

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 894**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/045** (2006.01)  
**A61K 31/655** (2006.01)  
**A61K 33/14** (2006.01)  
**A61K 33/42** (2006.01)  
**A61K 49/00** (2006.01)  
**A61P 27/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.09.2012 PCT/FR2012/052101**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013 WO13041810**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2012 E 12775746 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2758042**

54 Título: **Composición esterilizable estable, de baja toxicidad para tinturación oftálmica**

30 Prioridad:

**22.09.2011 FR 1102880**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.02.2017**

73 Titular/es:

**ARCADOPHTA (100.0%)  
11 rue Antoine Ricord  
31100 Toulouse, FR**

72 Inventor/es:

**REBOUL, GÉRARD**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 601 894 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).

**Composición esterilizable estable, de baja toxicidad para tinturación oftálmica****Descripción**

5 **[0001]** La invención se refiere a una composición de tinte que comprende al menos un colorante en una solución acuosa.

10 **[0002]** A lo largo del texto, el término "colorante" significa cualquier sustancia que tiene la propiedad de comunicar tinción sostenible al menos un material con el que se puso en contacto.

15 **[0003]** Los colorantes utilizados en solución acuosa (estén o no totalmente solubles en agua) son compuestos orgánicos, incluidos los compuestos organometálicos, que comprende al menos un grupo cromóforo (por ejemplo azo, trifenilmetano, tiazida, fenilamina...) y son, por tanto, tóxicos para el tejido y los seres vivos celulares a partir de un cierto nivel de concentración y/o tiempo de exposición. Sin embargo, muchos colorantes se utilizan en contacto con los tejidos oftálmicos, particularmente de células como agente colorante selectivo para el diagnóstico, para la terapia para el tratamiento curativo o preventivo, en el campo de la experimentación clínica o farmacológica. En estas aplicaciones, es necesario en primer lugar minimizar la toxicidad de la composición susceptible de contacto con el tejido celular oftálmico, para asegurar por otra parte la esterilización de la composición y su estabilidad en el tiempo. Por ejemplo se ha demostrado que el verde de indocianina es tóxico para las células de la retina; o azul de tripán o azul de anilina son tóxicos con respecto a células endoteliales o epiteliales.

20 **[0004]** Para superar este problema, y para densificar una composición que comprende azul brillante G, se ha propuesto añadir glucosa a una concentración de 5%. Sin embargo, resulta que dicha composición de glucosa no es estable a temperaturas de esterilización en una autoclave, y no puede ser esterilizada. Además, el inventor ha determinado que con una concentración tan baja de glucosa, la composición no es estable durante un largo periodo a temperatura ambiente, resultando en la degradación del colorante.

25 **[0005]** Además, la publicación "Comparative toxicology of trypan blue, brilliant blue G, and their combination together with polyethyleneglycol on human pigment epithelial cells" Investigative Ophthalmology & Visual Science, Junio 2011, Vol. 52, nº 7 enseña la posibilidad de reducir la toxicidad de una composición de azul de tripano mediante la adición de PEG. Sin embargo, este polímero se sintetiza a partir de óxido de etileno altamente tóxico, en particular para las estructuras internas del ojo. La obtención de una composición de PEG puro y completamente libre de óxido de etileno en la práctica es casi imposible, y en cualquier caso extremadamente caro. Además, este polímero es un agente tensioactivo capaz de promover la difusión de la solución de color debajo de la retina, con el riesgo de aumentar su toxicidad clínica.

30 **[0006]** La invención por lo tanto tiene como objetivo superar todos estos inconvenientes proponiendo una composición oftálmica coloración- particular y, en particular, intraocular- que comprende al menos un colorante que tiene una toxicidad reducida vis-à-vis las células de la ojo, que pueden ser esterilizadas, que es estable- incluyendo el estado estérilisé- durante un largo periodo (por ejemplo, varios meses) a temperatura ambiente, listo para usar y barato.

35 **[0007]** La invención pretende más particularmente proporcionar una composición de este tipo en el que el poder de coloración de cada colorante se conserva y no se modifica.

40 **[0008]** La invención también tiene como objetivo proporcionar una composición tal que se puede utilizar in vivo, en particular, teniendo un pH fisiológico y la osmolaridad. Más particularmente, la invención tiene como objetivo proporcionar una composición compatible con su uso en un entorno quirúrgico, en particular durante las operaciones de cirugía oftálmica y/o para el diagnóstico.

45 **[0009]** A lo largo del texto, el término "entorno oftálmico" designa cualquier componente de un ojo humano o animal. Por lo tanto, este término se aplica a los tejidos celulares, membranas y fluido oftálmico (humor acuoso, vítreo, lágrimas). El término "poliol" se refiere a un compuesto de fórmula  $H(HCOH)_nH$ , es decir, un compuesto de hidrocarburo que comprende un grupo hidroxilo unido a cada átomo de carbono. Cabe señalar que los sacáridos, que son hidratos de carbono no son polioles bajo esta definición.

50 **[0010]** La invención se refiere por tanto a una composición de coloración oftálmica - especialmente intraocular - estable adaptada a esterilizarse en la autoclave en una solución acuosa que comprende:

55 - Al menos un colorante,  
- Al menos un poliol soluble en agua de la fórmula  $H(HCOH)_nH$ , siendo n un número entero mayor que 3 (mayor o igual a 4).

60 **[0011]** La invención también se refiere a una composición colorante estable capaz de esterilizarse en autoclave que comprende en una solución acuosa:

- Al menos un colorante,

al menos un poliol soluble en agua de la fórmula  $H(HCOH)_nH$ , siendo n un número entero mayor que 3 (mayor o igual a 4), para uso en un procedimiento seleccionado de:

- Un método de cirugía oftálmica practicada en el cuerpo humano o animal en el que dicha composición se aplica en contacto con un entorno oftálmico a fin de realizar en condiciones fisiológicamente aceptables una coloración selectiva durante la producción de al menos una cirugía oftálmica,
- Un método de diagnóstico practicado en el cuerpo humano o animal (in vivo).

**[0012]** Sorprendentemente, e incluso monosacáridos tales como glucosa no proporcionan una composición que tiene las calificaciones requeridas, el inventor ha encontrado que la simple adición de la composición de un poliol soluble en el agua (con una estructura similar, pero diferente de la de monosacáridos, y diferente estructura PEG) reduce significativamente la citotoxicidad sin perjudicar de ninguna manera ni su estabilidad ni las propiedades de cada colorante, siempre que sea compatible con un tratamiento en autoclave y con la adición de adyuvantes adecuados para el uso de la composición en contacto con la comunidad oftálmica. Este resultado es incluso más sorprendente si los polioles están sujetos ellos mismos a algunas aplicaciones en contacto con los tejidos fisiológicos, no son inofensivos por sí mismos para las células de una cierta concentración. Por ejemplo, el manitol se conoce por otra parte por tener efectos de la contracción de las células endoteliales al menos a ciertas concentraciones. Ninguna explicación se puede dar para este resultado inesperado.

**[0013]** La invención se puede aplicar para cualquier colorante, pudiéndose utilizar en una solución acuosa y compatible con su uso en conjunción con al menos un poliol. Sin embargo, preferiblemente una composición de acuerdo con la invención comprende al menos un colorante seleccionado del grupo de azul de tripano, azul brillante G, azul Evans, azul patentado V, azul de metileno, azul de bromofenol y azul anilina. Estos colorantes son de hecho particularmente estable en solución acuosa, una autoclave de apoyo, y se pueden utilizar en muchas aplicaciones, entre ellas por vía tópica en entornos oftálmicos- en particular, intraoculares- con fines de diagnóstico o durante una operación quirúrgica, en particular en la cirugía oftálmica. La combinación con un poliol de acuerdo con la invención también reduce considerablemente su toxicidad.

**[0014]** La proporción de cada colorante en una composición de la invención puede variar dependiendo de la aplicación y del efecto deseado, en particular la intensidad del color, en el límite de la toxicidad admisible en la solicitud, teniendo en cuenta la adición de al menos un poliol de la invención. Ventajosamente, una composición según la invención comprende una cantidad de cada colorante aceptable para una aplicación en contacto con un entorno oftálmico - en particular durante una operación quirúrgica oftálmica como una composición de tinción selectiva intraocular - entornos oftálmicos. Ventajosamente, una composición según la invención comprende una cantidad de cada colorante en peso en volumen de entre 0,001% y 2,5%.

**[0015]** De manera similar, la proporción de cada poliol en una composición de la invención puede variar, y puede en particular optimizarse de acuerdo con cada colorante, cada poliol bajo consideración y de la aplicación prevista de la composición. Los polioles son ellos mismos fisiológicamente aceptables en la aplicación tópica sobre el tejido celular en una amplia gama de concentraciones. Ventajosamente, una composición según la invención comprende una proporción de poliol aceptable para una aplicación en contacto con un medio oftálmico- en particular durante una operación quirúrgica oftálmica como una composición de tinción selectiva intraocular- entornos oftálmicas. Ventajosamente, una composición según la invención comprende una proporción de poliol en peso en volumen de entre 0,1% y 5%.

**[0016]** Además, los mejores resultados se han obtenido con polioles para los que n es menor que o igual a 9. Preferiblemente, cada poliol se selecciona del grupo que consiste en eritritol (n=4), xilitol (n=5), arabitol (n=5), ribitol (n=5), sorbitol (n=6), dulcitol (n=6), manitol (n=6) volemitol (n=7), maltitol (n=9), isomaltipol (n=9) y lactitol (n=9). En particular, ventajosamente y según la invención, al menos un poliol se selecciona del grupo de hexoles (n=6).

**[0017]** Aún más preferiblemente, una composición de la invención comprende manitol como poliol.

**[0018]** Además, de manera ventajosa, una composición de acuerdo con la invención también se caracteriza porque comprende una cantidad adicional de cloruro de sodio adaptado de manera que la composición tiene una osmolaridad de 260 mOsmol/KgH<sub>2</sub>O y 360 mOsmol/KgH<sub>2</sub>O. Ventajosamente y según la invención se elige la proporción de cloruro de sodio para ajustar la osmolaridad de la composición a un valor entre 280 mOsmol/KgH<sub>2</sub>O y 350 mOsmol/KgH<sub>2</sub>O, en particular del orden de 310 mosm/KgH<sub>2</sub>O. Ventajosamente y según la invención, se elige la proporción en peso de volumen de cloruro de sodio entre 0,4% y 0,9%.

**[0019]** Además, preferiblemente, una composición de la invención también se caracteriza porque comprende además un tampón adaptado para mantener un pH entre 7 y 7,5. Ventajosamente y según la invención, dicho tampón es H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/HPO<sub>4</sub>.

**[0020]** Ventajosamente, una composición según la invención comprende también agua en una cantidad qsp.

**[0021]** Ventajosamente, una composición según la invención también se caracteriza porque comprende además entre 1% y 20% (volumen/volumen) en particular del orden de 5% - de agua pesada (D<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

5 **[0022]** Así, en una formulación preferida, una composición de la invención comprende de 0,001% a 2,5% (peso/volumen) de al menos un colorante, preferiblemente un colorante o dos colorantes -, 0,1% a 5% (peso/volumen) al menos un poliol soluble en agua - preferiblemente un hexol, como manitol-, una proporción de cloruro de sodio para ajustar la osmolalidad de la composición a un valor entre 280 mOsmol/KgH<sub>2</sub>O y 350 mOsmol/KgH<sub>2</sub>O, un tampón adaptado para mantener el pH de la composición entre 7 y 7,5, agua pesada en una  
10 proporción de 1% a 20% (volumen/volumen) y agua en una cantidad qsp.

**[0023]** Una composición de acuerdo con la invención se puede esterilizar en autoclave. En consecuencia, una composición de acuerdo con la invención se caracteriza ventajosamente porque es estéril.

15 **[0024]** Una composición de la invención es estable en el tiempo a temperatura ambiente (particularmente resistente al calor ambiente), manteniéndose estable la cantidad de colorante que contiene y sus propiedades colorantes durante varios meses.

20 **[0025]** Una composición de coloración de acuerdo con la invención puede, en particular, estar libre de PEG, sacárido - particularmente la glucosa, anticoagulantes - incluyendo la heparina, agente anestésico- en particular, un agente anestésico tópico -.

25 **[0026]** Una composición colorante según la invención se puede utilizar, en particular, en contacto con medios oftálmicos humanos o animales, en particular intraoculares-. Una composición de acuerdo con la invención por lo tanto se puede utilizar en contacto con las células epiteliales (o endoteliales), membranas oftálmicas, fluidos oftálmicos, u otros tejidos del ojo humano o animal in vivo.

30 **[0027]** Más particularmente, una composición colorante según la invención se puede usar en contacto con los medios oftálmicos humanos o animales en un método de tratamiento de una patología susceptible de causar visión borrosa (pérdida de visión (total o parcial), distorsiones, velas...) en los seres humanos o animales. Una composición colorante según la invención puede en particular ser utilizada en contacto con medios intraoculares oftálmicos humanos o de animales en un método seleccionado de un método de cirugía oftálmica en particular seleccionado a partir de un tratamiento quirúrgico para la operación de cataratas, una operación de procesamiento de cirugía de glaucoma, y una operación quirúrgica de la retina - y un método de diagnóstico oftálmico.  
35

**[0028]** La invención se extiende en particular a una composición colorante oftálmica como se ha mencionado anteriormente para uso en un método seleccionado a partir de: un método de cirugía oftálmica en el que se aplica la composición en contacto con un medio oftálmico; y un método de diagnóstico en el que la composición oftálmica se aplica en contacto con un entorno oftálmico humano o animal (in vivo).  
40

**[0029]** Una composición de la invención se puede usar para el diagnóstico para distinguir e identificar mediante tinción diferencial, porciones específicas de células -especialmente células muertas o tejidos celulares oftálmicos patogénicos o deteriorados- de tejidos celulares sanos. De acuerdo con ello, la invención se extiende a una composición como se ha mencionado anteriormente para uso en un método de diagnóstico practicado en el cuerpo humano o animal (in vivo), y en particular para su uso en un método de tinción de diagnóstico diferencial de porciones específicas de tejidos celulares oftálmicos intraoculares -especialmente tejidos patológicos tales como membranas epirretinianas para permitir distinguir los tejidos de células vivas tales como retina-. Dicha composición según la invención comprende entonces ventajosamente al menos un colorante vital, como el azul de tripano. Por lo tanto, la invención se extiende en particular a una composición como se ha mencionado anteriormente para uso en un método de diagnóstico practicado en el cuerpo humano o animal (in vivo) en el que la composición se aplica en contacto con la retina para distinguir membranas patológicas de la retina. Tal método de diagnóstico se produce particularmente durante la realización de un tratamiento de cirugía oftálmica de membranas patológicas de la retina.  
45  
50

**[0030]** La invención se extiende así a la utilización de una composición según la invención como se ha mencionado anteriormente en un método de diagnóstico practicado en el cuerpo humano o animal (in vivo). La invención también se extiende a un método de diagnóstico oftálmico (patología susceptible de causar visión borrosa (pérdida (total o parcial) de la visión, la distorsión, velas ...)) aplicado al cuerpo humano o animal (in vivo) en el que una composición de acuerdo con la invención se aplica en contacto con un tejido oftálmico, especialmente intraocular- para identificar por coloración selectiva porciones específicas del tejido oftálmico, incluyendo las células muertas cuando la composición de acuerdo la invención comprende al menos un colorante vital tal como azul de tripano o azul de Evans, o cualquier parte de este tejido oftálmico patológico.  
55  
60

**[0031]** Una composición de acuerdo con la invención puede también ser usada ventajosamente en un método de tratamiento quirúrgico oftálmico para permitir la visualización por tinción selectiva de ciertos fluidos fisiológicos oftálmicos o tejidos oftálmicos (tejidos compuestos por células epiteliales y/o endoteliales o por las membranas basales).  
65

5 **[0032]** La invención se extiende, por tanto, a la utilización de una composición de acuerdo con la invención como se mencionó anteriormente en un método de tratamiento quirúrgico oftálmico de una patología susceptible de causar visión borrosa (pérdida (total o parcial) de la visión, distorsiones, vela...), aplicada al cuerpo humano o animal, método en el que dicha composición se aplica en contacto con un medio oftálmico -especialmente intraocular-, a fin de lograr una coloración selectiva en condiciones fisiológicamente aceptables para la visualización a lo largo de la realización de una operación quirúrgica oftálmica. Por lo tanto, se extiende, en particular, a una composición como se ha mencionado anteriormente para uso en un método de tratamiento quirúrgico oftálmico de una patología susceptible de causar visión borrosa (pérdida (total o parcial) de la visión, deformaciones velas...) aplicada al cuerpo humano o animal, un método en el que dicha composición se aplica en contacto con un medio oftálmico -especialmente intraocular - de manera que se realiza una coloración selectiva en condiciones fisiológicamente aceptables durante la producción de al menos una cirugía oftálmica. La invención también se extiende a un método de tratamiento de cirugía oftálmica de una patología susceptible de causar visión borrosa (pérdida (total o parcial) de la visión, distorsión, velas...) aplicada al cuerpo humano o animal, método en el que se aplica una composición de acuerdo con la invención como se ha mencionado más arriba en contacto con un entorno oftálmico a fin de lograr una coloración selectiva en condiciones fisiológicamente aceptables para visualizar una operación de cirugía oftálmica durante su realización.

20 **[0033]** La invención también se extiende al uso de una composición según la invención como se mencionó anteriormente en un método de cirugía oftálmica practicado en el cuerpo humano o animal en el que la composición se aplica en contacto con la superficie exterior de la cápsula anterior del ojo a fin de producir una coloración selectiva de la cápsula anterior en condiciones fisiológicamente aceptables en relación al tejido lenticular subyacente, facilitando el logro de apertura controlada de la cápsula anterior durante una cirugía de extracción de cataratas. Por lo tanto, se extiende, en particular, a una composición como se ha mencionado anteriormente para su uso en un método de cirugía oftálmica practicado en el cuerpo humano o animal en el que la composición se aplica en contacto con la superficie exterior de la cápsula anterior del ojo a fin de producir una coloración selectiva de la cápsula anterior en condiciones fisiológicamente aceptables en relación al tejido lenticular subyacente, facilitando el logro de apertura controlada de la cápsula anterior durante la cirugía de extracción de cataratas.

35 **[0034]** La invención también se extiende al uso de una composición según la invención como se mencionó anteriormente en un método de cirugía oftálmica practicado en el cuerpo humano o animal en el que la composición se aplica al contacto de la retina para distinguir las membranas patológicas de la retina durante la realización de un tratamiento de cirugía oftálmica de membranas patológicas de la retina. Por lo tanto, se extiende, en particular, a una composición como se ha mencionado anteriormente para su uso en un método de cirugía oftálmica practicado en el cuerpo humano o animal en el que la composición se aplica en contacto con la retina para distinguir membranas patológicas de retina durante la realización de un tratamiento de cirugía oftálmica de membranas patológicas de la retina. La invención también se extiende a un método de cirugía oftálmica practicado en el cuerpo humano o animal en el que la composición se aplica en contacto con la retina para distinguir membranas patológicas de la retina durante la realización de un tratamiento de cirugía oftálmica de membranas patológicas de la retina.

45 **[0035]** La invención también se extiende al uso de una composición según la invención como se mencionó anteriormente en un método de cirugía oftálmica practicado en el cuerpo humano o animal en el que dicha composición se aplica al contacto de un fluido oftálmico de manera que se realice una coloración selectiva en condiciones fisiológicamente aceptables para visualizar la distribución del fluido oftálmico durante la realización de una cirugía oftálmica. Por lo tanto, se extiende, en particular, a una composición como se ha mencionado anteriormente para su uso en un método de cirugía oftálmica practicado en el cuerpo humano o animal en el que dicha composición se aplica en contacto con un fluido oftálmico a fin de lograr coloración selectiva en condiciones fisiológicamente aceptables para visualizar la distribución del fluido oftálmico durante la realización de una cirugía oftálmica. La invención también se extiende a un método de cirugía oftálmica practicado en el cuerpo humano o animal en el que dicha composición se aplica en contacto con un fluido oftálmico con el fin de lograr coloración selectiva en condiciones fisiológicamente aceptables para visualizar el difusión del fluido oftálmico durante la realización de una cirugía oftálmica. En esta aplicación, dicha cirugía oftálmica se elige ventajosamente de entre el grupo que consiste en la cirugía de glaucoma por esclerectomía, la cirugía de glaucoma por trabeculectomía de la cirugía de glaucoma por trabeculoplastia a la cirugía de glaucoma por canaloplastia, y cirugía de glaucoma por iridectomía. Dicho fluido oftálmico es, por tanto, humor acuoso.

60 **[0036]** La invención se extiende al uso de al menos un colorante y al menos un poliol en particular por lo que la explicación se ha mencionado anteriormente para la fabricación de una composición para una coloración oftálmica, especialmente destinada a ser aplicada en contacto con la superficie exterior de la cápsula anterior del ojo a fin de producir una coloración selectiva de la cápsula anterior en condiciones fisiológicamente aceptables en relación con el tejido lenticular subyacente, facilitando el logro de una apertura controlada de la cápsula anterior durante una

operación de extracción quirúrgica de la catarata.

**[0037]** La invención se extiende al uso de al menos un colorante y al menos un poliol en particular por lo que la explicación se ha mencionado anteriormente para la fabricación de una composición para el diagnóstico de las membranas patológicas de la retina por la coloración selectiva durante una operación de procesamiento de las membranas patológicas de la retina.

**[0038]** La invención también se refiere a una composición de acuerdo con la invención como se mencionó anteriormente; su uso para la coloración selectiva de medios oftalmológicos, in vivo, ex vivo o in vitro, especialmente en un método de diagnóstico de una enfermedad susceptible de causar problemas de visión (pérdida (total o parcial) de la visión, deformaciones, velas...) aplicada al cuerpo humano o animal o en un método de tratamiento quirúrgico de una patología susceptible de causar problemas de visión (pérdida (total o parcial) de la visión, la distorsión, velas... ) aplicada al cuerpo humano o animal; tal método; y el uso de al menos un colorante y al menos un poliol como se ha mencionado anteriormente para la fabricación de una composición para la coloración oftálmica, caracterizándose en combinación de todas o algunas de las características anteriormente mencionadas o mencionadas a continuación.

**[0039]** Otros objetos, características y ventajas de la invención aparecerán en la lectura de los siguientes ejemplos dados con carácter no limitativo.

Ejemplo 1

**[0040]** Tres soluciones referenciadas, respectivamente, solución 1, solución 2, solución 3 se preparan.

**[0041]** La solución 3 (no según la invención) se compone de azul de tripano disuelto en 0,15% (peso por volumen) en solución salina tamponada acuosa que comprende 0,8% (peso por volumen) de NaCl y el tampón  $H_2PO_4/HPO_4$ , bajo la forma de  $NaH_2PO_4, 2H_2O$  a 0,03%;  $Na_2HPO_4, 2H_2O$  a 0,18%.

**[0042]** La solución 1 según la invención corresponde a la solución 3 a la que se añadió 1,8% (peso por volumen) de manitol y la cantidad de NaCl reducida a 0,5%.

**[0043]** La solución 2 (no según la invención) difiere de la solución 1 en que el manitol está sustituido por glucosa.

**[0044]** Soluciones 1, 2 y 3 tienen un pH fisiológico, es decir, entre 7 y 7,5. También tienen una osmolaridad fisiológica, es decir entre 280 y 350 mOsmol/KgH<sub>2</sub>O.

**[0045]** Se evalúa los efectos con respecto a las soluciones de células endoteliales de la córnea humana.

**[0046]** Se mide la tasa de citólisis mediante la incorporación de una sonda fluorescente, uniéndose al ADN en las células cuya membrana plasmática está dañada. La citólisis se evalúa por el canal de fluorescencia apropiada de un citómetro de flujo.

**[0047]** Además, se mide la velocidad de células reteniendo una diferencia de potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ). Para ello, utilice sondas fluorescentes catiónicas no tóxicas que se acumulan por las mitocondrias polarizadas como el valor residual de su potencial de membrana mitocondrial. Se extraen de las células cuándo la membrana mitocondrial desaparece por completo. Las células se analizaron en placas de 96 pocillos por un citómetro de flujo.

**[0048]** Se utiliza una línea de células de retina epiteliales ARPE-19 suministrada por ATCC.

**[0049]** Estas células se cultivan en un medio de cultivo (mezcla en proporciones iguales de medio de cultivo MEM y medio de cultivo de Ham F 12 al que se añade 10% de suero bovino fetal y 2 mM L-glutamina. Estas células se inyectan a 10 000 células por pocillo en placas de 96 pocillos.

**[0050]** Las células se colocan después durante 2 min en contacto con 50  $\mu$ l de diferentes soluciones con el fin de imitar las condiciones de una operación quirúrgica. A continuación, las soluciones se lavaron y se reemplazaron con medio de cultivo celular fresco. Las mediciones de la citólisis y de las tasas celulares que mantienen una diferencia de potencial de membrana mitocondrial se llevan a cabo 1,5 horas y 24 horas después de este tratamiento.

**[0051]** Las mismas mediciones se llevaron a cabo para la comparación en un medio de referencia de células de cultivo (medio de cultivo MEM) y una solución salina de irrigación ocular oftálmica (HBSS).

**[0052]** Tres pruebas se llevan a cabo para cada prueba. Los resultados se dan en la siguiente tabla.

ES 2 601 894 T3

5	% de células citolizadas en 1,5 horas	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Medio
	Medio MEM		20,3	6,3	
	HBSS	19,3	26,2	6,2	15,30
10	Solución 3	40,4	33,6	10,6	24,27
	Solución 2	33,3	14	7,8	25,83
	Solución 1	33,8	8,3	10,5	18,53
		22,4			13,73
15	% de células citolizadas en 24 horas				
	Medio MEM		16,4	10,2	
	HBSS	18,3	13,1	6,6	14,97
20	Solución 3	25,4	7,2	9,6	15,03
		13,7			10,17
25	% de células citolizadas en 24 horas				
	Solución 2		11,2	7,7	
30	Solución 1	19,6	7,9	9,8	12,83
		20,2			12,63
35	% de células con mitocondrias polarizadas después de 1,5 horas				
	Medio MEM		93,8	97,7	
	HBSS	88	70,3	95,9	93,17
	Solución 3	62,9	54,2	97,3	76,37
	Solución 2	65,4	95,1	94,7	72,30
45	Solución 1	47	96,2	89,9	78,93
		83,7			89,93
50	% de células con mitocondrias polarizadas después de 24 horas				
	Medio MEM		92,6	95,8	
	HBSS	90,6	95,1	98	
	Solución 3	95,6	96,2	95,9	93,00
	Solución 2	96,6	96,6	97	96,23
60	Solución 1	96,6	96,1	95,6	96,23
		96,9			96,83
		95,6			95,77

65

[0053] La solución 1 tiene citotoxicidad similar a la del medio de cultivo de células de referencia (13,7% y 15,3%).

[0054] Además, la tasa de células con un  $\Delta\Psi$  mitocondrial es muy cercana a la del medio de cultivo de células de referencia (89,9% y 93,2%).

[0055] Se comprueba por tanto una ausencia sorprendente de citotoxicidad de la solución 1 de la invención.

[0056] La solución 3, solución salina con 0,15% de azul de tripano y sin manitol, presenta una mayor citotoxicidad en relación con el cultivo de células de referencia central (25,8% y 15,3%) y una velocidad de células que tienen una  $\Delta\Psi$  mitocondrial disminuida sustancialmente en comparación con la correspondiente al medio de cultivo celular (72,3% y 93,2%).

[0057] La solución 2 tiene una citotoxicidad intermedia entre la obtenida por el medio de cultivo de células de referencia y la de la solución 3 (respectivamente 18,5%, 15,3% y 25,8%).

[0058] De manera similar, la tasa de células que tiene un  $\Delta\Psi$  mitocondrial es intermedia entre la del medio de cultivo de células de referencia y la de la solución 3 (respectivamente, 78,9%, 93,2% y 72,3%).

Ejemplo 2: estabilidad después de esterilización

[0059] La solución 1 se sometió a autoclave (121°C 20 min) y está entonces lista para su uso. Esta esterilización no produce ninguna impureza detectable, y no altera significativamente el espectro de absorción ultravioleta o en el visible.

[0060] La solución 1 de acuerdo con la invención es estable a temperatura ambiente (+4°C/+30°C), la cantidad de colorante contenida medida por cromatografía en fase gaseosa que permanece constante durante varios meses.

[0061] La solución 3 que contiene sólo azul de tripano es también estable de la misma manera, incluso después de la esterilización.

[0062] Por el contrario, después de la esterilización, la solución que contiene glucosa 2 se modifica: el pH disminuye de 7,36 a 6,2 y el área de su pico de absorción a 595 nm disminuye en aproximadamente 20%.

Ejemplo 3:

[0063] Se han preparado soluciones idénticas a la solución 1, pero reemplazando un azul de tripano por un colorante entre el azul de Evans, azul brillante G, azul de metileno y azul de anilina.

[0064] Todas estas soluciones han sido esterilizadas en autoclave (121°C 20 min). Una vez más, se encontró que cada una de estas soluciones es estable a temperatura ambiente (+4°C/+30°C), la cantidad de colorante contenida en la misma medida por cromatografía de gases que permanece constante durante varios meses.

[0065] Por otra parte, el manitol puede ser sustituido por cualquier otro poliol biocompatible y estable, en particular seleccionado del grupo que consiste de eritritol (n=4), xilitol (n=5), arabitol (n=5), ribitol (n=5), sorbitol (n=6), dulcitol (n=6), volemitol (n=7), maltitol (n=9), isomaltitol (n=9) y lactitol (n=9).

Ejemplo 4:

[0066] En esta prueba también se evalúa la influencia de la presencia de agua pesada en las soluciones por su citotoxicidad con respecto a células de retina epiteliales ARPE-19 proporcionadas por la ATCC bajo las mismas condiciones generales que ejemplo 1.

[0067] Las células se exponen a las soluciones durante 30 minutos en una primera serie de ensayos, y cinco minutos en una segunda serie de pruebas. Mediciones de citólisis realizaron 1,5 horas y 48 horas después del tratamiento.

[0068] La solución 4 de la invención consta de azul de tripano 0,15% (peso por volumen), 2,5 g/l de manitol en una solución salina acuosa tamponada que comprende 0,45 g/L de NaCl y el tampón  $H_2PO_4/HPO_4$  bajo forma de  $NaH_2PO_4$ ,  $2H_2O$  a 0,03%;  $Na_2HPO_4$ ,  $2H_2O$  a 0,18%.

[0069] La solución 5 según la invención consiste en azul de tripano a 0,15% (peso por volumen), 2,5 g/l de manitol en una solución salina acuosa tamponada que contiene 5% (volumen a volumen) de agua pesada, 0,45 g/L NaCl y tampón  $H_2PO_4/HPO_4$ , en forma  $NaH_2PO_4$ ,  $2H_2O$  a 0,03%;  $Na_2HPO_4$ ,  $2H_2O$  a 0,18%.

[0070] Las mismas medidas se llevaron a cabo para la comparación de la composición de Monoblue® 0,15% comercializada por la empresa Arcadophta, Toulouse, Francia, en una solución de peróxido de hidrógeno y 100 mM

de irrigación salina intraocular (BSS).

**[0071]** Los resultados se dan en las siguientes tablas:

5

Cultivo de 1 hora y 30 minutos después de la exposición

10

	Exposición 30 min			
	Número de células		% Células citolizadas	
	Medio	Tipo Ecart	Medio	Tipo Ecart
BSS	663,33	143,62	1,27%	0,61%
H2O2 100mM	29,33	5,51	73,63%	8,37%
Solución 4	322,00	35,79	2,20%	2,48%
Solución 5	295,00	67,56	1,23%	1,02%
Solución 3	384,33	72,06	1,83%	1,60%

15

Cultivo de 48 horas después de la exposición

20

	Exposición 5 min			
	Número de células		% Células citolizadas	
	Medio	Tipo Ecart	Medio	Tipo Ecart
BSS	4786,67	919,57	5,4%	1,2%
H2O2 100mM	129,00	44,44	88,3%	2,9%
Monoblue® 0.15	3689,33	1584,45	3,5%	1,2%
Solución 4	3725,33	491,24	3,0%	1,7%
Solución 5	2335,67	889,52	2,5%	0,8%
Solución 3	2119,00	284,99	4,1%	1,2%

25

30

**[0072]** Las soluciones se esterilizan por tratamiento en autoclave y podrían conservarse durante 59 días a 55°C y 40°C durante seis meses, de acuerdo con la correspondiente ley de Arrhenius con un envejecimiento acelerado de dos años en 20°C, el análisis de las soluciones se realizó mediante medición HPLC. El área del pico de absorción de la solución 4 no se cambia con el tiempo, la del pico de absorción de la solución 5, es decir, después del envejecimiento, aún de 98,20% de la de la solución inicial. El pH de las dos soluciones permanece sustancialmente constante en el tiempo. Las soluciones de acuerdo con la invención conservan por lo tanto, bien la estabilidad del colorante en el tiempo. Las soluciones 4 y 5 de acuerdo con la invención inducen menos citolisis que la solución 3 de comparación no de acuerdo con la invención, y la composición comercial de azul de tripano. Además, sorprendentemente, la presencia de agua pesada disminuye sustancialmente la citolisis. También se encontró que una composición de acuerdo con la invención es particularmente resistente al calor y se puede conservar durante un largo período sin precauciones especiales con respecto a la temperatura.

35

40

45

**[0073]** Una composición de la invención se puede utilizar de manera especialmente ventajosa en un procedimiento de tratamiento quirúrgico del cuerpo humano o animal seleccionado entre:

50

55

60

65

- Un método de tratamiento de cirugía oftálmica para la extracción de cataratas en el que la composición se aplica en contacto con la superficie exterior de la cápsula anterior del ojo (véase, por ejemplo "Trypan blue dye in extra-capsular cataract surgery: initial observations", J. M. Waziri-Erameh et al, Ann Biomed Sci., Vol.5 N°s 1 & 2, junio y diciembre 2006 : 1-4).
- Un método de tratamiento quirúrgico oftálmico de tratamiento de membranas patológicas de la retina en la que la composición se aplica en contacto con la retina (véase, por ejemplo "Trypan blue staining of internal limiting membrane and epiretinal membrane during vitrectomy: visual results and histopathological findings", K Li, D Wong, P Hiscott, P Stanga, C Groenewald, J McGalliard, Br J Ophthalmol 2003;87:216-219)
- Un método de tratamiento quirúrgico oftálmico seleccionado del grupo que consiste en la cirugía de glaucoma por esclerectomía (véase, por ejemplo, video V3018 presentado en el congreso de la APAO ("Asian & Pacific Association of Ophthalmology") Singapur 2006, Asian Journal of Ophthalmology Volumen 8 N°3 suplemento 1 página 385); cirugía de glaucoma por trabeculectomía (véase, por ejemplo, "Use of Trypan Blue to confirm the patency of filtering surgery", Shishir Agrawal et al, Journal of Cataract & Refractive Surgery Vol. 31, Issue 1, enero 2005 235-237); de la cirugía de glaucoma por trabeculoplastia a la cirugía de glaucoma por Canaloplastia (véase, por ejemplo "Canaloplasty for open angle glaucoma: a three years critical evaluation and comparison with viscocanalostomy", C. O. Peckar y N. Körber, Spektrum Augenheilkd (2008) 22/4: 240-246); y la cirugía de glaucoma por iridectomía. En estas operaciones de tratamiento quirúrgico de glaucoma, la composición de coloración se aplica en contacto con el humor acuoso.

**Reivindicaciones**

- 5
1. - Composición de coloración estable adecuada para la esterilización en autoclave, comprendiendo una solución acuosa:
    - Al menos un colorante,
    - Al menos un poliol soluble en agua de la fórmula  $H(HCOH)_nH$ , donde n es un número entero mayor que 3,
- 10 para uso en un procedimiento seleccionado de:
- Un método de tratamiento quirúrgico oftálmico aplicado al cuerpo humano o animal, en el que dicha composición se aplica en contacto con un medio oftálmico con el fin de llevar a cabo una coloración selectiva en condiciones fisiológicamente aceptables durante la realización de al menos un procedimiento quirúrgico oftálmico,
  - Un método de diagnóstico aplicado al cuerpo humano o animal (in vivo).
- 15
2. - Composición de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** comprende al menos un tinte seleccionado del grupo formado por azul de tripán, azul brillante G, azul de Evans, azul patente V, azul de metileno, azul de bromofenol y azul de anilina.
- 20
3. - Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizada porque** comprende una proporción de cada colorante que es aceptable para una implementación en contacto con un medio oftálmico.
- 25
4. - Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada porque** comprende una proporción de cada colorante en peso por unidad de volumen de entre 0,001% y 2,5%.
- 30
5. - Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada porque** comprende una proporción de poliol que es aceptable para una implementación en contacto con un medio oftálmico.
- 35
6. - Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada porque** comprende una proporción de poliol en peso por unidad de volumen de entre 0,1% y 5%.
- 40
7. - Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada porque** n es menor que o igual a 9.
- 45
8. - Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada porque** cada poliol se selecciona del grupo formado por eritritol (n=4), xilitol (n=5), arabitol (n=5), ribitol (n=5), sorbitol (n=6), dulcitol (n=6), manitol (n=6), volemitol (n=7), maltitol (n=9), isomaltitol (n=9) y lactitol (n=9).
- 50
9. - Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizada porque** comprende tanto manitol como poliol.
- 55
10. - Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizada porque** comprende una cantidad de cloruro de sodio tal que la composición tiene una concentración osmótica de entre 260 y 360 mOsmol/kgH<sub>2</sub>O.
- 60
11. - Composición de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizada porque** comprende una proporción de cloruro sódico en peso por unidad de volumen de entre 0,4% y 0,9%.
- 65
12. - Composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizada porque** comprende adicionalmente un tampón adecuado para mantener un pH de entre 7 y 7,5.
13. - Composición de acuerdo con la reivindicación 12, **caracterizada porque** el tampón es H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/HPO<sub>4</sub>.
14. - Composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizada porque** consta de 0,001% a 2,5% (pes./vol.) de al menos un colorante, un 0,1% a 5% (pes./vol.) de al menos un poliol soluble en agua, una proporción de cloruro de sodio tal que la concentración osmótica de la composición se puede ajustar a un valor de entre 280 mOsmol/kgH<sub>2</sub>O y 350 mOsmol/kgH<sub>2</sub>O, un tampón adecuado para mantener el pH de la composición en entre 7 y 7,5, agua pesada en una proporción de 1% a 20% (vol./vol.) y q.s.
15. - Composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizada porque** es estéril.
16. - Composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 15 para uso en un procedimiento quirúrgico para el tratamiento del cuerpo humano o animal, seleccionado de:

- Un método de tratamiento quirúrgico oftálmico para la eliminación de cataratas en la composición aplicada en contacto con la zona exterior de la cápsula anterior del ojo,
- Un método de tratamiento quirúrgico oftálmico para el tratamiento de membranas de retina patológicas en las que la composición se aplica en contacto con la retina,
- Un método quirúrgico oftálmico para el tratamiento de glaucoma.

5

**17.** - Composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 15 para uso en un método de diagnóstico oftálmico aplicado al cuerpo humano o animal mediante coloración diferencial de algunas partes específicas de medios oftálmicos - en particular, intraocular.

10

**18.** - Composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 15, por coloración diferencial, para membranas de retina patológicas.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65