



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 338 750**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/39 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/45 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **00965007 .8**

(96) Fecha de presentación : **15.09.2000**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1218027**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **03.07.2002**

(54) Título: **Composición para la estabilización del tejido de la córnea durante o después de llevar las lentillas de contacto de ortoqueratología.**

(30) Prioridad: **15.09.1999 US 153959 P**
30.12.1999 US 173801 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.05.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.05.2010

(73) Titular/es: **EUCLID SYSTEMS CORPORATION**
2776 Towerview Road
Herndon, Virginia 20171, US

(72) Inventor/es: **Bruce H, Dewoolfson y**
Dale P. Devore

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

DESCRIPCIÓN

Composición para la estabilización del tejido de la córnea durante o después de llevar las lentillas de contacto de ortoqueratología.

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La invención se refiere a composiciones químicas adecuadas para mantener la curvatura córnea dando como resultado un procedimiento de ortoqueratología, y métodos para preparar las composiciones químicas para una córnea para mantener la curvatura de la córnea después de someterla a una terapia ortoqueratológica y al empleo de la misma para la elaboración de un medicamento.

Descripción de la técnica afín

Estructura y composición de una córnea humana. La córnea es la primera y más poderosa superficie retractante del sistema óptico del ojo. La producción de una imagen nítida en los receptores de la retina requiere que la córnea sea transparente y tenga un poder refractante apropiado. El poder refractante de la córnea depende principalmente de dos factores. Su curvatura y su índice de refracción. Cuando la córnea está deformada o la longitud axial del ojo es demasiado larga o demasiado corta, o los lentes del ojo funcionan anormalmente, pueden aparecer varios problemas relacionados con la visión, tales como la miopía, astigmatismo, hiperopia, o similares. Los cristales ópticos o los lentes de contacto son necesarios para corregir los problemas. Los cristales ópticos corrigen los errores de refracción, refractando la luz con unos lentes antes de que la misma alcance la córnea, y cambiando el ángulo con el cual la luz entra en la córnea. Los lentes de contacto corrigen los errores de refracción del ojo, substituyendo la córnea deformada con una curva frontal de un lente de contacto la cual está calculada para convertir el ojo en emetrópico. Cuando los lentes se retiran, sin embargo, la córnea está todavía deformada o defectuosa y permanecen todavía los errores de refracción.

La córnea contiene de un 75% a un 80% de agua sobre la base del peso húmedo. De los sólidos restantes, de un 20% a un 25% son colágeno, u otras proteínas y glicosaminoglicanos. Las fibrillas de la córnea, las cuales forman la estructura del estroma corneal, están claramente organizadas y presentan la frecuencia típica del colágeno de 64 a 66 nm. Las propiedades fisicoquímicas del colágeno de la córnea, sin embargo, no difieren significativamente de las del colágeno de un tendón o de la piel. Como el colágeno de estas otras fuentes, el colágeno de la córnea tiene un alto contenido en nitrógeno, glicina, prolina, e hidroxiprolina. En agua hirviendo o ácido, el colágeno de la córnea se convierte en gelatina y el colágeno puede ser disuelto mediante enzimas proteolíticas, como por ejemplo, la colagenasa, la pepsina, o la papaína.

Procedimiento ortoqueratológico: la ortoqueratología es un procedimiento no quirúrgico para mejorar los errores refractantes del ojo, y es una alternativa a por ejemplo, la cirugía láser del ojo. Específicamente, la ortoqueratología es un procedimiento terapéutico para reconformar la curvatura de la córnea de un paciente. Un procedimiento convencional de ortoqueratología implica el empleo de una serie de lentes progresivos de contacto, los cuales se pretende que gradualmente den forma a la córnea y produzcan una curvatura anterior más esférica. El procedimiento puede implicar el ajuste de tres a seis pares de lentes de contacto, y toma tradicionalmente aproximadamente de tres a seis meses para lograr un reconformado óptico. Este procedimiento ha sido ensayado para reducir o eliminar la miopía y el astigmatismo, mejorando por lo tanto la visión natural y produciendo la emetropía (un estado en donde la visión experimenta un error cero de refracción, o donde no es necesaria corrección alguna). La reciente mejora en el diseño de lentes para ortoqueratología hace posible lograr la emetropía mucho más rápidamente. En muchos casos esto puede lograrse con la simple utilización durante la noche de un único par de lentes de resultado final.

Un problema de la ortoqueratología es que el tejido reconformado de la córnea mantiene la memoria de su curvatura original, y tiene tendencia a relajarse y volver a su curvatura original después de que las lentillas han sido retiradas. Por este motivo, cuando un paciente de ortoqueratología alcanza unos resultados máximos, se prescriben unos lentes de contacto de retención, para llevar a tiempo completo o a tiempo parcial para estabilizar los resultados. Los lentes de contacto de retención se han construido típicamente de un material rígido permeable a los gases. Los pacientes de ortoqueratología llevan cada vez con más frecuencia lentes de contacto de retención durante la noche para obtener rápidamente los resultados deseados, y disfrutar de una visión emetrópica durante sus actividades diurnas. Una desventaja de dicha modalidad es que requiere llevar lentes de retención cada noche con el fin de mantener la córnea de regreso a su forma primitiva.

Corneoplastia: Un procedimiento dirigido a solventar este problema, utiliza un agente ablandante de la córnea para ablandar temporalmente la córnea, de manera que la deseada configuración pueda ser más fácilmente reconformada para producir emetropía. El procedimiento de corneoplastia es un procedimiento de tres pasos efectuado en una visita o durante un periodo de varias semanas. El procedimiento de tres pasos incluye: en primer lugar, aplicación del agente ablandante a la córnea para ablandar el tejido corneal; en segundo lugar, colocación de una lente de contacto rígida sobre la córnea para convertir el ojo en emetrópico; y en tercer lugar, aplicación de un agente estabilizante. A continuación, la córnea se conformaría y tomaría la deseada configuración marcada por la lente de contacto rígida. La administración del agente ablandante de la córnea ayuda a corregir grandes errores de refracción en un corto período de tiempo.

Sin embargo, se ha descubierto que es difícil colocar exactamente la lente de contacto conformadora con respecto al eje de visión para controlar la reconformación del tejido corneal. En algunas aplicaciones sin éxito, la corneoplastia ha inducido un astigmatismo o doble visión debido a errores causados por la mala colocación de los lentes de contacto conformadores. Además, debido a que los tres pasos se efectúan en una visita, el paciente no tiene la oportunidad de reaccionar al resultado del reconformado del tejido corneal. El paciente no puede “probar y ver” o cambiar su mentalidad durante el procedimiento.

En vista de lo anterior, existe la necesidad de un método mejorado para la realización de un procedimiento corrector agudo que permita que el paciente alcance rápidamente la emetropía, a la vez que retiene la opción de volver atrás a su nivel anterior de visión, por ejemplo, para hacer que el procedimiento sea reversible mientras el paciente escoge si desea tener una corrección permanente. Además, existe la necesidad de composiciones y métodos para preparar y aplicar la composición que estabilice la matriz de la córnea. Las composiciones necesitan ser capaces de estabilizar la curvatura corneal que resulta del procedimiento de ortoqueratología de manera que un paciente de ortoqueratología pueda prescindir del empleo de lentes de contacto rígidos de retención, prescindir mediante la aplicación de un agente ablandante, y retener todavía la oportunidad de regresar a la curvatura original de la córnea hasta que el paciente está convencido de que desea que la corrección se convierta en permanente.

Resumen de la invención

Las ventajas y finalidades de la invención, se expondrán en parte en la descripción que sigue, y en parte serán obvias a partir de la misma descripción, o podrán deducirse por la práctica de la invención. Las ventajas y finalidades de la invención se percibirán y lograrán mediante los elementos y combinaciones particularmente indicados en las reivindicaciones del anexo.

Para lograr dichas ventajas y de acuerdo con las finalidades de la invención como se ha explicado y ampliamente descrito en la presente, un primer aspecto de la presente invención está dirigido al empleo de un agente estabilizante para la aplicación de un medicamento para una aplicación terapéutica para estabilizar un tejido corneal reconformado sin ablandar, el cual se ha corregido en un procedimiento ortoqueratológico para corregir la curvatura de la córnea de un paciente. El agente estabilizante comprende por lo menos un compuesto escogido entre pequeños proteoglicanos repetidos ricos en leucina (“SLRP”), y colágenos asociados a fibrillas con triple hélice interrumpida (“FACIT”).

Un segundo aspecto de la presente invención está dirigido a un método para preparar una composición química para la aplicación en una córnea reconformada resultante de un procedimiento de ortoqueratología. El método comprende los pasos de preparación de la transglutaminasa en una solución tampón, mezclando la solución y diluyendo en agua estéril, añadiendo EDTA a la solución, y añadiendo cloruro de calcio antes de la aplicación de la composición a la córnea.

Un tercer aspecto de la presente invención está dirigido a un sistema ortoqueratológico, el cual comprende una lente ortoqueratológica configurada para ser insertada en el ojo de un paciente para reconformar el tejido sin ablandamiento de la córnea, en una forma corneal preseleccionada marcada por el lente ortoqueratológico, y un agente estabilizante administrado al interior del ojo del paciente para estabilizar el tejido de la córnea en la forma preseleccionada, en donde el agente estabilizante comprende por lo menos un compuesto escogido entre la transglutaminasa, los SLRPs y los FACITs.

Un cuarto aspecto de la presente invención está dirigido a una composición adecuada para la aplicación corneal que comprende por lo menos un compuesto escogido entre los colágenos asociados a las fibrillas con triples hélices interrumpidas (FACITs) en una solución fisiológicamente compatible. La solución está tamponada a un pH de 6,5 a 8,5 y además, la concentración de los FACIT oscila de 10 a 500 $\mu\text{g/ml}$.

Un quinto aspecto de la presente invención está dirigido a una composición adecuada para ser aplicada a la córnea, y que comprende por lo menos un compuesto escogido entre los proteoglicanos pequeños repetidos ricos en leucina (SLRPs), en una solución fisiológicamente compatible. Los SLRPs se escogen entre el queratocano y el mimecano, en donde la solución está tamponada a un pH de 6,5 a 8,5, y además la concentración de los SLRP oscila de 10 a 500 $\mu\text{g/ml}$.

Un sexto aspecto de la presente invención está dirigido a una composición adecuada para ser aplicada a la córnea, la cual comprende decorina en una solución de tampón fisiológicamente compatible, en donde la solución está tamponada a un pH de 6,8 a 8,5 y además la concentración de decorina oscila de 10 a 500 $\mu\text{g/ml}$.

Un séptimo aspecto de la presente invención está dirigido a un método de preparación de una composición química adecuada para aplicar a la córnea, la cual comprende los pasos de disolución de los colágenos asociados a la fibrilla, con triples hélices interrumpidas (FACITs), en una solución fisiológicamente compatible a una concentración de FACITs que oscila de 10 a 500 $\mu\text{g/ml}$; y tamponando la solución a un nivel de pH fisiológicamente compatible de 6,5 a 8,5.

Debe comprenderse que tanto la descripción general anterior así como la descripción detallada siguiente, son como ejemplo, y solamente explicatorias y no son restrictivas para la invención que se reivindica. Ventajas adicionales serán mencionadas en la descripción que sigue, y en parte serán deducibles de la misma descripción o podrán deducirse por la práctica de la invención. Las ventajas y finalidades de la invención pueden obtenerse mediante las combinaciones mencionadas en las reivindicaciones anexas.

Descripción de las versiones preferidas

Se hace referencia en detalle a la diferentes versiones de la invención. La presente solicitud describe composiciones y explica métodos para la preparación de dichas composiciones, de manera que cuando se aplican durante o después del período en que se llevan los lentes de ortoqueratología, los resultados correctivos de la córnea se mantienen substancialmente, con lo cual se prescinde de la necesidad de llevar lentes rígidos de contacto de retención, y el empleo de dichas composiciones para la elaboración de un medicamento para una aplicación terapéutica para estabilizar el tejido reconformado, compacto, de la córnea.

Un procedimiento acelerado de ortoqueratología, de acuerdo con la presente invención, comprende los pasos de utilización de un par de lentes de ortoqueratología para reconformar los tejidos de la córnea, y estabilización de los tejidos reconformados de la córnea para retardar la relajación de los tejidos de la córnea a la curvatura original de la córnea. El agente estabilizante convierte en permanente la nueva forma de los tejidos de la córnea. El procedimiento de ortoqueratología acelerado da como resultado una visión emetrópica durante un predeterminado período de tiempo, por ejemplo, aproximadamente 24 horas.

En el procedimiento acelerado de ortoqueratología, el paciente, de acuerdo con la presente invención, puede escoger entre llevar puestos los lentes de ortoqueratología, posiblemente durante las tardes, como lentes de retención, sin aplicar el agente estabilizante para disfrutar de la vista a través del tejido de la córnea reconformada. Si el resultado es insatisfactorio, el paciente puede consultar con un oftalmólogo u optometrista para que examine la córnea y poder disponer de un nuevo par de lentes de ortoqueratología ajustados. Cuando el paciente está satisfecho y decide convertir este resultado en permanente, el paciente puede aplicar el agente estabilizante para estabilizar permanentemente los tejidos reconformados de la córnea, retardando la relajación de los tejidos de la córnea a la curvatura original de la córnea. El agente estabilizante reestabiliza rápidamente los tejidos de la córnea y su nueva configuración después del reconformado.

Los lentes de ortoqueratología están diseñados de preferencia para reconformar de manera gradual el tejido de la córnea, utilizando una presión mecánica sobre el párpado y una acción hidráulica de bombeo de las lágrimas líquidas, bien sean naturales o artificiales.

De acuerdo con la presente solicitud, se describen por lo menos dos tipos de alternativas de composiciones, las cuales son adecuadas para emplear como agente estabilizante. Cada composición trabaja independientemente y presenta un distinto método para estabilizar la curvatura córnea. Estas composiciones se caracterizan generalmente como una composición conteniendo por lo menos un FACIT ó un SLRP, ó una composición de la enzima transglutaminasa.

De acuerdo con un primer método de la presente invención, una composición para el agente estabilizante está dirigida a una composición, de preferencia biológicamente compatible, adecuada para la estabilización de la matriz de colágeno del ojo. Las fibrillas de colágeno de la córnea están asociadas con macromoléculas naturales de unión. El agente estabilizante de acuerdo con la presente invención se compone generalmente de por lo menos un compuesto seleccionado entre dos grupos de tales macromoléculas, a saber, colágenos asociados con las fibrillas con triples hélices interrumpidas, habitualmente abreviadas como "FACITs", y pequeños proteoglicanos repetidos ricos en leucina, abreviados como "SLRPs".

En la solicitud, los componentes de la matriz extracelular de FACITs y SLRPs actúan como un agente estabilizante mediante la reticulación con las fibrillas de colágeno de la córnea, y controlando el diámetro de las fibrillas. El agente estabilizante puede también formar puentes y estar implicado en las fibrillas de unión juntamente para limitar la capacidad de las fibrillas de deslizarse unas sobre otras. Estos puentes permiten alguna flexibilidad pero limitan la distancia a la que pueden moverse las fibrillas.

Pueden escogerse varios tipos de colágenos de utilidad para formar un producto de reacción de base colagenosa de esta invención biológicamente compatible, a partir de un grupo que incluye el colágeno tipo VI, el colágeno tipo XX, el colágeno tipo XII y el colágeno tipo XIV. Estos tipos de colágenos son miembros de los FACITs. Los varios tipos de FACITs pueden extraerse y purificarse u obtenerse en fuentes académicas, como por ejemplo el Schepens Eye Research Institute (Boston, MA).

Los componentes de la composición estabilizante incluyen también proteoglicanos, tales como los SLRPs. La adición de estos SLRPs a la composición se ha descubierto que es efectiva para la estabilización de la córnea. A pesar de su nomenclatura engañosa, los SLRPs son moléculas grandes. Por ejemplo, varios tipos de SLRPs pueden seleccionarse entre la decorina, queratocano, biglicano, epifcano, lumicano, mimicano y fibromodulina. La decorina incluye cadenas de glicosaminoglicano sulfato de dermatano y el queratocano incluye cadenas de glicosaminoglicano sulfato de queratano. Muchos SLRPs, (como por ejemplo el biglicano, queratano, sulfato de proteoglicano, decorina, laminina y proteoglicano sulfato de heparano), pueden adquirirse también en fuentes comerciales, tales como Sigma Chemical Company (Milwaukee, WI) ("Sigma"). Otros pueden adquirirse en instituciones académicas o pueden prepararse mediante procedimientos ya conocidos en la técnica.

A continuación, se proporcionan descripciones detalladas de los varios tipos de colágenos de la familia FACIT. Las proteínas de colágeno comprenden una gran y heterogénea clase de moléculas que están asociadas con muchas funciones de desarrollo y fisiológicas. Por lo menos veinte colágenos han sido ahora identificados y alrededor de once

de éstos están implicados en el desarrollo de las estructuras de la córnea. Dos características que todas las moléculas de colágeno parecen tener en común están compuestas de tres cadenas (llamadas cadenas α) y tienen por lo menos un dominio en el cual estas cadenas están dispuestas en una triple hélice. Por convención, cada tipo de colágeno tiene asignado un número (en números romanos), que refleja el orden cronológico en el cual fue descubierto. Los FACITs juegan un papel principal en la organización de los colágenos fibrilares de la córnea, como se describe más adelante.

Es conocido en la técnica, que el tipo de colágeno VI tiene una forma de filamentos como un rosario y se encuentra en la mayor parte de tejidos conjuntivos de los estromas. En el estroma de la córnea del humano adulto, la molécula está presente en cantidades que se aproximan a la de los colágenos fibrilares. Estos filamentos en forma de rosarios se entrelazan entre ellos, y parecen interactuar con las fibrillas estriadas y proteoglicanos de la córnea.

Se han efectuado estudios sobre la expresión de las moléculas FACIT tipos XII y XIV en el desarrollo de la córnea de las aves. Estos estudios, como se detalla en "A New Fibril Associated Collagen, Type XX, Expressed in the Developing Avian Cornea" ("Un nuevo colágeno asociado a fibrillas, tipo XX, expresado en el desarrollo de la córnea de las aves"), por Gordon *et al.* (Resumen en "Through the Looking Glass" ("A Través del Espejo") Macromolecular Morphogenesis Symposium Sponsored by The Schepens Eye Research Institute ("Simposio sobre Morfogénesis Macromolecular Patrocinado por el Instituto de Investigación Ocular"), Boston, MA, Enero 22-23, 1999, en adelante "Through the Looking Glass" ("A Través del Espejo"), han identificado nuevos FACITs incluyendo el tipo XX, que puede estar implicado en la organización de fibrillas de la córnea. Estos estudios llegan a la conclusión de que el modelo de expresión del desarrollo del colágeno tipos XII, XIV y XX va correlacionado con las funciones potenciales de estas moléculas en la córnea de las aves. Los dominios NC3 amino terminales más pequeños del tipo XX, sugieren que puede permitir que las fibrillas de colágeno estén más próximas unas de otras.

Se ha demostrado en la "Assembly of the Corneal Extracellular Matrix is a Multistep Process with Each Step Independently Regulated by Different Macromolecular Interactions" ("El montaje de la Matriz Extracelular de la córnea es un proceso de varios pasos, cada uno de ellos regulado independientemente por diferentes interacciones macromoleculares"), por David E. Birk (resumen en "A través del espejo"), que el peculiar desarrollo y conservación de la arquitectura estromal es necesaria para la transparencia de la córnea. La estructura fibrilar es un importante determinante de la función de la córnea. Las fibrillas de colágeno están montadas inicialmente como intermediarias, y se las llama segmentos. Estos segmentos intermediarios se incorporan a la matriz extracelular que se está desarrollando y, como producto del desarrollo tiene lugar una maduración regulada. La maduración de las fibrillas implica la transformación de las fibrillas intermediarias dentro del estroma de la córnea inmadura en fibrillas maduras, más largas. En la córnea, el aumento de longitud tiene lugar sin ningún cambio de diámetro mientras que en otros tejidos tiene lugar un aumento tanto en la longitud como en el diámetro. La córnea de las aves ha sido empleada para estudiar la regulación de la formación de fibrillas de colágeno. En la córnea, interacciones heterotípicas de colágeno tipos I y V regulan el montaje inicial del segmento de fibrillas. Empleando un método dominante-negativo, la composición de colágeno tipo V determina el diámetro de los segmentos de fibrillas recién formados. Este efecto está mediado por el dominio amino terminal. Las alteraciones en el montaje molecular debido a la presencia del colágeno tipo V limitan el crecimiento de las fibrillas y favorecen la iniciación de nuevos segmentos de fibrillas. Esto sirve para aumentar el número de fibrillas presentes durante el rápido crecimiento del estroma.

El próximo paso en el crecimiento de las fibrillas es un aumento de la longitud para proporcionar la fibrilla madura. Un estudio implica los proteoglicanos asociados a las fibrillas, en la regulación de este paso. Una teoría es que los segmentos experimentan una fusión post-deposicional seguida de reajustes moleculares que hacen aumentar la longitud de las fibrillas del tejido maduro. En base a esta teoría, se diseñó un experimento y se pronosticó que, en diferentes etapas del desarrollo existen cambios temporales y espaciales en los componentes asociados con la superficie del segmento. Estos cambios servirían para estabilizar o desestabilizar los diferentes pasos de la fibrillogénesis. Eliminando los proteoglicanos de la superficie de fibrillas aisladas, se obtiene como resultado un crecimiento anormal de las fibrillas, dando fibrillas más largas y más grandes de diámetro. Volviendo a añadir proteoglicanos, se evita este crecimiento anormal de una manera dependiente de la dosis.

En otro estudio sobre la relación entre "Type XII Collagen and Corneal Morphogenesis" ("Colágeno tipo XII y Morfogénesis de la Córnea") por SundarRaj *et al.*, (Resumen en "Through the looping glass" ("A través del espejo")), se determinó que la distribución, regulada por el desarrollo, de dos variantes alternativamente empalmadas del colágeno tipo XII, podría ser asociada con sucesos morfogénéticos específicos implicados en la condensación del tejido.

Análisis inmunohistoquímicos efectuados por otros, indicaron que la variante corta del colágeno tipo XII se expresó en el estroma de la córnea del conejo y la esclerótica a partir de una etapa temprana (día 14) del desarrollo de la córnea. La forma corta estuvo también presente en el tejido conjuntivo de los párpados a partir de una etapa temprana de la formación de los pliegues del párpado. Sin embargo la forma larga se expresó en primer lugar en el estroma posterior en una etapa posterior (en el día 24). Durante las últimas etapas del desarrollo pre y post natal, la distribución de la forma variante larga progresó desde el estroma posterior al estroma anterior (un modelo similar al de la condensación del estroma durante el desarrollo de la córnea). La forma larga se expresó temporalmente en tejidos subepidérmicos en regiones restringidas, en donde los párpados se habían juntado y fusionado. La aparición de colágeno tipo XII en la zona de la membrana epitelial de la córnea ("BM") fue evidente justo antes de la apertura de los párpados.

El estudio llega a la conclusión de que las diferencias en la distribución temporal y espacial de las variantes larga y corta del colágeno tipo XII, sugieren que estas variantes pueden tener diferentes funciones en el desarrollo de la

córnea. La forma variante larga del colágeno tipo XII, puede estar implicada en la condensación del estroma de la córnea. Estas interacciones y función(es) en la zona BM son probablemente diferentes a las del estroma.

Por lo tanto, los estudios antes mencionados referidos a los diferentes tipos de FACITs, indican que estos únicos colágenos interaccionan con las fibrillas del colágeno del estroma, contribuyendo a la organización del estroma de la córnea para regular el crecimiento de las fibrillas proporcionando transparencia y estabilidad a la córnea.

Como se ha descrito anteriormente, la adición de SLRPs a la mezcla de colágeno se ha descubierto que estabiliza efectivamente la córnea. A continuación, se describirán los SLRPs con mayor detalle. En “Gene-Targeted Lumican-Deficient Mice: Regulation of Collagen Fibril Assembly and Corneal Transparency by Lumican” (“Ratones deficientes en Lumican dirigidos génicamente: Regulación del montaje de fibrillas de colágeno y transparencia córnea mediante el lumicano”, por S. Chakravarti (resumen en “Through the Looking Glass” (“A través del espejo”))), se diseñó un estudio en donde los proteoglicanos de la córnea fueron hipotéticamente reguladores clave de una matriz de colágeno altamente organizada necesaria para la transparencia de la córnea. Este estudio aclaró el papel del lumicano, un importante proteoglicano, sulfato de queretano (“KS”), de la córnea, en la regulación de la arquitectura del colágeno y la adquisición de la transparencia de la córnea. El estudio llegó a la conclusión de que el lumicano jugaba un papel crítico en el montaje de las fibrillas del colágeno y la transferencia de la córnea. La progresión de la opacidad podría ser una consecuencia directa del aumento, dependiente de la edad, de las anomalías del colágeno observadas en los mutantes más viejos. Una reducción en el contenido total de KS en ratones deficientes en lumicano afectó probablemente la hidratación específica y otras propiedades fisiológicas de la córnea.

En “Some Speculation on the Evolutionary Origin of the Genes for Corneal Keratan Sulfate Proteoglycan Core Proteins” (“Algunas especulaciones sobre el origen evolutivo de los genes de las proteínas del núcleo de proteoglicano sulfato de queratano de la córnea”), por G. W. Conrad *et al.* (resumen en “Through the Looking Glass” (“A través del espejo”))), los científicos sugirieron que ni los genes de la decorina ni del lumicano de la proteína del núcleo, fueron expresados de una manera específica de la córnea, aunque el lumicano fue glicosidado únicamente en la córnea. El mimecano se expresó en un conjunto de tejidos más restringido mientras que la expresión del queratocano fue completamente o casi completamente, en función de la especie, específica de la córnea. Suficientes datos de la secuencia genómica están ahora disponibles a partir de algunos vertebrados que permiten la comparación de la estructura genómica del gen del mimecano (8 exones) con la del gen del queratocano (3 exones). En base a sus secuencias de nucleótidos, los dendrogramas de la familia de genes que expresan las proteínas del núcleo que llevan las cadenas de sulfato de queratano, sugieren que el mimecano es claramente más divergente en su secuencia que el queratocano. El genoma principal del cual estos genes derivan, puede haber sido simple, con intrones apareciendo más tarde (por lo tanto apareciendo el mimecano tarde en la evolución), o pueden haberse derivado exactamente en orden inverso, con los intrones primitivos siendo eliminados con el tiempo (por lo tanto apareciendo el mimecano tempranamente en la evolución). La resolución de esta cuestión puede derivarse del análisis de los genomas de otros organismos que tienen córneas.

Para examinar la córnea durante una herida de la córnea, un estudio sobre la relación entre “Growth Factors and Proteoglycans in the Stroma” (“Factores de crecimiento y proteoglicanos en el estroma”), por V. Trinkaus-Randall *et al.*, (resumen en “Through the Looking Glass” (“A través del espejo”))), indicó que el TGF β jugaba un papel en el proceso de la reparación de la herida. El TGF β alteró la composición de la matriz extracelular en los fibroblastos del estroma, a nivel tanto de las proteínas del núcleo como del GAG. El aumento en perlecano podría potenciar la responsabilidad del β FGF y alterar su unión a la superficie celular.

En un experimento en el “Role of Lumican in Wound Healing of Mouse Corneal Epithelium” (“Papel del lumicano en la curación de heridas del epitelio de la córnea del ratón”), por W.W.-Y. Kao (resumen en “Through the Looking Glass” (“A través del espejo”))), se llegó a la conclusión de que el lumicano podría regular la migración de las células epiteliales, contribuyendo de esta forma a la curación de la herida epitelial de la córnea.

En un estudio relacionado con el “Control of Matrix Assembly and Cell Growth by Proteoglycan Signaling” (“Control del montaje de la matriz y crecimiento celular mediante la señalización con proteoglicano”) por R.V. Iozzo (resumen en “Through the Looking Glass” (“A través del espejo”))), se demostró que la decorina, un miembro prototipo de una familia de expansión de proteoglicanos pequeños ricos en leucina, fue directamente implicada primordialmente en el control del montaje de la matriz debido a su capacidad para unirse al colágeno fibrilar y retrasar la fibrillogénesis. El estudio observó también que la decorina podía actuar como un modulador directo del crecimiento celular. Por ejemplo los niveles de decorina son marcadamente elevados durante la interrupción e inactividad del crecimiento, y su expresión es anulada por la transformación vírica. Los estudios demostraron que había una directa interacción entre el núcleo de la proteína de la decorina y el receptor del EGF. Por lo tanto, la biosíntesis aumentada de la decorina por los elementos del estroma podría representar un mecanismo natural de control del crecimiento, bien en la curación de la herida o bien en el crecimiento del cáncer.

Por lo tanto, los estudios antes mencionados con respecto al SLRP, indican que estos únicos componentes de la matriz se unen a las fibrillas de colágeno del estroma para controlar la organización de la matriz y estabilizar la composición de la matriz.

De acuerdo con la presente invención, una vez se ha conseguido la forma deseada del tejido de la córnea mediante un procedimiento ortoqueratológico, el agente estabilizante se aplica a los tejidos de la córnea para mantener la forma

deseada. Este agente estabilizante debería ser aplicado directamente a los tejidos de la córnea. A continuación, los lentes conformadores pueden ser, pero no necesariamente, retirados dentro de los tejidos de la córnea hasta que el agente estabilizante ha tenido tiempo suficiente para efectuar su función. Como se describe más adelante, se ha descubierto que los agentes estabilizantes de la presente invención pueden realizar su función antes de que la córnea regrese a su forma primitiva. Sin embargo, con ciertos agentes estabilizantes, puede ser ventajoso colocar de nuevo los lentes ortoqueratológicos sobre la córnea, un día después de la aplicación del agente estabilizante.

*FACITs y SLRP*s

En una primera versión de la presente invención, los FACITs se disuelven o suspenden en una solución tampón fisiológicamente compatible. Generalmente, la concentración de los FACITs estará en el margen de 10 a 500 $\mu\text{g/ml}$. De preferencia, la concentración de los FACITs estará en el margen de 20 a 250 $\mu\text{m/ml}$, y con mayor preferencia, de 40 a 100 $\mu\text{g/ml}$. También se describe la adición de SLRPs, de forma que cuando los SLRPs están también incluidos, bien sea solos o en combinación con los FACITs, los SLRPs tienen una concentración en el margen, por ejemplo, de 10 a 500 $\mu\text{m/ml}$, de 20 a 25 $\mu\text{m/ml}$, de 40 a 100 $\mu\text{m/ml}$, e incluyendo cualquier margen de números enteros incluidos dentro de estos márgenes.

Los FACITs se diluyen o disuelven en un tampón, como por ejemplo, un tampón de fosfato de pH neutro, que tenga una concentración, por ejemplo, de 0,005 a 0,5 M a un pH que oscila de 6,5 a 8,5, y de preferencia de 6,8 a 7,6. Otros tampones adecuados incluyen el HEPES, TRIZMA® (Sigma-Aldrich, u otro suministrador de tampón TRIS) u otros tampones biológicamente adecuados, ya conocidos en la técnica, los cuales pueden estar también en una concentración de 0,005 a 5 M.

Esta solución de agente estabilizante se aplica a continuación a la córnea en forma de gotas durante un período de tiempo de 1 día a 14 días durante el período en que se llevan los lentes ortoqueratológicos o después de llevarlos. El sistema tampón y el pH pueden modificarse para optimizar la interacción con los colágenos de la córnea. Por ejemplo, el pH del tampón puede aumentarse a 7,6 ó mayor, con el fin de abrir la estructura de la matriz del colágeno para aumentar el suministro de la composición al tejido del ojo. Como reconocerá una persona experta en la técnica, el pH está limitado por el potencial daño que puede causarse en el tejido del ojo. En general, un pH adecuado no será superior a 8,0 debido al peligro que supone dicho daño.

Esta solución interactúa con las fibrillas de colágeno de la córnea, para controlar el diámetro de las fibrillas formando puentes para unir una fibrilla de colágeno con otra fibrilla adyacente. Estos puentes permiten la flexibilidad de las fibrillas pero restringen la distancia de movimiento de las fibrillas. A continuación los tejidos de la córnea conservarán su forma sin que tengan que emplearse posteriormente los lentes de reconvertido.

Ejemplo 1

Se efectuaron una serie de experimentos de laboratorio *ex vivo* sobre córneas porcinas extirpadas para optimizar los efectos de la estabilización. Los ojos porcinos extirpados fueron conservados en solución de Optisol y mantenidos a 2-8°C. Los ojos tratados se examinaron visualmente y empleando biomicroscopía para monitorizar los efectos sobre el epitelio de la córnea del estroma, la turbidez de la córnea, la rigidez de la córnea, la respuesta de la cámara anterior, y el grueso de la córnea. Los ojos tratados fueron sometidos a ensayos mecánicos para evaluar los cambios en bajos y altos módulos para evaluar el esfuerzo y la deformación bajo una fuerza de compresión, como se describe en detalle más adelante. Una disminución en el módulo bajo indicó un ablandamiento o una reducción en las fuerzas necesarias para comprimir la red de colágeno debido a la creciente capacidad para expulsar los fluidos. Por contraste, un aumento en los módulos bajos indicaba un endurecimiento. Cualquier cambio en el módulo alto indicaba un daño en la red de fibrillas del colágeno.

En la primera fase de estos experimentos *ex vivo*, fueron previamente explorados por screening un total de 12 ojos porcinos. Los ojos extirpados fueron tratados con unas gotas del agente estabilizante a base de colágeno tipo VI de córnea de conejo (adquirible en el Schlepens Eye Institute) con una concentración de 1 mg/ml y tamponado con 0,005 M de fosfato de sodio de pH 7,2. Las gotas se aplicaron durante un período de 7 días aplicando las gotas dos veces cada día después de eliminar el Optisol y lavando con solución de sal equilibrada ("BBS") o solución salina tamponada de fosfato ("PBS"). A continuación, se volvieron a colocar los ojos en Optisol. Todos los ojos se almacenaron a temperatura ambiente y se expusieron a la luz natural. Para el tratamiento se emplearon dos concentraciones de cada agente. A continuación se aplicó un portaobjetos a la superficie de la córnea de los ojos tratados y se mantuvo en su lugar haciendo presión con el dedo pulgar, o mecánicamente, generando una superficie aplanada. Después de 7 días, un análisis topográfico mostró un rechazo mínimo.

En la segunda fase de estos experimentos *ex vivo*, los mismos agentes estabilizantes se evaluaron además en ojos porcinos extirpados equipados con lentes ortoqueratológicos. El agente estabilizante se aplicó mientras se llevaban puestos los lentes ortoqueratológicos. Los ojos se examinaron visualmente, por biomicroscopía, y empleando un equipo para medir la curvatura de la córnea, como por ejemplo la queratometría y o topografía. Los resultados de estos experimentos mostraron un rechazo mínimo después de siete días.

ES 2 338 750 T3

Ejemplo 2

Los ojos del ensayo recibieron tanto un tratamiento de moldeo con lentes conformadoras seguido de la administración de decorina, un SLRP con una concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ tamponados con 0,04 M de fosfato de sodio a un pH de aproximadamente 7,2. La solución se aplicó de acuerdo con el siguiente programa: el molde se aplicó el viernes por la tarde, y se dejó allí hasta el lunes por la mañana cuando los moldes se eliminaron. Después de retirar el molde, los ojos se expusieron a continuación a 100 μl de la solución de decorina. El molde se volvió a aplicar sobre cada ojo. A continuación, cada ojo se colocó de nuevo en la solución de Optisol. La aplicación de decorina se repitió el martes y el miércoles.

El molde volvió a aplicarse sobre un ojo. El dictamen fotográfico subjetivo de dicho ojo mostró que el tratamiento con decorina con el molde vuelto a aplicar, dio por resultado una córnea plana sin ningún rechazo.

Con respecto al segundo ojo, después de que el ojo fue expuesto a la decorina el viernes, no se volvió a aplicar el molde. Esto se hizo para determinar si el ojo sería rechazado a su forma original. Después de tres días más, el dictamen fotográfico subjetivo de dicho ojo mostró que el rechazo era insignificante o que no había ningún rechazo de los tejidos de la córnea.

Ejemplo 3

Los ojos del ensayo recibieron el tratamiento de moldeo con lentes conformadas, seguido por la administración de sulfato de queratano, un SLRP, con una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$, tamponado con fosfato trisódico 0,04 M a un pH de aproximadamente 7,2. La solución se aplicó de acuerdo con el siguiente programa: el molde se aplicó el viernes por la tarde, y se dejó allí hasta el lunes por la mañana cuando los moldes se retiraron. Después de retirar el molde, los ojos se expusieron a continuación a 100 μl . El molde se volvió a aplicar sobre cada ojo. A continuación, se colocó cada ojo de nuevo, en la solución de Optisol. La aplicación de sulfato de queratano se repitió el martes y el miércoles.

El molde volvió a aplicarse sobre un ojo. El dictamen fotográfico subjetivo de dicho ojo mostró que el tratamiento con sulfato de queratano con el molde vuelto a aplicar, dio como resultado una córnea plana sin ningún rechazo.

Con respecto al segundo ojo, después de que dicho ojo fuera expuesto al sulfato de queratano el miércoles, el molde no volvió a aplicarse. Esto se hizo para determinar si el ojo sería rechazado a su forma original. Después de tres días más el dictamen fotográfico subjetivo de dicho ojo mostró que había un moderado rechazo del tejido de la córnea.

Transglutaminasa

De acuerdo con un segundo método para estabilizar la córnea de la presente invención, el agente estabilizante, también de preferencia biológicamente compatible, puede derivarse de una enzima que normalmente se encuentra en el tejido, como por ejemplo la epidermis. La enzima puede incluir la transglutaminasa, por ejemplo, proteínas reticuladas de la transglutaminasa (factor XIII), la cual está formada por enlaces covalentes entre los radicales lisina y glutamina.

La transglutaminasa se mezcla con EDTA en un margen de por ejemplo 0,01 M a 0,25 M ó de 0,05 M a 0,15 M. La concentración de la transglutaminasa puede oscilar desde 0,01 M a 0,25 M ó desde 0,05 M a 0,1 M, incluyendo cualquier margen de números enteros incluidos dentro de estos márgenes. Puesto que la transglutaminasa requiere iones calcio para ser activada, se añade EDTA a la solución de agente estabilizante con el fin de captar los iones calcio que podrían inducir una prematura activación de la transglutaminasa.

La solución debe estar tamponada en un margen de pH de, por ejemplo, 6,8 a 7,6, ó de 7,0 a 7,2 ó cualquier margen de números enteros incluidos dentro de estos márgenes. Los tampones adecuados incluyen el tampón de glicina, el tampón de TRIS, y tampones de Bicina. Sin embargo, el tampón no debe contener fosfatos puesto que los fosfatos tienen una tendencia a precipitar en presencia de calcio. A continuación se añade cloruro de calcio a la solución de transglutaminasa, en el margen de 5 mM a 50 mM, de preferencia de 20 mM a 30 mM, como catalizador. El sistema de suministro comprenderá un dispositivo de dos partes para añadir los componentes durante la aplicación de la córnea. Este dispositivo permitirá al usuario combinar el catalizador de calcio con la solución de transglutaminasa en el tiempo apropiado sin necesidad de separar las soluciones o sin necesidad de dos dispositivos separados.

Ejemplo 4

La composición de transglutaminasa se preparó añadiendo 10 mg de transglutaminasa a 10 ml de agua estéril conteniendo el 2% de sucrosa, 0,1 M de EDTA, y 5 mM de tampón de glicina a un pH de 7,2. La transglutaminasa se adquirió en Sigma, n° de catálogo T-5398, con un hígado de cobayo o fuente recombinante humana. Los componentes se mezclaron y a continuación se diluyeron hasta 90 ml con agua estéril. Una segunda solución contenía 25 mM de cloruro de calcio.

ES 2 338 750 T3

Antes de la aplicación a la córnea, se añadieron 10 ml de la solución de cloruro de calcio a la composición de transglutaminasa y se agitó suavemente. Unas gotas de esta mezcla se añadieron a la superficie de la córnea, igualmente a como se añaden las gotas oftalmológicas y se dejó que reaccionaran durante aproximadamente 10 minutos. A continuación el ojo se lavó con agua estéril o tampón estéril, por ejemplo "BSS", hasta eliminar el exceso de mezcla de transglutaminasa. Como resultado, la mezcla de transglutaminasa mediada, reticula covalentemente entre varios grupos amino primarios de lisinas unidos al péptido de colágeno en el estroma de la córnea.

La composición de más arriba se empleó también a través de una serie de experimentos de laboratorio *ex vivo*, sobre córneas porcinas extirpadas, para optimizar los efectos de la estabilización. Los ojos porcinos extirpados se colocaron en hielo hasta que fueron tratados. Antes del tratamiento, cada ojo se colocó en un soporte para la estabilidad y se sometieron a una evaluación topográfica empleando el sistema Optikon 2000. Se obtuvieron seis topografías de cada ojo, y se generaron compósitos verdaderos. La superficie de la córnea se secó empleando una gasa estéril y a continuación se humedeció con unas gotas de fosfato disódico 0,02 M. Los ojos mojados se secaron de nuevo y se trataron con unas gotas de fosfato disódico 0,02 M. Un portaobjetos de vidrio se equilibró sobre la superficie de la córnea. Se prepararon soluciones de transglutaminasa y cloruro de calcio (CaCl_2) en tampón de TRIS 50 mM de pH 8,5. El pH del tampón de TRIS se ajustó a 8,5 mediante la adición de hidróxido de sodio (NaOH) 2,5 N. La transglutaminasa se preparó a 1 mg/ml en 10 ml de tampón de TRIS. El CaCl_2 se preparó a una concentración de 25 mM en 50 ml de tampón de TRIS.

Antes de la administración se mezcló 1 ml de la solución de CaCl_2 con 9 ml de solución de transglutaminasa debido a que la transglutaminasa necesita Ca^{++} como catalizador. La solución de transglutaminasa/ CaCl_2 se añadió gota a gota al área alrededor del portaobjetos de vidrio. Aproximadamente se aplicó 1 ml de solución de enzima en un período de 2 minutos. El portaobjetos se retiró a continuación y el ojo se lavó con tampón de fosfato 0,004 M a un pH de 7,4. El ojo se reexaminó a continuación topográficamente y se tomaron fotografías. Después de la evaluación topográfica, los ojos se colocaron en Optisol para ser almacenados pendientes de evaluaciones adicionales. Tres ojos fueron tratados utilizando este protocolo.

Se presentaron algunas dificultades en el tratamiento de los primeros dos ojos, debido a la dificultad de aplicar la solución de la enzima mientras se equilibraba el portaobjetos de vidrio. A la tercera tentativa, se aplicaron unas gotas de transglutaminasa a la córnea y el portaobjetos se aplicó a la superficie de la córnea y se mantuvo en su lugar ejerciendo una presión con el dedo pulgar. A continuación se aplicaron unas gotas de la solución de la enzima a las superficies de la córnea alrededor del portaobjetos de vidrio. No se observó ningún efecto de aplanado en los primeros dos ojos. Los resultados topográficos del primer ojo parecieron mostrar una progresión de la córnea como muestra la tabla 1 a continuación. Sin embargo los mapas topográficos demostraron claramente un aplanamiento de la córnea central en el tercer ojo. El poder de refracción se redujo aproximadamente en 1,5 dioptrías. Todos los ojos parecieron más claros en el examen visual. Los ojos se colocaron en Optisol para el almacenamiento.

TABLA 1

Potencia de la córnea medida mediante un mapa topográfico

Ojo porcino nº	Pretratamiento (en dioptrías)		Post-tratamiento (en dioptrías)	
1	39,98	37,33	42,14	39,2
2	39,89	37,7	39,98	37,26
3	40,25	38,16	38,79	36,83

Después del tratamiento, se diseccionaron cuidadosamente los botones de la córnea, se colocaron en Optisol y se enviaron a la Universidad de Rutgers para el análisis de esfuerzo-deformación. En el análisis de esfuerzo-deformación, los botones de la córnea se colocaron en una superficie ligeramente convexa y se sometieron a fuerzas de compresión. Las curvas de esfuerzo-deformación representan la fuerza por unidad de área de la sección transversal necesaria para comprimir la córnea una cierta cantidad, expresada en tanto por ciento. Las curvas resultantes indican varias fases distintas. La parte inferior (región del módulo bajo), representa la resistencia a exprimir el fluido que hay entre las fibrillas de colágeno. La parte central, en donde la curva esfuerzo-deformación no cambia, y la parte superior (región del módulo alto) representa la compresión de las fibrillas de colágeno. Una reducción en el módulo bajo indica que la córnea es blanda. Un aumento indica que los botones de la córnea son rígidos y han sido estabilizados.

El tratamiento con transglutaminasa proporcionó resultados optimistas. La evaluación topográfica indicó que un ojo porcino tratado con transglutaminasa seguido de un aplanado de la córnea empleando un portaobjetos de vidrio presentaba una reducción del poder refractante de aproximadamente 1,5 dioptrías después de retirar el portaobjetos de vidrio. Es importante hacer notar que dos ojos adicionales se incluyeron en esta serie de tratamientos. Se aplicaron

ES 2 338 750 T3

también portaobjetos de vidrio a estos ojos porcinos. Sin embargo, la adición de enzima se aplicó con los ojos en posición horizontal y no parecieron fluir bajo el portaobjetos de vidrio dentro de la córnea. En estos ojos no se observó ninguna evidencia de una reducción del poder refractante mediante la evaluación topográfica. Dado que estos ojos no mostraron aplanamiento de la córnea central después de la aplicación del portaobjetos de vidrio, era improbable que el aplanamiento de la córnea observado en el ojo exitoso fuera solamente un resultado de la aplicación del portaobjetos de vidrio.

Ejemplo 5

Se efectuaron experimentos adicionales para demostrar que las gotas de transglutaminasa podían efectivamente estabilizar la córnea durante la ortoqueratología. Se evaluaron por lo menos tres diferentes niveles de transglutaminasa, incluyendo 10 mg/ml, 5 mg/ml, y 1 mg/ml. Se incluyeron tres ojos por tratamiento, junto con 2 falsos controles, es decir, aplicando solamente los lentes con unas gotas de tampón sin transglutaminasa, y un control sin ningún tratamiento.

En esta serie, el procedimiento experimental incluye la colocación de los ojos en asideros de soporte, y efectuando una evaluación topográfica, 6 lecturas para cada ojo. A continuación, se aplican los lentes de aplanamiento y se mantienen suavemente en su lugar empleando una cinta de goma u otro dispositivo similar. Los ojos se colocan aproximadamente a 45° de la horizontal, y se acondicionan con gotas de una solución 0,05 M de TRIS HCl, de pH 7,6. Mientras se deja que el tampón interaccione durante un minuto, la solución de transglutaminasa se mezcla con la solución de CaCl_2 en una proporción de 9 a 1. A continuación, los ojos se tratan con calcio que contiene unas gotas de transglutaminasa, conteniendo cada gota aproximadamente 0,1 ml de solución, a intervalos de 30 segundos durante dos minutos, seguido de la aplicación de gotas de tampón 0,05 M de TRIS HCl. Los ojos se evalúan a continuación topográficamente, se examinan empleando una lámpara de rendija de biomicroscopía, se diseccionan de los globos y a continuación se envían a la Universidad Rutgers para los análisis de compresión.

La evaluación topográfica muestra una disminución de 1,5 a 2,0 del número de dioptrías, y un aumento en el modulus bajo, mostrando un endurecimiento del tejido de la córnea.

Ejemplo 6

Los ojos del ensayo recibieron ambos el tratamiento de moldeado con lentes de conformado y a continuación, la administración de la solución de transglutaminasa a una concentración de 1 mg/ml de transglutaminasa tamponada con 0,05 M de TRIS HCl con un pH de aproximadamente 7,2, más cloruro de calcio en un tampón 0,05 M de TRIS HCl a una concentración de 25 mM. La solución se aplicó de acuerdo con el siguiente programa: el molde se aplicó el viernes por la tarde, y permaneció allí hasta el lunes por la mañana cuando los moldes fueron retirados. Después de retirar el molde, los ojos fueron tratados a continuación con 100 μl de solución de transglutaminasa. Se aplicó de nuevo el molde sobre cada ojo. A continuación cada ojo se colocó de nuevo en una solución de Optisol. La aplicación de la solución de transglutaminasa se repitió el martes y el miércoles.

Volvió a ubicarse el molde en un ojo. El dictamen fotográfico subjetivo de dicho ojo mostró que el tratamiento con transglutaminasa con el molde vuelto a aplicar, dio como resultado una córnea plana con ningún rechazo.

Con respecto al segundo ojo, después de someter el ojo a la transglutaminasa el miércoles, el molde no volvió a aplicarse. Esto se hizo para determinar si el ojo sufriría un rechazo a su forma original. Después de tres días más, el dictamen fotográfico subjetivo de dicho ojo mostró que había habido solamente un ligero rechazo de los tejidos de la córnea.

En resumen, la presente invención describe varias composiciones que tienen un sistema de aplicación de gotas-en-el-ojo, para emplear durante o después de llevar puestos los lentes ortoqueratológicos para mantener o estabilizar el tejido de la córnea corregido por el procedimiento de ortoqueratología acelerado. La composición se aplica a la córnea para unirse a las fibrillas del colágeno de la córnea, para controlar el diámetro de las fibrillas, y para formar puentes entre las fibrillas de colágeno.

La presente invención anticipa que puede emplearse para estabilizar las córneas de pacientes que ya han sido sometidos a la ortoqueratología. El procedimiento de estabilización eliminará la necesidad de continuar llevando lentes de retención para mantener la forma de la córnea. Mientras que para estos pacientes puede ser posible utilizar simplemente el paso de estabilización, se prevé que la córnea tendrá que ser desestabilizada antes de que pueda reestabilizarse para tomar la nueva configuración.

Ejemplo 7

Protocolo para la evaluación de la toxicidad de la decorina en el ojo de un felino

5 La finalidad de la siguiente evaluación fue la de determinar si (1) existe una toxicidad asociada con el empleo de la decorina sobre el ojo; (2) dictaminar la penetración de la decorina dentro de la córnea; y (3) cantidad de decorina en la córnea siguiendo la aplicación exógena de la decorina.

10 Se dictaminaron 1, 3, y 5 aplicaciones diarias de decorina, empleando gatos hembra (de 6 meses a 2 años de edad) con córneas normales como sistema modelo. La decorina se obtuvo como un polvo seco (Sigma), y se reconstituyó en un tampón de fosfato 0,1 M. Con el fin de efectuar las evaluaciones microscópicas, la decorina se señaló con Oregón verde 514, empleando un kit de Pruebas Moleculares comercialmente adquirible.

15 Se emplearon cinco gatos en el estudio. Cada gato fue sedado previamente a la aplicación tópica de la medicación o fotografía del ojo. A todos los animales se les efectuó un examen ocular y fotografías (ojo entero, lámpara de rendija, y células endoteliales) antes del tratamiento. Los ojos fueron asignados al azar a un grupo de tratamiento. La decorina se aplicó al interior de los lentes de contacto, y los lentes se colocaron sobre el ojo de los gatos. Los lentes permanecieron sobre el ojo durante 10 minutos. Todos los animales fueron observados diariamente durante el estudio. Tres ojos se asignaron aleatoriamente a un grupo de tratamiento o control. Por lo menos 2 ojos más se reservaron para emplear
20 como controles para cada una de las evaluaciones, histográfica, TEM, y microscopía confocal.

Un ojo de cada uno de los tres grupos de tratamiento se trató con decorina señalizada con verde Oregón 5149.

25 ♦ El grupo 1 de tratamiento de los ojos, recibió una aplicación de 50 µg de decorina en 100 µl de tampón el día 1. Se efectuaron fotografías y exámenes justo después del tratamiento y de nuevo los días 2, 4, y 8 después del tratamiento. A continuación, se efectuaron exámenes y fotos semanalmente durante el resto del mes.

30 ♦ El grupo 2 de tratamiento de los ojos, recibió una aplicación de 50 µg de decorina en 100 µl de tampón los días 1, 2 y 3. Se obtuvieron fotografías y exámenes justo después del tratamiento y de nuevo los días 2, 3, 5 y 8. A continuación, se efectuaron exámenes y fotos semanalmente durante el resto del mes.

35 ♦ El grupo 3 de tratamiento de los ojos, recibió una aplicación de 50 µg de decorina en 100 µl de tampón los días 1, 2, 3, 4 y 5. Se obtuvieron fotografías y exámenes diariamente y de nuevo el día 8. A continuación, se efectuaron exámenes y fotos semanalmente durante el resto del mes.

40 ♦ Todos los animales fueron sacrificados al cabo de un mes. Se extirparon los ojos. Cada ojo fue cortado por la mitad. Una mitad se fijó en formalina para el análisis histológico (tinción con H&E) de toxicidad. La segunda mitad se dividió de nuevo en dos, una parte se empleó para la visualización TEM de la decorina, y el resto se examinó empleando una microscopía confocal común para los gatos tratados con decorina marcada.

45 Los resultados están representados en la figura 1 (micrográficas confocales, y demuestran que la decorina ha penetrado en el tejido de la córnea del ojo. Además, la figura 2 (muestra # 33080543) muestra que una córnea tratada cinco veces con decorina de acuerdo con el protocolo del tratamiento anterior (tratamiento del grupo 3), contenía más decorina asociada a las fibrillas del colágeno que la córnea sin tratar mostrada en la figura 3 (muestra # 3380562). El análisis cualitativo inicial indica que los filamentos de la decorina en el ojo tratado parecen más largos y “más planos”. Estos filamentos “más planos” fueron observados a través de las secciones del estroma, incluyendo la región epitelial, el estroma central, y las regiones endoteliales.

50 Estas observaciones indican que la decorina añadida exógenamente puede penetrar en el tejido de la córnea del ojo y puede unirse a la matriz del estroma. Además, no parece haber ninguna toxicidad ocular o sucesos adversos asociados con la aplicación de decorina exógena a la córnea de los felinos.

55 Será aparente a los expertos en la técnica, que pueden hacerse diferentes modificaciones y variaciones en la composición, en el método de elaborar la composición, y en el método de aplicación de dicha composición en la presente invención, así como también otros aspectos de la invención, sin apartarse del ámbito de la misma.

60 Otras versiones de la invención serán aparentes a los expertos en la técnica a partir de la consideración de la especificación y práctica de la invención descrita en la presente. Se pretende que la especificación y los ejemplos se consideren solamente como ejemplificantes, estando el verdadero ámbito y espíritu de la invención indicados en las siguientes reivindicaciones y sus equivalentes.

REIVINDICACIONES

1. Empleo de un agente estabilizante para la elaboración de un medicamento para una aplicación terapéutica para estabilizar un tejido de córnea reconformado sin ablandar, el cual se corrige en un procedimiento ortoqueratológico para corregir la curvatura de la córnea de un paciente, en donde el agente estabilizante comprende por lo menos un compuesto escogido entre los proteoglicanos pequeños repetidos, ricos en leucina ("SLRP"), y los colágenos asociados a las fibrillas con triples hélices interrumpidas ("FACIT").
2. Empleo del agente estabilizante como se ha definido en la reivindicación 1, en donde el agente estabilizante está adaptado para ser aplicado a los tejidos de la córnea de un paciente.
3. Empleo del agente estabilizante como se ha definido en la reivindicación 1, en donde el agente estabilizante está adaptado para interactuar con las fibrillas de colágeno para formar puentes de conexión entre las fibrillas de colágeno.
4. Empleo del agente estabilizante como se ha definido en la reivindicación 3, en donde el agente estabilizante está adaptado para controlar el diámetro de las fibrillas de la córnea.
5. Empleo del agente estabilizante como se ha definido en la reivindicación 3, en donde el agente estabilizante está adaptado de forma que los puentes sean lo suficientemente flexibles para permitir el movimiento de las fibrillas dentro de un margen predeterminado.
6. Empleo de un agente estabilizante como se ha definido en la reivindicación 1, en donde los FACITs se escogen del tipo VI, tipo XII, tipo XIV, tipo XX, y cualquier combinación de los mismos.
7. Empleo del agente estabilizante como se ha definido en la reivindicación 1, en donde los SLRPs se escogen entre el biglicano, decorina, epifcano, queratocano, lumicano, mimecano, fibromodulina, y cualquier combinación de los mismos.
8. Empleo del agente estabilizante como se ha definido en la reivindicación 1, en donde la concentración del agente estabilizante está dentro de un margen de 40 $\mu\text{g/ml}$ a 100 $\mu\text{g/ml}$.
9. Empleo del agente estabilizante como se ha definido en la reivindicación 1, en donde el medicamento está en forma de una solución para aplicar en forma de gotas sobre el ojo.
10. Empleo del agente estabilizante como se ha definido en la reivindicación 1, en donde el agente estabilizante está adaptado para ser aplicado después de la retirada de los lentes ortoqueratológicos.
11. Empleo del agente estabilizante como se ha definido en la reivindicación 1, en donde el agente estabilizante está adaptado para ser aplicado antes de la retirada de los lentes ortoqueratológicos.
12. Un método para la elaboración de una composición química para la aplicación sobre una córnea vuelta a conformar, dando por resultado un procedimiento ortoqueratológico, que comprende los pasos de:
 - a. Preparación de la transglutaminasa en una solución tampón;
 - b. Mezcla de la solución y dilución en agua estéril;
 - c. Adición de EDTA a la solución; y a continuación,
 - d. Adición de cloruro de calcio antes de la aplicación de la composición a la córnea.
13. Un sistema ortoqueratológico, el cual comprende:
 - a) un lente ortoqueratológico, para ser insertado dentro del ojo de un paciente para dar una nueva forma al tejido no ablandado de la córnea en una forma preseleccionada de la córnea, dictada por el lente ortoqueratológico; y
 - b) un agente estabilizante para ser administrado dentro del ojo del paciente para estabilizar el tejido de la córnea en la forma preseleccionada, en donde el agente estabilizante comprende por lo menos un compuesto escogido entre la transglutaminasa, los SLRPs y los FACITs.
14. Una composición adecuada para la aplicación a la córnea, la cual comprende por lo menos un compuesto escogido de los colágenos asociados a las fibrillas con triple hélice interrumpida (FACITs) en una solución fisiológicamente compatible, en donde la solución está tamponada a un pH de 6,5 a 8,5, y además en donde la concentración de FACIT oscila entre 10 y 500 $\mu\text{g/ml}$.
15. La composición de la reivindicación 14, en donde los FACITs se escogen entre el tipo VI, tipo XII, tipo XIV, tipo XX, y cualquier combinación de los mismos.

ES 2 338 750 T3

16. La composición de la reivindicación 14, en donde la solución está tamponada a un pH de 6,8 a 7,6.

17. La composición de la reivindicación 14, en donde la concentración de los FACITs oscila de 40 a 100 $\mu\text{g/ml}$.

5 18. La composición de la reivindicación 14, en donde la composición comprende además por lo menos un compuesto escogido entre proteoglicanos pequeños repetidos, ricos en leucina (SLRPs).

10 19. Una composición adecuada para la aplicación sobre la córnea, la cual comprende por lo menos un compuesto escogido entre proteoglicanos pequeños repetidos, ricos en leucina (SLRPs) en una solución fisiológicamente compatible, en donde los SLRPs se escogen entre el queratocano y el mimecano, en donde la solución está tamponada a un pH de 6,5 a 8,5, y además en donde la concentración de los SLRP oscila de 10 a 500 $\mu\text{g/ml}$.

20. La composición de la reivindicación 19, en donde la solución está tamponada a un pH de 6,8 a 7,6.

15 21. La composición de la reivindicación 19, en donde la concentración de los SLRPs oscila de 40 a 100 $\mu\text{g/ml}$.

20 22. Una composición adecuada para la aplicación a la córnea, la cual comprende decorina en una solución tampón fisiológicamente compatible, en donde la solución está tamponada a un pH de 6,8 a 8,5 y además en donde la concentración de la decorina oscila de 10 a 500 $\mu\text{g/ml}$.

23. La composición de la reivindicación 22, en donde la solución está tamponada a un pH de 6,8 a 7,6.

24. La composición de la reivindicación 22, en donde la concentración de los SLRPs oscila de 40 a 100 $\mu\text{g/ml}$.

25 25. La composición de la reivindicación 22, en donde la solución comprende un tampón escogido entre los tampones de fosfato, los tampones HEPES y TRIZMA.

26. La composición de la reivindicación 22, en donde la concentración del tampón es de 0,005 a 5 M.

30 27. Un método para la elaboración de una composición química adecuada para la aplicación a la córnea, la cual comprende los pasos de:

35 a. Disolución de colágenos asociados a las fibrillas con triples hélices interrumpidas (FACITs) en una solución fisiológicamente compatible, a una concentración de FACITs que oscila de 10 a 500 $\mu\text{g/ml}$; y

b. Tamponado de la solución a un nivel de pH fisiológicamente compatible de 6,5 a 8,5.

40 28. El método de la reivindicación 27, en donde la concentración de la composición química está dentro del margen de 40 $\mu\text{g/ml}$ a 100 $\mu\text{g/ml}$ de FACITs.

45

50

55

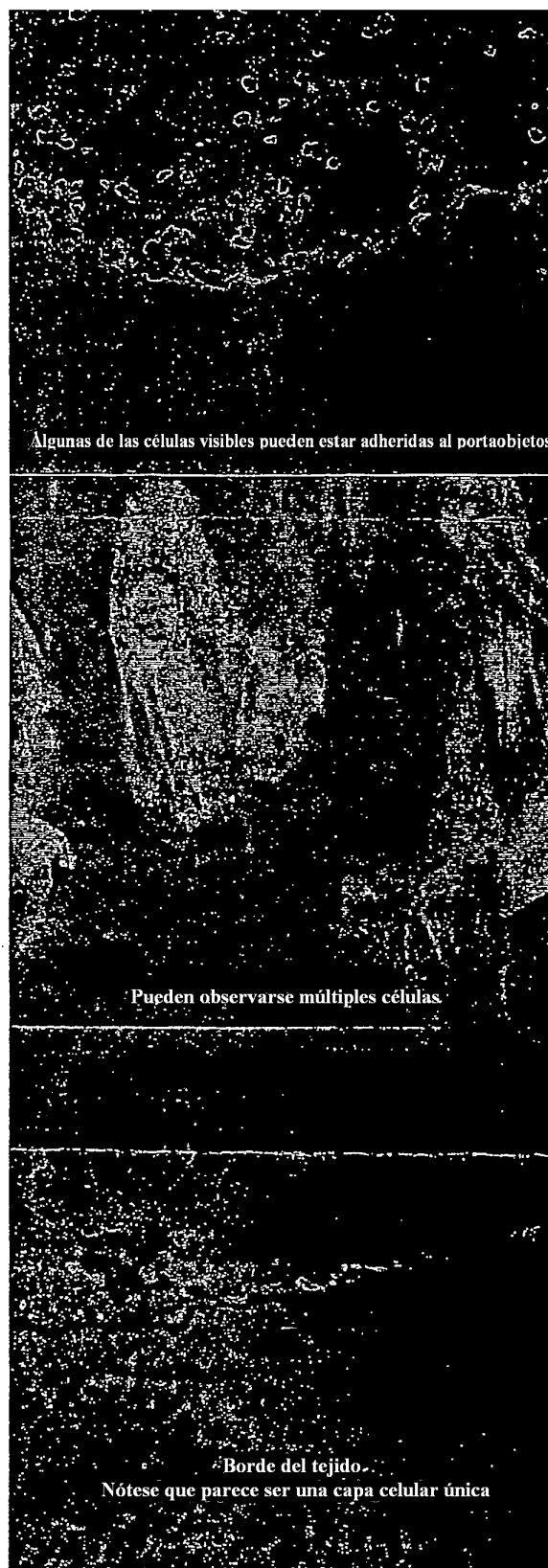
60

65

FIGURA 1

Imágenes confocales

Decorina bovina marcada con verde Oregón 514



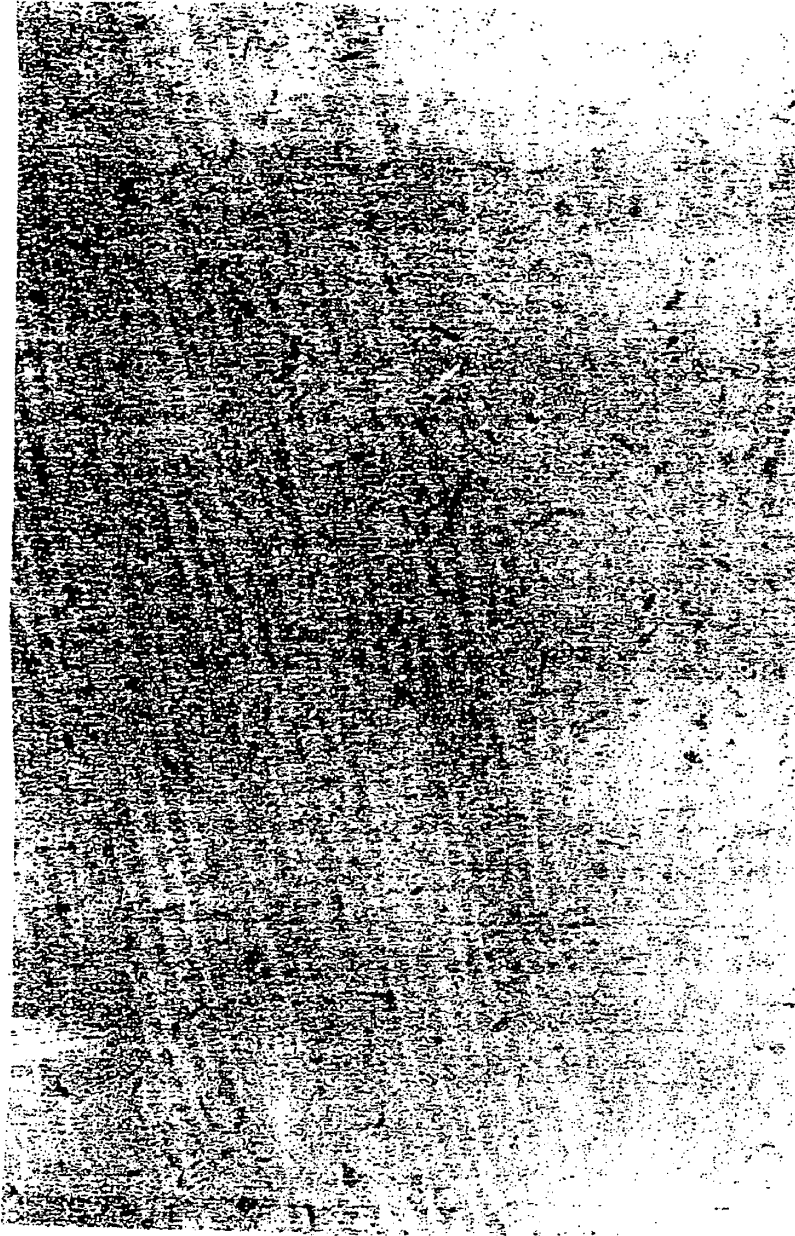


Figura 2. Muestra # 3380543



Figura 3 Muestra # 3380562