



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 308 061**

51 Int. Cl.:

A61P 9/10 (2006.01)

A61K 38/38 (2006.01)

A61K 38/41 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04008419 .6**

96 Fecha de presentación : **07.04.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1466649**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.10.2004**

54 Título: **Composición farmacéutica que contiene un vehículo artificial de oxígeno.**

30 Prioridad: **08.04.2003 JP 2003-103875**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

73 Titular/es: **Nipro Corporation**
9-3, Honjo-nishi 3-chome
Kita-ku, Osaka-shi, Osaka-fu, 531-8510, JP

72 Inventor/es: **Kai, Toshiya;**
Katayama, Naohisa;
Azuma, Yuko;
Yokoe, Junichi;
Kida, Yoshinori;
Hukutomi, Ippei;
Sato, Makoto;
Tsuchida, Eishun;
Takeoka, Shinji;
Komatsu, Teruyuki;
Sakai, Hiromi y
So, Keitaro

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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

Composición farmacéutica que contiene un vehículo artificial de oxígeno.

5 Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene un vehículo artificial de oxígeno capaz de adsorber y desorber oxígeno de manera reversible en un organismo vivo.

10 Más específicamente, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que se utiliza en los campos médicos para suministrar oxígeno a un sitio isquémico o un tejido tumoral o para infusión de sangre a un paciente que sufre una hemorragia masiva, o se utiliza como una solución de perfusión para almacenamiento de órganos, como una solución de circulación extracorpórea, o como una solución de cultivo de células; tiene una alta eficiencia de transporte de oxígeno; tiene una presión osmótica de coloides requerida, una presión osmótica de cristaloideos, pH, y balance electrolítico apropiados; y contiene un complejo metálico que tiene una estructura de porfirina.

Antecedentes de la invención

20 Es sabido que una proteína plasmática, que es un coloide plasmático, juega un papel importante en el mantenimiento de la cantidad de sangre en los vasos sanguíneos de un organismo vivo. Por esta razón, hasta ahora, se han aplicado técnicas para reemplazamiento de fluidos con un expansor de plasma que tiene una presión osmótica de coloides aproximadamente igual a la de la sangre de un organismo vivo para la recuperación del choque hemorrágico de un paciente. Sin embargo, en el caso en que un paciente sangra en una cantidad de 30% o más de la sangre circulante, se proporciona insuficiente oxígeno a los tejidos periféricos, por lo que el paciente requiere administración de un vehículo de oxígeno además de un expansor de plasma.

30 Convencionalmente, se ha utilizado sangre natural que contienen eritrocitos naturales o una solución concentrada de eritrocitos se ha utilizado como un vehículo de oxígeno de este tipo. Sin embargo, con objeto de evitar la coagulación sanguínea causada por la reacción antígeno-anticuerpo, se requiere que el tipo de sangre de un donante coincida con el de un receptor y se realice una compatibilidad cruzada durante su empleo. Adicionalmente, el periodo de almacenamiento eficaz de dicha sangre natural o solución concentrada de eritrocitos es tan breve como 3 semanas (4°C). La sangre congelada capaz de almacenamiento a largo plazo presenta problemas tales como su elevado coste y la aparición de hemólisis por choque de presión osmótica cuando se utiliza. Además, la existencia de enfermedades infecciosas tales como hepatitis y el síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida constituía también un problema.

35 Con objeto de resolver los problemas arriba mencionados, se han descrito ya los estudios siguientes: un estudio sobre un vehículo artificial de oxígeno compuesto de una emulsión de fluorocarbonos (JP 60-33367); un estudio sobre un sustituto de sangre para prolongar el tiempo de retención de la hemoglobina (tal como hemoglobina humana, hemoglobina bovina, y hemoglobina recombinante, abreviada en lo sucesivo como Hb), que es una hemo-proteína que tiene funciones de adsorción y desorción de oxígeno reversiblemente y de disociación, en la sangre circulante por fijación de polietilenglicol (abreviado en lo sucesivo como PEG) o análogos a la hemoglobina para modificación (JP 2-6337); o análogos.

40 Sin embargo, la capacidad de transporte de oxígeno del vehículo artificial de oxígeno compuesto de una emulsión de fluorocarbonos depende de un fenómeno físico de disociación de oxígeno en el fluorocarbono. Por esta razón, la capacidad de transporte de oxígeno es insuficiente. Un sustituto de sangre en el cual Hb está fijada a PEG o análogos ha representado también un problema de tiempo insuficiente de retención de la hemoglobina.

45 El desarrollo de una infusión de oxígeno que utilice Hb tal como Hb intramolecular de reticulación, Hb fijada aun polímero soluble en agua, o Hb de polimerización intermolecular de reticulación ha sido sugerido. Sin embargo, se ha encontrado que la infusión de oxígeno presenta varios efectos secundarios causados por la estructura no celular.

50 Las razones de que Hb esté encapsulada naturalmente en la membrana de los eritrocitos se muestran en los párrafos siguientes:

55 1) permitir el control de una presión osmótica de coloides por estar encapsulada por la membrana de los eritrocitos, debido a que la presión osmótica de coloides de una solución de Hb excede de un valor fisiológico cuando la concentración de Hb es 5% o más;

60 2) suprimir los efectos secundarios por la encapsulación de hemoglobina que tiene actividad fisiológica elevada en la membrana;

3) retener diversos compuestos de fosfato o un sistema glicólisis/reductasa para mantener las funciones de Hb tales como la afinidad para el oxígeno y estabilidad de un complejo de oxígeno en el mismo sistema; y

65 4) presentar la ventaja de que un sistema dispersado de hemocitos, que es un fluido no newtoniano, exhibe una función fisiológica por formar un flujo distintivo cuando el mismo circula en el cuerpo (particularmente en los vasos sanguíneos periféricos).

Considerando tales funciones primarias de la estructura de los eritrocitos, está claro que un sistema de dispersión que contenga partículas formadas por encapsulación de Hb en una cápsula es adecuado como la infusión de oxígeno.

Por otra parte, se ha descubierto que un fosfolípido que es un componente biológico forma una estructura vesicular independientemente, y muchas instituciones han realizado estudios sobre una vesícula de hemoglobina desde que Djordjevich y Miller iniciaron investigaciones acerca de una vesícula de hemoglobina utilizando un liposoma compuesto de fosfolípido/colesterol/ácido graso. El uso de la vesícula de hemoglobina presenta ventajas en el sentido de que 1) puede utilizarse hemoglobina natural sin tratamiento, 2) los efectos secundarios causados por la hemoglobina pueden suprimirse, 3) la viscosidad, presión osmótica de coloides, o afinidad para el oxígeno pueden ajustarse a un valor arbitrario, y 4) el tiempo de retención de la sangre en el cuerpo puede prolongarse.

Se han realizado diversas investigaciones para una hemoglobina encapsulada en liposoma en el cual la hemoglobina está encapsulada dentro de la capa de un liposoma compuesto de una membrana lipídica bicapa (JP 52/152718, JP 58-183625, y JP 61-37735). Sin embargo, una suspensión de hemoglobina encapsulada en liposoma de este tipo tiene una presión osmótica de coloides extremadamente baja, por lo que no puede esperarse el efecto del mantenimiento o aumento de la cantidad de sangre circulante aun cuando la suspensión se administre al vaso sanguíneo de un organismo vivo.

Como alternativas para resolver los defectos arriba mencionados, se ha descrito sangre artificial que tiene a la vez una capacidad de transporte de oxígeno y un efecto expansor del plasma, que se forma por suspensión de hemoglobina encapsulada en liposoma en una solución acuosa de un expansor de plasma (US 4.133.874 y JP 4-5242).

Sin embargo, para la sangre artificial descrita en US 4133874, la hemoglobina encapsulada en liposoma tiende a agregarse en la solución acuosa del expansor de plasma. Por esta razón, la viscosidad de la suspensión se hace alta, de tal modo que la suspensión presenta dificultad para la administración intravenosa y por consiguiente existe el riesgo de que el liposoma se agregue causando embolización en un vaso sanguíneo.

Con objeto de suprimir una interacción entre una vesícula de hemoglobina y una proteína en la sangre, la sangre artificial descrita en JP 4-5242 suprime una interacción entre una vesícula de hemoglobina y un expansor de plasma por utilización de un vehículo de oxígeno en el cual PEG está fijado a la superficie de la vesícula de hemoglobina (es decir, fosfolípido) (JP 2-149512 o JP 3-218309).

Sin embargo, es sabido que cuando un polímero soluble en agua tal como PEG (sinónimo con polioxietileno) se fija a un diacil-fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina que es un componente principal de la membrana celular de un organismo vivo en general, el diacil-fosfolípido fijado al polímero soluble en agua se desorbe de una vesícula de membrana bicapa de fosfolípido (J.R. Silvius y M.J. Zuckermann. *Biochemistry*, 32, 3153, 1993 y JP 2001-64383, párrafo 004).

Una composición farmacéutica que contiene el vehículo artificial de oxígeno arriba mencionado presentaba los problemas siguientes: la administración de la composición a un organismo vivo sin proporcionar una presión osmótica de coloides causa un síntoma de choque. Además, en el caso en que el balance de electrolitos difiere de un balance de electrolitos fisiológico, se produce hemólisis o angitis debida a la angialgia cuando la composición farmacéutica se administra al organismo vivo o a una diferencia entre las presiones osmóticas de cristaloides. Adicionalmente, cuando el pH de la infusión artificial de oxígeno es mayor que el pH fisiológico, se causa fácilmente alcalosis, mientras que cuando el pH de una infusión artificial de oxígeno es menor que el pH fisiológico, se causa fácilmente acidosis.

Sumario de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que tiene una eficiencia elevada de transporte de oxígeno; y tiene una presión osmótica de coloides requerida y una presión osmótica de cristaloides, pH, y balance de electrolitos apropiados.

Los autores de la presente invención han realizado un estudio extenso para conseguir el objeto arriba mencionado. Como resultado, los autores de la presente invención han encontrado que el objeto puede conseguirse por una composición farmacéutica caracterizada porque comprende:

(i) un conjugado de

(a) un complejo metálico que tiene una estructura de porfirina y

(b) una albúmina, y

(ii) un electrolito,

que comprende opcionalmente además como mínimo una sustancia seleccionada del grupo constituido por un compuesto capaz de proporcionar una presión osmótica de coloides, un sacárido, un aminoácido, un antioxidante, un ajustador de pH, y un agente isotonizante, y que comprende además opcionalmente una hemoglobina encapsulada en liposoma en la cual la hemoglobina está encapsulada en un liposoma, y se ha completado la presente invención.

Adicionalmente, los autores de la presente invención han concentrado su atención en el hecho de que una solución de una preparación que incluye un conjugado de un complejo metálico que tiene una estructura de porfirina y albúmina tiene una presión osmótica de coloides, que se incorpora en la presente invención.

Es decir, la presente invención se refiere a los puntos siguientes:

(1) una composición farmacéutica caracterizada porque comprende

(i) un conjugado de

(a) un complejo metálico que tiene una estructura de porfirina y

(b) una albúmina, y

(ii) un electrólito;

(2) La composición farmacéutica de acuerdo con el punto 1, en donde el complejo metálico es un complejo de hierro (II);

(3) una composición farmacéutica de acuerdo con el punto 1 ó 2, en donde la albúmina se selecciona de plasma humano, seroalbúmina humana, proteína de plasma humano calentada, seroalbúmina humana recombinante, seroalbúmina derivada de animales y seroalbúmina derivada de animales recombinante;

(4) una composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 3, en donde el electrólito se selecciona del grupo constituido por sales de sodio que comprenden cloruro de sodio, hidrogenocarbonato de sodio, citrato de sodio y lactato de sodio, sales de potasio que comprenden cloruro de potasio, acetato de potasio, gluconato de potasio, hidrogenocarbonato de potasio, glicerofosfato de potasio, sulfato de potasio, lactato de potasio, yoduro de potasio, dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato dipotásico, citrato de potasio, una sal potásica de aminoácido, propionato de potasio, y β -hidroxibutirato de potasio, sales de calcio que comprenden cloruro de calcio, gluconato de calcio, lactato de calcio, glicerofosfita de calcio, pantotenato de calcio, y acetato de calcio, sales de magnesio que comprenden cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, glicerofosfato de magnesio, acetato de magnesio, lactato de magnesio, y una sal magnésica de aminoácido, sales de amonio que comprenden cloruro de amonio, sales de cinc que comprenden sulfato de cinc, cloruro de cinc, gluconato de cinc, lactato de cinc, y acetato de cinc, sales de hierro que comprenden sulfato de hierro, cloruro de hierro, y gluconato de hierro, sales de cobre que comprenden sulfato de cobre, y sales de manganeso que comprenden sulfato de manganeso;

(5) una composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 4 que comprende adicionalmente al menos una sustancia seleccionada del grupo constituido por:

un compuesto capaz de proporcionar una presión osmótica de coloides que incluye un dextrano, un derivado de dextrano, hidroxietil-almidón, hidroxipropil-almidón, gelatina, PEG, polivinil-pirrolidona, carboximetilcelulosa, goma arábiga, glucosa, y una dextrosa;

un sacárido;

un aminoácido;

un antioxidante que incluye ácido ascórbico, ácido eritórlico, tioglicerol, α -tioglicerina, citrato de isopropilo, 1,3-butilenglicol, un sulfito de aminoácido, butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), galato de propilo, palmitato de ascorbilo, vitamina E y derivados de la misma, guayaco, ácido nordihidroguayarático (NDGA), ésteres L-ascorbato-estearato, lecitina de soja, ácido palmítico, ácido ascórbico, benzotriazol, y penta-eritritil-tetraquis[3-(3,5-di-t-butil-4-hidroxifenil)-propionato]2-mercaptopbencimidazol;

un ajustador de pH;

y un agente isotonzante que incluye ácido aminoetilsulfónico, cloruro de benzalconio, sacáridos, alcoholes-azúcar, ácido cítrico, nicotinamida, propilenglicol, alcohol bencílico, bórax, ácido fosfórico, y macrogol 4000;

(6) una composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 5 que comprende adicionalmente una hemoglobina encapsulada en liposoma;

(7) la composición farmacéutica de acuerdo con el punto 6, en donde el liposoma contiene un conjugado de un lípido no fosfolípido y un polialquilenglicol;

(8) la composición farmacéutica de acuerdo con el punto 6 ó 7, en donde la hemoglobina es una hemoglobina recombinante;

(9) la composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 8, en donde la composición es un líquido que tiene una presión osmótica de coloides de aproximadamente 1 a 50 mmHg, una presión osmótica de cristaloides de aproximadamente 50 a 500 mOsm, P50 de aproximadamente 1 a 50 Torr, y un pH de aproximadamente 5,6 a 8,0;

(10) la composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1) a (9), en donde la composición se utiliza para infusión de sangre cuando se produce una hemorragia; y

(11) la composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1) a (9), en la cual la composición se utiliza en una solución de perfusión para almacenamiento de órganos, una solución de circulación extracorpórea, o una solución de cultivo de células.

Breve descripción de los dibujos

Fig. de referencia 1. Un gráfico que muestra el efecto de mejora de acuerdo con el Ejemplo Experimental de Referencia 1 sobre la disminución de la presión sanguínea.

Fig. de referencia 2. Un gráfico que muestra el efecto de mejora de acuerdo con el Ejemplo Experimental de Referencia 1 sobre el aumento de la presión parcial de oxígeno en la sangre arterial.

Fig. de referencia 3. Un gráfico que muestra el efecto de mejora de acuerdo con el Ejemplo Experimental de Referencia 1 sobre el nivel de ácido láctico.

Fig. 4. Un gráfico que muestra el efecto de mejora de la presente invención sobre la disminución de la presión sanguínea.

Fig. 5. Un gráfico que muestra el efecto de mejora de la presente invención sobre la disminución de la presión parcial de oxígeno en sangre venosa.

Descripción detallada de la invención

Una composición farmacéutica de la presente invención incluye una composición que tiene forma líquida, sólida, o de gel. Entre ellas, se prefiere una composición que tiene forma líquida.

Ejemplos específicos del vehículo artificial de oxígeno incluyen un conjugado de un complejo metálico que tiene una estructura de porfirina y albúmina, o una mezcla o conjugado con una hemoglobina encapsulada en liposoma.

El complejo metálico que tiene estructura de porfirina se refiere a un complejo metálico en el cual un metal central está coordinado con un anillo de porfirina e incluye todos los compuestos que tienen una capacidad reversible de fijación de oxígeno. El metal central del complejo metálico es preferiblemente hierro, cobalto, o cromo; más preferiblemente, hierro (II) o cobalto (II).

La hemoglobina encapsulada en liposoma (abreviada en lo sucesivo como HbV) hace referencia a un compuesto en el cual la hemoglobina está encapsulada en un liposoma.

El término Aliposome® hace referencia típicamente a una vesícula cerrada que está formada por lípidos acumulados membranosamente (sic) y una fase acuosa en el interior de la misma. Sin embargo, en la presente invención, el término se refiere particularmente a todas las partículas finas formadas por lípidos acumulados con indiferencia de si el liposoma tiene la fase acuosa en su interior. Entretanto, la estructura del liposoma de la presente invención no está limitada tampoco particularmente, si no que puede ser un liposoma multicapa o un liposoma monocapa.

El tamaño del liposoma de la presente invención no está limitado particularmente, pero el liposoma puede tener un tamaño de partícula medio volumétrico de aproximadamente 10 a 5.000 nm, con preferencia aproximadamente 30 a 500 nm. El tamaño de partícula medio volumétrico del liposoma puede determinarse basándose en un principio tal como un principio de dispersión dinámica de la luz.

El lípido formador del liposoma de la presente invención no está limitado particularmente, y puede ser un lípido conocido. Ejemplos del lípido incluyen un glicolípido, esteroides, un ácido graso, un fosfolípido, un derivado de alquil-aminoácido anfipático, un dialquildimetilamonio, un poliglicerol-alkil-éter, un polioxi-etileno-alkiléter, o análogos (Liposome Technology, 2ª edición, vol. 1, 141, 1993), un copolímero de bloques anfipático tal como un copolímero de bloques polioxi-etileno-ácido poliláctico (JP 6-508831B), alquilaminas de cadena larga (tales como tetradecilamina, hexadecilamina, y estearilamina), e hidrazidas de ácidos grasos de cadena larga (tales como miristato de hidrazida, palmitato de hidrazida, y estearato de hidrazida).

Ejemplos del glicolípido incluyen un gliceroglicolípido y un esfingoglicolípido. Ejemplos de glicolípidos incluyen digalactosil-diglicéridos (tales como digalactosil-dilauril-glicérido, digalactosil-dimiristoil-glicérido, digalactosil-dipalmitoil-glicérido, y digalactosil-diestearoil-glicérido) y galactosil-diglicéridos (tales como galactosil-dilauril-glicérido, galactosil-dimiristoil-glicérido, galactosil-dipalmitoil-glicérido, y galactosil-diestearoil-glicérido). Ejemplos del esfingoglicolípido incluyen galactosil-cerebrósido, lactosil-cerebrósido, y gangliósido.

Ejemplos de los esteroides incluyen colesterol, colesterol-hemisuccinato, 3β -[N-(N=N-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol, ergosterol, y lanosterol.

En la presente invención, dichos lípidos pueden utilizarse aisladamente o en combinación de dos o más de los mismos.

Ejemplos del fosfolípido incluyen fosfolípidos naturales o sintéticos tales como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, ácido fosfatídico, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, lisofosfatidilcolina, esfingomielina, lecitina de yema de huevo, lecitina de soja, y un fosfolípido hidrogenado.

El liposoma de la presente invención está compuesto de modo particularmente preferible de un conjugado formado por unión de un lípido no fosfolipídico a un polialquilenglicol.

El polialquilenglicol es preferiblemente un compuesto que tiene una cadena alquileo con aproximadamente 2 a 6 átomos de carbono. Además, la cadena alquileo puede estar sustituida con un sustituyente, que no es perjudicial para la presente invención, tal como un grupo hidroxilo, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo alcoxi. Específicamente, pueden utilizarse por ejemplo PEG y polipropilenglicol. Entre ellos, puede utilizarse preferiblemente PEG. El peso molecular del polialquilenglicol a utilizar puede ser un peso molecular medio numérico de aproximadamente 200 a 4.000.000, con preferencia aproximadamente 1000 a 50.000. De modo particularmente preferible, PEG tiene el peso molecular mencionado anteriormente cuando se utiliza PEG.

En la presente invención, el contenido de polialquilenglicol es con preferencia aproximadamente 0,1 a 30% molar con relación a la cantidad total de lípidos que componen un liposoma.

La hemoglobina a utilizar en la presente invención puede incluir hemoglobina derivada de diversos organismos vivos y hemoglobina recombinante. Se prefiere la hemoglobina recombinante.

Ejemplos del conjugado de un complejo metálico que tiene una estructura de porfirina y albúmina incluyen una infusión de oxígeno en la cual un derivado de tetrafenilporfirina-hierro tal como 2-[8-{N-(2-metilimidazolil)}-octanoiloximetil]-5,10,15,20-tetraquis($\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$ -o-pivaloilamino)fenilporfinato-hierro (II) está incluido en una bolsa hidrófoba de albúmina humana o albúmina recombinante (a la que se hace referencia como albúmina-hemo (E. Tsuchida, *et al.*, Bioconjugate Chemistry, vol. 8, 534-538, 1997).

Ejemplos del complejo metálico que tiene una estructura de porfirina a utilizar en la presente invención incluyen tetrafenilporfirina, protoporfirina, octaalquil-porfirina, y derivados de los mismos. Se prefiere un derivado de protoporfirina.

Ejemplos de la albúmina a utilizar en la presente invención incluyen seroalbúmina humana, seroalbúmina derivada de animales, seroalbúmina recombinante derivada de animales, seroalbúmina recombinante humana (rHSA), y multímeros de las mismas. Desde los puntos de vista de la predicción de infecciones o análogos, es particularmente preferible rHSA.

En la presente invención, el término AP50@ hace referencia a una presión parcial de oxígeno en el caso en que la tasa de fijación de hemoglobina a oxígeno es 50%. El ajuste de P50 a 1 hasta 50 Torr puede producir un vehículo de oxígeno que tenga una capacidad normal de adsorción y desorción de oxígeno en un organismo vivo.

Cuando la composición farmacéutica de la presente invención no contiene compuesto alguno capaz de proporcionar una presión osmótica de coloides, la presión osmótica de coloides es aproximadamente 0 mmHg, mientras que cuando la composición farmacéutica de la presente invención contiene un compuesto capaz de proporcionar una presión osmótica de coloides (con inclusión de un conjugado de un complejo metálico que tiene una estructura de porfirina y una proteína), los efectos adversos sobre un organismo vivo pueden prevenirse por ajuste de la presión osmótica de coloides a aproximadamente 1 hasta 50 mmHg. Adicionalmente, la composición farmacéutica de la presente invención tiene una presión osmótica de cristaloides de aproximadamente 50 a 5.000 mOsm, con preferencia aproximadamente 50 a 500 mOsm. Además, la composición farmacéutica de la presente invención tiene preferiblemente un pH de aproximadamente 5,6 a 8,0.

El compuesto capaz de proporcionar una presión osmótica de coloides de la presente invención puede incluir diversos polímeros a utilizar para propósitos medicinales con tal que el mismo tenga una presión osmótica de coloides. Ejemplos del compuesto incluyen un dextrano (v.g., un dextrano de peso molecular bajo), un derivado de dextrano (v.g., carboximetil-dextrano, carboxidextrano, dextrano catiónico, y sulfato de dextrano), hidroxietil-almidón, hidroxipropil-almidón, gelatina (v.g. gelatina modificada), albúmina (v.g., plasma humano, seroalbúmina humana, proteína plasmática humana calentada, y seroalbúmina humana recombinante), PEG, polivinil-pirrolidona, carboximetilcelu-

losa, goma arábica, glucosa, una dextrosa (v.g., monohidrato de glucosa), oligosacáridos (v.g., oligosacárido), un producto de degradación de polisacárido, un aminoácido, y un producto de degradación de proteínas. Entre los mismos, son particularmente preferibles dextrano de peso molecular bajo, hidroxietil-almidón, gelatina modificada, y albúmina recombinante.

5

El electrólito a utilizar en la presente invención incluye típicamente diversos electrólitos a utilizar para propósitos medicinales. Ejemplos del electrólito incluyen sales de sodio (v.g., cloruro de sodio, hidrogenocarbonato de sodio, citrato de sodio, lactato de sodio, sulfato de sodio, dihidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato disódico, acetato de sodio, glicerofosfato de sodio, carbonato de sodio, una sal de sodio de aminoácidos, propionato de sodio, β -hidroxibutirato de sodio, y gluconato de sodio), sales de potasio (v.g., cloruro de potasio, acetato de potasio, gluconato de potasio, hidrogenocarbonato de potasio, glicerofosfato de potasio, sulfato de potasio, lactato de potasio, yoduro de potasio, dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato dipotásico, citrato de potasio, una sal potásica de aminoácido, propionato de potasio, y β -hidroxibutirato de potasio), sales de calcio (v.g. cloruro de calcio, gluconato de calcio, lactato de calcio, glicerofosfato de calcio, pantotenato de calcio, y acetato de calcio), sales de magnesio (v.g. cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, glicerofosfato de magnesio, acetato de magnesio, lactato de magnesio, y una sal magnésica de aminoácido, sales de amonio (v.g. cloruro de amonio), sales de cinc (v.g. sulfato de cinc, cloruro de cinc, gluconato de cinc, lactato de cinc, y acetato de cinc), sales de hierro (v.g. sulfato de hierro, cloruro de hierro, y gluconato de hierro), sales de cobre (v.g. sulfato de cobre), y sales de manganeso (por ejemplo, sulfato de manganeso). Entre ellas, son particularmente preferibles cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato dipotásico, dihidrogenofosfato de potasio, lactato de sodio, acetato de sodio, citrato de sodio, acetato de potasio, glicerofosfato de potasio, gluconato de calcio, cloruro de calcio, sulfato de magnesio, y sulfato de cinc.

Los sacáridos a utilizar en la presente invención incluyen típicamente diversos sacáridos a utilizar para propósitos medicinales. Ejemplos de los sacáridos incluyen glucosa, fructosa, xilitol, sorbitol, manitol, dextrina, glicerina, sacarosa, trehalosa, glicerol, maltosa, lactosa y eritritol. Entre ellos, son particularmente preferibles glucosa, fructosa, xilitol, sorbitol, manitol, dextrina, glidina y sacarosa.

El aminoácido a utilizar en la presente invención incluye típicamente diversos aminoácidos a utilizar para propósitos medicinales, y sales de los mismos. Ejemplos de los mismos incluyen lisina, hidrocloreto de lisina, acetato de lisina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina, tirosina, metionina, cistina, cisteína, hidrocloreto de cisteína, malato de cisteína, homocisteína, isoleucina, leucina, fenilalanina, triptófano, valina, arginina, hidrocloreto de arginina, histidina, hidrocloreto de histidina, alanina, prolina, ácido aminoacético, y sales de los mismos. Entre ellos, son particularmente preferibles lisina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina, tirosina, metionina, cistina, cisteína, homocisteína, y ácido aminoacético.

El antioxidante a utilizar en la presente invención incluye típicamente diversos antioxidantes a utilizar para propósitos medicinales. Ejemplos del antioxidante incluyen hidrogenosulfito de sodio, sulfito de sodio, piro-sulfito de sodio (v.g., metabisulfito de sodio), ronalita ($\text{CH}_2\text{OHSO}_2\text{Na}$), ácido ascórbico, ascorbato de sodio, ácido eritórbito, eritorbato de sodio, cisteína, hidrocloreto de cisteína, homocisteína, glutatión, tioglicerol, α -tioglicerina, edetato de sodio, ácido cítrico, citrato de isopropilo, dicloroisocianurato de potasio, tioglicolato de sodio, piro-sulfito de sodio, 1,3-butilenglicol, etilenodiaminatetraacetato de disodio y calcio, etilenodiaminatetraacetato disódico, un sulfito de aminoácido (v.g. sulfito de L-lisina), butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), galato de propilo, palmitato de ascorbilo, vitamina E y derivados de la misma (v.g., dl- α -tocoferol, acetato de tocoferol, vitamina E natural, d- δ -tocoferol, tocoferol mixto, y trolox), guayaco, ácido nordihidroguayarático (NDGA), ésteres L-ascorbato-estearato, lecitina de soja, ácido palmítico, ácido ascórbico, benzotriazol, y pentaeritritil-tetraquis[3-(3,5-di-t-butil-4-hidroxifenil)propionato]-2-mercaptobencimidazol. Entre éstos, se prefieren hidrogenosulfito de sodio, sulfito de sodio, ácido ascórbico, homocisteína, dl- α -tocoferol, acetato de tocoferol, glutatión, y trolox.

El ajustador de pH a utilizar en la presente invención incluye típicamente diversos ajustadores de pH a utilizar para propósitos medicinales. Ejemplos de ajustadores de pH ácidos incluyen ácido adípico, caseinato de sodio, ácido clorhídrico, ácido clorhídrico diluido, ácido sulfúrico, sulfato aluminopotasico, ácido cítrico, dihidrogeno-citrato de sodio, glicina, glucono- δ -lactona, ácido glucónico, gluconato de sodio, dihidrogenofosfato de sodio cristalino, ácido succínico, ácido acético, acetato de amonio, ácido tartárico, ácido D-tartárico, ácido láctico, ácido acético glacial, fumarato monosódico, propionato de sodio, ácido bórico, borato de amonio, ácido maleico, ácido malónico, ácido málico, fosfato disódico anhidro, ácido metanosulfónico, ácido fosfórico, y dihidrogenofosfatos (v.g., dihidrogenofosfato de potasio y dihidrogenofosfato de sodio). Entre ellos, se prefieren ácido clorhídrico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido acético, ácido láctico, ácido acético glacial, ácido fosfórico, dihidrogenofosfato de potasio, y dihidrogenofosfato de sodio.

60

Ejemplos de ajustadores de pH alcalinos incluyen amoníaco acuoso, carbonato de sodio seco, citrato de sodio, acetato de sodio, diisopropanolamina, L-tartrato de sodio, lactatos (v.g., lactato de calcio y lactato de sodio), bórax, maleato de sodio, malonato de sodio, malato de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, hidróxido de sodio, hidróxido de magnesio, hidrogenocarbonato de sodio, carbonato de sodio, triisopropanolamina, monoetanolamina, trietanolamina, acetato de sodio anhidro, monohidrogenofosfato de sodio anhidro, meglumina, fosfatos (v.g., fosfato trisódico), sales de sodio de barbital, e hidrogenofosfatos (v.g., hidrogenofosfato disódico e hidrogenofosfato dipotásico). Entre ellos, son particularmente preferibles acetato de sodio, hidróxido de sodio, hidrogenocarbonato de sodio, carbonato de sodio, fosfato trisódico, hidrogenofosfato disódico e hidrogenofosfato dipotásico.

65

El pH de la composición farmacéutica de la presente invención puede ajustarse por borboteo de dióxido de carbono gaseoso.

El agente isotonzante a utilizar en la presente invención incluye típicamente diversos agentes isotonzantes a utilizar para propósitos medicinales. Ejemplos del agente isotonzante incluyen ácido aminoetilsulfónico, hidrogenosulfato de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, cloruro de sodio, cloruro de benzalconio, cloruro de magnesio, sacáridos (v.g., lactosa, glicerina concentrada, glucosa, fructosa, xilitol, y glicerina), alcoholes-azúcar (v.g., D-sorbitol y D-manitol), ácido cítrico, citrato de sodio, dihidrogenofosfato de sodio cristalino, bromuro de calcio, bromuro de sodio, hidróxido de sodio, solución salina fisiológica, tartrato de sodio dihidratado, hidrogenocarbonato de sodio, nicotinamida, soluciones de lactato de sodio, propilenglicol, alcohol bencílico, ácido bórico, bórax, pirofosfato de sodio anhidro, ácido fosfórico, hidrogenofosfato disódico, dihidrogenofosfato de potasio, dihidrogenofosfato de sodio, y Macrogol 4000. Entre ellos, son particularmente preferibles cloruro de potasio, cloruro de sodio, glicerina concentrada, hidrogenofosfato disódico, y dihidrogenofosfato de potasio.

El método de producción de la composición farmacéutica de la presente invención puede incluir diversos métodos conocidos.

El método de preparación de la hemoglobina encapsulada en liposoma puede ser cualquier método conocido tal como un método de evaporación en fase inversa, un método de extrusión a alta presión, y un método que utiliza un microfluidizador. Con objeto de prevenir la desnaturalización de la hemoglobina, la preparación de la hemoglobina encapsulada en liposoma se realiza preferiblemente a una temperatura baja de 10°C o inferior.

Adicionalmente, el método de preparación del conjugado de un complejo metálico que tiene una estructura de porfirina y una proteína puede seleccionarse entre diversos métodos conocidos. Ejemplos del método incluyen un método de preparación de una hemo-albúmina descrito en E. Tsuchida, *et al.*, Bioconjugate Chemistry, vol. 8, 534-538, 1997).

El liposoma a utilizar en la presente invención puede producirse de acuerdo con diversos métodos conocidos. Cuando se produce un liposoma que contiene un conjugado de un polialquilenglicol y un lípido, el polialquilenglicol se une típicamente al lípido por una molécula espaciadora. La molécula espaciadora no está limitada particularmente con tal que la misma pueda unirse a la vez a un polialquilenglicol y a un lípido. Ejemplos de la molécula espaciadora incluyen un aminoácido y ácido succínico. Un aminoácido particularmente preferido es un aminoácido trifuncional que tiene un solo grupo funcional reactivo en la parte del núcleo y tiene grupos funcionales reactivos en los dos terminales de las ramas respectivas. Ejemplos del aminoácido incluyen lisina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina, y tirosina. Entre ellos, es más preferible un aminoácido trifuncional que tenga un primer grupo funcional reactivo en la parte del núcleo y tenga el mismo segundo grupo funcional en los dos terminales ramificados respectivos (tal como lisina, glutamina, o asparagina que tiene un grupo carboxi terminal y dos grupos amino terminales; o tal como ácido aspártico o ácido glutámico que tiene un solo grupo amino terminal y dos grupos carboxilo terminales).

La hemoglobina a utilizar en la presente invención se prepara deseablemente por eliminación del estroma de un eritrocito humano, y el pH de una solución de hemoglobina se ajusta deseablemente a 7,0 hasta 7,5. Para ajuste del pH de la solución de hemoglobina, puede utilizarse una solución acuosa de hidróxido de sodio, carbonato de sodio o hidrogenocarbonato de sodio. El ajuste del pH puede realizarse también por adición de un tampón a la solución de hemoglobina. Ejemplos del tampón incluyen Tris, bis-Tris, HEPES y un tampón de fosfatos inorgánicos o análogos. La hemoglobina recombinante puede prepararse también de la misma manera que anteriormente.

La composición farmacéutica de la presente invención puede aplicarse en todos los campos en los que se requieren vehículos de oxígeno. Por ejemplo, la composición puede administrarse a un organismo vivo para suministrar oxígeno a un sitio de isquemia o un tejido tumoral o para infusión de sangre cuando se produce una hemorragia. Alternativamente, la composición puede utilizarse como una solución de perfusión para almacenamiento de órganos, como solución de circulación extracorpórea, o como una solución de cultivo de células.

Ejemplos

A continuación, la presente invención se describirá con mayor detalle mediante ejemplos.

Ejemplo de Referencia 1

Homocisteína (abreviada en lo sucesivo como Hcy) y aproximadamente una cantidad molar triple (con relación a Hb) de una solución de 5--fosfato (sic) de piridoxal (abreviado en lo sucesivo como PLP) (disolvente: una solución acuosa de NaOH) se añadieron a una solución de Hb ([Hb]: 40 g/dl). Subsiguientemente, se ajustó la mezcla a pH 7,4 y se agitó a 4°C durante una noche, y la mezcla resultante se filtró utilizando un filtro de 0,22 µm (concentraciones finales: Hb: 5,9 mmol/l; PLP: 17,3 mmol/l, y Hcy: 5 mmol/l). La Hb en el filtrado se combinó con monóxido de carbono por desaireación repetida y paso de CO gaseoso 3 veces a través del filtrado, para producir con ello una solución de Hb combinada con monóxido de carbono.

Entretanto, una mezcla de DPPC/colesterol/ácido 1,5-dipalmitoil-L-glutamato-N-succínico = 10/10/2 (relación molar) se pesó en una cantidad total de 20 g, y se disolvió en benceno. Subsiguientemente, se disolvió un conjugado en el cual PEG está unido a diestearil-glutaril-éster (abreviado en lo sucesivo como PEG-DSGE) en solución salina fisiológica a fin de tener una reacción de concentración PEG-DSGE de 0,3% molar con relación a la masa total de lípidos. La mixtura se mezcló y se liofilizó, para obtener de este modo un polvo mixto de lípidos en el cual los lípidos están dispersados uniformemente. El polvo mixto de lípidos se hidrató por adición del polvo a la solución de Hb combinada con monóxido de carbono en porciones a 4°C, seguido por agitación durante una noche. Subsiguientemente, se ajustó el diámetro medio del polvo a 0,22 μ m utilizando un extrusor (fabricado por LIPEX BIOMEMBRANES, INC.), para producir con ello una dispersión de HbV.

Se añadió una cantidad cuatro veces mayor de solución salina fisiológica a la dispersión de HbV, y se llevó a cabo ultrafiltración repetida varias veces (peso molecular: 1.000.000) utilizando un recipiente Pellicon (fabricado por Millipore Corporation) para separar Hb en la fase acuosa externa. En dicho momento, se confirmó que la fase acuosa externa se volvía transparente. Subsiguientemente, se ajustó la concentración de lípidos a 2,0 g/dl con solución salina fisiológica. Se añadió gota a gota una solución acuosa de PEG-DSGE en porciones a la dispersión de HbV. La mixtura se agitó y se mezcló en una atmósfera de CO durante 2 horas (37°C, 400 rpm) y se agitó y mezcló ulteriormente durante una noche a 4°C.

Una vez completada la agitación, se ajustó la concentración de Hb a 2,0 g/dl con solución salina fisiológica, y la mixtura se sometió luego a una corriente de oxígeno e irradiación con luz visible para desorción de CO de la Hb. La mixtura resultante se concentró por centrifugación, para obtener de este modo una capa de pelets de HbV en la capa inferior.

Se añadió solución salina tampón de fosfato (abreviada en lo sucesivo como PBS) a la capa de pelets de HbV, y se efectuó ultracentrifugación para lavado. Se disolvió seroalbúmina humana recombinante (abreviada en lo sucesivo como rHSA) en PBS a fin de tener una concentración de rHSA de 5%, y se añadió la solución a la capa inferior, para obtener de este modo 200 ml de solución de HbV ([Hb]: 10 g/dl, aproximadamente pH 7,4).

La solución resultante tenía una presión osmótica de coloides de aproximadamente 20 mmHg y una presión osmótica de cristaloides de aproximadamente 300 mOsm.

Se encontró además que la solución tenía un espectro de absorción máximo (banda Q) a aproximadamente 575 nm. Después de airear la dispersión con nitrógeno gaseoso, se encontró que la solución tenía un espectro de absorción máximo (banda Q) a aproximadamente 555 nm correspondiente al de una desoxihemoglobina, con lo que se confirmó que el oxígeno se adsorbía y desorbía de modo reversible. Adicionalmente, se aireó la desoxihemoglobina con un gas mixto que tenía presiones parciales de oxígeno diferentes gradualmente, para determinar la afinidad para el oxígeno a 37°C. Como resultado, se encontró que la solución tenía P50 de aproximadamente 32 Torr.

Ejemplo de Referencia 2

Hcy y una cantidad equimolar (con relación a Hb) de una solución de PLP (disolvente: una solución acuosa de NaOH) se añadieron a una solución de Hb ([Hb] = 40 g/dl). Subsiguientemente, se ajustó la mixtura a pH 7,4 y se agitó a 4°C durante una noche, y la mezcla resultante se filtró utilizando un filtro de 0,22 μ m (concentraciones finales: Hb: 5,9 mmol/l, PLP: 5,9 mmol/l, y Hcy: 5 mmol/l). La Hb en el filtrado se combinó con monóxido de carbono por desaireación repetida y paso de CO gaseoso 3 veces a través del filtrado, para producir con ello una solución de Hb combinada con monóxido de carbono.

Entretanto, una mezcla de dipalmitoilfosfatidilcolina (abreviada en lo sucesivo como DPPC)/colesterol/di-palmitoilfosfatidilglicerol (abreviado en lo sucesivo como DPPG) = 10/10/2 (relación molar) se pesó en una cantidad total de 20 g, y se disolvió en benceno. Subsiguientemente, se liofilizó la mezcla para producir con ello un polvo mixto de lípido en el cual los lípidos están dispersados uniformemente. El polvo lípido mixto se hidrató por adición del polvo a la solución de Hb combinada con monóxido de carbono por porciones a 4°C, seguido por agitación durante una noche. Subsiguientemente, se ajustó el diámetro del polvo a 0,22 μ m utilizando un extrusor (fabricado por LIPEX BIOMEMBRANES, INC.), para producir con ello una dispersión de HbV.

Se añadió una cantidad 4 veces mayor de solución salina fisiológica a la dispersión de HbV, y se repitió varias veces la ultrafiltración (peso molecular: 1.000.000) utilizando un recipiente Pellicon (fabricado por Millipore Corporation) para separar Hb, que no se había encapsulado en el retículo endoplasmático, en la fase acuosa externa. En dicho momento, se confirmó que la fase acuosa externa se volvía transparente. Subsiguientemente, se ajustó la concentración de lípidos a 2,0 g/dl con solución salina fisiológica. Por otra parte, se disolvió un conjugado formado por unión de PEG y diestearoilfosfatidiletanolamina por la vía de ácido succínico (PEG-DSPE) en solución salina fisiológica de tal modo que tuviera un contenido de PEG-DSPE de 0,3% molar con relación a la cantidad total de lípidos, a fin de preparar de este modo una solución acuosa PEG-DSPE. La solución acuosa PEG-DSPE se añadió gota a gota en porciones a la dispersión de HbV. La mezcla se agitó y se mezcló en una atmósfera de CO durante 2 horas (37°C, 400 rpm) y se agitó y mezcló ulteriormente durante una noche a 4°C.

ES 2 308 061 T3

Una vez completada la agitación, se ajustó la concentración de Hb a 2,0 g/dl con solución salina fisiológica, y la mezcla se sometió luego a una corriente de oxígeno e irradiación con luz visible para la desorción de CO de la Hb. La mixtura resultante se concentró por centrifugación, para producir de este modo una capa de pelets de HbV en la capa inferior.

Se añadió PBS a la capa de pelets de HbV, y se realizó ultracentrifugación para lavado. A continuación, se disolvió rHSA en PBS a fin de obtener una concentración de rHSA de 5%, y se añadió la solución a la capa inferior, a fin de obtener 200 ml de solución de HbV ([Hb]: 10 g/dl, aproximadamente pH 7,4).

La solución resultante tenía una presión osmótica de coloides de aproximadamente 20 mmHg y una presión osmótica de cristaloides de aproximadamente 300 mOsm.

Además, se encontró que la solución tenía un espectro de absorción máximo (banda Q) a aproximadamente 575 nm. Después de desairear la dispersión con nitrógeno gaseoso, se encontró que la solución tenía un espectro de absorción máximo (banda Q) a aproximadamente 555 nm, correspondiente al de la una desoxihemoglobina, con lo que se confirmó que el oxígeno se adsorbía y desorbía de modo reversible. Adicionalmente, se aireó la desoxihemoglobina con un gas mixto que tenía presiones parciales de oxígeno diferentes gradualmente para determinar la afinidad para el oxígeno a 37°C. Como resultado, se encontró que la solución tenía P50 de aproximadamente 18 Torr.

Ejemplo de Referencia 3

Se añadió una cantidad molar 3 veces mayor (con relación a Hb) de una solución de PLP (disolvente: una solución acuosa de NaOH) a una solución de Hb ([Hb]: 40 g/dl). Subsiguientemente, se ajustó la mixtura a pH 7,4 y se agitó a 4°C durante una noche, y la mixtura resultante se filtró utilizando un filtro de 0,22 μ m (concentraciones finales: Hb: 5,9 mmol/l, PLP: 17,3 mmol/l, y Hcy: 5 mmol/l). La Hb en el filtrado se combinó con monóxido de carbono por desaireación repetida y paso de CO gaseoso a través del filtrado 3 veces, para producir con ello una solución de Hb combinada con monóxido de carbono.

Entretanto, una mixtura de DPPC/colesterol/ácido 1,5-dipalmitoil-L-glutamato-N-succínico = 10/10/2 (relación molar) se pesó en una cantidad total de 20 g, y se disolvió en benceno. Subsiguientemente, se disolvió un conjugado en el que PEG está unido a diestearil-glutaril-éster (abreviado en lo sucesivo como PEG-DSGE) en solución salina fisiológica a fin de tener una relación de concentraciones PEG-DSGE de 0,3% molar con relación a la cantidad total de lípidos. La mixtura se mezcló y liofilizó, para obtener con ello un polvo mixto de lípidos en el cual los lípidos estaban dispersados uniformemente. El polvo mixto de lípidos se hidrató por adición del polvo a la solución de Hb combinada con monóxido de carbono en porciones a 4°C, seguido por agitación durante una noche. Subsiguientemente, se ajustó el diámetro del polvo a 0,22 μ m utilizando un extrusor (fabricado por LIPEX BIOMEMBRANES, INC.), para obtener con ello una dispersión de HbV.

Se añadió una cantidad 4 veces mayor de solución salina fisiológica a la dispersión de HbV, y se repitió varias veces la ultrafiltración (peso molecular: 1.000.000) varias veces utilizando un recipiente Pellicon (fabricado por Millipore Corporation) a fin de separar Hb en la fase acuosa externa. En dicho momento, se confirmó que la fase acuosa externa se volvía transparente. Subsiguientemente, se ajustó la concentración de lípidos a 2,0 g/dl con solución salina fisiológica. Se añadió gota a gota una solución acuosa de PEG-DSGE en porciones a la dispersión de HbV. La mixtura se agitó en una atmósfera de CO durante 2 horas (37°C, 400 rpm) y se agitó ulteriormente durante una noche 4°C.

Una vez completada la agitación, se ajustó la concentración de Hb a 2,0 g/dl con solución salina fisiológica, y la mixtura se sometió luego a una corriente de oxígeno e irradiación con luz visible para la desorción del CO de la Hb. La mixtura resultante se concentró por ultracentrifugación, para proporcionar con ello una capa de pelets de HbV en la capa inferior.

Se añadió solución salina fisiológica a la capa de pelets de HbV, y se realizó ultracentrifugación para lavado. A continuación, se disolvió rHSA en solución salina fisiológica a fin de tener una concentración de rHSA de 5%, y se añadió la solución a la capa inferior, para producir con ello 200 ml de una solución de HbV ([Hb]: 8,6 g/dl, aproximadamente pH 7,4).

La solución resultante tenía una presión osmótica de coloides de aproximadamente 20 mmHg y una presión osmótica de cristaloides de aproximadamente 300 mOsm.

Además, se encontró que la solución tenía un espectro de absorción máximo (banda Q) a aproximadamente 575 nm. Después de desairear la dispersión con nitrógeno gaseoso, se encontró que la solución tenía un espectro de absorción máximo (banda Q) a aproximadamente 555 nm, correspondiente al de una desoxihemoglobina, por lo que se confirmó que el oxígeno se adsorbía y desorbía de modo reversible. Adicionalmente, se aireó la desoxihemoglobina con un gas mixto que tenía presiones parciales de oxígeno diferentes gradualmente para determinar la afinidad para el oxígeno a 37°C. Como resultado, se encontró que la solución tenía P50 de aproximadamente 32 Torr.

Ejemplo de referencia 4

Se añadieron Hcy y una cantidad equimolar (con relación a Hb) de una solución de PLP (disolvente: una solución acuosa de NaOH) a una solución de Hb ([Hb]: 40 g/dl). Subsiguientemente, se ajustó la mixtura a pH 7,4 y se agitó a 4°C durante una noche, y la mixtura resultante se filtró utilizando un filtro de 0,22 μ m (concentración final; Hb: 5,9 mmol/l, PLP: 5,9 mmol/l; y Hcy: 5 mmol/l). La Hb contenida en el filtrado se combinó con óxido de carbono por desaireación repetida y paso de CO gaseoso a través del filtrado 3 veces, para producir con ello una solución de Hb combinada con monóxido de carbono.

Entretanto, se pesó una mixtura de DPPC/colestero/DPPG = 10/10/2 (relación molar) en una cantidad total de 20 g, y se disolvió en benceno. Subsiguientemente, la mixtura se liofilizó, para proporcionar con ello un polvo mixto de lípidos en el cual los lípidos estaban dispersados uniformemente. El polvo mixto de lípidos se hidrató por adición del polvo a la solución de Hb combinada con monóxido de carbono en porciones a 4°C, seguido por agitación durante una noche. Subsiguientemente, se ajustó el diámetro del polvo a 0,22 μ m utilizando un extrusor (fabricado por LIPEX BIOMEMBRANES, INC.), a fin de proporcionar con ello una dispersión de HbV.

Se añadió una cantidad cuatro veces mayor de solución salina fisiológica a la dispersión de HbV, y se repitió la ultrafiltración (peso molecular: 1.000.000) varias veces utilizando un recipiente Pellicon (fabricado por Millipore Corporation) a fin de separar la Hb, que no se había encapsulado en el retículo endoplasmático, en la fase acuosa externa. En dicho momento, se confirmó que la fase acuosa externa se volvía transparente. Subsiguientemente, se ajustó la concentración de lípidos a 2,0 g/dl con solución salina fisiológica. Por otra parte, un conjugado formado por la unión de PEG y diestearoilfosfatidiletanolamina por ácido succínico (PEG-DSPE) se disolvió en solución salina fisiológica a fin de tener una relación de concentraciones PEG-DSPE de 0,3% molar con relación a la cantidad total de lípidos, para preparar con ello una solución acuosa de PEG-DSPE. La solución acuosa PEG-DSPE se añadió gota a gota en porciones a la dispersión de HbV. La mixtura se agitó en una atmósfera de CO durante 2 horas (37°C, 400 rpm) y se agitó ulteriormente durante una noche a 4°C.

Una vez completada la agitación, se ajustó la concentración de Hb a 2,0 g/dl con solución salina fisiológica, y la mixtura se sometió luego a corriente de oxígeno e irradiación con luz visible para la desorción del CO de la Hb. La mixtura resultante se concentró por ultracentrifugación, a fin de proporcionar con ello una capa de pelets de HbV en la capa inferior.

Se añadió solución salina fisiológica a la capa de pelets de HbV, y se realizó ultracentrifugación para lavado. A continuación, se disolvió seroalbúmina humana recombinante (abreviada en lo sucesivo como rHSA) en solución salina fisiológica a fin de obtener una concentración de rHSA de 5%, y se añadió la solución a la capa inferior, para proporcionar con ello 200 ml de una solución de HbV ([Hb]: 8,6 g/dl, aproximadamente pH 7,4).

La solución resultante tenía una presión osmótica de coloides de aproximadamente 20 mmHg y una presión osmótica de cristaloides de aproximadamente 300 mOsm.

Además, se encontró que la solución tenía un espectro de absorción máximo (banda Q) a aproximadamente 575 nm. Después de airear la dispersión con nitrógeno gaseoso, se encontró que la solución tenía un espectro de absorción máximo (banda Q) a aproximadamente 555 nm, correspondiente al de una desoxihemoglobina, con lo que se confirmó que el oxígeno se absorbía y desorbía de modo reversible. Adicionalmente, se aireó la desoxihemoglobina con un gas mixto que tenía presiones parciales de oxígeno diferentes gradualmente, para determinar la afinidad para el oxígeno a 37°C. Como resultado, se encontró que la solución tenía un valor P50 de aproximadamente 18 Torr.

Ejemplo Experimental de Referencia 1

Se realizó un test de resucitación de choque hemorrágico utilizando la solución de HbV preparada en el Ejemplo Ref. 3 a fin de evaluar el efecto de la dispersión como una infusión que tenía una capacidad de transporte de oxígeno sobre la base de la presión sanguínea y la composición de gases en la sangre. Una rata Wistar (macho, aproximadamente 250 g) se anestesió por inhalación de sevoflurano bajo respiración espontánea, y se intubó la rata a través de la vena carótida. Subsiguientemente, se extrajo el 50% de la sangre circulante a través de la carótida. Después de dejar la rata en reposo durante 15 minutos, se administró una solución de resucitación a la rata a través de la carótida, seguida por observación durante 6 horas. La solución de resucitación utilizada era una solución preparada por dispersión de la solución de HbV preparada en el Ejemplo de Referencia 3 en una solución acuosa de rHSA al 5% (a la que se hace referencia en lo sucesivo como HbV/rHSA), una solución preparada por dispersión de una solución de HbV obtenida del mismo modo que en el Ejemplo de Referencia 3 en solución salina fisiológica (a la que rehace referencia en lo sucesivo como HbV/solución salina), o la sangre extraída a la que se añadió heparina.

Se encontró que la presión sanguínea disminuía desde 100 mmHg antes de la extracción de la sangre a 30 mmHg después de la extracción de la sangre (Ref. Fig. 1). La presión parcial de oxígeno en la sangre arterial (a la que se hace referencia en lo sucesivo como PaO₂) aumentaba desde 79 Torr a 103 Torr (Ref. Fig. 2). Además, el nivel de ácido láctico aumentaba significativamente desde 1,9 mM a 7,2 mM (Ref. Fig. 3). La presión sanguínea para el grupo al que se administró HbV/rHSA se recuperaba hasta 95 mmHg inmediatamente después de la administración, y el nivel era equivalente al del grupo al que se administró la sangre extraída, y se mantuvo durante 6 horas (Ref. Fig.

1). Análogamente, la composición de gases en la sangre se recuperaba también, y PaO₂ y el nivel de ácido láctico eran 73 Torr (Ref. Fig. 2) y 1,8 mM (Ref. Fig. 3), respectivamente. Entretanto, para el grupo al que se administró HbV/solución salina, la presión sanguínea se recuperaba hasta 88 mmHg (Ref. Fig. 1), pero el nivel de ácido láctico era 3,1 mM incluso después de la administración, por lo que las dos ratas no se recuperaron y murieron antes de completarse el periodo de observación de 6 horas.

HbV/rHSA tenían una presión osmótica de coloides de 20 Torr, mientras que HbV/solución salina tenía una presión osmótica de coloides de 0 Torr.

Los resultados arriba mencionados revelaban que debe utilizarse un expansor de plasma en combinación con un vehículo artificial de oxígeno particularmente cuando es importante la recuperación de la cantidad de sangre circulante, en particular en el momento de la resucitación de un choque hemorrágico.

Ejemplo 5

Se disolvió en etanol un complejo porfirina-hierro (2-[8-{N-(2-metilimidazolil)}octanoiloximetil]-5,10,15,20-tetraquis($\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$ -o-pivaloilamino)fenilporfi-nato-hierro(II)). A continuación, se añadió una solución de ácido L-ascórbico a lo anterior para reducción del hierro central, y se aireó monóxido de carbono gaseoso para invertir el complejo porfirina-hierro en un complejo con monóxido de carbono. La mezcla resultante se añadió a seroalbúmina humana recombinante diluida con un tampón de fosfato, seguido por mezcla para incluir con ello el complejo porfirina-hierro en albúmina. La mezcla se concentró por eliminación del etanol contenido en la mezcla por diálisis de ultrafiltración a volumen constante utilizando un tampón de fosfato. La concentración de sal de la mezcla resultante se ajustó a 140 mM por adición de cloruro de sodio a la misma, a fin de obtener de este modo una dispersión de un compuesto de inclusión complejo hierro-porfirina-albúmina (pH 7,3, concentración de albúmina 5 p/v %). La dispersión tenía una presión osmótica de coloides de aproximadamente 20 mmHg, y una presión osmótica de cristaloideos de aproximadamente 300 mOsm.

La dispersión se sometió a irradiación luminosa con sustitución de oxígeno en un baño de hielo para producir una oxihemoglobina, y se encontró que la dispersión resultante tenía un espectro de absorción máximo a 421 nm. Después de airear la dispersión con nitrógeno gaseoso, se encontró que la dispersión tenía un espectro de absorción máximo a 441 nm correspondiente al de una desoxihemoglobina. Como resultado, se confirmó que el oxígeno se adsorbía y desorbía de modo reversible. Adicionalmente, se aireó la desoxihemoglobina con un gas mixto que tenía presiones parciales de oxígeno diferentes, gradualmente, para determinar la afinidad para el oxígeno a 37°C. Como resultado, se encontró que la dispersión tenía P50 de 33 Torr.

Ejemplo 6

Se disolvió un complejo porfirina-hierro (2-[8-{N-(2-metilimidazolin)}octanoiloximetil]-5,10,15,20-tetraquis-{ $\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$ -o-(1-metilciclohexanoil)amino}fenilporfinato-hierro(II) en etanol. Subsiguientemente, se añadió una solución de ácido L-ascórbico a lo anterior para reducción del hierro central, y se aireó monóxido de carbono gaseoso para invertir el complejo porfirina-hierro en un complejo con monóxido de carbono. La mezcla resultante se añadió a seroalbúmina humana recombinante diluida con un tampón de fosfato, seguido por mezcla para incluir con ello el complejo porfirina-hierro en albúmina. La mezcla se concentró por eliminación del etanol contenido en la mezcla por diálisis de ultrafiltración a volumen constante utilizando un tampón de fosfato (pH 7,3). La concentración de sal de la mezcla resultante se ajustó a 140 mM por adición de cloruro de sodio a la misma, a fin de obtener de este modo una dispersión de un compuesto de inclusión complejo hierro-porfirina-albúmina (pH 7,3, concentración de albúmina 5 p/v %). La dispersión tenía una presión osmótica de coloides de aproximadamente 20 mmHg, y una presión osmótica de cristaloideos de aproximadamente 300 mOsm.

La dispersión se sometió a irradiación luminosa con sustitución de oxígeno en un baño de hielo para producir una oxihemoglobina, y se encontró que la dispersión resultante tenía un espectro de absorción máximo a 424 nm. Después de airear la dispersión con nitrógeno gaseoso, se encontró que la dispersión tenía un espectro de absorción máximo a 443 nm correspondiente al de una desoxihemoglobina. Como resultado, se confirmó que el oxígeno se adsorbía y desorbía de modo reversible. Adicionalmente, se aireó la desoxihemoglobina con un gas mixto que tenía presiones parciales de oxígeno diferentes, gradualmente, para determinar la afinidad para el oxígeno a 37°C. Como resultado, se encontró que la dispersión tenía P50 de 35 Torr.

Ejemplo Experimental 2

Los compuestos de inclusión complejo porfirina-hierro-albúmina preparados en los Ejemplos 5 y 6 se evaluaron respecto a capacidad de suministro de oxígeno a células y tejidos hipóxicos. Una rata macho Wistar IGS (peso corporal 275 a 315 g) se anestesió por inhalación de sevoflurano bajo respiración espontánea, y se insertó un catéter en la rata por la arteria carótida común derecha para preparar una vía para extracción de sangre y para extracción de sangre arterial. Se disecó la región femoral izquierda, y se insertó un catéter por la arteria femoral izquierda para preparar una vía para medida de la presión sanguínea. Se disecó la región femoral derecha, y se insertó un catéter en la arteria

femoral derecha para preparar una ruta para administración de una sustancia de test o una sustancia de control y para extracción de sangre venosa. Se disecó el abdomen, y se insertó un electrodo de oxígeno (fabricado por Intermedical Inc., POE-OPS) en la corteza renal. A continuación, se realizó el intercambio de sangre en la rata para intercambiar el 70% de la sangre (con relación a la sangre total) de la rata con una solución de rHSA al 5%. Una vez completado el intercambio de sangre, se extrajo el 30% de la cantidad total estimada de sangre (convertida como 56 ml/kg de peso corporal) por la arteria carótida común derecha. Inmediatamente después de la extracción de la sangre, se administró a la rata una cantidad igual (con relación a la cantidad de sangre extraída) de la sustancia de test (una dispersión del compuesto de inclusión complejo porfirina-hierro-albúmina preparado en el Ejemplo 5 ó 6) o una sustancia de control (solución de rHSA al 5%, sangre retransfundida de la sangre extraída). Después de ello, se realizó una observación durante 2 horas después de la administración, y se determinó vida o muerte. La presión sanguínea media se midió utilizando un sistema de polígrafo (fabricado por NIHON KOHDEN Corporation, LEG-1000, Ver. 01-02) por medio de un amplificador de presión. Por el uso del electrodo de oxígeno insertado en la corteza renal, se midió la presión parcial de oxígeno en la sangre venosa utilizando un aparato para medida de la presión parcial de oxígeno en los tejidos (fabricado por Intermedical Inc., PO2-100DW).

Fig. 4 muestra el resultado de la medida de la presión sanguínea media. Se midió la presión sanguínea media para cada uno de los grupos de albúmina, el grupo de sangre retransfundida, la dispersión del compuesto de inclusión complejo porfirina-hierro-albúmina preparado en el Ejemplo 5 (al que se hace referencia en lo sucesivo como grupo piv), y la dispersión del compuesto de inclusión complejo porfirina-hierro-albúmina preparado en el Ejemplo 6 (al que se hace referencia en lo sucesivo como grupo cyc). La presión sanguínea media disminuía hasta aproximadamente un 80% con relación al nivel inicial por intercambio del 70% de la sangre con la solución de rHSA al 5%. Adicionalmente, la presión sanguínea media disminuía hasta aproximadamente 25% por eliminación del 30% de la sangre. Después de ello, la presión sanguínea del grupo de albúmina no aumentaba aun cuando se administró albúmina, mientras que la presión sanguínea del grupo de sangre retransfundida aumentaba hasta aproximadamente 110% con relación al valor inmediatamente antes de la extracción de sangre por la retransfusión de sangre. La presión sanguínea de cada uno de grupo cyc y el grupo piv aumentaba hasta aproximadamente 85% con relación a su valor inmediatamente antes de la extracción de sangre por administración de la sustancia de test.

Fig. 5 muestra el resultado de la medida de la presión parcial de oxígeno en sangre venosa. Se midió la presión parcial de oxígeno en sangre venosa para cada uno de los grupos de albúmina, el grupo de sangre retransfundida, el grupo cyc y el grupo piv. La presión parcial de oxígeno en sangre venosa disminuía hasta aproximadamente 90% con relación al nivel inicial por intercambio del 70% de la sangre. Adicionalmente, la presión de oxígeno en sangre venosa disminuía hasta aproximadamente 60% por extracción del 30% de la sangre. Después de ello, la presión parcial de oxígeno del grupo de albúmina no aumentaba aun cuando se administró albúmina, mientras que la presión parcial de oxígeno del grupo de sangre retransfundida, el grupo cyc, o el grupo piv aumentaba hasta aproximadamente 110% con relación al valor inmediatamente antes de la extracción de sangre por la administración de la sustancia de test.

Efecto de la invención

Como se ha descrito arriba, la sangre artificial de la presente invención tiene a la vez la capacidad de transporte de oxígeno y la presión osmótica de coloides (el efecto de expansión del plasma), y es particularmente eficaz para supervivencia de un paciente con hemorragia masiva o análogos.

Además, la sangre artificial de la presente invención puede evitar la toxicidad por hemólisis o análogos debido a que se prepara por ajuste de la presión osmótica de cristaloides, el balance de electrólitos, y el valor de pH dentro de intervalos biológicamente aceptables.

En la presente invención, puede prepararse una composición farmacéutica que tiene eficiencia de transporte de oxígeno tan alta como, o mayor que, la de un eritrocito por utilización del vehículo de oxígeno que está compuesto por un conjugado de un complejo metálico que tiene una estructura de porfirina y albúmina o de una mezcla con una hemoglobina encapsulada en liposoma.

Adicionalmente, el uso de un liposoma que contiene un conjugado de un lípido no fosfolipídico y un polialquilenglicol puede fijar de manera estable un polímero soluble en agua sobre una superficie de liposoma por interacción intermolecular, y puede transportar el polímero soluble en agua sin detracción de la función del mismo.

Además, el uso de una albúmina o hemoglobina recombinante puede preparar una composición farmacéutica segura que no tiene posibilidad alguna de enfermedad infecciosa derivada de un organismo vivo.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica **caracterizada** porque comprende:

(i) un conjugado de

(a) un complejo metálico que tiene una estructura de porfirina y

(b) una albúmina, y

(ii) un electrólito.

2. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la cual el complejo metálico es un complejo de hierro (II).

3. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la cual la albúmina se selecciona de plasma humano, seroalbúmina humana, proteína de plasma humano calentada, seroalbúmina humana recombinante, seroalbúmina derivada de animales y seroalbúmina de animales recombinante.

4. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la cual el electrólito se selecciona del grupo constituido por sales de sodio que comprenden cloruro de sodio, hidrogenocarbonato de sodio, citrato de sodio y lactato de sodio, sales de potasio que comprenden cloruro de potasio, acetato de potasio, gluconato de potasio, hidrogenocarbonato de potasio, glicerofosfato de potasio, sulfato de potasio, lactato de potasio, yoduro de potasio, dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato dipotásico, citrato de potasio, una sal potásica de aminoácido, propionato de potasio, y β -hidroxibutirato de potasio, sales de calcio que comprenden cloruro de calcio, gluconato de calcio, lactato de calcio, glicerofosfato de calcio, pantotenato de calcio, y acetato de calcio, sales de magnesio que comprenden cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, glicerofosfato de magnesio, acetato de magnesio, lactato de magnesio, y una sal magnésica de aminoácido, sales de amonio que comprenden cloruro de amonio, sales de cinc que comprenden sulfato de cinc, cloruro de cinc, gluconato de cinc, lactato de cinc, y acetato de cinc, sales de hierro que comprenden sulfato de hierro, cloruro de hierro, y gluconato de hierro, sales de cobre que comprenden sulfato de cobre, y sales de manganeso que comprenden sulfato de manganeso.

5. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende adicionalmente al menos una sustancia seleccionada del grupo constituido por:

un compuesto capaz de proporcionar una presión osmótica de coloides que incluye un dextrano, un derivado de dextrano, hidroxietil-almidón, hidroxipropil-almidón, gelatina, PEG, polivinil-pirrolidona, carboximetilcelulosa, goma arábica, glucosa, y una dextrosa;

un sacárido;

un aminoácido;

un antioxidante que incluye ácido ascórbico, ácido eritórlico, tioglicerol, α -tioglicerina, citrato de isopropilo, 1,3-butilenglicol, un sulfito de aminoácido, butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), galato de propilo, palmitato de ascorbilo, vitamina E y derivados de la misma, guayaco, ácido nordihidroguayarático (NDGA), ésteres L-ascorbato-estearato, lecitina de soja, ácido palmítico, ácido ascórbico, benzotriazol, y penta-eritritil-tetraquis[3-(3,5-di-t-butil-4-hidroxifenil)-propionato]2-mercaptopbencimidazol;

un ajustador de pH;

y un agente isotonzante que incluye ácido aminoetilsulfónico, cloruro de benzalconio, sacáridos, alcoholes-azúcar, ácido cítrico, nicotinamida, propilenglicol, alcohol bencílico, bórax, ácido fosfórico, y macrogol 4000.

6. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende adicionalmente una hemoglobina encapsulada en liposoma.

7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, en la cual el liposoma contiene un conjugado de un lípido no fosfolípido y un polialquilenglicol.

8. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7, en la cual la hemoglobina es una hemoglobina recombinante.

9. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la cual la composición es un líquido que tiene una presión osmótica de coloides de aproximadamente 1 a 50 mmHg, una presión osmótica de cristaloides de aproximadamente 50 a 500 mOsm, P50 de aproximadamente 1 a 50 Torr, y un pH de aproximadamente 5,6 a 8,0.

ES 2 308 061 T3

10. Una infusión de sangre que comprende la composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

5 11. Una solución de perfusión para almacenamiento de órganos, una solución de circulación extra-corpórea, o una solución de cultivo de células que comprende La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. de Referencia 1

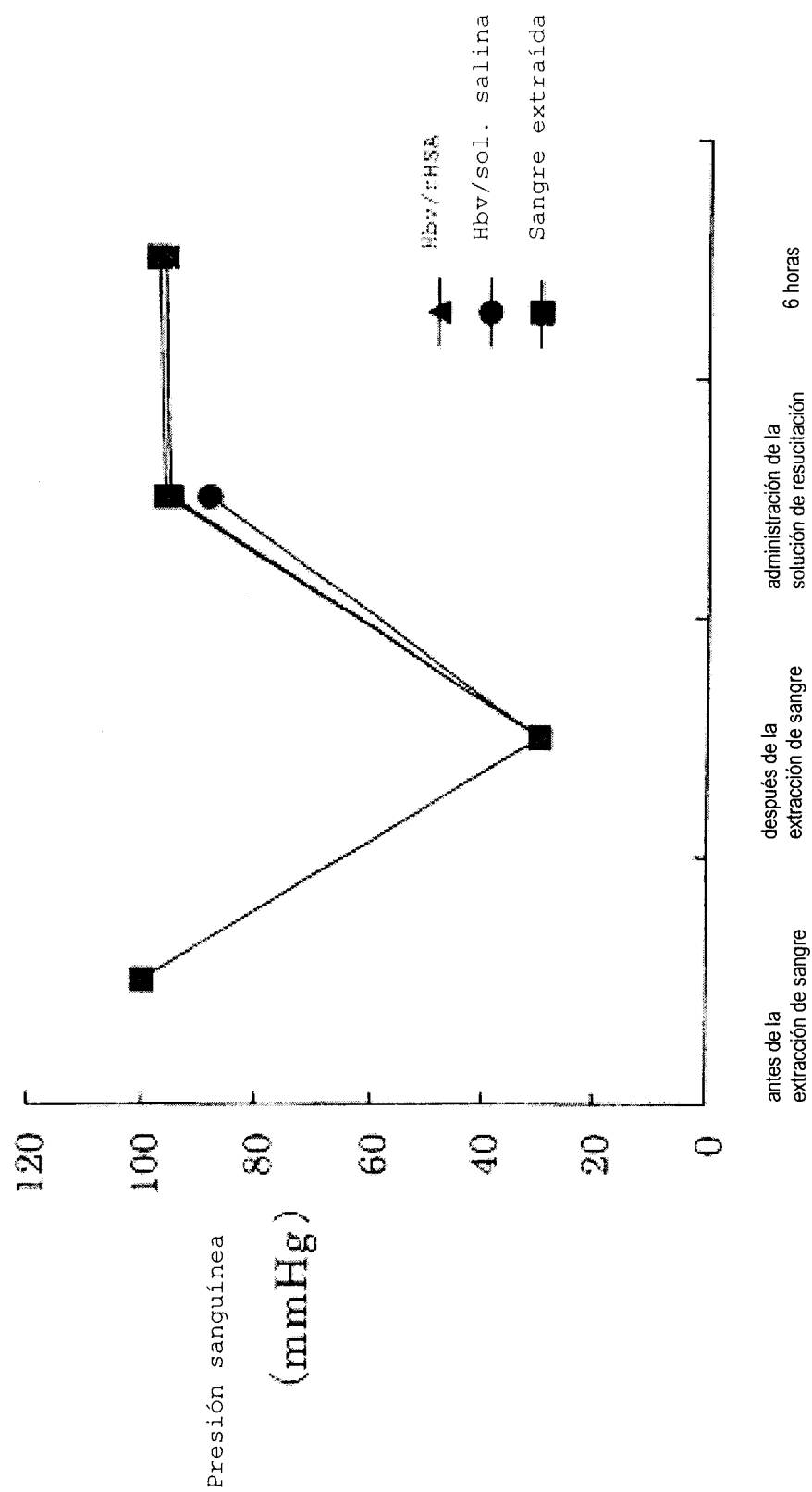


Fig. de Referencia 2

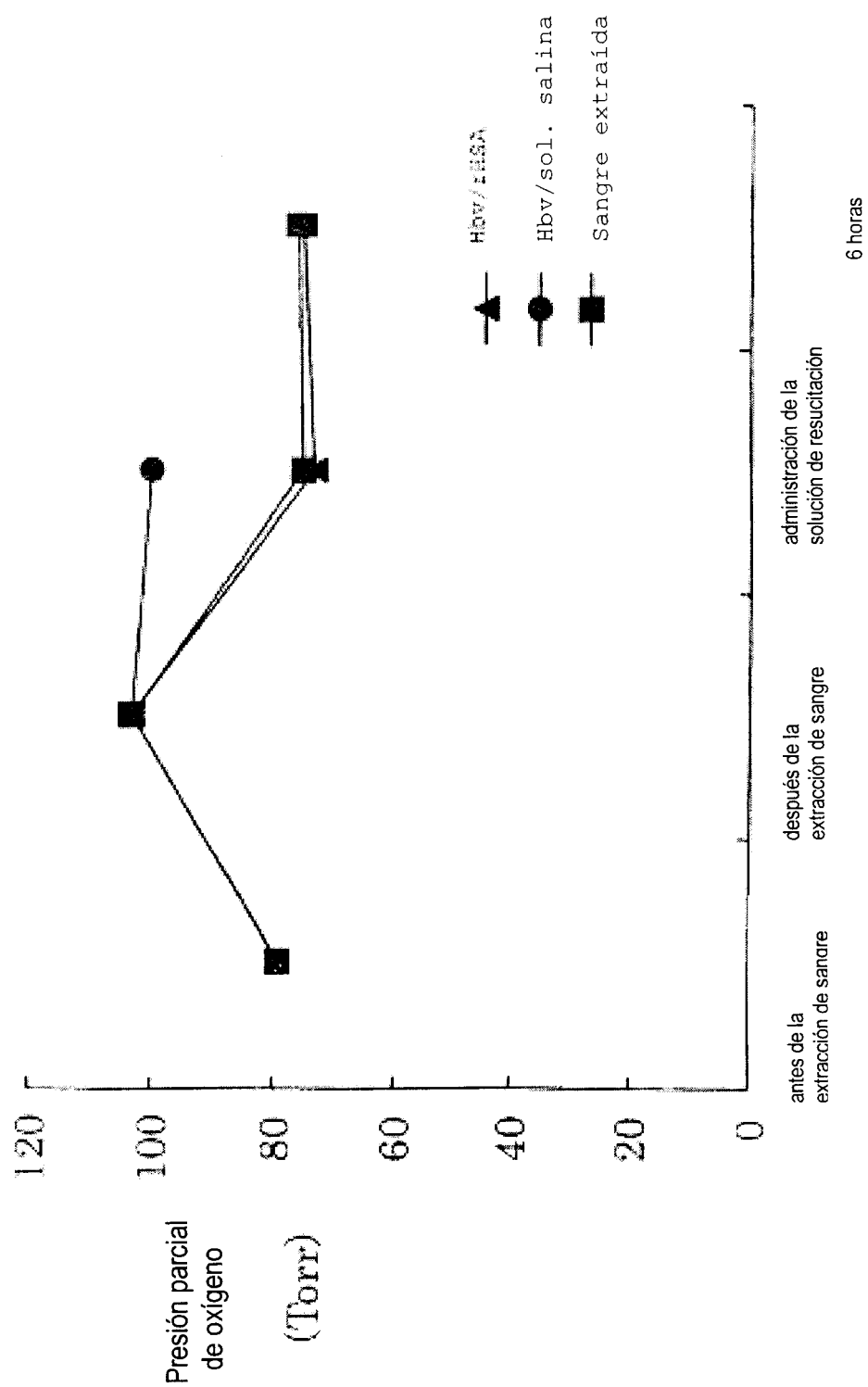


Fig. de Referencia 3

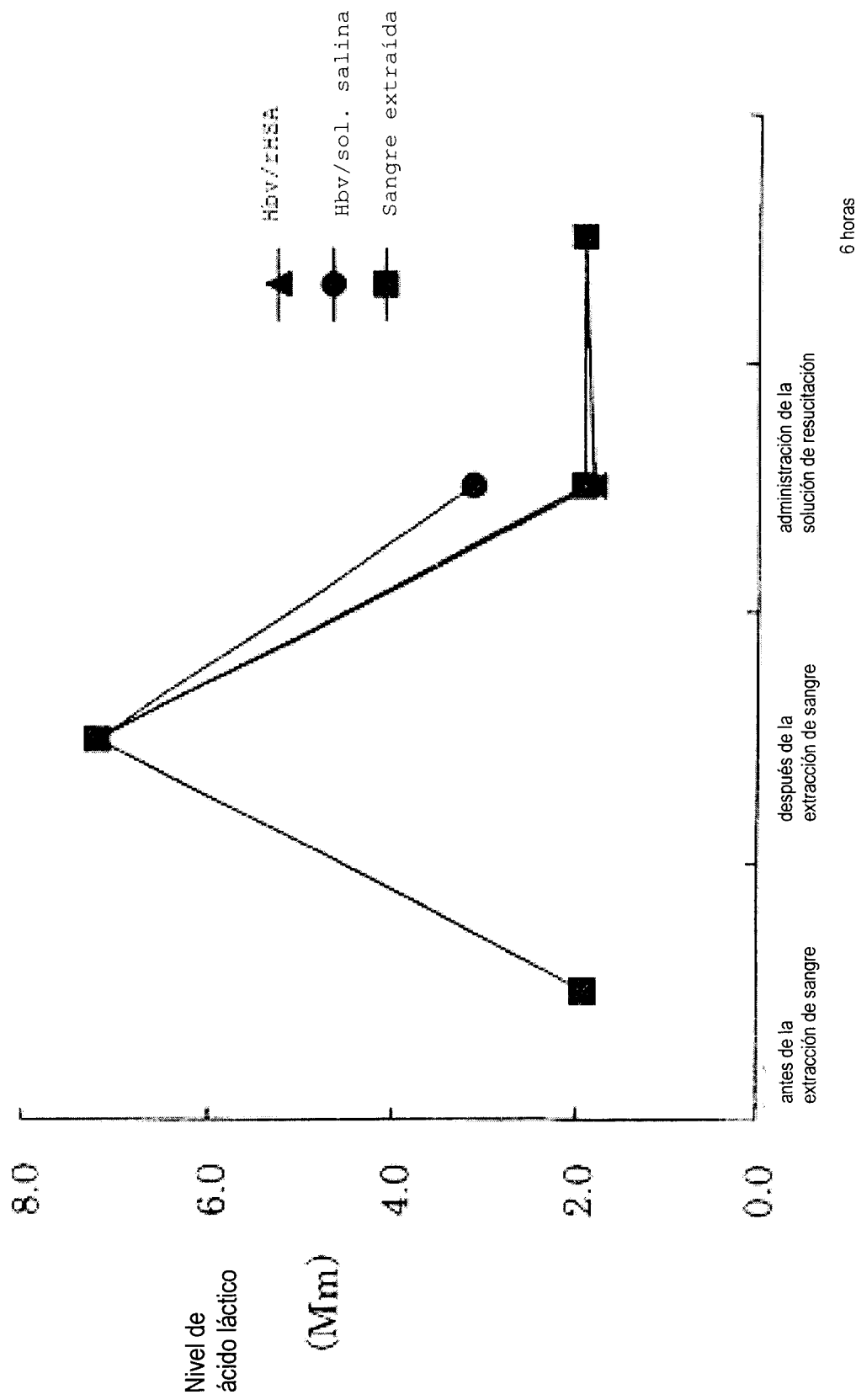


Fig. 4

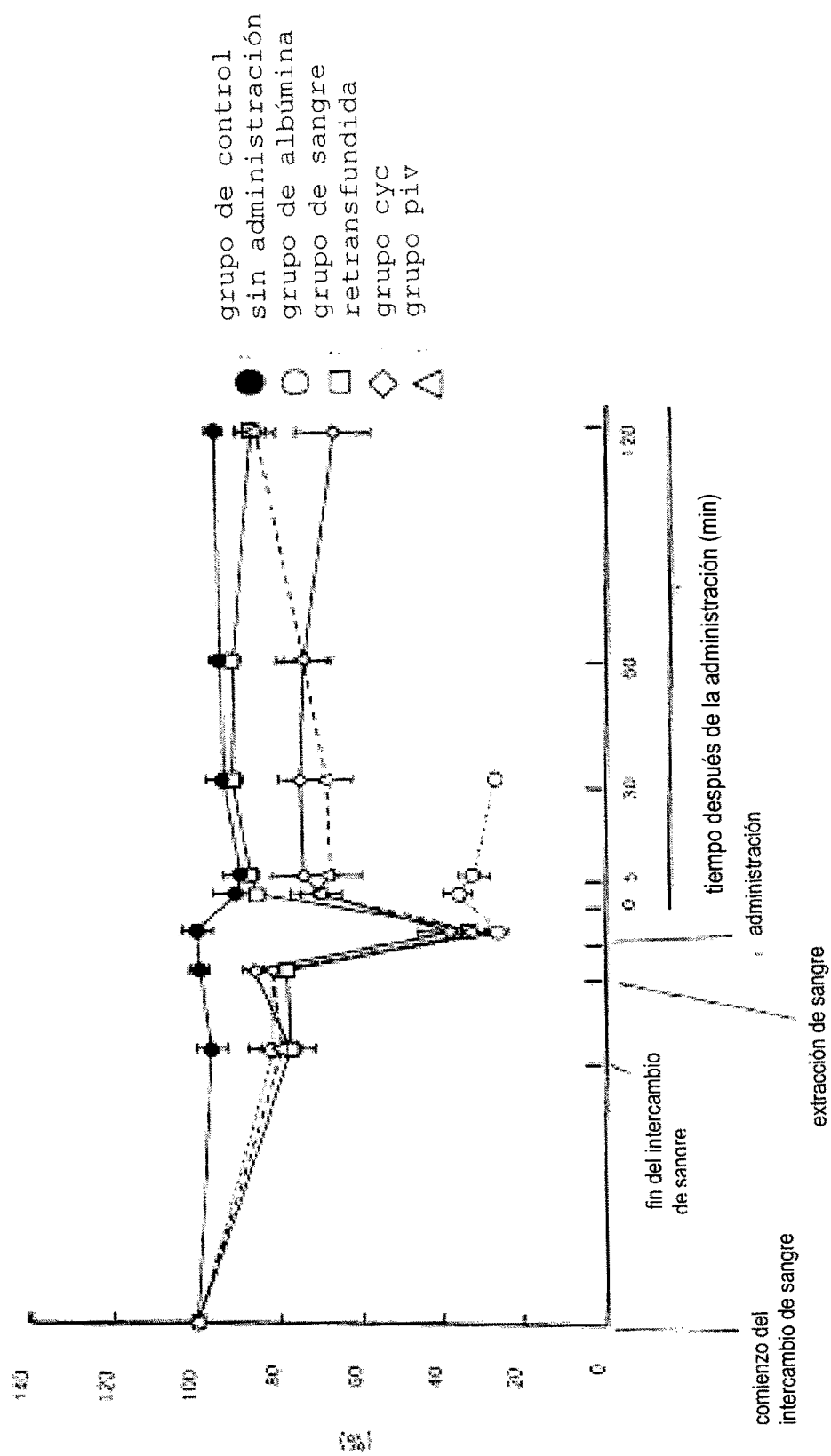


Fig. 5

