



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 280 454**

⑤1 Int. Cl.:
A61K 35/14 (2006.01)
A61K 41/00 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **02014086 .9**
⑧6 Fecha de presentación : **08.02.1993**
⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1243278**
⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **25.09.2002**

⑤4 Título: **Método para aumentar la concentración de óxido nítrico en la sangre.**

③0 Prioridad: **07.02.1992 US 832798**
04.09.1992 US 941326

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.09.2007

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.09.2007

⑦3 Titular/es: **Vasogen Ireland Limited**
Shannon Airport House, Shannon, Co
Clare, IE

⑦2 Inventor/es: **Bolton, Anthony Ernest**

⑦4 Agente: **Cañadell Isern, Roberto**

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

Método para aumentar la concentración de óxido nítrico en la sangre.

La presente invención se refiere a un método para aumentar la concentración de óxido nítrico en la sangre.

Las plaquetas son los elementos formes más pequeños de la sangre. Cada milímetro cúbico de sangre contiene aproximadamente 250 millones de plaquetas, comparado con unos pocos millares solamente de glóbulos blancos. Un ser humano adulto medio tiene aproximadamente un trillón de plaquetas en la sangre. Las plaquetas no son células sino fragmentos de las células gigantes de la médula ósea que reciben el nombre de megacariocitos. Cuando un megacariocito madura, su citoplasma se divide formando varios millares de plaquetas. Las plaquetas carecen de ADN y tienen poca aptitud para sintetizar proteínas. Cuando se liberan en la sangre, circulan y mueren en aproximadamente 10 días. No obstante, las plaquetas si que poseen un metabolismo activo para cubrir sus necesidades energéticas.

Debido a que las plaquetas contienen una cantidad generosa de proteína contráctil (actomiosina), tienen tendencia a contraerse como lo hacen los músculos. Este fenómeno explica la contracción de un coágulo de sangre fresca al cabo de unos pocos minutos. La contracción juega un papel en la formación de un tapón hemostático cuando se corta un vaso sanguíneo. La función principal de las plaquetas es formar coágulos de sangre. Cuando se produce una herida, las plaquetas son atraídas al lugar donde activan una sustancia (trombina) que comienza el proceso de coagulación. La trombina, además de convertir el fibrinógeno en fibrina, también hace que las plaquetas sean pegajosas. Por consiguiente, cuando se expone al colágeno y a la trombina, las plaquetas se juntan para formar un tampón en el orificio de un vaso sanguíneo herido.

Las plaquetas no solamente tienden a pegarse entre si, sino que también lo hacen a las paredes de los vasos sanguíneos. Debido a que promueven la coagulación, las plaquetas desempeñan un papel clave en la formación de trombos. Las consecuencias peligrosas de los trombos son evidentes en muchos trastornos cardiovasculares y cerebrovasculares.

La función precisa de las plaquetas de la sangre en diversas patologías humanas se va entendiendo ahora cada vez más, a medida que se producen avances en bioquímica que permiten entender mejor las etiologías de las enfermedades.

Por ejemplo, se han realizado muchos intentos para explicar el proceso de la aterogénesis, es decir, la creación de placas que estrechan las arterias y, algo que es particularmente importante, las arterias coronarias. Recientemente, se ve teniendo un interés cada vez mayor por el posible papel de las plaquetas en la aterosclerosis.

En este sentido, se ha comprobado que el óxido nítrico (NO) en la sangre inhibe la coagulación sanguínea al evitar que se junten las plaquetas de la sangre. Véase por ejemplo Zinder *et al.*, "Biological Roles of Nitric Oxide" (Funciones biológicas del óxido nítrico) *Scientific American*, mayo de 1992, páginas 68-77, cuya descripción se incorpora aquí a modo de referencia.

Al explorar el papel biológico preciso del óxido nítrico, se ha visto que el óxido nítrico sirve de molécula mensajera importante en el cerebro y en otras partes del cuerpo, gobernando diversas funciones biológicas. En los vasos sanguíneos, el principal factor relajante derivado del endotelio (EDRF) es el óxido nítrico, que estimula la vasodilatación. El óxido nítrico también inhibe la agregación de plaquetas y es parcialmente responsable de las acciones citotóxicas de los macrófagos.

En el cerebro, el óxido nítrico media las acciones del glutamato neurotransmisor excitatorio, estimulando concentraciones de GMP cíclicas. Unos estudios inmuno - histoquímicos han localizado la óxido nítrico sintasa (NOS) en poblaciones neuronales particulares del cerebro y la periferia.

Unos inhibidores de óxido nítrico sintasa bloquean la relajación fisiológica del intestino inducida por estimulación neuronal, lo cual indica que el óxido nítrico tiene las propiedades de un neurotransmisor. En este sentido, el óxido nítrico parece ser un nuevo tipo de mensajero adicional, ya que, a diferencia de los neurotransmisores convencionales, el óxido nítrico no se almacena en vesículas sinápticas y no actúa sobre las proteínas receptoras típicas de membranas sinápticas. Una de las funciones del óxido nítrico puede ser la de proteger las neuronas de agresiones isquémicas y neurotóxicas. Véase, Bredt *et al.*, "Cloned and Expressed Nitric Oxide Synthase Structurally Resembles Cytochrome P-450 Reductase", (La óxido nítrico sintasa donada y expresada se asemeja estructuralmente al citocromo P-450 reductasa), *Nature* Vol. 351, junio de 1991, páginas 714-718.

El documento DE-A- 1068428 describe un método y un dispositivo para la preparación de sangre oxigenada.

Por consiguiente, además de las enfermedades asociadas a la agrupación de plaquetas, se cree en la actualidad que algunos estados patológicos que se dan en los seres humanos están asociados con niveles inadecuados de óxido nítrico en la sangre. Estas condiciones asociadas al óxido nítrico pueden ser: la presión arterial elevada, estados neurológicos como la depresión, tumores, infecciones bacterianas o por hongos o impotencia.

La invención se refiere a la utilización de una cantidad de sangre para la fabricación de un medicamento como el que se define en la reivindicación 1.

De preferencia, el gas ozono tiene una concentración de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ a 100 $\mu\text{g/ml}$ aproximadamente en la sangre.

ES 2 280 454 T3

La radiación ultravioleta tiene, ventajosamente, una longitud de onda de aproximadamente 253.7 nm.

La sangre se mantiene, de preferencia, a una temperatura de 0°C a 56°C aproximadamente, mientras entra en contacto con el gas ozono y la radiación ultravioleta. La temperatura preferida es de 37°C a 43°C y todavía mejor, de 42.5°C.

La cantidad de sangre tratada puede oscilar entre 0,01 ml y 400 ml y de preferencia es de 10 ml, y la sangre se pone en contacto con el gas ozono y con radiación ultravioleta, de preferencia durante un período aproximado de 3 minutos.

La sangre puede ser sangre humana.

El medicamento puede ser para el tratamiento de la presión arterial elevada, depresión, tumores, infección bacteriana, infección por hongos o infección viral.

La invención se describirá ahora de forma más detallada.

Los ejemplos 1 y 2 siguientes muestran que la acumulación de plaquetas de la sangre solo se puede inhibir si se trata la sangre con una combinación de gas ozono y radiación ultravioleta (UV). El tratamiento de la sangre únicamente con gas ozono produce una inhibición mínima de la acumulación de las plaquetas de la sangre. El tratamiento de la sangre únicamente con luz ultravioleta no produce ninguna inhibición de la acumulación de plaquetas. Además, los ejemplos 3 y 4 muestran que la inhibición de la acumulación de plaquetas se produce a través de un mecanismo mediado por el óxido nítrico y que el tratamiento de la sangre con luz ultravioleta y ozono según la invención, aumenta las concentraciones de óxido nítrico en la sangre.

El tratamiento combinado con gas ozono y luz ultravioleta, como se ha podido comprobar por lo tanto de forma inesperada, produce un notable incremento en la concentración de óxido nítrico en la sangre, que puede resultar útil en el tratamiento de toda una serie de trastornos que se benefician por el aumento de los niveles de óxido nítrico en la sangre.

El gas ozono se puede aportar a partir de un agente convencional, conocido en el estado de la técnica, como un ozonizador. El gas ozono utilizado en relación con el método de la invención tiene una concentración de ozono de aproximadamente 0,5 a 100 µg/ml. De preferencia, el gas ozono tiene una concentración de aproximadamente entre 5 a 50 µg/ml. El gas ozono se aporta de preferencia a la sangre utilizando un vehiculador de oxígeno médico, y se pone de preferencia en contacto con la sangre, utilizando métodos conocidos en el estado de la técnica, de preferencia haciendo pasar por burbujeo la mezcla de ozono/oxígeno a través de la muestra de sangre.

La radiación ultravioleta se puede aportar de cualquier fuente convencional conocida en el estado de la técnica, por ejemplo con una pluralidad de lámparas ultravioletas de baja presión. La invención utiliza de preferencia una fuente de UV-C standard de radiación ultravioleta. Se utiliza de preferencia lámparas ultravioletas de baja presión que generan un espectro lineal donde por lo menos un 90% aproximadamente de la radiación tiene una longitud de onda de aproximadamente 253,7 nm. Se cree que la radiación ultravioleta con longitudes de onda de emisión correspondientes a las fuentes standard UV-A y UV-B también darían resultados aceptables.

La sangre que se va a tratar con UV/ozono se calienta de preferencia hasta una temperatura de aproximadamente 0 a 56°C, mientras se pone en contacto con el gas ozono y la radiación ultravioleta. Se puede utilizar cualquier fuente adecuada de calor conocida en el estado de la técnica para calentar la sangre, de preferencia una o más lámparas infrarrojas. La sangre se puede calentar hasta aproximadamente 37-43°C, de preferencia aproximadamente hasta 42,5°C antes de ponerse en contacto con el gas ozono y la radiación ultravioleta. De preferencia, la temperatura de la sangre se mantiene entonces a aproximadamente 42,5°C durante el tratamiento con UV/ozono.

Alternativamente, la muestra de sangre se calienta mientras se somete a radiación UV, hasta que la sangre alcanza una temperatura predeterminada (de preferencia en torno a 42,5°C), en cuyo momento se empieza el burbujeo del gas ozono a través de la sangre. El tratamiento simultáneo UV/ozono se mantiene entonces durante un período de tiempo predeterminado, de preferencia unos 3 minutos.

Otro método alternativo supone someter la sangre a UV/ozono mientras se calienta la sangre hasta una temperatura predeterminada (de preferencia en torno a 42,5°C) y luego se termina el tratamiento una vez que se ha alcanzado la temperatura predeterminada o se sigue el tratamiento UV/ozono durante otro período de tiempo, de preferencia, unos 3 minutos.

El calentar la sangre hasta aproximadamente 42,5°C con las lámparas infrarrojas, método utilizado de preferencia en la invención, necesita, según se ha visto, de un minuto, cincuenta segundos a aproximadamente dos minutos, 10 segundos.

Se entenderá que la procedencia de la sangre tratada según la invención puede ser exterior como por ejemplo la de un donante de sangre compatible. Se trata con UV/ozono y se administra luego a un paciente. Alternativamente y de preferencia, la sangre que se va a tratar se puede extraer de un paciente humano, como una cantidad, tratada con UV/ozono, y luego volverla a administrar al paciente del que se ha extraído dicha sangre. La totalidad o parte de la sangre extraída del paciente se podrá tratar y volver a administrar al paciente.

ES 2 280 454 T3

En general, se puede tratar según la invención de 0,01 a 400 ml de sangre aproximadamente. De preferencia, dichas cantidades oscilan entre aproximadamente 0,1 y 200 ml y todavía mejor entre 1 y 50 ml de sangre. El método preferido supone tratar uno 10 ml de sangre con gas ozono y radiación ultravioleta, y luego administrar (o volver a administrar) la sangre tratada al paciente por inyección intramuscular.

Se pueden utilizar otras técnicas convencionales conocidas en el estado de la técnica para la administración de sangre, tales como la inyección inter arterial, inyección intravenosa, inyección subcutánea e inyección intraperitoneal. La administración de pequeños volúmenes de sangre del huésped indicada recibe el nombre de micro - auto - hemoterapia.

La invención se puede utilizar en una realización en la que se extrae de forma continua sangre del cuerpo de un paciente y se hace circular a través de un aparato que trata la sangre con gas ozono y luz ultravioleta, en la forma descrita anteriormente, antes de devolver la sangre al paciente. Este procedimiento resultaría particularmente útil por ejemplo mientras se realizan intervenciones quirúrgicas como por ejemplo cirugía coronaria de bypass.

La sangre se pone en contacto con el gas ozono y la radiación ultravioleta durante un período de tiempo suficiente para incrementar de forma eficaz la concentración de óxido nítrico en la sangre del paciente. Se ha visto que un período de tratamiento de aproximadamente unos pocos segundos a 60 minutos, de preferencia de unos 0,5 minutos a 10 minutos y todavía mejor en torno a 3 minutos tiene como resultado un incremento de los niveles de óxido nítrico en la sangre. La sangre se mantiene de preferencia a una temperatura de aproximadamente 42,5°C durante el período de tratamiento de 3 minutos.

El método se realizará en condiciones estériles, conocidas en el estado de la técnica. El método de la invención se puede realizar utilizando un aparato convencional para ozonar la sangre e irradiar la misma con radiación ultravioleta conocida por los expertos en la materia. De preferencia, se utiliza un aparato similar al descrito en la patente US n°. 4.968.483 para realizar el método de la invención.

Los expertos en la materia comprobarán que el método para aumentar la concentración de óxido nítrico en la sangre presentado por la invención tendrá una utilidad terapéutica para el tratamiento de una amplia gama de estados patológicos que pueden verse beneficiados al incrementar los niveles de óxido nítrico en la sangre.

El término “tratamiento” tal como se utiliza aquí se refiere a la mitigación o prevención de unos trastornos particular. En el caso de condiciones traumáticas como ictus, se prefiere obviamente el tratamiento preventivo. Asimismo, aunque el término “humano” se utiliza para describir el huésped preferido, los expertos en la materia podrán ver que los métodos de la invención presentan una utilidad similar con otros mamíferos.

Los siguientes estados patológicos son ilustrativos de los estados conocidos que se pueden tratar potencialmente: presión arterial elevada, condiciones neurológicas como la depresión; tumores, infecciones bacterianas, virales, protozoarias y micóticas; e impotencia. Esta relación es meramente ilustrativa, y los expertos en la materia podrán comprobar que se pueden tratar con la técnica de la invención otros estados patológicos que se ven beneficiados al aumentar la concentración de ácido nítrico en la sangre.

Se piensa que la vasculopatía periférica está asociada con una reducción del factor de relajación derivado del endotelio (EDRF), y que unos niveles bajos de dicho factor conducen a una contracción del músculo liso de los vasos sanguíneos y por consiguiente a una reducción del diámetro de la luz del vaso y a una reducción del flujo sanguíneo. El EDRF más importante que se presenta de forma natural es el óxido nítrico. Además, el óxido nítrico estabiliza las plaquetas de la sangre reduciendo su acumulación. Por consiguiente todo incremento en los niveles de EDRF (óxido nítrico) tiene un doble efecto beneficioso sobre el sistema circulatorio: inhibe la acumulación de plaquetas haciendo que la sangre sea más fluida y amplía el diámetro de los vasos, mejorando la circulación. Por el contrario, una reducción en los niveles de óxido nítrico puede darse en vasculopatías periféricas y en los demás estados descritos anteriormente que se puede beneficiar por el aumento de la concentración de óxido nítrico en la sangre.

Tal como se ilustra en los ejemplos siguientes, se cree que el método aumenta los niveles de óxido nítrico en la sangre, lo cual puede explicar la forma de actuar en el tratamiento de la invención de vasculopatía periférica y otros estados patológicos asociados con la acumulación de plaquetas de la sangre y deficiencia de óxido nítrico.

Los ejemplos siguientes se dan para ilustrar la invención y no se consideran como limitación de la misma.

Ejemplo 1

Inhibición de la acumulación de plaquetas en la sangre

El siguiente experimento se realizó para estudiar los efectos del tratamiento con ozono/luz ultravioleta sobre la actividad de las plaquetas en la sangre.

Procedimiento experimental

Se tomaron muestras (20 ml) de sangre periférica de 10 individuos para 13 experimentos separados. Cada muestra se dividió en dos partes. La primera parte se trató según la técnica de la invención, en la forma indicada a continuación:

ES 2 280 454 T3

La porción de 10 ml se trató *in vitro* durante 3 minutos con gas ozono (concentración variable de ozono de 5-50 $\mu\text{g/ml}$) y luz ultravioleta (253,7 nm) a una temperatura de 42,5°C. Para realizar el tratamiento de la muestra de sangre se utilizó un aparato como el que se describe en la patente US 4.968.483.

La segunda porción de 10 ml de cada muestra sirvió de control no tratado.

Se aislaron plaquetas de las muestras de control o de las muestras tratadas por centrifugación y se midió en un agregómetro la capacidad de acumulación en respuesta a concentraciones diferentes de ADP (un estimulador natural de plaquetas). Se utilizó una muestra de sangre tratada con ozono y no tratada para la cuantificación del número de plaquetas utilizando un contador Coulter. En algunos de los experimentos descritos a continuación, las porciones de sangre se trataron con concentraciones diferentes de ozono. En otros experimentos que se realizaron, la sangre se trató en presencia y ausencia de radiación por luz UV.

La acumulación de plaquetas en la sangre tratada con ozono se expresó en forma de porcentaje de acumulación en la sangre de control no tratada de la misma persona.

Resultados

Tal como se muestra en el cuadro 1, los resultados de los experimentos indican que el tratamiento de la sangre con ozono y con luz ultravioleta según la invención inhibe la acumulación de plaquetas en la sangre. Además, existen indicios de que esta inhibición está relacionada en cuanto a dosis con la concentración de ozono (véase cuadro 2).

Efecto de niveles elevados de ozono en las plaquetas de la sangre estimuladas por ADP

Unos niveles elevados de ozono (entre 35 y 50 $\mu\text{g/ml}$) produjeron una inhibición medible de la acumulación de plaquetas inducidas por ADP (tomada arbitrariamente como inhibición al 33,3%) en 11 e los 13 experimentos (8 de los 10 individuos). Tomando todos los datos de los 10 individuos, la inhibición media de acumulación de plaquetas fue de 49,2 $\pm$ 27,8% (media $\pm$ sd). No existía ninguna diferencia significativa entre los efectos inhibitorios en sangre tomada de machos y hembras (inhibición media 4,81% y 50,7% respectivamente).

Esta inhibición parece estar relacionada con la concentración de ADP (estimulador de acumulación) en toda la gama de concentración de 0,01-0,1 mM ADP, con un inhibición menor a concentraciones elevadas de agonista de plaqueta. No obstante, esta relación no se mantuvo a concentraciones de ADP más (cuadro 1) y podía ser falsa, aunque el nivel de inhibición a 0,01 nM ADP es notablemente superior al de 0,1 mM ADP (71% frente a 95%, $p < 0,02$).

CUADRO 1

Efecto de altos niveles de ozono en la acumulación de plaquetas en sangre humana en presencia de concentraciones variables de ADP

Fecha (individuo)	concentración de ozono ($\mu\text{g/ml}$)	concentración de ADP (nM)	Porcentaje inhibición de acumulación	recuento plaquetas	
				antes de ozono	después de ozono
21.11.91 (F1)	50	10	100		
27.11.91 (M1)	50	5	83.3		
		10	71.4		
		30	75.0		
2.12.91 (F2)	50	10	0		
		30	10.0		
		100	27.3		
3.12.91 (M2)	50	0.5	67.1		
		1.	57.1		
		5	50.0		
		30	88.1		
6.12.91 (M3)	50	0.1	0	34	49
		0.1	6.2		
		0.5	4.0		
		0.5	0		

ES 2 280 454 T3

5	11.12.91 (M4)	50	0.05 0.1 1.0 10.0	67.0 62.4 74.3 50.0	46	93
10	12.12.91 (M5)	50	0.01 0.1 1.0	67.0 7.1 35.7	51	121
15	13.12.91 (F1)	50	0.01 0.05 0.1 0.5 1.0 5.0 10.0	63.4 22.7 30.4 15.4 20.8 20.0 27.6	33	87
20	9.01.92 (M6)	50	0.01 0.05 0.1	34.2 31.0 9.8	34	40
25			0.5 1.0 5.0	15.4 26.2 31.3		
30	10.01.92 (F3)	50	0.001 0.005 0.01 0.05 0.1 0.5 1.0	71.4 37.5 69.8 33.8 31.2 10.1 21.8	49	64
35						
40	13.01.92 (F4)	50	0.005 0.01 0.05 0.1 0.5 1.0 5.0 10.0	100 100 95.2 92.9 95.8 91.6 95.8 80.0	49	52
45						
50	15.01.92 (F1)	40	0.01 0.05 0.1 0.5 1.0 5.0 10.0 50.0 100.0	90.0 71.4 40.7 87.0 81.8 95.5 85.2 84.0 79.1	81	66
55						
60	21.01.92 (M2)	35	0.01	67.1	68	79
65						

ES 2 280 454 T3

A continuación se da un resumen de los datos que figuran en el cuadro 1:

ADP nM	0,01	0,05	0,10	0,50	1,00	5,00	10,0
Porcentaje Inhibición de Acumulación	70,8	53,5°	34,7	37,6	50,3	60,7	60,7
N =	+/-20,9 6	+/-26,1 6	+/-28,4 8	+/-38,4 7	+/-28,7 7	+/-35,2 4	+/-30,4 4

Efecto de altos niveles de ozono en los recuentos totales de plaqueta de sangre de completa

Como toda reducción aparente de la acumulación de plaquetas tras el tratamiento con ozono de sangre completa podría ser causado por una pérdida de plaquetas de la sangre durante el tratamiento, se realizaron recuentos de plaquetas de sangre completa en las muestras de sangre completa tratadas y no tratadas en 9 experimentos con sangre de 8 individuos. Globalmente, el recuento de plaquetas fue de 115,5 +/- 59,8% del nivel no tratado tras la ozonización (82-264%).

Por consiguiente los recuentos totales de plaquetas antes y después del tratamiento con ozono/UV no indican una pérdida importante de plaquetas de la sangre como resultado de la ozonización.

Efecto de diferentes concentraciones de ozono en la inhibición de la acumulación de plaquetas en sangre humana estimulada con ADP

Se utilizaron tres concentraciones diferentes de ozono (5, 25 y 50 µg/ml) dentro una gama de concentraciones s de ADP en cuatro experimentos sobre cuanto individuos diferentes. Reuniendo los datos para concentraciones de ozono diferentes de cada individuo y calculando la media de los datos de los cuatro experimentos se comprobó que existía cierta relación de respuesta a la dosis entre la concentración de ozono utilizada y la inhibición de acumulación de plaquetas (véase Cuadro 2).

Aunque globalmente estas diferencias no eran significativas, en dos de los cuatro individuos había un efecto inhibitorio notablemente mayor del ozono a 50 µg/ml que a 5 µg/ml (véase cuadro 3).

(Cuadro pasa a página siguiente)

ES 2 280 454 T3

CUADRO 2

Efecto de concentraciones diferentes de ozono en la inhibición de plaquetas en la presencia de ADP

Fecha (individuo)	concentración de ozono (µg/ml)	concentración de ADP (nM)	Porcentaje inhibición de acumulación	recuento plaquetas antes de ozono	después de ozono
3.12.92 (M2)	15	0.1	27.3		
	25	0.1	100		
	5	0.5	0		
	25	0.5			
	50	0.5	67.1		
	5	1.0	0		
	25	1.0	28.6		
	50	1.0	57.1		
	5	5.0	0		
	25	5.0	25.0		
	50	5.0	50.0		
	5	30.0	50.0		
9.01.92 (M6)	25	30.0	62.0		
	50	30.0	88.1		
	5	0.01	20.1	34	43
	25	0.01	28.9		45
	50	0.01	34.2		40
	5	0.05	0		
	25	0.05	5.2		
	50	0.05	31.0		
	5	0.1	9.8		
	25	0.1	1.4		
	50	0.1	9.8		
	5	0.5	0		
10.01.92 (F3)	25	0.5	0		
	50	0.5	15.4		
	5	1.0	22.5		
	25	1.0	13.7		
	50	1.0	26.2		
	5	5.0	0		
	25	5.0	17.8		
	50	5.0	31.5		
	5	0.001	57.1	49	73
	25	0.001	85.7		90
	50	0.001	71.4		64
	5	0.005	37.5		
	25	0.005	80.0		

ES 2 280 454 T3

		50	0.005	37.5		
5		5	0.01	66.4		
		25	0.01	83.2		
		50	0.01	69.8		
10		5	0.05	44.9		
		25	0.05	66.9		
		50	0.05	33.8		
15		5	0.1	29.3		
		25	0.1	61.0		
		50	0.1	31.2		
20		5	0.5	39.4		
		25	0.5	54.5		
		50	0.5	10.1		
25		5	1.0	21.8		
		25	1.0	52.9		
		50	1.0	21.8		
	13.01.92 (F4)	5	0.005	100	49	60
		25	0.005	100		85
		50	0.005	100		52
30		5	0.01	100		
		25	0.01	87.5		
		50	0.01	100		
35		5	0.05	84.8		
		25	0.05	97.1		
		50	0.05	95.2		
40		5	0.1	82.9		
		25	0.1	91.4		
		50	0.1	92.9		
45		5	0.5	83.3		
		25	0.5	95.8		
		50	0.5	95.8		
50		5	1.0	83.2		
		25	1.0	89.5		
		50	1.0	91.6		
55		5	5.0	79.2		
		25	5.0	91.7		
		50	5.0	95.8		
		5	10.0	85.3		
		25	10.0	80.0		
		50	10.0	80.0		

A continuación se recogen los datos que figuran en el Cuadro 2.

Concentración de ozono (µg/ml)	5	25	50
Acumulación de plaquetas (%) (media +/- sd, n=4)	38,5 +/- 30,9	56,5 +/- 29,4	55,9 +/- 26,4

ES 2 280 454 T3

CUADRO 3

Efecto de concentraciones diferentes de ozono en la inhibición de la acumulación de plaquetas en dos individuos

Concentración de ozono ($\mu\text{g/ml}$)	5	25	50
Acumulación de plaquetas M2 (%)	15,5 +/- 20,2	53,9 +/- 30,0	65,6 +/- 14,4
Diferencia respecto de 5 $\mu\text{g/ml}$		ns	p < 0,01
Acumulación de plaquetas M6(%)	8,7 +/- 9,6	11,2 +/- 10,2	24,7 +/- 9,0
Diferencia respecto de 5 $\mu\text{g/ml}$		ns	p < 0,02

ns= no significativo

Efecto de la luz UV en la respuesta de plaquetas al ozono

El efecto del ozono en la acumulación de plaquetas de la sangre humana fue objeto de investigación con concentraciones diferentes de ADP, en presencia o ausencia de luz UV. Los resultados, que se muestran en el cuadro 4, indican que, aunque puede existir alguna respuesta inhibitoria-acumulación de plaquetas al ozono solamente, ésta es casi siempre mayor en presencia de luz UV y el efecto de la luz UV ha sido altamente significativo ($p < 0,001$) en este experimento único. Este resultado también se repitió en el segundo experimento utilizando una sola concentración de ADP (0,01 mM). Los resultados de este segundo experimento se exponen en el cuadro 5.

CUADRO 4

Efecto de la luz UV en la inhibición de la acumulación de plaquetas inducida por ADP por ozono a una concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$ (Fecha del experimento 15.01.92, individuo F1).

Concentración ADP (mM)	Inhibición de acumulación de plaquetas (%)	
	+UV	-UV
0,01	90,0	60,0
0,05	71,4	0
0,1	40,7	40,7
0,5	87,0	0
1,0	81,8	0
5,0	95,5	19,4
10,0	85,2	18,5
50,0	84,0	16,0
100,0	79,1	4,2
Media +/- sd	79,4 +/- 15,1	17,6 +/- 19,6 ($p < 0,001$)

CUADRO 5

Efecto de la luz UV en la acumulación de plaquetas inducida por ADP (0,01 mM) en presencia o ausencia de ozono. (Fecha de experimento 21.01.92, individuo M2).

Porcentaje inhibición de acumulación de plaquetas		
Ozono 35 $\mu\text{g/ml}$ + UV	Ozono 35 $\mu\text{g/ml}$ - UV	sin ozono, UV solamente
83,4%	11,2%	0%

En suma, los resultados del Ejemplo 1 indican que el tratamiento *in vitro* de una porción de sangre con gas ozono y luz ultravioleta inhibe la acumulación de plaquetas en la sangre. Esta inhibición de las plaquetas, según se ha podido

ver esta relacionada en cuanto a dosis con la concentración de ozono. Además, se comprobó que la inhibición de las plaquetas depende en gran medida del tratamiento combinado de luz ultravioleta y gas ozono, según se puede comprobar en los Cuadros 4 y 5. El tratamiento con el gas ozono solo dio como resultado una inhibición mínima de la acumulación de plaquetas mientras que el tratamiento con luz ultravioleta solamente no produjo ninguna inhibición de la acumulación de plaquetas.

Ejemplo 2

Medida del óxido nítrico

Para aclarar el mecanismo por el que la ozonización/luz UV influye en la acumulación de plaquetas en sangre tratada, se midió la concentración de ciertas formas oxidadas de nitrógeno.

Resulta difícil realizar la medida directa de óxido nítrico. Si embargo, el óxido nítrico es un intermedio en una vía de conducción metabólica donde la arginina se convierte en citrulina. Otros productos finales estables son los nitratos y los nitritos.

Por consiguiente, se determinó indirectamente el contenido de óxido nítrico para varias muestras de sangre tratada con luz ultravioleta y gas ozono según el ejemplo 1, midiendo las concentraciones combinadas de nitrato más nitrito en las muestras, antes y después del tratamiento con ozono/luz UV, tras la conversión de nitrato en nitrito.

Los resultados muestran que existe un pequeño incremento en las concentraciones de nitrato más nitrito después del tratamiento ilustrado. Este aumento se comprobó de forma clara en muestras tratadas con gas ozono/luz ultravioleta. Por lo tanto, se pueden potenciar los niveles de óxido nítrico mediante el tratamiento con gas ozono/luz UV y esto puede formar parte del modo de actuación que sigue la invención para lograr una inhibición de la acumulación de plaquetas en la sangre. Este efecto terapéutico sería coherente con la etiología de vasculopatías periféricas descrita anteriormente.

Conclusiones

Los datos de los Ejemplos 1 y 2 sugieren que el tratamiento de la sangre con gas ozono y luz ultravioleta según la invención induce realmente una inhibición de la acumulación de plaquetas por las siguientes razones.

1. El efecto inhibitorio depende por lo menos parcialmente de la concentración de ADP, siendo el ozono más inhibitorio a concentraciones más reducidas de ADP. Esto se interpreta como que las concentraciones superiores de agonista superan en parte el efecto inhibitorio de ozono debido a la "hiperestimulación" de las plaquetas. Este sugiere que la inhibición es por lo menos parcialmente reversible y probablemente no actúa destruyendo la capacidad de las plaquetas de reunirse.

2. El efecto inhibitorio parece estar relacionado en cuanto a dosis con la concentración de ozono, donde las concentraciones más elevadas de ozono dan como resultado una mayor inhibición de la acumulación de plaquetas.

3. El efecto inhibitorio depende de UV, lo cual sugiere que no se trata de un efecto tóxico causado por la capacidad oxidativa de gas ozono.

Ejemplo 3

Se recogió en anticoagulante citrato sódico sangre venosa (20 ml), de 13 voluntarios sanos, no fumadores, 6 mujeres y 7 hombres, de 20-50 años. Ninguno de los voluntarios había tomado medicación alguna durante por lo menos una semana antes de la investigación. La sangre se dividió en dos partes de 10 ml. Una parte se trató con ozono/UV como se describe a continuación, y la otra era una muestra de control no tratada.

Tratamiento con ozono de muestras de sangre

La sangre se trató según la invención, con concentraciones diferentes de ozono utilizando un dispositivo similar al descrito en la patente US n°. 4.968.483. Se burbujeó ozono en oxígeno médico a través de la muestra de sangre a una velocidad de 0,3 l/min durante un período fijo de aproximadamente 3 minutos. La sangre se calentó hasta una temperatura de 42,5°C y se expuso a luz ultravioleta con una longitud de onda de 253,7 nm. La concentración de ozono en el vehículo de oxígeno oscilaba entre aproximadamente 5 y 50 µg/ml y se midió utilizando un monitor de ozono (Humares, Karlsruhe, Alemania).

Estudios sobre la acumulación de plaquetas

Se midió la acumulación de plaquetas utilizando esencialmente el método turbidimétrico de punto final de Born.

Se preparó plasma rico en plaquetas (PRP) centrifugando 10 ml de sangre (sangre tratada con ozono o sangre de control no tratada) a temperatura ambiente durante 20 minutos a 200 x g. Se diluyeron 4 de PRP añadiendo 1,0 ml de salino con tampón de fosfato.

ES 2 280 454 T3

Se colocó el PRP diluido (0,225 ml) en una cubeta de agregómetro que contenía una pequeña barra agitadora magnética (agregómetro modelo 1002, ADG Instruments Ltd., Codicote, Herst, R.U.) y se equilibró a 37°C. Después de iniciar la agitación se añadió 0,025 ml de agonista (ADP- colágeno o reacción de acumulación de plaqueta ADP - reactivo de acumulación de plaqueta colágeno; ambos de Sigma Chemical Co., Poole, Dorset, R.U.) hasta las concentraciones finales indicadas en la sección de resultados que se da a continuación. Se midió el cambio máximo en transmisión de la luz. La acumulación de plaquetas en las muestras tratadas con ozono se expresó como porcentaje de la acumulación en las muestras de control para condición experimental individual.

Se realizaron recuentos de plaquetas de la sangre en sangre completa utilizando un contador Coulter, facilitado por el Departamento de Hematología, Northern General Hospital, Sheffield, R.U.

Resultados

Tras el tratamiento de sangre completa con 35-50 µg/ml de ozono en oxígeno a un caudal de 0,3 l/min durante 3 minutos (masa total de ozono que reaccionó: 31,5-45 mg) con exposición a UV, se produjo un aumento aparente global en el recuento de plaquetas, hasta 1461/57% (media +/- desviación standard, límites 81-202%) del valor de control en los 12 individuos investigados. Esto sugiere que, en las condiciones utilizadas en estos experimentos, el tratamiento de sangre completa con ozono no destruye las plaquetas de la sangre. Además, tras la evaluación visual no se observó ninguna hemólisis notable en la sangre tratada comparado con las muestras de sangre de control, lo cual indicaba que el régimen de tratamiento surtía poco efecto en la integridad de los eritrocitos. Las plaquetas de sangre tratada con 35-50 µg/ml de ozono en la forma anterior mostraron una reducción en capacidad de acumulación en respuesta a ADP (concentraciones de 0,001-100 mmol/l). La inhibición global de la acumulación fue de 53,1 +/- 31,1% (desviación standard media +/-, n=13). La inhibición era variable de un individuo a otro, desde 2,6% a 100%.

Este efecto inhibitor del tratamiento ozono/UV dependía de la concentración de ADP, mostrando un nivel más elevado de inhibición de acumulación de plaquetas a concentraciones reducidas de ADP (véase Cuadro 6). El efecto inhibitor a 0,01 mmol/l ADP fue notablemente superior ($p<0,02$) que a 0,12 mmol/l de este agonista (véase Cuadro 6).

Con colágeno como inductor de acumulación de plaquetas, las plaquetas tratadas con 35-50 µg/ml de ozono en oxígeno también mostraron un nivel elevado de inhibición de la acumulación: 74,2 +/- 43,3% con 1 mg/ml de colágeno y 76,4 +/- 25,2% con 10 mg/ml de colágeno (n=5).

Una reducción en la concentración de ozono en el oxígeno burbujeado a través de la muestra de sangre dio como resultado una reducción en el efecto del tratamiento en la inhibición de la acumulación de plaquetas. Esta diferencia era notable en respuestas individuales al tratamiento, aunque los valores medios globales de los cuatro individuos investigados no fueron muy diferentes (véase Cuadro 7).

CUADRO 6

*Efecto de concentraciones diferentes del agonista de plaqueta ADP en la inhibición de acumulación de plaquetas inducida por ADP mediante el tratamiento de sangre *in vitro* con ozono a una concentración de 50 µg/ml en oxígeno y en radiación UV*

Sujeto	Conc. ADP (mmol/l)	Porcentaje inhibición de Acumulación plaquetas
Hombre 1	0,5	67,1
	1,0	57,1
	5,0	50,0
Mujer 1	0,001	71,4
	0,01	69,8
	0,1	31,2
	1,0	21,8
Mujer 2	0,01	63,4
	0,1	30,4
	1,0	20,8
Media	0,01	70,8 +/-20,9, n=6
	0,05	53,5 +/-26,1, n=6
	0,1	34,7 +/-28,4, n=8*

* notablemente diferente de 0,01 mmol/l, $p<0,02$

CUADRO 7

Efecto de concentraciones diferentes de ozono en la inhibición de la acumulación de plaquetas inducida por ADP por tratamiento de sangre completa in vitro con ozono en oxígeno y radiación UV

Porcentaje inhibición de acumulación plaquetas			
	5	25	50
Sujeto	µg/ml ozono	µg/ml ozono	µg/ml ozono
Hombre 1	15,5	53,9	65,6**
Hombre 2	8,7	11,2	24,7*
Media (n=4)	38,5	56,5	55,9
Sd	30,9	29,4	26,5

** significativo a $p < 0,01$

* significativo a $p < 0,02$

Ejemplo 4

Efecto del tratamiento UV/ozono de sangre in vitro en la concentración de óxido nítrico en plasma

Resumen experimental

Se trató sangre (10 ml) anticoagulada con citrato sódico, de 14 individuos normales sanos, con UV/gas ozono, tal como se describe en el Ejemplo 3, donde el oxígeno contenía ozono en una concentración de 20-50 µg/ml. No se trató la sangre de control de cada individuo. Después de eliminar los componentes celulares de la sangre por centrifugación a 15.000 x g durante 30 segundos, se almacenó el plasma de -20°C.

El óxido nítrico producido metabólicamente a partir de L-arginina es inestable y reacciona con oxígeno para formar nitrato y nitrito. Se midió el total nitrato más nitrito después de convertir el nitrato en nitrito utilizando un catalizador de cadmio. Se midió colorimétricamente el nitrito utilizando el reactivo Griess en un método basado en el publicado por Green, Wagner, Glogowski, Skipper, Wishnok & Tannenbaum en 1982 (*Analytical Biochemistry*, vol. 126, páginas 131-138). Todas las muestras tratadas de control se midieron en una sola tanda de ensayos.

Resultados

Los valores reales de concentración de nitrito variaron ampliamente de un individuo a otro, de 0,6 a 27,6 µmol/l. Para permitir comparaciones entre individuos, la concentración de nitrito en la muestra tratada con ozono se expuso como porcentaje de la concentración en el control correspondiente no tratado. A continuación se recogen los resultados:

	Nº. individuo	porcentaje de nitrito en muestra tratada con ozono comparado con control
5	1	28,0
	2	36,7
	3	48,9
	4	76,4
10	5	110,0
	6	133,3
	7	157,6
	8	162,9
	9	175,8
15	10	350,0
	11	845,5
	12	985,7
	13	2075,0
20	14	3067,0
	Media aritmética	589,5%

25 Estos valores no forman una distribución normal. No obstante, se puede conseguir una distribución aproximadamente normal tras la transformación logarítmica de los datos. Después de la transformación logarítmica, el nivel de nitrito en las muestras de sangre UV/tratadas con ozono es notablemente superior al de las muestras no tratadas ($p < 0.001$).

30 *Estudios de la inhibición*

El óxido nítrico inhibe la acumulación de plaquetas - esta es una de sus actividades fisiológicas, es bien sabido que el efecto del óxido nítrico en las plaquetas se puede inhibir mediante oxihemoglobina libre (Salvemini, Radziszewski, Korbut & Vane, *Br. J. Pharmacol.*, vol. 101, páginas 991-995, 1990). Investigamos por lo tanto el efecto de la oxihemoglobina en la acción inhibidora de acumulación de plaquetas del tratamiento de sangre completa UV/gas ozono.

Resumen experimental

40 Se preparó plasma rico en plaquetas a partir de sangre completa, tratada con UV/ozono o no tratada (control), por centrifugación a 200 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente. La acumulación de plaquetas en respuesta a ADP, colágeno o trombina como estimulantes, se midió en un agregómetro. Se añadió oxihemoglobina al plasma rico en plaquetas tras la ozonización y antes de medir la actividad de acumulación de plaqueta. Si el tratamiento de la sangre con UV/ozono para inhibir la acumulación de plaquetas actúa a través de un mecanismo mediado por el óxido nítrico, entonces la adición de oxihemoglobina debería evitar la inhibición de la acumulación de plaquetas causada por UV/ozonización. Los resultados se exponen en el cuadro 8 siguiente.

CUADRO 8

	Sujeto	agonista de plaquetas	nº. Hb	Porcentaje inhibición de Acumulación de plaquetas Después de tratamiento con Ozono/UV 10 µmmol/l Hb
50	Mujer a	trombina 100 iu	23	4
	Mujer b	trombina 100 iu	57	0
60		Trombina 10 iu	97	57
		ADP 1 mmol/l	36	0
	Hombre a	trombina 10 iu	80	79
65		Colágeno 1 mg/ml	95	80
		ADP 1 mmol/l	16	0
		ADP 0,1 mmol/l	26	9

ES 2 280 454 T3

Aunque bastante variables, dos de los tres sujetos mostraron reducciones en la inhibición de la acumulación de plaquetas tras la terapia UV/ozono, en presencia de hemoglobina y el tercer sujeto mostró alguna reducción con tres de las cuatro condiciones de acumulación utilizadas. La media global de acumulación de plaquetas fue de 54% sin hemoglobina y 29% en presencia de este inhibidor de la actividad del óxido nítrico.

Conclusiones

Los datos anteriores muestran que la ozonización de la sangre aunque el nivel de los nitritos (el metabolito estable de óxido nítrico), y que la inhibición de la acumulación de plaquetas causada por la ozonización de la sangre se puede invertir con hemoglobina, un inhibidor del óxido nítrico. Tomados juntos, estos datos sugieren con cierto grado de certeza el tratamiento de la sangre con UV/ozono aumenta los niveles *in vitro* de óxido nítrico en la sangre e inhibe la acumulación de plaquetas a través de un mecanismo mediado por óxido nítrico.

Una vez descrita la invención, resulta evidente que la misma se puede modificar de muchas formas y se considera que cada una de estas modificativas está comprendida dentro del ámbito de las reivindicaciones siguientes.

REIVINDICACIONES

1. La utilización de una porción de sangre que se ha puesto en contacto con una cantidad de gas ozono y radiación ultravioleta eficaz para incrementar la concentración de óxido nítrico, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un estado patológico asociado con niveles de óxido nítrico inadecuados en la sangre.

2. La utilización de la reivindicación 1, en la que el gas ozono tiene una concentración de aproximadamente 0,5 $\mu\text{g/ml}$ a aproximadamente 100 $\mu\text{g/ml}$ en la sangre.

3. La utilización de la reivindicación 2, donde el gas ozono tiene una concentración de aproximadamente 0,5 $\mu\text{g/ml}$ a aproximadamente 50 $\mu\text{g/ml}$.

4. La utilización de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la radiación ultravioleta tiene una longitud de onda de aproximadamente 253,7 nm.

5. La utilización de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la sangre se mantiene a una temperatura comprendida entre 0°C y 56°C aproximadamente mientras se pone en contacto con el gas ozono y la radiación ultravioleta.

6. La utilización de la reivindicación 5, donde la sangre se mantiene a una temperatura comprendida entre 37°C y 43°C aproximadamente mientras se pone en contacto con el gas ozono y la radiación ultravioleta.

7. La utilización de la reivindicación 6, donde la sangre se mantiene a una temperatura comprendida entre 42,5°C mientras está en contacto con el gas ozono y la radiación ultravioleta.

8. La utilización de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la sangre tratada comprende de 0,01 ml a 400 ml aproximadamente.

9. La utilización de la reivindicación 8, donde la sangre tratada comprende aproximadamente 10 ml de sangre.

10. La utilización de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la sangre se pone en contacto con el gas ozono y la radiación ultravioleta durante un período de aproximadamente 3 minutos.

11. La utilización de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la sangre es sangre humana.

12. La utilización de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el estado patológico se elige dentro del grupo formado por presión arterial elevada, depresión, tumor, infección bacteriana, acumulación de plaquetas asociada con enfermedades e infección micótica.