



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 270 245**

(51) Int. Cl.:
C07D 487/22 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **04020375 .4**

(86) Fecha de presentación : **27.08.2004**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1538151**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **08.06.2005**

(54) Título: **Vehículo de oxígeno artificial y su método de producción.**

(30) Prioridad: **28.08.2003 JP 2003-305036**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

(73) Titular/es: **NIPRO CORPORATION**
9-3, Honjo-nishi 3-chome
Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 531-8510, JP

(72) Inventor/es: **Tsuchida, Eishun;**
Takeoka, Shinji;
Komatsu, Teruyuki;
Kai, Toshiya;
Katayama, Naohisa;
Fukutomi, Ippei y
Sato, Makoto

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Vehículo de oxígeno artificial y su método de producción.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un vehículo de oxígeno artificial capaz de adsorber y desorber oxígeno reversiblemente en organismos vivos, y una preparación de infusión de oxígeno artificial que comprende un vehículo de oxígeno artificial. Más particularmente, la presente invención se refiere a un complejo de albúmina y un complejo metálico en forma desoxi que tiene la estructura de porfirina, que es altamente seguro y de alta calidad y que se usa en el campo sanitario para el suministro de oxígeno en penumbra isquémica o en tejido tumoral, para la infusión de sangre de pacientes con hemorragia masiva, y como un líquido de perfusión para la conservación de órganos, una solución para la circulación extracorpórea o un fluido para cultivo celular, y su método de producción.

15 **Antecedentes de la invención**

Se sabe que las proteínas en plasma, o los coloides en plasma, juegan un papel clave en el mantenimiento del flujo sanguíneo en los vasos sanguíneos de organismos vivos. En vista a esto, para hacer que los pacientes se recuperen de un choque hemorrágico, se ha usado convencionalmente como reemplazo del fluido un expansor del plasma que tiene casi la misma presión osmótica coloidal que la sangre de organismos vivos. En el caso de una pérdida masiva del 30% o más del volumen de sangre circulante, sin embargo, se vuelve insuficiente el suministro de oxígeno a los tejidos periféricos, y la administración de un vehículo de oxígeno se hace necesaria además de la administración del expansor del plasma.

Como vehículo de oxígeno, se ha usado de manera convencional sangre natural que contiene glóbulos rojos naturales y una solución viscosa de glóbulos rojos. Para evitar la coagulación sanguínea debido a reacciones de anticuerpo y antígeno, los grupos sanguíneos del donante y el receptor tienen que coincidir y se necesitan hacer pruebas cruzadas cuando se usan. La sangre natural y la solución viscosa de glóbulos rojos pueden ser eficaces sólo mediante su conservación durante un período corto de 3 semanas (4°C). Por otra parte, la sangre congelada que permite una conservación a largo plazo por crio-conservación es susceptible problemáticamente a un alto coste y a hemólisis debido al choque osmótico durante su uso. Además, es preocupante la existencia de enfermedades infecciosas, tales como la hepatitis, el SIDA y similares.

Como un vehículo de oxígeno para solucionar tales problemas, se han estudiado diversos vehículos de oxígeno artificiales. Una preparación de infusión de oxígeno (en lo sucesivo en este documento albúmina-hemo), en la que un derivado de hemo, el complejo 2-[8-[N-(2-metilimidazolil)]octanoiloximetil]-5,10,15,20-tetraquis($\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$ -o-pivalamido)fenilporfinato-hierro, etc., es adsorbido en una bolsita hidrófoba de albúmina humana o albúmina recombinante, ha sido sintetizado y su capacidad de transporte de oxígeno ha sido confirmada (E. Tsuchida, *et al.*, *Bioconjugate Chemistry*, vol. 8, 534-538, 1997).

Para la producción de estos vehículos de oxígeno artificiales, se ha usado de manera convencional el monóxido de carbono tóxico (en lo sucesivo en este documento CO).

Komatsu *et al.*, *Bioconjugate Chemistry*, vol. 10, 797-802, 1999 (página 800, columna izquierda, línea 2 de la línea 1 de la columna inferior derecha) describe que la albúmina-hemo es degradada al 50% en presencia de oxígeno a 25°C: 8 h, o a 37°C: 2 h. De este modo, cuando el oxígeno está presente en la etapa de producción, un complejo de hierro divalente se hace trivalente y no se satisface la función de vehículo de oxígeno, fallando así en proporcionar un albúmina-hemo que tenga una capacidad de transporte de oxígeno suficiente.

Para bloquear completamente la mezcla de oxígeno durante la etapa de producción, sin embargo, se requiere una instalación extremada y altamente avanzada. Ya que la instalación general no puede prevenir la mezcla de oxígeno, ha sido una práctica convencional usar CO para producir el vehículo de oxígeno de modo que el vehículo de oxígeno no será degradado incluso cuando el oxígeno se mezcla en la etapa de producción. La unión del CO a un complejo de porfirina de hierro (en lo sucesivo en este documento abreviado como hemo) mantiene al hierro divalente del hemo en un nivel estable, y puede ser suprimida la reacción de oxidación en hierro trivalente.

Un ejemplo del método de producción del vehículo de oxígeno artificial que utiliza CO comprende primero formar un CO-PFP haciendo reaccionar la porfirina bloqueada físicamente (en lo sucesivo en este documento PFP; siglas en inglés de "picket-fence porphyrin") con CO. Este CO-PFP se reduce después con ditionito. Entonces, se mezcla CO-PFP con albúmina de suero humano (en lo sucesivo en este documento HSA) para dar un complejo con HSA (en lo sucesivo en este documento CO-PFP-HSA). Se puede confirmar la formación de CO-PFP-HSA por cromatografía y ultrafiltración. El CO puede ser eliminado exponiendo una muestra a la luz en un tonómetro que contiene oxígeno. Eliminando el oxígeno del O₂-HSA-PFP resultante por el reemplazo con nitrógeno, puede ser obtenido HSA-PFP (documento JP-T-10-503489, página 14, líneas 5-11).

Sin embargo, para realizar tal etapa de producción en una atmósfera de CO, es necesaria una cantidad grande de CO, lo que puede causar un daño fatal al cuerpo humano.

En vista de lo anterior, se desea un método de producción sin CO en la etapa de producción y degradación del vehículo de oxígeno artificial.

Cuando el vehículo de oxígeno artificial producido de esta manera se coloca en conservación enfriado bajo una atmósfera de CO, la degradación por la reacción de oxidación es suprimida de modo similar a como se describe anteriormente. Sin embargo, cuando el CO se une, debido a la ausencia de la capacidad de unión de oxígeno, se hace necesaria una etapa para eliminar el CO antes de la administración. El CO también se genera en esta etapa y plantea problemas tales como el miedo a que afecte al cuerpo humano y la incapacidad de tratarlo en la administración con situaciones de emergencia.

Como un método para solucionar tales problemas, el documento JP-A-2001-72595 describe (párrafo 0028) un método para conservar albúmina-hemo convirtiendo el mismo a desoxi-hemo. Más concretamente, después de la confirmación con respecto a una solución salina fisiológica de albúmina-hemo preparada de acuerdo con Komatsu *et al.*, *Bioconjugate Chemistry* vol. **10**, 797-802, 1999 (página 800, columna izquierda, línea 2 de la columna inferior derecha, línea 1) de que el hemo está en un estado divalente de hierro, la dispersión se expone a nitrógeno o a otros gases inertes (argón, helio y similares) sin oxígeno para eliminar el oxígeno de esta dispersión, por lo cual el oxígeno disuelto se agota y el oxi-hemo se convierte en desoxi-hemo sin oxígeno unido para la conservación.

En este método descrito en el documento JP-A-2001-72595, sin embargo, aunque el CO no se use para la desoxidización en la forma de conservación el CO todavía se use en las etapas de producción (por ejemplo, Ejemplo 1, Ejemplo 7 del documento JP-A-2001-72595 y Komatsu *et al.*, *Artificial Blood*, vol. **6**, 110-114, 1998 (página 111, columna izquierda, líneas 16-19)).

Los métodos de producción convencionales de vehículos de oxígeno artificiales (por ejemplo, vesículas de hemoglobina, vesículas de hemo lipídicas, microesferas de hemo-triglicéridos lipídicas, albúmina-hemo y similares) que utilizan CO están asociados con los problemas anteriormente mencionados y se desea un método de producción de vehículos de oxígeno artificiales más seguros y fáciles de manejar. Sin embargo, no ha sido publicado anteriormente ningún método de producción de un vehículo de oxígeno artificial sin uso de CO en la etapa de producción.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un método para producir un complejo de albúmina y un complejo metálico que tiene la estructura de porfirina, que es un vehículo de oxígeno artificial, sin usar CO.

La presente invención se ha hecho para solucionar estos problemas. Como consecuencia de estudios intensivos de los presentes inventores, se ha encontrado que el complejo metálico en forma desoxi sin CO unido, que tiene la estructura de porfirina, es extremadamente fácil de oxidar, y que gran parte de la reacción de oxidación ocurre debido al fluido de sustitución usado para la ultrafiltración, fluido dializante usado para la diálisis y similar en la etapa de purificación, de un complejo de albúmina y un complejo metálico que tiene la estructura de porfirina. Además, los inventores han encontrado que los problemas anteriormente mencionados pueden ser solucionados produciendo un complejo de albúmina y un complejo metálico en forma desoxi que tiene la estructura de porfirina y preferiblemente añadiendo un agente reductor al fluido de sustitución o al fluido dializante usado para la etapa de purificación bajo una atmósfera de gas sustancialmente sin monóxido de carbono (CO) y oxígeno (en lo sucesivo en este documento O₂), y han completado la presente invención.

En consecuencia, la presente invención proporciona:

(1) un método para producir un complejo de albúmina y un complejo metálico en forma desoxi que tiene la estructura de porfirina, que comprende mezclar la albúmina y un complejo metálico que tiene la estructura de porfirina bajo una atmósfera de gas sustancialmente sin monóxido de carbono ni oxígeno,

(2) el método de producción de (1), que comprende convertir un complejo metálico en forma oxi que tiene la estructura de porfirina en un complejo metálico en forma desoxi que tiene la estructura de porfirina y mezclar el complejo resultante con albúmina,

(3) el método de producción de (2), en el que el complejo metálico en forma oxi que tiene la estructura de porfirina es convertido al complejo metálico en forma desoxi que tiene la estructura de porfirina en presencia de un agente reductor,

(4) el método de producción de (2), en el que el complejo metálico en forma oxi que tiene la estructura de porfirina es convertido en el complejo metálico en forma desoxi que tiene la estructura de porfirina por el reemplazo de nitrógeno,

(5) el método de producción de (1), en el que, en la etapa de mezclar la albúmina y un complejo metálico que tiene la estructura de porfirina, un metal central del complejo metálico que tiene la estructura de porfirina es del tipo reductor,

ES 2 270 245 T3

(6) el método de producción de (1), en el que se añade una solución de albúmina acuosa después de la eliminación del oxígeno disuelto en un recipiente sellado relleno de un gas sustancialmente sin monóxido de carbono ni oxígeno, y luego se mezcla una solución de un complejo metálico que tiene la estructura de porfirina en un disolvente orgánico y un agente reductor,

(7) el método de producción de (1), en el que el complejo metálico que tiene la estructura de porfirina es un derivado de hemo,

(8) el método de producción de (1), en el que el gas es un gas inerte,

(9) el método de producción de (8), en el que el gas inerte es de una o varias clases de gases seleccionado a partir del grupo que consiste en hidrógeno, helio, argón, nitrógeno y neón,

(10) el método de producción de (3), en el que el agente reductor es de una o varias clases seleccionado a partir del grupo que consiste en ácido ditionoso, ditionito de sodio, hidrógeno-sulfito de sodio, sulfito de sodio, sulfito de sodio seco, pirosulfito de sodio, metabisulfito de sodio, Rongalite, ácido L-ascórbico, L-ascorbato de sodio, ácido eritórbito, eritorbato de sodio, cisteína, tioglicerol, α -tioglicerina, edetato de sodio, ácido cítrico, citrato isopropílico, dicloroisocianurato de potasio, tioglicolato de sodio, tiomalato de sodio, 1,3-butilenglicol-pirosulfito de sodio, butilhidroxianisol, dibutilhidroxitolueno, galato de propilo, palmitato de ascorbilo, agente asociado a la vitamina E, dl- α -tocopherol, acetato de tocoferol, vitamina E natural, d- δ -tocopherol, concentrado de tocoferol mezclado, resina de guayaco, ácido nordihidroguayarático, estearato de L-ascorbilo, lecitina de soja, ácido ascórbico palmítico, benzotriazol, pentaeritritil-tetraquis[3-(3,5-di-t-butil-4-hidroxifenil)propionato]-2-mercaptobencimidazol, etilendiamina-tetraacetato de disodio y calcio y etilendiamina-tetraacetato de disodio,

(11) el método de producción de (6), en el que el disolvente orgánico es etanol,

(12) un método de acuerdo con (1) con la etapa subsecuente de purificar el complejo por ultrafiltración usando, como fluido de sustitución, una solución acuosa que contiene un agente reductor y/o que no contiene oxígeno,

(13) un método de acuerdo con (1) con la etapa subsecuente de purificar el complejo por diálisis usando, como fluido dializante, una solución acuosa que contiene un agente reductor y/o que no contiene oxígeno,

Ya que el complejo de albúmina y el complejo metálico en forma desoxi que tiene la estructura de porfirina de la presente invención es producido por etapas sin CO, esto puede usarse como vehículo de oxígeno artificial altamente seguro.

Además, dado que el método de producción de la presente invención elimina la necesidad de un sistema de control estricto que prevenga fugas de CO, antes requerido por la etapa de producción de vehículos de oxígeno artificiales convencionales, la instalación de la producción puede ser simplificada y miniaturizada consecuentemente.

Cuando se usa CO en la etapa de producción como en los casos convencionales, la etapa de eliminar el CO es necesaria antes de usar finalmente el producto como vehículo de oxígeno. Para este fin, si se dispone de una luz extremadamente intensa y se insufla oxígeno, se puede formar un complejo metálico que tiene la estructura de porfirina del tipo oxidante, lo que puede causar una situación en la que la función como vehículo puede no ser satisfecha. De acuerdo con el método de producción de la presente invención, la etapa para eliminar el CO no es necesaria porque el CO no se usa en la etapa de producción, previniéndose así la degradación de la calidad, lo que hace posible administrar el vehículo tal como esté en caso de emergencia.

El complejo de albúmina y el complejo metálico en forma desoxi que tiene la estructura de porfirina de la presente invención puede ser aplicado como vehículo de oxígeno en un amplia área de los campos de la medicina y la farmacia, y puede ser usado como sangre para infusión, tal como esté o como una mezcla que contenga un aditivo cuando sea necesario como sustituto de la sangre en tratamientos clínicos.

Además, el complejo de albúmina y el complejo metálico en forma desoxi que tiene la estructura de porfirina de la presente invención puede ser administrado intravenosamente como tal si no se aplica el tratamiento para la unión de CO en conservación a largo plazo. El complejo administrado de albúmina y el complejo metálico en forma desoxi que tiene la estructura de porfirina se une inmediatamente con el oxígeno al pasar por el pulmón para volverse su forma oxi y liberar el oxígeno en los vasos sanguíneos periféricos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un anillo de porfirina. La Figura 2 muestra un ejemplo de un anillo de porfirina.

Descripción detallada de la invención

En la presente invención, "un complejo metálico que tiene la estructura de porfirina" significa un complejo metálico en el que un metal central está coordinado en un anillo de porfirina, y puede contener un anillo de porfirina modificado o tener una capacidad de unión reversible con el oxígeno, todo lo cual está abarcado por ello. El anillo de porfirina

significa un compuesto macrocíclico en el que cuatro anillos de pirrol como se muestra en la Figura 1 están unidos alternativamente a cuatro grupos metino en la posición α y sus derivados. Un complejo metálico que tiene la estructura de porfirina se ejemplifica por uno en el que el centro del anillo de porfirina mostrado en la Figura 2 (2-[8-[N-(2-metilimidazolil)]octanoiloximetil]-5,10,15,20-tetraquis($\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$ -o-pivalamido)fenil-porfirina) está coordinado con hierro.

5 El metal central de tal complejo metálico es generalmente un elemento de transición, preferiblemente un elemento de transición de los grupos 6-10 de la tabla periódica, y los elementos de transición del período 4 son más preferibles. De estos, hierro, cobalto, cromo y similares son preferibles, más preferiblemente hierro (II) y cobalto (II).

Además, un “complejo metálico en forma desoxi” significa un complejo metálico en el que el oxígeno no está
10 unido al metal central, tal como un complejo metálico en el que el oxígeno no está unido al metal central, hierro (II). Un “complejo metálico en forma oxi” significa un complejo metálico en el que el oxígeno está unido al metal central, tal como un complejo metálico en el que el oxígeno está unido al metal central, hierro (II).

En la presente invención, un “complejo metálico que tiene la estructura de porfirina” es preferiblemente un “derivado de hemo”. Un “derivado de hemo” significa un complejo de hierro que tiene la estructura de porfirina, que puede ser
15 un derivado que tiene un anillo de porfirina deforme o que tiene una capacidad de unión reversible con el oxígeno, todo lo cual está abarcado por ello. Como un derivado de hemo pueden ser mencionados, por ejemplo, tetrafenilporfirina, protoporfirina, octaalquil-porfirina y sus derivados y similares. De estos, la tetrafenilporfirina es preferible.

En la presente invención, el “complejo de albúmina y el complejo metálico en forma desoxi que tiene la estructura de porfirina” se obtiene uniendo albúmina y un complejo metálico que tiene la estructura de porfirina, y que tiene una
20 una capacidad de adsorción y desorción de oxígeno reversibles. Por ejemplo, puede ser mencionado un complejo de derivado de hemo y albúmina (en lo sucesivo en este documento albúmina-hemo) y similares.

Un complejo metálico que tiene la estructura de porfirina en el que el metal central es del tipo oxidante carece de la capacidad de adsorción y desorción reversibles de oxígeno. Por lo tanto, es necesario para el complejo de albúmina y el complejo metálico en forma desoxi que tiene la estructura de porfirina de la presente invención que contengan un
25 metal central del tipo reductor. Sin embargo, es difícil convertir un metal central de un complejo metálico que tiene la estructura de porfirina que contiene un metal central del tipo oxidante (por ejemplo, hierro (III)) a un tipo reductor (por ejemplo, hierro (II)) después de la unión a albúmina.

Por lo tanto, cuando se une un complejo metálico que tiene la estructura de porfirina con albúmina, el metal central del complejo metálico que tiene la estructura de porfirina es preferiblemente del tipo reductor. Por ejemplo, cuando
30 se une un complejo de hierro que tiene la estructura de porfirina con albúmina, el metal central del complejo es preferiblemente del tipo reductor, hierro (II).

Es también posible aplicar la idea de la presente invención a un complejo de albúmina y un complejo metálico en forma desoxi que tiene la estructura de porfirina, así como a vehículos de oxígeno artificiales tales como vesículas de hemoglobina, vesículas de hemo lipídicas, microesferas de hemo-triglicérido lipídicas y similares, o su mezcla o
40 complejo y otros por el estilo.

Como la albúmina que se usa en la presente invención no está particularmente limitada también pueden ser mencionados, por ejemplo, albúmina de suero humana, albúmina de suero derivada de albúmina de suero animal, recombinante humano (rHSA), y sus multímeros y similares. Desde el aspecto de la prevención de infecciones y similares,
45 es particularmente preferible rHSA.

Como ejemplos de albúmina-hemo de la presente invención puede mencionarse un derivado de tetrafenilporfirina de hierro, el complejo 2-[8-[N-(2-metilimidazolil)]-octanoiloximetil]-5,10,15,20-tetraquis($\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$ -o-pivalamido)fenilporfinato-hierro, y similares que se incluyen en un bolsita hidrófoba de albúmina (E. Tsuchida, *et al.*, *Bioconjugate Chemistry*, vol. 8, 534-538, 1997) y similares.
50

En la presente invención, “una atmósfera de gas sustancialmente sin monóxido de carbono ni oxígeno” significa una atmósfera de gas en la que el contenido de CO es menos que la cantidad influyente en el cuerpo humano, y el
55 contenido de O₂ es inferior a la cantidad que degrada un complejo de albúmina y un complejo metálico en forma desoxi que tiene la estructura de porfirina. Esto significa que son toleradas la presencia de una pequeña cantidad de monóxido de carbono que no tiene ninguna influencia sobre el cuerpo humano y la presencia de oxígeno en el intervalo en el que el complejo de albúmina y el complejo metálico en forma desoxi que tiene la estructura de porfirina de la presente invención pueden ser obtenidos establemente. Más concretamente, la concentración de monóxido de carbono en la atmósfera de gas anteriormente mencionada es preferiblemente no más de 0,1 ppm, y la concentración
60 de oxígeno en la atmósfera de gas anteriormente mencionada es preferiblemente no más del 1% (aprox. 10000 ppm), más preferiblemente no más del 0,1% (aprox. 1000 ppm), y todavía más preferiblemente no más de 100 ppm.

Un gas que constituye la atmósfera de gas anteriormente mencionada es preferiblemente un gas inerte. Un gas inerte significa un gas químicamente inactivo, tal como un gas noble tal como helio, argón, neón y similares, y nitrógeno e
65 hidrógeno. El uso del gas nitrógeno es industrialmente preferible.

Como agente reductor en la presente invención, pueden mencionarse, por ejemplo, ácido ditionoso, sal de ditionito (ditionito de sodio y similares), sal de hidrógeno-sulfito (hidrógeno-sulfito de sodio y similares), sal de sulfito (sulfito

de sodio, sulfito de sodio seco y similares), sal de pirosulfito (pirosulfito de sodio y similares), sal de metabisulfito (metabisulfito de sodio y similares), Rongalite ($\text{CH}_2\text{OHSO}_2\text{Na}$), ácido ascórbico o su sal (ácido L-ascórbico, L-ascorbato de sodio y similares), ácido eritórbito o su sal (eritorbato de sodio y similares), cisteína (preferiblemente hidrocloreto de cisteína), tioglicerol, α -tioglicerina, sal de edetato (edetato de sodio y similares), ácido cítrico, citrato isopropílico, sal de dicloroisocianurato (dicloroisocianurato de potasio y similares), sal de tioglicolato (tioglicolato de sodio y similares), sal de tiomalato (tiomalato de sodio y similares), 1,3-butilenglicol-pirosulfito de sodio, butilhidroxianisol (BHA), dibutilhidroxitolueno (BHT), galato de propilo, palmitato de ascorbilo, dl- α -tocoferol, acetato de tocoferol, vitamina E natural, d- δ -tocoferol, concentrado de tocoferol mezclado, resina de guayaco, ácido nordihidroguayarático (NDGA), estearato de L-ascorbilo, lecitina de soja, ácido ascórbico palmítico, benzotriazol, pentaeritritil-tetraquis [3-(3,5-di-t-butil-4-hidroxyfenil)propionato]-2-mercaptobencimidazol, etilendiamina-tetraacetato de disodio y calcio y etilendiamina tetraacetato de disodio. De estos, el ácido L-ascórbico y el L-ascorbato de sodio son preferibles. Sólo una clase de agente reductor seleccionado a partir de tal grupo puede usarse, o pueden usarse simultáneamente dos o más clases de agentes reductores.

En la presente invención, el “reemplazo de nitrógeno” significa una operación para eliminar el oxígeno colocando un objeto bajo una atmósfera de nitrógeno. Por ejemplo, un complejo metálico en forma oxi que tiene la estructura de porfirina es colocado bajo una atmósfera de nitrógeno para eliminar el oxígeno, convirtiéndolo así en un complejo metálico en forma desoxi que tiene la estructura de porfirina. Como un método para el reemplazo de nitrógeno pueden mencionarse un método que comprende burbujear gas nitrógeno en una solución de una sustancia objeto (en lo sucesivo en este documento burbujeo de nitrógeno) y un método que comprende pulverizar gas nitrógeno en una superficie de una solución de una sustancia objeto (flujo de nitrógeno).

El método de producción de la presente invención incluye preferiblemente la etapa de añadir una solución acuosa de albúmina después de la eliminación de oxígeno disuelto en un recipiente sellado relleno de un gas sustancialmente sin monóxido de carbono ni oxígeno, y luego mezclar un agente reductor con una solución de un complejo metálico que tiene la estructura de porfirina en un disolvente orgánico.

El disolvente orgánico que disuelve el complejo metálico que tiene la estructura de porfirina no está particularmente limitado siempre que pueda disolver un complejo metálico que tenga una estructura de porfirina. Generalmente, se usa un disolvente orgánico soluble en agua, con preferencia dada al etanol para uso como producto farmacéutico. Aunque la cantidad del complejo metálico que tiene estructura de porfirina en una solución de un disolvente orgánico puede ser ajustada de acuerdo con el objeto del uso, es preferiblemente aproximadamente 1-10 moles por 1 mol de albúmina. Es preferible añadir el agente reductor anteriormente mencionado a un disolvente orgánico para un complejo metálico que tenga una estructura de porfirina.

La solución del complejo metálico que tiene la estructura de porfirina en el disolvente orgánico se somete a un reemplazo de nitrógeno previo, tal como burbujear el nitrógeno y similares, mediante el cual, antes de la mezcla con la solución acuosa de albúmina, el complejo metálico en forma oxi que tiene la estructura de porfirina es convertido a un complejo metálico en forma desoxi que tiene la estructura de porfirina. El tiempo de burbujeo del nitrógeno es preferiblemente aproximadamente 1-30 minutos.

La concentración de la solución acuosa de albúmina es preferiblemente menos de aproximadamente 25% (p/p). Cuando la concentración es baja, la eficacia de producción se hace pobre. El oxígeno es eliminado preferiblemente de una solución acuosa de albúmina previamente, antes de mezclar con la solución del complejo metálico que tiene la estructura de porfirina en un disolvente orgánico. Por ejemplo, se mezcla con un disolvente después de la eliminación de oxígeno por burbujeo de nitrógeno y similar, y se somete al flujo de nitrógeno cuando sea necesario para eliminar el oxígeno. El disolvente anteriormente mencionado particularmente no está limitado siempre que pueda usarse para la producción de la inyección y pueden mencionarse solución salina fisiológica, y agua para la inyección, tampón y similares. El burbujeo directo de nitrógeno en una solución acuosa de albúmina no modifica preferiblemente la albúmina. El tiempo de burbujeo del nitrógeno es preferiblemente aproximadamente 1-60 minutos.

Para mezclar un disolvente orgánico que disuelva a un complejo metálico que tiene la estructura de porfirina con una solución acuosa de albúmina, se añade primero una solución acuosa de albúmina en un recipiente sellado relleno de un gas sustancialmente sin monóxido de carbono ni oxígeno, y luego se añade un disolvente orgánico para disolver el complejo metálico que tiene la estructura de porfirina mediante una pequeña cantidad y la mezcla preferiblemente se mezcla moviéndola. La mezcla se realiza en condiciones de temperaturas generalmente de aproximadamente 0-60°C, preferiblemente de aproximadamente 10-50°C, de modo que la congelación de la solución acuosa y la desnaturización de la albúmina no ocurran. El tiempo de mezcla es un tiempo necesario para mezclar uniformemente la albúmina y el complejo metálico que tiene la estructura de porfirina y para obtener la cantidad deseada del complejo de albúmina y el complejo metálico que tiene la estructura de porfirina.

En la presente invención, el “método purificado de un complejo de albúmina y el complejo metálico en forma desoxi que tiene la estructura de porfirina” es un método para separar un disolvente o una impureza en una solución que contiene un complejo de albúmina y un complejo metálico en forma desoxi que tiene la estructura de porfirina usando varios métodos de purificación de sangre conocidos y otros por el estilo. Por ejemplo, pueden ser aplicados varios métodos de purificación conocidos tales como la diálisis de la sangre, la filtración por diálisis de sangre, la filtración de la sangre y similares. Es preferible realizar la filtración usando una membrana de ultrafiltración por un método de filtración de sangre y complementar con un fluido de sustitución cuando sea necesario en una solución

que contenga el complejo de albúmina y el complejo metálico en forma desoxi que tiene la estructura de porfirina. Además, puede ser realizada la diálisis usando una membrana semipermeable y un fluido dializante por un método de diálisis de sangre. El fluido de sustitución o el fluido dializante que se usa en esta invención preferiblemente es una solución acuosa que contiene un agente reductor y/o que no contiene oxígeno. Como agente reductor, pueden usarse los similares a los que se añaden al disolvente anteriormente mencionado para el complejo metálico que tiene la estructura de porfirina, y como un método para eliminar el oxígeno, pueden usarse varios métodos conocidos tales como burbujear nitrógeno y similares. Mediante el uso de tal fluido de sustitución, puede prevenirse la oxigenación del complejo de albúmina y del complejo metálico en forma desoxi que tiene la estructura de porfirina.

La preparación de la infusión de oxígeno artificial obtenida por el método de la presente invención es un líquido que contiene un complejo de albúmina y un complejo metálico en forma desoxi que tiene la estructura de porfirina que tiene la capacidad de transportar oxígeno.

La preparación de la infusión de oxígeno artificial de la presente invención puede contener, cuando sea necesario, un compuesto capaz de proporcionar una presión osmótica coloidal. Como compuesto capaz de proporcionar una presión osmótica coloidal, pueden usarse varios polímeros usados como agentes farmacéuticos siempre que tengan la presión osmótica coloidal. Los ejemplos de estos incluyen dextrano (por ejemplo, dextrano de peso molecular bajo), derivado de dextrano (por ejemplo, carboximetil-dextrano, carboxi-dextrano, dextrano catiónico, sulfato de dextrano), almidón de hidroxietilo, almidón de hidroxipropilo, gelatina (por ejemplo, gelatina modificada), albúmina (por ejemplo, plasma humano en bruto, albúmina de suero humano, proteína de plasma calentada humana, albúmina recombinante de suero humano), PEG, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa, goma de acacia, glucosa, dextrosa (por ejemplo, monohidrato de D-glucosa), oligosacáridos (por ejemplo, oligosacárido), productos de degradación de polisacáridos, aminoácidos, productos de degradación de proteínas y otros por el estilo. De estos, son particularmente preferibles dextrano de peso molecular bajo, almidón de hidroxietilo, gelatina modificada y albúmina recombinante.

El complejo anteriormente mencionado de albúmina y el complejo metálico en forma desoxi que tiene la estructura de porfirina se une reversiblemente al oxígeno cuando el complejo metálico que tiene la estructura de porfirina es del tipo reductor, pero cuando es del tipo oxidante, el complejo metálico no tiene capacidad de unión al oxígeno. Por ejemplo, cuando el hierro como elemento central de hemo es el hierro divalente (Fe^{2+}), el complejo se une reversiblemente al oxígeno, pero cuando es hierro trivalente del tipo oxidante (Fe^{3+}), el complejo no tiene capacidad de unión al oxígeno. Incluso un complejo de hierro divalente unido con el oxígeno libera el anión superóxido (O_2^-) y se autooxida gradualmente para hacerse hierro trivalente (la forma meto) sin capacidad de unión al oxígeno. Además, es preocupante la influencia adversa sobre los organismos vivos de la fácil liberación de hemo y el ión de hierro a partir de la forma meto.

Por lo tanto, cuando una preparación de infusión de oxígeno artificial que contiene tal complejo de albúmina y el complejo metálico en forma desoxi que tiene la estructura de porfirina debe ser conservado, la reacción de oxidación tiene que ser suprimida.

Como un método para suprimir la reacción de oxidación, la velocidad de reacción puede reducirse simplemente por conservación en frío. Por la simple conservación en frío, sin embargo, el hierro trivalente aumenta gradualmente. Para impedir esto, se conoce un método que comprende la adición de un sistema enzimático de reducción de metemoglobina presente intrínsecamente en los glóbulos rojos, una enzima que elimina la catalasa oxígeno activa y la superóxido dismutasa, y similares. La temperatura de conservación puede ser de -20°C a 60°C , preferiblemente de 4 a 25°C , y el complejo se conserva en un lugar fresco y oscuro.

Para la conservación sin oxígeno, por ejemplo, el complejo se sella directamente en una botella de vidrio, bolsa de capas de aluminio/polietileno (bolsa de polietileno aluminizada), se coloca en un recipiente hecho a partir de un material que tiene una permeabilidad de oxígeno extremadamente baja, tales como poli(cloruros de vinilideno), copolímeros de alcohol de vinilo y etileno y similares, o se sella en una bolsa de plástico, que se coloca después preferiblemente en el recipiente que no es permeable al oxígeno.

Además, mediante la conservación por bloqueo del oxígeno después de quitar el oxígeno en el recipiente que contiene la infusión de oxígeno artificial, pueden ser suprimidas la oxidación del complejo metálico que tiene la estructura de porfirina y la oxidación de otros componentes tales como lípidos y similares. Después de la etapa de eliminación de oxígeno, puede ser dispersada una cantidad adecuada de reactivo (antioxidante) que reacciona con el oxígeno en el recipiente que almacena la infusión de oxígeno artificial, con el objetivo de quitar además las cantidades trazas de oxígeno que permanecen en la solución. Cuando el complejo de albúmina y el complejo metálico en forma desoxi que tiene la estructura de porfirina se dispersan en la solución, puede añadirse un antioxidante al disolvente.

Como antioxidante, pueden usarse varios antioxidantes generalmente usados como agentes farmacéuticos. Los ejemplos de estos incluyen ácido ditionoso, hidrógeno-sulfito de sodio, sulfito de sodio, pirosulfito de sodio (por ejemplo, metabisulfito de sodio), Rongalite ($\text{CH}_2\text{OHSO}_2\text{Na}$), ácido ascórbico, ascorbato de sodio, ácido eritórlico, eritorbato de sodio, cisteína, acetilcisteína, hidrocloreuro de cisteína, homocisteína, glutatióna, tioglicerol, α -tioglicerina, edetato de sodio, ácido cítrico, citrato isopropílico, dicloroisocianurato de potasio, tioglicolato de sodio, tiomalato de sodio, 1,3-butilenglicol-pirosulfito de sodio, etilendiamina tetraacetato de disodio y calcio, etilendiamina tetraacetato de disodio, sulfito de aminoácido (por ejemplo, sulfito de L-lisina), butilhidroxianisol (BHA), dibutilhidroxitolueno (BHT), galato de propilo, palmitato de ascorbilo, vitamina E y sus derivados (por ejemplo, dl- α -tocoferol, acetato de

ES 2 270 245 T3

5 tocoferol, vitamina E natural, d- δ -tocoferol, concentrado de tocoferol mezclado, trolox), resina de guayaco, ácido nor-dihidroguayarático (NDGA), estearato de L-ascorbilo, lecitina de soja, ácido ascórbico palmítico, benzotriazol, pentaitritil-tetraquis[3-(3,5-di-t-butil-4-hidroxifenil)propionato]2-mercaptobencimidazol y otros por el estilo. De estos, son preferibles ácido ditionoso, hidrógeno-sulfito de sodio, sulfito de sodio, ácido ascórbico, cisteína, acetilcisteína, dl- α -tocoferol, acetato de tocoferol, glutatona y trolox.

10 Además, el complejo de albúmina y el complejo metálico en forma desoxi que tiene la estructura de porfirina de la presente invención pueden conservarse después de la unión a CO. Por ejemplo, cuando un complejo metálico que tiene la estructura de porfirina es un hemo (complejo de hierro), el CO se une mostrando una afinidad 200 veces más alta para el hemo que para el oxígeno y se somete a conservación a largo plazo.

15 En este caso, la cantidad de uso de CO es preferiblemente el mínimo necesario desde los aspectos de seguridad y otros por el estilo. Para este fin, por ejemplo, cuando el complejo de albúmina y el complejo metálico en forma desoxi que tiene la estructura de porfirina es un albúmina-hemo, es preferible rellenar, después de la reacción de inclusión, el complejo en un recipiente y sustituir el interior del recipiente con CO mejor que operar en una atmósfera de CO durante mucho tiempo desde la preparación de la solución de etanol de hemo a la inclusión en albúmina como en la manera convencional. Esto reduce la cantidad de CO que se usa a una cantidad mucho más pequeña que las cantidades convencionales.

20 Más concretamente, por ejemplo, puede mencionarse un método que comprende añadir una solución de ácido L-ascórbico acuoso a una solución de etanol del derivado de hemo, que se añade a una solución acuosa de albúmina después de la eliminación del oxígeno disuelto en un recipiente sellado mientras se realiza el reemplazo de nitrógeno, agitar la mezcla para permitir la generación de albúmina-hemo en una forma de desoxi, que se coloca entonces bajo una atmósfera de CO para permitir unir el CO a la albúmina-hemo y conservarse.

25 Ejemplos

La presente invención se explica detalladamente con referencia a los Ejemplos, que no deben ser interpretados como limitantes.

30 Ejemplo 1

35 El complejo 2-[8-[N-(2-metilimidazolil)]octanoiloximetil]-5,10,15,20-tetraquis-($\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$ -o-pivalamido)fenilporfinato-hierro fue obtenido por el método de Tsuchida, *et al.*, *Bioconjugate Chemistry*, vol. 8, págs. 534-538, 1997.

Una solución acuosa (4 μ L) de ácido L-ascórbico (1,2 mM) fue añadida a una solución de etanol (2 mL) de este complejo (3,0 mM) y se hizo reaccionar durante 10 minutos en un recipiente sellado con reemplazo de nitrógeno para dar la solución A.

40 Separadamente, la solución B fue preparada añadiendo albúmina recombinante de suero humano (1,5 mM, 0,5 mL) a una solución acuosa de ácido fosfórico (pH 8,1, 1,0 mM, 7,5 mL) después de la eliminación del oxígeno disuelto por burbujeo de nitrógeno.

45 Después, la solución A fue añadida a la solución B y la mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 minutos.

50 La mezcla fue aplicada a un dispositivo de ultrafiltración (Ultrafiltro fabricado por Advantec: peso molecular de ultrafiltración 50000) y fue concentrada en 5 mL. Usando tampón fosfato (pH 7,4, 1,0 mM, 50 mL) que contenía una solución acuosa (200 μ L) de ácido L-ascórbico (1,2 mM), el etanol fue eliminado por ultrafiltración a volumen constante. Esto fue concentrado a 2,0 mL y la mezcla obtenida se rellenó en un vial de vidrio y se selló. El interior del recipiente fue reemplazado con nitrógeno.

55 De este modo, fue obtenido un complejo metálico de porfirina-complejo de albúmina (concentración de albúmina 5,38%, concentración de porfirina 3,24 mM).

Ejemplo Experimental 1

60 Fue insuflado oxígeno en la dispersión obtenida en el Ejemplo 1 para dar una forma oxi. El espectro visible de absorción fue $\lambda_{\text{máx}}$ de 420 nm. Esta dispersión fue diluida y fue añadida una pequeña cantidad de ácido ditionoso bajo una atmósfera de nitrógeno para dar una forma desoxi, cuyo espectro visible de absorción fue $\lambda_{\text{máx}}$ de 441 nm.

Repitiendo la aeración alterna con el oxígeno y el nitrógeno, fueron confirmadas la adsorción y la desorción de oxígeno. Como consecuencia de la observación basada en la electroforesis, la albúmina no estaba desnaturalizada.

65 Ejemplo 2

De la misma manera que en el Ejemplo 1, fue obtenido el complejo 2-[8-[N-(2-metilimidazolil)]octanoiloximetil]-5,10,15,20-tetraquis($\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$ -o-pivalamido)-fenilporfinato-hierro.

ES 2 270 245 T3

Una solución acuosa (10 μ L) de ácido L-ascórbico (1,2 mM) fue añadida a una solución de etanol (5 mL) de este complejo (1,2 mM) y se hizo reaccionar durante 10 minutos en un recipiente sellado con reemplazo de nitrógeno para dar la solución A.

5 Separadamente, la solución B fue preparada añadiendo albúmina recombinante de suero humano (1,5 mM, 0,5 mL) a una solución acuosa de ácido fosfórico (pH 8,1, 1,0 mM, 24,5 mL) después de la eliminación del oxígeno disuelto por burbujeo de nitrógeno.

10 Entonces, la solución A fue añadida a la solución B y la mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 minutos.

La mezcla fue aplicada a un dispositivo de ultrafiltración (Ultrafiltro fabricado por Advantec: peso molecular de ultrafiltración 50000) y fue concentrada en 5 mL. Usando tampón fosfato (pH 7,4, 1,0 mM, 50 mL) que contenía una solución acuosa (200 μ L) de ácido L-ascórbico (1,2 mM), el etanol fue eliminado por ultrafiltración a volumen
15 constante. Esto fue concentrado a 2,0 mL y la mezcla obtenida se rellenó en un vial de vidrio y se selló. El interior del recipiente fue reemplazado con nitrógeno.

De este modo, fue obtenido el complejo metálico de porfirina-complejo de albúmina objeto (concentración de albúmina 4,344%, concentración de porfirina 3,55 mM).

20 Ejemplo Experimental 2

Fue insuflado oxígeno en la dispersión obtenida en el Ejemplo 2 para dar una forma oxi. El espectro visible de absorción fue $\lambda_{\text{máx}}$ de 421,5 nm. Esta dispersión fue diluida y fue añadida una pequeña cantidad de ácido ditionoso
25 bajo una atmósfera de nitrógeno para dar una forma desoxi, cuyo espectro visible de absorción fue $\lambda_{\text{máx}}$ de 441,5 nm.

Repitiendo la aeración alterna con el oxígeno y el nitrógeno, fueron realizadas la adsorción y la desorción de oxígeno. Como consecuencia de la observación basada en la electroforesis, la albúmina no estaba desnaturalizada.

30 Ejemplo 3

De la misma manera que en el Ejemplo 1, fue obtenido el complejo 2-[8-[N-(2-metilimidazolil)]octanoiloximetil]-5,10,15,20-tetraquis($\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$ -o-pivalamido)-fenilporfinato-hierro.

35 Una solución acuosa (20 μ L) de ácido L-ascórbico (1,2 mM) fue añadida a una solución de etanol (1 mL) de este complejo (1,5 mM) y se hizo reaccionar durante 10 minutos en un recipiente sellado con burbujeo de nitrógeno para dar la solución A.

40 Separadamente, la solución B fue preparada añadiendo albúmina recombinante de suero humano (0,375 mM, 0,5 mL) a una solución acuosa de ácido fosfórico (pH 8,1, 1,0 mM, 4,5 mL) después de la eliminación del oxígeno disuelto por burbujeo de nitrógeno.

Entonces, la solución A fue añadida a la solución B y la mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 minutos.

45 La mezcla fue aplicada a un dispositivo de ultrafiltración (Ultrafiltro fabricado por Advantec: peso molecular de ultrafiltración 50000) y fue concentrada en 5 mL. Usando tampón fosfato (pH 7,4, 1,0 mM, 50 mL), el etanol fue eliminado por ultrafiltración a volumen constante. Esto fue concentrado a 0,5 mL y la mezcla obtenida se rellenó en un vial de vidrio y se selló. El interior del recipiente fue reemplazado con nitrógeno.

50 De este modo, fue obtenido el complejo metálico de porfirina-complejo de albúmina de objeto (concentración de albúmina 5,252%, concentración de porfirina 1,74 mM).

Ejemplo Experimental 3

55 Fue insuflado oxígeno en la dispersión obtenida en el Ejemplo 3 para dar una forma oxi. El espectro visible de absorción fue $\lambda_{\text{máx}}$ de 421,5 nm. Esta dispersión fue diluida 1/50, fue transferida a una celda para una espectroscopia de cuarzo y fue añadida una pequeña cantidad de ácido ditionoso bajo una atmósfera de nitrógeno para dar una forma desoxi, cuyo espectro visible de absorción fue $\lambda_{\text{máx}}$ de 440,5 nm.

60 Repitiendo la aeración alterna con el oxígeno y el nitrógeno, fueron realizadas la adsorción y la desorción de oxígeno. Como consecuencia de la observación basada en la electroforesis, la albúmina no estaba desnaturalizada.

Ejemplo 4

65 De la misma manera que en el Ejemplo 1, fue obtenido el complejo 2-[8-[N-(2-metilimidazolil)]octanoiloximetil]-5,10,15,20-tetraquis($\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$ -o-pivalamido)-fenilporfinato-hierro.

ES 2 270 245 T3

Una solución acuosa (4 μ L) de ácido L-ascórbico (1,2 mM) fue añadida a una solución de etanol (5 mL) de este complejo (1,2 mM) y se hizo reaccionar durante 10 minutos en un recipiente sellado con burbujeo de nitrógeno para dar la solución A.

5 Separadamente, la solución B fue preparada añadiendo albúmina recombinante de suero humano (1,5 mM, 0,5 mL) a una solución acuosa de ácido fosfórico (pH 8,1, 1,0 mM, 24,5 mL) después de la eliminación del oxígeno disuelto por burbujeo de nitrógeno.

10 Entonces, la solución A fue añadida a la solución B y la mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 minutos.

15 La mezcla fue aplicada a un dispositivo de ultrafiltración (Ultrafiltro fabricado por Advantec: peso molecular de ultrafiltración 50000) y fue concentrada en 5 mL. Usando tampón fosfato (pH 7,4, 1,0 mM, 50 mL), el etanol fue eliminado por ultrafiltración a volumen constante. Esto fue concentrado a 2,0 mL y la mezcla obtenida se rellenó en un vial de vidrio y se selló. El interior del recipiente fue sustituido por CO.

De este modo, fue obtenido un complejo metálico de porfirina-complejo de albúmina objeto (concentración de albúmina 5,041%, concentración de porfirina 2,71 mM).

20 Ejemplo Experimental 4

Por irradiación de luz (500 W) en un baño de hielo con oxígeno fluyendo en la dispersión obtenida en el Ejemplo 4, fue obtenida una forma oxi. El espectro visible de absorción fue $\lambda_{\text{máx}}$ de 421,5 nm. Esta dispersión fue diluida, transferida a una celda para espectroscopia de cuarzo y fue añadida una pequeña cantidad de ácido ditionoso bajo una atmósfera de nitrógeno para dar una forma desoxi, cuyo espectro visible de absorción fue $\lambda_{\text{máx}}$ de 441,5 nm.

Repitiendo la aeración alterna con el oxígeno y el nitrógeno, fueron realizadas la adsorción y la desorción de oxígeno. Como consecuencia de la observación basada en la electroforesis, la albúmina no estaba desnaturalizada.

30 Ejemplo 5

De la misma manera que en el Ejemplo 1, fue obtenido el complejo 2-[8-[N-(2-metilimidazolil)]octanoiloximetil]-5,10,15,20-tetraquis($\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$ -o-pivalamido)-fenilporfinato-hierro.

35 Una solución acuosa (20 μ L) de ácido L-ascórbico (1,2 mM) fue añadida a una solución de etanol (1 mL) de este complejo (1,5 mM) y se hizo reaccionar durante 10 minutos en un recipiente sellado con burbujeo de nitrógeno para dar la solución A.

40 Separadamente, la solución B fue preparada añadiendo albúmina recombinante de suero humano (0,375 mM, 0,5 mL) a una solución acuosa de ácido fosfórico (pH 8,1, 1,0 mM, 4,5 mL) después de la eliminación del oxígeno disuelto por burbujeo de nitrógeno.

Entonces, la solución A fue añadida a la solución B y la mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 minutos.

45 La mezcla fue aplicada a un dispositivo de ultrafiltración (Ultrafiltro fabricado por Advantec: peso molecular de ultrafiltración 50000) y fue concentrada en 5 mL. Usando tampón fosfato (pH 7,4, 1,0 mM, 50 mL), el etanol fue eliminado por ultrafiltración a volumen constante. Esto fue concentrado a 0,5 mL y la mezcla obtenida se rellenó en un vial de vidrio y se selló. El interior del recipiente fue reemplazado con nitrógeno.

50 De este modo, fue obtenido un complejo metálico de porfirina-complejo de albúmina objeto (concentración de albúmina 3,16%, concentración de porfirina 3,90 mM).

Ejemplo Experimental 5

55 Fue insuflado oxígeno en la dispersión obtenida en el Ejemplo 3 para dar una forma oxi. El espectro visible de absorción fue $\lambda_{\text{máx}}$ de 421,5 nm. Esta dispersión fue diluida y fue añadida una pequeña cantidad de ácido ditionoso bajo una atmósfera de nitrógeno para dar una forma desoxi, cuyo espectro visible de absorción fue $\lambda_{\text{máx}}$ de 442,0 nm.

60 Repitiendo la aeración alterna con el oxígeno y el nitrógeno, fueron realizadas la adsorción y la desorción de oxígeno. Como consecuencia de la observación basada en la electroforesis, la albúmina no estaba desnaturalizada.

65 La preparación de la infusión de oxígeno artificial de la presente invención puede usarse en cualquier campo que requiera un vehículo de oxígeno. Por ejemplo, se administra a organismos vivos para el suministro de oxígeno en penumbra isquémica o tejido tumoral, infusión de sangre durante una hemorragia, o puede ser usado como un líquido de perfusión para la conservación de órganos, una solución para la circulación extracorpórea o un fluido para cultivo celular.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un complejo de albúmina y un complejo metálico en forma desoxi que tiene una estructura de porfirina, que comprende mezclar albúmina y un complejo metálico que tiene una estructura de porfirina bajo una atmósfera de gas sustancialmente sin monóxido de carbono ni oxígeno.

2. El método de producción de la reivindicación 1, que comprende convertir un complejo metálico en forma oxi que tiene una estructura de porfirina en un complejo metálico en forma desoxi que tiene una estructura de porfirina y mezclar el complejo resultante con albúmina.

3. El método de producción de la reivindicación 2, en el que el complejo metálico en forma oxi que tiene la estructura de porfirina se convierte en el complejo metálico en forma desoxi que tiene la estructura de porfirina en presencia de un agente reductor.

4. El método de producción de la reivindicación 2, en el que el complejo metálico en forma oxi que tiene la estructura de porfirina se convierte en el complejo metálico en forma desoxi que tiene la estructura de porfirina por el reemplazo de nitrógeno.

5. El método de producción de la reivindicación 1, en el que, en la etapa de mezclar la albúmina y un complejo metálico que tiene la estructura de porfirina, el metal central del complejo metálico que tiene la estructura de porfirina es del tipo reductor.

6. El método de producción de la reivindicación 1, en el que se añade una solución de albúmina acuosa después de la eliminación del oxígeno disuelto en un recipiente sellado relleno de un gas sustancialmente sin monóxido de carbono ni oxígeno, y luego se mezcla una solución de un complejo metálico que tiene la estructura de porfirina en un disolvente orgánico y un agente reductor.

7. El método de producción de la reivindicación 1, en el que el complejo metálico que tiene la estructura de porfirina es un derivado de hemo.

8. El método de producción de la reivindicación 1, en el que el gas es un gas inerte.

9. El método de producción de la reivindicación 8, en el que el gas inerte es de una o varias clases de gases seleccionados a partir del grupo que consiste en hidrógeno, helio, argón, nitrógeno y neón.

10. El método de producción de la reivindicación 3, en el que el agente reductor es de una o varias clases seleccionadas a partir del grupo que consiste en ácido ditionoso, ditionito de sodio, hidrógeno-sulfito de sodio, sulfito de sodio, sulfito de sodio seco, pirosulfito de sodio, metabisulfito de sodio, Rongalite, ácido L-ascórbico, L-ascorbato de sodio, ácido eritórbito, eritorbato de sodio, cisteína, tioglicerol, α -tioglicerina, edetato de sodio, ácido cítrico, citrato isopropílico, dicloroisocianurato de potasio, tioglicolato de sodio, tiomalato de sodio, 1,3-butilenglicol-pirosulfito de sodio, butilhidroxianisol, dibutilhidroxitolueno, galato de propilo, palmitato de ascorbilo, agente asociado a la vitamina E, dl- α -tocoferol, acetato de tocoferol, vitamina E natural, d- δ -tocoferol, concentrado de tocoferol mezclado, resina de guayaco, ácido nordihidroguayarático, estearato de L-ascorbilo, lecitina de soja, ácido ascórbico palmítico, benzotriazol, pentaeritritil-tetraquis[3-(3,5-di-t-butil-4-hidroxifenil)propionato]-2-mercapto-bencimidazol, etilendiamina-tetraacetato de disodio y calcio y etilendiamina tetraacetato de disodio.

11. El método de producción de la reivindicación 6, en el que el disolvente orgánico es etanol.

12. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 con la etapa subsecuente de purificar el complejo por ultrafiltración usando, como fluido de sustitución, una solución acuosa que contiene un agente reductor y/o que no contiene oxígeno.

13. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 con la etapa subsecuente de purificar el complejo por diálisis usando, como fluido dializante, una solución acuosa que contiene un agente reductor y/o que no contiene oxígeno.

FIG. 1

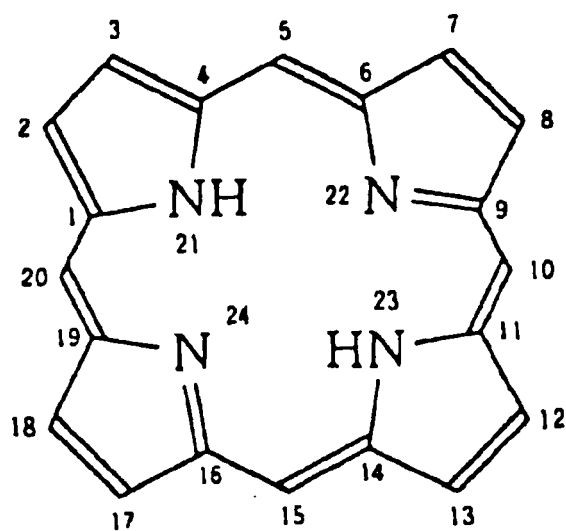


FIG. 2

