



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 983**

51 Int. Cl.:

A61B 18/18 (2006.01)

A61B 18/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01923275 .0**

96 Fecha de presentación : **12.02.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1272119**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.01.2003**

54 Título: **Unión tisular fotoquímica.**

30 Prioridad: **11.02.2000 US 181980 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.04.2011

73 Titular/es: **The General Hospital Corporation
55 Fruit Street
Boston, Massachusetts 02114, US**

72 Inventor/es: **Kochevar, Irene;
Redmond, Robert, W. y
Azar, Dimitri**

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 356 983 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

ANTECEDENTES

5 Los procedimientos de cierre de heridas tradicionales, tales como las grapas y las suturas, presentan numerosas desventajas, incluyendo el posible caso de inflamación, irritación, infección, abertura de herida y fugas. En las aplicaciones de córnea, las suturas con frecuencia producen astigmatismo debido a la tensión de sutura irregular. Los resultados cosméticos de la utilización de grapas y suturas también pueden resultar no deseados.

10 Las alternativas posibles a las suturas incluyen los adhesivos hemostáticos, tales como sellantes de fibrina (Henrick *et al.* (1987) J Cataract Refract Surg 13: 551-553; Henrick *et al.* (1991) J Cataract Refract Surg 17: 551-555), adhesivos de cianoacrilato (Shigemitsu *et al.* (1997) International Ophthalmology 20: 323-328), y pegamento tisular fotodinámico, compuesto por una mezcla de riboflavina-5-fosfato y fibrinógeno, de los que se ha informado que cierran incisiones de cataratas y acoplan la córnea de donante en trasplantes de córnea (Goins *et al.* (1997) J Cataract Refract Surg 23: 1331-1338; Goins *et al.* (1998) J Cataract Refract Surg 24: 1566-1570: patente US nº 5.552.452). Además, se ha intentado la soldadura tisular controlada por temperatura en la córnea bovina y el intestino de rata (Barak *et al.* (1997) Surg Ophthalmol 42 Sup. 1: S77-81; Cilesiz *et al.* (1997) Lasers Surg Med 21: 269-86). También se ha informado de la soldadura tisular fotoquímica de duramadre, utilizando 1,8-naftalimidias irradiadas con luz visible (Judy *et al.* (1993) Proc. SPIE - Int. Soc. Opt. Eng. 1876: 175-179).

20 El documento WO 91/04073 da a conocer un procedimiento de soldadura tisular que comprende aplicar una material de absorción de energía tal como colorante y un agente de soldadura tal como fibrinógeno o pegamento de fibrina al tejido que va a soldarse e impartir energía al material de absorción de energía para efectuar la soldadura del tejido. La energía puede impartirse dirigiendo una fuente de energía tal como un láser hacia el material de absorción de energía, presentando el láser una longitud de onda dominante que corresponde a una longitud de onda pico de absorción dominante del colorante, de manera que el colorante absorbe la energía del láser, calienta el tejido y efectúa la soldadura del tejido.

25 La técnica ideal para el cierre de heridas sería más sencilla, más rápida, y propensa a menos complicaciones posoperatorias que las técnicas convencionales. En la córnea, una técnica de reparación de tejidos o cierre de heridas ideal produciría un sellado hermético sin inducir astigmatismo.

SUMARIO

30 En un aspecto la invención proporciona la utilización de un compuesto fotoactivable en la preparación de un medicamento para unir un primer tejido y un segundo tejido, en la que el compuesto se irradia con luz de una longitud de onda fotoactivante y a una irradiancia de menos que 3,5 W/cm² en ausencia de un sustrato reticulable exógeno para formar un complejo tejido-compuesto y formar un sellado de tejido entre el primer tejido y el segundo tejido.

35 La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que la aplicación o un fotosensibilizador, por ejemplo, rosa de bengala (RB), riboflavina-5-fosfato (R-5-P), azul de metileno (MB), o N-hidroxipiridina-2-(1H)-tiona (N-HTP), a un tejido, por ejemplo, córnea, piel, tendón, cartílago o hueso, seguido por una fotoactivación, por ejemplo, irradiación con energía electromagnética, por ejemplo, luz, puede producir un sellado de tejido-tejido (por ejemplo, para reparar una herida, o sellar un trasplante de tejido) sin desnaturalización del colágeno o daño al tejido periférico inducido por calor. Además, el sellado de tejido-tejido puede producirse cuando se aplica el fotosensibilizador al tejido en ausencia de una fuente suministrada exógenamente de sustrato reticulable, por ejemplo proteína, por ejemplo, fibrina o fibrinógeno, o adhesivo o pegamento tisular a base de proteína. Con frecuencia se sugiere utilizar tales sustancias exógenas para aportar proteína reticulable a un tejido. (Un injerto de tejido no se considera una fuente de sustrato reticulable suministrada exógenamente). Este procedimiento se denomina en la presente memoria unión tisular fotoquímica (PTB). Puede utilizarse PTB *ex vivo* o *in vivo* en un sujeto, por ejemplo, un ser humano, o un animal no humano, preferentemente un animal no albino.

45 El medicamento puede utilizarse para reticular tejidos, por ejemplo, creando un sello tisular. Esto puede incluir identificar un tejido que necesita reparación, por ejemplo, un tejido de colágeno, por ejemplo, córnea, piel, hueso, cartílago o tendón; poner en contacto el tejido, y opcionalmente un segundo tejido, con al menos un agente fotosensibilizador, por ejemplo, rosa de bengala (RB), riboflavina-5-fosfato (R-5-P), azul de metileno (MB), o N-hidroxipiridina-2-(1H)-tiona (N-HTP), para formar una mezcla tejido-fotosensibilizador; y aplicar una energía electromagnética, por ejemplo, luz a la mezcla tejido-fotosensibilizador suficiente para producir reticulación de una proteína, por ejemplo, colágeno, en el tejido. El tejido no se pone en contacto con una fuente suministrada exógenamente de sustrato reticulable, por ejemplo proteína, por ejemplo, fibrina o fibrinógeno, o adhesivo o pegamento tisular a base de proteína, que se reticula mediante la aplicación de energía electromagnética.

50 En una forma de realización preferida, el tejido es tejido corneal. Por ejemplo, pueden unirse juntos, o al tejido del injerto, uno o más elementos, por ejemplo, bordes o superficies cortadas o separadas de otra manera, del tejido corneal del sujeto.

55 En una forma de realización preferida, el tejido necesita reparación. Por ejemplo, el tejido, por ejemplo, córnea, se ha sometido a un traumatismo, una incisión quirúrgica, reacomplamiento de colgajo mediante LASIK, trasplante de córnea o corrección de astigmatismo.

60 En una forma de realización preferida, el agente fotosensibilizador se selecciona de entre el grupo constituido por rosa de bengala, riboflavina-5-fosfato, azul de metileno y N-hidroxipiridina-2-(1H)-tiona.

- En una forma de realización preferida, el agente fotosensibilizador es rosa de bengala.
- El medicamento puede utilizarse tal como se expuso anteriormente en el que la etapa que consiste en la puesta en contacto se produce *ex vivo*.
- 5 Alternativamente la etapa que consiste en la puesta en contacto se produce *in vivo* en un sujeto, por ejemplo un ser humano, o un animal no humano, preferentemente un animal no albino, por ejemplo, un conejo no albino.
- El sujeto puede ser distinto de un animal albino, por ejemplo, distinto de un conejo albino
- El sujeto puede ser un ser humano.
- La aplicación de energía electromagnética a la mezcla tejido-fotosensibilizador se produce sin daño térmico al tejido, por ejemplo, sin contracción o deformación alrededor del sitio de la herida.
- 10 La aplicación de energía electromagnética a la mezcla tejido-fotosensibilizador se produce sin un aumento superior a 3°C de temperatura según se mide, por ejemplo, con una cámara térmica de obtención de imágenes durante la irradiación.
- La aplicación de energía electromagnética a la mezcla tejido-fotosensibilizador se produce sin un aumento superior a 2°C de temperatura según se mide, por ejemplo, con una cámara térmica de obtención de imágenes durante la irradiación.
- 15 La aplicación de energía electromagnética a la mezcla tejido-fotosensibilizador se produce sin un aumento superior a 1°C de temperatura según se mide, por ejemplo, durante la irradiación con una cámara térmica de obtención de imágenes.
- El medicamento puede utilizarse para reparar una lesión córnea, por ejemplo, una incisión córnea, laceración, o un trasplante de córnea, en un sujeto, por ejemplo, un ser humano, o un animal no humano, preferentemente un animal no albino. Esto incluye: poner en contacto un tejido córnea con al menos un agente fotosensibilizador por ejemplo, RB, R-5-P, MB o N-HTP, y aplicar energía electromagnética, por ejemplo, luz, a la mezcla tejido córnea-fotosensibilizador suficiente para producir una especie reactiva, por ejemplo, una especie de oxígeno reactivo, a partir del fotosensibilizador. El tejido córnea no se pone en contacto con una fuente suministrada exógenamente de sustrato reticulable, por ejemplo, proteína, por ejemplo, fibrina o fibrinógeno, o adhesivo o pegamento tisular a base de proteína, que se reticula mediante la aplicación de energía magnética electromagnética.
- 20 La lesión córnea puede estar provocada por un procedimiento quirúrgico.
- El procedimiento quirúrgico puede seleccionarse de entre el grupo constituido por cirugía de trasplante de córnea, cirugía de cataratas, cirugía por láser, queratoplastia, queratoplastia penetrante, queratoplastia lamelar posterior, LASIK, cirugía refractiva, restructuración de la córnea y tratamiento de laceración córnea.
- 30 Pueden unirse juntos, o a tejido de injerto, uno o más elementos, por ejemplo, bordes o superficies cortados o separados de otra manera, del tejido córnea del sujeto.
- Un tendón del músculo de un sujeto puede unirse al ojo del sujeto. Por ejemplo, puede reducirse, ajustarse o corregirse una desalineación ocular, por ejemplo, uniendo un tendón del músculo ocular al ojo.
- 35 La córnea puede necesitar corrección por astigmatismo. Por ejemplo, puede utilizarse PTB para corregir, reducir o disminuir el astigmatismo, por ejemplo, induciendo astigmatismo en el meridiano ortogonal, contrarrestando así el astigmatismo preexistente. PTB induce un grado predecible de astigmatismo correctivo.
- Puede utilizarse el medicamento junto con la administración de una terapia adyuvante, por ejemplo, terapia con lentes de contacto, terapia de membrana amniótica, terapia con LASIK o administración de antibióticos.
- 40 En una forma de realización preferida la energía electromagnética aplicada es superior a 1.200 J/cm². En otra forma de realización preferida, la energía electromagnética aplicada es de entre 200 y 1.200 J/cm². En otra realización preferida, la energía electromagnética aplicada es de entre 200 y 800 J/cm². En aún otra realización preferida, la energía electromagnética aplicada es de entre 200 y 300 J/cm². En aún otra realización preferida, la energía electromagnética aplicada es de entre 300 y 600 J/cm². En otra realización preferida, la energía electromagnética aplicada es de entre 350 y 550 J/cm².
- 45 El sujeto puede ser distinto de un animal albino, por ejemplo, distinto de un conejo albino.
- El medicamento puede utilizarse para reparar una lesión córnea *in vivo* en un sujeto vivo por ejemplo, un ser humano, o un animal no humano, preferentemente un animal no albino. Esto incluye poner en contacto un tejido córnea con rosa de bengala (RB) para formar una mezcla tejido córnea-RB; y aplicar energía electromagnética, por ejemplo, luz, a la mezcla tejido córnea-RB de una manera eficaz para provocar la producción de especies reactivas, por ejemplo, especies de oxígeno reactivas, a partir de la RB. El tejido córnea no se pone en contacto con una fuente suministrada exógenamente de sustrato reticulable, por ejemplo, proteína, por ejemplo, fibrina o fibrinógeno, o adhesivo o pegamento tisular a base de proteína, que se reticula mediante la aplicación de energía electromagnética.
- 50 El sujeto puede ser un ser humano.
- 55 La lesión córnea puede estar provocada por un procedimiento quirúrgico.
- El procedimiento quirúrgico puede seleccionarse de entre el grupo constituido por cirugía de trasplante de córnea,

cirugía de cataratas, cirugía por láser, queratoplastia, queratoplastia penetrante, queratoplastia lamelar posterior, LASIK, cirugía refractiva, restructuración de la córnea y tratamiento de laceración corneal.

Pueden unirse juntos, o al tejido de injerto, uno o más elementos, por ejemplo, los bordes o superficies cortados o separados de otra manera del tejido corneal del sujeto.

- 5 Un tendón del músculo de un sujeto puede unirse al ojo del sujeto. Por ejemplo, puede reducirse, ajustarse o corregirse una desalineación ocular, por ejemplo, uniendo un tendón del músculo ocular al ojo.

La córnea puede necesitar corrección por astigmatismo. Por ejemplo, puede utilizarse PTB para corregir, reducir o disminuir astigmatismo, por ejemplo, induciendo astigmatismo en el meridiano ortogonal, contrarrestando así el astigmatismo preexistente. PTB induce un grado predecible de astigmatismo correctivo.

- 10 Puede utilizarse el medicamento junto con la administración de una terapia adyuvante, por ejemplo, terapia con lentes de contacto, terapia de membrana amniótica, terapia con LASIK, o administración de antibióticos.

El sujeto puede ser distinto de un animal albino, por ejemplo, distinto de un conejo albino

Puede utilizarse un kit para reparar lesiones corneales, kit que incluye un agente fotosensibilizador, por ejemplo, RB, R-5-P, MB o N-HTP, e instrucciones para la fotoactivación del agente fotosensibilizador para reparar la lesión corneal.

- 15 El kit no necesita incluir una fuente de sustrato reticulable, por ejemplo, proteína, por ejemplo, fibrina o fibrinógeno, adhesivo o pegamento tisular a base de proteína, para utilizarse con el fotosensibilizador.

En una forma de realización preferida, agente fotosensibilizador es la rosa de bengala. Los detalles de una o más formas de realización de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción siguiente.

- 20 Otros objetivos, características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Perfil típico de aumento de la PIO con el tiempo de infusión para un ojo tratado con PTB mostrando PIO_f a 300 mm Hg.

- 25 Figura 2. Valores de PIO_f medios para ojos tratado con PTB (n=5) utilizando luz de 514 nm (2,55 W/cm²) y RB (1,5 mM) en PBS. Los controles adicionales son incisiones tratadas con RB o tampón pero sin luz láser.

Figura 3. PIO_f media antes y después de PTB utilizando RB e irradiación de 514 nm. Se aplicó RB (10 µl, 1,5 mM) a las superficies de incisión, después se trataron con las dosis indicadas utilizando irradiancias de: (A) 1,27 W/cm², (B) 2,55 W/cm² y (C) 3,82 W/cm².

- 30 Figura 4. PIO_f media antes y después de PTB utilizando R-5-P e irradiación de 488 nm. Se aplicó R-5-P (40 µl, 11 mM) a las superficies de incisión, después se trataron con las dosis indicadas utilizando irradiancias de: (A) 1,27 W/cm², (B) 2,55 W/cm² y (C) 3,82 W/cm².

Figura 5. Los valores de PIO_f medios antes y después de la PTB utilizando FI e irradiación de 488 nm. Se aplicó FI (40 µl, 0,6 mM) a las superficies de incisión, después se trataron con las dosis indicadas utilizando irradiancias de: (A) 1,27 W/cm², (B) 2,55 W/cm² y (C) 3,82 W/cm².

- 35 **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

La unión tisular fotoquímica (PTB), tal como se describe en la presente memoria, proporciona un procedimiento para crear un sellado tejido-tejido, por ejemplo, para tratar una herida, por ejemplo, una herida corneal, sin desnaturalización del colágeno o daño al tejido periférico inducido por calor. La PTB, tal como se describe en la presente memoria, implica la aplicación de un fotosensibilizador a la superficie de una herida seguida por fotoactivación mediante irradiación de láser para sellar la herida. El fotosensibilizador puede aplicarse eficazmente para sellar una herida, o reparar de otra manera un tejido, en ausencia de un adhesivo a base de proteína exógeno, tal como fibrinógeno.

- 40 Estos procedimientos proporcionan reparación con alta resistencia a la tracción y no presentan requisito de una proteína exógena, por ejemplo, fibrinógeno, que deba aislarse del paciente que va a tratarse o derivarse de uno o más donantes. Estos procedimientos no requieren la utilización de pegamentos químicos, por ejemplo, adhesivos de cianoacrilato. Los procedimientos descritos en la presente memoria minimizan la desnaturalización térmica tisular de proteínas provocada por calentamiento tisular.

- 50 El cierre de heridas corneales o trasplantes de córnea con suturas pueden asociarse con neovascularización, rechazo de la córnea de donante y astigmatismo posoperatorio inducido debido en parte a tensión de sutura irregular. Esto puede producirse tras una queratoplastia penetrante en la que se necesitan numerosas suturas para sostener el injerto en su sitio. Las técnicas de saturación concebidas para distribuir uniformemente la tensión a través de injertos corneales todavía pueden dar como resultado un astigmatismo significativo. Adicionalmente, suturas sueltas o rotas pueden dejar a un paciente vulnerable a queratitis microbiana. Las suturas utilizadas requieren mucha destreza y se realizaron principalmente por especialistas de córnea. Los procedimientos descritos en la presente memoria no requieren la utilización de suturas. Aunque factores tales como cicatrización de heridas, dimensionamiento del injerto
- 55 en el huésped y técnicas de trepanación también desempeñan un papel en el astigmatismo posoperatorio, los procedimientos descritos en la presente memoria sostienen el injerto con una fuerza distribuida uniformemente y ayudan a reducir el astigmatismo posoperatorio. La PTB reduce el tiempo de operación y rehabilitación para

procedimientos para cerrar heridas, por ejemplo, para tratar incisiones o laceraciones córneas, colocar sellado de colgajos LASIK, realizar cirugía de cataratas, y acoplar una córnea de donante.

FOTOACTIVACIÓN Y FOTOSENSIBILIZADORES

5 El procedimiento para crear un sellado de tejido-tejido descrito en la presente memoria incluye tratar un tejido con un agente fotosensibilizador, por ejemplo, RB, R-5-P, MB, o N-HTP, preferentemente en ausencia de una proteína exógena, por ejemplo, un adhesivo a base de proteína, por ejemplo, fibrina o fibrinógeno, y fotoactivar el agente fotosensibilizador con radiación electromagnética, por ejemplo, luz.

10 Se utiliza la fotoactivación para describir el proceso por el que se absorbe energía en forma de radiación electromagnética por un compuesto, por ejemplo, un fotosensibilizador, "excitando" así al compuesto, que alcanza entonces la posibilidad de convertir la energía a otra forma de energía, preferentemente energía química. La radiación electromagnética puede incluir energía, por ejemplo, luz, que presenta una longitud de onda en el intervalo visible o la porción del espectro electromagnético, o las regiones ultravioletas e infrarrojas del espectro. La energía química puede estar en forma de una especie reactiva, por ejemplo, una especie de oxígeno reactivo, por ejemplo, un oxígeno singlete, anión superóxido, radical hidroxilo, el estado excitado del fotosensibilizador, radical libre del fotosensibilizador o especie de radical libre del sustrato. Los procesos de fotoactivación descritos en la presente memoria implican preferentemente una transferencia insustancial de la energía absorbida en energía térmica. Preferentemente, la fotoactivación se produce con un aumento de temperatura de menos de 3 grados Celsius (C), más preferentemente un aumento de temperatura de menos de 2 grados C y aun más preferentemente, un aumento de temperatura de menos de 1 grado C. según se mide, por ejemplo, por una cámara térmica de obtención de imágenes que examina el tejido durante la irradiación. La cámara puede dirigirse a la zona de depósito de colorante original, por ejemplo, la zona de la herida, o a una zona inmediatamente adyacente a la zona de la herida, a la que se difundirá el colorante. Tal como se utiliza en la presente memoria, un "fotosensibilizador" es un compuesto químico que produce un efecto biológico tras la fotoactivación o un precursor biológico de un compuesto que produce un efecto biológico tras la fotoactivación. Los fotosensibilizadores preferidos son los que absorben energía electromagnética, tal como luz. Sin desear vincularse a la teoría, el fotosensibilizador puede actuar produciendo un fotosensibilizador excitado o especies derivadas que interactúan con tejido, por ejemplo, tejido colagenoso, para formar un enlace, por ejemplo, un enlace covalente o reticulación. Los fotosensibilizadores presentan normalmente estructuras químicas que incluyen múltiples anillos conjugados que permiten la absorción de luz y fotoactivación. Los ejemplos de compuestos fotosensibles incluyen varios colorantes sensibles a la luz y moléculas biológicas tales como, por ejemplo, xantenos, por ejemplo, rosa de bengala y eritrosina; flavinas, por ejemplo, riboflavina; tiazinas, por ejemplo, azul de metileno; porfirinas y porfirinas expandidas, por ejemplo, protoporfirina 1 hasta protoporfirina IX, coproporfirinas, uroporfirinas, mesoporfirinas, hematoporfirinas y saporinas; clorofilas, por ejemplo, bacterioclorofila A, y agentes fotosensibles derivados de los mismos. Los fotosensibilizadores preferidos para su utilización en los procedimientos descritos en la presente memoria son compuestos que pueden provocar una reacción fotoquímica que puede producir un compuesto intermedio reactivo cuando se expone a la luz, y que no liberan una cantidad sustancial de energía térmica. Los fotosensibilizadores preferidos también son solubles en agua. Los fotosensibilizadores preferidos incluyen rosa de bengala (RB); riboflavina-5-fosfato (R-5-P); azul de metileno (MB) y N-hidroxipiridina-2-(1H)-tione (N-HTP).

40 Sin desear vincularse a la teoría, se cree que la energía química, por ejemplo, una especie de oxígeno reactivo, producido por fotoactivación del agente fotosensibilizador con el que se pone en contacto el tejido que va a repararse, une y provoca cambios estructurales en los aminoácidos de las proteínas del tejido, dando como resultado la formación de enlaces covalentes, polimerización, o reticulación entre aminoácidos del tejido, creando así un entramado proteico para sellar, reparar, cicatrizar o cerrar la lesión del tejido o la herida. Por ejemplo, como resultado de tratamiento de PTB, se cree que se forman reticulaciones covalentes fuertes entre moléculas de colágeno en superficies opuestas de una lesión córnea para producir un sellado de tejido hermético.

45 Puede disolverse el agente fotosensibilizador, por ejemplo, RB, R-5-P, MB o N-HTP, en un tampón o disolución biocompatible, por ejemplo, solución salina, y se utiliza a una concentración de desde aproximadamente 0,1 mM hasta 10 mM, preferentemente desde aproximadamente 0,5 mM hasta 5 mM, más preferentemente desde aproximadamente 1 mM hasta 3 mM.

50 Puede administrarse el agente fotosensibilizador al tejido mediante, por ejemplo, inyección dentro del tejido, o aplicación sobre la superficie del tejido. Puede aplicarse una cantidad de fotosensibilizador suficiente para teñir, por ejemplo, cubrir las paredes de, la lesión o herida que va a repararse. Por ejemplo, pueden aplicarse al menos 10 µl de disolución de fotosensibilizador, preferentemente 50 µl, 100 µl, 250 µl, 500 µl, o 1 ml, o más, de disolución de fotosensibilizador, al tejido, por ejemplo, una córnea. Preferentemente, el fotosensibilizador presenta una eficacia de unión, por ejemplo, una eficacia de unión de colágeno, de manera que el colorante se une predominantemente a la superficie de la incisión.

60 La radiación electromagnética, por ejemplo, luz, se aplica al tejido a una longitud de onda, energía, y duración apropiadas, para provocar que el fotosensibilizador experimente una reacción para afectar a la estructura de los aminoácidos en el tejido, por ejemplo, reticular una proteína tisular, creando así un sello tisular. Puede seleccionarse la longitud de onda de luz de modo que éste corresponde a o abarca la absorción del fotosensibilizador, y alcanza la zona del tejido que se ha puesto en contacto con el fotosensibilizador, por ejemplo, penetra en la región en la que se inyecta el fotosensibilizador. La radiación electromagnética, por ejemplo, luz, necesaria para lograr la fotoactivación del agente fotosensibilizador puede presentar a longitud de onda de desde aproximadamente 350 nm hasta aproximadamente 800 nm, preferentemente desde aproximadamente 400 hasta 700 nm y puede estar dentro del espectro visible, infrarrojo o

ultravioleta próximo. La energía puede suministrarse a una irradiancia de aproximadamente entre 0,5 y 5 W/cm², preferentemente entre aproximadamente 1 y 3 W/cm². La duración de la irradiación puede ser suficiente para permitir la reticulación de una o más proteínas del tejido, por ejemplo, de un colágeno tisular. Por ejemplo, en tejido córneo, la duración de la irradiación puede ser de desde aproximadamente 30 segundos hasta 30 minutos, preferentemente desde aproximadamente 1 hasta 5 minutos. La duración de la irradiación puede ser sustancialmente más larga en un tejido en el que la luz tiene que penetrar una capa de dispersión para alcanzar la herida, por ejemplo, piel o tendón. Por ejemplo, la duración de irradiación para suministrar la dosis requerida a una herida de piel o tendón puede ser de al menos entre un minuto y dos horas, preferentemente entre 30 minutos y una hora.

Las fuentes adecuadas de energía electromagnética incluyen láseres, lámparas, diodos emisores de luz, u otras fuentes de radiación electromagnética comercialmente disponibles. Puede aplicarse radiación de luz en la forma de un haz láser monocromático, por ejemplo, un haz láser de argón o un haz láser en estado sólido bombeado por diodos. También puede suministrarse luz a un tejido de superficie no externa a través de un dispositivo de fibra óptica, por ejemplo, puede suministrarse luz por fibras ópticas pasadas por una aguja hipodérmica de calibre pequeño o un artroscopio. También puede transmitirse luz mediante instrumentos percutáneos utilizando fibras ópticas o guías de onda canuladas.

La elección de fuente de energía se realizará generalmente junto con la elección del fotosensibilizador empleado en el procedimiento. Por ejemplo, un láser de argón es una fuente de energía preferida adecuada para utilizarse con RB o R-5-P porque estos colorantes se excitan de manera óptima a longitudes de ondas correspondientes a la longitud de onda de la radiación emitida por el láser de argón. Otras combinaciones adecuadas de láseres y fotosensibilizadores las conocerán los expertos en la materia. También pueden utilizarse láseres de colorante sintonizables con los procedimientos descritos en la presente memoria.

UTILIZACIONES

Los procedimientos descritos en la presente memoria son adecuados para su utilización en una variedad de aplicaciones, incluyendo aplicaciones de laboratorio *in vitro*, tratamientos de tejido *ex vivo*, pero especialmente en procedimientos quirúrgicos *in vivo* en sujetos vivos, por ejemplo, seres humanos, y cicatrizaciones de heridas no quirúrgicas.

Los procedimientos descritos en la presente memoria son particularmente útiles para aplicaciones quirúrgicas, por ejemplo, para sellar, cerrar, o unir de otra manera, dos o más partes de tejido, por ejemplo, para realizar una operación de trasplante de tejido, o para cicatrizar un tejido dañado, por ejemplo, una incisión córneo. Los procedimientos descritos en la presente memoria pueden utilizarse en aplicaciones quirúrgicas en las que se necesita un adhesión precisa, y/o en las que la aplicación de suturas, grapas o selladores de proteínas es inconveniente o indeseable. Por ejemplo, en trasplantes de córnea y otras operaciones oculares, con frecuencia surgen complicaciones quirúrgicas tales como inflamación, irritación, infección, abertura de herida, fugas, y crecimiento epitelial interno, de la utilización de suturas. Los procedimientos de unión tisular fotoquímica descritos en la presente memoria son particularmente adecuados para su utilización en cirugía o microcirugía, por ejemplo, en manipulaciones u operaciones quirúrgicas del ojo, por ejemplo, en la reparación de heridas o incisiones córneas, en cirugía refractiva (la corrección de irregularidades o defectos en la córnea mediante eliminación por "raspado" de una capa uniforme de la córnea), en queratoplastia, en trasplantes de córnea, y en corrección de astigmatismo, por ejemplo, induciendo astigmatismo concebido para contrarrestar astigmatismo preexistente, por ejemplo, en el meridiano ortogonal.

Como otro ejemplo, no pueden utilizarse suturas satisfactoriamente en el cartílago articular del hueso debido a su interferencia mecánica con el deslizamiento mutuo de las superficies del cartílago requerido para el movimiento articular. Tampoco pueden utilizarse suturas para sellar superficies de vasos sanguíneos pequeños con diámetros de 1-2 mm o menos, ya que las suturas inciden en la luz de los vasos, comprometiendo el flujo de sangre. Por tanto, los procedimientos descritos en la presente memoria también son útiles en intervenciones quirúrgicas de tejido vascular pequeño, cartílago articular, tubo gastrointestinal, vainas de nervios, conductos pequeños (uretra, uréter, conductos biliares, conducto torácico) o incluso el oído interno. Otros procedimientos en los que las suturas o grapas no se indican o desean, y en los que los procedimientos de unión tisular fotoquímica descritos en la presente memoria son útiles, incluyen procedimientos que implican operaciones o intervenciones laparoscópicas tales como procedimientos torácicos laparoscópicos (LP), apendectomía LP, reparaciones de hernia LP, ligaciones de trompas LP y cirugía orbitaria LP.

Los procedimientos de unión tisular fotoquímica descritos en la presente memoria también pueden utilizarse para complementar la utilización de suturas, por ejemplo, para reforzar anastomosis saturada. Las suturas dejan un tubo que puede permitir fugas de fluidos y organismos. El problema de las fugas es especialmente crítico en anastomosis vasculares o para cualquier anastomosis de una estructura que contiene fluido (aorta, uréter, tubo GI, ojo, etc.) en la que el fluido o el contenido del interior puede filtrarse al exterior a través del orificio de la sutura. En una realización, una herida puede suturarse según procedimientos generales y se trata a continuación con los procedimientos de unión tisular fotoquímica descritos en la presente memoria, haciendo así que la herida cicatrizante sea impermeable al agua, e impermeable a bacterias.

Además, los procedimientos descritos en la presente memoria pueden utilizarse en aplicaciones de cicatrización de heridas no quirúrgicas, por ejemplo, puede utilizarse un "vendaje fotoquímico" para la cicatrización de herida además de, o en lugar de, un vendaje convencional. En una realización, puede impregnarse un sustrato biocompatible, por ejemplo, un material de vendaje convencional, por ejemplo, una tira de fibra, con el agente fotosensibilizador descrito en la presente memoria, aplicarse a una herida, y fotoactivarse con una fuente de luz visible, por ejemplo, una fuente

de luz incandescente, fluorescente o de vapor de mercurio, por ejemplo, una lámpara de arco de xenón, o una fuente de luz láser. El vendaje fotoquímico puede contener otro material beneficioso para la cicatrización de heridas, por ejemplo, un antibiótico. En algunas formas de realización, el vendaje impregnado de fotosensibilizador, y/o la fuente de luz, puede suministrarse a un sujeto en un kit, por ejemplo, un kit para su utilización por un profesional sanitario, o un kit para su utilización en el domicilio, kit que puede contener instrucciones de utilización. El vendaje fotoquímico descrito en la presente memoria puede dejarse sobre la herida, o puede reemplazarse según sea necesario.

Tal vendaje puede utilizarse *ex-vivo*, en un tejido extraído del cuerpo, o *in situ* en un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano. Por ejemplo, un vendaje descrito en la presente memoria puede utilizarse como una "piel artificial" o agente de cobertura para cubrir grandes superficies de supuración en el interior o el exterior del cuerpo. Por ejemplo, pueden cubrirse pacientes quemados con un vendaje fotoquímico descrito en la presente memoria para ayudar en la prevención de infección bacteriana y para reducir la pérdida de fluidos y electrolitos del cuerpo a través de las zonas quemadas.

Los procedimientos descritos en la presente memoria también pueden utilizarse para reticular proteínas para su utilización en aplicaciones de laboratorio, por ejemplo, para fijar proteínas para microscopia, para inmovilizar anticuerpos u otros reactivos de proteínas en un sustrato para diagnóstico o purificación; o para reticular proteínas o péptidos a una matriz sólida para su utilización en aplicaciones cromatográficas o inmunológicas.

KITS

Pueden utilizarse kits en una unión tisular fotoquímica. Tales kits pueden utilizarse para laboratorio o para aplicaciones clínicas. Tales kits incluyen un agente fotosensibilizador por ejemplo, un fotosensibilizador descrito en la presente memoria, e instrucciones para aplicar e irradiar el fotosensibilizador para reticular al menos un reactivo de proteína para utilización de laboratorio, o para unir, reparar o cicatrizar un tejido animal, por ejemplo, un tejido humano, particularmente en un paciente humano. Los kits pueden incluir un recipiente para el almacenamiento, por ejemplo, un recipiente protegido frente a la luz y/o refrigerado para el almacenamiento del agente fotosensibilizador. Un fotosensibilizador incluido en los kits puede proporcionarse de varias formas, por ejemplo, en forma de polvo, liofilizada, de cristales o líquida. Opcionalmente, un kit puede incluir un agente adicional para su utilización en una aplicación de unión tisular, reparación de heridas o terapia ocular, por ejemplo, un antibiótico o una lente de contacto.

Los kits descritos en la presente memoria también pueden incluir unos medios para aplicar el agente fotosensibilizador a un tejido, por ejemplo, una jeringa o dispositivo similar a jeringa, un gotero, un polvo, un recipiente de aerosol y/o un material de vendaje. Los kits descritos en la presente memoria los que se basan en mecanismos fotoquímicos y generación de compuestos intermedios reactivos, por ejemplo, generación oxígeno singlete, pueden almacenarse en una atmosfera con alta concentración de oxígeno.

Los kits pueden incluir instrucciones de utilización, por ejemplo, instrucciones de utilización en ausencia de una fuente suministrada exógenamente de sustrato reticulable, por ejemplo, proteína, por ejemplo, fibrina o fibrinógeno.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Evaluación de PTB en la reparación de incisiones córneales

Puede utilizarse la PTB para sellar o reparar un tejido, por ejemplo, una herida, por ejemplo, una herida córneal. Este ejemplo ilustra el procedimiento experimental concebida para someter a prueba la eficacia de PTB, tal como se describe en la presente memoria, utilizando córneas de mamífero *ex vivo*. Se realizaron experimentos según el procedimiento siguiente.

Se recibieron ojos de conejos en hielo (Pel-Freez Biologicals) aproximadamente 17-24 horas después del sacrificio y la enucleación. Se mantuvieron los ojos en hielo y se utilizaron el mismo día. Se montó el ojo que iba a estudiarse en un bloque de poliestireno cubierto de plástico y se fijó en su posición mediante agujas insertadas a través de los músculos extraoculares en el poliestireno. Entonces se colocó el ojo bajo un microscopio de disección (Reichert Scientific Instruments. 1L) permitiendo la visualización de la zona tratada durante el procedimiento completo. Se insertó una aguja de 27 G paralela al iris, 2 mm anterior al limbo en córnea transparente, y se colocó sobre el cristalino en la cámara anterior. Se conectó la aguja tanto a un transductor de presión arterial (Harvard Apparatus, MA) como a un minifusor 400 (Bard Harvard) por medio de un acoplador en T. El transductor de presión está constituido por un elemento transductor que se conecta mediante cables a una caja de amplificador y utiliza una cúpula semidesechable con una membrana de caucho de silicona solidaria. Se transmite presión dentro de la cúpula a través de la membrana a un botón de plástico cuyo movimiento se traduce en una tensión. La tensión generada por la combinación transductor-amplificador es proporcional al límite inferior de la presión intraocular (PIO). Se registraron señales del transductor-amplificador utilizando un instrumento Macintosh G3 Power book equipado con una tarjeta de adquisición de datos PCMICA (DAQCARD - 1200) (National Instruments, TX). Se controló la adquisición de datos utilizando programas escritos utilizando el paquete de software LabView 4 (National Instruments, TX). Se convirtió la tensión del transductor y amplificador en presión calibrando con un manómetro permanente.

Se iniciaron experimentos con ojos individuales incrementando la PIO hasta 30-40 mm Hg, utilizando infusión de agua a una velocidad de 1 mL por minuto. Se realizó una incisión en la córnea a 1 mm del limbo y paralela al iris, utilizando un queratomo angular de 3,5 mm (Becton Dickinson Co.). Para cada ojo se registró la PIO requerida para producir la fuga de fluido de la incisión (PIO_i) antes y después del tratamiento de PTB. Se aplicó un fotosensibilizador, disuelto en disolución tampón fosfato (STF, pH 7,2, Gibco BRL), a las paredes de la incisión utilizando una jeringa de 50 µl Gastight, (Hamilton Co.) con una aguja de 27 G. La espectroscopia de fluorescencia confocal confirmó la ubicación del

fotosensibilizador, por ejemplo, rosa de bengala, en las paredes de la incisión e indicó que el fotosensibilizador penetró aproximadamente 100 μM lateralmente dentro de la pared de la incisión.

5 Los fotosensibilizadores, su absorción máxima, y sus coeficientes de absorción a las longitudes de onda del láser utilizados en este ejemplo fueron, por ejemplo, rosa de bengala (RB), 550 nm, $33.000 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 514 nm; fluoresceína (FI), 490 nm, $88.300 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 488 nm; azul de metileno (MB), 664 nm, $15.600 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 661 nm; riboflavina-5-fosfato (R-5-P), 445 nm, $4330 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 488 nm; y N-hidroxipiridina-2-(1H)-tiona (N-HPT), 314 nm, $2.110 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 351 nm. Se utilizaron los fotosensibilizadores tal como se recibieron con la excepción de N-HPT que se recristalizó dos veces en etanol acuoso antes de su utilización. Se ajustaron las concentraciones de los fotosensibilizadores de modo que todas las disoluciones presentaban una absorbencia de aproximadamente 1,0 en una longitud de trayectoria de 200 μm a las longitudes de onda de irradiación de láser (con la excepción del N-HPT para la que la absorción fue aproximadamente un factor de 10 inferior).

10 Las irradiaciones utilizaron un láser de ión argón de onda continua (CW) (Innova 100; Coherent, Inc., Palo Alto, California) a 488 nm (para FI y R-5-P), 514,5 nm (para RB) o 351 nm (para NHPT). Se utilizó un láser de colorante bombeado por ión argón (CR-599; Coherent) con colorante 4-dicianometilen-2-metil-6-(p-dimetilaminoestiril)-4H-pirano (Exciton, Inc. Dayton, Ohio) para la irradiación a 661 nm (para MB). Se acopló la luz láser en una fibra de cuarzo de 1 mm de diámetro y se creó una mancha de 1 cm de diámetro en el tejido utilizando una combinación de lentes biconvexas de sílice fundida de calidad S1-UV, de 1 y 2 pulgadas de longitud focal (Esco Products), montadas en una disposición de armazón de serie SM1 (Thorlabs, NJ). La mancha circular de 1 cm de diámetro fue suficiente para cubrir la incisión completa y se ajustó la óptica de modo que la luz láser era incidente en la córnea a un ángulo de aproximadamente 45° con respecto al plano de la incisión. Se obtuvieron curvas de respuesta a la dosis variando la duración de la irradiación a una irradiancia constante. En experimentos separados se investigaron los efectos de la irradiancia del láser mediante comparación de la misma dosis suministrada utilizando irradiancias diferentes. Las dosis utilizadas estuvieron comprendidas entre 124 y 1.524 J/cm^2 y las irradiancias utilizadas fueron de 0,64, 1,27, 2,55 y $3,86 \text{ W/cm}^2$. El tiempo de exposición al láser estuvo comprendido entre 33 segundos para la dosis más baja utilizando la irradiancia más alta y 26 minutos y 27 segundos para la dosis más alta utilizando la irradiancia más baja. Se registró la PIO_i inmediatamente tras el tratamiento. Se inició la infusión (1 mL por minuto) y se aumentó la PIO_i hasta un máximo seguido por un descenso agudo producido, que corresponde a la apertura de la incisión y la fuga del fluido desde la cámara anterior. En la figura 1 se representa un perfil típico que muestra los cambios de PIO_i con el tiempo de infusión. Se sometieron a prueba de cinco a 10 ojos de conejo para cada condición de dosis e irradiancia.

20 Los experimentos de control incluyeron: (1) irradiación sin aplicación de fotosensibilizador, (2) aplicación de un fotosensibilizador solamente y (3) ni fotosensibilizador ni irradiación láser. En los experimentos que no utilizan un fotosensibilizador, se aplicó PBS a las paredes de la incisión, utilizando el mismo procedimiento que el descrito por los fotosensibilizadores. En los experimentos de control sin irradiación láser se dejó reposar el ojo durante el mismo periodo de tiempo que las muestras tratadas con láser.

35 Ejemplo 2. Utilización de rosa de bengala (RB) en PTB

En la córnea, puede utilizarse RB en PTB a una concentración de aproximadamente 0,5 mM a 5 mM, preferentemente de aproximadamente 1 mM a 3 mM. Las longitudes de onda de irradiación para RB es preferentemente de aproximadamente 450-600 nm, más preferentemente de aproximadamente 500 a 560 nm. La dosis de irradiación puede ser de desde aproximadamente 0,5 hasta 2 kJ/cm^2 . La irradiancia suministrada puede ser de desde aproximadamente 0,2 hasta 3 W/cm^2 . La duración de la irradiación es preferentemente de desde aproximadamente 1 hasta 10 minutos.

40 El tratamiento de incisiones con RB 1,5 mM y luz láser a 514 nm dieron como resultado un incremento de la PIO_i tras el tratamiento, según se midió tal como se describió en el ejemplo 1. Los experimentos de control demostraron que se produjo un incremento significativo ($p < 0,005$) de la PIO_i tras el tratamiento de PTB, cuando se aplicaron tanto RB como irradiación láser y no mediante cualquiera de los dos solos (figura 2). La PIO_i media de incisiones tratadas con RB y luz láser a 514 nm fue mayor que $300 \pm 48 \text{ mm Hg}$, mientras que la irradiación láser sola o el fotosensibilizador solo no produjeron un incremento significativo entre los valores de PIO_i antes y después del tratamiento.

45 En la figura 3 se representan las curvas de respuesta a la dosis para PIO_i para dosis de RB suministradas a irradiancias de 1,27 (3A), 2,55 (3B) y $3,82 \text{ W/cm}^2$ (3C). Se observó una relación dosis-respuesta a la irradiancia más baja ($1,27 \text{ W/cm}^2$) para dosis de entre 508 y 1.270 J/cm^2 (3A). No se observó ningún aumento significativo de la PIO_i para dosis por debajo de 508 J/cm^2 a ninguna irradiancia sometida a prueba. PTB fue lo más eficaz a 1.270 J/cm^2 suministrados a una irradiancia de $1,27 \text{ W/cm}^2$. Todas las dosis suministradas a las dos irradiancias más bajas ($1,27$ y $2,55 \text{ W/cm}^2$) dieron valores de PIO_i mayores que 100 mm Hg. El tratamiento utilizando irradiancias de 2,55 y $3,82 \text{ W/cm}^2$ no produjeron un patrón de respuesta a la dosis obvio. En general, para una dosis seleccionada la PIO_i fue menor a irradiancias superiores. Por ejemplo, a 1.270 J/cm^2 los valores de PIO_i medios fueron de 274, 150 y 130 mm Hg para las irradiancias de $1,27 \text{ W/cm}^2$, $2,55 \text{ W/cm}^2$ y $3,86 \text{ W/cm}^2$.

50 Tras el tratamiento, se examinaron los ojos para detectar la presencia de daño térmico. La contracción y deformación del tejido alrededor del sitio de la herida se consideraron signos de daño térmico. No se observó daño térmico a la córnea a la menor irradiancia sometida a prueba ($1,27 \text{ W/cm}^2$). Pudo observarse daño térmico a dosis de 762 a 1.524 J/cm^2 a la mayor irradiancia ($3,82 \text{ W/cm}^2$) y ocasionalmente a $2,55 \text{ W/cm}^2$. Los efectos térmicos producidos utilizando altas irradiancias pueden producir contracción del colágeno dando como resultado la distorsión de la visión del paciente.

Ejemplo 3. Utilización de riboflavina-5-fosfato (R-5-P) en PTB

En la córnea, puede aplicarse R-5-P para PTB a una concentración de aproximadamente 1 mM a 30 mM, preferentemente de aproximadamente 10 mM a 20 mM. La longitud de onda de irradiación para R-5-P es preferentemente de aproximadamente 400-600 nm, más preferentemente de aproximadamente 450 a 550 nm. La dosis de irradiación puede ser de desde aproximadamente 0,5 hasta 2 kJ/cm². La irradiancia suministrada puede ser de desde aproximadamente 0,2 hasta 3 W/cm². La duración de la irradiación es preferentemente de desde aproximadamente 1 hasta 10 minutos.

Se evaluó el efecto de PTB con R-5-P tal como se describió en el ejemplo 1. La aplicación de R-5-P 11 mM e irradiación utilizando luz a 488 nm, a las mismas irradiancias utilizadas para RB, y dosis de 762 J/cm² y 1016 J/cm², incrementó significativamente el valor de PIO_f tras el tratamiento de PTB (p<0,05), véase la figura 4. Los valores de PIO_f observados utilizando R-5-P son de una magnitud similar a los de RB. Sin embargo, los valores de PIO_f observados para cada colorante a la misma irradiancia y dosis no fueron comparables. Aunque el tratamiento produce incrementos significativos de PIO_f, no se observó un patrón simple entre los dos colorantes.

Ejemplo 4. Utilización de N-hidroxipiridina-2-(1H)-tiona (N-HTP) en PTB

En la córnea, puede aplicarse N-HTP a una concentración de aproximadamente 0,5 mM a 10 mM, preferentemente de aproximadamente 3 mM a 6 mM. La longitud de onda de irradiación para N-HTP es preferentemente de aproximadamente 330-400 nm. La dosis de irradiación puede ser de desde aproximadamente 0,5 hasta 2 kJ/cm². La irradiancia suministrada puede ser de desde aproximadamente 0,2 hasta 3 W/cm². La duración de la irradiación es preferentemente de desde aproximadamente 1 hasta 10 minutos. Se aplicó una disolución 4,5 mM de NHPT a las paredes de la incisión, tal como se describe en el ejemplo 1, y se irradió utilizando luz a 351 nm (0,64 W/cm²) a dosis comprendidas entre 127 J/cm² y 508 J/cm². Se produjeron unos valores de PIO_f medios de 60 ± 23 mm Hg y 126 ± 40 mm Hg cuando se utilizaron las dosis de 254 J/cm² y 508 J/cm² respectivamente, dosis menores que la utilizada para otros fotosensibilizadores.

Ejemplo 5. Utilización de azul de metileno (MB) en PTB

El MB es un colorante utilizado frecuentemente en cirugía oftálmica que se ha notificado que fotosensibiliza reticulaciones de colágeno en el tendón de cola de rata (Ramshaw *et al.* (1994) *Biochim Biophys Acta* 1206: 225-230). Los estudios previos mostraron que MB y luz a 355 nm no produjeron una reticulación eficaz de colágeno soluble. Por tanto se utilizó MB como un control en estos estudios *ex vivo*. Se aplicó MB (3 mM) a las paredes de la incisión, tal como se describió en el ejemplo 1, y se irradió con 0,64 W/cm² de luz a 661 nm. Dosis de 508 J/cm², 762 J/cm² y 1016 J/cm² no incrementaron la PIO_f tras el tratamiento. Sin embargo, se observó que MB no manchó el tejido corneal eficazmente, lo que tal vez explica su baja eficacia para PTB.

Ejemplo 6: Evaluación de la contribución térmica a PTB

Se ha estudiado la soldadura tisular activada con láser en una variedad de tejidos (Abergel *et al.* (1986) *J Am Acad Dermatol*, 14: 810-814; Cilesiz *et al.*, mencionado anteriormente; Massicotte *et al.* (1998) *Lasers in Surgery and Medicine* 23: 18-24; Oz *et al.* (1990) *J Vasc Surg*. 11: 718-725; Poppas *et al.* (1996) *Lasers in Surgery and Medicine* 18: 335-344; Poppas *et al.* (1996) *Lasers in Surgery and Medicine* 19: 360-368; Stewart *et al.* (1996) *Lasers in Surgery and Medicine* 19: 9-16; Wider *et al.* (1991) *Plastic Reconstr Surg* 88: 1018-1025). En la soldadura tisular, se utilizó la radiación láser para calentar el tejido hasta temperaturas a las que el colágeno se desnaturaliza y, tras enfriarse, las moléculas del colágeno se entrelazan para formar una soldadura. Adicionalmente, se ha investigado la soldadura térmica potenciada por colorante (Bass & Treat (1995) *Lasers Surg and Med* 17: 315-349; Chuck *et al.* (1989) *Lasers Surg and Med* 9: 471-477). En este procedimiento el colorante absorbe selectivamente la energía láser y luego libera calor a la zona deseada, reduciendo el daño al tejido periférico. Sin embargo, estos procedimientos no son apropiados para la córnea debido a la posible reducción de la agudeza visual que resulta de la deformación corneal producida por el daño térmico al tejido. Cuando se realiza PTB en la córnea, debe evitarse el calentamiento.

Se evaluó la posibilidad de que procesos no fotoquímicos contribuyan al cierre de heridas comparando PTB producida por RB que con la producida por fluoresceína (FI), un colorante con una estructura similar pero que no se espera que induzca reticulaciones de proteína, RB y FI son ambos colorantes de xanteno. Sin embargo, RB está halogenado (4 yodos y 4 cloros) y la presencia de esos átomos pesados provoca que RB sea fotoquímicamente activo (Lessing *et al.* (1982) *J Mol Struct* 84: 281-292). La FI presenta un alto rendimiento cuántico de fluorescencia y un rendimiento cuántico de formación de estado de triplete menor que RB (fleming *et al.* (1977) *JACS* 99: 4306-4311) y, por tanto, producirá una menor proporción de especies activas con la posibilidad de producir reticulaciones de colágeno. Se aplicó una disolución de FI 0,6 mM y se irradió utilizando luz láser a 488 nm al mismo intervalo de irradiancias utilizadas para RB y a dosis de desde 508 J/cm² hasta 1016 J/cm² (figura 5). No se observó ningún incremento de PIO_f para las incisiones tratadas con las dos dosis más bajas utilizando las dos irradiancias más bajas estudiadas. Sin embargo, a la dosis más alta para todas las irradiancias se observó un incremento de los valores de PIO_f con valores comprendidos entre 63 ± 30 y 89 ± 42 mm Hg, aunque esto es mucho menos eficaz que RB (compárense las figuras 3 y 5). Estos resultados sugieren de hecho se produce PTB mediante procesos fotoquímicos. El valor de PIO_f de 116 ± 40 mm Hg obtenido utilizando una dosis de 762 J/cm² a 3,82 W/cm² (tiempo de exposición láser de 3 minutos y 10 segundos) es considerablemente más alto que cualquier otro observado utilizando FI. El sellado observado a la irradiancia más alta (3,82 W/cm²) y dosis (762 J/cm²) sugiere que algún otro efecto está funcionando, tal como un mecanismo térmico en estas condiciones de irradiancia alta.

Ejemplo 7: PTB frente a suturas

5 Se comparó la PIO_f tras el tratamiento de PTB, tal como se describió en el ejemplo 1, con la obtenida utilizando suturas. Se utilizaron dos suturas radiales interrumpidas de nailon monofilamento 10-0 negro (Ethilon Inc.) para cerrar la incisión de queratomo. Las suturas se colocaron en forma radial a una profundidad córnea de aproximadamente el 90%. Los valores de PIO_f con suturas fueron de aproximadamente 230 mm Hg. Este valor es similar para las incisiones cerradas con tratamiento de PTB.

Ejemplo 8: PTB *in vivo*

Se realizó PTB *in vivo* en conejos de Nueva Zelanda para reparar dos tipos de heridas córneas.

10 En el grupo 1, se realizaron incisiones de 3,5 mm en 20 córneas de conejos (blanco de Nueva Zelanda). Se variaron las dosis e irradiancias de láser en subgrupos de cinco o más ojos para cada condición y ojos control apropiados. Se realizó la fotoactivación con un láser de argón de 514 nm. Se determinó *in vivo* la presión de fuga y ruptura incisional de la herida de los ojos de conejos tratados y no tratados, con los animales con anestesia.

15 Se cicatrizaron las heridas del grupo I utilizando, por ejemplo, 191 J/cm^2 , aplicando RB 1-5 mM. La presión de ruptura *in vivo* inmediata fue de $495 \pm 10 \text{ mm Hg}$ para ojos tratados con PTB. En las mismas condiciones los valores de la presión de ruptura en el ojo de control variaron desde 15 hasta 60 mm Hg. Un día tras la cirugía, la presión de ruptura fue la misma para ojos tratados con PTB y ojos de control (aproximadamente $450 \pm 125 \text{ mmHg}$). A los 14 días, la presión de ruptura superó 500 mm Hg en ojos tanto tratados con PTB como control.

20 En el grupo 11, se realizaron incisiones de 6 mm de queratoplastia penetrante (PK) sujetadas por 4-16 suturas en 16 córneas de conejo. Se sometió la mitad de las córneas en cada grupo a PTB en la que se aplicó colorante de rosa de bengala al 1% a los bordes de la herida seguido por irradiación láser a una fluencia de 19 J/cm^2 . Se realizó la fotoactivación con un láser de argón de 514 nm y un láser CW de Nd:YAG de 532 nm. Se determinó *in vivo* la presión de fuga y ruptura incisional de la herida en el periodo posoperatorio inmediato. Los ojos tratados con PTB mostraron una presión de ruptura inmediata de $410 \pm 70 \text{ mm Hg}$ para los ojos tratados con PTB, en comparación con $250 \pm 150 \text{ mm Hg}$ para los ojos de control con suturas solas. Este resultado indica que PTB es útil y eficaz como un complemento para suturas, así como por sí solo.

25 Los resultados descritos en la presente memoria muestran que PTB es eficaz para sellar, cerrar o cicatrizar un tejido, por ejemplo, una incisión córnea, *in vivo*, en un sujeto por ejemplo un animal, o un ser humano. La presencia de una proteína, por ejemplo, un sellante a base de proteína, por ejemplo, fibrinógeno, no es necesariamente para obtener un buen sello tisular. Puede utilizarse PTB en lugar de, o además de, otras técnicas de cicatrización de heridas, por ejemplo, suturas.

30

REIVINDICACIONES

1. Utilización de un agente fotosensibilizador en la preparación de un medicamento para unir un primer tejido y un segundo tejido, en la que una mezcla de tejido-fotosensibilizador se irradia con luz de longitud de onda fotoactivante y a una irradiancia inferior a $2,55 \text{ W/cm}^2$, en ausencia de un sustrato reticulable exógeno, para producir la reticulación de una proteína en el tejido y para formar un sellado tisular entre el primer tejido y el segundo tejido.
2. Utilización según la reivindicación 1, en la que el compuesto es un componente de una composición.
3. Utilización según la reivindicación 1 ó 2, en la preparación de un medicamento para injertar un primer tejido y un segundo tejido.
4. Utilización según la reivindicación 1, 2 ó 3, en la que el primer tejido y/o el segundo tejido es la piel.
5. Utilización según la reivindicación 1, 2 ó 3, en la que el primer tejido y/o el segundo tejido es el tendón de músculo.
6. Utilización según la reivindicación 1, 2 ó 3, en la que el primer tejido y/o el segundo tejido es el tejido córnea.
7. Utilización según la reivindicación 1, 2 ó 3, en la que el primer tejido y/o el segundo tejido es el tejido vascular.
8. Utilización según la reivindicación 1, 2 ó 3, en la que el primer tejido y/o el segundo tejido es el cartílago articular.
9. Utilización según la reivindicación 1, 2 ó 3, en la que el primer tejido y/o el segundo tejido es el tubo gastrointestinal.
10. Utilización según la reivindicación 1, 2 ó 3, en la que el primer tejido y/o el segundo tejido es la vaina del nervio.
11. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que dicho por lo menos un agente fotosensibilizador se selecciona de entre el grupo constituido por xantenos, flavinas, tiazinas, porfirinas y porfirinas expandidas y clorofilas.
12. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dicho por lo menos un agente fotosensibilizador se selecciona de entre el grupo constituido por rosa de bengala, riboflavina-5-fosfato, y N-hidroxipiridina-2-(1H)-tionea.
13. Utilización según la reivindicación 12, en la que dicho por lo menos un agente fotosensibilizador es el rosa de bengala.
14. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que el sujeto es un ser humano.
15. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que el compuesto es activable por energía electromagnética a un nivel superior a 200 J/cm^2 .
16. Utilización según la reivindicación 1 ó 2, en la que el primer tejido y/o el segundo tejido es piel y dicho por lo menos un agente fotosensibilizador es el rosa de bengala.
17. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en la que la luz de irradiación presenta una longitud de onda de por lo menos 488 nm.
18. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en la que la irradiancia es de desde 0,2 hasta $2,55 \text{ W/cm}^2$.

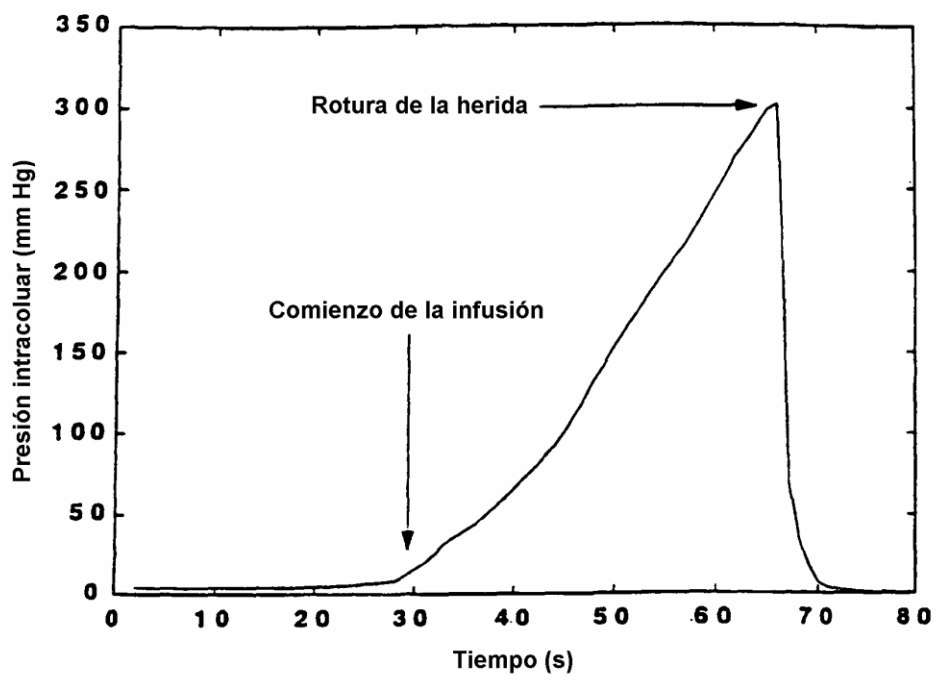


Figura 1

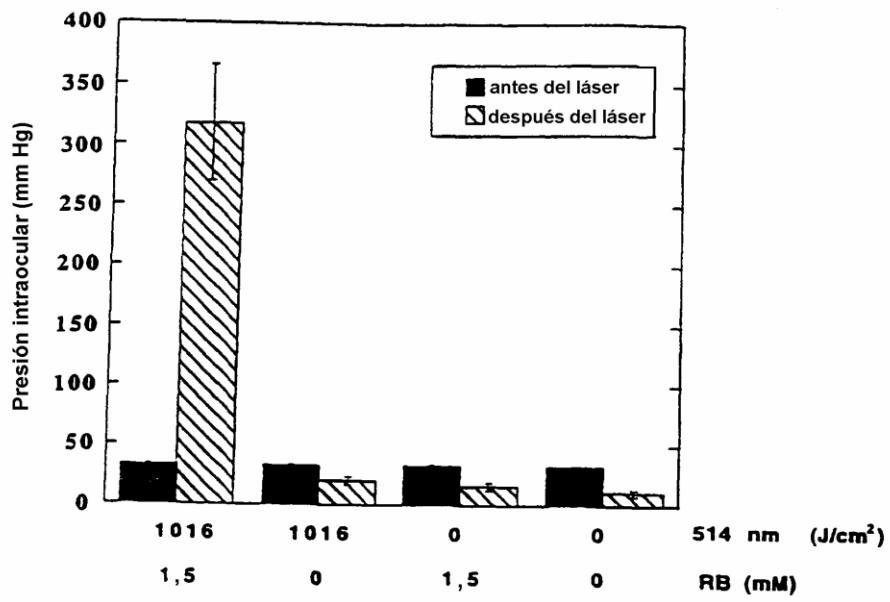


Figura 2

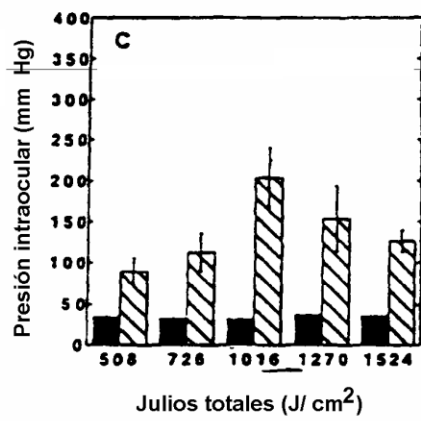
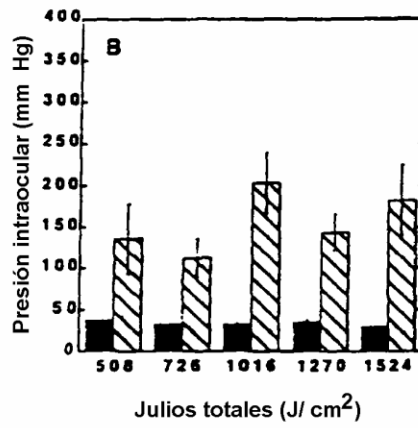
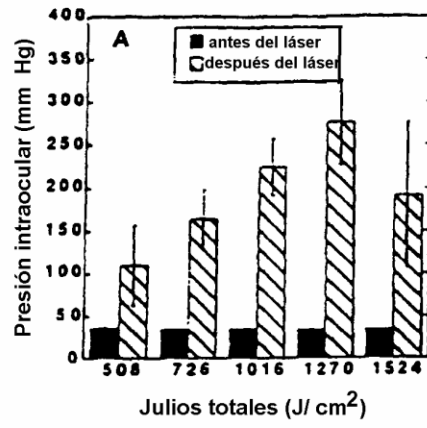


Figura 3

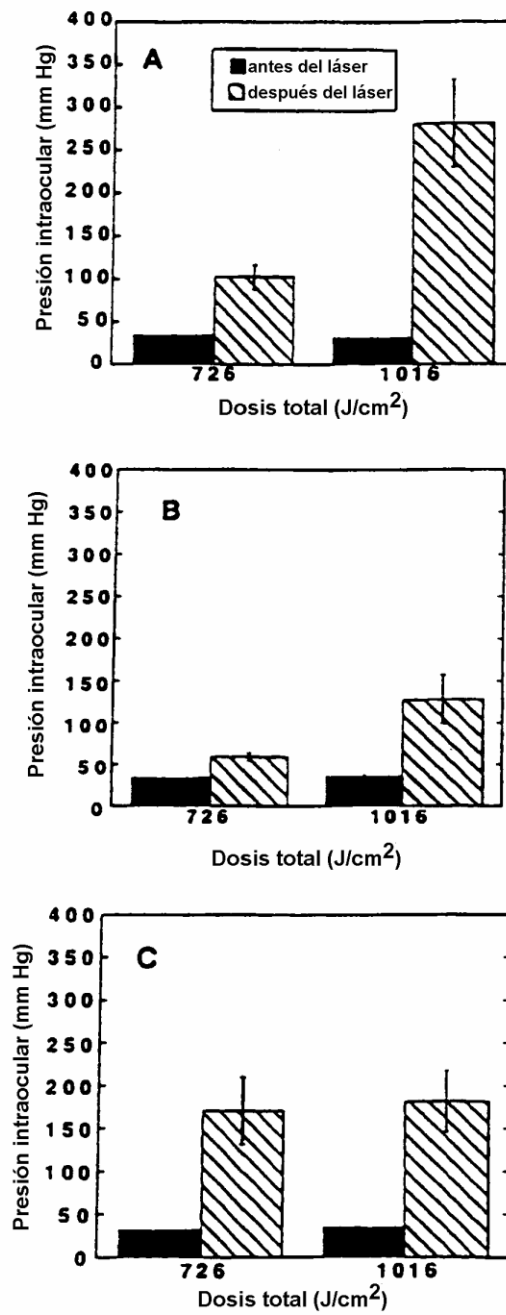


Figura 4

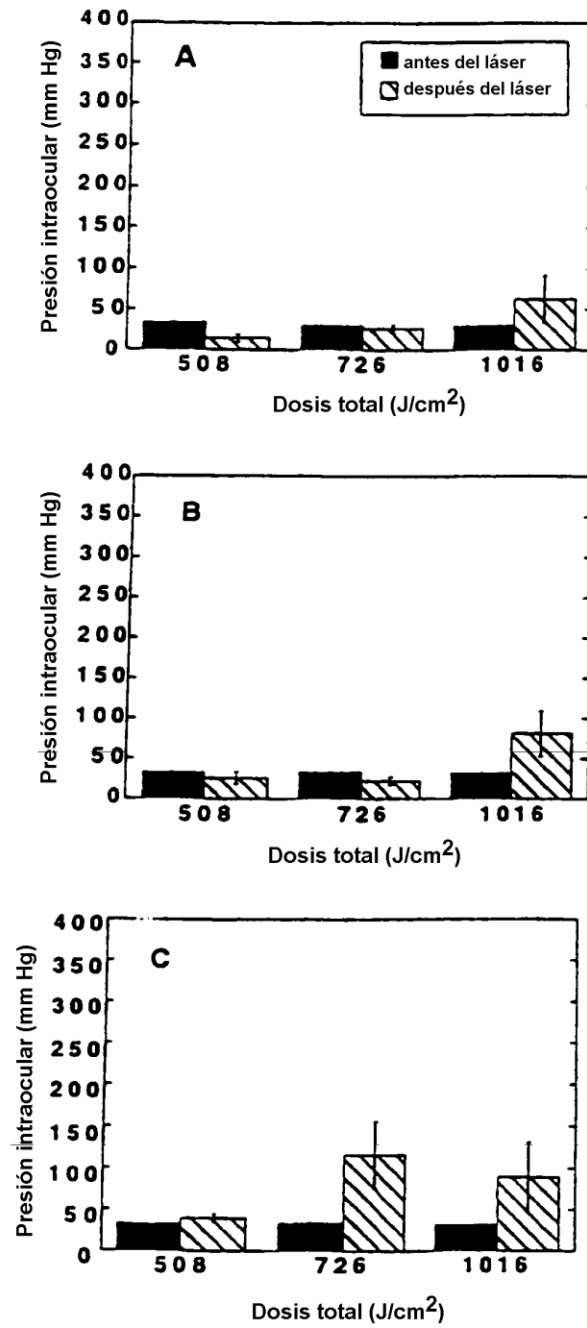


Figura 5