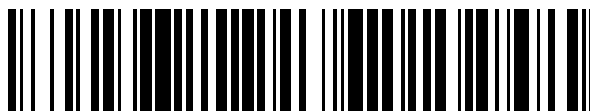


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 319 759**

51 Int. Cl.:

**A61K 49/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA  
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.10.2003 PCT/EP2003/011251**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.04.2004 WO04035091**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2003 E 03757950 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **30.05.2018 EP 1553984**

54 Título: **Uso de un agente colorante para la coloración de la cápsula del cristalino o de membranas formadas en la retina del ojo**

30 Prioridad:

**14.10.2002 DE 10247781**  
**28.11.2002 DE 10255601**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:  
**26.10.2018**

73 Titular/es:

**FLUORON GMBH (100.0%)**  
**Magirus-Deutz-Strasse 10**  
**89077 Ulm, DE**

72 Inventor/es:

**MEINERT, HASSO;**  
**GÜNTHER, BERNHARD;**  
**KIM, YONG-KEUN; y**  
**HIEBL, WILFRIED**

74 Agente/Representante:

**CONTRERAS PÉREZ, Yahel**

**DESCRIPCIÓN**

USO DE UN AGENTE COLORANTE PARA LA COLORACIÓN DE LA CÁPSULA DEL CRISTALINO O DE MEMBRANAS FORMADAS EN LA RETINA DEL OJO

5 La invención se refiere al uso de una solución acuosa, fisiológicamente compatible, en la que se disuelve un colorante de trifenilmetano biocompatible para la producción de un agente colorante para la coloración de una membrana limitante interna que se debe retirar del ojo durante la cirugía de retina o del humor vítreo, en donde el agente colorante además de las células muertas para la diferenciación del material vivo, también colorea las células  
10 vivas.

A partir del documento WO 02/07693 A se conocen composiciones para la coloración de células epiteliales mediante colorantes mitocondriales, particularmente para el diagnóstico de tejido epitelial canceroso o precanceroso. Como colorantes se pueden utilizar disoluciones acuosas, tamponadas de Verde Malaquita y Verde Brillante.

15 A partir del documento GB-A-2.026.015 se conocen composiciones para la coloración de células, que contienen, entre otros, del 0,1 al 0,5% de un colorante de trifenilmetano, pudiéndose producir estas composiciones como soluciones.

20 A partir del documento EP-A-0 037 905 se conoce un método para la identificación y determinación por diagnóstico diferencial de células leucémicas, en el que se usa un colorante de trifenilmetano.

Además, a partir del documento WO 99/58160 se conoce el uso de azul de tripano como colorante. Este compuesto conocido de la clase de los colorantes diazo se usa en una solución acuosa para la coloración de la cápsula anterior  
25 en las intervenciones de catarata en el ojo. Por la visualización de la cápsula anterior, el cirujano reconoce el contorno de la capsulorrexis, con lo que se simplifica la faecoemulsificación.

El azul de tripano es una sustancia citotóxica, tal como se conoce, por ejemplo, por Solomon K. D. et al.: Protective effect of the anterior lens capsule during extracapsular cataract extraction, OPTHALMOLOGY, vol. 96, N° 5, mayo de 1989 (1989-05), 591-597 y Veckener M. et al.: Ocular toxicity study of trypan blue injected into the vitreous cavity of rabbit eyes, Graefes Arch Clin Ex Ophthalmol (2002) 239: 698-704. Por lo tanto, cuando se utiliza azul de tripano es necesario efectuar un lavado completo, sobre todo de la zona del ojo en la que se ha utilizado el azul de tripano como agente colorante, inmediatamente después de la operación de catarata, para evitar su permanencia más  
30 prolongada en el cuerpo o en el ojo.

35 El documento US-A-4.764.360 describe la incorporación de un colorante con un peso molecular de al menos 10.000 a un polímero de alto peso molecular, que forma el medio de soporte.

De este modo, se debe evitar que el colorante penetre en el tejido corporal circundante. El colorante sólo debe  
40 colorear el medio de soporte de alto peso molecular.

Además, se conoce (E. Kutchera, "Vitalfärbung der abgehobenen Netzhaut und ihre Defekte", Albrecht v. Graefes Arch. klin. exp. Ophthal. 178, 72, 87 (1969)) cómo inyectar el colorante azul patente por vía intravítrea para hacer visibles los defectos que afectan a toda la retina en casos de desprendimiento de retina. Para la inyección intravítrea  
45 se usó una solución al 0,47% de azul patente-ácido hialurónico. La visualización del desprendimiento de retina requiere una cantidad de tiempo extremadamente alta y sólo tiene lugar algunos días después de la inyección.

Es un objetivo de la invención proporcionar la producción de un agente colorante exento de citotoxicidad, que sea adecuado para hacer visible la membrana limitante interna del ojo humano o animal.

50 Este objetivo se resuelve de acuerdo con la invención por las características de la reivindicación 1. Las reivindicaciones dependientes contienen realizaciones ventajosas de la invención.

En la invención, se prepara un agente colorante para la coloración de las membranas en el ojo humano y animal mediante el uso de un colorante de trifenilmetano biocompatible sin medio de soporte en una solución acuosa fisiológicamente compatible, particularmente de cloruro sódico, que puede estar ajustada con un tampón a un pH de 6,8 a 7,8, en especial de aproximadamente 7,8. El agente de coloración es un colorante no polimérico, de bajo peso molecular y soluble en agua. El agente de coloración que se usa en la invención se puede utilizar para la detección de vitalidad, donde, sin embargo, y a diferencia de los colorantes vitales convencionales, con el colorante  
60 biocompatible que se usa en la invención, además de las células muertas para la diferenciación del material vivo, también se pueden colorear las células vivas.

Como colorante soluble en agua, de bajo peso molecular, se utiliza un colorante de trifenilmetano. El colorante se utiliza sin medio de soporte. Ejemplos de tales colorantes adecuados son el azul patente y el azul brillante R, conociéndose este último por la coloración de proteínas en la electroforesis en gel.

El azul patente es preferiblemente un azul patente V ( $C_{54}H_{62}CaN_4O_{14}S_4$ , PM: 1159,45) admitido como colorante alimentario (L-azul 3 = E 131).

Como tampón se utiliza un tampón fosfato, hidrógeno-carbonato o citrato, cuyo valor de pH se puede ajustar mediante hidróxido sódico. La concentración del colorante biocompatible, por ejemplo, de azul patente V, en solución acuosa es, preferiblemente, de 0,6 a 2,5 g/l, en particular de aproximadamente 1,2 g/l. Se consigue una coloración espontánea de las zonas deseadas en el cuerpo humano o animal.

El agente colorante se puede usar para la coloración de la cápsula del cristalino, particularmente de la cápsula anterior del cristalino durante una operación de catarata. La coloración se produce antes de la capsulorrexis y la facoemulsificación.

Para la coloración, el humor acuoso se aspira por una incisión de túnel corneal o escleral y, a continuación, la cámara anterior se llena con un gas, en especial aire. Con una cánula se administran aproximadamente 0,3 ml de solución de agente colorante, por ejemplo, de azul patente V, a la cámara anterior. Se produce la coloración de la cápsula del cristalino, que está delimitada por el borde pupilar del iris. Después de algunos segundos, para la eliminación por lavado del colorante innecesario, la cámara anterior se enjuaga con una solución de cloruro sódico.

A continuación, para la realización de la operación de catarata se introduce de forma convencional una solución viscoelástica en la cámara anterior del ojo. Debido a la coloración azul de la cápsula anterior, el contorno de la capsulorrexis destaca notoriamente y se puede diferenciar claramente del tejido gris del núcleo del cristalino.

Además, el agente colorante se puede utilizar para la coloración de la membrana limitante interna o, membranas producidas, por ejemplo, como consecuencia de PVR (vitreo-retinopatía proliferativa), particularmente membranas epirretinianas en la retina o en la superficie posterior de la membrana limitante del humor vítreo, especialmente en la cirugía de retina y del humor vítreo.

Durante la eliminación, por ejemplo, de una membrana epirretiniana de la retina, se suministra el colorante, por ejemplo, azul patente V, en aproximadamente 0,3 ml de la solución de tampón indicada, de forma selectiva a través de una cánula insertada en la pars plana a la membrana que se debe retirar. Previamente, el humor vítreo se puede sustituir completa o parcialmente por una carga de gas, como se utiliza de forma convencional en la cirugía de humor vítreo o de retina, particularmente de la mácula. Al colorear la membrana epirretiniana se puede producir, eventualmente, una coloración del tejido retiniano adyacente con un grado de coloración más débil. Entonces, al eliminar la membrana del tejido retiniano subyacente, no coloreado, se produce un buen contraste. Después de la coloración, el exceso de solución de agente colorante se elimina por lavado y el espacio libre se llena con el sustituto de humor vítreo en forma del gas que se ha indicado. Por medio de la coloración es posible trabajar con un instrumento no iluminado o iluminado solamente de forma débil durante la retirada de la membrana. De este modo, gracias a la percepción suficiente de contraste se disminuye considerablemente la fototoxicidad. Particularmente con el uso en relación con membranas epirretinianas (gliosis epirretiniana, "macular pucker", "surface wrinkling"), la utilización de la solución de agente colorante representa una ayuda valiosa para la detección y eliminación de las membranas.

Cuando, en el caso de forámenes maculares con un tamaño de orificio creciente, se requiere la retirada de la membrana limitante interna, la coloración de esta membrana con la solución de agente colorante resulta ser una ayuda ventajosa para la búsqueda y eliminación de esta membrana durante la cirugía del humor vítreo.

Adicionalmente, es posible colorear un material viscoelástico, por ejemplo, ácido hialurónico, que se utiliza como ayuda durante la cirugía oftalmológica, con la solución acuosa de agente colorante. De esta forma, resulta posible obtener, especialmente durante la operación de catarata, una mejora del contraste del adyuvante viscoelástico con respecto al tejido intraocular, en particular del iris del ojo y del reflejo del fondo.

En comparación con el azul de tripano convencional, que tiene acción teratógena o mutágena (Cahen RL: Evaluation of the teratogenicity of drugs, Clin Pharmacol. Ther., 1964, 5, 480-514 e información del producto de BLUR-HEXTM, Dr. Agarwal's Pharma Ltd. Chennai (India)), la solución biocompatible de acuerdo con la invención, por ejemplo, de azul patente V o azul brillante R, no es citotóxica.

Para la comprobación de la ausencia de citotoxicidad se trataron células de ratón L 929 y células ARPE-19 con el agente colorante azul patente V, según la invención, a diferentes concentraciones durante 68 a 72 horas en la incubadora. La vitalidad de las células y la citotoxicidad derivada se determinaron cuantitativamente por

determinación del contenido proteico de los cultivos celulares tratados, con respecto a cultivos de control no tratados. El contenido proteico se determina colorimétricamente mediante un método convencional.

Se demuestra que no existe citotoxicidad en un nivel significativo correspondiente a una inhibición del crecimiento superior al 30%.

La invención es particularmente ventajosa durante la realización de operaciones de catarata con cataratas opacas y/o fondos intensamente pigmentados, en los que el reflejo del fondo es débil o está ausente. Con ayuda del agente de coloración se consigue un buen contraste entre la cápsula anterior coloreada y el tejido subyacente.

10

A continuación se indican ejemplos de realización del agente colorante en diferentes soluciones de tampón.

Ejemplo 1

15

Azul patente V con una concentración de 1,2 g/l en una solución de tampón fosfato.  
200 ml de solución contienen:  
0,240 g de azul patente V  
0,380 g de hidrogeno-fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )  
0,060 g de dihidrógeno-fosfato sódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )  
1,640 g de cloruro sódico (NaCl)  
hidróxido sódico para el ajuste del pH.

20

Ejemplo 2

25

Azul patente V con una concentración de 1,2 g/l en una solución de tampón de hidrogeno-carbonato.  
200 ml de solución contienen:  
0,240 g de azul patente V  
0,420 g de hidrogeno-carbonato sódico ( $\text{NaHCO}_3$ )  
1,640 g de cloruro sódico (NaCl)  
hidróxido sódico para el ajuste del pH

Ejemplo 3

30

Azul patente V con una concentración de 1,2 g/l en una solución de tampón citrato.  
200 ml de solución contienen:  
0,240 g de azul patente V  
0,216 g de citrato trisódico ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )  
1,640 g de cloruro sódico (NaCl)  
hidróxido sódico para el ajuste del pH

35

También se pueden producir ejemplos de realización idénticos de acuerdo con los Ejemplos 1, 2 y 3 con azul brillante R con una concentración de 1,2 g/l.

Preferiblemente, en las soluciones de tampón el valor del pH se ajusta con hidróxido sódico. Sin embargo, también es posible ajustar la propia solución hasta el valor de pH deseado (neutro, débilmente ácido o débilmente alcalino) dentro del intervalo preferido de 6,8 a 7,8. El ajuste de la concentración de azul patente a preferiblemente 0,6 hasta 2,5 g/l, en particular de aproximadamente 1,2 g/l, se alcanza por medio de la cantidad correspondiente de azul patente V.

45

50

55

60

**REIVINDICACIONES**

5

1. Uso de una solución acuosa, fisiológicamente compatible, en la que se disuelve un colorante de trifenilmetano biocompatible, para la producción de un agente colorante para la coloración de una membrana limitante interna que se debe retirar del ojo durante la cirugía de retina o del humor vítreo, en donde el agente colorante además de las células muertas para la diferenciación del material vivo, también colorea las células vivas.

10

2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el colorante se disuelve en un tampón neutro o débilmente ácido o débilmente alcalino.

15 3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el colorante se disuelve en un tampón con un valor de pH de 6,8 a 7,8.

4. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que se usa un tampón fosfato, hidrógeno-carbonato o citrato.

20 5. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la concentración del colorante en la solución de tampón es de 0,3 a 2,5 g/l, en particular de aproximadamente 1,2 g/l.

6. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que como colorante se usa azul patente V.

25 7. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que como colorante se usa azul brillante R.

30

35

40

45

50

55