

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 324 485**

51 Int. Cl.:

**A61K 49/00** (2006.01)

**A61K 31/185** (2006.01)

**A61P 27/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA  
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.12.2005 PCT/JP2005/022738**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.06.2006 WO06062233**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2005 E 05814729 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **22.06.2016 EP 1819366**

54 Título: **Composición colorante para colorear una membrana oftálmica**

30 Prioridad:

**06.12.2004 US 633592 P**  
**27.01.2005 US 647504 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:  
**17.11.2016**

73 Titular/es:

**KYUSHU UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION (100.0%)**  
**6-10-1 HAKOZAKI, HIGASHI-KU**  
**FUKUOKA-SHI, FUKUOKA 812-0053, JP**

72 Inventor/es:

**ENaida, HIROSHI;**  
**HISATOMI, TOSHIO;**  
**ISHIBASHI, TATSURO;**  
**KAGIMOTO, TADAHISA y**  
**HATA, YASUAKI**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

## DESCRIPCION

Composición colorante para colorear una membrana oftálmica.

5 **Depósito de la prioridad**

La presente solicitud reivindica la prioridad respecto a las solicitudes provisionales de los Estados Unidos número 60/633.592, solicitada el 6 de diciembre de 2004 y número 60/647.504 solicitada el 27 de enero de 2005.

10 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a una composición colorante para colorear una membrana oftálmica. Más específicamente, la presente invención se refiere a la composición colorante utilizada como coadyuvante para colorear la membrana oftálmica y, concretamente, para retirar la membrana.

15 **Estado de la técnica**

El coloreado de la membrana limitadora interna (MLI) es uno de los desarrollos importantes de la cirugía para enfermedades vítreo-retinianas tales como orificio macular y membranas epirretinales (MERS) (*Indocyanine green-assisted peeling of the retinal internal membrane*. Desprendimiento asistido por el verde de indocianina de la membrana limitadora interna de la retina. Burk SE *et al.* Ophthalmology. 2000; 107:2010-2014). Actualmente se reconoce en general que es extremadamente difícil retirar las membranas sin coadyuvante quirúrgico debido a la escasa visibilidad de la MLI y las MER. En particular, la coloración con verde de indocianina (VIC) y el Azul de Tripano (AT) han facilitado en gran medida el desprendimiento de la MLI y las MER en diferentes enfermedades vítreo-retinianas y, como resultado de ello, esta técnica es ahora ampliamente aceptada por muchos cirujanos. Sin embargo, se han publicado recientemente numerosos informes en relación con el daño a la retina provocado por las inyecciones intravítreas de VIC y AT, tanto en experimentos como en uso clínico. (*Morphological and functional damage caused by intravitreal injections of ICG and TB caused by intravitreal indocyanine green in rat eyes*. Lesiones morfológicas y funcionales de la retina provocadas por el verde de indocianina intravítreo en ojos de ratas. Enaida H, *et al.* Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2002; 240: 209-213.; Uemura A, *et al.* *Visual field defects after uneventful vitrectomy for epirretinal membrana with indocyanine green-assisted internal limiting membrane peeling*. Defectos del campo visual después de vitrectomía satisfactoria de la membrana epirretiniana con desprendimiento de la membrana limitadora interna asistido por verde de indocianina. Am J Ophthalmol. 2003; 136:252-257.; Veckeneer M. *et al.* *Ocular toxicity study of trypan blue injected into the vitreous cavity of rabbit eyes*. Estudio de la toxicidad ocular del azul de tripano inyectado en la cavidad vítreo de ojos de conejo. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2001;239:698-704).

Además, la creación de una capsulorrexia curvilínea continua (CCC) en ojos con una catarata blanca madura puede representar un reto, dado que es difícil distinguir la cápsula anterior de la corteza blanca subyacente. Una deficiente visualización de la cápsula tiende a provocar una CCC incompleta o inadecuada que podría provocar un desgarro capsular posterior, la pérdida de humor vítreo y dislocación de la lente intraocular (DLI). La administración intraocular de colorantes para colorear la cápsula anterior a fin de realizar la CCC en ojos con cataratas con escaso o ningún reflejo rojo se ha hecho cada vez más popular. Dada demostró que la coloración capsular facilita la CCC, incluso en cataratas inmaduras y podría ser un complemento útil para los alumnos de cirugía. El azul de tripano al 1% y 0, 06% se ha introducido en la coloración capsular y se ha comprobado que carecen de toxicidad aparente *in vivo*. Sin embargo, se ha descrito que el azul de tripano es tóxico para el endotelio corneal *in vitro* en condiciones severas. El verde de indocianina (VIC) es también un colorante utilizado frecuentemente para la coloración capsular. McEnerney y Peyman describieron el uso del VIC para recuentos de células en el endotelio corneal de conejo, y sugirieron que el colorante no dañaba el endotelio vivo. Sin embargo, los inventores describieron en 2002 la posible toxicidad de la VIC para las células retinianas y, recientemente, se ha descrito la toxicidad del VIC en el epitelio del pigmento retiniano, las células de los ganglios y los fotorreceptores. (*Indocyanine green induces apoptosis in human retinal pigment epithelial cells*. El verde de indocianina provoca apoptosis en las células epiteliales del pigmento retiniano humano. Rezai KA, *et al.* Am J Ophthalmol. 2004;137:931-933.; *Trypan blue induces apoptosis in human retinal epithelial cells*. El azul de tripano provoca apoptosis en las células epiteliales del pigmento retiniano humano. Rezai KA, *et al.* Am J Ophthalmol. 2004;13 8:492-495). La patente WO 2004/035091 describe el uso de azul Patentblue V o Azul Brillante R para la coloración de la cápsula anterior o la membrana epirretiniana del ojo al realizar operaciones oftálmicas.

Como se ha indicado anteriormente, los colorantes (como por ejemplo el IC o AT) utilizados normalmente para colorear una membrana oftálmica, particularmente la membrana limitadora interna y la cápsula anterior, han producido dudas en cuanto a su seguridad. Dichas dudas han surgido como consecuencia de informes sobre la posibilidad de toxicidad, teratogenicidad, etc., en las células retinianas. Además, han surgido problemas técnicos tales como la incapacidad para obtener un colorante satisfactorio a bajas concentraciones y la complicación de los procedimientos de coloración. Como consecuencia, estos problemas han hecho que la cirugía oftálmica se convierta en una cuestión aún más difícil.

Así pues, para promover la mejora en las intervenciones oftálmicas, se ha perseguido con gran interés el desarrollo de un colorante que coloree específicamente una membrana oftálmica, y tenga como objetivos una fuerte coloración a bajas concentraciones junto con niveles elevados de seguridad.

## 5 Objeto de la invención

En consecuencia, un objetivo de la presente invención es el de proporcionar una composición colorante que sea una alternativa a los colorantes utilizados habitualmente para colorear una membrana oftálmica. Un objetivo más detallado es el de proporcionar una composición colorante que permita colorear específicamente la membrana limitadora interna o la cápsula anterior, y que pueda utilizarse como coadyuvante en una operación para la retirada de dicha membrana.

A fin de proporcionar una composición colorante que alcance dichos objetivos, se han utilizado todos los colorantes, incluidos los que actualmente no se usan en organismos, siendo cribados para encontrar los mejores colorantes. Además, como condiciones para el cribado, se anotaron específicamente la seguridad y la afinidad del colorante. Acto seguido se realizaron evaluaciones de la seguridad, utilizando ratas, de los mejores colorantes candidatos. Basándose en la superior afinidad de coloración y a la seguridad, el candidato final fue el Azul Brillante G (ABG).

Además, con el fin de examinar las condiciones óptimas de una composición colorante que contenga ABG para colorear una membrana oftálmica, se realizaron varios experimentos. De ese modo, se obtuvo la composición colorante de la presente invención. Conviene señalar que el ABG no ha sido utilizado aún clínicamente, sobre todo en seres humanos. No obstante, debido a las óptimas condiciones de la presente invención, se puede proporcionar una composición colorante que sea segura para uso clínico y que tenga al mismo tiempo una elevada afinidad a la coloración.

En consecuencia, según el primer aspecto principal de la presente invención, se proporciona una composición colorante que tiene el ABG como componente principal, para colorear una membrana oftálmica cuando se procede a la retirada de la membrana oftálmica.

Esto es, un aspecto de la presente invención se dirige a una composición colorante para colorear una membrana oftálmica cuando se procede a la retirada de la membrana oftálmica, caracterizada porque dicha composición colorante comprende, como componente primario, el Azul Brillante G (ABG), una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un hidrato suyo.

La estereoestructura preferida del ABG de la presente invención son cuerpos ópticamente activos que tienen la estructura absoluta, pero el ABG de la presente invención puede estar presente en forma de enantiómeros, o mezclas de los mismos, tales como cuerpos racémicos. Así pues, el ABG de la presente invención incluye todos los cuerpos ópticamente activos, las mezclas enantioméricas, tales como cuerpos racémicos y las mezclas diaestereoméricas del ABG.

Entre los ejemplos de la sal farmacéuticamente aceptable se incluyen las sales formadas con bases inorgánicas, amoniaco, bases orgánicas, ácidos inorgánicos, ácidos orgánicos, aminoácidos básicos, iones de halógenos o similares, así como sales moleculares internas. Entre los ejemplos de la base inorgánica se incluyen el metal alcalino (por ejemplo Na, K) y el metal alcalinotérreo (por ejemplo Ca, Mg). Ejemplos de la base orgánica incluyen la trimetilamina, trietilamina, colina, procaína, etanolamina y similares. Ejemplos del ácido inorgánico son ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares. Entre los ejemplos del ácido orgánico incluyen el p-toluensulfónico, el ácido metanesulfónico, el ácido fórmico, el ácido trifluoroacético, el ácido maléico, y similares. Ejemplos de los aminoácidos básicos son la lisina, arginina, ornitina, histidina, y similares. El compuesto podría ser un hidrato farmacéuticamente aceptable.

Según una realización preferida de la invención, dicha composición colorante puede utilizarse como coadyuvante quirúrgico en intervenciones oftálmicas relacionadas con enfermedades de los ojos tales como la enfermedad vítreo-retiniana, el orificio macular, el desprendimiento de retina debido a orificio macular hímico, la membrana epirretiniana, la retinopatía diabética proliferativa, el edema macular diabético y la viterorretinopatía proliferativa y cataratas específicas tales como la catarata hipermadura y la catarata congénita, al igual que el trasplante corneal de espesor dividido, etc. Según la composición colorante la presente invención, se hace posible verificar más claramente las membranas oftálmicas de difícil observación y mejorar la seguridad durante las operaciones quirúrgicas.

En otra realización preferida de la presente invención, dicha composición colorante puede utilizarse para colorear una membrana oftálmica y, más preferentemente, para colorear la membrana limitadora interna y/o la cápsula anterior.

En una realización preferida de la presente invención, es conveniente que la composición colorante de la presente invención contenga ABG a una concentración de 0,1-10 mg/ml, preferentemente una concentración de 0,1 - 1,0 mg/ml y, más preferentemente, una concentración de 0,1 - 0,25 mg/ml. En esta realización, se presenta una composición colorante que tiene una elevada afinidad colorante a concentraciones bajas y en cantidades reducidas.

Además, según la realización de la presente invención, es preferible que la composición colorante tenga una presión osmótica de alrededor de 298 mOsm. Según esta realización, la composición colorante de la presente invención tiene una presión osmótica equivalente a la de una solución salina fisiológica. De este modo, queda neutralizado cualquier problema que ocurra como consecuencia de diferencias en la presión osmótica.

En una realización preferida de la presente invención, es conveniente que la composición colorante de la misma tenga un pH neutro, es decir, un pH cercano a 7,4.

Según el segundo aspecto principal de la presente invención, se proporciona una composición para su uso en un procedimiento de coloración y retirada de una membrana oftálmica que incluye los pasos de preparar una composición colorante que tiene el ABG como componente principal, colorear la membrana oftálmica utilizándose una concentración predeterminada de dicha composición colorante y retirar la membrana oftálmica coloreada.

En una realización preferida de la presente invención, dicha membrana oftálmica es una membrana limitadora interna y/o una cápsula anterior, aunque no se limita necesariamente a las mismas.

Según el tercer aspecto principal de la presente invención, se proporciona el uso del ABG en la fabricación de una composición colorante para el tratamiento de enfermedades oftálmicas.

Además, según el cuarto aspecto principal de la presente invención, se proporciona el uso de ABG como coadyuvante quirúrgico para intervenciones oftálmicas.

#### **Descripción de las figuras**

La Fig. 1 muestra una fotografía en microscopía óptica de ojos de rata a los que se ha inyectado ABG intravítreo (10 mg/ml, 0,05 ml/ojo) observada a los 14 días. (Aumento Original A: x 200, B: x 400).

La Fig. 2 muestra una fotografía en microscopía electrónica de transmisión de los ojos de rata inyectados con ABG intravítreo (10 mg/ml y 1 mg/ml, 0,05 ml/ojo) observada a los 14 días. (Aumento Original x 2000).

La Fig. 3 muestra una fotografía que ilustra la muerte de células apoptóticas detectada por TUNEL. (Aumento original x 400).

La Fig. 4 muestra gráficos que presentan formas de onda y amplitud máxima de ERGs en ojos de rata.

La Fig. 5 muestra fotografías que presenta la coloración de la MLI por ABG en ojos de primates.

La Fig. 6 muestra fotografías que presentan el desprendimiento de la MLI asistido por ABG para OM.

La Fig. 7 muestra una fotografía que ilustra el desprendimiento de membrana asistido por ABG para la MER.

La Fig. 8 muestra una fotografía microscópica de la transmisión de electrones para la MLI.

La Fig. 9 muestra las imágenes biomicroscópicas representativas de la coloración capsular con ABG. (Aumento original x4).

La Fig. 10 muestra secciones de la córnea coloreadas con hematoxilina y eosina después de la inyección de los colorantes en la cámara anterior. (Aumento original x400).

La Fig. 11 muestra fotografías que presentan la muerte de células apoptóticas detectada por TUNEL.

La Fig. 12 muestra fotografías que presentan la ultraestructura de las células corneales y la matriz celular de colágeno por microscopía electrónica de transmisión.

La Fig. 13 muestra fotografías que presentan la ultraestructura de las células endoteliales corneales por microscopía electrónica de exploración.

La Fig. 14 muestra fotografías que ilustran la CCC asistido por el ABG.

#### **Descripción detallada de la invención**

Como se ha descrito anteriormente, la evaluación se centró en proporcionar un colorante para la coloración de una membrana oftálmica, como alternativa a los colorantes utilizados habitualmente, tales como el VIC o el AT. Así, tal

como se expone a continuación, se combinaron una serie de características, y se obtuvo una composición colorante que posee una elevada afinidad colorante y un alto nivel de seguridad.

5 Un aspecto de la presente invención se dirige a una composición colorante como se define en las reivindicaciones para colorear una membrana oftálmica cuando se procede a la retirada de la membrana oftálmica, caracterizada porque dicha composición colorante comprende, como componente primario, el Azul Brillante G (ABG), una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un hidrato suyo.

10 La estereoestructura preferida del ABG de la presente invención son cuerpos ópticamente activos que tienen la estructura absoluta, pero el ABG de la presente invención puede estar presente en forma de enantiómeros o mezclas de los mismos, tales como cuerpos racémicos. Así pues, el ABG de la presente invención incluye todos los cuerpos ópticamente activos, las mezclas enantioméricas, tales como cuerpos racémicos y las mezclas diaestereoméricas del ABG.

15 Entre los ejemplos de la sal farmacéuticamente aceptable se incluyen las sales formadas con bases inorgánicas, amoniaco, bases orgánicas, ácidos inorgánicos, ácidos orgánicos, aminoácidos básicos, iones de halógenos o similares, así como sales moleculares internas. Entre los ejemplos de la base inorgánica se incluyen el metal alcalino (por ejemplo Na, K) y el metal alcalinotérreo (por ejemplo Ca, Mg). Ejemplos de la base orgánica incluyen la trimetilamina, trietilamina, colina, procaína, etanolamina y similares. Ejemplos del ácido inorgánico son ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares. Entre los ejemplos del ácido orgánico incluyen el p-toluensulfónico, el ácido metanesulfónico, el ácido fórmico, el ácido trifluoroacético, el ácido maléico, y similares. Ejemplos de los aminoácidos básicos son la lisina, arginina, ornitina, histidina, y similares. El compuesto podría ser un hidrato farmacéuticamente aceptable.

25 El ABG, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un hidrato suyo, especialmente ABG, puede adquirirse y fabricarse mediante el conocimiento común de química orgánica. También, pueden fabricarse mediante el procedimiento descrito en la memoria de la patente de los Estados Unidos número 6.057.160.

30 A continuación se describirá una realización de la presente invención utilizándose ejemplos prácticos y dibujos.

En primer lugar, se utilizaron todos los colorantes, incluidos los que actualmente no se usan para organismos, cribándose a continuación para encontrar los colorantes candidatos. Los colorantes cribados son el azul de Evans, el azul Ácido 9, el verde Fijo, el Azul Brillante FCF, Indigo-carmine, el azul de metilo, el azul de metileno y el Azul Brillante G (ABG). Las condiciones del cribado se centraron en particular en la seguridad y la afinidad de la coloración. Entre algunos de los principales candidatos, fueron retirados los que mostraban superioridad en cuanto a la seguridad pero incapacidad de colorear el objeto diana o, por el contrario, los que presentaban una buena coloración pero eran virulentos para la retina. Se efectuaron evaluaciones de seguridad, de los mejores colorantes elegidos, con el uso de ratas y, de acuerdo con su excelente afinidad de coloración y de seguridad, el candidato final fue el ABG. A continuación se describe con más detalle las razones por las que el ABG pasó a ser el candidato final para la presente invención.

45 En primer lugar, las cualidades de coloración del ABG, cuando se comparan con las del VIC, eran muy similares, ya que pueden colorear un objeto-blanco a concentraciones muy bajas (1/10 - 1/20). Incluso después del examen de soluciones a concentraciones muy elevadas que quedaban en la zona intraocular, no pudo demostrarse ningún carácter en cuanto a una clara toxicidad al ojo. Además, dado que el ABG (al contrario que el VIC) no es un colorante fluorescente, se considera que es prácticamente inexistente la fototoxicidad para la retina que se cree que tiene lugar debido a la iluminación intraocular como consecuencia de una elevada iluminancia. Además, la persistencia del colorante en la superficie tisular después de limpieza fue muy baja comparada con el VIC. Por otra parte, dado que el ABG es un colorante del tipo de color frío, siendo los tejidos intraoculares del tipo de color cálido, se puede reforzar el contraste del colorante.

50 A continuación, se efectuaron diferentes experimentos para evaluar las condiciones óptimas de una composición colorante que contiene ABG para colorear una membrana oftálmica. Además, el ABG no se ha utilizado hasta ahora clínicamente, sobre todo en seres humanos. No obstante, dadas las condiciones óptimas de la presente invención, puede proporcionarse una composición, que es al mismo tiempo segura, y con una elevada afinidad de coloración para uso clínico.

55 En consecuencia, según el primer aspecto principal de la presente invención, se proporciona una composición colorante como se define en las reivindicaciones que tiene el ABG como componente principal, para colorear una membrana oftálmica cuando se procede a la retirada de la membrana oftálmica.

60 Según una realización preferida de la invención, dicha composición colorante puede utilizarse como coadyuvante quirúrgico en intervenciones oftálmicas relacionadas con enfermedades de los ojos tales como, por ejemplo, la enfermedad vítreo-retiniana, el orificio macular, el desprendimiento de retina debido a orificio macular himiópico, la membrana epirretiniana, la retinopatía diabética proliferativa, el edema macular diabético y la viterorretinopatía

proliferativa, y cataratas específicas tales como la catarata hipermadura y la catarata congénita, al igual que el trasplante corneal de espesor dividido, etc. Según la composición colorante la presente invención, se hace posible verificar más claramente las membranas oftálmicas de difícil observación y mejorar la seguridad durante las operaciones quirúrgicas.

5 En otra realización preferida de la presente invención, dicha composición colorante puede utilizarse para colorear una membrana oftálmica y, más preferentemente, para colorear la membrana limitadora interna y/o la cápsula anterior. Una vez más, según una realización de la presente invención, la composición colorante de la presente invención puede combinarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Puede prepararse en forma de conjunto con una solución disolvente y fármacos en polvo, o como solución que llena una jeringa, así como en solución en estado de gel combinada con un ácido hialurónico. Más preferentemente, se prepara en la forma de solución, pero no es preciso limitarse a esta forma.

10 En una realización de la presente invención, dicha composición colorante se prepara como solución farmacéuticamente aceptable, aunque no es preciso limitarse necesariamente a la misma. Esto se debe a las cualidades del ABG, puesto que puede disolverse directa y fácilmente en una solución intraocular de limpieza, y puede esterilizarse con el filtro de la jeringa.

15 Además, según una realización de la presente invención, dicha composición colorante se prepara en forma de solución, disolviéndose en una solución de riego intraocular, una solución salina equilibrada (SSE), una solución fisiológica salina o, más preferentemente, la conocida como OPEGUARD -MA (Senjyu Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japón) que es una solución de riego intraocular (solución intraocular de limpieza). No obstante, no es necesario que se limite a dicha forma.

20 En una realización preferida de la presente invención, la composición colorante de la presente invención contiene ABG a una concentración de 0,1 - 10 mg/ml, preferentemente a una concentración de 0,1 - 1,0 mg/ml y, más preferentemente, a una concentración de 0,1 - 0,25 mg/ml. En un ejemplo práctico de la presente invención, en dicha composición colorante, la concentración de ABG necesaria para colorear la MLI de primates, es aproximadamente 1/10 si se compara con el VIC. Además, para colorear la cápsula anterior, el ABG de dicha composición colorante puede proporcionar una coloración satisfactoria con una baja concentración de 0,25 mg/ml, comparado con el VIC que requiere 5 mg/ml y el AT que exige 1 mg/ml. En otras palabras, según esta realización, se puede proporcionar una composición colorante que tiene una elevada afinidad a la coloración a bajas concentraciones y pequeñas cantidades.

25 Además, según una realización de la presente invención, es preferible que la composición colorante tenga una presión osmótica de alrededor de 298 mOsm. Según esta realización, la composición colorante de la presente invención presenta una presión osmótica equivalente a la de una solución fisiológica salina. Se ha descrito anteriormente que los defectos en el epitelio del pigmento retiniano con el VIC, podrían deberse posiblemente a la hiposmolalidad de su solución. A este respecto, la composición colorante de una realización de la presente invención tiene efectos superiores, dado que no ocurren los defectos debidos a diferencias de la presión osmótica en el epitelio del pigmento retiniano - que son trastornos tisulares relacionados con las dilataciones o deshidratación de las células (tales como la falta de células o su muerte) -.

30 En una realización preferida de la presente invención, es conveniente que la composición colorante de la misma tenga un pH neutro, es decir, un pH cercano a 7,4.

35 Según el segundo aspecto principal de la presente invención, se proporciona una composición para su uso en un procedimiento de coloración y retirada de una membrana oftálmica que incluye los pasos para preparar una composición colorante que tiene el ABG como componente principal; colorear la membrana oftálmica utilizándose una concentración predeterminada de dicha composición colorante; y retirar la membrana oftálmica coloreada.

40 Para una realización de la presente invención, el citado uso para colorear la membrana oftálmica puede utilizar un procedimiento que conoce fácilmente una persona docta en la materia, por ejemplo, inyección, infusión, irrigación, confirmación y desprendimiento. En un ejemplo práctico de la presente invención, es preferible que el citado uso para colorear una membrana oftálmica utilice la inyección de dicha composición colorante. Con este ejemplo práctico, no es necesario un paso adicional, como es el intercambio de fluidos-gases, que se necesita cuando se aplica el AT a una membrana oftálmica. Por ejemplo, es posible simplemente colorear en el momento de su uso durante la cirugía oftálmica.

45 Además, según el tercer aspecto principal de la presente invención, se proporciona el uso del ABG como coadyuvante quirúrgico para intervenciones oftálmicas.

50 Además, en la presente invención, dicha composición colorante y/o su uso en un procedimiento de coloración, es empleado como parte de intervenciones oftálmicas. Según una realización preferida de la presente invención, dichas intervenciones oftálmicas son cirugías para tratar el orificio macular, el desprendimiento de retina debido a orificio macular himiópico, la membrana epirretiniana, la retinopatía diabética proliferativa, el edema macular diabético y la

viterorretinopatía proliferativa, cataratas específicas tales como la catarata hipermadura y la catarata congénita, al igual que el trasplante corneal de espesor dividido, etc. y, más preferentemente, enfermedades vítreo-retinianas (en particular el orificio macula o membranas epirretinianas (MERs) ) y cataratas.

- 5 Además, con una realización preferida de la presente invención, las citadas intervenciones oftálmicas pueden efectuarse en los ojos de los mamíferos y, más preferentemente, en los ojos de los humanos.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir la invención con mayor detalle.

10 **Ejemplo 1**

Cribado de diferentes colorantes como candidatos, centrándose en su seguridad y capacidad para colorear membranas

- 15 A fin de proporcionar una composición colorante que alcance dichos objetivos, se utilizaron todos los colorantes, incluidos los que actualmente no se usan para organismos, cribándose a continuación para encontrar los colorantes candidatos. Los colorantes cribados son el azul de Evans, el azul Ácido 9, el verde Fijo, el Azul Brillante FCF, Indigo-carmine, el azul de metilo, el azul de metileno y el Azul Brillante G (ABG). Además, como condiciones de cribado, se observaron en particular la seguridad y la afinidad de la coloración.

- 20 Entre algunos de los principales candidatos, fueron retirados los que mostraban superioridad en cuanto a la seguridad pero incapacidad de colorear el objeto diana o, por el contrario, los que presentaban una buena coloración pero eran virulentos para la retina.

- 25 Se efectuaron evaluaciones de seguridad, de los mejores colorantes elegidos, con el uso de ratas. Basándose en su excelente afinidad de coloración y de seguridad, el candidato final fue el ABG.

- 30 A continuación, a fin de examinar las condiciones óptimas de una composición colorante que contiene ABG para colorear una membrana oftálmica, se efectuaron diferentes experimentos. De ese modo, se obtuvo la composición colorante de la presente invención.

**Ejemplo 2**

2. Efectos para la retina del ABG intravítreo

- 35 Todos los procedimientos cumplieron la declaración de la Asociación para Investigación en la Visión y Oftalmológica (AIVO) para el Uso de Animales en Investigación Oftálmica y de la Visión así como las directrices para el cuidado de animales de la Universidad de Kyushu, Fukuoka, Japón.

40 2.1 Caracterización de la solución de ABG

- El ABG es también conocido Azul Ácido 90 y Azul Brillante Coomassie G. Aparte de nuestra publicación anterior, no existen informes sobre la investigación de la toxicidad del ABG para uso oftálmico. La Tabla 1 muestra la osmolalidad y el pH de la solución de ABG a diferentes concentraciones. Se observó que la osmolalidad y el pH del ABG eran similares a los de las soluciones de irrigación intraocular.

TABLA 1

Solución	Osmolalidad (mOsm/KgH <sub>2</sub> O)	pH
Control	298	7,33
ABG 10mg/ml	310	7,41
ABG 1,0mg/ml	300	7,42
ABG 0,1mg/ml	298	7,41
ABG 0,01mg/ml	298	7,41
Solución salina	285	7,4
BSS plus (marca comercial registrada)	305	7,1
El control muestra OPEGUARD® - MA.		

## 2.2 Procedimiento quirúrgico para el ABG intravítreo en ojos de rata

Unas ratas marrones de Noruega (n = 78 machos, de 8 semanas de edad, Kyudo, Fukuoka, Japón) fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal de clorhidrato de ketamina a una dosis de 75 mg/kg de peso corporal. Un ojo de cada animal (con un total de n = 6 por grupo de dosis) fue vitrectomizado con el uso de 0,05 ml de gas SF<sub>6</sub> puro, como se ha descrito anteriormente. Después de la inyección de gas, se inyectaron en la cavidad vítrea de cada ojo vitrectomizado 0,05 ml de solución ABG, con el uso de un microscopio para mejorar el aumento durante la intervención. Se preparó la solución de ABG (Azul Brillante G, azul brillante G 250 Coomassie (marca comercial registrada); Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) a concentraciones de 0,01, 0,1, 1,0, y 10 mg/ml utilizándose dilución en solución de riego intraocular (OPEGUARD (marca registrada) -MA, Senjyu Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka, Japón), y se esterilizó a través de un filtro de jeringa de 0,22 µm. Se determinó la osmolalidad media con el uso de un medidor de presión osmótica (OSMO STATION, Arkray, Kyoto, Japón) y se calculó el pH de cada solución para todas las concentraciones preparadas (Tabla 1). La concentración final se calculó de acuerdo con la solución de VIC utilizada en vitrectomías en humanos (2,5-5,0 mg/ml), a fin de administrar a la rata una dosis segura de ABG que produjera al mismo tiempo una buena coloración. Como controles se utilizaron veinticuatro ojos falsamente operados (a los que se inyectó SF<sub>6</sub> seguido por 0,05 ml de solución de riego intraocular).

## 2.3 Microscopía óptica

Los ojos fueron enucleados y fijados en paraformaldehído al 10% el día 14 (n = 30; 6 por grupo de dosis y de control) y a los 2 meses (n = 30, 6 por dosis y grupo de control) postoperatoriamente. Se cortaron ojos completos siguiéndose aproximadamente el meridiano vertical. Unas secciones empapadas en parafina se colorearon con hematoxilina-eosina (HE) y se examinó cada sección utilizando un microscopio óptico.

Después de inyección intravítrea de ABG, no se observó, por microscopía quirúrgica, efecto tóxico alguno del ABG, tales como edema corneal, edema retiniano grave o endoftalmitis, durante un período de dos meses. Los ojos se enuclearon el día 14 y 2 meses después de la intervención. La estructura normal de la retina quedaba preservada en los ojos a los que se inyectó las dosis más elevadas de ABG (10 mg/ml) cuando se observaron tanto el día 14 como a los 2 meses. Además, no se observó ninguna infiltración de células inflamatorias. (Fig. 1, día 14). La estructura normal de la retina se conservó igualmente en los grupos a los que se inyectaron dosis menores de ABG y no se observaron signos de degeneración celular de las secciones, tanto en el día 14 como a los 2 meses.

## 2.4 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Los ojos fueron enucleados en el día 14 y a los 2 meses después de la operación, fijándose en paraformaldehído al 1%, y glutaraldehído al 1%, en PBS. Las muestras fueron posteriormente fijadas en el tampón de acetato de veronal en tetróxido de osmio (2%), se deshidrataron en etanol y agua, y se empaparon en Epon. De los bloques se cortaron secciones ultrafinas, que se montaron en rejillas de cobre. Se observaron las muestras con un microscopio electrónico JEM 100CX (JEOL, Tokio).

Algunas muestras a las que se inyectó la dosis más alta de ABG (10 mg/ml) mostraron vacuolización en las células ganglionares y en los procesos de las células de Müller de las fibras nerviosas, tanto en el día 14 (Fig. 2A, día 14) como a los 2 meses. Aunque estos mismos cambios se hallaron también en el grupo al que se inyectó 1 mg/ml de ABG, el grado de vacuolización fue inferior que en el grupo de 10 mg/ml (Fig. 2B). Ni en los grupos que recibieron dosis inferiores ni en los controles se observó vacuolización alguna. Entre todos los grupos, no se observaron cambios dignos de mención en la retina, incluidas las capas de células nucleares internas, nucleares externas, y epiteliales del pigmento retiniano.

## 2.5 Etiquetado del Extremo de la Entalla del Terminal TdT-dUTO (TUNNEL)

Con el uso del Etiquetado del Extremo de la Entalla del Terminal TdT-dUTO (TUNNEL) se detectó la muerte de células apoptóticas, como se ha descrito anteriormente. Para obtener secciones de 4-µm a partir de muestras fijadas en paraformaldehído al 4% y empapadas en parafina, se utilizó un criostato. La coloración TUNNEL se realizó con el Kit de Detección Directa de Apoptosis *in situ* con Fluoresceína ApopTag® (Intergen Company, Nueva York, EE.UU.) siguiéndose el protocolo del fabricante. Las secciones se colorearon simultáneamente con yoduro de propidio (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.), permitiéndose así la observación de los núcleos de las células a través de un microscopio de fluorescencia (Olympus, Tokio). Se seleccionaron aleatoriamente diez secciones de cada muestra de ojo, observándose con el uso del microscopio.

En el grupo al que se administró las dosis más elevadas de ABG (10 mg/ml), se observó entre las diez secciones un caso de muerte de células apoptóticas. Sin embargo, la proporción de células apoptóticas no fue significativamente diferente de lo que se observó en las secciones de control (Fig. 3, día 14). A los grupos a los que se inyectaron las dosis inferiores de ABG, no se observó coloración en TUNNEL en la retina en el día 14. Además, al cabo de 2 meses, las células retinianas de todos los grupos de dosis de ABG no habían sufrido ninguna muerte de células apoptóticas.

## 2.6 Electrorretinografía

Después de una inyección de gas, se inyectaron en la cavidad vítrea 0,05 ml de solución ABG (1 mg/ml y 10 mg/ml) o una solución de riego intraocular. Se estudiaron seis ratas de cada grupo de dosis y seis controles. Se confirmó la ausencia de cataratas en todas las ratas antes de efectuarse las mediciones. A los catorce días, así como dos meses más tarde, se mantuvieron a las ratas en una sala oscura durante una noche, con sólo una leve iluminación roja, anestesiándose con una inyección intraperitoneal de 15 µl/g de peso corporal de una solución salina que contenía ketamina (1 mg/ml), xilazina (0,4 mg/ml), y uretano (40 mg/ml). A continuación se efectuó la electroretinografía (ERG) como se ha descrito previamente. Las pupilas se dilataron con gotas de fenilefrina HCl al 2,5% y tropicamida al 1%, hasta que se alcanzó la dilatación máxima antes registrarse del ERG. Se anestesió la córnea con gotas de proparacaína HCl al 1% colocándose acto seguido las ratas sobre una almohadilla térmica durante el experimento. Sobre la córnea se colocó un electrodo de alambre, recubierto con metilcelulosa al 1%, para registrar las ERGs. Como electrodo de referencia, se utilizó un electrodo de alambre similar colocado en la boca, al tiempo que se puso a tierra un electrodo de aguja en la cola. Las respuestas se amplificaron diferencialmente, (de 0,8 a 1.200 Hz), se promediaron, y se almacenaron con el uso de un ordenador. Se presentaron destellos estroboscópicos blancos (xenón) en un estimulador de Ganzfeld (VPA-10; Cadwell, Kennewick, Washington, EE.UU.) contra un campo acromático de adaptación. Se registraron las ERGs adaptadas a la oscuridad (mediadas con varilla) en primer lugar para verificar la estabilidad de la respuesta a ambas intensidades. A continuación, se adaptó cada rata a una luminancia de fondo oscuro durante 20 minutos, período suficiente para alcanzar un nivel estable de respuesta. Posteriormente, se obtuvieron ERG adaptadas a la oscuridad *a* (mediadas con varilla) y adaptadas a la oscuridad *b* (bipolares y mediadas con células de Müller) a una luminancia de destello de 1,30 log cd seg/m<sup>2</sup>. Después de sacó la media de las respuestas a cinco destellos sucesivos con un intervalo entre los estímulos de 1 min. a fin de establecer las respuestas adaptadas a la oscuridad. A continuación se expusieron las ratas a un campo de luz de adaptación blanca (1,50 log cd/m<sup>2</sup>) durante un mínimo de 25 minutos, obteniéndose a continuación ERG adaptadas a la luz *b* (mediadas con conos) a una luminancia del destello de 1,30 log cd seg/m<sup>2</sup> (estado de sensibilizado de los bastoncillos en ratas). Se sacó la medida de las respuestas a 50 destellos sucesivos efectuados a 2 Hz. Se evaluaron los resultados de la amplitud de las ERGs con el uso del test *t* de Student, considerándose estadísticamente significativo un valor de *p* de < 0,05.

La figura 4A representa las formas de ondas de las ERG en la oscuridad y adaptadas a la luz de las respuestas de los grupos de control y de dosis elevada en el día 14. Las amplitudes de las respuestas adaptadas a la oscuridad, obtenidas al comienzo de los experimentos, mostraron una escasa variabilidad entre los grupos. Aunque en los grupos que recibieron las dosis elevadas se observó en el día 14 una ligera reducción de la amplitud máxima media de las ondas a adaptadas a la oscuridad (Fig. 4B, día 14), de manera dependiente de la dosis, no se observó ninguna diferencia significativa en la amplitud máxima de las ondas en comparación con los controles (10 mg/ml: *p* = 0,054 y 1,0 mg/ml: *p* = 0,063; test de la *t*). Por otra parte, las ERG de las ondas *b* adaptadas a la oscuridad (10 mg/ml: *p* = 0,553 y 1,0 mg/ml: *p* = 0,508; ensayo *t*) y las ondas *b* adaptadas a la luz (10 mg/ml: *p* = 0,451 y 1,0 mg/ml: *p* = 0,550; ensayo *t*) no mostraron ninguna reducción digna de mención, sin que se produjera diferencia estadística significativa entre las amplitudes (Fig. 4B, día 14). Al cabo de 2 meses, se registraron las ERGs de los mismos grupos de dosis (1,0 mg/ml y 10 mg/ml), comprobándose que la reducción de la amplitud de las ondas adaptadas a la oscuridad se recuperaban de manera similar a lo que ocurría en el grupo de control.

## 2.7 Coloración de la MLI por ABG en ojos de primates

Dado que, en los ojos de rata, es imposible el desprendimiento de la MLI, los inventores examinaron la capacidad de la ABG de colorear la MLI en ojos de primates. En este estudio se utilizaron dos ojos de dos monos *cynomolgus* de 3 años de edad. Los animales fueron confinados en una jaula de sujeción y se les inyectó en el muslo, por vía intramuscular, 20 mg/kg de clorhidrato de ketamina (Sankyo Yell Pharmaceutics Products Co. Ltd., Japón) para anestesia general. Posteriormente los monos fueron trasladados a un quirófano. La intervención consistió en una vitrectomía estándar de la *pars plana* y de tres orificios, provocándose un desprendimiento vítreo posterior por aspiración con una cuchilla de vitrectomía, utilizándose una inyección triamcinolona-acetomida para visualización vítrea.

Se disolvieron diez miligramos de ABG en 20 ml de solución de riego intraocular, esterilizándose con un filtro de jeringa. La concentración final de ABG fue de 0,5 mg/ml. A continuación, se inyectó lentamente la solución preparada de ABG (0,5 ml) en la cavidad vítrea y se lavó de inmediato con solución salina equilibrada (BSS plus (marca registrada), Santen, Osaka, Japón). Se realizó la retirada de la MLI con el uso de fórceps de MLI. Posteriormente se retiraron los instrumentos y se cerraron los orificios de esclerotomía con el uso de suturas de poligalatina 7-0. Los exámenes postoperatorios incluyeron microscopía con lámpara de hendidura y oftalmoscopia en los días 1, 3 y 14. El día 14 se realizó una angiografía de fluoresceína.

Después de irrigación de la cavidad vítrea, la MLI se coloreó con un color azul claro. El borde y el colgajo de la MLI se mantuvieron claramente visibles durante el desprendimiento de la MLI (Fig. 5A). La zona circular situada debajo de la MLI fue claramente visible después del desprendimiento de la misma (Fig. 5B).

Postoperatoriamente, durante la microscopía de lámpara de hendidura y los exámenes oftalmoscópicos del día 14, no se observaron efectos tóxicos del ABG, tales como edema corneal, grave edema retiniano ni endoftalmitis. La angiografía con fluoresceína puso igualmente de relieve que la ABG no había producido a los 14 días ningún daño retiniano visible (Fig. 5C). Los exámenes oftalmoscópicos posteriores no mostraron ningún otro cambio en la retina durante el período de seguimiento de seis meses.

### Ejemplo 3

#### 3. Serie de casos clínico quirúrgicos con ABG como solución colorante potencial para el desprendimiento de membrana

La coloración con verde de indocianina (VIC) y Azul de Tripano (AT) ha facilitado notablemente el desprendimiento de la MLI en diversas enfermedades vítreo-retinianas. Sin embargo, se han publicado recientemente numerosos informes en relación con el daño a la retina provocado por el VIC y el AT, tanto en experimentos como en uso clínico.

A partir del estudio pre-clínico, se seleccionó el ABG como colorante candidato para coloración de la MLI. Al parecer, esta es la primera investigación clínica del ABG en el ojo humano. Esta es la primera investigación clínica conocida del ABG en el ojo humano.

#### 3.1. Uso del ABG en la coloración de la MLI y efectos y seguridad en el ojo humano (primer intento)

Entre agosto y septiembre de 2004, se reclutaron de la unidad de pacientes ambulatorios del Hospital Universitario de Kyushu (Fukuoka, Japón), dieciséis ojos de 16 pacientes con un orificio macular (OM) y membranas epirretinianas (MER). Se excluyó a los pacientes con enfermedades oculares, tales como glaucoma, uveítis, y trastorno corneal. En la Tabla 1 se presentan los datos de los pacientes. Este estudio se efectuó con la aprobación del Comité de Ética Institucional apropiado, ejecutándose de acuerdo con las normas éticas dispuestas en la Declaración de Helsinki de 1989. Antes de la intervención quirúrgica, se expusieron a los pacientes las posibles ventajas y riesgos del presente tratamiento, obteniéndose el consentimiento informado de todos los pacientes. La intervención consistió en una vitrectomía de la *pars plana* y de tres orificios, provocándose un desprendimiento vítreo posterior por aspiración con una cuchilla de vitrectomía, utilizándose triamcinorona. Se disolvieron veinte miligramos de ABG (Azul brillante G 250; Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) en 10 ml de solución de riego intraocular (OPEGUARD (marca registrada) -MA, Senjyu Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japón), esterilizándose con un filtro de jeringa (Minisart (marca registrada) Sartorius AG, Goettingen, Alemania). La concentración final de ABG fue de 0,25 mg/ml. A continuación, se inyectó lentamente la solución preparada de ABG (289 mOsm, pH = 7,44) en la cavidad vítrea y se lavó inmediatamente con una solución salina equilibrada (BSS plus (marca registrada), Santen, Osaka, Japón). La MLI quedó coloreada con un color azul claro. Se realizó la retirada de la MLI utilizando fórceps de MLI (D.O.R.C.; Dutch Ophthalmic Research Center International b.v., Holanda). No obstante, la coloración de las MERS no pudo confirmarse en esta concentración.

Los exámenes postoperatorios incluyeron microscopía con lámpara de hendidura, oftalmoscopia, mejor agudeza visual corregida (MAVC) y presión intraocular. Se evaluó el campo visual con el Analizador de Campo de Humphrey II (Humphrey Systems, Dublín, California, EE.UU.) al cabo de 2 meses.

El procedimiento quirúrgico se completó satisfactoriamente. En todos los casos se recuperó la agudeza visual. Ninguno de los pacientes presentó una elevación de la presión intraocular. No se observó ninguna reducción visible de la intensidad ni defecto en el campo visual. Dentro del período de observación no se observaron otros efectos perjudiciales debidos al ABG. (Tabla 2).

Tabla 2

Caso	enfermedad	Edad	Sexo	MAVC Preop.	MAVC Postop.	Desprendimiento de la MLI	Estado Preop. del Cristalino	Seguimiento (meses)	Estado Retiniano Postop.	Elevación Postop. de la PIO	Defecto Postop. del CV	Estado Postop. del Cristalino	Complicaciones
1	OM estadio 3	58	F	20/63	20/20	+	Fáquico	4	OM cerrado	-	-	LIO	Ninguna
2	OM estadio 4	77	M	20/200	20/63	+	Fáquico	3	OM cerrado	-	-	LIO	Ninguna
3	OM estadio 3	57	F	20/50	20/50	+	Fáquico	2	OM cerrado	-	-	LIO	Ninguna
4	OM estadio 2	62	F	20/100	20/25	+	Fáquico	2	OM cerrado	-	-	LIO	Ninguna
5	OM estadio 3	68	M	10/100	20/50	+	Fáquico	2	OM cerrado	-	-	LIO	Desprendimiento Retiniano Periférico
6	OM estadio 4	79	M	20/80	20/63	+	LIO	2	OM cerrado	-	-	LIO	Desprendimiento Retiniano Periférico
7	OM estadio 3	78	M	20/125	20/25	+	Fáquico	2	OM cerrado	-	-	LIO	Ninguna
8	OM estadio 3	63	F	20/50	20/32	+	Fáquico	2	OM cerrado	-	-	LIO	Ninguna
9	OM estadio 2	64	F	20/63	20/32	+	Fáquico	2	OM cerrado	-	-	LIO	Ninguna
10	MER (secundaria)	33	M	20/63	20/32	+	LIO	2	Piingue (-)	-	-	LIO	Ninguna
11	MER (primaria)	85	M	20/40	20/32	+	Fáquico	2	Quiste Macular (+)	-	-	LIO	Ninguna
12	MER (primaria)	72	F	20/63	20/40	+	Fáquico	2	Piingue (-)	-	-	LIO	Ninguna
13	MER (primaria)	85	M	20/63	20/40	+	Fáquico	4	Piingue (-)	-	-	LIO	Hemorragia Vítrea
14	MER (primaria)	66	F	20/40	20/12,5		Fáquico	4	Piingue (-)	-	-	LIO	Ninguna
15	MER (primaria)	72	M	20/40	20/16	+	Fáquico	3	Piingue (-)	-	-	LIO	Ninguna
16	MER (primaria)	63	F	20/63	20/40	+	Fáquico	3	Piingue (-)	-	-	LIO	ninguna

Abreviaciones de la Tabla 2

OM: Orificio Macular - MER: Membrana Epirretiniana - MAVC: Mejor Agudeza Visual Corregida - Preop.: Preoperatorio - Postop.: Postoperatorio - LIO: Lente Intraocular - PIO: Presión Intraocular - CV: Campo Visual

### 3.2 Uso del ABG en la coloración de la MLI y los efectos y seguridad en ojos de seres humanos (segundo intento)

Los inventores han continuado investigando el caso clínico, y obtuvieron los resultados siguientes.

5 Entre agosto y noviembre de 2004 se realizó vitrectomía con retirada de las membranas, con el uso de la solución colorante ABG, a veinte ojos de 20 pacientes consecutivos que presentaban orificio macular (OM: diez ojos de 10 pacientes; 5 hombres y 5 mujeres) o con membrana epirretinal (MER: diez ojos de 10 pacientes, 5 hombres y 5 mujeres). Se excluyó a los pacientes con enfermedades oculares, tales como glaucoma, retinopatía diabética, uveítis, y trastorno corneal. La edad media  $\pm$  DT de los pacientes fue de  $67 \pm 11,9$  años, con un rango de 33 a 85 años. El período medio de seguimiento fue  $7,3 \pm 1,0$  meses. Los detalles de los pacientes aparecen en la Tabla 3 y 4. Los exámenes oftálmicos preoperatorios y postoperatorios incluyeron microscopía con lámpara de hendidura, oftalmoscopia, mejor agudeza visual corregida (MAVC) y presión intraocular (PIO). El cierre del OM y la medición del espesor de la fovea (casos de MER) se determinó mediante tomografía de coherencia óptica (OCT3: Humphrey Instruments, San Leandro, CA, EE.UU.). Se calculó el espesor de la fovea a partir de un total de 4 escáneres.

15 Se enviaron muestras extraídas de 4 ojos (2 ojos de pacientes de OM y 2 ojos de pacientes de MER) para microscopía electrónica de transmisión, a fin de verificar la presencia de la MLI. Las muestras fueron posteriormente fijadas en el tampón de acetato de veronal en tetróxido de osmio (2%), se deshidrataron en etanol y agua, y se empaparon en Epon. De los bloques se cortaron secciones ultrafinas, que se montaron en rejillas de cobre. Se observaron las muestras con un microscopio electrónico JEM 100CX (JEOL, Tokio).

20 Este estudio se efectuó con la aprobación del Comité de Ética Institucional apropiado, ejecutándose de acuerdo con las normas éticas dispuestas en la Declaración de Helsinki de 1989. Antes de la intervención quirúrgica, se expusieron a los pacientes las posibles ventajas y riesgos del presente tratamiento, obteniéndose el consentimiento informado de todos los pacientes.

25 Cuando fue preciso se efectuó la facoemulsificación estándar. La intervención consistió en una vitrectomía de la *pars plana* y de tres orificios, con inducción de un desprendimiento vítreo posterior (DVP) por aspiración con una cuchilla de vitrectomía, utilizándose una inyección de triamcinolona-acetomida (Kenakolt-A® Bristol Phramaceuticals KK, Tokio, Japón) en la medida necesaria. Se disolvió ABG (Azul brillante G 250; Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) en solución de riego intraocular (OPEGUARD®-MA, Senju Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japón). Se esterilizó la solución con un filtro de jeringa de  $0,22 \mu\text{m}$ . La concentración final de ABG fue de  $0,25 \text{ mg/ml}$  ( $289 \text{ mOsm}$ ,  $\text{pH} = 7,44$ ). A continuación, se inyectó lentamente la solución preparada de ABG ( $0,5 \text{ ml}$ ) en la cavidad vítreo (Fig. 6A) y se lavó inmediatamente con una solución salina equilibrada (BSS plus (marca registrada), Santen, Osaka, Japón). En los casos de OM, la MLI quedó coloreada instantáneamente con un color azul brillante. Se realizó la retirada de la MLI utilizando fórceps de MLI (Fig. 6B, C). Después de la retirada de la MLI, fue claramente visible (Fig. 6D) la diferencia en el color de la superficie retiniana entre la zona de la cual se había retirado la MLI y el área circundante. No obstante, en los casos de MER, la coloración de la MER no pudo confirmarse a esta concentración (Fig. 7A). Después de desprendimiento de la MER (Fig. 7B), se inyectó de nuevo la solución de ABG, seguida por el riego inmediato de la cavidad vítreo. La MLI de la zona donde se había retirado la MLI se coloreó bien con ABG (Fig. 7C). Sin embargo, no se coloreó la zona en la que quedaban restos de MER y del humor vítreo posterior. La MLI coloreada pudo retirarse fácilmente con los restos no coloreados de MER y de humor vítreo posterior (Fig. 7D).

40 Por último, se insertaron en todos los casos lentes intraoculares. En los casos de OM, se efectuó el intercambio fluido-gas, sustituyéndose con gas de hexafluoruro de azufre al 15%. Se aconsejó a los pacientes que mantuvieran durante una semana una postura con la cara hacia abajo.

45 Durante la intervención, se retiraron satisfactoriamente de los 20 ojos la MLI incluida la MER. Los exámenes en microscopía electrónica de transmisión confirmaron la presencia de la MLI en todas las muestras procesadas ( $n = 4$ ) (Fig. 8). Postoperatoriamente, hacia el día 14, no se observó, por microscopía de lámpara de hendidura y exámenes oftalmoscópicos, ninguna toxicidad grave provocada por el inyectado de ABG, tal como edema corneal, grave edema retiniano grave o grave inflamación intraocular como por ejemplo endoftalmítis.

50 Todos los casos de OM se cerraron del todo anatómicamente con exámenes tanto oftalmoscópicos como con OCT. La MAVC media preoperatoria fue de  $20/100$  (rango;  $20/200$ - $20/50$ ). La MAVC medida postoperatoria fue de  $20/32$  (rango;  $20/200$ - $20/20$ ). La agudeza visual mejoró en 9 ojos (90%) en 2 o más líneas de Snellen y no se modificó en un ojo. En dos casos, las complicaciones incluyeron desprendimientos retinianos periféricos iatrogénicos, que fueron tratados intraoperatoriamente por fotocoagulación endolaser. Sólo un caso de OM presentó una elevación de la PIO ( $26 \text{ mmHg}$ ) al cabo de 6 meses y siendo tratada con latanoprost. (Tabla 3).

55 En los casos de intervención de la MER, el espesor medio de la fovea de la retina, medido con OCT, disminuyó  $454,7 \pm 141,3 \mu\text{m}$  (preoperatoriamente) a  $249,4 \pm 71,3 \mu\text{m}$  (postoperatoriamente). La MAVC postoperatoria ( $20/100$ - $20/12,5$ ; media:  $20/32$ ) fue mejor que la MAVC preoperatoria ( $20/100$ - $20/40$ ; media:  $20/50$ ) en los casos de MER (Tabla 4). Ocho pacientes (80%) consiguieron una mejora de 2 o más líneas en la tabla de Snellen, mientras que la MAVC permaneció igual o mejoró en 1 línea en los otros dos pacientes. La única complicación fue la protracción de la

60

65

hemorragia vítrea en un caso, que fue absorbida después de observación. En todos los casos, durante el período de seguimiento, no se observó ningún otro efecto secundario, tal como atrofia del epitelio del pigmento retiniano (EPR).

Tabla 3

Caso No. /Edad.y /sexo	Estadio OM	MCAV Preop.	MAVC Postot.	Desprendimiento MLI	Estado Retiniano postop.	Estado Preop./postop. del Cristalino	Elevación Postop. de la PIO	Complicaciones	Seguimiento (meses)
1/58/F	3	20/63	20/20	+	OM cerrado	Fáquico/ LIO	-	Ninguna	9
2/77/M	4	20/200	20/200	+	OM cerrado	Fáquico/ LIO	-	Ninguna	8
3/57/F	3	20/50	20/32	+	OM cerrado	Fáquico/ LIO	-	Ninguna	7
4/62/F	2	20/100	20/25	+	OM cerrado	Fáquico/ LIO	-	Ninguna	7
5/68/M	3	20/100	20/40	+	OM cerrado	Fáquico/ LIO	-	Desprendimiento Retiniano Periférico	7
6/79/M	3	20/80	20/50	+	OM cerrado	LIO/ LIO	-	Desprendimiento Retiniano Periférico	7
7/78/M	3	20/125	20/25	+	OM cerrado	Fáquico/ LIO	-	Ninguna	7
8/63/F	3	20/50	20/20	+	OM cerrado	Fáquico/ LIO	-	Ninguna	7
9/64/F	2	20/63	20/25	+	OM cerrado	Fáquico/ LIO	-	Ninguna	7
10/73/M	4	20/200	20/50	+	OM cerrado	Fáquico/ LIO	-	Ninguna	6

Abreviaciones de la Tabla 3

OM: Orificio Macular – MAVC: Mejor Agudeza Visual Corregida – Preop.: Preoperatorio – Postop.: Postoperatorio – LIO: Lente Intraocular – PIO: Presión Intraocular

Tabla 4

Caso No. /Edad.y /sexo	Estadio OM	MAVC Preop.	MAVC Postot.	Desprendimiento MLI	Esesor Retiniano preop./postop. (µm)	Estado Preop./postop. del Cristalino	Elevación Postop. de la PIO	Complicaciones	Seguimiento (meses)
1/33/M	3	20/63	20/20	+	759/232	LIO/ LIO	-	Ninguna	9
2/85/M	4	20/200	20/200	+	441/248	Fáquico/ LIO	-	Ninguna	9
3/72/F	3	20/50	20/32	+	423/354	Fáquico/ LIO	-	Ninguna	8
4/85/M	2	20/100	20/25	+	478/266	Fáquico/ LIO	-	Hemorragia Vítrea	8
5/66/F	3	20/100	20/40	+	501/240	Fáquico/ LIO	-	Ninguna	7
6/72/M	3	20/80	20/50	+	417/190	Fáquico/ LIO	-	Ninguna	7
7/63/F	3	20/125	20/25	+	429/232	Fáquico/ LIO	-	Ninguna	7
8/69/F	3	20/50	20/20	+	556/382	Fáquico/ LIO	-	Ninguna	6
9/56/M	2	20/63	20/25	+	228/146	Fáquico/ LIO	-	Ninguna	6
10/60/F	4	20/200	20/50	+	315/204	LIO/ LIO	-	Ninguna	6

Abreviaciones de la Tabla 4

MER: Membrana Epirretiniana – OM: Orificio Macular – MAVC: Mejor Agudeza Visual Corregida – Preop.: Preoperatorio – Postop.: Postoperatorio –

LIO: Lente Intraocular – PIO: Presión Intraocular

**Ejemplo 4**4. Biocompatibilidad del ABG; estudio preclínico del ABG como coadyuvante para la coloración capsular5 4.1 Capacidad colorante capsular del ABG

Se evaluó la capacidad colorante capsular del ABG en ojos de cerdo con el uso de concentraciones graduadas del colorante.

10 Los ojos de cerdo se obtuvieron de un matadero local, y se transportaron al laboratorio en hielo. Se cortaron cuidadosamente los músculos extraoculares y otros tejidos conectivos, colocándose los ojos se colocaron en el quirófano. Se preparó la solución de ABG utilizándose el procedimiento siguiente. Se disolvieron veinte miligramos de ABG (Azul brillante G 250; Signa-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) en 10 ml de solución de riego intraocular (OPEGUARD (marca registrada) -MA, Senjyu Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japón), esterilizándose con un filtro de jeringa (Minisart. Sartorius AG, Goettingen, Alemania). Bajo el microscopio quirúrgico, se examinó la coloración capsular por ABG del modo siguiente. Se entró en la cámara anterior a través de la córnea transparente con una aguja de calibre 26 montada en una jeringa. Se inyectó ABG sobre la zona capsular anterior a través de una aguja calibre 26 introducida a través del mismo punto de entrada (10, 1, 0,5, 0,25, 0,1 y 0,01 mg/ml). Se regó inmediatamente la cámara anterior con una solución salina equilibrada mejorada (BSS plus (marca registrada), Santen, Osaka, Japón) lavándose fácilmente el exceso de colorante.

25 Para profundizar en la cámara anterior, se inyectó hialuronato sódico al 1% (Healon®, Pharmacia, Upsala, Suecia). Se inició un CCC preparándose un pequeño colgajo capsular anterior de forma triangular con una aguja desechable doblada de calibre 26, montada sobre una jeringa viscoelástica. Se completó la CCC utilizando quistótomo o fórceps de capsulorrexia.

30 El colorante coloreó de forma homogénea la cápsula anterior y, bajo el microscopio quirúrgico, se pudo observar claramente el borde de la CCC. La coloración se profundizó a medida que se aumentó la concentración del colorante (0,25 mg/ml a 1 mg/ml, Fig. 9), comprobándose que la concentración mínima necesaria para producir una coloración de calidad excelente con una clara visualización era de 0,25 mg/ml (Fig. 9, arriba a la derecha). A 0,1 mg/ml y 0,01 mg/ml, la coloración capsular era oscura, y no pudo comprobarse ventaja alguna en el uso del colorante. (Fig. 9, en medio a la izquierda y abajo a la izquierda). El orificio lateral se coloreó igualmente con la inyección de la cámara anterior.

35 4.2 Biocompatibilidad del ABG

40 Unas ratas marrones de Noruega (Kyudo, Fukuoka, Japón), de 8 semanas después del nacimiento, se estudiaron del siguiente modo. Se anestesió a las ratas con una inyección intraperitoneal de pentobarbital y se dilataron sus pupilas con la aplicación tópica de tropicamida al 1% y clorhidrato de fenilefrina al 2,5%. Se entró en la cámara anterior a través de la córnea transparente con una aguja de calibre 30 montada en una jeringa. A continuación se realizó una única inyección en la cámara anterior con cada colorante, ABG (10, 1, 0,5, 0,25, 0,1 y 0,01 mg/ml), VIC (5 mg/ml, azul tripano (1 mg/ml) y la solución OPEGUARD de control (n=6 para cada colorante, total 54 ojos).

45 La osmolalidad media y pH de cada solución aparecen en la Tabla 1.

El colorante permaneció en la cámara anterior y fue seguido por examen biomicroscópico durante 2 meses. Los ojos fueron enucleados a las 2 semanas y a los 2 meses después de la operación. Se analizaron los ojos por microscopía óptica, microscopía electrónica de transmisión y microscopía electrónica de exploración.

50 4.3 Microscopía óptica

Se fijaron los ojos en paraformaldehído al 4% y se cortaron por la mitad, se empaparon en parafina, se desparafinizaron en xileno, se rehidrataron en etanol, y se lavaron en solución salina tamponada de fosfato (SPF). Las secciones de 4 µm de espesor se colorearon con hematoxilina y eosina y se observaron al microscopio óptico.

55 Las secciones de la córnea coloreadas con hematoxilina y eosina no mostraron cambios significativos en ninguno de los grupos (ABG, VIC, AT; Fig. 10). En el examen al microscopio óptico, no se observaron signos de pérdida de células endoteliales ni de edema corneal. Las capas laminares de colágeno, las capas estromales y la capa de células epiteliales quedaban perfectamente preservadas. En ninguna de las capas corneales se observó infiltración de células inflamatorias.

60 4.4 Etiquetado del Extremo de la Entalla del Terminal TdT-dUTO (TUNEL)

65 Con el uso del Etiquetado del Extremo de la Entalla del Terminal TdT-dUTO (TUNEL) se detectó la muerte de células apoptóticas. Se obtuvieron secciones de cuatro micras de espesor a partir de las muestras fijadas en paraformaldehído

al 4% y empapadas en parafina. La coloración TUNEL se realizó con el Kit de Detección Directa de Apoptosis *in situ* con Fluoresceína ApopTag® (Intergen Company, Nueva York, EE.UU.) siguiéndose el protocolo del fabricante. Las secciones se colorearon simultáneamente con yoduro de propidio (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.), permitiéndose así la observación de los núcleos de las células a través de un microscopio de fluorescencia (Olympus, Tokio). Se seleccionaron y observaron aleatoriamente diez secciones de cada muestra de ojo (n=3). Los resultados se presentan como medias  $\pm$  desviaciones típicas.

En todos los grupos, se observó a veces la muerte de células apoptóticas del epitelio corneal debido al recambio fisiológico (Fig. 11, cabeza de flechas). En los grupos con ABG, no se observó coloración tipo TUNEL en las células del estroma corneal, el endotelio, el cuerpo ciliar y las células del cristalino (Fig. 11). En el grupo con VIC, no se detectó ninguna muerte visible de células apoptóticas en la concentración de 5 mg/ml. En el grupo con AT, se detectó muerte de células apoptóticas del endotelio corneal en el 2% del total de dichas células. Las restantes células del grupo de AT no sufrieron ninguna muerte de células apoptóticas.

#### 4.5. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Los ojos fueron enucleados y se fijaron los segmentos anteriores en paraformaldehído al 1%, y glutaraldehído al 1%, en PBS. Las muestras fueron posteriormente fijadas en el tampón de acetato de veronal en tetróxido de osmio (2%), se deshidrataron en etanol y agua, y se empaparon en Epon. De los bloques se cortaron secciones ultrafinas, que se montaron en rejillas de cobre. Se observaron las muestras con un microscopio electrónico JEM 100CX (JEOL, Tokio).

En el grupo de ABG, se conservó bien la ultraestructura de las células corneales y la matriz celular de colágeno en la concentración más elevada de 10 mg/ml (Fig. 12, izquierda). En el endotelio corneal, las membranas celulares, núcleos bien definidos, y organelo citoplásmico no mostraron cambios degenerativos (Fig. 12, abajo a la izquierda). El grupo de VIC mostró una estructura bien conservada de las células endoteliales, pero algunas células endoteliales mostraron signos de tumefacción mitocondrial (Fig. 12, a la mitad, flechas). El grupo de AT mostró la formación de quistes en la capa de células endoteliales debida a la separación entre las células (Fig. 12, a la derecha), y degeneración ocasional del endotelio corneal de manera irregular (Fig. 12, abajo a la derecha).

#### 4.6. Microscopía Electrónica de Exploración (MEE)

Los ojos fueron enucleados y se fijaron los segmentos anteriores en paraformaldehído al 1%, y glutaraldehído al 1%, en PBS. Las muestras fueron posteriormente fijadas en el tampón de acetato de veronal en tetróxido de osmio (2%), y se deshidrataron en etanol y agua. Se saturaron las muestras en alcohol t-butilo, y se efectuó en secado en punto crítico (Eiko, Tokio). A continuación, las muestras se colocaron en trozos por medio de lengüetas de carbono adherentes y pulverizadas con Au de 20 nm de espesor mediante revestimiento de plasma de argón (Eiko). A continuación, se estudió la superficie endotelial de la córnea con un microscopio electrónico de exploración JEM 840 (JEOL).

En las corneas expuestas al ABG, el MEE mostró células normales similares a las de los controles. La imagen de MEE mostró una lámina de células endoteliales hexagonales normales con bordes intactos, sin tumefacción endotelial (Fig. 13, arriba). El grupo de VIC mostró también celulares en la capa endotelial de la córnea. Ocasionalmente, se observaron células endoteliales degeneradas liberadas de su emplazamiento original. En el grupo de AT se reconoció una contracción celular endotelial en la zona central de la córnea. La contracción celular llevó a una pérdida celular endotelial en una forma esporádica.

### Ejemplo 5

#### 5. Capsulorrexia Curvilinea Continua Asistida por Azul Brillante

Como se ha indicado anteriormente, los inventores informaron los resultados de un estudio preclínico con un nuevo colorante, el Azul Brillante G (ABG), que coloreó la cápsula anterior a concentraciones inferiores y con una toxicidad mínima. Este ejemplo demuestra la eficacia del ABG en la coloración capsular de un ojo humano.

En agosto de 2004, una mujer de 70 años de edad con una catarata blanca madura recibió una CCC asistida por ABG y la facoemulsificación con implante de lentes intraoculares (LIO).

La paciente no tenía otras enfermedades oculares tales como glaucoma, uveítis o trastornos oculares. Se disolvió Coomassie® BBG 250 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) en solución de riego intraocular (OPEGUARD®-MA, Senju Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka, Japón), en una dosis de 0,25 mg/ml, esterilizándose con un filtro de jeringa. Se inyectó lentamente la solución preparada de ABG en la cámara anterior y a continuación se lavó de inmediato con solución salina equilibrada (SSE).

Según la Fig. 14, la cápsula anterior azul brillante era claramente visible durante la producción quirúrgica de la CCC. La solución de ABG (0,25 mg/ml) se inyectó en la cámara anterior del ojo, regándose inmediatamente. (A) La flecha

5 indica la CCC creada en el ojo, que tenía una catarata blanca. (B) Las cabezas de flecha muestran los márgenes de la CCC completada. (C) Después de la facoemulsificación y aspiración, se insertó una LIO. El día siguiente, ni se observó ninguna toxicidad grave (tal como edema corneal, grave inflamación ni presión intraocular elevada). La agudeza visual de la paciente mejoró en la percepción a la luz (PL) a 20/20 y se observó una pérdida mínima de células endoteliales de la córnea del 0,8% después de 2 meses.

10 Este estudio se efectuó con la aprobación del Consejo de Revisión Interna de nuestra institución, ejecutándose de acuerdo con las normas éticas dispuestas en la Declaración de Helsinki de 1989. Antes de la intervención quirúrgica, se expusieron a la paciente las posibles ventajas y riesgos del presente tratamiento, obteniéndose el consentimiento informado de la misma.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición colorante para uso en un método de cirugía oftálmica que comprende colorear una membrana oftálmica y proceder a la retirada de la membrana oftálmica, **caracterizada porque** la composición colorante comprende, como componente primario, Azul Brillante G (ABG), una sal farmacéuticamente aceptable de ABG o un hidrato de Azul Brillante G (ABG).
- 10 2. Composición colorante para uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** la membrana oftálmica es la membrana limitadora interna (MLI).
3. Composición colorante para uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** la membrana oftálmica es la cápsula anterior.
- 15 4. Composición colorante para uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** dicha composición colorante tiene una concentración de ABG, una sal farmacéuticamente aceptable de ABG o un hidrato de ABG, dentro del rango de 0,1 a 1,0 mg/ml.
- 20 5. Composición colorante para uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** dicha composición colorante tiene una concentración de ABG, una sal farmacéuticamente aceptable de ABG o un hidrato de ABG, dentro del rango de 0,1 a 0,25 mg/ml.
6. Composición colorante para uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** dicha composición colorante tiene una presión osmótica de aproximadamente 298 mOsm, que es la misma que la solución salina.

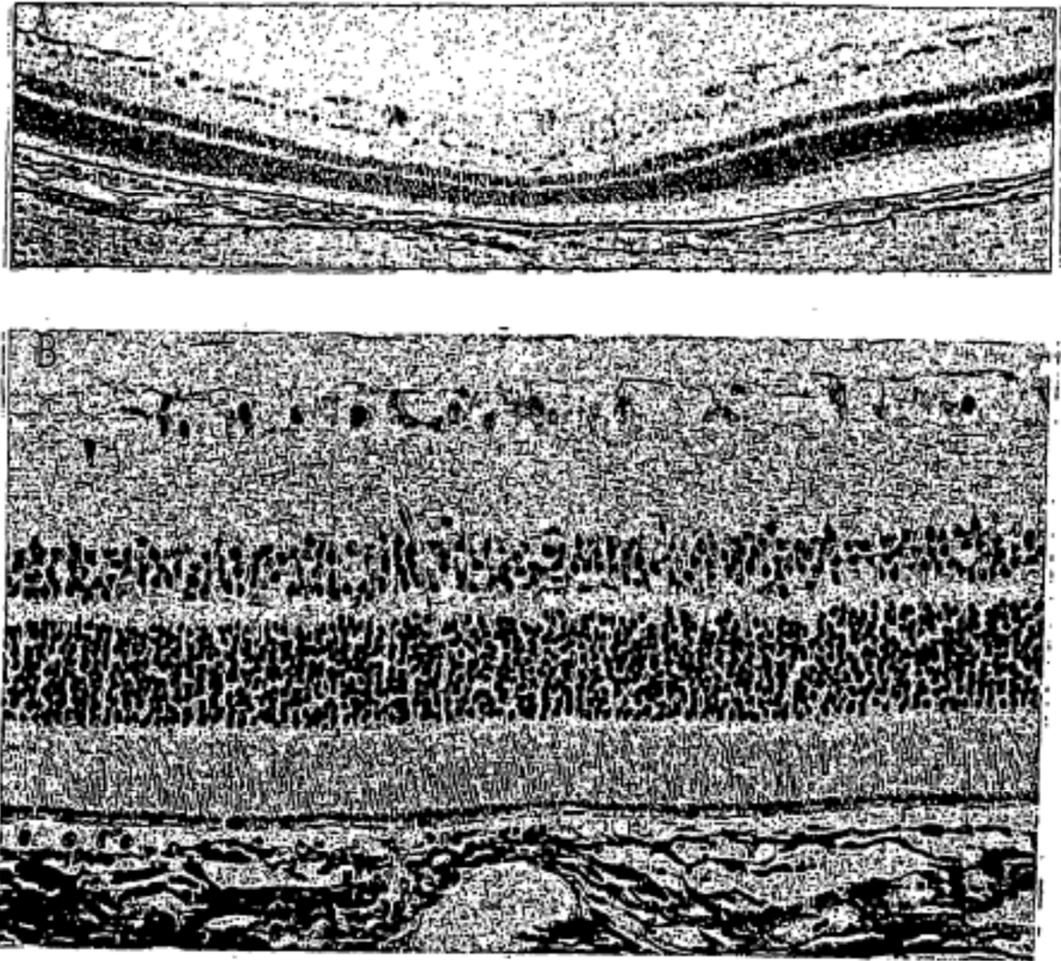


Fig.1

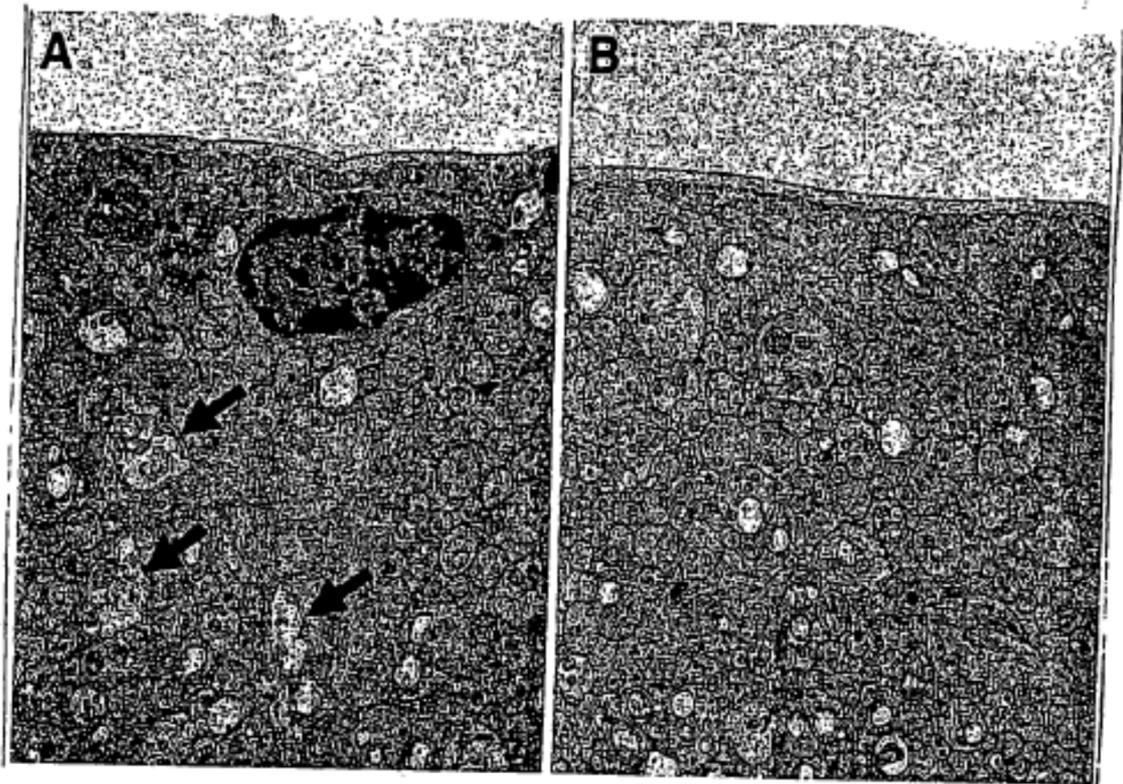


Fig.2

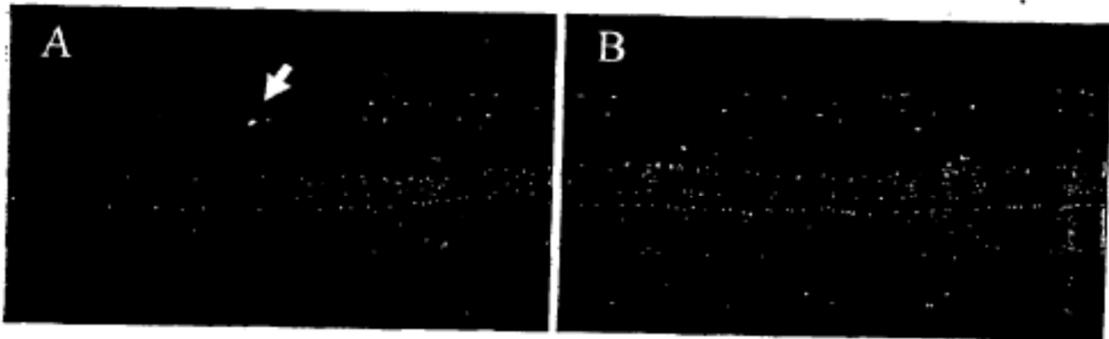


Fig.3

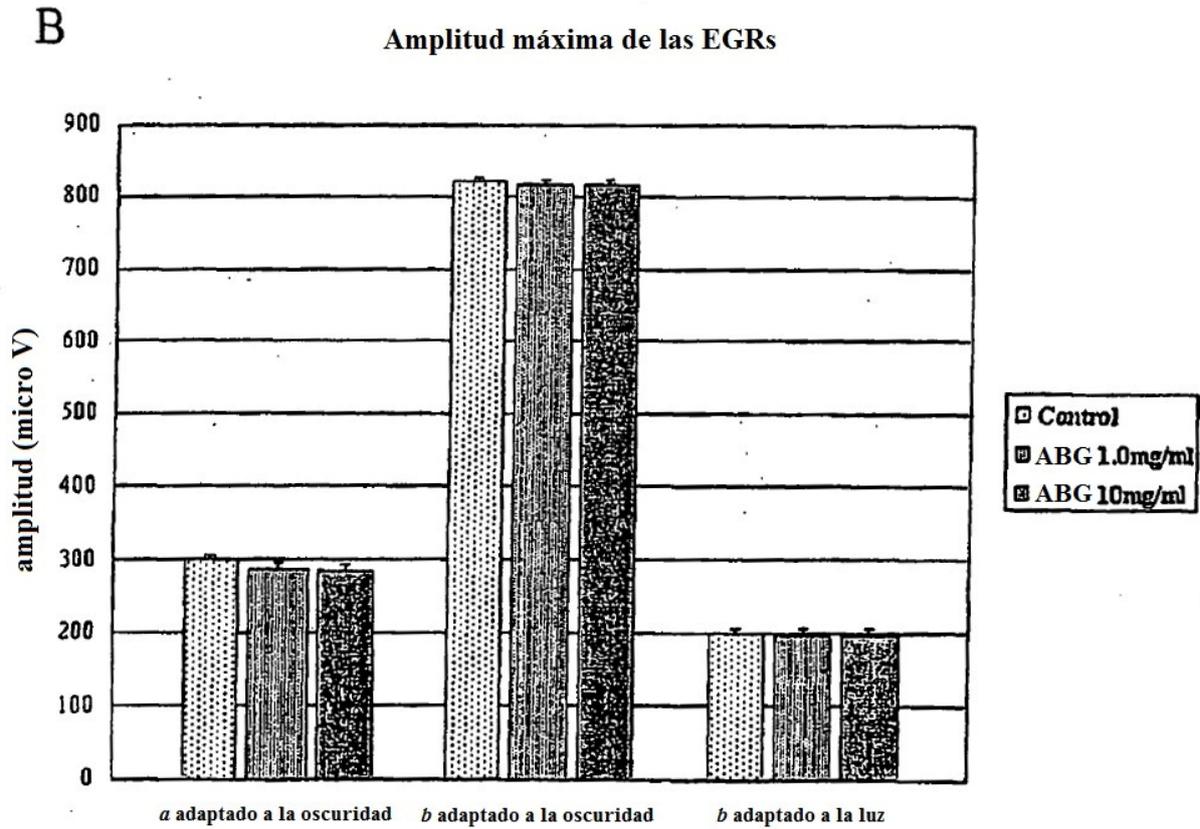
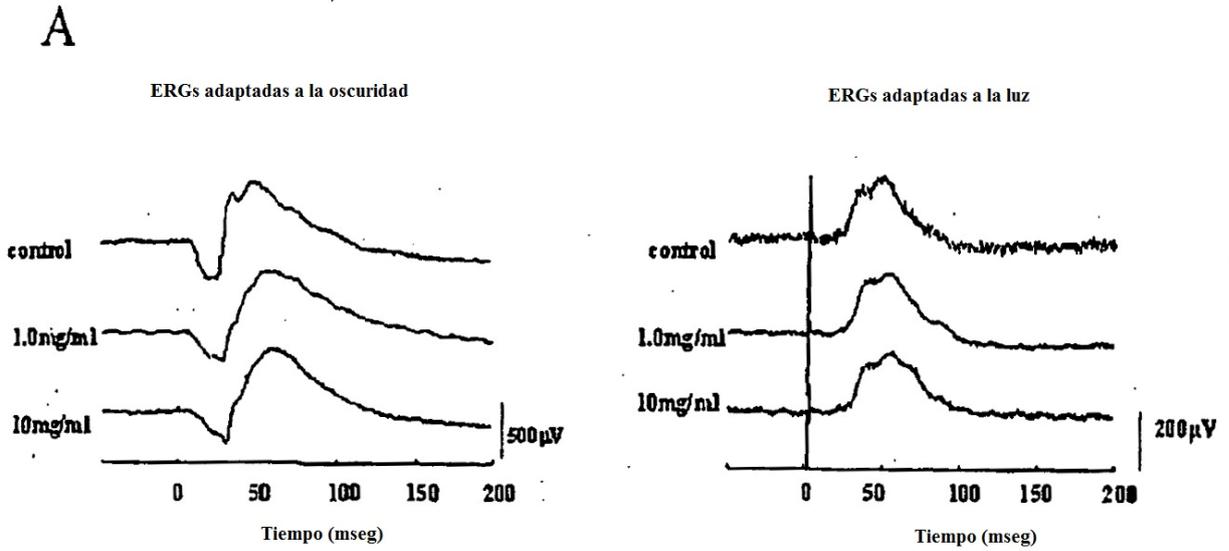


Fig.4

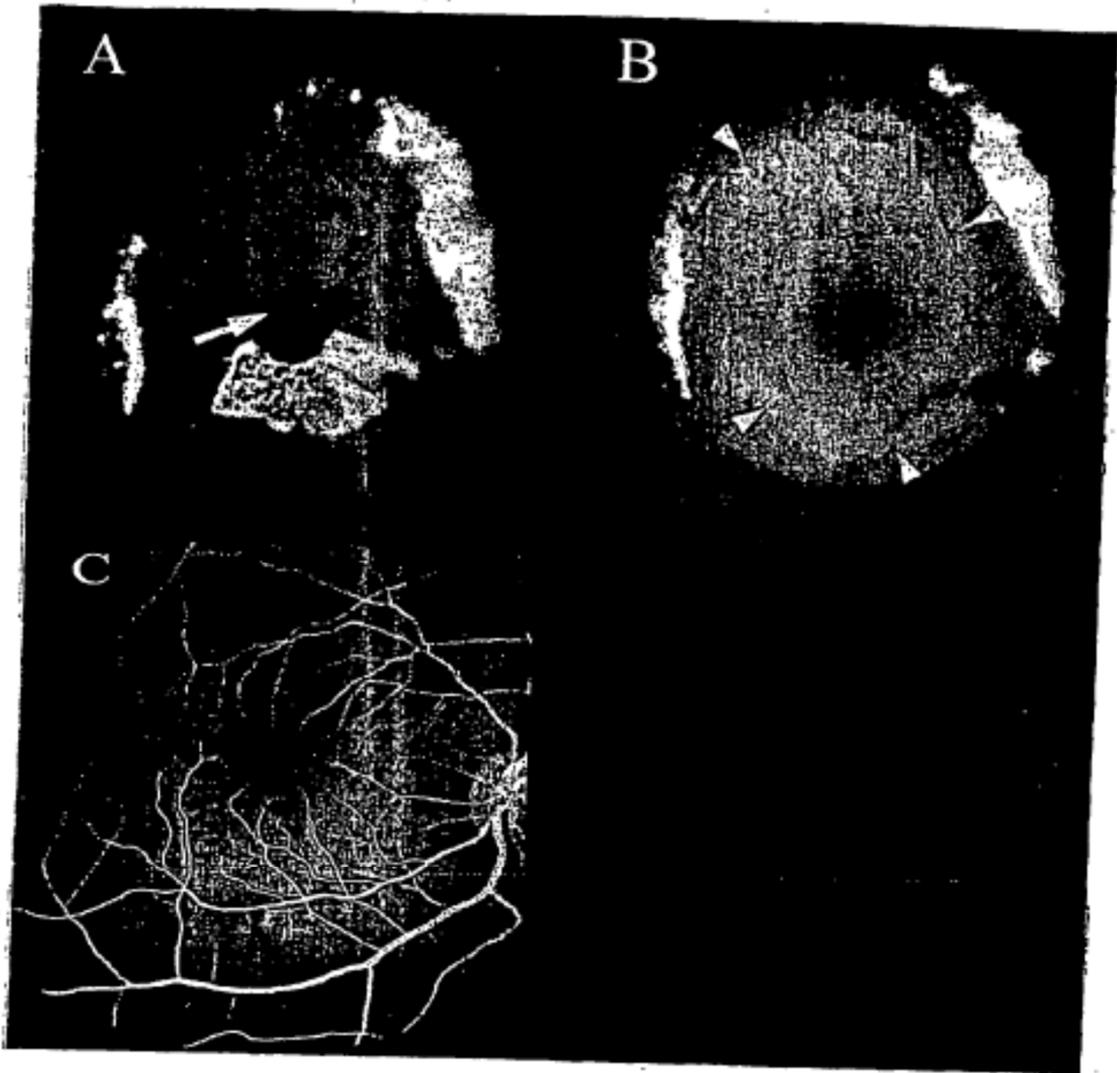


Fig.5

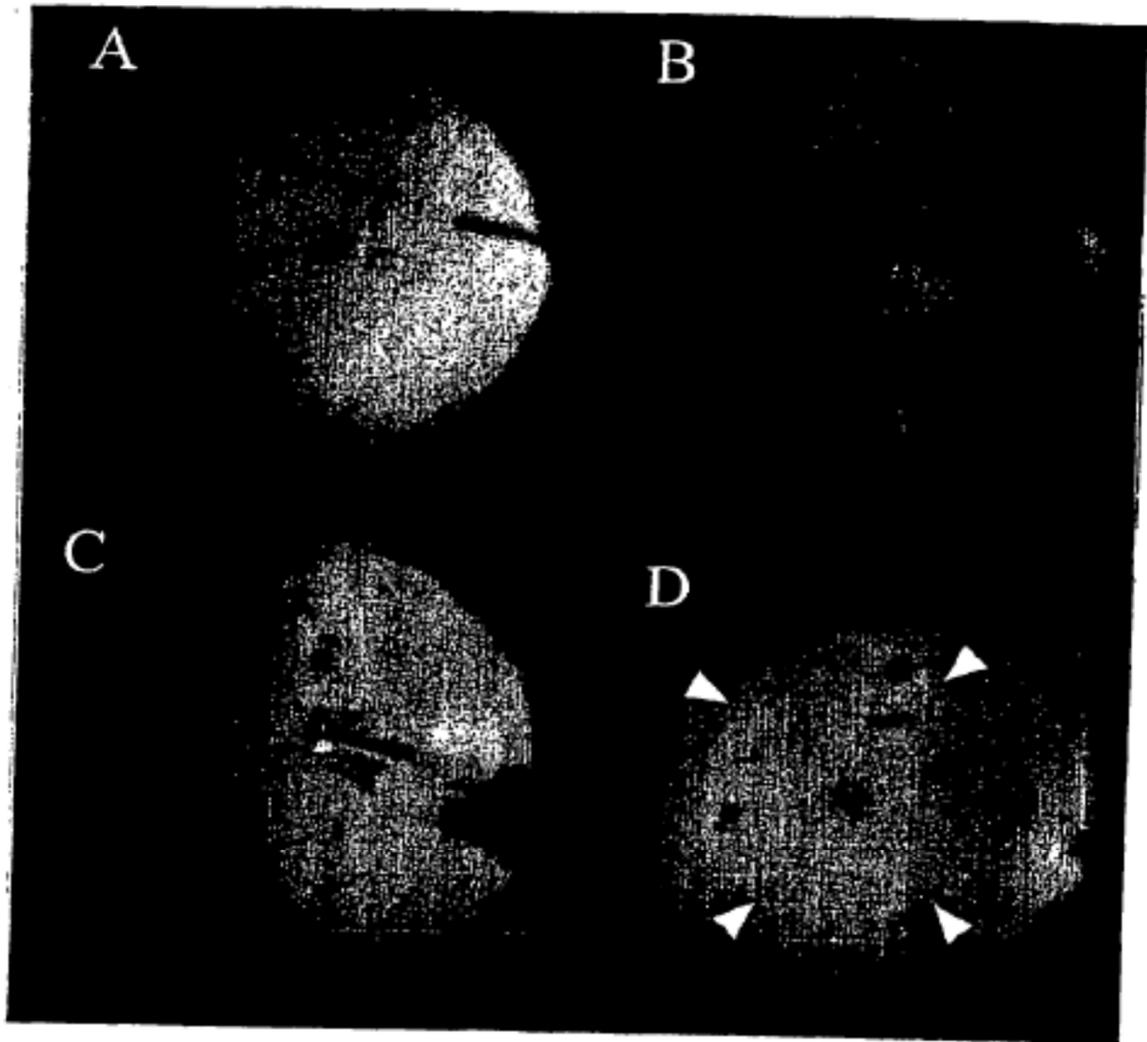


Fig.6

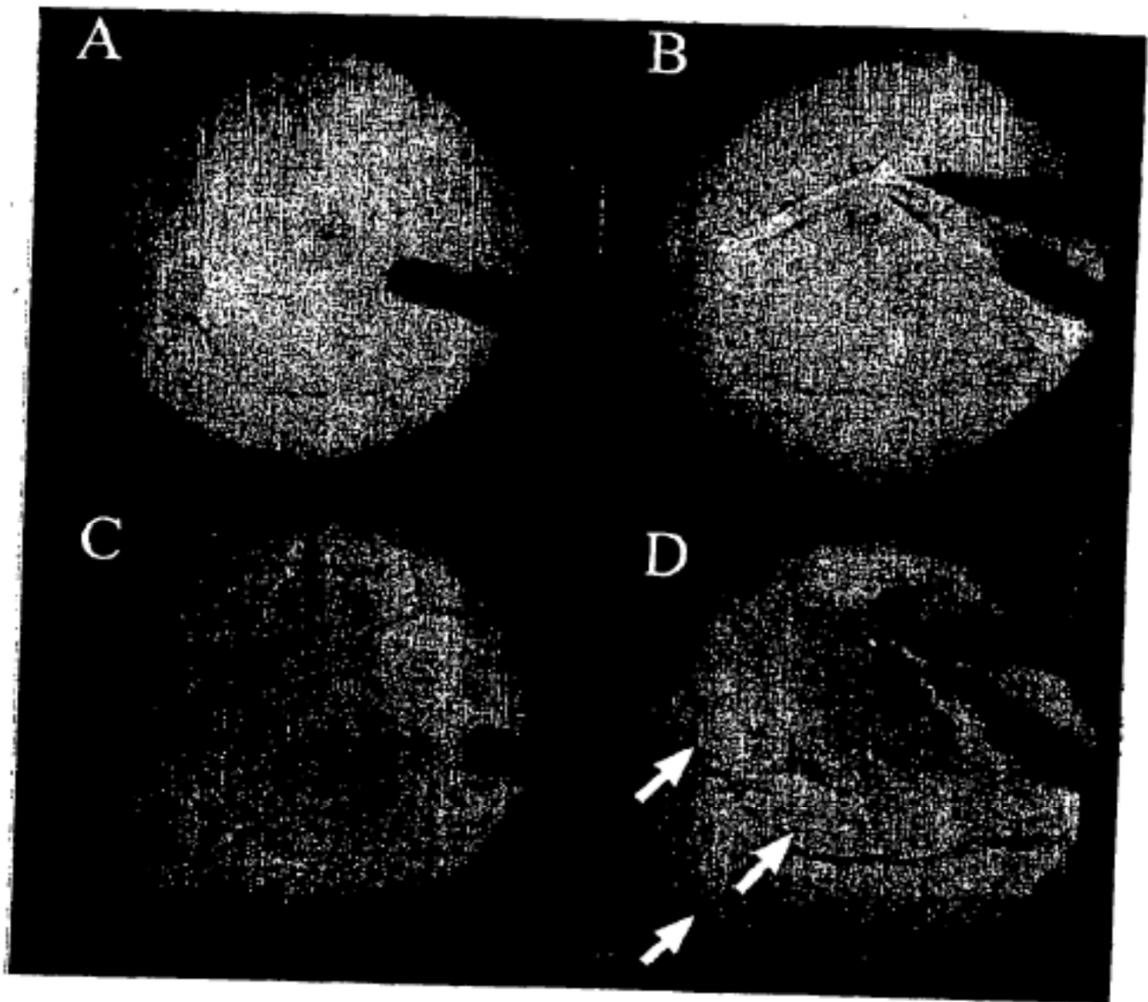


Fig.7



Fig.8

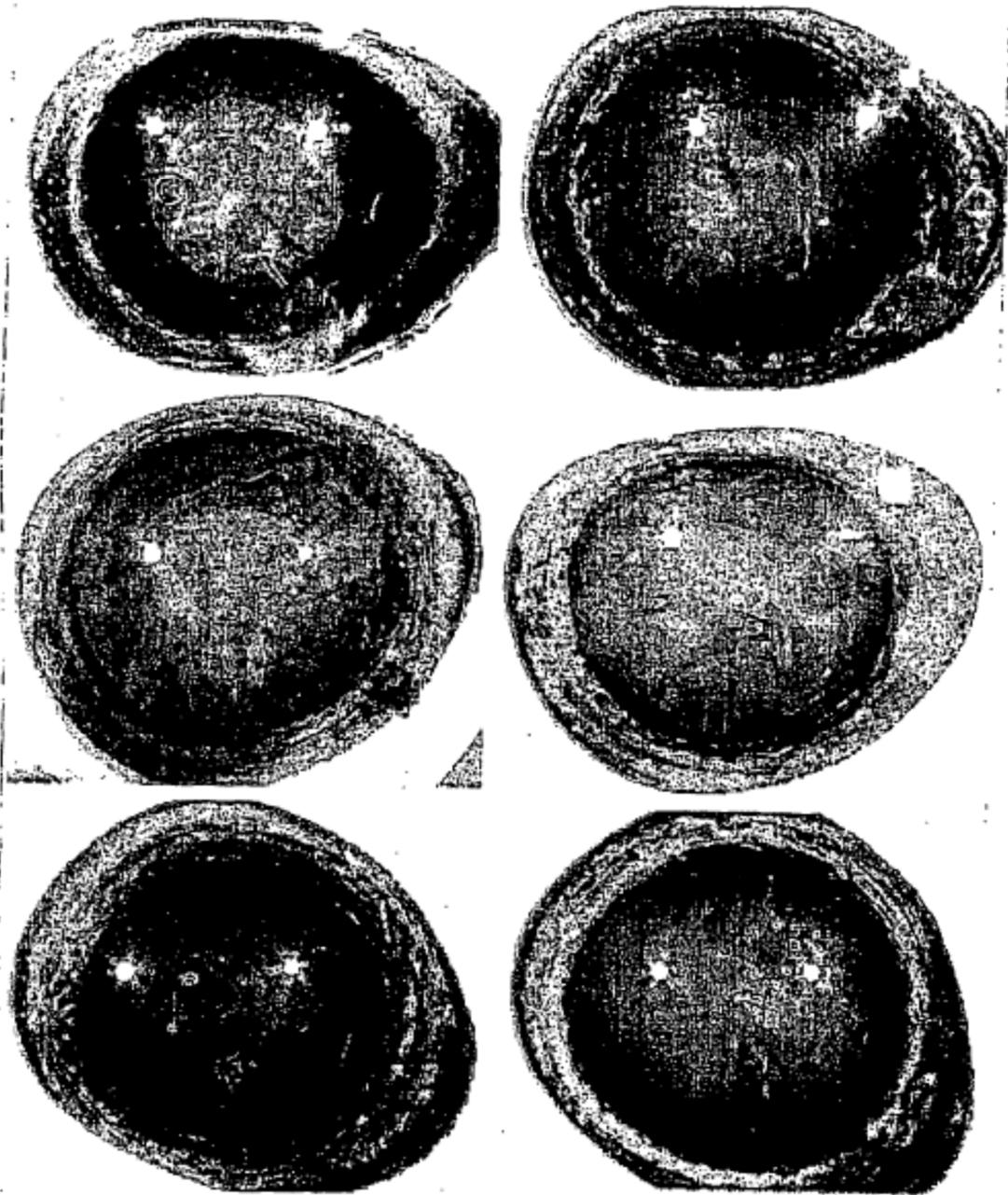


Fig.9

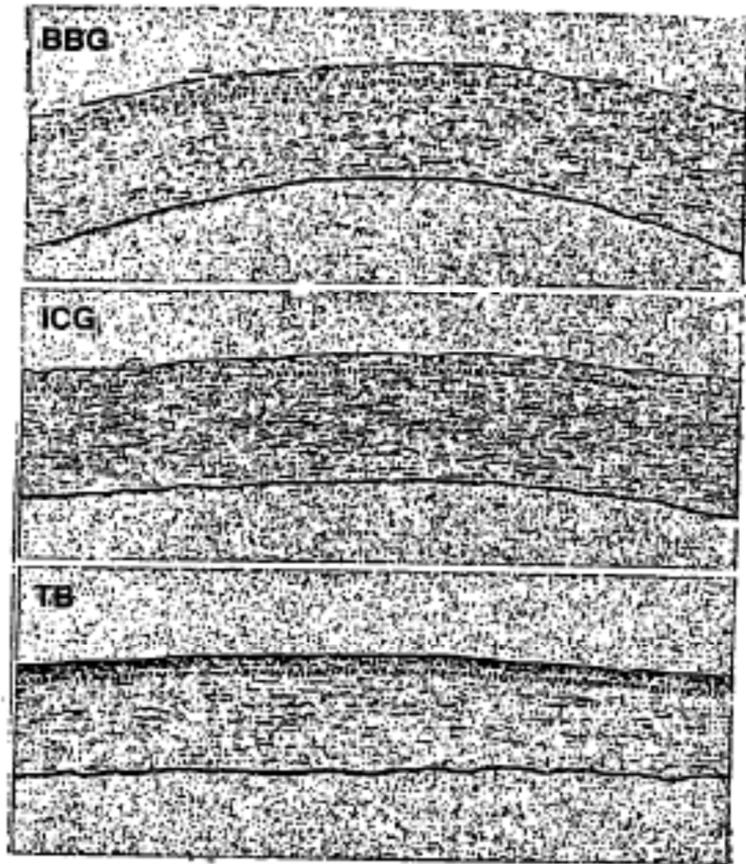


Fig.10

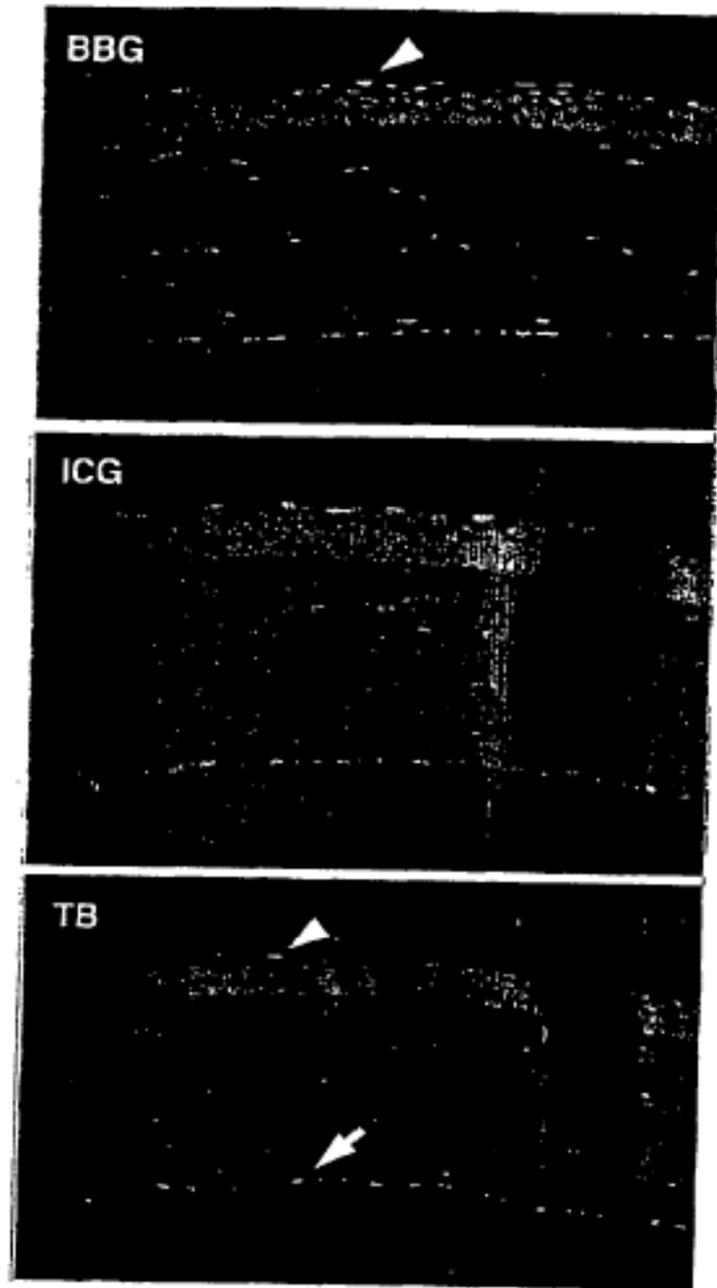


Fig.11

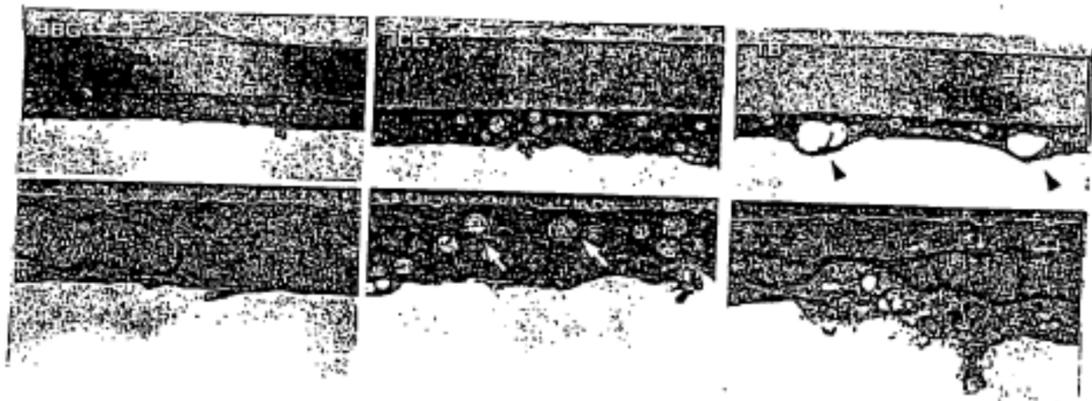


Fig.12

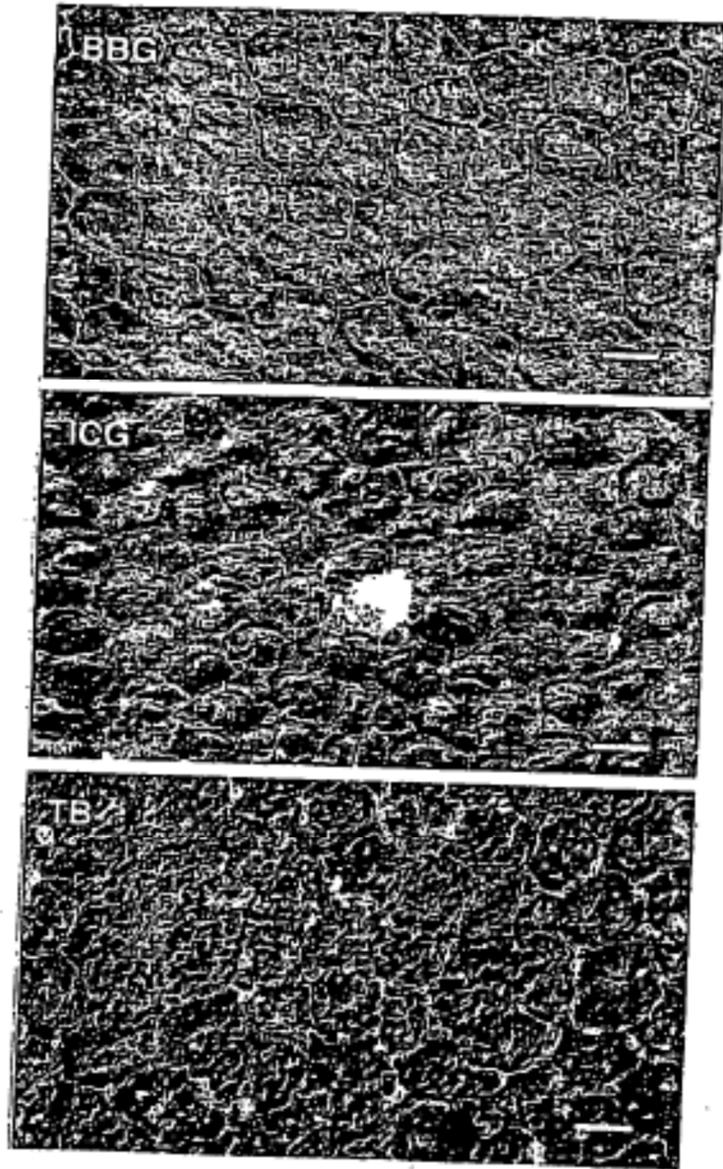


Fig.13

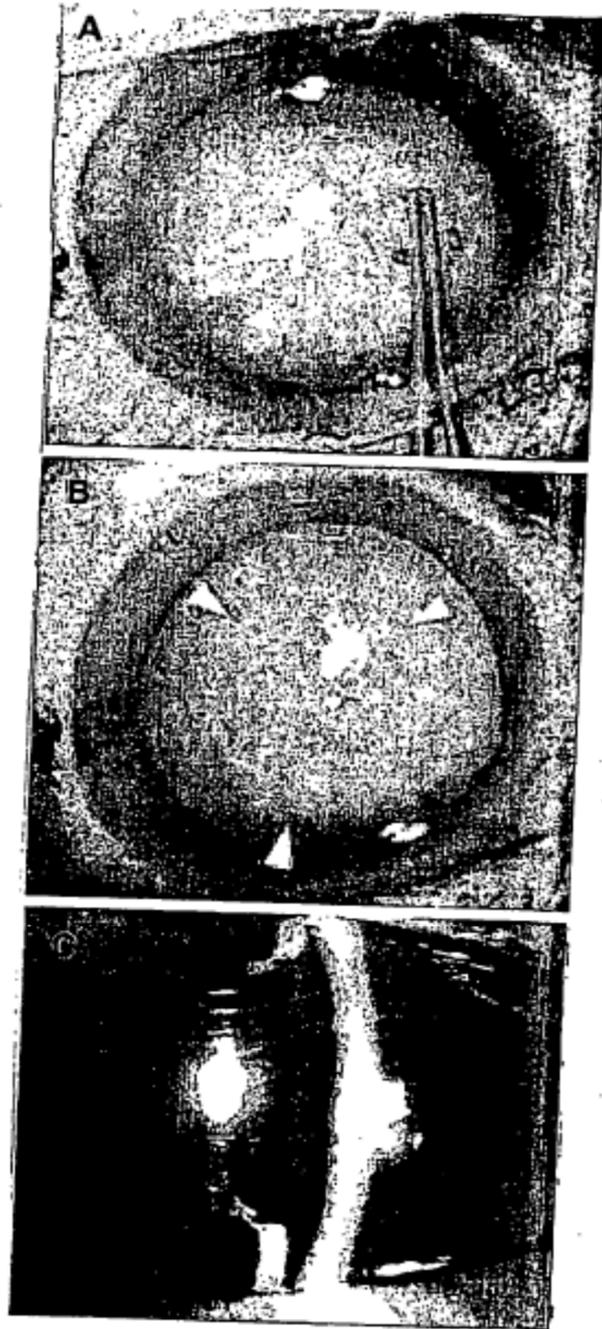


Fig.14