



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 292 060**

(51) Int. Cl.:
C09J 189/00 (2006.01)
A61L 24/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **05104976 .5**
(86) Fecha de presentación : **14.12.2000**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1589088**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **26.10.2005**

(54) Título: **Nueva composición bioadhesiva que incluye una proteína polifenólica, un polímero que incluye grupos carbohidrato, filamentos finos de aceptación farmacéutica y sus usos.**

(30) Prioridad: **17.12.1999 SE 9904650**
26.01.2000 US 178548 P
10.03.2000 SE 0000799

(73) Titular/es: **BioPolymer Products of Sweden AB.**
P.O. Box 206
441 24 Alingsås, SE

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2008

(72) Inventor/es: **Qvist, Magnus y**
Hansson, Hans, Arne

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2008

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 292 060 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

Nueva composición bioadhesiva que incluye una proteína polifenólica, un polímero que incluye grupos carbohidrato, filamentos finos de aceptación farmacéutica y sus usos.

La presente invención se relaciona con composiciones biodegradables que incluyen polímeros adhesivos biocompatibles y métodos usados para cubrir superficies y para pegar estructuras a los tejidos del ojo, tales como la córnea. Proteínas polifenólicas aisladas de mejillón, a las cuales se hace referencia como "Proteína Adhesiva de Mejillón" o "MAP", son usadas junto con polisacáridos y filamentos finos farmacéuticamente aceptables con el fin de lograr un pegado adhesivo fuerte. La invención también tiene que ver con un juego consistente de una preparación MAP, una preparación de polisacáridos que son preferiblemente de carga negativa, filamentos finos de aceptación farmacéutica y, opcionalmente, un agente oxidante tal como iones peróxido de hidrogeno, iones nitroprusiato o iones peryodato, que es empleado para la preparación de una composición para el cubrimiento y pegado de estructuras a los tejidos de los ojos tales como la córnea.

Antecedentes de la invención

La reparación de estructuras traumatizadas sobre y en un ojo y sus anexos es a menudo difícil. El uso de suturas en, p.ej., la córnea causa malestar, deformaciones, distorsiones y puede afectar la agudeza visual. Otros componentes del ojo, tales como el iris, estructuras del cristalino y retina son difíciles o difícilmente posibles de suturar o unir con pinzas o elementos relacionados. Más aún, las suturas y pinzas inevitablemente inducen reacciones de cuerpo extraño y formación de cicatrices. El posicionamiento de un implante en estructuras oculares, por ej., un espesamiento parcial o una queratoplastia penetrante o una prótesis en la córnea, requieren el uso de técnicas elaboradas incluyendo el uso de hápticos para mantenerlas en la posición adecuada, lo cual puede conducir a irritaciones y reacciones adversas. Consecuentemente los métodos actuales de reparación de estructuras en, sobre y dentro de un ojo están asociados con malestar y con la posibilidad de inducir daño permanente a la agudeza visual. Es altamente deseable el uso de una composición que permita unir estructuras con superficies húmedas en la posición deseada, que permanezca adherente durante un período de tiempo predecible sin causar ninguna opacidad en componentes de importancia óptica o cualquier deformación, cicatriz o reacción de cuerpo extraño no aceptable.

Se sabe que las proteínas polifenólicas, preferiblemente aisladas de mejillones, actúan como adhesivos. Ejemplos de tales proteínas se pueden encontrar en, por ej., en US 4'585.585. Su amplio uso como adhesivos ha sido limitado por problemas relacionados con la purificación y caracterización de las proteínas adhesivas en cantidades suficientes. Adicionalmente, el requerimiento de agentes de entrecruzamiento biocompatibles adecuados y otros aditivos han limitado su uso. Agentes químicos, tales como los compuestos conjugados bifuncionales y las enzimas se asocian comúnmente con reacciones tóxicas y otros efectos biomédicos laterales. Adicionalmente, es difícil purificar completamente enzimas con alta actividad retenida evitando su desnaturalización y efectos adversos sobre células, tejidos y órganos.

La proteína adhesiva de mejillón (MAP) se forma en una glándula en el pie de mejillones formadores de filamentos, tales como el mejillón azul común (*Mytilus edulis*). El peso molecular de la MAP del *Mytilus edulis* es de aproximadamente 10.000 Daltons y se ha revelado que consiste de 75 a 80 secuencias de péptidos repetidos cerca-mente relacionados. Tiene una inusual alta proporción de aminoácidos con hidróxilos tales como hidroxiprolina, serina, treonina, tirosina y el poco común aminoácido 3,4 dihidroxi L-fenilalanina (Dopa) así como lisina. Puede ser aislada de fuentes naturales o producida mediante biotecnología. US 5,015,677 así como US 4,585,585 revelan que la MAP tiene propiedades adhesivas muy fuertes luego se su oxidación y polimerización, p. ej., por actividad de la enzima tirosinasa o después de tratamiento con reactivos bifuncionales. Es muy importante en aplicaciones biomédicas de un adhesivo y composición recubriente el utilizar componentes bioaceptables y biodegradables los cuales no deben, per sé, o debido a contaminación, inducir ningún tipo de inflamación o reacción tóxica. Se ha adicionado materiales de relleno, incluyendo colágeno y polisacáridos, para mejorar las propiedades mecánicas en casos en los cuales se ha empleado MAP para unir tejidos y estructuras, lo cual significa un riesgo adicional de reacciones inmunológicas.

También se sabe previamente que es posible utilizar composiciones adhesivas basadas en MAP con propósitos oftalmológicos. Robin *et al.*, Refractive and Corneal Surgery, vol. 5, p. 302 - 306, y Robin *et al.*, Arch. Ophthalmol., vol. 106, p. 973 -977, en ambos se revelan adhesivos basados en MAP los cuales incluyen un polimerizador enzimático. US 5,015,677 también describe un adhesivo basado en MAP el cual contiene un agente entrecruzador y, opcionalmente, una sustancia de relleno y un surfactante. Agentes de entrecruzamiento preferidos, de acuerdo a US 5,015,677 son agentes oxidantes enzimáticos tales como catecol oxidasa y tirosinasa, pero también algunas veces agentes de entrecruzamiento tales como glutaraldehído y formaldehído. Ejemplos de materiales de relleno son las proteínas tales como el colágeno y albúmina y polímeros que incluyen grupos carbohidrato tales como el quitosán y el hialuronan. US 5,030,230 también tiene que ver con un adhesivo que incluye MAP, tirosinasa de champiñón (entrecruzador), SDS (sodio dodecil sulfato, un surfactante) y colágeno (un material de relleno). El autoadhesivo se emplea para adherir una prótesis córnea a la pared del ojo.

Un problema principal asociado con composiciones conocidas de bioadhesivos basados en MAP, no obstante las propiedades de la MAP *per se*, es que algunos constituyentes, en particular los agentes de entrecruzamiento que se emplean en la actualidad, pueden dañar o irritar tejidos vivos y causar reacciones tóxicas e inmunológicas. Los agentes químicos de entrecruzamiento, tales como el glutaraldehído y el formaldehído son generalmente tóxicos para humanos

y animales, y es altamente inapropiado el adicionar tales agentes a un tejido sensible como el ojo. Las enzimas, tales como la catecol oxidasa y la tirosinasa, son proteínas y se reconoce a las proteínas como potentes alérgenos, especialmente en casos donde se originan de especies diferentes a las del paciente. Debido a sus habilidades oxidantes e hidrolizantes también pueden dañar tejidos sensibles. A pesar de estos serios problemas asociados con los agentes de entrecruzamiento utilizados en la actualidad, se ha considerado necesario el incluirlos con el objetivo de obtener un curado suficiente del bioadhesivo.

WO-A1-94/28937 revela conjugados proteína-polímero como adhesivos biocompatibles.

En éste sentido existe una necesidad de una composición basada en MAP que supere estos problemas y por lo tanto no dañe ni irrite tejidos sensibles como el ojo.

Resumen de la invención

Sorprendentemente se ha encontrado que una composición no irritante, no alérgica y no tóxica se puede obtener suministrando una composición bioadhesiva que incluya a) una proteína polifenólica derivada de mejillones formadores de filamento b) Un polímero que incluya grupos carbohidrato y c) filamentos finos de aceptación farmacéutica. La composición bioadhesiva no contiene ninguna enzima o agente químico de entrecruzamiento. Opcionalmente la composición puede contener un agente oxidante y/o proteína de relleno. La composición se provee preferiblemente como un juego de al menos dos partes donde la proteína polifenólica y los grupos poliméricos que incluyen carbohidratos se suministran en porciones separadas.

Definiciones

Tal como se revela aquí los términos “proteína polifenólica”, “proteína adhesiva de mejillón” o “MAP” tienen que ver con una proteína bioadhesiva derivada de mejillones formadores de filamento. Ejemplos de tales mejillones son los mejillones del género *Mytilus*, *Geukensia*, *Aulacomya*, *Fragmatopoma*, *Dreissena* y *Brachiodontes*. Se han revelado proteínas adecuadas en una pluralidad de publicaciones, por ej., US-A-5,015,677, US-A-5,242,808, US-A-4,585,585, US-A-5,202,236, US-A-5,149,657, US-A-5,410,023, WO 97/34016 y US-A-5,574,134, Vreeland *et al.*, J. Physiol., 34: 1-8 y Yu *et al.*, Macromolecules, 31: 4739-4745. Estas incluyen alrededor de 30 - 300 residuos de aminoácidos y esencialmente consisten de unidades peptídicas unidas en tándem separadas por una secuencia de unión de 0 - 10 aminoácidos. Una característica de tales proteínas es una cantidad comparativamente alta de residuos de lisina positivamente cargados y, en particular, el inusual aminoácido DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina). Una proteína polifenólica adecuada para el uso en la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos en la cual al menos 5% y preferiblemente 6-25% de los residuos aminoácidos son DOPA. Algunos ejemplos de unidades peptídicas típicas se dan más adelante. Sin embargo, es importante notar que las secuencias de aminoácidos de estas proteínas son variables y que el objetivo de la presente invención no está limitado a las secuencias dadas más adelante a manera de ejemplo tal como personas expertas entienden que las proteínas bioadhesivas polifenólicas de diferentes fuentes pueden ser vistas como equivalentes:

- a) Val-Gly-Gly-DOPA-Gly-DOPA-Gly-Ala-Lys
- b) Ala-Lys-Pro-Ser-Tyr-diHyp-Hyp-Thr-DOPA-Lys
- c) Thr-Gly-DOPA-Gly-Pro-Gly-DOPA-Lys
- d) Ala-Gly-DOPA-Gly-Gly-Leu-Lys
- e) Gly-Pro-DOPA-Val-Pro-Asp-Gly-Pro-Tyr-Asp-Lys
- f) Gly-Lys-Pro-Ser-Pro-DOPA-Asp-Pro-Gly-DOPA-Lys
- g) Gly-DOPA-Lys
- h) Thr-Gly-DOPA-Ser-Ala-Gly-DOPA-Lys
- i) Gln-Thr-Gly-DOPA-Val-Pro-Gly-DOPA-Lys
- j) Gln-Thr-Gly-DOPA-Asp-Pro-Gly-Tyr-Lys
- k) Gln-Thr-Gly-DOPA-Leu-Pro-Gly-DOPA-Lys

Como se revela aquí, el término “grupos poliméricos que incluyen carbohidratos”, se relacionan con un polímero de ocurrencia natural o sintético que incluya una cantidad de grupos carbohidratos. Los polímeros pueden ser grupos carbohidrato constituidos o discretos unidos mediante cadenas de hidrocarburos, pero preferiblemente los polímeros son polisacáridos, y más preferiblemente polisacáridos con grupos cargados. Ejemplos de polímeros adecuados son la heparina, el sulfato de condroitina, el chitosán y el hialuronán.

ES 2 292 060 T3

Como se revela aquí, el término “filamentos finos de aceptación farmacéutica” tiene que ver con fibras delgadas que pueden ser empleadas en suturas, preferiblemente en suturas oftálmicas. Para propósitos de la presente invención, las longitudes de las fibras no deben exceder 15 mm, y están típicamente dentro del rango 1 a 10 mm.

5 Como se revela aquí, el término “proteína de relleno” se relaciona con una proteína que es opcionalmente adicionada a la composición bioadhesiva para obtener una composición bioadhesiva que se adapte a aplicaciones especiales. Proteínas de relleno adecuadas de acuerdo a la presente invención son colágeno, caseína, albúmina, elastina, fibrina y fibronectina.

10 Por el término “agente enzimático oxidante” se significa una enzima que tiene la habilidad de oxidar la MAP para promover entrecruzamiento completo o parcial de la MAP y/o polímeros y/o proteínas de relleno. Ejemplos de tales enzimas, de acuerdo al estado del arte, incluyen la catecol oxidasa y la tirosinasa. Una composición acorde a la presente invención no incluye un agente enzimático oxidante. Por el término “agente oxidante no enzimático” se significa un agente oxidante de aceptación farmacéutica el cual, a la dosis empleada, no es tóxico ni irritante. Ejemplos de tales agentes oxidantes no enzimáticos son el peróxido de hidrógeno y el nitroprusiato de sodio.

Por el término “agente químico de entrecruzamiento” se significa un compuesto que incluye al menos dos grupos funcionales que son capaces de acoplarse covalentemente a la MAP y/o polímeros y/o proteínas de relleno. Ejemplos de tales compuestos de acuerdo al estado del arte incluyen glutaraldehído, formaldehído, bis(sulfosuccinimido) suberato y 3,3'-ditiobis (sulfosuccinimidilpropionato). Una composición acorde a la presente invención no incluye ningún agente químico de entrecruzamiento.

Una composición acorde a la presente invención incluye tres componentes indispensables, estos son: a) una proteína polifenólica bioadhesiva, b) un polímero que incluya grupos carbohidrato y c) filamentos finos de aceptación farmacéutica. Se prefiere que la composición se suministre como un juego de diferentes partes donde los anteriores componentes indispensables (a) y (b) se suministren en preparaciones separadas. Estas preparaciones se mezclan inmediatamente antes de su utilización. En la composición completa las siguientes concentraciones se han encontrado útiles:

30	Componente	Concentración (mg/ml)
	proteína fenólica (un componente)	0,1 - 50, preferiblemente 0,3 - 10
	polímero con grupos carbohidrato	0,1 - 50, preferiblemente 0,3 - 30
35	filamentos finos de aceptación farmacéutica	0,5 - 40, preferiblemente 1 - 20

Se puede incluir opcionalmente un agente oxidante no enzimático. Uno de éstos agentes es el peróxido de hidrógeno que se puede incluir típicamente en cantidades de 1 - 100 mg/ml, preferiblemente alrededor de 10 mg/ml que corresponde al 1% (p/v). Otros tales agentes son los iones nitroprusiato y los iones peryodato. Los peryodatos, tales como el peryodato de sodio, se incluyen típicamente en concentraciones de 2 mM basadas en la composición final.

En el caso en que la composición sea suministrada como un juego de diferentes partes, cada componente se suministra en la misma o superior concentración, pero los anteriores rangos de concentración se obtendrán mezclando las preparaciones de los componentes entre sí para preparar la composición final.

La presente invención a continuación se describirá más en el siguiente ejemplo que no es limitante.

50 Ejemplo

A una MAP purificada (0,81 mg/ml, BioPolymer Products AB) en ácido láctico 1% se le ajustó el pH a 7,5 - 9,5. La heparina y los productos químicos de laboratorio eran de la más alta calidad disponible y se compraron a Sigma y Merck. Se compraron suturas oftálmicas (10-0) de Ethicon, se cortaron en pequeños trozos de longitudes entre 1 y 10 mm y eventualmente se adicionaron a la solución de MAP. Los experimentos fueron realizados en ratas anestesiadas de acuerdo a las reglas especificadas por los permisos éticos.

A la córnea se le retiró el epitelio. La córnea fue cuidadosamente pinchada en el centro con la ayuda de un trépano de un diámetro de 3 mm. El cilindro de tejido se hizo reaccionar lentamente hasta al menos la mitad de su espesor de la córnea original bajo el microscopio con ayuda de instrumentos de punta fina. Se hicieron dos pequeñas marcas en la periferia del conector de córnea central. Una solución, preparada inmediatamente antes de su uso, de 20 µl de una solución de MAP, 10 µl de una solución acuosa de heparina, suturas oftálmicas (10 mg/ml de la composición final) y 10 µl de una solución acuosa al 6% (p/v) de peróxido de hidrógeno, fue aplicada varias veces a lo largo del borde entre el conector y el resto de la córnea. Se reposicionó entonces el conector de la córnea y se ajustó cuidadosamente en su lugar. La adhesión se logró entre el conector central y la parte periférica de la córnea original luego de 5 - 10 minutos tal como se comprobó experimentalmente con la ayuda de instrumentos de microcirugía oftálmica utilizando un microscopio de operación.

ES 2 292 060 T3

Se realizaron inspecciones visuales y microscópicas durante las siguientes tres horas. Hubo buena adhesión entre el conector central de la córnea y el resto de la córnea. Los pequeños defectos en la zona de interfase fueron rellenados por el pegante con sus filamentos.

- 5 Los resultados obtenidos indican de ésta manera que la MAP junto con la heparina, un agente oxidante y filamentos muy finos pueden ser empleados para pegar en forma segura un conector córneo en su lugar de cirugía y para llenar los defectos de puente en el tejido.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una composición bioadhesiva que incluye

- 5 a) una proteína polifenólica bioadhesiva derivada de un mejillones formadores de filamento, la cual incluye 30 - 300 aminoácidos y que consiste esencialmente de repeticiones peptídicas en tándem constituidas por residuos de 3 a 15 aminoácidos donde al menos el 5%, preferiblemente entre el 6 y el 25% de los residuos aminoácidos de dicha proteína polifenólica bioadhesiva corresponden a DOPA;
- 10 b) Un polímero que incluye grupos carbohidrato tales como heparina, sulfato de chondroitin, chitosan y hialuronan;
- 15 c) filamentos finos de aceptación farmacéutica los cuales son fibras delgadas adecuadas para ser utilizadas en suturas oftálmicas, donde la longitud de las fibras no supera los 15 mm;
- d) opcionalmente, un agente oxidante no enzimático tal como el peróxido de hidrógeno, iones nitroprusiato o iones peryodato; y opcionalmente
- 20 e) una proteína de relleno tal como colágeno, caseína, albúmina, elastina, fibronectina y fibrina;

esta composición no incluye ningún agente oxidante enzimático o agente químico de entrecruzamiento.

2. Una composición bioadhesiva acorde a la reivindicación 1 para uso médico.

25 3. El uso de una composición acorde a la reivindicación 1 para la preparación de un adhesivo oftálmico que puede ser utilizado para curar perforaciones, laceraciones o incisiones, para pegar la retina a la parte posterior del ojo, para reparar o pegar el cristalino y para reparar, construir, reconstruir y/o pegar componentes córneos.