



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 281 128**

51 Int. Cl.:
A61K 38/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98924866 .1**

86 Fecha de presentación : **22.05.1998**

87 Número de publicación de la solicitud: **0983084**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **08.03.2000**

54 Título: **Uso de hialuronidasa para la fabricación de una preparación oftálmica para la licuefacción del humor vítreo en el tratamiento de trastornos oculares.**

30 Prioridad: **22.05.1997 US 862620**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.09.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.09.2007

73 Titular/es: **Ista Pharmaceuticals, Inc.**
1414 Muirlands Drive
La Jolla, California 92307, US

72 Inventor/es: **Karageozian, Hampar, L.;**
Karageozian, Vicken, H.;
Kenney, Maria, Cristina;
Gutierrez Flores, Jose Luis;
Carpio Aragon, Gabriel Arturo y
Nesburn, Anthony, B.

74 Agente: **Blanco Jiménez, Araceli**

ES 2 281 128 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de hialuronidasa para la fabricación de una preparación oftálmica para la licuefacción del humor vítreo en el tratamiento de trastornos oculares.

Campo de la invención

La presente invención está relacionada generalmente con preparaciones enzimáticas para la administración terapéutica en los ojos de seres humanos u otros mamíferos, y más particularmente a un método de utilización de una o más enzimas para tratar trastornos del ojo que afectan a la retina y/o al cuerpo vítreo del ojo mamífero.

Antecedentes de la invención

Anatomía del ojo humano

En los seres humanos, la anatomía del ojo incluye un “cuerpo vítreo” que ocupa aproximadamente cuatro quintos de la cavidad del bulbo ocular, detrás de la lente. El cuerpo vítreo está formado de material gelatinosa, conocido como el humor vítreo. Normalmente, el humor vítreo de un ojo humano normal contiene aproximadamente el 99% de agua junto con el 1% de macromoléculas que incluyen: colágeno, ácido hialurónico, glicoproteínas solubles, azúcares y otros metabolitos de bajo peso molecular.

La retina es esencialmente una capa de tejido nervioso formada en la superficie interna posterior del bulbo ocular. La retina está rodeada por una capa de células conocida como la capa coroidea. La retina puede ser dividida en una parte óptica que participa en el mecanismo visual, y una parte no óptica que no participa en el mecanismo visual. La parte óptica de la retina contiene los bastones y conos, que son eficaces órganos de visión. Varias arterias y venas se introducen en la retina por su centro, y se extienden hacia afuera para proporcionar circulación sanguínea a la retina.

La parte posterior del cuerpo vítreo está en contacto directo con la retina. Las redes de membranas fibrilares se extienden desde la retina y atraviesan o se insertan en el cuerpo vítreo para unir el cuerpo vítreo con la retina.

Causas, tratamientos y secuelas clínicas de la hemorragia del vítreo

La retinopatía diabética, trauma y otros trastornos oftalmológicos a veces suponen la rotura o fuga de los vasos sanguíneos retinales con sangrado resultante en el humor vítreo del ojo (es decir, “hemorragia del vítreo”). La hemorragia del vítreo de este tipo normalmente se manifiesta como un nublado u opacificación del humor vítreo.

Hemorragia del vítreo está a veces, pero no siempre, acompañada por un desgarro o desprendimiento de la retina. En los casos en los que la hemorragia del vítreo está acompañada por una lagrime retinal o desprendimiento, es importante que tal desgarro o desprendimiento retinal sea rápidamente diagnosticado y reparado quirúrgicamente. El fracaso en diagnosticar y reparar rápidamente el desgarro o desprendimiento retinal puede permitir que las células fotorreceptoras de la retina, en la región del desgarro o desprendimiento, se vuelva necrótico. Tal necrosis de las células fotorreceptoras de la retina puede resultar en la pérdida de visión. Además, permitiendo que el desprendimiento retinal permanezca sin reparar durante este tipo de periodo temporal extendido puede resultar en una hemorragia del vítreo adicional y/o en la formación de tejido fibroso en el lugar de la hemorragia. Tal formación de tejido fibroso puede resultar en la formación de una fijación fibrosa permanente indeseable entre el cuerpo vítreo y la retina.

El procedimiento típico quirúrgico usado para la reparación de los desgarros o desprendimientos retinales requiere que el cirujano pueda mirar a través del humor vítreo, para visualizar la región dañada de la retina (es decir, “visión transvítrea de la retina”). Cuando se produce la hemorragia, la presencia de sangre hemorrágica dentro del vítreo puede provocar que el vítreo se vuelva tan nublado que el cirujano no pueda visualizar la retina a través del vítreo. Este nublado hemorrágico del vítreo puede tardar 6-12 meses o más en despejarse lo suficiente como para permitir una visión transvítrea de la retina. No obstante, en vista de las complicaciones potenciales que pueden originarse por un diagnóstico o tratamiento tardío de un desgarro o desprendimiento de la retina, generalmente no es deseable esperar a que se produzca esta limpieza natural de la sangre hemorrágica.

Además, incluso cuando la hemorragia del vítreo no está acompañada por el desgarro o desprendimiento de la retina, es frecuentemente difícil comprobar que el desgarro o desprendimiento de la retina no se haya producido, ya que el vítreo nublado impide que el médico realice el examen fundoscópico de rutina de la retina. Además, la presencia de sangre hemorrágica dentro del vítreo puede perjudicar significativamente u oscurecer completamente la visión del paciente a través del ojo afectado, y seguirá haciéndolo hasta que la sangre hemorrágica haya sido sustancialmente o completamente nítida.

Así, la presencia de sangre hemorrágica dentro del cuerpo vítreo causa múltiples problemas clínicos que incluyen a) incapacidad para examinar y diagnosticar visualmente el sitio y causa de la hemorragia y/o cualquier desgarro o desprendimiento de la retina que la acompañen, b) degradación completa o parcial de visión en el ojo afectado, y c) degradación o prevención del rendimiento de los procedimientos quirúrgicos transvítreos del tipo de tratamiento normalmente utilizado para reparar el lugar de la hemorragia y/o para reparar cualquier desgarro o desprendimiento de la retina que la acompañen.

En los casos en los que la hemorragia del vítreo ha resultado en un nublado u opacificación sustancial del vítreo, el médico tratante puede tener la opción de ejecutar un procedimiento conocido como una vitrectomía, donde todo (o una parte de) el cuerpo vítreo es quitado del interior del ojo, y sustituido con un líquido claro. El rendimiento de este procedimiento de vitrectomía se destina a permitir al cirujano ejecutar el examen de la retina necesario y/o la reparación quirúrgica de la hemorragia y de cualquier desgarro o desprendimiento de la retina que la acompañen. Tales procedimientos de vitrectomía requieren un conocimiento muy profundo, y están asociados con diferentes inconvenientes, riesgos y complicaciones significantes. Entre estos inconvenientes, riesgos y complicaciones está la posibilidad de que la acción de eliminar el vítreo provoque un desprendimiento o desgarro adicional de la retina y/o que tal eliminación del vítreo provoque una hemorragia posterior de los vasos sanguíneos de la retina ya debilitados.

Aplicaciones oftálmicas anteriores de la hialuronidasa y otras enzimas

En un esfuerzo para minimizar la posibilidad de provocar un desprendimiento o desgarro posterior de la retina durante la realización de la vitrectomía, se ha propuesto anteriormente en la patente estadounidense n°. 5,292,509 (Hageman), inyectar ciertas enzimas glicosaminoglicanasas sin proteasa en el cuerpo vítreo, para hacer que el cuerpo vítreo se desacople o “desinserte” de la retina, antes de la eliminación del cuerpo vítreo. Tal desinserción o desacoplamiento del cuerpo vítreo parece minimizar la probabilidad de que se produzca un desgarro o desprendimiento posterior de la retina al quitar el cuerpo vítreo. Ejemplos de enzimas glicosaminoglicanasas sin proteasa específicas que pueden ser usadas para provocar esta desinserción vítreo aparentemente incluyen: condroitinasa ABC, condroitinasa AC, condroitinasa B, condroitina 4-sulfatasa, condroitina 6-sulfatasa, hialuronidasa y B-glucuronidasa.

Aunque la enzima hialuronidasa se conoce por ser utilizable para varias aplicaciones oftálmicas, incluida la aplicación adjunta de la vitrectomía descrita en la patente estadounidense n°. 5,292,509 (Hageman), los estudios previamente publicados han indicado que la hialuronidasa es tóxica para la retina y/o otras estructuras anatómicas del ojo cuando se administra por vía intravítrea en dosis superiores a 1 UI, es decir, a 15, 30, 50 y 150 UI de hialuronidasa. Véase, *The Safety of Intravitreal Hyaluronidase*; Gottlieb, J.L.; Antoszyk, A.N., Hatchell, D.L. and Soloups, P., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31:11, 2345-52 (1990).

La toxicidad oftálmica de algunas preparaciones de hialuronidasa ha sido confirmada por otros investigadores, que han propuesto que tales preparaciones de hialuronidasa se usan como un tóxico irritante para provocar la neovascularización inducida experimentalmente en el ojo, en modelos de toxicidad animal. Véase, *An Experimental Model of Preretinal Neovascularization in the Rabbit*; Antoszyk, A.N., Gottlieb, J.L., Casey, R.C., Hatchell, D.L. and Machemer, R.; *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 1, 46-51 (1991).

WO97/18835 se refiere a la preparación de la hialuronidasa para la administración oftálmica, en particular para romper y eliminar la sangre del humor vítreo.

Desafortunadamente, no ha sido previamente conocido si las actividades terapéuticas y toxicidades de la hialuronidasa son universalmente aplicables a todas las preparaciones de la hialuronidasa, o si tales eficacias y/o toxicidades son aplicables sólo a las preparaciones de la hialuronidasa que contienen ciertos materiales excipientes o a las enzimas hialuronidasas derivadas de fuentes específicas. Esta es una consideración importante en vista de que la pureza y caracterización (p. ej., distribución del peso molecular) de las distintas preparaciones de la hialuronidasa usadas en la técnica anterior pueden variar, dependiendo de la fuente de hialuronidasa y de los solventes y/u otros componentes de la formulación con los cuales se combina la hialuronidasa.

Pureza y caracterización de preparaciones de hialuronidasa previamente usadas para la administración oftálmica

El término “hialuronidasa” se utiliza de forma común para describir un grupo de enzimas endo-B-glucuronidasas que despolimerizan ciertos mucopolisacáridos, tales como el ácido hialurónico. Myer, K. *et al.*, *The Enzymes* Vol. 4, 2d, Ed., pp 447, Academic Press, Inc., New York (1960).

La hialuronidasa causa la hidrólisis de los enlaces endo-N-acetil hexosamínicos del ácido hialurónico y de los ácidos A y C de sulfato de condroitina, principalmente a residuos tetrasacáridos.

Una evidencia significativa indica que las enzimas hialuronidasas derivadas de distintas fuentes difieren en cuanto a la distribución del peso molecular enzimático y a las actividades enzimáticas específicas. Tal variabilidad en la distribución del peso molecular y actividad específica enzimática son excelentes consideraciones en vista de que las enzimas hialuronidasas pueden ser aisladas de una variedad de fuentes, incluso de testículos bovinos, testículos ovinos, ciertas bacterias tales como streptomyces y algunos animales invertebrados tales como las sanguijuelas.

La preparación de la hialuronidasa Wydase® está proporcionada por haber sido previamente administrada a ojos mamíferos para varias aplicaciones clínicas y experimentales, incluyendo el tratamiento del glaucoma y la promoción de la licuefacción del cuerpo vítreo durante los procedimientos de vitrectomía en los que el cuerpo vítreo es quitado del ojo.

Aunque algunas preparaciones de la hialuronidasa han sido proporcionadas por presentar efectos terapéuticos deseables al inyectarse en o al administrarse tópicamente en el ojo, las toxicidades potenciales de la hialuronidasa y/o el conservante timerosal son motivo de interés con respecto a la seguridad de la administración clínica de rutina de tales preparaciones por inyección intraocular.

Por consiguiente, existe la necesidad en la técnica de la formulación y el desarrollo de una preparación de hialuronidasa nueva que pueda ser administrada en el ojo con niveles de dosificación que sean suficientes para provocar efectos terapéuticos óptimos, pero que no provoquen toxicidad ocular.

Además, en vista de los problemas arriba discutidos en relación con la lentitud de la limpieza natural de la sangre hemorrágica del cuerpo vítreo, existe la necesidad en la técnica de elucidar y de desarrollar métodos nuevos y de procedimientos para acelerar la limpieza de la sangre hemorrágica del cuerpo vítreo del ojo para permitir la visión transvítrea del aspecto posterior del ojo, incluso de la retina, sin necesidad de quitar el cuerpo vítreo (es decir, de vitrectomía total o parcial).

Además, existe la necesidad de prevenir y tratar varios trastornos del ojo mamífero que resultan de un daño o patología en la vascularización de la retina o que resultan en un daño en la barrera de la retina-sangre.

Resumen de la invención

Uso de una hialuronidasa tal y como se define en las reivindicaciones 1 a 18 para la preparación de un medicamento para inducir la licuefacción de un humor vítreo para tratar un trastorno de un ojo mamífero tras la administración intravítrea en un humor vítreo sin sangre hemorrágica permitiendo la visión de una retina del ojo mamífero no como un complemento de la vitrectomía. Se define como causante de la hidrólisis de los enlaces endo-N-acetil hexosamínicos del ácido hialurónico. La hialuronidasa estando: libre de timerosal, y esencialmente desprovista de fracciones de un peso molecular de la hialuronidasa superior a 100.000, entre 50.000 y 60.000, e inferior a 20.000 como está determinado por electroforesis SDS PAGE con gradiente 4-20%.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 muestra un gel de electroforesis con los pozos 1-6. Dichos pozos indican 1) estándares de peso molecular desde 31.000 hasta 200.000, 2) hialuronidasa ACS ovina, 3) hialuronidasa bovina tipo VI-S, 4) hialuronidasa ovina tipo V, 5) hialuronidasa bovina tipo IV-S y 6) hialuronidasa bovina tipo I-S.

Figura 2 es una tabla que resume el Usado del ácido hialurónico determinado zimográficamente, actividades gelatinolíticas y caseinolíticas de la hialuronidasa ACS de la presente invención, en comparación con las hialuronidasas bovinas de tipos VI-S, IV-S y I-S y la hialuronidasa ovina de tipo V.

Figura 3 es una tabla que resume los efectos tóxicos de las inyecciones intravítreas en monodosis de BSS, BSS+ timerosal, hialuronidasa ACS y hialuronidasa Wydase® en conejos, conforme al ejemplo 1 a continuación.

Figura 4 es una tabla que resume la eficacia de la hialuronidasa ACS intravítrea en monodosis en conejos, conforme al Ejemplo 2 a continuación.

Figura 5 es una tabla que resume la seguridad y la eficacia de la hialuronidasa ACS intravítrea en dosis múltiples en conejos, conforme al Ejemplo 2 a continuación.

Figura 6 es una tabla que resume la eficacia de limpieza de hemorragia de la hialuronidasa ACS en monodosis en pacientes humanos con retinopatía diabética, conforme al Ejemplo 9 a continuación.

Descripción detallada de la invención

La siguiente descripción detallada y los ejemplos del anexos están provistos únicamente para fines de descripción y explicación de ciertas formas de realización preferidas de la invención, y no están destinados a limitar el objetivo de la invención de ninguna manera.

Método enzimático para acelerar la limpieza de la sangre hemorrágica del vítreo del ojo

Conforme a la invención, el solicitante ha determinado que ciertos tipos de enzimas, al entrar en contacto con el humor vítreo después de la hemorragia dentro de éste, acelerará el nivel en el cual la sangre hemorrágica es limpiada del humor vítreo.

En este aspecto, el solicitante ha concebido un método para acelerar la limpieza de la sangre hemorrágica del vítreo del ojo, dicho método generalmente comprende la fase de entrada en contacto, con el humor vítreo, con una cantidad de hialuronidasa con una dosis que es suficiente para acelerar la limpieza de la sangre hemorrágica del vítreo sin provocar daños en la retina u otros tejidos del ojo. Preferiblemente, la hialuronidasa está seleccionada por tener una distribución del peso molecular que permite que la hialuronidasa sea administrada por vía intravítrea en dosis superiores a 1 UI, y preferiblemente superiores a 15 UI, y ventajosamente superiores a 75 UI, en ausencia de timerosal, sin provocar daños tóxicos a la retina u otros tejidos del ojo. Este método de limpieza de la hemorragia de la presente invención puede ser realizado sin ninguna vitrectomía u otra manipulación quirúrgica o eliminación del humor vítreo, evitando así los riesgos potenciales y las complicaciones asociadas con estos procedimientos de vitrectomía.

La forma de administración preferida de estas enzimas limpiadoras de la hemorragia es por inyección intraocular directamente en el cuerpo vítreo. Pe forma alternativa, no obstante, la(s) enzima(s) limpiadora(s) de la hemorragia,

de la presente invención puede(n) ser administrada(s) por cualquier otra forma de administración adecuada (p. ej., tópicamente) resultando en una distribución suficiente de la(s) enzima(s) en el cuerpo vítreo para causar el efecto limpiador de la hemorragia deseado.

La solución inyectable preferida puede contener, una hialuronidasa que tiene una distribución de peso molecular que le permite ser administrada por vía intravítrea en dosis superiores a 1 UI, y preferiblemente superiores a 15 UI, y ventajosamente superiores a 75 UI, sin provocar daño tóxico al ojo, junto con ingredientes inactivos que provocan que la solución sea sustancialmente isotónica, y con un pH que sea conveniente para la inyección en el ojo. Esta preparación de la hialuronidasa preferida está preferiblemente desprovista de timerosal. Tal solución para inyección puede ser inicialmente liofilizada a un estado seco y, luego, puede ser reconstruida antes del uso.

Una preparación de la hialuronidasa preferida para la administración oftálmica

Una formulación general para una preparación de hialuronidasa inyectable sin timerosal, de la presente invención está mostrada en la tabla 1 a continuación:

TABLA 1

Formulación general	
<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad</u>
Hialuronidasa ACS	hasta 8000 unidades Internacionales
Lactosa USP	5,0 mg - 130,0 mg
Fosfato USP	0,01 - 100 mmoles

Estos ingredientes de la formulación son inicialmente disueltos en agua estéril, filtrados con filtro estéril y posteriormente liofilizados hasta una composición seca. La composición liofilizada está envasada para la reconstitución posterior antes del uso, en un solvente adecuado tal como una solución salina estéril isotónica o solución salina equilibrada. Tal solución salina equilibrada normalmente contiene: 0,64% cloruro sódico, 0,075% cloruro de potasio, 0,048% dihidrato de cloruro de calcio, 0,03% hexahidrato de cloruro de magnesio, 0,39% trihidrato de acetato sódico, 0,17% dihidrato de citrato sódico, hidruro de sodio/ácido clorhídrico para ajustar el pH, y el agua (cantidad suficiente) que sea necesaria para conducir la solución hasta el volumen final para la inyección.

El término "hialuronidasa ACS" como se utiliza en este caso describe una solución de la hialuronidasa preferida para la inyección intravítrea que está desprovista de timerosal y que está desprovista de fracciones de peso molecular de la hialuronidasa superiores a 100.000, entre 50.000-60.000 e inferiores a 20.000. Una tal hialuronidasa está disponible comercialmente de Calbiochem Biochemicals, P.O. Box 12087, La Jolla, CA 92039-2087 (fabricada por Biozyme, San Diego, CA). Los solicitantes han determinado que esta distribución del peso molecular específica de la hialuronidasa ACS resulta en una toxicidad oftálmica inferior que otras preparaciones de la hialuronidasa, mientras que presenta una eficacia terapéutica en numerosas aplicaciones oftálmicas.

Figura 1 muestra un gel de electroforesis (SDS-PAGE con gradiente 4-20%) que demuestra la distribución del peso molecular de la hialuronidasa ACS preferida en comparación con las distribuciones del peso molecular de las hialuronidasas bovinas tipo VI-S, IV S y I-S y ovinas tipo V obtenidas por SIGMA Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis, Missouri 63178. Unas cantidades estandarizadas (es decir, unidades equivalentes de actividad hialuronidasa) de cada enzima fueron cargadas en cada pozo (pozos 2-6) del gel de electroforesis mostrado en la figura 1. El pozo 1 del gel de electroforesis mostrado en la figura 1 contiene marcadores del peso molecular a 200.000, 116.000, 97.400, 66.000, 45.000, y 31.000, respectivamente. Los pozos 2-6 del gel de electroforesis mostrados en la figura 1 contienen las preparaciones de la hialuronidasa respectivas evaluadas, como sigue: μ

<u>Pozo</u>	<u>Qué está en el pozo</u>
2	Hialuronidasa ACS
3	Hialuronidasa bovina tipo VI-S
4	Hialuronidasa ovina tipo V
5	Hialuronidasa bovina tipo IV-S
6	Hialuronidasa bovina tipo I-S

El pozo 2 muestra que la distribución del peso molecular de la hialuronidasa ACS incluye fracciones de peso molecular de 97, 400, 50.000 (aprox) y 45.000 (aprox.), pero está claramente desprovista de fracciones de peso molecular superior a 100.000, entre 50.000-60.000 e inferior a 20.000.

ES 2 281 128 T3

Los pozos 3, 4, 5 y 6 del gel de electroforesis de la figura 1 muestran que todas las hialuronidasas testiculares bovinas de tipos VI-S, IV-S y I-S y hialuronidasa testicular ovina de tipo V evaluada difieren de la hialuronidasa ACS de la presente invención puesto que incluyen fracciones de peso molecular entre 50.000-60.000 e inferior a 20.000. También, tres (3) de las cuatro (4) hialuronidasas testiculares evaluadas (es decir, tipos VI-S, IV-S y I-S) incluían fracciones de peso molecular de la hialuronidasa que fueron superiores a 100.000.

Además, se realizaron zimogramos para comparar las actividades relativas líticas de cantidades estandarizadas (es decir, unidades equivalentes de actividad hialuronidasa) de la hialuronidasa ACS descrita anteriormente, hialuronidasa tipo VI-S, V, IV-S y I-S después de ácido hialurónico, gelatina y caseína. Respecto a la figura 2, los métodos específicos por los cuales cada uno de estos zimogramos fue realizado son los siguientes:

Zimograma para la actividad gelatinolítica

GELATINA 1 mg/ml gelatina; 10% poliacrilamida; tampón durante toda la noche = 50 mM tris HCl, 5 mM CaCl₂, 0,05% Tritón X-100 pH 7,5; tinción con azul de Coomassie; destinción con 10% ácido acético/50% metanol.

Zimograma para actividad caseinolítica

CASEÍNA 4 mg/ml; 15% poliacrilamida; tampón durante toda la noche = 50 mM tris HCl, 5 mM CaCl₂, 0,05% Tritón X-100 pH 7,5; tinción con azul de Coomassie; destinción 10% ácido acético/50% metanol.

Zimograma para la actividad de lisado del ácido hialurónico

ÁCIDO HIALURÓNICO 2 mg/ml; 10% poliacrilamida; tampón durante toda la noche = suero salino tamponado con fosfato, pH 7,4; tinción con 0,5% de azul alcian en 3% ácido acético; destinción con 10% ácido acético/50% metanol.

Los resultados de este ácido hialurónico, gelatina y zimogramos de la caseína están resumidos en la tabla de la figura 2. Sobre todo, la hialuronidasa ACS preferida de la presente invención está desprovista de fracciones de peso molecular de lisado del ácido hialurónico superiores a aproximadamente 100.000 determinado por electroforesis SDS PAGE al 10% mientras que cada una de las hialuronidasas testiculares evaluada (es decir, tipos VI-S, V, IV-S y II-S) contenía fracciones de peso molecular de lisado del ácido hialurónico superiores a 100.000.

De forma similar, la hialuronidasa ACS de la presente invención estaba desprovista de fracciones de peso molecular gelatinolítico entre aproximadamente 60.000-100.000, mientras que cada una de las hialuronidasas testiculares evaluadas incluía fracciones de peso molecular gelatinolíticas entre aproximadamente 60.000-100.000 000 cuando se determinó por electroforesis SDS PAGE al 10%.

También, la hialuronidasa ACS de la presente invención fue desprovisto de fracciones de peso molecular caseinolítico superiores a aproximadamente 45.000 mientras que cada una de las hialuronidasas testiculares (es decir, tipos VI-S, V, IV-S y I-S) evaluada contenía fracciones de peso molecular caseinolítico superiores a aproximadamente 45.000 determinadas por electroforesis SDS PAGE al 10%.

La distribución del peso molecular específica y perfil de la actividad enzimática específica de la hialuronidasa ACS preferida de la presente invención, y/o la exclusión de timerosal de su formulación, proporciona una preparación de la hialuronidasa que no es tóxica para el ojo cuando se administra a niveles de dosificación en los que otras preparaciones de la hialuronidasa causan efectos tóxicos.

Para el uso en los ejemplos expuestos a continuación, la hialuronidasa ACS preferida se prepara en una formulación sin timerosal por el método y fórmula general descrita a continuación y mostrada en la tabla 1. Más específicamente, la hialuronidasa ACS usada en los ejemplos siguientes es preparada conforme a la formulación específica mostrada en la tabla 2 a continuación:

TABLA 2

Formulación específica A	
<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad</u>
Hialuronidasa ACS	7.200 IU
Lactosa USP	5,0 mg
Fosfato USP	0,02 mmoles

ES 2 281 128 T3

De forma alternativa, otra formulación específica utilizable para aplicaciones en dosis unitarias está mostrada en la tabla 3 a continuación:

TABLA 3

Formulación específica B	
<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad</u>
Hialuronidasa ACS	500-1000 IU
Lactosa USP	5,0-10,0 mg
Fosfato USP	0,01-10,0 mmoles

En otra formulación alternativa específica, la hialuronidasa ACS es suministrada en una forma liofilizada y los componentes están mostrados en la tabla 4 a continuación:

TABLA 4

Formulación específica C	
Ingrediente	Cantidad
Hialuronidasa ACS	450 UI
Lactosa USP	10,0 mg
Fosfato potásico monobásico USP	0,098 mg
Fosfato potásico dibásico USP	10,0 mg
Cantidad de diluyente (0,9% NaCl)	0,3 ml o 0,18 ml

Volumen de inyección	0,5 ml o 0,03 ml
-----------------------------	-------------------------

Las cantidades de diluyente y volúmenes de inyección están catalogados arriba para una dosis de 75 UI. Las cantidades de diluyente pueden ser cambiadas para variar la dosificación.

En otra formulación alternativa específica, la hialuronidasa ACS es suministrada en una forma líquida y está mostrada en la tabla 5 a continuación:

TABLA 5

Formulación específica C	
Ingrediente	Cantidad
Hialuronidasa ACS	1.500 UI
Lactosa USP	1,25 mg
Fosfato potásico monobásico USP	0,305 mg
Fosfato potásico dibásico USP	0,48 mg
Volumen de inyección	0,05 ml
Dosis	75 UI

Está contemplado que todos los ingredientes pueden ser reducidos proporcionalmente para conseguir dosificaciones más bajas con el mismo volumen de inyección. También, la cantidad de lactosa puede ser reducida a la mitad o a un cuarto.

TABLA 6

Formulación específica D	
Ingrediente	Cantidad
Hialuronidasa ACS	6.500 UI
Lactosa USP	5,0 mg
Fosfato USP	0,02 mmoles

Como se describe en los ejemplos siguientes, la formulación específica A de la hialuronidasa ACS expuesta en la tabla 2 (arriba) puede ser inyectada directamente en la cámara posterior del ojo a unos niveles de dosificación que provocan efectos terapéuticos deseables, que incluyen pero no se limitan necesariamente al efecto de limpieza de la hemorragia del vítreo de la presente invención, sin provocar toxicidad significativa para el ojo o las estructuras anatómicas asociadas. De forma alternativa, las formulaciones específicas B o C de hialuronidasa ACS pueden ser así inyectadas. Además otra alternativa proporciona el uso de la formulación específica D de hialuronidasa ACS expuesta en la tabla 6 en los métodos de la presente invención.

Toxicidades oftálmicas de timerosal, hialuronidasa ACS y hialuronidasa (Wydase®) en Conejos

Ejemplo 1

Cincuenta y dos (52) conejos saludables de la raza cruzada de Nueva Zelanda (26 macho, 26 hembra) pesando 1,5 kg a 2,5 kg, fueron individualmente marcados para su identificación y fueron alojados individualmente en jaulas colgadas. Los animales recibieron un alimento para conejos en comprimidos comercialmente disponibles en una base diaria, con agua corriente disponible *ad libitum*.

Los animales fueron divididos en trece grupos de 4 animales cada uno (2 macho, 2 hembra). Dos animales de cada grupo (1 macho, 1 hembra) fueron seleccionados para una fotografía del fondo con pretratamiento y angiografía con fluoresceína.

La fotografía del fondo fue realizada fijando los animales y visualizando el nervio óptico, los arcos de la retina con el fondo con una cámara para fondo KOWA® RC-3 cargada película Kodak Gold 200 ASA.

La angiografía de fluoresceína implicaba una inyección de 1,5 ml de 2% solución de fluoresceína estéril por medio de la vena marginal de la oreja. Aproximadamente 30 segundos post-inyección la fluoresceína fue visualizada después de la localización del nervio óptico, vasos retinales y fondo.

Al día siguiente, cada animal fue anestesiado mediante la administración intravenosa de una combinación de 34 mg/kg de hidrocloreuro de ketamina y 5 mg/kg xilazina. Los párpados fueron retraídos usando un blefarostato, y los ojos fueron desinfectados con un lavado de providona yodada.

Se administraron tratamientos experimentales de solución salina equilibrada (BSS), BSS + timerosal, hialuronidasa (Wydase®) o hialuronidasa ACS por inyección usando una jeringa tuberculina de 1 cc con una aguja de calibre 30, de 0,5 pulgadas unida a ella. La solución de hialuronidasa ACS utilizada en este ejemplo estaba libre de timerosal y estaba constituida por la formulación de la hialuronidasa ACS específica expuesta en la tabla 2 más arriba.

Los tratamientos experimentales administrados a cada grupo de animales fueron los siguientes:

<u>Grupo #</u>	<u>Tratamiento</u>
1	BSS
2	BSS + 0,0075 mg timerosal
3	BSS + 0,025 mg timerosal
4	Hialuronidasa (Wydase) 1 UI
5	Hialuronidasa (Wydase) 15 UI
6	Hialuronidasa (Wydase) 30 UI
7	Hialuronidasa (Wydase) 50 UI
8	Hialuronidasa (Wydase) 150 UI
9	Hialuronidasa ACS 1 UI
10	Hialuronidasa ACS 15 UI
11	Hialuronidasa ACS 30 UI
12	Hialuronidasa ACS 50 UI
13	Hialuronidasa ACS 150 UI

El día después de las inyecciones (día 1), los 26 animales que fueron sometidos a la fotografía del fondo y angiografía con fluoresceína fueron observados usando los mismos métodos que para el examen de predosificación.

En el día 2 después de las inyecciones, los 13 conejos macho que recibieron la fotografía del fondo y angiografía con fluoresceína en la predosificación y día 1, así como los 13 conejos hembra que no fueron seleccionados para la fotografía fueron eutanizados con un fármaco a base de pentobarbital de sodio. Los ojos fueron luego extraídos quirúrgicamente y colocados en una solución de fijación del 2,5% de glutaraldehído con 0,1 M de suero salino tamponado con fosfato a pH 7.37.

De forma alternativa, un conejo seleccionado de forma aleatoria fue eutanizado por inyección de pentobarbital pero después fue fijado por inyección intracardíaca de la solución del glutaraldehído en el ventrículo izquierdo para determinar el efecto del procedimiento de fijación en las conclusiones de la histología dentro de los ojos enucleados.

En el día 7, los 13 conejos hembra que fueron previamente fotografiados y en los que se realizó la angiografía fueron sometidos a las mismas observaciones según los métodos previamente descritos.

Los 26 animales restantes fueron eutanizados según el modo descrito anteriormente 7 días después de la dosificación. Los ojos fueron fijados de la misma manera que los que fueron fijados en el día 2. También, un conejo seleccionado de forma aleatoria fue sometido al mismo procedimiento de fijación intracardíaca del glutaraldehído descrito anteriormente para el animal seleccionado previamente de forma aleatoria.

Los ojos de los animales tratados en este ejemplo fueron examinados a fondo y por microscopio para evidenciar las toxicidades relacionadas con el tratamiento. Una tabla que expone un resumen de la evidencia histológica de la toxicidad o no toxicidad en cada grupo de tratamiento, está expuesta en la figura 3.

En resumen, los ojos del grupo de control tratado con BSS no tuvieron toxicidad en los días 2 y 7 post-dosis.

Los ojos de los animales del grupo n°. 2 tratados con BSS+timerosal (0,0075 mg) no tuvieron toxicidad en el día 2, pero presentaron evidencia de que había una descomposición de la barrera de la retina-sangre en el día 7.

Los animales del grupo n°. 3 tratados con BSS + timerosal (0,025 mg) presentaron efectos tóxicos graves relacionados con el tratamiento, en los días 2 y 7 post-dosis.

Los animales del grupo n°. 4 tratados con Wydase® en la dosis de 1 UI no tuvieron toxicidad en los días 2 y 7, no obstante, los ojos de los animales en los grupos Nos. 5-8 tratados con Wydase® con dosificaciones entre 15 IU-150 UI presentaron generalmente efectos tóxicos relacionados con la dosis en los días 2 y 7 post-dosis.

ES 2 281 128 T3

Los ojos de animales en los grupos de tratamiento Nos. 9-13 tratados con hialuronidasa ACS, en dosificaciones entre 1 UI-150 UI, generalmente no tenían evidencias de efectos tóxicos en los días 2 y 7 post-dosis. Sin embargo, se observó cierta fuga de la fluoresceína en los animales tratados con las dosis de 150 UI.

- 5 Por consiguiente, se concluye que el timerosal y la formulación de Wydase® con timerosal causó efectos tóxicos en los ojos de conejos en las dosificaciones evaluadas, no obstante, la hialuronidasa ACS no provocó efectos tóxicos en estos animales con las dosificaciones evaluadas.

10 Los resultados de los exámenes realizados en el día 7 están resumidos en la figura 3. Como se muestra, en la figura 3, se observaron efectos tóxicos significantes en el día 7 en los ojos de los conejos tratados con BSS más timerosal (0,0075 mg) y hialuronidasa (Wydase) en todas las dosis entre 1 IU-150 UI. Por el contrario, no se observaron efectos tóxicos en los ojos de los animales tratados con hialuronidasa ACS con dosis de 1-150 UI.

15 Seguridad y eficacia de hialuronidasa ACS inyectada por vía intravítrea en ojos de conejo

Ejemplo 2

20 En este ejemplo, 12 conejos saludables de la raza cruzada de Nueva Zelanda fueron marcados para su identificación y se alojaron individualmente en jaulas colgadas. Los animales recibieron alimento para conejos en comprimidos comerciales en una base diaria y agua corriente estaba disponible *ad libitum*.

25 Los animales fueron divididos de forma aleatoria en cuatro (4) grupos de tratamiento de tres (3) animales cada uno.

Inicialmente, los ojos de cada animal fueron examinados por dilatación con 1-2 gotas del 10% tropicamida seguido de examen extenso, oftalmoscopia indirecta usando una lente de 20 dioptrías, y examen con lámpara de hendidura de la anatomía anterior del ojo.

30 Siguiendo el examen inicial de los ojos de los animales, 100:1 o 10:1 de sangre fue inyectada por vía intravítrea en cada ojo de cada animal.

35 En el día 2, los animales de cada grupo de tratamiento recibieron una única inyección intravítrea de BSS o hialuronidasa ACS en el ojo derecho, conforme al siguiente plan de tratamiento:

<u>Grupo #</u>	<u>Tratamiento</u>	
	<u>Ojo izquierdo</u>	<u>Ojo derecho</u>
A	Ninguno	BSS (30 :1) x 1
B	Ninguno	25 UI Hialuronidasa ACS en 30:1x1
C	Ninguno	50 UI Hialuronidasa ACS en 30 :1x1
D	Ninguno	75 UI Hialuronidasa ACS en 30 :1 x 1

La preparación de hialuronidasa ACS usada en este experimento fue la formulación descrita anteriormente y mostrada en la tabla 2.

65 En los días 3, 5, 7, 14 y 21 los ojos de cada animal fueron otra vez examinados por lámpara de hendidura para evaluar la córnea, cámara anterior e iris. Además, los ojos de cada animal fueron dilatados con el 10% de solución de tropicamida y la retina fue examinada por oftalmoscopia indirecta con una lente de 20 dioptrías.

ES 2 281 128 T3

La eficacia de limpieza de hemorragia observada de la hialuronidasa ACS está resumida en la figura 4. En general, el ojo izquierdo (no tratado) de cada animal en cada grupo de tratamiento contenía un vítreo nublado y algunos coágulos de sangre, debido a la cantidad de sangre que había sido inyectada en su interior. Los ojos derechos de los animales tratados (control) con BSS del grupo A también contenían vítreos nublados y algunos coágulos de sangre, mientras que los ojos derechos de todos los animales tratados con hialuronidasa en los Grupos de tratamiento B-D contenían vítreo que estaba limpio y a través del cual la visualización transvítrea de la retina fue posible. Además, las retinas de los ojos derechos de todos los animales de los grupos de tratamiento B-B parecieron normales y libres de toxicidad relacionada con el tratamiento.

Los resultados de este experimento indican que la hialuronidasa ACS administrada por vía intravítrea fue eficaz en dosis individuales de 25, 50, y 75 UI, para acelerar el nivel al cual la sangre fue despejada de los ojos de los animales tratados y además que estas dosis individuales de hialuronidasa ACS administradas en este experimento no causaron efectos tóxicos observables en los ojos de los conejos tratados en este experimento.

En una variación, el ejemplo fue realizado exactamente como antes excepto que en vez de administrar una dosis individual, se administraron dosis múltiples en la cantidad de cuatro (4) dosis consecutivas de hialuronidasa ACS en intervalos de 2 semanas. Las observaciones después de cada dosis fueron uniformes y están resumidas en la figura 5. En general, el ojo izquierdo (no tratado) de cada animal en cada grupo de tratamiento, contenía humor vítreo nublado y algunos coágulos de sangre, debido a la cantidad de sangre que fue inyectada en su interior. Los ojos derechos de los animales (control) tratados con BSS del Grupo A también contenían vítreos nublados y algunos coágulos de sangre, mientras que los ojos derechos de todos los animales en los Grupos de tratamiento B-D (es decir, los animales tratados con hialuronidasa ACS) contenían vítreos nítidos a través de los cuales la visualización transvítrea de la retina fue posible. Además, las retinas de los ojos derechos de todos los animales en los grupos de tratamiento B-D parecieron ser normales y estar libres de toxicidad relacionada con el tratamiento, incluso después de dosis múltiples de hialuronidasa ACS.

Los resultados de este experimento indican que la hialuronidasa ACS administrada por vía intravítrea fue eficaz, en dosis individuales de 25, 50, y 75 UI x 4, para acelerar el nivel en el cual la sangre fue despejada de los ojos de los conejos y además que estas dosis de hialuronidasa ACS no causaron efectos tóxicos observables en los ojos de los conejos tratados, incluso después de cuatro (4) dosis consecutivas de hialuronidasa ACS administrado en intervalos de 2 semanas.

Seguridad y eficacia de la hialuronidasa ACS inyectada por vía intravítrea en ojos humanos

Ejemplo 3

El objetivo primario de este estudio fue el de determinar si una solución salina equilibrada conteniendo un extracto de hialuronidasa altamente purificada de tejido testicular ovino podría ser inyectada en el vítreo de ojos visualmente perjudicados sin suscitar ningún efecto adverso ocular grave.

Materiales y métodos

Una Solución Salina Equilibrada (BSS) fue empleada como el placebo de control, y fue obtenida por Allergan Pharmaceuticals (Irvine, CA). BSS contenía el 0,64% de cloruro de sodio, 0,075% de cloruro de potasio, 0,048% de dihidrato de cloruro de calcio, 0,03% de hexahidrato de cloruro de magnesio, 0,39% de trihidrato de acetato de sodio, 0,17% de dihidrato de citrato de sodio, hidróxido de sodio/ácido clorhídrico suficiente para el ajuste del pH a 7.1-7.2, y agua para inyección (qs. 100%). Partes alícuotas de treinta microlitros de BSS o formulación D específica de hialuronidasa (Tabla 6) fueron cargadas en una microjeringa de 300 μ l ajustada con una aguja de calibre 29 de 0,5 pulgadas de longitud. Las microjeringas cargadas fueron luego usadas para inyectar el material en el vítreo del ojo del paciente.

Inicialmente, los ocho sujetos humanos con al menos un ojo visualmente perjudicado fueron asignados de forma aleatoria para recibir por vía intravítrea bien 50 μ l de 50 UI de hialuronidasa ACS en BSS o BSS solo (proporción 3:1). Después de un mes de continuación para asegurar que la dosificación de 50 UI fue bien tolerada, un segundo grupo de seis sujetos visualmente perjudicados fueron inscritos en el estudio y asignados de forma aleatoria a un grupo de dosificación más alta de hialuronidasa ACS (100 UI) o BSS de control en una, proporción 2:1.

Los procedimientos usados para evaluar la seguridad de los sujetos de la prueba fueron completados en varios intervalos en todo el estudio, e incluían la oftalmoscopia indirecta, fotografía del fondo, angiografía con fluoresceína, electroretinografía, examen externo del ojo, biomicroscopía con lámpara de hendidura, tonometría por aplanación, paquimetría, y autorrefracción.

Un grupo de control de placebo concurrente fue incluido en el estudio de modo que eventos adversos peculiarmente relacionados con la hialuronidasa ACS pudieran ser distinguidos de aquellos atribuibles al vehículo (BSS)/procedimiento de inyección. Sólo los ojos visualmente perjudicados fueron tratados, adicionalmente, puesto que los artículos de la prueba fueron inyectados cerca de la retina y no se pudo observar como amenaza ninguna respuesta adversa de naturaleza seria. Los pacientes fueron asignados para tratamiento usando un esquema de aleatorización generado

por ordenador con el número 601 para la primera fase del estudio, y 701 para el segundo. Ni los pacientes ni los investigadores fueron conscientes de si fue el vehículo BSS o la solución hialuronidasa ACS/BSS el que estaba siendo inyectado por vía intravítrea.

Después del establecimiento de una línea de base para cada paciente los sujetos fueron inyectados bien con la enzima o el control de placebo. Los pacientes fueron colocados en una posición sentada en una silla cómoda. Una o dos gotas de un anestésico local fueron tópicamente instiladas en el ojo que debía ser tratado, tras lo cual se pidió al paciente que mirara hacia abajo y un bastoncillo de algodón empapado en solución oftálmica de hidrocloreto de Proparacaína fue aplicado durante 10 segundos en un área de la esclerótica aproximadamente a 4-5 mm sobre la córnea (posición superior/12:00 meridiano). El sujeto de la prueba fue luego inyectado en el vítreo a través de una aguja de calibre 29 fijada a una microjeringa de 200 μ l que fue insertada hasta la longitud total de la aguja en el sitio de aplicación del segundo anestésico.

Resultados

Aunque sólo se logró importancia estadística de forma no frecuente, los datos de la biomicroscopía con la lámpara de hendidura sugirieron que una proporción sustancialmente más alta de pacientes tratados con las preparaciones de hialuronidasa ACS/ BSS en oposición a BSS solo presentaron cambios patológicos en el segmento anterior, siendo el más prominente la presencia de células y fiare en la cámara anterior. No obstante, después de la sexta visita (post-tratamiento de un mes), no se observaron diferencias en el intergrupo para ninguna de las variables evaluadas por la lámpara de hendidura.

Las respuestas retinales/corticales, según se midió por electroretinografía/potencial visual evocado se deterioraron con el tiempo en un paciente tratado con BSS y dos a los que se les dio 50 UI de hialuronidasa ACS/BSS. No obstante, las alteraciones en modelos electroretinográficos fueron siempre bilaterales y no ocurrieron en los ojos tratados o no tratados de los pacientes a quienes se les asignaron dosis elevadas (100 UI) de hialuronidasa ACS/BSS, ni tampoco los resultados de la prueba angiográfica con fluoresceína indicaron que hubiera isquemia retinal en ningún ojo sin tener en cuenta el tratamiento.

Los exámenes indirectos oftalmoscópicos revelaron licuefacción y el establecimiento de desprendimiento vítreo posterior (PVD) en los ojos de los sujetos de la prueba. El vítreo fue caracterizado por presentar un alto grado de motilidad y/o licuefacción poco después de inyectar a los sujetos de la prueba; lo cual estaba previsto para las preparaciones con hialuronidasa ACS. Algunos de los ojos de la prueba que fueron inyectados con BSS de control deberían presentar licuefacción y PVD, que estaba presente posiblemente antes del tratamiento, puesto que éste no poseía ninguna actividad enzimática y fue administrado en un volumen muy pequeño (30 μ l).

Por lo que se refiere al PVD, en el primer grupo de pacientes, cuatro de los seis pacientes que iban a ser tratados con hialuronidasa ACS presentaron ausencia de PVD por biomicroscopía con la lámpara de hendidura (es decir, 601, 602, 604, y 606)(Ver Tabla 6 más abajo). Después del tratamiento, cada uno de estos sujetos mostró la presencia de PVD. Los resultados del segundo grupo de pacientes fueron menos claros, debido a dificultades en la formación de imágenes del vítreo usando la microscopía de la lámpara de hendidura.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 6

Estudio de seguridad humano con inyección de hialuronidasa ACS 50 :1 y 100 :1 por vía intravítrea						
Número	Dosis enzimática	Ojo tratado	Biomicroscopía con la lámpara de hendidura de presencia de PVD tratado con línea base		Día para PVD	Motilidad vítrea
601	50	OD	No	Sí	2 Días	+3/+4
602	50	OD	No	Sí	1 Día	+4
603	BSS	OD	Sí	Sí	-	+3
604	50	OD	No	Sí	1 Día	+3
605	BSS	OS	Sí	Sí	-	+3/+4
606	50	OD	No	Sí	14 Días	+3/+4
607	50	OD	Sí	Sí	-	+3/+4
608	50	OD	Sí	Sí	-	+3
701	100	OS	No	?	-	+2
702	100	OD	No	?		+4
703	BSS	OD	Sí	Sí		
704	100	OS	No	?		
705	100	OD	No	Sí	1 Día	
706	BSS	OS	No	No		

Dados los resultados del Ejemplo 2 donde la inyección de hialuronidasa ACS en el vítreo de conejos en varias dosis hasta 150 UI no resultó en ningún cambio significativo histopatológico en un estudio anterior preclínico, se esperaba que las dosis inferiores a 150 UI fueran bien toleradas en los seres humanos. Siguiendo con esta expectativa, la administración intravítrea de hialuronidasa ACS/BSS en ojos visualmente perjudicados en la prueba actual suscitó pocos síntomas, se creyó que todos ellos eran atribuibles al propio procedimiento de la inyección ya que ocurrieron con frecuencia comparable en cada uno de los grupos del estudio, y las secuelas adversas relacionadas con el tratamiento fueron relativamente leves y de corta duración.

Además, se observó que el tratamiento de los ojos humanos con hialuronidasa ACS aumentaba la incidencia de desprendimiento del vítreo posterior observado. El aumento observado de PVD en pacientes inyectados por vía intravítrea con hialuronidasa ACS muestra que los métodos de la presente invención son eficaces para inducir la licuefacción y el desprendimiento del humor vítreo. Así, los resultados del presente estudio indican que la hialuronidasa ACS puede ser inyectada en el vítreo de seres humanos sin suscitar complicaciones serias u oculares a largo plazo.

Uso de hialuronidasa para acelerar la limpieza de la sangre hemorrágica del vítreo del ojo

El ejemplo 4 expuesto a continuación describe casos en los que se usó hialuronidasa ACS intravítrea para acelerar la limpieza de la sangre hemorrágica del vítreo del ojo. En el ejemplo 4, la hialuronidasa usada fue la formulación de la hialuronidasa ACS sin timerosal anteriormente descrita y mostrada en la tabla 2.

Ejemplo 4

Limpieza acelerada de la hemorragia después de la hialuronidasa intravítrea

5 En este experimento, seis (6) pacientes humanos (5 mujeres, 1 hombre) que se presentaron con hemorragia del vítreo fueron tratados con inyecciones intravítreas individuales de hialuronidasa ACS con dosificaciones de 50-200 UI.

10 La hialuronidasa ACS administrada en este experimento fue preparada mediante la formulación, descrita a continuación y mostrada en la tabla 2.

15 Todos los pacientes tratados en este experimento tienen una historia de retinopatía diabética, y se encontró que tenían hemorragias del vítreo de duración variable. En cada paciente, la cantidad de sangre presente en el vítreo fue suficiente para impedir la visión de la retina por medios fundoscópicos estándares.

Cada paciente recibió una inyección intravítrea individual de hialuronidasa ACS. Cuatro (4) pacientes recibieron una dosis de 50 UI, un (1) paciente recibió una dosis de 70 UI, y un (1) paciente recibió una dosis de 200 UI.

20 Los resultados observados en este experimento están resumidos en la Figura 6.

En los seis (6) pacientes tratados en este ejemplo, el vítreo hemorrágico se volvió suficientemente nítido para permitir la visión transvítrea de la retina en los 6-16 días de la inyección intravítrea individual de la hialuronidasa ACS. Se determinó subjetivamente que esta limpieza del vítreo había ocurrido significativamente más rápido de lo que se había previsto que ocurriera en los pacientes sin tratamiento de hialuronidasa.

25 Debe ser destacado que a diferencia de la fuga de fluoresceína observada con dosis más altas de hialuronidasa ACS en conejos, no se observó toxicidad en este estudio humano.

30 *Uso de hialuronidasa para tratar otros trastornos oftalmológicos*

Los solicitantes han observado adicionalmente la eficacia de la administración intravítrea individual de la hialuronidasa ACS, a una dosis experimental, para el tratamiento de algunos trastornos oftalmológicos. Los pacientes que sufrieron trastornos previamente diagnosticados del ojo, incluso retinopatía diabética proliferativa, degeneración macular asociada con la edad, ambliopía, retinitis pigmentosa, agujeros maculares, exudados maculares y edema macular cistoide, ha presentado una mejora en los síntomas clínicos de estos trastornos tras el tratamiento con hialuronidasa ACS.

Los solicitantes también han determinado que la formulación de la hialuronidasa ACS de la presente invención puede ser administrada por vía intravítrea en dosis de o de más de 1 UI sin provocar daño tóxico en el ojo y así es utilizable para efectuar una pronta licuefacción del cuerpo vítreo y concomitantemente la desconexión o desprendimiento del cuerpo vítreo de la retina y otros tejidos (p. ej., membranas epirretinales, mácula). Como resultado de esto la licuefacción y el desprendimiento del vítreo, las fuerzas físicas de tracción del vítreo en la retina y otros tejidos son minimizados y el nivel de producción natural de líquidos se acelera dentro del vítreo. En consecuencia, la formulación de la hialuronidasa ACS del solicitante es particularmente adecuada para el tratamiento de muchos trastornos (p. ej., retinopatía proliferativa diabética, degeneración macular asociada con la edad, ambliopía, retinitis pigmentosa, agujeros maculares, exudados maculares y edema macular cistoide) que se benefician de la licuefacción/desconexión del vítreo y/o limpieza acelerada de toxinas u otras sustancias deletéreas (p. ej., factores angiogénicos, líquidos del edema, etc.) de la cámara posterior del ojo y/o de tejidos contiguos a la cámara posterior (p. ej., la retina o mácula). Además, también se piensa que la licuefacción del vítreo elimina la matriz, en forma de vítreo polimerizado, necesario para soportar la neovascularización. Así, la presente invención es útil para la prevención o reducción de la incidencia de la neovascularización retinal.

Además, muchos trastornos oftálmicos tienen como componente causativo, una desestabilización de la membrana de la retina-sangre. Está desestabilización permite que distintos componentes (p. ej., componentes del suero, lípidos, proteínas) de los coriocapilares se introduzcan en la cámara vítrea y dañen la superficie de la retina. Esta desestabilización es también un precursor de la infiltración vascular de la cámara vítrea, conocida como neovascularización.

Por consiguiente, las formas de realización de la presente invención están dirigidas a la prevención y tratamiento de varios trastornos del ojo mamífero que resultan del daño o patología a la vascularización del ojo o que resultan en un daño en la barrera de la retina-sangre. Ejemplos de enfermedades de este tipo incluyen pero no se limitan a retinopatía proliferativa diabética, degeneración macular relacionada con la edad, ambliopía, retinitis pigmentosa, agujeros maculares, exudados maculares, y edema macular cistoide, y otros en los que los síntomas clínicos de estos trastornos responderte al tratamiento de la hialuronidasa ACS de la presente invención.

65 Los siguientes son ejemplos de aplicación que utilizan la preparación de hialuronidasa ACS descrita anteriormente, dando como resultado mejoras de los trastornos oftalmológicos descritos. Sin embargo, la presente invención contempla el uso de enzimas aparte de la hialuronidasa ACS para inducir la licuefacción del vítreo. Ejemplos de enzimas alternativas utilizables con la presente invención incluyen: otras enzimas glicosaminoglicanasas tales como otras pre-

paraciones de hialuronidasa, condroitinasa ABC, condroitinasa AC, condroitinasa B, condroitina 4-sulfatasa, condroitina 6-sulfatasa, y B-glucuronidasa. Las colagenasas están también contempladas. Las proteasas están adicionalmente previstas.

- 5 Un experto en la técnica que desee utilizar una enzima distinta a la hialuronidasa ACS para practicar los métodos de la presente invención usará las instrucciones de la presente para seleccionar una enzima apropiada y su dosificación. Específicamente, los ejemplos que discuten las especificidades enzima-sustrato y estudios de la no toxicidad serían realizados con candidatos enzimáticos para establecer su eficacia al usarse con la presente invención. Por consiguiente, las instrucciones contenidas aquí son aplicables para identificar una enzima sustancialmente no tóxica que promueve la licuefacción del vítreo mientras que no provoca daños a la retina u otras estructuras oculares.

Tratamiento con hialuronidasa de la retinopatía proliferativa diabética (PDR)

- 15 La retinopatía diabética es la principal causa de ceguera en edad de trabajo de los americanos. La incidencia de la retinopatía aumenta con el tiempo en estado de la enfermedad, desde un nivel de manifestación de aproximadamente el 50% en diabéticos con la enfermedad durante 7 años hasta aproximadamente el 90% en aquellos con la enfermedad durante más de 20 años. Se estima que la PDR afecta a una estimación de 700.000 americanos.

- 20 Las consecuencias retinovasculares de la diabetes esencialmente consisten, en parte, en fuga microvascular y no perfusión capilar que resulta de la hiperglicemia crónica. La fuga microvascular puede sucesivamente resultar en edema retinal, exudados lipídicos y hemorragias intrarretinales. La no perfusión capilar resulta en la formación de anomalías intrarretinales microvasculares (IRMA). Estas anomalías son derivaciones arteriovenosas formadas para perfundir regiones retinales privadas de vascularización por la degeneración de la arteriola mediada por la diabetes.

- 25 La expresión del factor de crecimiento vascular endotelial de una retina hipóxica en áreas de no perfusión capilar se considera que resulta en el desarrollo de la neovascularización extrarretinal. La neovascularización de este tipo y sus componentes asociados fibrosos pueden espontáneamente ser evolutivos o complicarse por la hemorragia del vítreo o el desprendimiento de la retina por tracción. La neovascularización puede ser fácilmente vista en un angiograma con fluoresceína por la fuga profusa de colorante de estos nuevos vasos puesto que éstos carecen de uniones estancas endoteliales de la vasculatura retinal. Un flujo axoplásmico perjudicado en áreas de la hipoxia retinal resulta en manchas algodonasas.

- 30 La retinopatía proliferativa diabética (PDR) requiere una selección cuidadosa de diabéticos para la identificación y tratamiento tempranos puesto que la PDR permanece ampliamente asintomática en los estadios tempranos. La retinopatía proliferativa diabética puede ser clasificada en tres subgrupos: (1) retinopatía no proliferativa; (2) retinopatía preproliferativa; (3) retinopatía proliferativa. Cada clasificación tiene ciertas características morfológicas. Las características de la retinopatía no proliferativa incluyen microangiopatía capilar (obstrucciones microvasculares y cambios de la permeabilidad, no perfusión de capilares, microaneurismas de los capilares retinales, grosor de la membrana basal, y anomalías internas microvasculares (IRMA); hemorragias intrarretinales; exudados; y cambios maculares. La retinopatía preproliferativa está indicada por ninguno o todos los cambios descritos para la retinopatía no proliferativa y los siguientes: envainamiento venal significativo, exudados de lana de algodón, IRMA extensiva e isquemia retinal extensiva. La retinopatía proliferativa está indicada por neovascularización extrarretinal y proliferación del tejido fibroso, alteraciones vítreas y hemorragia, enfermedad macular, y desprendimiento de retina.

- 45 La creación de tejido fibrovascular es una complicación especialmente, importante de la PDR puesto que frecuentemente conducirá a un daño en la retina mediado por el vítreo. El tejido fibrovascular puede formar membranas prerretinales que crean adhesiones densas con la membrana hialoide posterior. Estas adhesiones son responsables de la transmisión de las fuerzas de tracción vítrea a la retina, que puede resultar en desprendimientos retinales.

- 50 La base vítrea está normalmente firmemente fijada a la retina contigua y a la circunferencia externa de la cabeza del nervio óptico, conocida como el anillo de Martegiani. La fijación del vítreo a la retina en todos los demás sitios entre el anillo de Martegiani y la base vítrea es mucho menos firme. La neovascularización de la retina conduce a la formación de membranas vasculares que se extienden en el vítreo desde la cabeza del nervio o en otro lugar del fondo. La contracción de estas membranas pueden causar un desprendimiento de retina parcial o completo.

- 55 El desprendimiento de retina en la mácula es una complicación más importante de la PDR. Muchos desprendimientos retinales que resultan de lo PDR comienzan como desprendimientos traccionales sin agujeros, pero pueden volverse regmatógenos por la formación de agujeros retinales en un punto posterior de la enfermedad. Los desprendimientos traccionales son provocados por adhesiones vitreoretinales anormales o tracción vítrea con contracción posterior de las bandas fibrosas y elevación de la retina.

- 60 La presente invención contempla el tratamiento de la PDR en los estados preproliferativos y proliferativos usando inyecciones intravítreas de hialuronidasa ACS. Sin limitarse a un mecanismo particular, se cree que el efecto de la inyección de hialuronidasa ACS intravítrea es el de promover la limpieza de la fase líquida del vítreo. El nivel de transferencia de agua tratada inyectada por vía intravítrea desde el vítreo medio hasta el coroides fue significativamente aumentado después de la despolimerización del ácido hialurónico vítreo por la hialuronidasa ACS inyectada. La presente invención aprovecha esta observación para licuificar el vítreo, por ejemplo, para promover la limpieza de varios factores inductores del crecimiento y otros productos del suero filtrados en el vítreo debido a la presencia de la

PDR. Es adicionalmente contemplado que el tratamiento de la hialuronidasa ACS de la presente invención puede ser realizado solo o en combinación con otros tratamientos de PDR.

Ejemplo 5

Tratamiento de retinopatía preproliferativa diabética

En el Ejemplo 5, un paciente diabético que manifiesta retinopatía preproliferativa diabética es tratado por esta complicación de diabetes mellitus a través de la inyección intravítrea de hialuronidasa ACS. El propósito de este tratamiento es el de reducir o prevenir el desarrollo de la retinopatía proliferativa diabética manifestado por la neovascularización extrarretinal y la proliferación del tejido fibroso, alteraciones y hemorragia vítreas, enfermedad macular, y desprendimiento de retina.

Una vez que a un paciente se le ha diagnosticado diabetes, se realiza una mayor vigilancia oftálmica, dado el alto porcentaje de individuos que padecen esta enfermedad desarrollando más tarde la retinopatía proliferativa diabética (PDR). Esta vigilancia aumentada debería incluir exámenes periódicos retinales y angiogramas con fluoresceína para controlar la extensión de envainamiento venal, IRMA, e isquemia retinal.

Cuando la retinopatía preproliferativa diabética empieza a alcanzar la fase proliferativa, comienza el tratamiento de la hialuronidasa ACS. Esta fase está definida como la presencia de envainamiento venoso en 2 o más cuadrantes, IRMA en uno o más cuadrantes, y/o microaneurisma y hemorragias de puntos en todos los cuadrantes. Una vez que estas indicaciones están presentes, comienza el método de tratamiento con hialuronidasa ACS de la presente invención.

El paciente recibirá un examen completo oftálmico para establecer una línea de base de salud ocular. El examen oftálmico incluye oftalmoscopia indirecta, biomicroscopía con lámpara de hendidura, examen periférico retinal, mediciones de la presión intraocular, sintomatología de la agudeza visual (sin ayuda y corregida), fotografía del fondo, angiografía con fluoresceína, electroretinografía y mediciones con A-scan.

Después del examen preliminar, una inyección intravítrea de hialuronidasa ACS es dada al ojo afectado del paciente. Si ambos ojos están afectados, pueden ser tratados por separado. El ojo a tratar es inyectado con 50:1 de 50 UI de la solución oftálmica de hialuronidasa ACS anteriormente descrita por vía intravítrea para promover la despolimerización del ácido hialurónico vítreo, dando como resultado la licuefacción del vítreo.

Después del tratamiento, los ojos del paciente deben ser examinados en los días uno (1), dos (2), siete (7), quince (15), treinta (30) y sesenta (60). En cada día del examen el paciente es vigilado con respecto a la licuefacción vítreo. Además, el paciente es vigilado con respecto a los desprendimientos vítreos posteriores usando la oftalmoscopia indirecta con la depresión escleral. Finalmente, la extensión de la PDR presentada por el paciente es continuamente vigilada a través de exámenes periódicos retinales y angiogramas con fluoresceína para controlar la extensión del envainamiento venal, IRMA, e isquemia retinal.

Ejemplo 6

Tratamiento de la retinopatía proliferativa

En este ejemplo, un paciente diabético que manifiesta retinopatía proliferativa diabética es tratado con la inyección intravítrea de hialuronidasa ACS. El propósito de este tratamiento es reducir la extensión de la retinopatía proliferativa diabética, prevenir las manifestaciones posteriores de la enfermedad después de la eliminación de cualquier tejido extrarretinal neovascularizado, y reducir la probabilidad de desprendimiento de retina.

Un paciente que presenta retinopatía proliferativa diabética recibirá el tratamiento de la hialuronidasa ACS de la presente invención en combinación con el tratamiento quirúrgico del tejido neovascularizado. La proliferación normalmente comienza con la formación de vasos nuevos con muy poco componente de tejido fibroso. Estos surgen a partir de elementos mesenquimales primitivos que se diferencian en las células endoteliales vasculares. Los canales vasculares recién formados sufren después metaplasia fibrosa; es decir, los brotes angioblásticos son transformados en tejido fibroso.

Los nuevos vasos pierden fluoresceína, así la presencia de proliferación es especialmente notable durante la angiografía. Los vasos nuevos y el tejido fibroso se abren paso a través de la membrana limitadora interna y se ramifican en la interfaz entre la membrana limitadora interna y la membrana posterior hialoide. El tejido fibrovascular puede formar membranas prerretinales que crean adhesiones densas con la membrana posterior hialoide. Estas adhesiones son extremadamente importantes porque son responsables de transmitir las fuerzas de tracción vítreo a la retina durante la fase posterior del encogimiento del vítreo.

La fase proliferativa de la PDR está definida como la presencia de tres o más de las siguientes características: vasos nuevos, vasos nuevos en o dentro de un diámetro del disco del nervio óptico, vasos graves nuevos (tal y como se define por una tercera neovascularización del área del disco del nervio óptico o neovascularización de una mitad del área del disco del nervio óptico o neovascularización de una mitad del área del disco en otro lugar), y hemorragia prerretinal o vítreo.

Una vez diagnosticada la entrada en la fase proliferativa, el paciente debe recibir un examen completo oftálmico para establecer una línea de base de salud ocular. El examen oftálmico incluye oftalmoscopia indirecta, biomicroscopía con la lámpara de hendidura, examen periférico retinal, mediciones de la presión intraocular, sintomatología de la agudeza visual (agudeza visual sin ayuda y corregida), fotografía del fondo, angiografía con fluoresceína, electrorretinografía y mediciones con A-scan.

Después del examen preliminar, una inyección intravítrea de hialuronidasa ACS es dada a los ojos afectados del paciente. Si ambos ojos están afectados, pueden ser tratados por separado. El ojo es inyectado con 50:1 de 50 UI de la solución oftálmica de hialuronidasa ACS por vía intravítrea para promover la despolimerización del ácido hialurónico del vítreo, dando como resultado la licuefacción del vítreo. Además de la despolimerización del vítreo, el tejido neovascularizado es también tratado directamente para minimizar el daño posterior a la retina usando la fotocoagulación panretinal.

La fotocoagulación panretinal (PRP) puede ser usada para tratar pacientes que presentan PDR en conjunción con el tratamiento de la hialuronidasa ACS de la presente invención. La fotocoagulación panretinal es una forma de fotocoagulación con láser. Habitualmente los láseres tales como el argón verde (614 nm), argón verde azulado (488 y 514 nm), rojo de kriptón (647 nm), colorante sintonizable, láseres-arco con diodos y xenon, son usados para la cirugía retinal. La energía del láser es absorbida predominantemente por los tejidos que contienen pigmento (melanina, xantofil, o hemoglobina) que producen efectos térmicos en las estructuras contiguas. Los láseres de rojo de kriptón son el método preferido de tratamiento, ya que son más capaces de penetrar en las cataratas escleróticas nucleares y en la hemorragia del vítreo que los láseres de argón, que requieren más energía para producir los mismos niveles de penetración.

Los parámetros usados durante cirugía retinal por láser pueden ser modificados dependiendo del objetivo de la fotocoagulación. A un ajuste de la potencia inferior, usando duraciones más largas de tratamiento y produciendo tamaños de manchas más grandes, el láser tiene un efecto coagulante en pequeños vasos. La fotocoagulación con láser focal se usa en diabetes para detener la filtración de microaneurismas. El foco del láser es puesto directamente sobre el microaneurisma para conseguir un ligero blanqueo y cierre del aneurisma. Cuando se aplica como una rejilla sobre un área edematoso de la retina, el láser puede reducir la fuga microvascular. A niveles de energía más altos, es posible la ablación con láser de tejido. Se considera que fotocoagulación panretinal es eficaz para destruir el tejido retinal, reduciendo la cantidad de tejido isquémico en el ojo. Los focos del láser confluyentes pueden ser usados sobre una membrana neovascular para obliterar los vasos anormales.

Debe ser entendido que la presente invención no requiere un orden particular de tratamiento. En una forma de realización, el paciente es tratado primero con hialuronidasa ACS y luego con tratamiento por láser. En otra forma de realización el paciente es sometido primero a un tratamiento por láser seguido del tratamiento con la hialuronidasa ACS de la presente invención.

Después de tratamiento, los ojos del paciente deben ser examinados en los días uno (1), dos (2), siete (7), quince (15), treinta (30) y sesenta (60). En cada día del examen el paciente es vigilado con respecto a la licuefacción del vítreo. Además, el paciente es vigilado con respecto a posteriores desprendimientos del vítreo usando la oftalmoscopia indirecta con depresión escleral. Finalmente, la extensión de la PDR presentada por el paciente es continuamente vigilada a través de exámenes periódicos retinales y angiogramas con fluoresceína para controlar la extensión del envainamiento venal, IRMA, isquemia retinal, neovascularización, y hemorragia del vítreo. La evidencia de la nueva neopolimerización o despolimerización incompleta del vítreo garantizaría un tratamiento de repetición del paciente como se ha descrito anteriormente.

Tratamiento con hialuronidasa de la degeneración macular relacionada con la edad

La presente invención también contempla la utilidad en el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD). La degeneración macular relacionada con la edad consiste en una reducción gradual frecuentemente bilateral de la visión. Es la causa más común de ceguera oficial en adultos. Es probablemente provocada por el envejecimiento y la enfermedad vascular de los coriocalpares o de los vasos retinales aferentes. Hay básicamente dos tipos morfológicos de AMD: "seca" y "húmeda".

La anomalía subyacente de la AMD es el desarrollo de cambios involucionales a nivel de la membrana de Bruch y el epitelio pigmentario retiniano (RPE). La lesión más característica de estos cambios es la drusa. Clínicamente, las drusas (plural de drusa) parecen pequeños depósitos blancos amarillentos a nivel del RPE. Las drusas pueden ser categorizadas como drusas laminares duras, blandas o basales.

La presente invención está dirigida tanto al tratamiento como a la prevención de las formas húmedas y secas de AMD. En la forma húmeda, se considera que la enfermedad afecta a las coriocalpares. Las coriocalpares son un componente del coroides que sirve para vascularizar el globo. Las coriocalpares consisten en una red capilar rica que alimenta la mayor parte de la nutrición al epitelio del pigmento y a las capas externas de la retina. La lesión de las coriocalpares se considera que resulta en última instancia en complicaciones neovasculares, una causa de degeneración macular.

En la forma seca, la degeneración macular no disciforme resulta de una obliteración parcial o total de las coriocapilares subyacentes. Oftalmoscópicamente, la degeneración del epitelio pigmentario retiniano y la formación de agujeros puede ser observada. También, los depósitos epiteliales del subpigmento de material tal como quelatos de calcio o proteináceos y otros pueden ser observados. En ADM seca, los cambios secundarios retinales generalmente ocurren gradualmente, dando como resultado la pérdida gradual de agudeza visual. Sin embargo, en cierto porcentaje de pacientes, resulta una pérdida grave de la visión.

La presente invención contempla la utilidad de tratar ADM seca y prevenir la degeneración macular a través de la licuefacción del vítreo. Se contempla que la licuefacción del vítreo supondrá un aumento a nivel de la limpieza de la retina del material depositado que más tarde resulta en la degeneración macular.

La ADM húmeda resulta con más frecuencia de la insuficiencia de las coriocapilares, conduciendo a la neovascularización epitelial posterior del subpigmento. La neovascularización también se considera que ocurre como una adaptación de la vascularización retinal a la oxigenación inadecuada como resultado de un daño en la vesícula. La neovascularización puede también provocar otros trastornos diferentes tales como el desprendimiento del pigmento del epitelio y la retina sensitiva. Normalmente la enfermedad normalmente comienza después de los 60 años, manifestándose en ambos sexos por igual y en pacientes que presentan la enfermedad, bilateralmente.

Quizás la complicación más importante de la degeneración macular relacionada con la edad es el desarrollo de defectos en las membranas de Bruch del globo a través de las cuales crecen nuevos vasos. Esta neovascularización epitelial puede suponer la producción de depósitos exudativos dentro y debajo de la retina. La neovascularización puede también conducir a la hemorragia en el vítreo, que puede llevar a la degeneración de los bastones y conos de la retina, y edema macular cistoide (discutido más abajo). Un agujero macular puede formarse el cual resulta en una pérdida visual irreversible.

Aunque afecta sólo al 10% de pacientes con AMD, las complicaciones neovasculares de AMD suponen la mayoría arrolladora de casos de pérdida visual grave. Los factores de riesgo incluyen edad en aumento, drusas blandas, atrofia no geográfica, historia familiar, hiperopía, y desprendimientos epiteliales del pigmento retinal. Los síntomas de neovascularización coroidal en AMD incluyen metamorfopsia, escotomas paracentrales o visión central reducida. Conclusiones oftalmoscópicas incluyen líquido subretinal, sangre, exudados, desprendimiento de RPE, cambios císticos retinales, o la presencia de membrana neovascular subretinal verde grisácea. La angiografía de la fluoresceína es frecuentemente un método eficaz de diagnóstico. Durante este procedimiento diagnóstico, el agrupamiento progresivo del colorante en el espacio subretinal, visto como un velado de los límites de la lesión o fuga de fuentes sin determinar es indicativo de la enfermedad. Otros componentes de membranas coroidales neovasculares según está determinado por la angiografía con fluoresceína incluyen fluorescencia bloqueada elevada, fluorescencia bloqueada plana, sangre, y cicatriz disciforme.

La presente comprensión de AMD neovascular sugiere que la neovascularización clásica coroidal es el componente de la lesión más fuertemente asociado con el deterioro visual rápido. Por consiguiente, el tratamiento de AMD debe comprender todos los componentes neovasculares y fibrovasculares de la lesión. Actualmente, el tratamiento está sólo indicado cuando la neovascularización clásica tiene límites que están bien demarcados, y la fotocoagulación ha demostrado ser provechosa.

En ojos con neovascularización extrafoveal coroidal (≥ 200 micros desde el centro foveal), la fotocoagulación con láser de argón disminuyó la incidencia de pérdida visual grave, (≥ 6 líneas) a los 5 años del 64% al 46%. La neovascularización recurrente se desarrolló en la mitad de los ojos tratados con láser, normalmente en el primer año después del tratamiento. La neovascularización recurrente fue invariablemente asociada con el desarrollo de la pérdida visual grave.

En ojos con neovascularización yuxtafoveal coroidal (1 a 199 micras desde el centro foveal), la fotocoagulación con láser de kriptón disminuyó la incidencia de pérdida visual grave del 45% al 31% a 1 año, aunque la diferencia entre los grupos no tratados y los tratados fue menos marcada a los 5 años.

El tratamiento con láser sigue siendo un método terapéutico para el tratamiento de AMD, sin embargo, la presente invención ampliaría este método mediante la reducción de la reincidencia de la neovascularización.

Ejemplo 7

Tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad

En este ejemplo, un paciente que manifiesta degeneración macular relacionada con la edad es tratado con una inyección intravítrea de hialuronidasa ACS. El propósito de este tratamiento es reducir o prevenir el desarrollo de la neovascularización, la enfermedad macular, y el daño retinal.

Cuando un paciente alcanza la edad de 60 años, se realiza una mayor vigilancia oftálmica para detectar la presencia de ADM. Esta vigilancia aumentada debería incluir exámenes periódicos retinales y angiogramas con fluoresceína para controlar para la presencia de líquido subretinal, sangre, exudados, desprendimiento de RPE, cambios císticos retinales, o la presencia de membrana neovascular subretinal verde grisácea.

Cuando se diagnostica ADM, se comienza un régimen de tratamiento con hialuronidasa ACS junto con o sin otros tratamientos tales como la fotocoagulación. Como primera fase de tratamiento, el paciente recibirá un examen oftálmico completo para establecer una línea de base de salud ocular. El examen oftálmico incluye una oftalmoscopia indirecta, biomicroscopia con lámpara de hendidura, examen periférico retinal, mediciones intraoculares de la presión, sintomatología de agudeza visual (sin ayuda y corregida), fotografía del fondo, angiografía con fluoresceína, electroretinografía y mediciones con A-scan.

Siguiendo el examen preliminar, una inyección intravítrea de hialuronidasa ACS es dada al ojo afectado del paciente que manifiesta ADM. Si ambos ojos están afectados, pueden ser tratados por separado. El ojo a tratar es inyectado con 50:1 de 50 UI de la solución oftálmica de hialuronidasa ACS (anteriormente descrita) por vía intravítrea para promover la despolimerización del ácido hialurónico vítreo, dando como resultado la licuefacción del vítreo.

El tratamiento de la fotocoagulación por láser con ojos inyectados con hialuronidasa ACS puede ser requerido. El protocolo del tratamiento con láser descrito en el ejemplo 5 y 6 debería ser seguido durante el tratamiento de AMD. En una forma de realización alternativa, el tratamiento de la fotocoagulación ocurre antes del tratamiento enzimático de la presente invención.

Después del tratamiento, los ojos del paciente deben ser examinados en los días uno (1), dos (2), siete (7), quince (15), treinta (30) y sesenta (60). Dada la posibilidad de reincidencia, el paciente debería volver a los exámenes periódicos en una base mensual después de éste. En cada día del examen el paciente es vigilado para la licuefacción vítreo. Además, el paciente es vigilado para posteriores desprendimientos del vítreo usando oftalmoscopia indirecta con depresión escleral. Finalmente, la extensión de ADM presentada por el paciente es continuamente vigilada a través de exámenes periódicos retinales y angiogramas con fluoresceína para controlar la presencia de líquido subretinal, sangre, exudados, desprendimiento de RPE, cambios císticos retinales, o la presencia de membrana subretinal neovascular verde grisácea. Hialuronidasa ACS adicional y/o tratamientos con láser pueden ser requeridos si hay indicación o se observa neovascularización recurrente.

El ejemplo siguiente demuestra la eficacia de la presente invención, incluso sin el uso de fotocoagulación.

Ejemplo 8

Mejora en síntomas de degeneración macular después de la inyección de la hialuronidasa intravítrea

Un hombre mayor de setenta y nueve (79) años de edad se presentó con una historia de degeneración macular relacionada con la edad, y visión no corregida de 20:400 en su ojo derecho. Una dosis individual de 100 UI de la hialuronidasa ACS fue inyectada por vía intravítrea en su ojo derecho. El otro ojo se mantuvo sin tratar.

El paciente fue examinado reiteradamente post-dosis y la visión en su ojo izquierdo (no tratado) se mantuvo invariada, mientras que se observó que la visión en su ojo derecho (tratado) mejoraba de la siguiente manera:

Tiempo (Post-dosis)	Visión (no corregida)	Visión (corregida)
Línea de base	20:400	ninguna
3 días	cf @ lft.	ninguna
1 semana	20:400	ninguna
2 semana	20:400	ninguna
4 semana	20:300	ninguna
*cf se refiere al recuento con los dedos		

No se observaron efectos adversos de la hialuronidasa ACS en este experimento.

Tratamiento de la ambliopía con hialuronidasa

El término ambliopía deriva del griego y significa visión opaca (ambly = opaco, ops = ojo). La visión pobre es provocada por un desarrollo anormal en áreas visuales del cerebro, que a su vez es provocada por una estimulación visual anormal durante el desarrollo visual temprano. La patología asociada con la ambliopía no es específica del ojo, más bien, está localizada en las áreas visuales del cerebro incluyendo el núcleo geniculado lateral y el córtex

estriado. Este desarrollo anormal es provocado por tres mecanismos: (1) imagen borrosa retinal llamada distorsión del modelo; (2) supresión cortical, o (3) supresión cortical más distorsión del modelo. La presente invención concierne principalmente a las distorsiones del modelo provocadas por la opacidad de los medios. Más específicamente, la presente invención dirige sus conclusiones a la opacidad del vítreo.

La visión ambliópica está normalmente definida como una diferencia de al menos dos líneas de Snellen de agudeza visual. Para el tratamiento de la ambliopía es fundamental la detección precoz y la intervención temprana. La estrategia para tratar la ambliopía provocada por la opacidad del vítreo es proporcionar una imagen retinal nítida mediante la alteración de la opacidad del vítreo de modo que resulte una visión nítida.

En este ejemplo, un paciente que manifiesta ambliopía resultante de la opacidad del vítreo fue tratado con una inyección intravítrea de hialuronidasa ACS. El propósito de este tratamiento fue reducir la opacidad del vítreo mediante el aumento del nivel de intercambio de líquido en el vítreo.

Ejemplo 9

Mejora en los síntomas de la ambliopía después del tratamiento intravítreo con hialuronidasa ACS

Una mujer de cuarenta (40) años de edad con una historia de ambliopía se presentó con visión no corregida de 20:400 en su ojo derecho y visión corregida en ese ojo de 20:200. Una única dosis de 100 UI de hialuronidasa ACS fue inyectada por vía intravítrea en su ojo derecho. El otro ojo se mantuvo sin tratar.

El paciente fue examinado reiteradamente post-dosis y la visión en sus ojo izquierdo (no tratado) se mantuvo invariada mientras que se observó que la visión en su ojo derecho (tratado) mejoraba de la siguiente manera:

Tiempo (Post-dosis)	Visión (corregida)	Visión (no corregida)
4 semana	20:200	20:70(-I)
8 semana	20:200	20:60(-2)
12 semana	20:200	20:60(-1)
52 semana	20:200	20:60(-I)

No se observaron efectos adversos de la hialuronidasa ACS en este paciente.

Tratamiento de la retinitis pigmentosa con hialuronidasa

Retinitis pigmentosa (RP) es el nombre dado a un grupo de trastornos heredables de degeneración retinal progresiva caracterizada por nictalopía bilateral campos visuales restringidos y anomalía del electroretinograma. Síntomas tempranos incluyen dificultad con adaptación a la oscuridad y pérdida del campo visual medioperiférico. Conforme progresa la enfermedad, la pérdida del campo visual avanza, normalmente dejando un pequeño campo de visión central incluso afectando la visión central. La agudeza central puede también verse afectada antes en el transcurso de la enfermedad bien por edema macular cistoide, atrofia macular, o desarrollo de una catarata subcapsular posterior. RP representa un grupo variado de enfermedades cuyo punto en común es la producción anormal de al menos una proteína en segmentos fotorreceptores externos fundamentales para la transducción de la luz.

Un resultado clínico de la RP es la desestabilización de la barrera de la retina-sangre de los capilares perifoveales y la cabeza del nervio óptico. Esta desestabilización resulta en la fuga de colorante de fluoresceína observada por angiografía. Además de la fuga, la acumulación de líquido como microquistes en la capa plexiforme externa puede ocurrir y ser observada. Estos quistes rellenos de líquido pueden reventar con el tiempo, dando como resultado un daño de la capa retinal. La presente invención contempla el tratamiento del daño relacionado con la RP a la retina promoviendo la limpieza acelerada del líquido del tejido que se acumula en los microquistes.

Ejemplo 10

Mejora en los síntomas de la retinitis pigmentosa después de la hialuronidasa intravítrea

Un hombre de cincuenta y nueve (59) años de edad se presentó con una historia de retinitis pigmentosa. La visión no corregida en su ojo izquierdo fue 20:400 y con corrección fue también 20:400. Una única inyección intravítrea de 100 UI de hialuronidasa ACS fue administrada al ojo izquierdo del paciente. El otro ojo se mantuvo sin tratar.

ES 2 281 128 T3

El paciente fue examinado reiteradamente después de la dosis de hialuronidasa ACS y la visión en el ojo derecho (no tratado) del paciente se mantuvo invariada, mientras que se observó que la visión en el ojo izquierdo (tratado) del paciente observado mejoraba de la siguiente manera:

Tiempo	Presión intraocular	Agudeza visual sin ayuda	Agudeza visual corregida
Línea de base	17 mm	20/400	20/400
1 Día post tratamiento	26 mm	HM†/1ft	HM / 1ft
1 semana	-----	HM / 1ft	HM / 1ft
2 semana	14 mm	cf‡@3ft.	cf@3ft.
3 semana	14 mm	20:300	20:300
4 semana	12 mm	20:200	20:80
8 semana	15 mm	20:80	20:40
9 semana	15 mm	20:60	20:40
10 semana	18 mm	20:80	20:40
†HM se refiere "movimiento de la mano"			
‡cf se refiere "recuento con los dedos"			

Los resultados del estudio demostraron que habían mejoras significantes en el rendimiento visual del sujeto, tanto con respecto a la agudeza visual sin ayuda (mejorando de 20:400 a 20:80) como a la agudeza visual corregida (mejorando de 20:400 a 20:40). También, mientras que se observaban cambios en la presión intraocular del sujeto durante el periodo del tratamiento, la presión intraocular pareció volver a los niveles de la línea de base aproximadamente dos semanas después del momento de la inyección. Aunque estos resultados son de un único paciente, parecen promesa suficiente para garantizar estudios posteriores.

Tratamiento de los agujeros maculares con hialuronidasa

Una rotura o reventón de la mácula se conoce como un agujero macular. De forma interesante, esta condición normalmente ocurre en mujeres entre los sesenta y los ochenta años, o después de un trauma tal como herida luminosa, herida solar, deformación escleral, o en ojos con estafiloma. Los síntomas incluyen metamortopsia y agudeza visual reducida.

Se cree que la formación de los agujeros maculares se origina por la tracción tangencial a través de la superficie retinal inducida por el vítreo cortical posterior con implicación de movimiento de los líquidos dentro de una cavidad vítrea posterior con sinéresis. La cavidad vítrea posterior con sinéresis está presente en la gran mayoría de pacientes que presentan agujeros maculares. Se piensa que como el gel vítreo se retira del gel de la superficie retinal, el espacio resultante entre las dos superficies crea un área donde el movimiento del humor vítreo puede negativamente interactuar con la superficie retinal. Se cree que el movimiento tangencial del humor vítreo dentro del espacio de la cavidad vítrea posterior con sinéresis promueve desprendimientos de la membrana retinal, dando como resultado la creación de agujeros maculares.

La presente invención contempla el uso de hialuronidasa ACS para despolimerizar el vítreo para eliminar las enfermedades que resultan de la formación del agujero macular. Tras la despolimerización del vítreo, la cavidad vítrea posterior con sinéresis es eliminada como resultado de la reorganización del vítreo mediada por hialuronidasa ACS. La eliminación de esta cavidad permite que el líquido entre el vítreo y la retina se mueva libremente por 10 cámara vítrea, dispersando cualquier fuerza nociva que de lo contrario habría sido dirigida contra la superficie retinal.

El ejemplo siguiente discute el tratamiento de un paciente que presenta síntomas tempranos de formación de agujeros maculares.

Ejemplo 11

Tratamiento de agujeros maculares

5 Un paciente que presenta signos tempranos de formación de agujeros maculares es tratado con una inyección intravítrea de hialuronidasa ACS. El paciente a tratar presenta varios signos de formación de agujeros premaculares. Estos incluyen pérdida de la depresión foveal asociada con una mancha o anillo foveal de color amarillo. La fovea ha empezado a estrecharse en la región de formación del agujero y la lesión puede tener un aspecto rojizo. La angiografía con fluoresceína en esta fase puede parecer normal o presentar una hiperfluorescencia débil. La apariencia de una
10 dehiscencia excéntrica de espesor completo denota una fase temprana avanzada de la enfermedad. Tras la observancia de estos síntomas comienza el tratamiento con hialuronidasa ACS.

El tratamiento con hialuronidasa ACS de la presente invención comienza cuando se diagnostica la formación de un agujero macular. El paciente recibirá un examen oftálmico completo para establecer una línea de base de salud ocular.
15 El examen oftálmico incluye oftalmoscopia indirecta, biomicroscopía con lámpara de hendidura, examen periférico retinal, mediciones de la presión intraocular, sintomatología de la agudeza visual (sin ayuda y corregida), fotografía del fondo, angiografía con fluoresceína, electrorretinografía y mediciones con A-scan.

Después del examen preliminar, una inyección intravítrea de hialuronidasa ACS es dada al ojo afectado del paciente. Si ambos ojos están afectados, pueden ser tratados por separado. El ojo a tratar es inyectado con 50:1 de 50 UI de la solución oftálmica de hialuronidasa ACS anteriormente descrita por vía intravítrea para promover la despolimerización del ácido hialurónico del vítreo, dando como resultado la licuefacción del vítreo.
20

Después del tratamiento, los ojos del paciente deben ser examinados en los días uno (1), dos (2), siete (7), quince (15), treinta (30) y sesenta (60). En cada día del examen el paciente es vigilado con respecto a la licuefacción del vítreo. La angiografía con fluoresceína, considerada un método particular efectivo del control del transcurso del tratamiento, es también realizada. Además, el paciente es vigilado con respecto a los desprendimientos vítreos posteriores usando la oftalmoscopia indirecta con depresión escleral.
25

30 *Tratamiento de los exudados maculares con hialuronidasa*

Los exudados maculares son el material que penetra en la barrera de la retina-sangre y se filtra a través de la mácula en la cámara vítrea. Hay dos tipos de exudados, blandos y duros. Los exudados blandos en realidad no son exudados sino agrupaciones de axones de células ganglionares en la capa de la fibra del nervio que han sufrido una dilatación bulbosa en un sitio de daño, isquémico o infarto. Los exudados duros son exudados de forma común como resultado de cambios microvasculares en la retinopatía del fondo. Los exudados duros son amarillos y encerados y son frecuentemente depositados en una forma circular sobre la mácula. Estos consisten en material lipídico y proteínico derivado de la exudación de componentes del suero de los vasos de fuga o de los productos lipídicos de elementos de degeneración neural dentro de la retina. La adsorción de exudados duros es principalmente mediada por resorción macrofágica, no obstante, el nivel de este proceso puede ser lento puesto que la exudación frecuentemente ocurre en la capa plexiforme externa dentro de la zona avascular de la retina. La presente invención es particularmente útil para la reducción de la extensión de la acumulación exudativa que resulta de la desestabilización de la membrana retinal puesto que la despolimerización de la hialuronidasa ACS del vítreo promueve un nivel de rotación circulatoria aumentado de los componentes acuosos del vítreo.
35
40
45

Ejemplo 12

Tratamiento de los exudados maculares

50 Un paciente que presenta exudados maculares es tratado con un método de inyección de hialuronidasa ACS de la presente invención. El paciente recibirá un examen oftálmico completo para establecer una línea de base de salud ocular. El examen oftálmico incluía oftalmoscopia indirecta, biomicroscopía con lámpara de hendidura, examen periférico retinal, mediciones de la presión intraocular, sintomatología de la agudeza visual (sin ayuda y corregida), fotografía del fondo, angiografía con fluoresceína, electrorretinografía y mediciones con A-scan.
55

Después del examen preliminar, una inyección intravítrea de hialuronidasa ACS es dada al ojo afectado del paciente. Si ambos ojos están afectados, pueden ser tratados por separado. El ojo para ser tratado es inyectado con 50:1 de 50 UI de la solución oftálmica de hialuronidasa ACS anteriormente descrita por vía intravítrea para promover la despolimerización del ácido hialurónico del vítreo, dando como resultado la licuefacción del vítreo.
60

Después del tratamiento, los ojos del paciente deben ser examinados en los días uno (1), dos (2), siete (7), quince (15), treinta (30) y sesenta (60). En cada día del examen el paciente es vigilado con respecto a la licuefacción del vítreo. La angiografía con fluoresceína, considerada un método particular efectivo para el control del transcurso del tratamiento, es también realizada. Además, el paciente es vigilado con respecto a los desprendimientos del vítreo posteriores usando la oftalmoscopia indirecta con depresión escleral.
65

Tratamiento del edema macular cistoide

El edema macular cistoide es una anomalía ocular común resultante de un grupo diverso de etiologías. Muchas de las causas de esta condición provienen de un trastorno de la barrera de la sangre-retina de los capilares perifoveales y de la cabeza del nervio óptico que resulta en una fuga del líquido que se acumula en microquistes de la capa plexiforme externa. Esta región es un área relativamente delgada y poco vascularizada de la retina. Clínicamente, un edema macular cistoide produce un aspecto en panal cuando se examina por angiografía con fluoresceína. Conforme progresa el edema, el capa plexiforme externa puede romperse, produciendo un agujero lamelar. El agujero puede ser limitado a la capa interna de la retina o puede progresar con el tiempo hasta un agujero completo macular.

La presente invención contempla el tratamiento del edema macular cistoide y la prevención de formación del agujero macular a través de la despolimerización del vítreo mediada por hialuronidasa ACS.

Ejemplo 13

Tratamiento de exudados maculares

Un paciente que presenta indicios de edema macular cistoide es tratado con una inyección de hialuronidasa ACS intravítrea como se describe en ejemplos 11 y 12.

Será apreciado por los expertos en la técnica que la invención ha sido descrita más arriba con referencia únicamente a ciertas formas de realización y ejemplos actualmente preferidos, y no se ha hecho ningún esfuerzo para describir exhaustivamente todas las formas de realización en las que la invención pueda adquirir forma física o pueda ser practicada. De hecho, varias modificaciones pueden ser realizadas a las formas de realización específicas y ejemplos descritos más arriba, sin salirse de la sustancia y objetivo pretendido por la presente invención. Por consiguiente, se pretende que todas estas modificaciones razonables a lo anterior estén incluidas dentro del campo de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de una hialuronidasa en la preparación de un medicamento para inducir la licuefacción de un humor vítreo para tratar un trastorno de un ojo mamífero tras la administración intravítrea en un humor vítreo sin sangre hemorrágica lo que permite ver la retina de dicho ojo mamífero no como un complemento de la vitrectomía,

caracterizado por el hecho de que

10 está definido como provocando la hidrólisis de los enlaces endo-N-acetil hexosamínicos del ácido hialurónico, dicha hialuronidasa siendo:

sin timerosal, y

15 esencialmente desprovista de fracciones de peso molecular de la hialuronidasa superiores a 100.000, entre 50.000 y 60.000, e inferiores a 20.000 según está determinado por electroforesis SDS PAGE con gradiente 4-20%.

20 2. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que la licuefacción se realiza con el propósito de tratar la retinopatía diabética proliferativa.

3. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que la licuefacción se realiza con el propósito de tratar la degeneración macular relacionada con la edad.

25 4. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que la licuefacción se realiza con el propósito de tratar la ambliopía.

5. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que la licuefacción se realiza con el propósito de tratar la retinitis pigmentosa.

30 6. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que la licuefacción se realiza con el propósito de tratar los agujeros maculares.

7. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que la licuefacción se realiza con el propósito de tratar los exudados maculares.

35 8. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que la licuefacción se realiza con el propósito de tratar el edema macular cistoide.

40 9. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que la hialuronidasa está preparada en una solución para inyección.

10. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que la dosis de hialuronidasa es 5-200 Unidades Internacionales.

45 11. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que la dosis de hialuronidasa es 1 Unidad Internacional.

12. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que la hialuronidasa está en forma de dosis múltiple.

50 13. Uso según la reivindicación 12, **caracterizado** por el hecho de que la hialuronidasa está en un volumen inyectable inferior a 100:1.

14. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que la hialuronidasa está preparada en una solución para inyección y que tiene la formulación:

55 dicha hialuronidasa hasta 8000 UI;

lactosa a 5,0-130,0 mg; y

60 fosfato a 0,01-100,0 mmoles.

15. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que la hialuronidasa está preparada en una solución para inyección y que tiene la formulación:

65 dicha hialuronidasa a 6500 UI;

lactosa a 5,0 mg; y

fosfato a 0,02 mmoles.

ES 2 281 128 T3

16. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que la hialuronidasa está preparada en una solución para inyección y tiene la formulación:

dicha hialuronidasa a 500-1000 UI;

lactosa a 5,0-10,0 mg; y

fosfato a 0,01-10,0 mmoles.

17. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que la licuefacción se realiza con el propósito de inducir un desprendimiento vítreo posterior (PVD).

18. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que la hialuronidasa es la hialuronidasa testicular ovina.

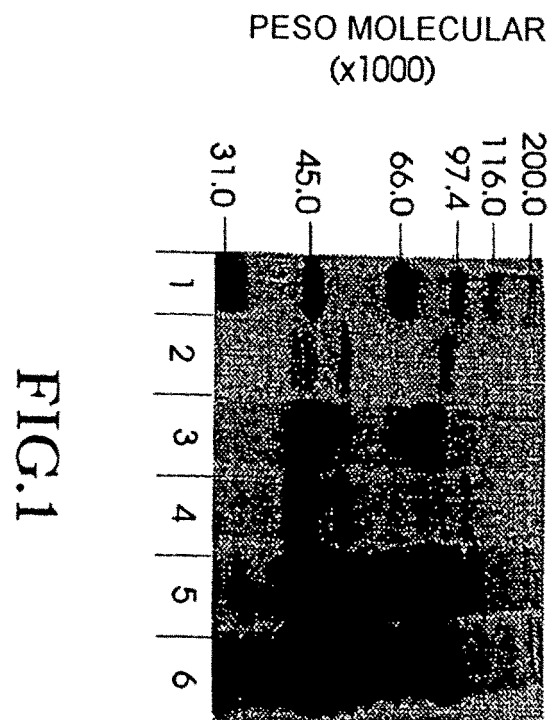


FIG. 2

Preparación de hialuronidasa	ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS ESPECÍFICAS DETERMINADAS POR ZIMOGRAFÍA		
	Ácido hialurónico	Gelatina	Caseína
Hialuronidasa (ACS)	Inactiva sobre 100.000 MW	Inactiva entre 60.000-100.000 MW	Inactiva sobre 45.000 MW
Hialuronidasa Bovina Tipo VI-S (Sigma)	Activa sobre 100.000 MW	Activa sobre 60.000-100.000MW	Activa sobre 45.000 MW
Hialuronidasa Ovina Tipo V (Sigma)	Activa sobre 100.000MW	Activa entre 60.000-100.000 MW	Activa sobre 45.000MW
Hialuronidasa Bovina Tipo IV-S	Activa sobre 100.000MW	Activa sobre 60.000-100.000MW	Activa sobre 45.000MW
Hialuronidasa Bovina Tipo I-S	Activa sobre 100.000MW	Activa sobre 60.000-100.000MW	Activa sobre 45.000MW

FIG. 3 Efectos tóxicos de Inyección Intravítrea de monodosis de BSS, BSS + Timerisol, Hialuronidasa (ACS) y Hialuronidasa (Wydase®) en Conejos

Grupo	Tratamiento & Dosificación (Volumen = 100 µL)	Resultados en el Día 7	
		Fotografía del Fondo & Angiografía con Fluoresceína	Histología
		Normal	Normal
1	BSS		
2	BSS + Timerisol (0.0075mg)	Rotura de la barrera de la retina-sangre	Necrosis Retinal
3	BSS + (0.025mg)	Efectos retinales severos & hemorragia intravítrea	Necrosis retinal grave
4	Hialuronidasa (Wydase) - 1 IU	Fuga de fluoresceína leve. Barrera de la retina-sangre comprometida	Ningún cambio significativo
5	Hialuronidasa (Wydase) - 15 IU	Daño retinal grave	Cambios equivocados
6	Hialuronidasa (Wydase) - 30 IU	Daño retinal grave	Necrosis Retinal
7	Hialuronidasa (Wydase) - 50 IU	Daño retinal extenso y desprendimiento de retina	Necrosis Retinal
8	Hialuronidasa (Wydase) - 150	Daño retinal extenso y desprendimiento de retina	Necrosis retinal grave
9	Hialuronidasa (ACS) - 1 IU	Normal	Normal
10	Hialuronidasa (ACS) - 15 IU	Normal	Normal
11	Hialuronidasa (ACS) - 30 IU	Normal	Normal
12	Hialuronidasa (ACS) - 50 IU	Normal	Normal
13	Hialuronidasa (ACS) - 150 IU	Barrera de la retina-sangre comprometida	Normal

FIG. 4

Eficacia de limpieza de hemorragia de Hialuronidasa (ACS) intravítrea monodosís en conejos

* 12 Conejos de Nueva Zelanda inyectados por vía intravítrea con 10 µl o, 100 µl de sangre en ambos ojos

	Grupo	Nº de Conejos	Tratamientos oculares		Resultados	
			Ojo izquierdo	Ojo derecho	Ojo izquierdo	Ojo derecho
GRUPO A	Solución salina equilibrada con B.S.S	3	Ninguno	30µl de B.S.S.	Gran coágulo fibroso en el vítreo nublado	Gran coágulo fibroso en el vítreo nublado
GRUPO B	25 UI de Hialuronidasa (ACS)	3	Ninguno	Hialuronidasa (ACS) 25 UI en 30 µl	Gran coágulo fibroso en el vítreo nublado	Vítreo nítido
GRUPO C	50 UI de Hialuronidasa (ACS)	3	Ninguno	Hialuronidasa (ACS) 50 UI en 30 µl	Gran coágulo fibroso en el vítreo nublado	Vítreo nítido
GRUPO D	75 UI de Hialuronidasa (ACS)	3	Ninguno	Hialuronidasa (ACS) 75 UI en 30 µl	Gran coágulo fibroso en el vítreo nublado	Vítreo nítido

FIG. 5

Seguridad y Eficacia de Hialuronidasa (ACS) intravítrea multidosis en Ojos de Conejos

	Tratamiento	Nº de Conejos	TRATAMIENTOS OCULARES		RESULTADOS	
			Ojo izquierdo	Ojo derecho	Ojo izquierdo	Ojo derecho
GRUPO A	Solución salina equilibrada	3	Ninguno	30µl de B.S.S.	Gran coágulo fibroso del vítreo nublado	Gran coágulo fibroso del vítreo nublado
GRUPO B	25 UI de Hialuronidasa (ACS)	3	Ninguno	Hialuronidasa (ACS) 25 UI en 30µl	Gran coágulo fibroso del vítreo nublado	Vítreo nítido Retina Normal con Oftalmoscopia Indirecta
GRUPO C	50 UI de Hialuronidasa (ACS)	3	Ninguno	Hialuronidasa (ACS) 50 UI en 30µl	Gran coágulo fibroso del vítreo nublado	Vítreo nítido Retina Normal con Oftalmoscopia Indirecta
GRUPO D	75 UI de Hialuronidasa (ACS)	3	Ninguno	Hialuronidasa (ACS) 75 UI en 30µl	Gran coágulo fibroso del vítreo nublado	Vítreo nítido Retina Normal con Oftalmoscopia Indirecta

Eficacia de la limpieza de la hemorragia de la inyección intravítrea individual de Hialuronidasa (ACS) en pacientes humanos con retinopatía diabética

FIG. 6

Paciente	Hemorragia del vítreo	Dosis de Hialuronidasa (ACS) inyectada	Actividad visual subjetiva		Tiempo hasta la limpieza de la hemorragia (Días Post Dosis)
			Pretratamiento	Post tratamiento	
Mujer 54 años de edad	Ojo izquierdo 4 años de duración	50 UI	Recuento con los dedos a 3 Ft. - Vítreo nublado	20/60 Vítreo nítido	6 Días
Mujer 65 años de edad	Ojo izquierdo Larga duración	50 UI	20/400 Vítreo nublado	20/200 Vítreo nítido	16 Días
Mujer 58 años de edad	Ojo izquierdo Duración de 1 año	50 UI	Recuento con los dedos a 5 Ft. - Vítreo nublado	20/60 Vítreo nítido	11 Días
Mujer 85 años de edad	Ojo ciego derecho por daño en el nervio óptico	200 UI	Vítreo muy nublado	Vítreo nítido	8 Días
Mujer 60 años de edad	Ojo ciego izquierdo por Glaucoma	70 UI	Vítreo muy nublado	Vítreo nítido	7 Días
Hombre 25 años de edad	Hemorragia intravítrea grave con perforación penetrando en el ojo izquierdo	50 UI	Vítreo muy nublado Sólo percepción de la luz	Vítreo nítido Movimiento de la mano como 1,0 Ft.	14 Días