(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 818 129**

(51) Int. CI.:

***C07C 309/49*** (2006.01)
***C09B 11/12*** (2006.01)
***C09B 11/20*** (2006.01)
***A61K 49/00*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.05.2016 PCT/IB2016/053062**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2016 WO16189475**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2016 E 16734450 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 3274000**

(54) Título: **Molécula de colorante y preparados de colorante, en particular para su uso en métodos quirúrgicos de cirugía oftálmica y para teñir proteínas**

(30) Prioridad:

**26.05.2015 IT UB20150864**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**09.04.2021**

(73) Titular/es:

**AL.CHI.MI.A. S.R.L. (100.0%)**
**Viale Austria 14**
**35020 Ponte S. Nicolò (Padova), IT**

(72) Inventor/es:

**BECCARO, MAURO;**
**BETTINI, ENRICO y**
**SIGNORI, PAOLO**

(74) Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

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

## DESCRIPCIÓN

Molécula de colorante y preparados de colorante, en particular para su uso en métodos quirúrgicos de cirugía oftálmica y para teñir proteínas

Campo técnico

La presente invención hace referencia a una nueva molécula de colorante, en particular a una molécula utilizable para elaborar preparados para teñir la membrana limitante interna (en lo sucesivo, MLI) de un ojo, así como varios tipos de membranas epirretinianas (en lo sucesivo, MEM), con el objetivo de crear una diferencia de color entre las membranas teñidas de dicha manera (MLI y MEM) y el tejido subyacente durante las vitrectomías que implican la eliminación de dichas membranas. Además, la molécula de este invento está destinada a ser utilizada para teñir cadenas de proteínas. La presente invención hace referencia también a un preparado de colorante que comprende dicha nueva molécula, en particular para uso médico, y aún más particularmente para los usos médicos indicados más arriba. La invención hace referencia también al uso de un preparado que comprende dicha molécula de colorante, tanto en el sector médico, en particular para los usos médicos especificados más arriba, como en el sector no médico en lo que a la coloración de proteínas respecta. No menos importante, la presente invención hace referencia también a preparados de colorante que comprenden un nuevo agente espesante, tanto de las maneras descritas como para su uso en métodos para el tratamiento de los cuerpos de los humanos o los animales, en particular en los métodos indicados más arriba. Finalmente, hace referencia al uso de preparados de colorante que comprenden un nuevo agente espesante tanto del tipo médico como del tipo no médico.

Antecedentes de la técnica

Tal y como se describe detalladamente en los documentos EP 1819366 A1 o US 2011/190728 A1 del estado de la técnica, en muchas patologías del ojo, la cirugía de vitrectomía suele ser la mejor opción. No obstante, durante la cirugía, es importante minimizar el riesgo de daños en la retina. Una de las medidas cautelares generalmente reconocidas consiste en retirar, durante la cirugía, la MLI, y si fuera necesario, también cualquier membrana epirretiniana que se haya formado sobre ella, con el objetivo de evitar que las tensiones intravítreas afecten a la mácula. Según la técnica quirúrgica utilizada generalmente en la actualidad, la extracción de la MLI y de las membranas epirretinianas se efectúa separándolas mecánicamente con una pinza apropiada, en una acción mecánica que se denomina pelado. Sin embargo, y como consecuencia, ha sido posible percatarse de que, para el cirujano, es fundamental poder distinguir en la medida de lo posible la membrana que se va a extraer de la retina subyacente.

Por esta razón, a lo largo de los años, y de manera similar a como ocurre con otras cirugías oftálmicas, se ha sugerido la posibilidad de teñir selectivamente las membranas a extraer, de manera que puedan distinguirse visualmente de las estructuras subyacentes no teñidas. Obviamente, para poder utilizarse con este fin, el colorante debe cumplir numerosos requisitos. En particular, por un lado, debe ser biocompatible y no citotóxico o dañino para las células. Por otro, debe ser, preferiblemente, soluble en agua, debe ser capaz de teñir las membranas de la forma más selectiva posible y debe poder expulsarse del ojo con facilidad al final de la cirugía, pero no con demasiada facilidad durante la misma.

Para este propósito se ha propuesto gran cantidad de colorantes, pero hasta ahora, ninguno de ellos ha mostrado ser totalmente satisfactorio. Entre los colorantes iniciales utilizados se incluyen el indocianina verde (en lo sucesivo, ICV. Véase como ejemplo "Indocyanine green assisted peeling of the retinal internal limiting membrane". Burk SE y otros. Ophthalmology. 2000;107:2010-2014) y el azul de tripano (en lo sucesivo, TP). Sin embargo, los diversos estudios llevados a cabo han puesto en relieve varios problemas con dichos colorantes. En particular, mientras que para el ICV se plantearon numerosas dudas sobre su seguridad en el uso de ojos humanos, el TP demostró ser capaz de teñir satisfactoriamente las membranas epirretinianas, pero no la MLI.

A posteriori se han propuesto otros colorantes, como el Azul brillante G (en lo sucesivo, ABG), el azul brillante R (en lo sucesivo, ABR), el azul patentado V o el azul de metileno.

En particular, en el documento EP 1819366 A1 se propuso el uso del ABG, de una sal del ABG o de un hidrato del ABG.

El ABG también se indica como el colorante preferido en el documento US 2011/190728 A1, un documento más genérico que describe el uso de al menos un colorante seleccionado entre el trifenilmetano y/o el azo colorante y/o el colorante de cianina y/o los colorantes naturales como los antocianos y las antocianinas.

En dicho documento, el preparado de colorante basado en el colorante seleccionado se elabora también con una densidad de entre 1,01 g/cm$^3$ y 1,5 g/cm$^3$, preferiblemente de entre 1,01 g/cm$^3$ y 1,3 g/cm$^3$, para garantizar un mayor contacto durante la cirugía entre la solución teñida y la MLI y para superar los problemas relacionados con la eliminación excesiva del colorante que puede producirse con los colorantes de menor densidad, debido a la irrigación continua que tiene lugar en el ojo durante la cirugía.

De acuerdo con dicho documento, el agente utilizado para aumentar la densidad se selecciona entre agua pesada $D_2O$, disacáridos o polisacáridos, o polímeros neutros como poliéteres, alcohol polivinílico, poliésteres, copolímeros de ácido poliacrílico y polivinilpirrolidona.

Sin embargo, de todos los colorantes indicados, el único que se comercializó posteriormente para teñir la MLI fue el ABG (que, no por casualidad, está indicado como el colorante preferido en los documentos mencionados anteriormente).

Sin embargo, como ya se ha indicado anteriormente, dicho colorante tampoco está libre de desventajas.

En particular, el ABG es un colorante difícil de sintetizar con altos niveles de pureza, al menos a un costo razonable en términos comerciales.

De hecho, el ABG se obtiene por modificación del ABR y los rendimientos de reacción de síntesis son limitados, por lo que el producto comercialmente disponible tiene muy a menudo un nivel de pureza que es incluso muy inferior al 90 % declarado (los ensayos efectuados por el solicitante incluso mostraron niveles de pureza del 80 %) con una alta contaminación por parte del ABR inicial. Es fácil imaginar que, sin un ensayo de pureza preliminar, puede ser difícil elaborar preparados de colorante basados en el ABG que contengan un contenido de colorante controlado con precisión.

Al mismo tiempo, intentar purificar en mayor medida el ABG no es ventajoso en lo que se refiere a la relación costo-beneficio.

Además de estas desventajas, hay que tener en cuenta que el ABG no es una sustancia intrínsecamente biocompatible, sino que es citotóxica. La posibilidad de utilizarlo o no en preparados destinados a usos médicos o, en cualquier caso, para teñir material vivo, depende exclusivamente de su concentración. En base a la literatura científica disponible, en particular, el ABG se considera no citotóxico solo cuando su concentración no es superior a 0,3 g/l (igual a 0,03 % p/v - véanse los ensayos llevados a cabo de acuerdo con la norma DIN EN ISO 10993 mostrados en la hoja del producto comercial Brilliant Peel® de la empresa Geuder AG). Sin embargo, según numerosos cirujanos, en esas concentraciones el efecto de coloración que se puede lograr no es siempre satisfactorio, por ejemplo, en el caso de los ojos de personas muy miopes.

Como se ha indicado ya, un segundo campo de aplicación de este invento es la coloración genérica de proteínas y cadenas proteicas.

De hecho, incluso en este sector, uno de los colorantes más utilizados a día de hoy es el ABG.

Sin embargo, el solicitante se ha percatado de que, aunque puede teñir las proteínas, el ABG presenta, en realidad, una afinidad relativamente baja con estas. Los ensayos llevados a cabo sobre la proteína comúnmente aceptada como proteína de referencia (albúmina de huevo), mediante un análisis de dicroísmo circular (en lo sucesivo, DC), destacaron para el ABG-250 en un tampón fosfato (1,22 mg/ml en $D_2O$) una constante de asociación $K_a$ entre el ABG y la albúmina de, aproximadamente, 38000 $M^{-1}$. Debe tenerse en cuenta que, para llevar a cabo los ensayos, el ABG comercial con una pureza del 80 % fue purificado preliminarmente y los espectros de DC fueron medidos en la región de 800-400 nm en presencia de cantidades cada vez mayores de albúmina. Finalmente, de la manera conocida, el valor de la constante de asociación se determinó utilizando una regresión no lineal de la señal dicroica expresada en $\Delta A$ ($A_L$-$A_R$, donde $A_L$ y $A_R$ indican, respectivamente, la absorbencia del preparado en lo que respecta a las dos ondas de luz polarizadas circularmente utilizadas para el estudio del dicroísmo circular, la onda izquierda y la onda derecha) en función de la concentración de la clara de huevo, utilizada como referencia. Sin embargo, en este respecto, también debe tenerse en cuenta lo que se indica en la posterior sección Pruebas de afinidad.

Divulgación de la invención

En este contexto, el propósito técnico que conforma la base de esta invención es proporcionar una nueva molécula de colorante que supere las ventajas mencionadas anteriormente.

En particular, el propósito técnico de esta invención es proporcionar una molécula de colorante que pueda utilizarse en los preparados para teñir la MLI, en particular, mejor de lo que es posible actualmente utilizando el ABG.

Otro propósito técnico de esta invención es proporcionar una nueva molécula de colorante que tenga una afinidad mucho mayor con las proteínas y las cadenas proteicas, en comparación con el ABG.

Otro propósito técnico más de esta invención es proporcionar un preparado de colorante pesado que cuente con una capacidad de coloración superior a la de las alternativas del estado de la técnica.

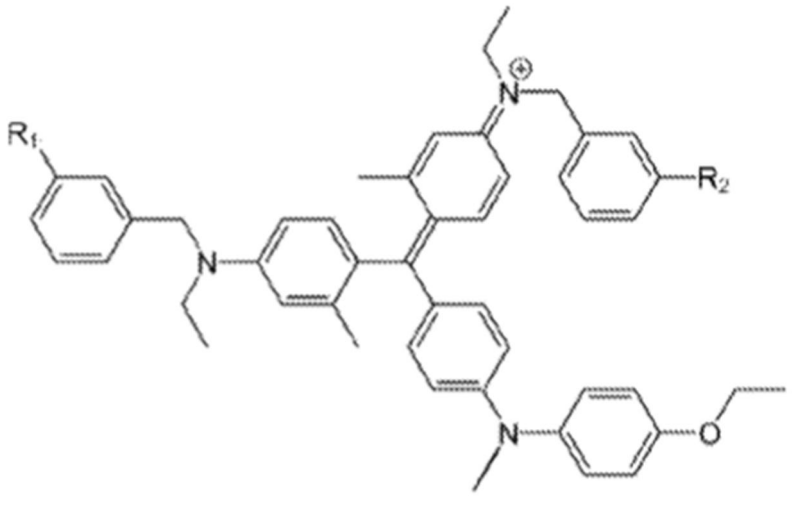
No menos importante, el propósito técnico de esta invención es proporcionar un preparado de colorante que pueda ser utilizado en métodos para el tratamiento de los cuerpos humanos o animales.

El propósito técnico especificado y los objetos indicados se logran sustancialmente mediante una molécula de colorante y mediante un preparado de colorante que la comprende, tal y como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

En la descripción detallada de la presente invención se hacen más aparentes las características y las ventajas adicionales de la misma, haciendo referencia a varias realizaciones preferidas, pero no limitantes, de la presente invención ilustrada más adelante.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención

Con respecto a la molécula de colorante, en el contexto de la presente invención, se proporcionó una familia de la misma que está representada por la siguiente estructura (I):




(I)

donde $R_2$ está constituido por un grupo $SO_3$- (que forma una sal interna con el átomo N de nitrógeno cercano cargado positivamente) y $R_1$ está constituido por un grupo $SO_3$- unido con un enlace iónico a un átomo H de hidrógeno o a otro átomo (por ejemplo, sodio Na) o a un grupo $NH_4$ de amonio o a una sal de lisina o a una sal de arginina o a un catión monovalente diferente.

Como bien puede observarse, la molécula divulgada según esta invención difiere de una molécula de ABG (es necesario tener en cuenta que, en el contexto de la presente invención, dicho nombre también tiene por objeto mencionar a cualquier producto identificado por sinónimos, como el Coomassie® brilliant blue, el Acid Blue 90, C. I. 42655 y el Brilliant Blue G 250, identificados todos ellos por el número CAS: 6104-58-1) debido a la presencia de un grupo metilo en lugar de un átomo de hidrógeno unido al átomo de amino-nitrógeno disuelto.

La síntesis de la nueva molécula descrita puede lograrse mediante una reacción de metilación en el nitrógeno amino disustituído de un producto de partida constituido por Brilliang Blue G250. En particular, la reacción es particularmente ventajosa partiendo del ABG comercial que, como se ha dicho, normalmente tiene un nivel de pureza inferior o igual al 90 % y está contaminado con ABR. De hecho, al final de la reacción de metilación y de la posterior purificación, la contaminación con ABR se ha eliminado.

En general, el método de síntesis consiste en hacer reaccionar el producto inicial en uno o más pasos sucesivos con hidróxido de sodio y yoduro de metilo, variando, si fuera necesario, sus proporciones cada vez.

**Ejemplo**

A continuación, se incluye una descripción de un ejemplo de producción preferido. Obviamente, las cantidades indicadas podrían variar, preservando las proporciones entre las diversas sustancias, entendiéndose que el proceso descrito conduce a la producción de, aproximadamente, 1,6 g de la molécula divulgada, y la producción de cantidades significativamente más grandes podría requerir ciertas modificaciones al proceso para su optimización industrial.

Materiales y métodos

Catalizadores

| Catalizadores | Fabricante | Cantidad para un lote de aproximadamente 1,6 gramos |
|---|---|---|
| Azul brillante G – puro (ABG) | (Sigma Aldrich, B0770) | 2 g |
| Metanol de grado RP | (Sigma Aldrich) | 50 ml |
| Hidróxido de sodio | (Sigma Aldrich) | 0,20 g |
| Yoduro de metilo | (Sigma Aldrich) | 2,20 ml |
| Acetronilo de grado HPLC | (Sigma Aldrich) | 4 l |
| Agua desionizada | | 10 l |
| Ácido trifluoroacético de grado UV | (Sigma Aldrich) | 40 ml |
| Metanol de grado HPLC | (Sigma Aldrich) | 4 l |

Con respecto al ABG inicial, en los ensayos llevados a cabo este era un producto con una pureza del 91 % (Certificado de análisis B0770, Sigma Aldrich, lote SLBJ8621V). Confirmando dicha cuestión, la figura 1 muestra su espectro de masa, que indica al menos dos picos significativos.

Materiales

| Materiales | Cantidad para un lote de aproximadamente 1,6 gramos |
|---|---|
| Matraz de cristal de 250 ml | 1 |
| Probetas de 5 ml | 2 |
| Matraces de liofilización de 500 ml y 1 l | 5 |
| 16*160 mm Tubos de ensayo de vidrio lavados en una lavadora de laboratorio | 300 |
| 200 viales ul para automuestreador para HPLC | 600 |

Instrumentos

| Instrumentos | Fabricante |
|---|---|
| Sistema de cromatografía en fase líquida de media presión | |
| Columna REVELERIS C18 WP 40 g | Grace |
| Liofilizador | Freeze Dryer Modulyo Edwards |
| HPLC | Shimadzu LC10 |
| Agitador magnético | Ika |
| Evaporador rotativo | Buchi |

Descripción de la reacción

Se añaden 0,12 g de hidróxido de sodio y 0,92 ml de yoduro de metilo a 1,7 g de ABG disuelto en metanol-agua 1:1 v/v. Se deja que la reacción se produzca durante unos dos días a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción puede entonces ser comprobada utilizando HPLC para destacar que el producto inicial sigue estando presente. Los resultados del análisis por HPLC de los ensayos llevados a cabo se muestran en la figura 3 y destacan tres picos que corresponden, de izquierda a derecha, el primero al disolvente empleado en la reacción, el segundo a la molécula de ABG y el tercero a la nueva molécula divulgada. En este punto, se añaden otros 0,92 ml de yoduro de metilo y 0,08 g de hidróxido de sodio. Tras 7 días, se añaden otros 0,36 ml de yoduro de metilo y 0,08 g de hidróxido de sodio y se deja que la reacción finalice durante otros dos días.

La mezcla de reacción se concentra entonces en pequeños volúmenes y la mezcla sin refinar se purifica mediante cromatografía en fase líquida de media presión (MPLC) utilizando una columna REVELERIS C18 WP 40 g (Grace) eluida con una mezcla de agua (A) y 90 % v/v de acetonitrilo en agua (B), conteniendo ambas un 0,05 % v/v de ácido trifluoroacético.

Tras la purificación, se juntan las fracciones que contienen el producto deseado, se concentran en pequeños volúmenes y se liofilizan. El sólido disuelto en hidróxido de sodio 0,01 se purifica entonces utilizando la misma columna con una mezcla de agua (A) - metanol (B). Condiciones de la MPLC: caudal 20 ml/min, detección 254 nm, gradiente 40 % (B) durante 5 min, 40 – 60 % (B) en 40 min, 60 – 95 % (B) en 2 min, 95 % (B) 2 min, 95 – 40 % (B) 2 min.

La figura 4 muestra el resultado de la verificación por HPLC del producto final purificado y liofilizado obtenido en los ensayos llevados a cabo, y muestra la presencia de un solo pico correspondiente a la molécula divulgada (en forma de sal de sodio). Confirmando esta cuestión, la figura 2 muestra el espectro de masa (ESI-MS) del producto final purificado.

También en los ensayos llevados a cabo, la pureza del producto final fue de, aproximadamente, 96,6 % según los cálculos efectuados a partir de los espectros de la HPLC, mientras que el rendimiento de la reacción fue de,

aproximadamente, un 60 % de producto no refinado (100 g de ABG-250 dieron, por lo tanto, aproximadamente 60 g de la molécula divulgada, en forma de sal de sodio).

Tal y como se ha indicado, la presente invención hace también referencia a un preparado de colorante que comprende al menos un primer colorante cuya molécula es la nueva molécula divulgada, o una sal aceptable farmacéuticamente de la misma o un hidrato de la misma.

Preferiblemente, el preparado de colorante es una solución acuosa y/o tiene una matriz tamponada de fosfato. Además, es líquido al menos en el rango de temperatura de entre 0 y 50 °C.

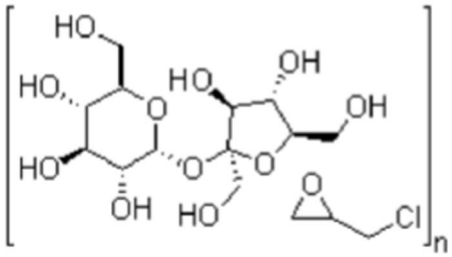
Además, al menos en lo que respecta a los usos en el contexto de los métodos para el tratamiento de cuerpos de personas y animales, el preparado es también ventajosamente estéril y biocompatible.

Ventajosamente, el primer colorante está presente en una cantidad, en peso en relación al volumen total de la preparación (p/v), de entre 0,0001 % y 0,5 %, preferiblemente de entre 0,015 % y 0,05 %.

Además, en algunas realizaciones preferidas, el preparado de colorante tiene una densidad de entre 1,01 g/cm$^3$ y 1,5 g/cm$^3$ gracias a la presencia adicional de al menos un agente para aumentar su densidad.

El al menos un agente para aumentar la densidad puede seleccionarse de acuerdo con las necesidades. Por ejemplo, puede ser seleccionado del grupo formado por: agua pesada $D_2O$, monosacáridos, disacáridos, polisacáridos y polímeros neutros; en particular, entre los polímeros neutros pueden seleccionarse poliéteres, alcohol polivinílico, poliésteres, copolímeros de ácido poliacrílico, manitol y polivinilpirrolidona.

Sin embargo, en una realización particularmente preferida, el agente para aumentar la densidad es un polímero con la fórmula empírica (C12H22O11 •C3H5ClO)n, y estructura



El agente es comercialmente conocido como Ficoll® o Polisucrosa (número CAS: 26873-85-8), y está ventajosamente presente en una cantidad, en peso en relación al volumen total del preparado (p/v), de entre 0,001 % y 20 %, preferiblemente de entre 0,1 % y 10 %. En lo sucesivo, cuando se haga referencia al término Ficoll, la intención será la de hacer mención a dicho agente.

En una formulación particularmente preferida, el preparado comprende 0,05 % (p/v) de la molécula divulgada y 4 % (p/v) de Ficoll en un tampón de fosfato.

En función de las aplicaciones a las que se destine, el preparado de colorante puede comprender también otras sustancias y, en particular, puede comprender también por lo menos un segundo colorante diferente del primero. En una realización preferida, en la que el preparado de colorante está destinado a ser utilizado en el contexto de los métodos para el tratamiento de los cuerpos de humanos y animales, el segundo colorante es ventajosamente azul de tripano (la invención, sin embargo, no está dirigida a esos métodos para el tratamiento como tal).

Con respecto a las demás propiedades del preparado de colorante, como la viscosidad dinámica, el pH, la osmolalidad, etc., en cada caso el experto en la materia podrá adaptarlas al uso del preparado de colorante. Por ejemplo, en el caso del uso del preparado de colorante en el cuerpo de humanos o animales, si fuera necesario, pueden ajustarse de tal manera que se acerquen lo más posible a las condiciones fisiológicas.

Con respecto a los posibles usos del preparado de colorante, uno de los usos para los que está destinado específicamente el preparado de colorante de esta invención es el uso en métodos para el tratamiento del cuerpo de humanos o animales (la invención, sin embargo, no está destinada a dichos métodos para el tratamiento como tal).

Ventajosamente, en particular, el preparado de colorante está destinado para su uso en un método quirúrgico de vitrectomía.

Aún más ventajosamente, el preparado de colorante puede utilizarse para teñir la MLI de la membrana limitante interna y/o las membranas epirretinianas en un método quirúrgico que implica la posterior extracción de la MLI y/o de la MEM. De hecho, se ha comprobado que la molécula de colorante divulgada es capaz de teñir selectivamente al menos la MLI de tal manera que durante el paso de separación de la MLI (pelado) y la MEM, se crea una diferencia claramente visible entre la MLI teñida y las estructuras subyacentes no teñidas. Para garantizar que se tiñen todas las MEM posibles, el preparado de colorante puede también comprender un segundo colorante, capaz de teñirlas selectivamente (como el azul tripán).

Un uso preferido más del preparado de colorante divulgado es en un método en el que tiñe proteínas, por ejemplo, para aumentar la visibilidad de un tejido al que pertenecen las proteínas.

Datos experimentales

A continuación, se incluyen algunos datos experimentales obtenidos tras los ensayos y los análisis elaborados por el solicitante.

Análisis de citotoxicidad

El solicitante llevó a cabo diversos tests que destacaron que los preparados de colorante de acuerdo con esta invención no son citotóxicos.

A continuación, a modo de ejemplo, se incluyen los resultados obtenidos por los laboratorios de Eurofins Biolab S.r.l. en Vimodrone (provincia de Milán), Italia, para tres diferentes lotes de un preparado de colorante que comprende 0,05 % (p/v) de una molécula elaborada de acuerdo con esta invención (con el grupo $R_1$ conformado por un grupo $SO_3$- unido a un catión de sodio), 4 % (p/v) Ficoll en un tampón de fosfato, que muestra que ninguna de las tres muestras era citotóxica. Cabe destacar que la concentración utilizada es mucho mayor que aquella (0,03 % p/v) en la que se ha declarado que el ABG es citotóxico.

| Lote | Esterilización | % de reducción en viabilidad | | grado de degeneración celular | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | valor medido | % de límite de citotoxicidad | valor medido | grado límite de toxicidad |
| 1 | autoclave 121,1 ºC x20' | 1,6 | >30 | 0 | >2 |
| 2 | autoclave 121,1 ºC x20' | -0,42 | >30 | 0 | >2 |
| 3 | autoclave 121,1 ºC x20' | -2,77 | >30 | 0 | >2 |

Pruebas de afinidad

Son estas pruebas llevadas a cabo por el solicitante para comparar la molécula divulgada y al ABG-250 comercial, en términos de afinidad con proteínas y con cadenas de proteínas. Como en el caso anterior, la molécula producida de acuerdo con esta invención utilizada en los tests es una molécula obtenida con el método descrito en el Ejemplo, y en la que el grupo $R_1$ está conformado por un grupo $SO_3$- unido a un catión de sodio.

En contraste, en lo que respecta al ABG-250 comercial, dado que la pureza de dicho compuesto era aproximadamente del 91 %, (en comparación con el 80 % declarado), antes de llevar a cabo los tests, se purificó hasta, aproximadamente, el 98 %.

En particular, se llevaron a cabo tests sobre cuatro preparados de colorante diferentes, a base de agua en un tampón de fosfato: para cada molécula, una comprendiendo Ficoll (al 4 % p/v) y una comprendiendo agua pesada $D_2O$ (a 13 % v/v). En todos los preparados de colorante probados, el tampón de fosfato comprendió:

-Fosfato de sodio monobásico minohidrato NaH2PO4 · H2O: 0,266 mg/ml;

-Fosfato de sodio dibásico anhidro Na2HPO4: 1,51 mg/ml;

-Cloruro de sodio NaCl: 8,2 mg/ml.

La afinidad se determinó mediante espectroscopia DC (dicroísmo circular). Los espectros DC se midieron en la región de 800 – 400 nm en presencia de cantidades crecientes de albúmina de clara de huevo que, como es bien sabido, es comúnmente considerada representativa de las proteínas en general para los análisis de este tipo.

Cabe destacar que, en las condiciones utilizadas (400 - 800 nm), la albúmina no absorbe y, por lo tanto, no produce ninguna señal dicroica, mientras que los colorantes presentan un alto nivel de absorción, pero no muestran ninguna señal dicroica. Por el contrario, la interacción de la albúmina con la molécula colorante (ABG-250 o la divulgada en el presente documento) induce una quiralidad en el colorante que puede medirse mediante DC. Como consecuencia, al

efectuar un análisis volumétrico del colorante con la albúmina es posible determinar su constante de afinidad aparente o su constante de asociación, mediante una regresión no lineal de la curva de valoración.

Los datos de la espectroscopia DC relacionados con un preparado de colorante que comprende la molécula divulgada y Ficoll se muestran en la figura 5, donde el número 1 indica el espectro dicroico del preparado de colorante en ausencia de proteína, mientras que las otras líneas se refieren al mismo preparado en presencia de cantidades crecientes de albúmina (según la flecha).

Como se ha indicado previamente, al utilizar una regresión no lineal de la señal dicroica expresada en $\Delta A$ ($A_L$-$A_R$) en función de la concentración de albúmina de clara de huevo, se determinan los valores de la constante de asociación $K_a$. La figura 6 muestra la tendencia de la regresión relacionada con el preparado de colorante que comprende la molécula divulgada y Ficoll. Es necesario tener en cuenta que en el cálculo de la constante de asociación $K_a$ se tuvieron en cuenta las diferentes concentraciones de ambos colorantes.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

-Preparado de colorante con ABG-250 en Ficoll 4 % en un tampón de fosfato (esterilizado): $K_a$, aproximadamente, 60.000 $M^{-1}$;

-Preparado de colorante con la molécula divulgada en Ficoll 4 % en un tampón de fosfato (esterilizado): $K_a$, aproximadamente, 300.000 $M^{-1}$;

-Preparado de colorante con ABG-250 en un tampón de fosfato (1,22 mg/ml en $D_2O$) (esterilizado): $K_a$, aproximadamente, 38.000 $M^{-1}$;

-Preparado de colorante con la molécula divulgada en un tampón de fosfato (0,58 mg/ml en $D_2O$) (esterilizado): $K_a$, aproximadamente, 180.000 $M^{-1}$;

Por lo tanto, como puede observarse, independientemente del agente utilizado para aumentar la densidad, la molécula divulgada mostró, sorprendentemente, una afinidad por albúmina igual a 4,7 - 5 veces la del ABG-250 comercial.

Además, se pudo establecer que, para ambas moléculas de colorante, la presencia de Ficoll promovía (en 1,66 - 1,58 veces) la asociación del colorante con la albúmina en comparación con el utilizado en el agua pesada. Si bien no se conoce con certeza el motivo por el que se obtiene este último resultado, la teoría del solicitante es que el Ficoll, además ejercer la función consistente en aumentar la densidad, también puede cumplir la función de "agente de aglomeración" (en lo sucesivo, denominado CA) y promover la interacción de los colorantes con la albúmina de huevo mediante "volumen excluido" y factores espaciales.

De hecho, recientemente se ha estudiado el Ficoll junto con el PEG y el dextrano, y se ha utilizado como CA, es decir, como agente de aglomeración/relleno, para imitar las condiciones del entorno intracelular, que se caracteriza por un entorno extremadamente apiñado, con una cantidad limitada de agua libre y una ausencia casi total de espacio. Muchos estudios sobre CA (véase, por ejemplo, "What Macromolecular Crowding Can Do to a Protein", Irina M. Kuznetsova 1,2, Konstantin K. Turoverov 1,2 y Vladimir N. Uversky 1,3,4,5) han mostrado, de hecho, que el "apiñamiento macromolecular" creado por el CA podría afectar a la estructura de las proteínas, al plegado, a la forma, a la estabilidad, al enlace con las moléculas pequeñas, a la actividad enzimática, a las interacciones proteína-proteína, a las interacciones proteína-ácido nucleico y a la agregación patológica.

El principal mecanismo de CA es actuar para el "volumen excluido", que corresponde a la ocupación espacial y, por tanto, al movimiento de las otras moléculas en los espacios libres restantes. Localmente, esto puede resultar en un aumento de la concentración o en cambios estéricos moleculares de los solutos. Por lo tanto, esto también podría ocurrir en el caso en cuestión.

A la luz de los resultados experimentales que se acaban de discutir en relación con las sorprendentes ventajas que pueden obtenerse utilizando Ficoll como agente para aumentar la densidad, para concluir, esta invención también hace referencia a un preparado de colorante para su uso en un método quirúrgico de cirugía oftálmica que tiene una densidad superior a 1,01 g/cm$^3$ y que comprende Ficoll como un agente para aumentar su densidad. Dicho preparado puede ser utilizado para todos los usos indicados más arriba haciendo referencia a la nueva molécula de colorante divulgada.

Ventajosamente, este preparado de colorante puede comprender al menos un colorante seleccionado del grupo compuesto por: ABG, sales aceptables farmacéuticamente de ABG, hidratos de ABG y metilatos de ABG.

Desde un punto de vista operativo, en el caso del uso de un preparado de colorante que utiliza Ficoll para obtener una densidad superior a 1,01 g/cm$^3$ para teñir la MLI, es necesario recordar que, en estas cirugías, tras la extracción del vítreo mediante vitrectomía, el preparado de colorante se inyecta en la cámara posterior. Gracias a su alta densidad, se deposita sobre la MLI con la que permanece en contacto solo durante unos segundos antes de ser extraído

mediante el habitual y abundante lavado de la cámara posterior con BSS. Sin embargo, a pesar de los pocos segundos durante los que se produce el contacto, el preparado de colorante tiñe la MLI.

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que en estas condiciones de uso (por lo tanto, también incluso en el caso de otras cirugías oftálmicas llevadas a cabo en condiciones similares), cualquier Ficoll utilizado como espesante no puede actuar como CA, puesto que el preparado de colorante se retira inmediatamente después de teñir la membrana y se diluye en la cámara posterior con BSS.

Por lo tanto, limitado al uso para el teñido intraoperatorio en los métodos de cirugía oftálmica, el uso de Ficoll ofrece "tan solo" un rendimiento similar al que se puede obtener, siendo la densidad del preparado de colorante la misma, con agentes normales para aumentar la densidad, como el agua pesada.

Esta invención proporciona importantes ventajas.

En lo que respecta a la nueva molécula de colorante proporcionada, en primer lugar, se logró la enorme ventaja de que dicha molécula demostró ser capaz de teñir mejor que el ABG comercial no solo la MLI (circunstancia declarada por todos los cirujanos que participaron en las pruebas experimentales), sino también las proteínas y las cadenas de proteínas (véanse los resultados de las pruebas mostrados más arriba), con la consecuencia de que es posible utilizar menos colorante para lograr los mismos resultados.

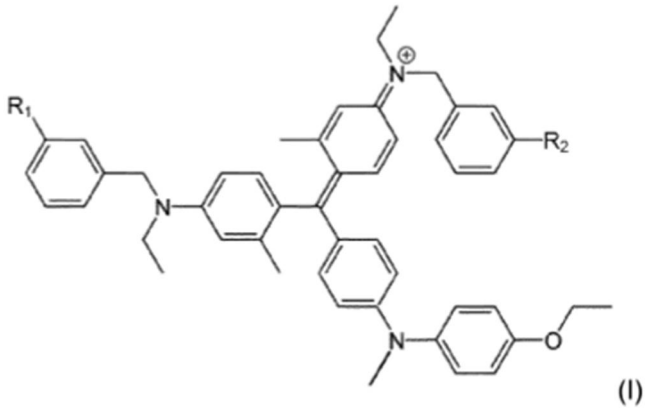
Además, no es citotóxico en concentraciones significativamente más altas que las permitidas actualmente para el ABG comercial.

En cambio, en lo que respecta al uso de Ficoll como un agente para aumentar la densidad, como alternativa a los utilizados hasta ahora en el sector, se pudo establecer que su uso permite en algunas aplicaciones resultados similares a aquellos que se podían obtener hasta ahora (como en el caso de la cirugía oftálmica), mientras que en otras aplicaciones permite el uso de menos colorante para lograr los mismos resultados.

Por último, cabe señalar que este invento es relativamente fácil de producir y que tampoco el costo vinculado a la implementación del invento es demasiado elevado.

**REIVINDICACIONES**

1. Una molécula de colorante que tiene la estructura:



(I)

donde:

$R_1$ está conformado por un grupo $SO_3$- unido con un enlace iónico a un átomo de hidrógeno H o a otro átomo o a un grupo amónico $NH_4$ o a una sal de lisina o a una sal de arginina o a un catión monovalente diferente; y

$R_2$ está conformado por un grupo $SO_3$-.

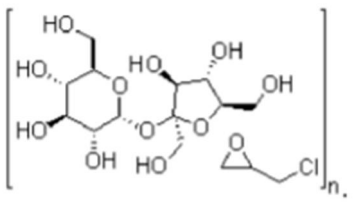
2. Un preparado de colorante que comprende al menos un primer colorante con la molécula de acuerdo con la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma o un hidrato de la misma.

3. El preparado de colorante de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado por que el primer colorante está presente en una cantidad, en peso en relación al volumen total de la preparación (p/v), de entre 0,0001 % y 0,5 %.

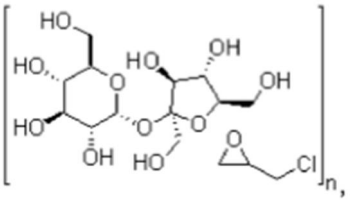
4. El preparado de colorante de acuerdo con la reivindicación 2, también comprendiendo un segundo colorante que es azul de tripano u otro colorante que es diferente al primer colorante.

5. El preparado de colorante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 – 4, caracterizado por que tiene una densidad de entre 1,01 g/cm$^3$ y 1,5 g/cm$^3$ y por que también comprende al menos un agente para aumentar la densidad.

6. El preparado de colorante de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado por que el al menos un agente para aumentar la densidad se selecciona de entre el grupo conformado por: agua pesada $D_2O$, monosacáridos, disacáridos, polisacáridos, polímeros neutros como poliéteres, alcohol polivinílico, poliésteres, copolímeros de ácido poliacrílico, manitol, polivinilpirrolidona y un polímero con la fórmula empírica $(C_{12}H_{22}O_{11}\cdot C_3H_5ClO)n$, y la estructura



7. Un preparado de colorante que tiene una densidad superior a 1,01 g/cm$^3$ y que comprende al menos un colorante y al menos un agente para aumentar su densidad que es un polímero con la fórmula empírica $(C_{12}H_{22}O_{11}\cdot C_3H_5ClO)x$, y la estructura



en donde el colorante se selecciona entre Azul brillante G (ABG), una sal farmacéuticamente aceptable de ABG, un hidrato de ABG, un metilato de ABG.

8. El preparado de colorante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 – 7, en donde el agente para aumentar su densidad está presente en una cantidad, en peso en relación con el volumen total del preparado (p/v), de entre 0,001 % y 20 %.

9. El preparado de colorante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 – 8, caracterizado por que es también líquido al menos en el rango de temperatura de entre 0 y 50 °C.

10. El preparado de colorante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 – 9 para su uso en métodos para el tratamiento de los cuerpos de humanos o animales.

11. El preparado de colorante de acuerdo con la reivindicación 10, para su uso o en un método quirúrgico para vitrectomía, o al teñir la membrana limitante interna MLI y/o las membranas epirretinianas MEM en un método quirúrgico que implica la posterior extracción, respectivamente, de la MLI y/o de las MEM, o en un método en el que el preparado de colorante tiñe proteínas para hacer más visible un tejido al que pertenecen las proteínas.

12. El preparado de colorante de acuerdo con la reivindicación 10, cuando es esta dependiente de la reivindicación 4, para su uso a la hora de teñir la membrana limitante interna MLI y las membranas epirretinianas MEM en un método quirúrgico que implica la eliminación posterior, respectivamente, de la MLI y de las MEM, en donde el primer colorante en uso tiñe al menos la MLI y el segundo colorante tiñe las membranas epirretinianas MEM.

13. El uso de un preparado de colorante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 – 8 para teñir proteínas.

14. Un método para sintetizar la molécula de colorante reivindicada en la reivindicación 1, caracterizado por que utiliza una reacción de metilación de un producto inicial constituido por el Azul brillante G250.

15. El método reivindicado en la reivindicación anterior, en donde la reacción de metilación comprende hacer que el producto inicial reaccione en uno o más pasos con hidróxido de sodio y yoduro de metilo.

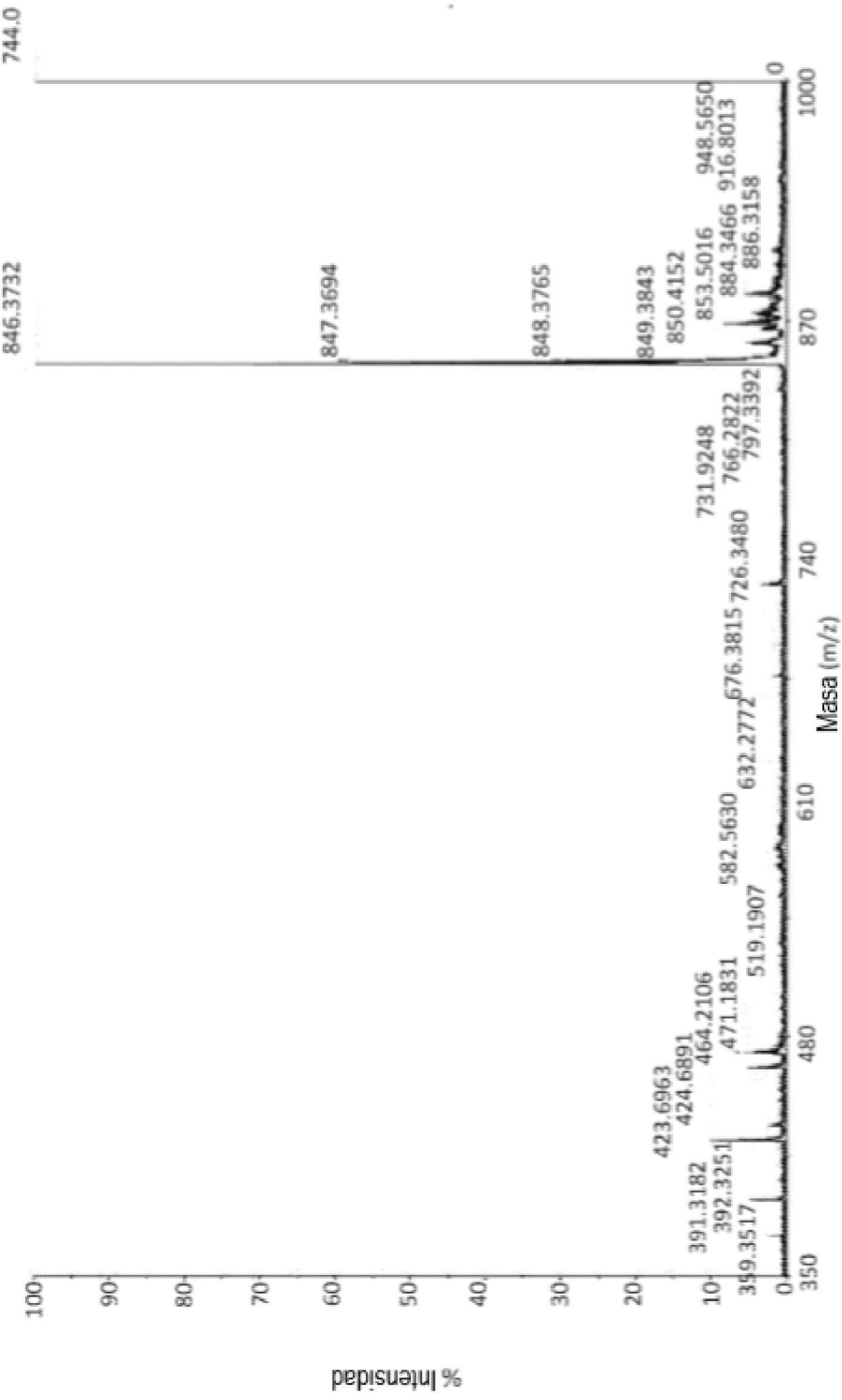

744.0
846.3732
847.3694
848.3765
849.3843
850.4152
853.5016
884.3466
886.3158
916.8013
948.5650
731.9248
766.2822
797.3392
726.3480
676.3815
632.2772
582.5630
519.1907
471.1831
464.2106
424.6891
423.6963
391.3182
392.3251
359.3517
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
350
480
610
740
870
1000
% Intensidad
Masa (m/z)

Figura 1

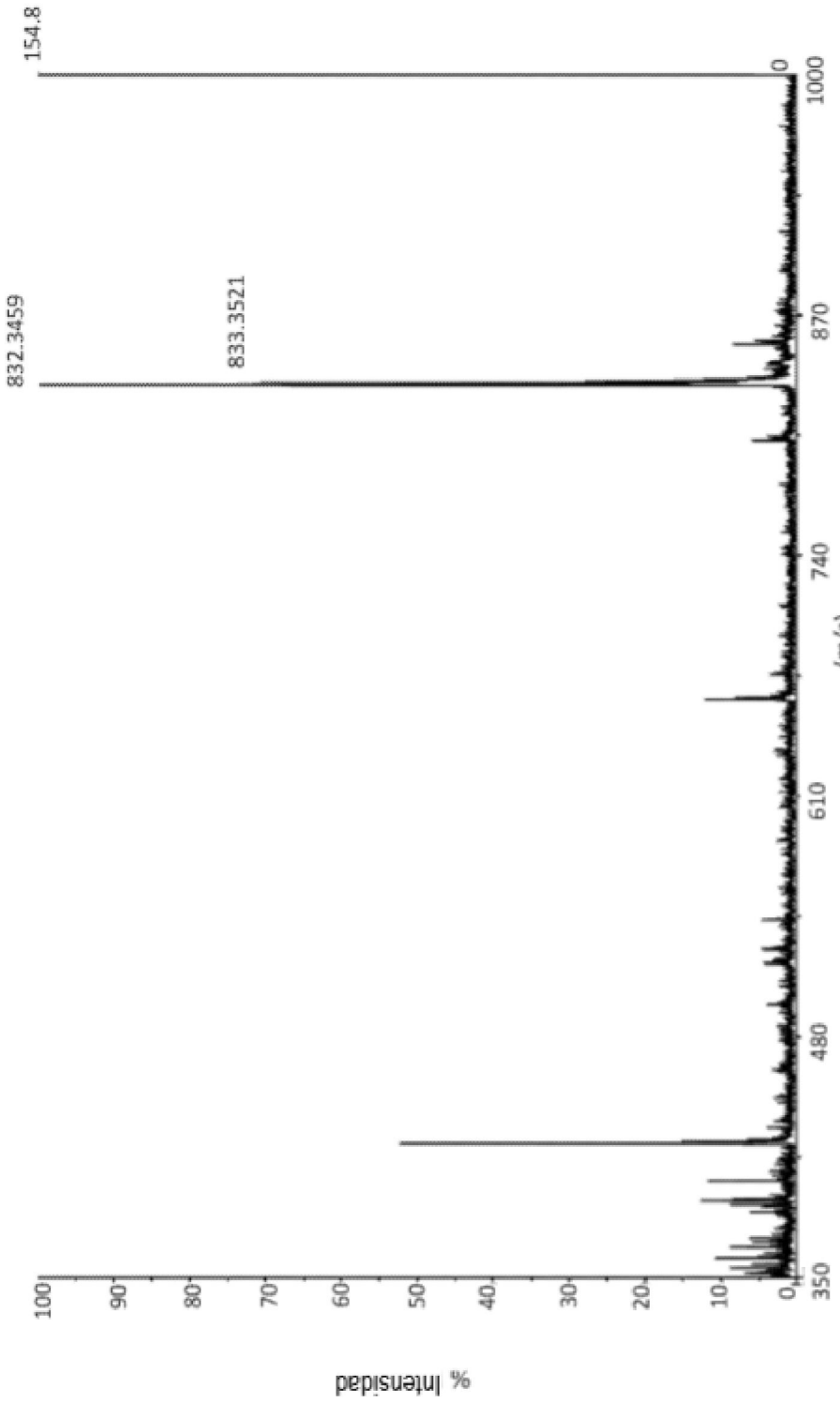

154.8
832.3459
833.3521
% Intensidad
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
350
480
610
740
870
1000
Masa (m/z)

Figura 2

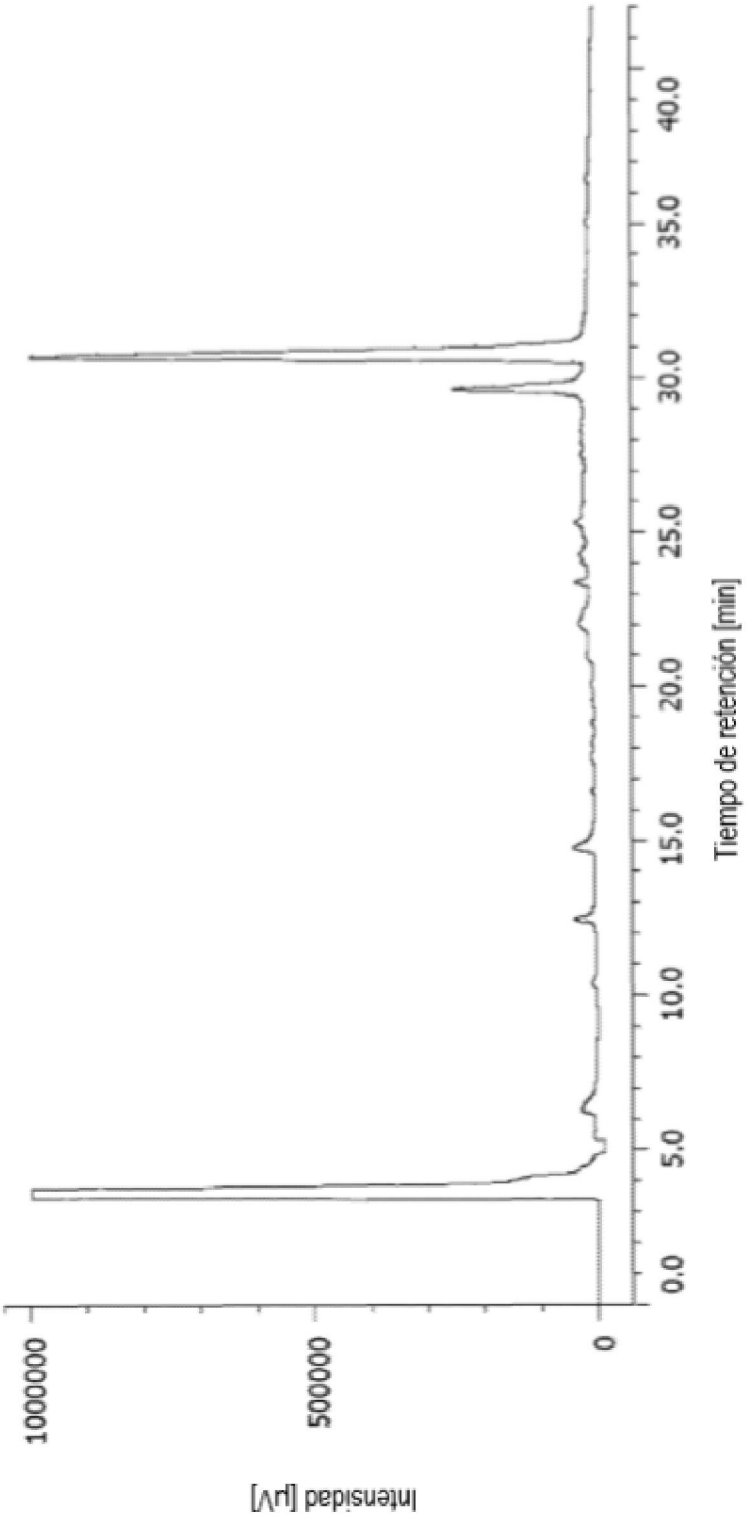

Intensidad [µV]
1000000
500000
0
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0
Tiempo de retención [min]

Figura 3

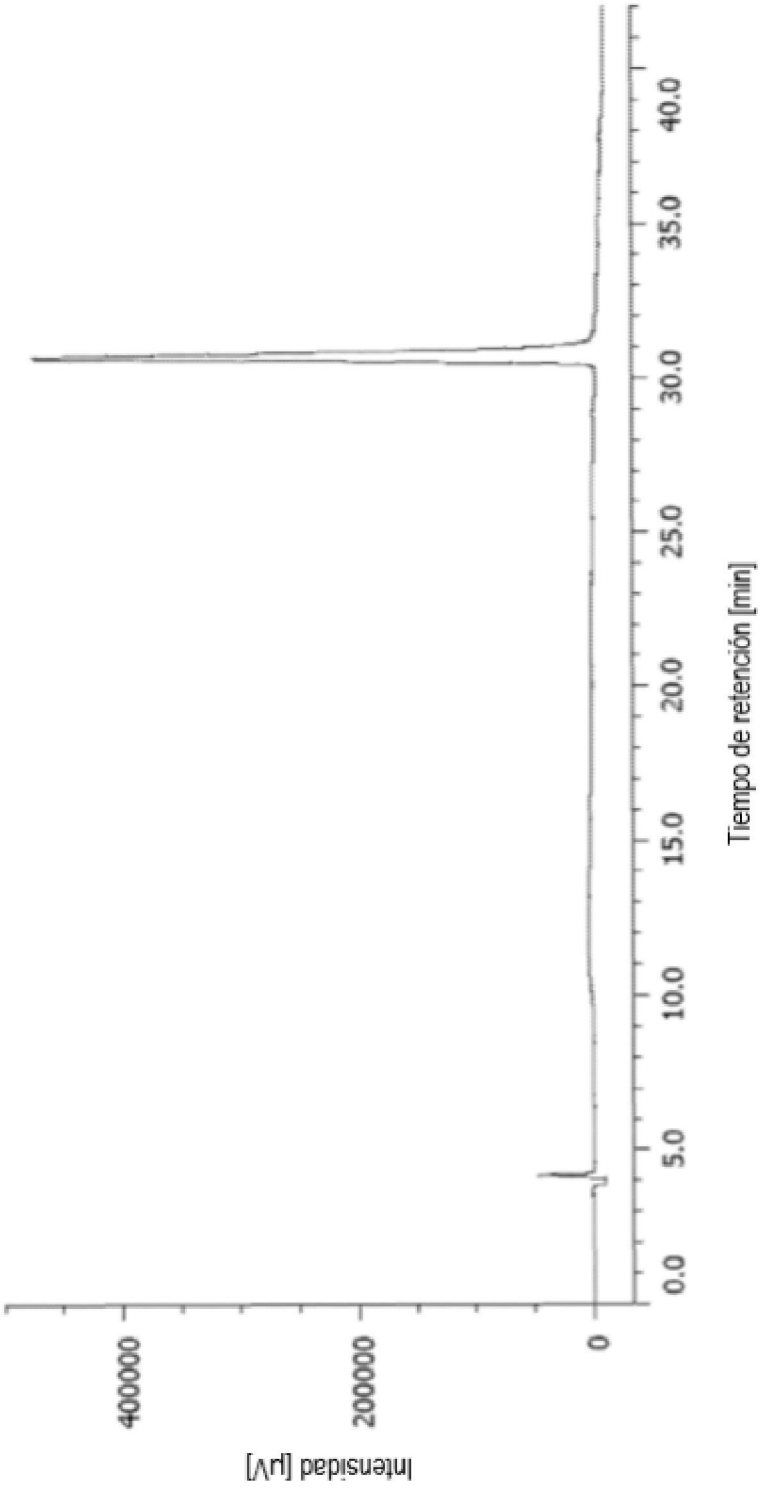

Intensidad [µV]
400000
200000
0
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0
Tiempo de retención [min]

Figura 4

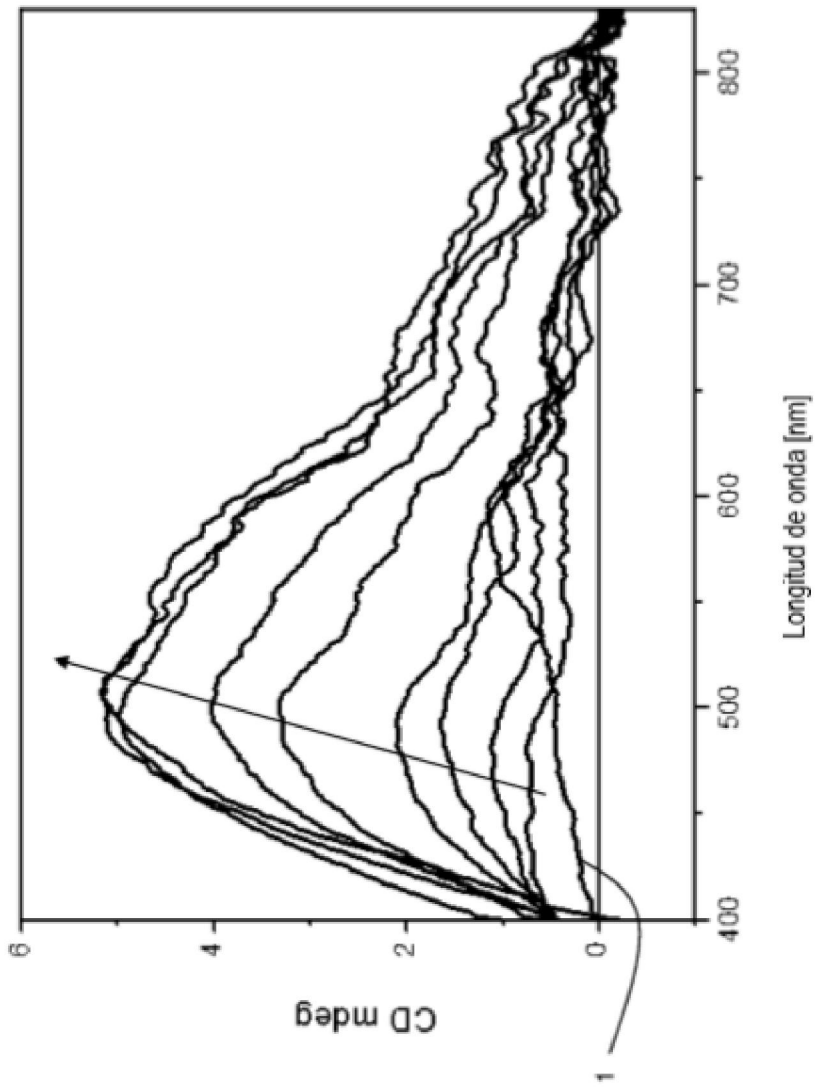



Figura 5

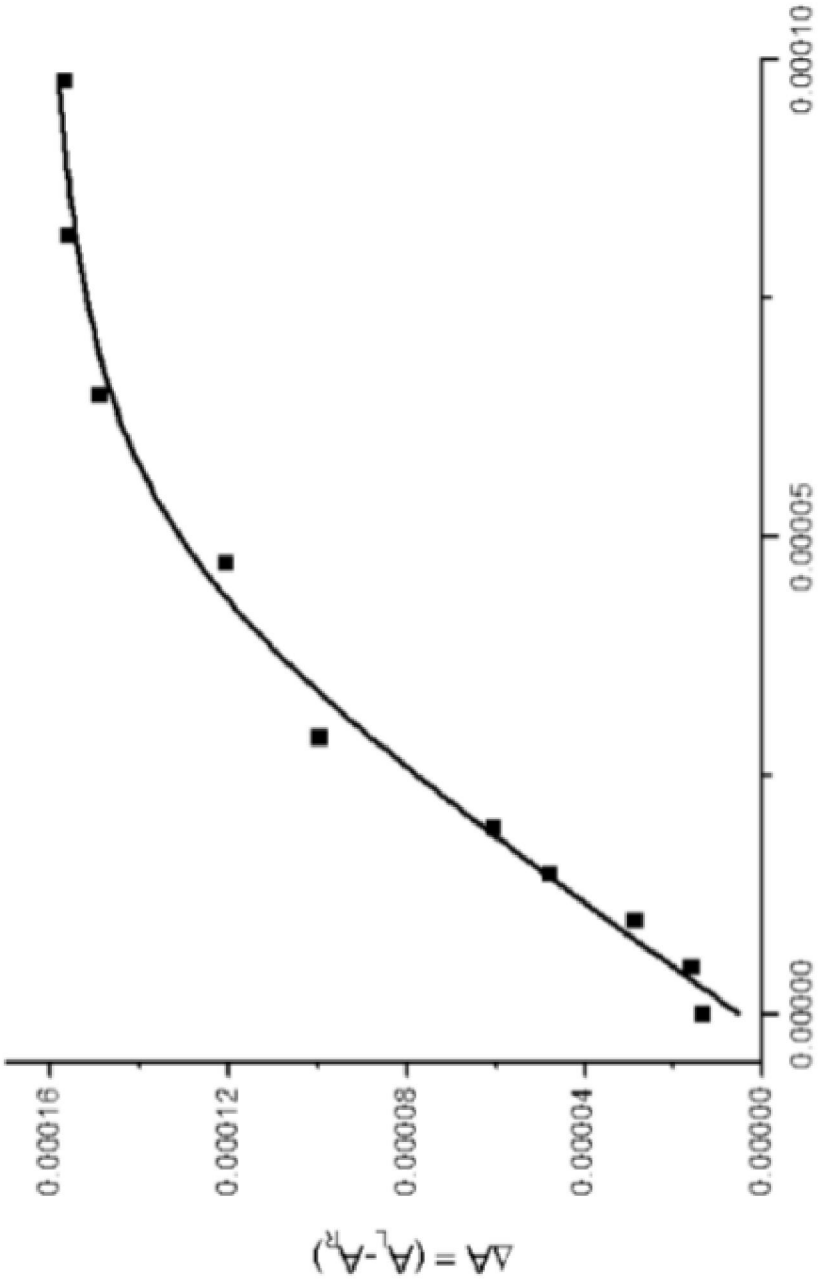

0.00016
0.00012
0.00008
0.00004
0.00000
ΔA = (A_L-A_R)
0.00000
0.00005
0.00010
[HWA]

Figura 6