los autores no reportan ningún conflicto de interés en este trabajo.

REFERENCIAS

1. Lallemand F, Felt-Baeyens O, Besseghir K, Behar-Cohen F, Gurny R. Cyclosporine A delivery to the eye: a pharmaceutical challenge. *Eur J Pharm Biopharm.* 2003;56(3):307–318.
2. Kashani S, Mearza AA. Uses and safety profile of ciclosporin in ophthalmology. *Expert Opin Drug Saf.* 2008;7(1):79–89.
3. Karn PR, Cho W, Park HJ, Park JS, Hwang SJ. Characterization and stability studies of a novel liposomal cyclosporin A prepared using the supercritical fluid method: comparison with the modified conventional Bangham method. *Int J Nanomedicine.* 2013; 8:365–377.
4. Rodriguez-Aller M, Kaufmann B, Guillarme D, et al. In vivo characterisation of a novel water-soluble cyclosporine A prodrug for the treatment of dry eye disease. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012;80(3):544–552.
5. Noble S, Markham A. Cyclosporin: a review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (Neoral). *Drugs.* 1995;50(5):924–941.
6. Mondon K, Zeisser-Labouèbe M, Gurny R, Möller M. Novel cyclosporin A formulations using MPEG-hexyl-substituted polylactide micelles: a suitability study. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011;77(1):56–65.
7. Di Tommaso C, Bourges JL, Valamanesh F, et al. Novel micelle carriers for cyclosporin A topical ocular delivery: in vivo cornea penetration, ocular distribution and efficacy studies. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012;81(2):257–264.
8. Strickley RG. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharm Res.* 2004;21(2):201–230.
9. Javadi MA, Feizi S. Dry eye syndrome. *J Ophthalmic Vis Res.* 2011;6(3):192–198.
10. Pflugfelder SC. Antiinflammatory therapy for dry eye. *Am J Ophthalmol.* 2004;137(2):337–342.
11. Schaumberg DA, Sullivan DA, Buring JE, Dana MR. Prevalence of dry eye syndrome among US women. *Am J Ophthalmol.* 2003;136(2):318–326.
12. Karn PR, Kim HD, Kang H, Sun BK, Jin SE, Hwang SJ. Supercritical fluid-mediated liposomes containing cyclosporin A for the treatment of dry eye syndrome in a rabbit model: comparative study with the conventional cyclosporin A emulsion. *Int J Nanomedicine.* 2014;9: 3791–3800.
13. Gupta C, Chauhan A. Ophthalmic delivery of cyclosporine A by punctal plugs. *J Control Release.* 2011;150(1):70–76.
14. Aliabadi HM, Brocks DR, Lavasanifar A. Polymeric micelles for the solubilization and delivery of cyclosporine A: pharmacokinetics and biodistribution. *Biomaterials.* 2005;26(35):7251–7259.
15. Kuwano M, Ibuki H, Morikawa N, Ota A, Kawashima Y. Cyclosporine A formulation affects its ocular distribution in rabbits. *Pharm Res.* 2002; 19(1):108–111.
16. Luschmann C, Tessmar J, Schoeberl S, Strauss O, Luschmann K, Goepferich A. Self-assembling colloidal system for the ocular administration of cyclosporine A. *Cornea.* 2014;33(1):77–81.
17. Cholkar K, Gilger BC, Mitra AK. Topical, aqueous, clear cyclosporine formulation design for anterior and posterior ocular delivery. *Transl Vis Sci Technol.* 2015;4(3):1.
18. Jiao J. Polyoxyethylated nonionic surfactants and their applications in topical ocular drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60(15): 1663–1673.

1. Lallemand F, Felt-Baeyens O, Besseghir K, Behar-Cohen F, Gurny R. Cyclosporine A delivery to the eye: a pharmaceutical challenge. *Eur J Pharm Biopharm.* 2003;56(3):307–318.
2. Kashani S, Mearza AA. Uses and safety profile of ciclosporin in ophthalmology. *Expert Opin Drug Saf.* 2008;7(1):79–89.
3. Karn PR, Cho W, Park HJ, Park JS, Hwang SJ. Characterization and stability studies of a novel liposomal cyclosporin A prepared using the supercritical fluid method: comparison with the modified conventional Bangham method. *Int J Nanomedicine.* 2013; 8:365–377.
4. Rodriguez-Aller M, Kaufmann B, Guillarme D, et al. In vivo characterisation of a novel water-soluble cyclosporine A prodrug for the treatment of dry eye disease. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012;80(3):544–552.
5. Noble S, Markham A. Cyclosporin: a review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (Neoral). *Drugs.* 1995;50(5):924–941.
6. Mondon K, Zeisser-Labouèbe M, Gurny R, Möller M. Novel cyclosporin A formulations using MPEG-hexyl-substituted polylactide micelles: a suitability study. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011;77(1):56–65.
7. Di Tommaso C, Bourges JL, Valamanesh F, et al. Novel micelle carriers for cyclosporin A topical ocular delivery: in vivo cornea penetration, ocular distribution and efficacy studies. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012;81(2):257–264.
8. Strickley RG. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharm Res.* 2004;21(2):201–230.
9. Javadi MA, Feizi S. Dry eye syndrome. *J Ophthalmic Vis Res.* 2011;6(3):192–198.
10. Pflugfelder SC. Antiinflammatory therapy for dry eye. *Am J Ophthalmol.* 2004;137(2):337–342.
11. Schaumberg DA, Sullivan DA, Buring JE, Dana MR. Prevalence of dry eye syndrome among US women. *Am J Ophthalmol.* 2003;136(2):318–326.
12. Karn PR, Kim HD, Kang H, Sun BK, Jin SE, Hwang SJ. Supercritical fluid-mediated liposomes containing cyclosporin A for the treatment of dry eye syndrome in a rabbit model: comparative study with the conventional cyclosporin A emulsion. *Int J Nanomedicine.* 2014;9: 3791–3800.
13. Gupta C, Chauhan A. Ophthalmic delivery of cyclosporine A by punctal plugs. *J Control Release.* 2011;150(1):70–76.
14. Aliabadi HM, Brocks DR, Lavasanifar A. Polymeric micelles for the solubilization and delivery of cyclosporine A: pharmacokinetics and biodistribution. *Biomaterials.* 2005;26(35):7251–7259.
15. Kuwano M, Ibuki H, Morikawa N, Ota A, Kawashima Y. Cyclosporine A formulation affects its ocular distribution in rabbits. *Pharm Res.* 2002; 19(1):108–111.
16. Luschmann C, Tessmar J, Schoeberl S, Strauss O, Luschmann K, Goepferich A. Self-assembling colloidal system for the ocular administration of cyclosporine A. *Cornea.* 2014;33(1):77–81.
17. Cholkar K, Gilger BC, Mitra AK. Topical, aqueous, clear cyclosporine formulation design for anterior and posterior ocular delivery. *Transl Vis Sci Technol.* 2015;4(3):1.
18. Jiao J. Polyoxyethylated nonionic surfactants and their applications in topical ocular drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60(15): 1663–1673.
19. Roggeband R, York M, Pericoi M, Braun W. Eye irritation responses in rabbit and man after single applications of equal volumes of undiluted model liquid detergent products. *Food Chem Toxicol.* 2000;38(8): 727–734.
20. Ammar HO, Salama HA, Ghorab M, Mahmoud AA. Nanoemulsion as a potential ophthalmic delivery system for dorzolamide hydrochloride. *AAPS PharmSciTech.* 2009;10(3):808–819.
21. van der Bijl P, van Eyk AD, Meyer D. Effects of three penetration enhancers on transcorneal permeation of cyclosporine. *Cornea.* 2001; 20(5):505–508.
22. Buralassi S, Panichi L, Chetoni P, Saetone MF, Boldrini E. Development of a simple dry eye model in the albino rabbit and evaluation of some tear substitutes. *Ophthalmic Res.* 1999;31(3):229–235.
23. Gin J, Wong VG, inventors; Visionex, assignee. Schirmer tear test. United States patent US 5006310. 1991 Apr 9.
24. Kunert KS, Tisdale AS, Gipson IK. Goblet cell numbers and epithelial proliferation in the conjunctiva of patients with dry eye syndrome treated with cyclosporine. *Arch Ophthalmol.* 2002;120(3):330–337.
25. Dursun D, Wang M, Monroy D, et al. A mouse model of keratoconjunctivitis sicca. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(3):632–638.
26. Stevenson D, Tauber J, Reis BL. Efficacy and safety of cyclosporin A ophthalmic emulsion in the treatment of moderate-to-severe dry eye disease: a dose-ranging, randomized trial. *Ophthalmology.* 2000; 107(5):967–974.

27. van der Bijl P, Engelbrecht AH, Van Eyk AD, Meyer D. Comparative permeability of human and rabbit corneas to cyclosporin and tritiated water. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2002;18(5):419–427.
28. Das S, Mondal S, Ghosh S. Physicochemical studies on the micellization of cationic, anionic, and nonionic surfactants in water-polar organic solvent mixtures. *J Chem Eng Data.* 2013;58(9):2586–2595.
29. van Tellingen O, Huizing MT, Panday VR, Schellens JH, Nooijen WJ, Beijnen JH. Cremophor EL causes (pseudo-) non-linear pharmacokinetics of paclitaxel in patients. *Br J Cancer.* 1999;81(2):330–335.
30. Torchilin VP. Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. *Pharm Res.* 2007;24(1):1–16.
31. Bonanno JA, Polse KA. Measurement of in vivo human corneal stromal pH: open and closed eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1987;28(3): 522–530.
32. Coles WH, Jaros PA. Dynamics of ocular surface pH. *Br J Ophthalmol.* 1984;68(8):549–552.
33. Missel PJ, Lang JC, Rodeheaver DP, et al. Design and evaluation of ophthalmic pharmaceutical products. In: Florence AT, Siepmann J, editors. *Modern Pharmaceutics*. 5th ed. Boca Raton (FL): CRC Press; 2009:101–189.
34. Suzuki M, Massingale ML, Ye F, et al. Tear osmolarity as a biomarker for dry eye disease severity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(9): 4557–4561.
35. Beauchesne PR, Chung NS, Wasan KM. Cyclosporine A: a review of current oral and intravenous delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm.* 2007;33(3):211–220.
36. el Tayar N, Mark AE, Vallat P, Brunne RM, Testa B, van Gunsteren WF. Solvent-dependent conformation and hydrogen-bonding capacity of cyclosporin A: evidence from partition coefficients and molecular dynamics simulations. *J Med Chem.* 1993;36(24):3757–3764.
37. Mithani SD, Bakatselou V, TenHoor CN, Dressman JB. Estimation of the increase in solubility of drugs as a function of bile salt concentration. *Pharm Res.* 1996;13(1):163–167.
38. Acheampong AA, Shackleton M, Tang-Liu DD, Ding S, Stern ME, Decker R. Distribution of cyclosporin A in ocular tissues after topical administration to albino rabbits and beagle dogs. *Curr Eye Res.* 1999; 18(2):91–103.
39. Shatos MA, Rios JD, Horikawa Y, et al. Isolation and characterization of cultured human conjunctival goblet cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(6):2477–2486.
40. Chao CC, Butala SM, Herp A. Studies on the isolation and composition of human ocular mucin. *Exp Eye Res.* 1988;47(2):185–196.
41. Holly FJ, Lemp MA. Wettability and wetting of corneal epithelium. *Exp Eye Res.* 1971;11(2):239–250.
42. Watanabe H. Significance of mucin on the ocular surface. *Cornea.* 2002; 21(2 Suppl 1): S17–S22.
43. Xiong C, Chen D, Liu J, et al. A rabbit dry eye model induced by topical medication of a preservative benzalkonium chloride. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(5):1850–1856.
44. Barabino S, Shen L, Chen L, Rashid S, Rolando M, Dana MR. The controlled-environment chamber: a new mouse model of dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(8):2766–2771.
45. Pflugfelder SC, De Paiva CS, Villarreal AL, Stern ME. Effects of sequential artificial tear and cyclosporine emulsion therapy on conjunctival goblet cell density and transforming growth factor- β 2 production. *Cornea.* 2008;27(1):64–69.
46. Kinoshita S, Kiorpes TC, Friend J, Thoft RA. Goblet cell density in ocular surface disease: a better indicator than tear mucin. *Arch Ophthalmol.* 1983;101(8):1284–1287.



Haciendo que el mundo
vea mejor



Clacier®

Clacier®

EVOLUCIÓN LANSIER para el Tratamiento Eficaz del Ojo Seco



Nanoemulsion
Sin preservantes
Ciclosporina 0.05%
Caja x 30 viales x 0.4 mL