

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 530**

51 Int. Cl.:

A61K 38/42 (2006.01)
A61K 33/00 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61M 35/00 (2006.01)
A61L 26/00 (2006.01)
C07K 14/805 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.07.2012 PCT/EP2012/003086**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2013 WO13013799**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2012 E 12743076 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2734223**

54 Título: **Aerosol para heridas**

30 Prioridad:

23.07.2011 EP 11006057

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.12.2016

73 Titular/es:

**SASTOMED GMBH (100.0%)
Brüsseler Strasse 2
49124 Georgsmarienhütte, DE**

72 Inventor/es:

**SANDER, MICHAEL y
PÖTZSCHKE, HARALD**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 593 530 T3

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

DESCRIPCIÓN

Aerosol para heridas

5 La presente invención se refiere a una composición, que comprende hemoglobina o mioglobina en la que, en al menos el 40 % de dicha hemoglobina o mioglobina, el sitio de unión de oxígeno está cargado con un ligando que no es O₂, y al menos un ingrediente adicional, un método para la preparación de dicha composición y hemoglobina o mioglobina cargada con un ligando que no es oxígeno para su uso en el tratamiento externo de heridas. Se utilizan diferentes métodos para el tratamiento de heridas, en función de su estado. En primer lugar, una herida que todavía
10 está abierta preferiblemente debería ser desinfectada y de ese modo protegida frente a influencias externas negativas. Esto se puede hacer por medio de soluciones desinfectantes adecuadas o vendajes de aerosol o también mediante la aplicación de una solución de yodo. La verdadera curación de las heridas debe entonces producirse desde el interior. Esto significa que los vasos sanguíneos que todavía están en el lugar deben suministrarle al tejido destruido suficientes cantidades de materiales, de manera que el mecanismo de reparación del tejido pueda
15 empezar.

Las heridas pueden ser causadas por diversos factores, como por ejemplo, lesiones o también después de operaciones o traumatismos.

20 Por otra parte se sabe que la formación de heridas, particularmente también heridas crónicas, pueden ser provocadas asimismo por enfermedades, en las que se produce la degeneración y/o la constricción de los vasos sanguíneos grandes y/o pequeños. Esto puede ser el resultado, por ejemplo en el caso de pacientes de edad avanzada, de estancias prolongadas en cama (decúbito) o de la diabetes mellitus que pueden dar lugar a degeneración y arteriosclerosis (P. Carpenter, A. Franco, Atlas der Kapillaroskopie [Atlas de Capilaroscopia], 1983, Abbott, Max-Planck-Inst. 2, D-Wiesbaden) de los vasos sanguíneos grandes y pequeños (macroangiopatía y microangiopatía de las arterias). También se demostró que una deficiencia de oxígeno (hipoxia) está presente en el
25 área de la herida. Se considera que 40 mmHg es un valor crítico (C.D. Müller y colaboradores, Hartmann Wund [Wound] Forum 1 (1999), 17-25).

30 La sangre fluye a los tejidos, incluyendo la piel, a través de las arterias y suministra a las células materiales necesarios para la vida. Cualquier degeneración de los vasos sanguíneos resulta en un suministro deficiente de materiales a las células, que conduce a su muerte. Los materiales deben atravesar el último espacio, aparentemente insignificante de aproximadamente 20 µm, desde los vasos sanguíneos más pequeños (capilares) hasta las células por difusión; a este respecto, el oxígeno desempeña un papel especial, ya que es difícil para el organismo manejar
35 este material.

Hay tres problemas principales implicados:

(1) Es cierto que el oxígeno es absolutamente esencial para la vida (un ser humano experimenta muerte cerebral
40 después de sólo aproximadamente cinco minutos sin que su cerebro reciba oxígeno), pero al mismo tiempo, el oxígeno es altamente tóxico (un recién nacido que recibe tratamiento de respiración con oxígeno puro morirá después de solo unos pocos días).

(2) El oxígeno tiene muy poca solubilidad en un medio acuoso. Esto da como resultado, según la primera ley de FICK, una velocidad de difusión más baja de oxígeno. Además, hay una ley fundamental de la difusión, esto es, la ley de SMOLUCHOWSKI y la ley de EINSTEIN, que indica que la velocidad de difusión (de oxígeno) disminuye con un aumento de la distancia de difusión. Ahora, la constante de difusión de oxígeno es tan baja que la velocidad de difusión a una distancia de difusión tan pequeña como 20 µm, es sólo el 5 % del valor inicial. Una capa de agua de por ejemplo 50 µm, representa un aislamiento de las células casi total frente al oxígeno. El oxígeno es transportado a lo largo de largas trayectorias en el organismo, desde los pulmones a las puntas de los dedos de los pies con el torrente sanguíneo, unido a la hemoglobina, y sólo de esta manera es capaz de superar las largas distancias de un modo que resulta adecuado para el organismo.

(3) Para el oxígeno, al contrario que con la glucosa, por ejemplo, no hay un área de almacenamiento en el
55 cuerpo, por lo tanto, este material debe de estar a disposición de las células en todo momento y de forma rápida, en una cantidad suficiente; el oxígeno es un denominado material de uso inmediato necesario para la vida.

Un organismo intacto ha resuelto estos problemas mediante el uso de varios mecanismos. Los efectos tóxicos del oxígeno se evitan de tal manera que, este último se une a la hemoglobina durante el transporte y de este modo permanece inofensivo. Al mismo tiempo, el oxígeno libre se diluye y de este modo pierde además su potencial oxidativo perjudicial. Sin embargo, puesto que la unión a la hemoglobina es reversible, está disponible instantáneamente en una cantidad suficiente. El problema del rango de difusión bajo se soluciona de tal manera que el organismo ha desarrollado una red de vasos sanguíneos muy finamente ramificada (red capilar), que asegura que como media, cada célula está a una distancia de como máximo 25 µm de un capilar; de esta manera, la trayectoria de difusión de oxígeno en el organismo se mantiene por debajo de la longitud crítica de 50 µm. Además, a una célula se le puede suministrar oxígeno mediante difusión desde varios lados; esto representa un mecanismo de
60
65

seguridad. La disponibilidad inmediata, de conformidad con la demanda (al oxígeno no se le permite estar disponible en exceso, de lo contrario tendría un efecto perjudicial) se logra en el organismo por medio de la regulación vascular del flujo de los vasos sanguíneos, que controla la perfusión y con ello optimiza el suministro de oxígeno.

5 Si hay una superficie de herida abierta, el suministro de oxígeno a las células se interrumpe. El suministro de oxígeno desde el aire exterior es pobre porque sobre la superficie celular (de tejido) se encuentra una película de líquido acuoso, el cual, como se explica, forma una barrera para la difusión del oxígeno. Heridas frescas en tejido normal se curan en pocos días si el suministro de oxígeno desde abajo, es decir, desde el interior, es suficiente. Sin embargo, se ha demostrado en experimentos con animales que incluso heridas frescas curan mejor si la
10 concentración de oxígeno del aire circundante se incrementa (M.P. Pai y colaboradores, Sug. Gyn. Obstet. 135 (1972), 756-758). Heridas más viejas, en particular heridas crónicas, se conoce que curan de una forma muy lenta, si acaso lo hacen, debido a su deficiencia en oxígeno.

15 Para curar mejor heridas crónicas, se ha utilizado también la denominada terapia de oxígeno hiperbárico (HBO). En este tratamiento, los pacientes se colocan en cámaras presurizadas, donde son sometidos a un exceso de presión de oxígeno puro de aproximadamente 3 bar durante un cierto periodo de tiempo (C.D. Müller y colaboradores, Hartmann Wund Forum 1 (1999), 17-25). De hecho, la curación de heridas puede mejorarse por este método. Sin embargo, el efecto disminuye con el número de tratamientos.

20 La patente de EE.UU. No. 2,527,210 describe una solución de hemoglobina que supuestamente se puede utilizar para el tratamiento de heridas, tanto por vía intravenosa y por vía tópica, por ejemplo mediante pulverización. En esta descripción, la hemoglobina se obtiene de los eritrocitos frescos que son sometidos a congelación de choque después de una centrifugación y de extraer la fracción de plasma de la sangre. Esto da como resultado la lisis celular, y la hemoglobina se libera. Las paredes celulares lisadas también están presentes en el producto. Esta
25 formulación es un detrito celular concentrado (fragmentos de células). De esta manera, se supone un efecto antiséptico de recubrimiento, tal como se consigue con solución de yodo, después de haber añadido 5 % de sulfuro de sodio. En otras palabras, la herida se cierra simplemente. El transporte de oxígeno no se menciona allí.

30 El documento WO 97/15313 describe el uso terapéutico de la hemoglobina para la mejora de la curación de heridas. Para este propósito, la hemoglobina libre de estroma y pirógenos se administra por vía intravenosa a los pacientes, en particular después de las operaciones y sucesos traumáticos para aumentar la presión de la sangre. En particular, para este propósito se utiliza una hemoglobina reticulada con diaspirina.

35 El documento WO 2003/077941 enseña el tratamiento de heridas abiertas con una solución de hemoglobina que comprende hemoglobina aislada y, opcionalmente, reticulada. Las soluciones se preparan frescas con hemoglobina de sangre de cerdo y se aplican a heridas crónicas.

40 Durante la preparación y el almacenamiento de portadores de oxígeno sobre la base de hemoglobina o mioglobina, éstos pueden perder parcial o completamente su funcionalidad. Para evitar esto es deseable estabilizar los portadores de oxígeno para que permanezcan utilizables y capaces de transportar oxígeno.

45 En general, existen diferentes aproximaciones a la preparación de portadores de oxígeno artificiales; uno de ellos es la preparación de soluciones adecuadas de hemoglobinas naturales o químicamente modificadas (ver "Cuestiones del V Simposio Internacional de Sustitutos de Sangre, San Diego, California, EE.UU., Marzo de 1993", Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology 22 (1994), vol.2 - vol.4). Un problema en el manejo de dichas preparaciones farmacéuticas como portadores de oxígeno artificiales, es su creciente inactivación por oxidación espontánea a metahemoglobina, la cual ya no es capaz de transportar oxígeno. Esto ocurre por lo general durante la preparación por el fabricante y el posterior almacenamiento.

50 Se describen varias aproximaciones para resolver este problema. O bien se trata de minimizar el grado de oxidación de la hemoglobina, o de reducir la hemoglobina oxidada a su estado anterior.

55 Una posibilidad para la prevención de la oxidación espontánea es la desoxigenación de la hemoglobina (es decir, la eliminación de todo el oxígeno de la preparación), ya que la desoxihemoglobina se oxida de forma mucho más lenta a metahemoglobina que la oxihemoglobina.

Además, es posible minimizar la cantidad de oxidación por almacenamiento y/o preparación a la menor temperatura posible (para soluciones acuosas, a aproximadamente 4 °C).

60 Además, la tasa de oxidación de la hemoglobina depende de la concentración de iones hidrógeno, es decir, del pH. Por ejemplo, para la hemoglobina humana nativa hay un mínimo en el intervalo entre pH 7,5 y 9,5.

También, la adición de ciertos alcoholes puede disminuir la oxidación de la hemoglobina. Algunos de ellos funcionan incluso en bajas concentraciones. Un problema es la toxicidad de estos alcoholes.

65

Ciertos iones metálicos (Cu^{2+} , Fe^{3+} , etc.) catalizan la oxidación espontánea de la hemoglobina. Pueden resultar ineficaces por formación de complejos con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), aunque en sí EDTA promueve la oxidación espontánea de la hemoglobina.

5 La protección de los portadores de oxígeno artificiales frente a la oxidación puede lograrse además mediante la adición de sustancias reductoras. Bajo ciertas circunstancias, incluso dar lugar a una reactivación de la hemoglobina oxidada.

10 El documento EP 0 857 733 describe que la hemoglobina puede ser estabilizada mediante la unión de un ligando al sitio de unión del oxígeno, en particular monóxido de carbono. Se ha encontrado que una carbonilhemoglobina de este tipo se puede aplicar a un organismo sin que se desuna el ligando y es adecuado como un portador de oxígeno en el interior de la corriente sanguínea.

15 El objetivo de la presente invención es proporcionar un producto para el tratamiento externo de heridas, lo que aumenta la curación de la herida, que sea de fácil manejo y almacenable.

Este objetivo se alcanza, según la invención, mediante una composición, que comprende

20 (a) un portador de oxígeno, que es hemoglobina o mioglobina, en el que en al menos el 40 % de dicho portador de oxígeno, el sitio de unión de oxígeno está cargado con monóxido de carbono, y
 (b) al menos un ingrediente adicional, seleccionado de electrolito(s) conservante(s), estabilizante(s), anti-floculante(s), anticoagulante(s), agente(s) tamponadores del pH, disolvente(s), antioxidante(s), agente(s) formador(es) de película y agente(s) de reticulación, caracterizado por que la composición se proporciona en un contenedor de aerosol, preferiblemente en un contenedor de aerosol envasado a presión:

25 y un portador de oxígeno, que es hemoglobina o mioglobina cargada en su sitio de unión de oxígeno con monóxido de carbono para su uso para el tratamiento externo de heridas.

30 De acuerdo con la invención, se utiliza un portador de oxígeno, que es hemoglobina o mioglobina o un derivado modificado de las mismas, o mezclas de las mismas. La hemoglobina de origen humano o animal, en particular de origen equino, bovino o porcino preferiblemente, es particularmente adecuada para la presente invención. Como portador de oxígeno se prefiere particularmente la hemoglobina humana o porcina, que es natural o modificada como se describe a continuación. El portador de oxígeno puede ser recién aislado de la sangre humana o animal o puede prepararse artificialmente.

35 También se pueden utilizar las mezclas de portador de oxígeno natural y modificado, tal como, por ejemplo, en una proparte de 20:1 a 1:20, con referencia al peso. Además, las mezclas de hemoglobina y mioglobina, o sus derivados modificados pueden usarse en la proparte antes mencionada de 20:1 a 1:20.

40 En una realización particular adicional el portador de oxígeno puede ser modificado. La modificación puede ser una reticulación intramolecular, polimerización (reticulación intermolecular), pegilación (unión covalente con óxidos de polialquileño), modificación con efectores reactivos químicamente, tal como piridoxal-5'-fosfato o 2-nor-2-formilpiridoxal-5'-fosfato, o también con efectores no reactivos químicamente del enlace oxígeno, tal como 2,3-bisfosfoglicerato, hexafosfato de inositol, hexasulfato de inositol o ácido melítico, o una combinación de los mismos.
 45 Tales modificaciones son conocidas y se describen, por ejemplo, en DE-A 100 31 744, DE-A 100 31 742, y DE-A 100 31 740. La reticulación de los portadores de oxígeno también se describe en DE 197 01 37, EP 97 1000790, DE 44 18 937, DE 38 41 105, DE 37 14 351, DE 35 76 651.

50 Ejemplos de portadores de oxígeno modificados son hemoglobinas que tienen un peso molecular de 65.000 a 15.000.000, tal como moléculas intramolecularmente reticuladas según el documento WO 97/1531, en particular productos poliméricos, así como productos intermolecularmente reticulados que tienen un peso molecular medio de 80.000 a 10.000.000 g/mol, particularmente 100.000 a 5.000.000, o mioglobinas producidas análogamente que tiene un peso molecular de 16.000 a 5.000.000, particularmente de 100.000 a 3.000.000, preferiblemente de 1.000.000 g/mol. Se pueden utilizar aquellos portadores de oxígeno que son polimerizados, por ejemplo, usando agentes de reticulación conocidos para modificación intermolecular, tales como agentes de reticulación bifuncionales como diepóxido de butadieno, divinilsulfona, diisocianato, en particular diisocianato de hexametileno, diisocianato de ciclohexilo, y ácido 2,5-bisocyanatobenzol sulfónico, éster de di-N-hidroxi succinimidilo, diimidoéster, o dialdehído, especialmente glicoxal, aldehído glicólico que reacciona de manera análoga, o glutardialdehído.

60 Además, se pueden utilizar productos que son polimerizados de esta manera y pegilados con un polietilenglicol o derivados adecuados del mismo. Esto incluye, por ejemplo, óxido de polietileno, óxido de polipropileno, o un copolímero de óxido de etileno y óxido de propileno, o un éster, éter, amida éster del mismo. Puede ser adecuado si el óxido de polialquileño unido covalentemente tiene una masa molar de 200 a 5000 g/mol.

65 Para la unión covalente de los óxidos de polialquileño, pueden ser adecuados aquellos derivados de óxido de polialquileño que contienen un agente de unión ya unido covalentemente con un grupo funcional, permitiendo de ese

modo una reacción química directa con amino, alcohol o grupos sulfhidrilo de las hemoglobinas, formando uniones covalentes de los óxidos de polialquileno, por ejemplo, óxidos de polialquileno con éster de N-hidroxi succinimidilo, epoxi (éter de glicidilo), ldehide, isocianato, vinilsulfona, iodoacetamida, formiato de imidazolilo, grupos tresilato, y otros, reactivos. Muchos de estos polietilenglicoles activados monofuncionalmente están disponibles comercialmente.

Si se utilizan portadores de oxígeno modificados, se prefieren, modificados por reticulación (intramolecular o intermolecular), o productos de hemoglobina reticulados y pegilados que tienen un peso molecular medio de 250.000 a 750.000 productos g/mol, o productos de mioglobina que tiene un peso molecular medio de 50.000 a 750.000 g/mol.

De acuerdo con la forma de realización preferida particular, la hemoglobina o mioglobina de origen humano o animal recién aislada, en particular, de origen porcino se utiliza para la preparación de la composición de la invención.

Según la presente invención, al menos 40 % de los sitios de unión de oxígeno del portador de oxígeno están cargados con monóxido de carbono.

Preferiblemente, al menos 50 %, preferiblemente al menos 60 %, más preferido al menos 70 %, incluso más preferido al menos 80 %, particularmente preferido al menos 90 % o 95 % de la hemoglobina o mioglobina se proporciona en forma cargada con ligando. Esta carga puede aplicarse ya durante el aislamiento del portador o después de su purificación adicional, sin embargo, se prefiere en particular llevar a cabo el aislamiento del portador de oxígeno en su forma protegida, lo que significa que durante el aislamiento o la purificación el ligando se proporciona / o contacta con el portador de oxígeno.

El monóxido de carbono tiene una alta afinidad por el/los sitio(s) de unión de O₂ de la hemoglobina/mioglobina y sirve como un protector frente a la oxidación del ion central Fe³⁺ del hemo.

El o los portador(es) de oxígeno cargado está/están preferiblemente disuelto(s) en un medio acuoso u orgánico, prefiriéndose una solución acuosa, en una cantidad de 0,1 a 35 % en peso, preferiblemente de 0,1 a 20 % en peso, más preferiblemente de 0,1 a 15 % en peso, para estar listas para su aplicación.

La composición de acuerdo con la presente invención comprende además al menos un aditivo adicional, preferiblemente seleccionado del grupo que comprende electrolito(s), estabilizante(s), anti-floculante(s), conservante(s), agente(s) tamponadores del pH, disolvente(s), antioxidante(s) y agente(s) formadores de película, más preferiblemente seleccionado de electrolito(s), estabilizante(s), anti-floculante(s), conservante(s) y agente(s) tamponadores del pH. Lo más preferido es que la composición esté en forma de una solución y comprenda al menos un electrolito y, opcionalmente, un estabilizador.

La solución puede comprender electrolitos fisiológicamente compatibles, tales como sales, en cantidades adecuadas o deseadas. Los electrolitos pueden estar presentes en cantidades del 0,1 al 30 % en peso, preferiblemente del 0,1 al 10 %, pero preferiblemente están presentes en una concentración fisiológica, respectivamente. Preferiblemente, la composición comprende una sal en las cantidades antes mencionadas, como por ejemplo, NaCl, KCl, NH₄Cl, CaCO₃, Na₂CO₃, K₂CO₃, MgSO₄, Na₂SO₄, CaCl₂, MgCl₂, citrato de sodio, lactato de sodio o mezclas de los mencionados o similares, sin estar restringida a estos ejemplos. La sal más preferida es NaCl, en particular en una concentración del 0,9 % (solución isotónica).

De acuerdo con la invención, se prefiere particularmente que la composición comprenda un compuesto que actúe como un estabilizador y/o anti-floculante para proteínas, en particular, para la hemoglobina / mioglobina, tales como N-acetil cisteína, cisteína, N-acetil metionina, metionina, sales no caotrópicas, polioles, tales como azúcares, preferiblemente disacáridos, y aminoácidos, preferiblemente cada uno en cantidades del 0,001 % en peso al 20 % en peso.

Los polioles que se pueden emplear son preferiblemente polioles de bajo peso molecular aunque se pueden emplear derivados poliméricos. Dichos polioles incluyen etilenglicol, glicerol, eritritol y manitol. Los polioles cíclicos que pueden ser empleados incorporan uno o más anillos alicíclicos y pueden tener al menos una cadena lateral. Los polioles preferidos incluyen disacáridos y alcoholes de azúcar, por ejemplo lactitol, sorbitol e inositol. Se prefieren los compuestos que tienen de 2 a 10 grupos hidroxilo. La cantidad del poliol puede estar en el intervalo preferido del 0,001 al 20 %, más preferiblemente del 1 al 15 %, y lo más preferiblemente del 2 al 10 % p/v.

Además el aditivo estabilizador de proteínas puede ser seleccionado de un compuesto de tris(hidroxiometil)metilo de fórmula 1; (HOCH₂)₃C-R (1) en la que R es: alquilo C₁-C₄, alquilo C₁-C₄ sustituido, NH₂, NHC(CH₂OH)₃, hidroxialquilo C₁-C₄, carboxilato de alquilo C₁-C₄, NR¹R² (en la que R¹ y R² pueden ser de forma independiente: H, alquilo C₁-C₄, sulfonato de alquilo C₁-C₄, sulfonato de hidroxialquilo C₁-C₄). Ejemplos de compuestos preferidos de fórmula (1) incluyen: tris(hidroxiometil)etano; 1,1',1"-tris(hidroxiometil)propano; tris(hidroxiometil)aminometano o sales de los mismos, por ejemplo, cloruro, maleato, fosfato, sales de succinato; 1,3 bis[tris(hidroxiometil)metilamino]propano; bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroxiometil)metano; sulfonato de N [tris(hidroxiometil)metil]-2-aminoetano; sulfonato de N

[tris(hidroxiometil)metil]-3-aminopropano; sulfonato de N [tris(hidroxiometil)metil]-3-amino-2-hidroxiopropano; N [tris(hidroxiometil)metil]-glicina. Estos compuestos también se pueden añadir en el intervalo preferido del 0,001 al 20 % más preferiblemente del 1 al 15 %, y lo más preferiblemente del 2 al 10 % p/v.

5 Además el aditivo estabilizador de proteínas se puede seleccionar de un polielectrolito. El polielectrolito puede ser un polielectrolito catiónico o aniónico. Polielectrolitos anfóteros también pueden emplearse. El polielectrolito catiónico es preferiblemente un polímero con grupos catiónicos distribuidos a lo largo de la cadena molecular.

10 Los grupos catiónicos, que son preferiblemente funciones derivadas de amonio cuaternario, pueden estar dispuestos en grupos laterales colgantes de la cadena o se pueden incorporar en ella. Ejemplos de polielectrolitos catiónicos incluyen: Copolímeros de vinil pirrolidona y metacrilato de metilo cuaternario, por ejemplo, series Gafquat (755N, 734, HS-100) obtenidos de ISP; poliacrilamidas sustituidas; polietilenimina, polipropilenimina y derivados sustituidos; homopolímeros de poliamina (Golchem CL118); copolímeros de poliamina (por ejemplo, condensados de epíclorhidrina y mono- o dimetilamina); cloruro de polidialil dimetil amonio (poliDADMAC); dextranos sustituidos; goma guar modificada (sustituida con cloruro de hidroxipropiltrimonio); proteínas sustituidas (por ejemplo, grupos cuaternarios sustituidos en proteína de soja y colágeno hidrolizado); poliaminoácidos (por ejemplo, polilisina); compuestos poliamino de bajo peso molecular (por ejemplo, espermina y espermidina). Se pueden emplear polímeros naturales o artificiales.

20 Se pueden emplear polielectrolitos catiónicos con pesos moleculares de 150 a 5.000.000, preferiblemente de 5.000 a 500.000, más preferiblemente de 5.000 a 100.000. Se prefiere una cantidad del 0,01 al 10 %, más preferiblemente del 0,1 al 2 %, especialmente del 0,05 al 5 % p/v.

25 El polielectrolito aniónico preferiblemente es un polímero con grupos aniónicos distribuidos a lo largo de la cadena molecular. Los grupos aniónicos, que pueden incluir carboxilato, sulfonato, sulfato u otros agrupamientos grupos ionizables cargados negativamente, se pueden disponer sobre grupos colgantes de la cadena o unidos directamente a la cadena principal del polímero. Se pueden emplear polímeros naturales o artificiales.

30 Ejemplos de polielectrolitos aniónicos incluyen: Gantrez (Sseries, AN-series), ácido alginico y sales; carboximetil celulosas y sales; poliacrilamidas sustituidas (por ejemplo, sustituidas con grupos ácidos carboxílicos); ácidos poliacrílicos y las sales; ácidos sulfónicos de poliestireno y sales; sulfatos de dextrano; sacáridos sustituidos, por ejemplo octosulfato de sacarosa; heparina. Se pueden utilizar polielectrolitos aniónicos con pesos moleculares de 150 a 5.000.000, preferentemente 5.000 a 500.000, más preferiblemente de 5.000 a 100.000. Se prefiere una cantidad del 0,01 % al 10 %, especialmente del 0,05 al 5 %, y más especialmente del 0,1 al 2 % p/v.

35 Un estabilizante preferido en particular es N-acetil cisteína en una cantidad del 0 al 10 %, preferiblemente del 0,01 al 5 %.

40 Además, la composición puede contener cualquier conservante como por ejemplo, fenoxietanol, isotiazolina, ácido sórbico o cualquier otro conservante adecuado conocido para las personas expertas en la materia.

45 La composición puede comprender además, preferentemente cualquier agente tampón. Todos los tampones conocidos comúnmente puede ser utilizados, como Tris/HCl, K_2HPO_4/KH_2PO_4 , Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 , MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propansulfónico), HEPES (ácido 4-2-hidroxiethyl-1-piperazinetansulfónico), TAPS (ácido 3-[[tris(hidroxiometil)metil]amino]propansulfónico), Bicina (N,N-bis(2-hidroxiethyl)glicina), Tricina (N-tris(hidroxiometil)metilglicina), TES (ácido 2- [[tris(hidroxiometil)metil]amino]etansulfónico), PIPES (piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etansulfónico)), SSC (citrato sódico salino), MES (ácido 2-(N-morfolino)etansulfónico) sin limitarse a éstos.

50 Los disolventes adecuados en la composición según la invención son preferiblemente agua o soluciones acuosas, disolventes orgánicos como el alcohol, preferiblemente etanol, o polietilenglicol (PEG). También pueden utilizarse mezclas de dichos disolventes. Además aceites naturales pueden ser utilizados como un disolvente para algunos de los ingredientes y la composición puede proporcionarse como una emulsión. Un disolvente particularmente preferido es agua o una solución acuosa.

55 Los antioxidantes útiles para la presente composición puede ser, por ejemplo, vitamina C, vitamina E, flavonoides, carotenoides, o sales o derivados de los mismos.

60 Agentes formadores de película preferidos son aquellos agentes comúnmente usados en aplicación cosmética, como por ejemplo, acrilamida/sodio, copolímero de acrilato, copolímero de acrilatos/acrilamida, butil éster de copolímero PVM/MA, carboximetil quitina, quitosán, hidroxipropil celulosa, Polyquaternium-36, PVP, copolímero de PVP/VA, copolímero de VA/crotonatos o copolímero de vinilo caprolactama/PCP/metacrilato de dimetilaminoctilo.

65 Todos los aditivos mencionados anteriormente pueden estar presentes en una cantidad del 0 al 20, preferiblemente del 0,001, 0,01, 0,05 o 0,1 al 10, más preferiblemente del 0,5 al 5 % (p/v), si no se indica lo contrario.

Si se desea, pueden estar presentes aditivos adicionales, en particular en una cantidad del 0 al 20, preferiblemente del 0,1 al 20, preferiblemente del 0,2 al 15, especialmente del 0,5 al 10 % en peso. Los aditivos preferidos son nutrientes para las células. Estos pueden ser seleccionados de glucosa, por ejemplo, en cantidades del 0,1 al 5 % en peso, insulina en cantidades de hasta 25 IU/ml, los aminoácidos naturales, en particular cisteína, por ejemplo del 0,1 al 5 % en peso, o factores de tejido, tales como interleucinas en cantidades fisiológicas, hasta una cantidad de 10 veces la de los mismos.

Preferiblemente, la composición representa una solución acuosa que comprende

- (a) un portador de oxígeno, preferiblemente hemoglobina o mioglobina, en la que en al menos el 40 % de dicho portador de oxígeno, el sitio de unión de oxígeno está cargado con un ligando que no es O₂, y
- (b) al menos un ingrediente adicional, seleccionado de electrolito(s) conservante(s), estabilizante(s), anti-floculante(s), anticoagulante(s), agente(s) tamponadores del pH, antioxidante(s), disolvente orgánico, agente(s) formador(es) de película y agente(s) de reticulación.

En una realización preferida de la presente invención, la composición comprende un portador de oxígeno, que se aísla de la sangre entera de un ser humano o animal, preferiblemente de cerdos.

En consecuencia, es un aspecto adicional de la invención proporcionar un proceso para la purificación de un portador de oxígeno utilizable para la composición de la presente invención a partir de sangre entera.

Para la preparación de la composición según la realización preferida el portador de oxígeno se aísla de la sangre de un ser humano o animal y se purifica adicionalmente para presentarse esencialmente libre de plasma y constituyentes de la membrana celular.

Con "esencialmente libre" se quiere decir que el compuesto o composición considerada no comprende más del 20 %, preferiblemente no más del 10 %, incluso más preferiblemente no más del 5 % y particularmente preferido no más del 2 % o menos del 1 % del o de los compuesto(s) no deseado(s) mencionado(s).

La purificación puede comprender cualquier medio o etapas de método adecuados, como por ejemplo, la lisis selectiva o precipitación, centrifugación, ultracentrifugación, centrifugación fraccionada, métodos de cromatografía como la cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de afinidad o de adsorción, cromatografía de filtración en gel o filtro molecular, o diálisis, sin estar limitada a estos ejemplos, con tal de que los métodos aplicados desnaturalicen lo menos posible el portador de oxígeno. Preferiblemente durante el aislamiento y purificación el portador de oxígeno se mantiene esencialmente en solución.

Cuando el portador de oxígeno está aislado de la sangre entera, se prefiere que o bien las células que comprenden el portador de oxígeno sean separadas de otros componentes de la sangre o bien que dichas células se lisen selectivamente para suministrar el portador de oxígeno (soluble) a la solución y, posteriormente, los componentes no solubles sean separados. Una combinación de los dos métodos es asimismo adecuada. La lisis de las células que contienen el portador de oxígeno puede ser llevada a cabo por cualquier método adecuado de lisis, por ejemplo, lisis química, lisis osmótica, lisis mecánica, lisis térmica o similar.

Los restos celulares se pueden separar por cualquier medio o método adecuado. Esto incluye por ejemplo, centrifugación, filtración, sedimentación y decantación, la diálisis o cualquier método similar.

Para separar las células no lisadas o los restos de células del portador de oxígeno disuelto un método común es la sedimentación del material sólido. Por ejemplo se puede llevar a cabo una etapa de centrifugación. La centrifugación con 2 a 5000 x g por lo general es suficiente para sedimentar las células y restos celulares.

Para la sedimentación de otros componentes no disueltos, por ejemplo, cualquier precipitado desarrollado durante el proceso de purificación, en cualquier momento durante el proceso de purificación se pueden llevar a cabo más etapas de centrifugación, en particular, etapas de centrifugación utilizando fuerzas superiores, hasta ultracentrifugación con hasta 6 x 10 g.

La purificación de la solución que contiene el portador de oxígeno, además o como una alternativa a cualquier etapa de centrifugación, puede comprender al menos una etapa de filtración, preferiblemente al menos dos, tres o más etapas de filtración. Esto puede llevarse a cabo ya sea mediante el uso de al menos uno, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente al menos tres filtros (si se utiliza más de un filtro en la presente solicitud se utiliza el término "cascada de filtros"), o por una, dos, tres o más etapas de filtración separadas.

Dicha cascada de filtros o de las diferentes etapas de filtrado pueden incluir dos, tres, cuatro, cinco filtros de tipo diferente, material diferente y/o diferentes tamaños de poro. Además un filtro de lecho profundo, como por ejemplo lana de vidrio o similares se puede usar, preferiblemente como un primer material de filtro para retener los desechos celulares gruesos. Si se utiliza más de un filtro, se prefiere el uso de filtros que proporcionan diferentes diámetros de poro en orden decreciente. Por ejemplo, si se utilizan tres filtros diferentes, el primer filtro (después del filtro de lecho

profundo) puede tener un tamaño medio de poro de 1 a 0,5 μm , el segundo filtro puede tener un tamaño de poro de 0,7 a 0,3 μm y el tercero un poro tamaño de 0,4 a 0,1 μm , donde independientes de los intervalos que se solapan citados antes, el siguiente filtro, en cualquier caso, tiene un tamaño de poro más pequeño que el filtro anterior a este. Mediante dicha(s) etapa(s) de filtrado, se elimina esencialmente material sólido y precipitado que tiene un tamaño mayor que el tamaño de poro de los filtros utilizados.

Además, en el proceso de purificación se puede incluir una etapa de ultrafiltración para purificar el o los portador(es) de oxígeno. Mediante una etapa tal de ultrafiltración, macromoléculas no disueltas no deseadas se pueden separar. Preferiblemente, el límite de exclusión de tamaño se selecciona para separar macromoléculas que son más grandes (peso molecular mayor, más alto) que los portadores de oxígeno deseados, y en consecuencia, dichas macromoléculas son retenidas por el filtro. Debido al peso molecular de la hemoglobina de aproximadamente 64.000 Dalton, el límite de exclusión de tamaño del filtro de ultrafiltración debe ser mayor. Para asegurarse de que el rendimiento de hemoglobina no se reduce en la etapa de ultrafiltración, se prefiere seleccionar la exclusión de tamaño del filtro a aproximadamente 100.000 Dalton, preferiblemente a aproximadamente 200.000 Dalton, más preferiblemente a aproximadamente 300.000 Dalton, sin estar limitada a estos valores.

Adicionalmente o como una alternativa, se puede llevar a cabo cualquier etapa de cromatografía adecuada. Un tipo particularmente preferido de cromatografía es intercambio iónico o cromatografía de exclusión por tamaño.

El mismo resultado puede obtenerse mediante una etapa de diálisis utilizando una membrana de diálisis que proporciona los límites de exclusión de tamaño anteriormente mencionados, permitiendo que el portador de oxígeno pase, pero reteniendo las macromoléculas que tienen un tamaño molecular más alto.

Para reducir la cantidad de compuestos de bajo peso molecular en solución se puede llevar a cabo una etapa de diálisis adicional utilizando una membrana de diálisis que tiene un límite de exclusión de tamaño de aproximadamente 50.000 Dalton, permitiendo que las moléculas más pequeñas pasen, pero reteniendo el portador de oxígeno.

Para disminuir la contaminación de virus y/o microorganismos en la composición se prefiere particularmente incluir una etapa de degradación de contenido de virus en el proceso de purificación. El contenido de virus se reduce mediante esta etapa, preferiblemente a una carga de menos de 10, preferiblemente menos de 5, más preferiblemente menos de 2 partículas de virus por ml, e incluso más preferiblemente a 0. En esta etapa se prefiere que la solución que comprende el portador de oxígeno, se pase a través de un filtro de degradación del contenido de virus ("filtro de virus"). Tales filtros son comúnmente conocidos y disponibles en el mercado. Ejemplos son Sartorius Virosart® CPV, Planova® 15N, 20N, Millipore Viresolve® NFP o PALL Pegasus® Grado LV6, sin limitarse a éstos. Alternativamente o adicionalmente, preferiblemente después del paso a través del filtro, se puede aplicar un tratamiento con luz UV, en particular la luz UV de una longitud de onda de 245 nm para eliminar cualquier virus restante. Opcionalmente, en cualquier etapa durante el proceso de aislamiento del portador de oxígeno se puede llevar a cabo al menos una etapa de calentamiento. Esta etapa comprende el calentamiento de la suspensión o la solución que contiene el portador de oxígeno durante el procedimiento de aislamiento a una temperatura en el intervalo de 40 a 85 °C, preferiblemente de 60 a 80 °C, más preferiblemente en el intervalo de 65 a 75 °C. La etapa de calentamiento se lleva a cabo preferiblemente durante 10 minutos a 6 horas, preferentemente durante 20 minutos a 4 horas y lo más preferido de 30 min a 3 horas y puede comprender varias temperaturas diferentes dentro del rango antes mencionado. De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, se prefiere que el portador de oxígeno permanezca en solución durante todo el proceso de purificación. Además se prefiere que el portador de oxígeno permanezca en solución durante todo el proceso de purificación y durante la preparación de la composición de la presente invención. Esto significa que se prefiere que el portador de oxígeno no se precipite durante el procedimiento de la presente invención y, por consiguiente conserve su estructura tridimensional natural como la que presenta en su entorno natural.

De acuerdo con la presente invención, el procedimiento para purificar un portador de oxígeno de la sangre entera comprende al menos las etapas:

- (a) separar el plasma de la sangre entera
- (b) lisar los glóbulos rojos de la sangre
- (c) cargar los portadores de oxígeno con el ligando
- (d) calentar la muestra a una temperatura en el intervalo de 40 a 85 °C
- (e) separar el portador de oxígeno de cualquiera de los componentes sanguíneos no deseados, en el que la etapa (e) incluye al menos una etapa de filtración.

Mediante estas etapas se obtiene una solución que contiene un portador de oxígeno que puede ser utilizado para la preparación de la composición de la presente invención. En particular, la solución que contiene un portador de oxígeno obtenible mediante estas etapas puede ser concentrada a una cantidad deseada del portador de oxígeno y a esta solución, se le añade/n, el al menos un ingrediente adicional(es) para obtener la composición de la presente invención.

- 5 La etapa (a) del presente método se puede llevar a cabo mediante uno cualquiera de los métodos comúnmente utilizados para separar el plasma de la sangre entera, preferentemente por centrifugación o filtración. Por centrifugación durante aproximadamente 30 min a aproximadamente 2000 a 5000 rpm, por ejemplo, 4000 rpm, los glóbulos rojos de la sangre se sedimentan, mientras que los compuestos solubles y los glóbulos blancos de la sangre se quedan predominantemente en el sobrenadante. Mediante la repetición de resuspensión y sedimentación de los glóbulos rojos de la sangre, por ejemplo de 2 a 5 veces, se puede aumentar la separación de los glóbulos rojos de la sangre de los compuestos no deseados de sangre.
- 10 La etapa (b) se lleva a cabo preferentemente mediante la adición de agua, preferiblemente agua destilada o un tampón sub-isotónico adecuado, preferiblemente un tampón de fosfato, a la sangre espesada de la etapa (a). Después de romper los glóbulos rojos de la sangre con agua o con un tampón sub-isotónico, se añade preferiblemente una sal a la solución / suspensión para obtener la concentración fisiológica de dicha sal en solución. Preferiblemente se añade NaCl a una cantidad del 0,9 % en solución.
- 15 La etapa (c) puede llevarse a cabo después de la etapa (a), después de la etapa (b), después de la etapa (d) o después de la etapa (e), pero se lleva a cabo preferiblemente al menos después de la etapa (b). Se señala de forma particular que la etapa (c) no se lleva a cabo necesariamente de forma inmediata como la siguiente etapa después de la etapa (b), sino que también puede llevarse a cabo o repetirse después de la etapa (d), después de la etapa (e) o de cualquier etapa de tratamiento. La carga del portador de oxígeno en la solución / suspensión puede llevarse a cabo mediante la introducción de gas en la solución / suspensión, preferiblemente gas CO o NO o una mezcla de los mismos. En una realización preferida se introduce gas CO en la solución / suspensión por un periodo de tiempo lo suficientemente largo para obtener una saturación > 90 % en la solución / suspensión, preferiblemente una saturación > 95 %.
- 20 La etapa (d) puede llevarse a cabo después de la etapa (a), después de la etapa (b), después de la etapa (c) o después de la etapa (e), pero se lleva a cabo preferiblemente después de la etapa (c). Además el calentamiento se puede repetir durante el procedimiento de aislamiento. Esta etapa comprende el calentamiento de la suspensión o la solución que contiene el portador de oxígeno durante el procedimiento de aislamiento a una temperatura en el intervalo de 40 a 85 °C, preferiblemente de 60 a 80 °C, más preferentemente en el intervalo de 65 a 75 °C. La etapa de calentamiento se lleva a cabo preferiblemente durante 10 minutos a 6 horas, preferentemente durante 20 minutos a 4 horas y lo más preferido de 30 min a 3 horas y puede comprender varias temperaturas diferentes dentro del rango antes mencionado.
- 25 En la etapa (e) el portador de oxígeno se purifica de otros ingredientes adicionales no deseados contenidos todavía en solución, como células no lisadas, restos celulares, cualquier precipitado u otros ingredientes no solubles. Además el portador de oxígeno puede ser purificado adicionalmente mediante la separación de, al menos parcialmente, compuestos solubles no deseados, como por ejemplo, macromoléculas solubles o compuestos solubles de bajo peso molecular.
- 30 En consecuencia, dicha etapa (e) puede incluir varias etapas individuales, como filtración, ultrafiltración, centrifugación, ultracentrifugación, cromatografía, diálisis utilizando diferentes tipos de membranas de diálisis que proporcionan diferentes límites de exclusión de tamaño, etapas de lavado, concentración del contenido de portador de oxígeno, etc. Cualquiera de los métodos citados anteriormente puede estar incluido en esta etapa de purificación.
- 35 Preferiblemente, la etapa (e) comprende al menos una etapa de centrifugación y/o al menos una etapa de filtración. Por ejemplo, el lisado se puede centrifugar en una centrifugadora para separar las células y restos celulares restantes o se filtra por ejemplo, por una cascada de filtros como se describió anteriormente. Asimismo, el lisado se puede centrifugar primero y, posteriormente filtrar, o puede ser filtrado en una primera etapa a través de un filtro de lecho profundo y, posteriormente, a través de al menos un filtro o un filtro en cascada. Mediante la centrifugación o el filtro de lecho profundo, se simplifica el manejo durante cualquiera de las siguientes etapas de filtrado debido a la menor cantidad de material que se sedimenta u obstruye el/los filtro(s). Si no se utiliza una cascada de filtros, se prefiere que al menos un filtro se utilice para permitir que se retenga esencialmente la totalidad de los materiales sólidos contenidos en la suspensión y permitir que pasen todos los componentes disueltos. En una forma de realización más preferida, al menos uno de los filtro(s) utilizado(s) es capaz de retener asimismo microorganismos, actuando así como filtro estéril. Además puede llevarse a cabo preferiblemente una etapa de ultrafiltración y/o una etapa para disminuir el contenido de virus y/o microorganismos de la solución. Por consiguiente, se prefiere que después de la etapa (e) la solución que contiene el portador de oxígeno esté esencialmente libre de cualquier partícula no disuelta, floculo o precipitado.
- 40 En la etapa (e), además de cualquiera de las etapas / métodos citados anteriormente, la solución que comprende el portador de oxígeno deseado se puede lavar y/o concentrar. Por "lavado" se quiere decir que las moléculas más pequeñas que el portador de oxígeno deseado (que tienen un peso molecular inferior) se separan, preferiblemente mediante la adición de la misma cantidad o un múltiplo (por ejemplo 5 a 10 veces) de una solución isotónica a la solución que contiene el portador de oxígeno y después de ello filtración de la solución obtenida (diluida) mediante un filtro que retiene el portador de oxígeno y permite que las moléculas más pequeñas pasen. Para el lavado de la solución preferentemente se utiliza una solución de NaCl al 0,9 %. La etapa de lavado se puede repetir 2 o 3 o 4 o 5
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

o hasta 10 veces. Una realización preferida se ejemplifica mediante el uso de un filtro que tiene un límite de exclusión de tamaño de 5000 Dalton, 10.000 Dalton o 20.000 Dalton, permitiendo que las moléculas más pequeñas pasen. En esta etapa la solución que contiene el portador de oxígeno (preferiblemente después del lavado) se puede concentrar hasta una concentración deseada del portador de oxígeno, por ejemplo, a una concentración de 50 g/l, 100 g/l o 200 g/l sin ser restringida a estas cantidades. Cualquier concentración deseada se puede obtener ya sea mediante la concentración por filtración o mediante la adición del 0,9 % de NaCl o una solución isotónica similares.

La solución que contiene el portador de oxígeno así obtenida puede usarse a continuación para preparar la composición de la presente invención mediante la adición de al menos un ingrediente adicional descrito arriba a la solución en la cantidad deseada.

En una realización preferida, la composición de la presente invención se prepara mediante la adición a la solución que contiene el portador de oxígeno de al menos un conservante, preferiblemente un conservante farmacéuticamente aceptable como por ejemplo, fenoxietanol, parabenos, benzoato de sodio, alcohol bencílico, hexaclorofeno y un antioxidante y/o estabilizante como por ejemplo, N-acetilcisteína, octanoato de sodio, N-acetil-L-triptofanato, N-acetil-metioninato, vitamina E, vitamina C, metil prednisolona o manitol. Además cualquiera de los ingredientes adicionales descritos anteriormente puede ser añadido adicionalmente.

La composición terminada puede ser esterilizado de nuevo, si se desea, por ejemplo, por calentamiento, filtración, centrifugación, por la adición de conservantes, aplicación de vapor, la aplicación de gas o aplicación de UV o una combinación de al menos dos de éstas, preferentemente por una etapa adicional de filtración estéril y preferiblemente se introduce en recipientes estériles o bolsas estériles para almacenamiento.

De acuerdo con una realización preferida, las bolsas estériles son colocadas en un contenedor de aerosol para su uso posterior. Un ejemplo puede ser un sistema bolsa-en válvula (Bag-on-Valve), que comprende una bolsa, por ejemplo, una bolsa de aluminio laminado y un contenedor de aerosol de lámina de estaño o aluminio. Debido a la separación de producto y propelente, el sistema bolsa-en-válvula se puede utilizar con aire comprimido o nitrógeno a una presión por ejemplo de 2 a 9 bar.

De acuerdo con la invención, la composición se utiliza preferiblemente para el tratamiento de heridas abiertas, preferiblemente heridas crónicas de seres humanos y animales, en donde se prefiere el uso para el tratamiento de seres humanos. El uso preferido es por tratamiento tópico de la herida(s) con el/los portador(es) de oxígeno cargado(s) descritos.

Sorprendentemente, se ha encontrado que es posible tratar eficazmente heridas abiertas con dichos portadores de oxígeno cargados. Como se describió anteriormente la curación de heridas crónicas a menudo se ve disminuida debido a la disminución del suplemento de oxígeno. En consecuencia, parece lógico que el tratamiento de las heridas requiera de portadores de oxígeno cargados de oxígeno para tratamiento. Sin embargo, de acuerdo con la presente invención, se encontró que es posible obtener una curación externa de herida positiva mediante la aplicación de un portador de oxígeno cargado con CO. Sin estar ligado a ella, nuestra teoría es que debido a la presión parcial de oxígeno en el aire el ligando puede ser reemplazado por el oxígeno cuando se aplica a la herida y en consecuencia se refuerza la curación de la herida.

La composición de la presente invención tiene la clara ventaja de una mayor estabilidad del portador de oxígeno debido a su estado no oxidado basado en la carga con el ligando CO que resulta en una buena preparación y estabilidad de almacenamiento. Además, la composición es fácil de aplicar y fácil de manejar y proporciona un enfoque seguro y eficaz para mejorar la curación de heridas mediante la facilitación de la difusión mediada por el portador / agente de oxígeno.

La composición de la presente invención se aplica externamente. Dependiendo del estado de la herida, se aplica preferiblemente pulverizada, sobre el área de la herida en forma de una pulverización fina.

De acuerdo con la invención, se ha demostrado que las heridas abiertas, en particular también las heridas crónicas que tienen muy diferentes causas, pueden ser tratadas eficazmente. Estas pueden ser heridas después de operaciones, después de un traumatismo, después de lesiones, heridas con mala curación o heridas hipóxicas, o también heridas causadas por cambios degenerativos en el tejido. A este respecto, puede haber heridas causadas por cambios degenerativos de los vasos sanguíneos arteriales y heridas que resultan de la insuficiencia venosa crónica. Estas incluyen particularmente decúbito, así como heridas crónicas, en particular aquellas que resultan de la diabetes. Otras heridas causadas por quemaduras (ya sea por el calor, por productos químicos o por congelación) o por escaldado pueden ser tratadas eficazmente.

Figuras

La Figura 1 muestra la curva de saturación de O₂ de la hemoglobina dependiente de la presión parcial del O₂ circundante.

Ejemplos

Ejemplo 1:

5 La hemoglobina se aisló a partir de sangre entera de cerdos mediante la separación de los glóbulos rojos del suero, ruptura de los glóbulos rojos recogidos, sedimentación de restos de células, carga de la hemoglobina con CO mediante la introducción de gas CO hasta que se obtiene la saturación de la muestra de líquido, calentamiento de la solución, realización de varias etapas de filtración, incluyendo una etapa de filtración de virus y lavado de la solución de hemoglobina obtenida mediante la adición de dos veces un volumen 2 veces mayor del 0,9 % de solución salina y filtrado de la solución.

10 Se preparó una composición lista para usar para el tratamiento de heridas, que comprende el 10 % de hemoglobina purificada y estabilizada, el 0,05 % de N-acetil cisteína y el 0,7 % de fenoxi etanol en NaCl al 0,9 %. La composición se cargó de nuevo con gas CO, se separó en 10 partes y se envasó en un contenedor de aerosol, respectivamente.

15 Ejemplo 2:

Una primera parte de la composición del Ejemplo 1 se utilizó inmediatamente después de la preparación para el tratamiento de una paciente femenina (Diagnóstico: Diabetes, Hipertensión) con una herida crónica en el pie derecho (7x2cm). La herida se trató una vez al día mediante pulverización de la composición sobre la herida. Después de 3 semanas los primeros signos de curación eran visibles. En las siguientes semanas el proceso de curación fue pronunciado y completo, obteniéndose el cierre de la herida después de 18 semanas.

25 Ejemplo 3:

Una segunda parte de la composición del Ejemplo 1 se almacenó a 4 °C durante 2 años después de la preparación y después de ello, se utilizó para tratar una herida crónica de un paciente masculino que sufría de diabetes mellitus tipo II. La composición se aplicó a una úlcera crónica superficial (4x3cm) en la tibia izquierda del paciente. La herida se trató una vez al día. Después de 2,5 semanas la curación se hizo visible; después de 4 semanas la herida se curó más del 50 % de la línea de base. En las siguientes semanas se observó una curación rápida y el cierre completo de la herida se obtuvo después de 8 semanas.

Ejemplo 4:

35 Una tercera parte de la composición del Ejemplo 1 se almacenó a 10 °C durante 2 años. Después de ello se utilizó para el tratamiento de una úlcera crónica superficial (4x2cm) en la pierna derecha de un paciente masculino que sufría de diabetes mellitus tipo II. La herida se trató una vez al día. Después de 2,5 semanas la curación era visible. En las siguientes semanas se observó una curación rápida y el cierre completo de la herida se obtuvo después de 12 semanas.

40 Ejemplo 5:

Una parte de la composición del ejemplo 1 se utilizó para tratar un paciente masculino después del contacto con agua hirviendo y vapor. El diagnóstico fue de quemaduras de primer y segundo grado en el rostro.

45 El tratamiento inicial con gel frío y Neosporin durante una semana no mostró mejora y el médico que lo atendía propuso la aplicación de injertos de piel en la nariz y otras partes de la cara, como los párpados.

50 Sin embargo, el paciente fue tratado con la composición del ejemplo 1 durante 7 semanas. La composición se aplicó a la piel por pulverización tres o cuatro veces al día. Se observó una mejoría y curación rápida de la piel y el paciente fue dado de alta del hospital después de siete semanas. No se requirieron injertos de piel.

Ejemplo 6: Comparación de hemoglobina cargada/no cargada

55 A) Se preparó un aerosol de hemoglobina cargada de acuerdo con el Ejemplo 1. Se preparó una composición lista para usar para tratamiento de heridas, que comprende 10 % de hemoglobina purificada y estabilizada, 0,05 % de N-acetil cisteína y 0,7 % de fenoxi etanol en NaCl al 0,9 %. La composición se cargó de nuevo con CO gas, se separó en 20 partes que se envasaron en un contenedor de aerosol, respectivamente.

60 La composición puede almacenarse entre 4 °C y temperatura ambiente durante meses a años.

B) Se trató una segunda parte de sangre entera de cerdo como en el Ejemplo 1, con la excepción de que no se llevó a cabo carga de CO. Durante la etapa de calentamiento precipitó una cantidad considerable de hemoglobina. Las siguientes etapas de filtración fueron difíciles de llevar a cabo. El rendimiento de hemoglobina purificada por litro de sangre entera disminuyó a menos del 30 % del rendimiento cuando la carga de CO se llevó a cabo antes del calentamiento. Esto muestra que cargar las muestras con CO durante la preparación estabiliza la hemoglobina de una manera durante una etapa de calentamiento que precipita considerablemente menos

hemoglobina.

Se preparó una composición lista para su uso para el tratamiento de heridas, que comprende el 10 % de hemoglobina purificada, 0,05 % de N-acetil cisteína y 0,7 % de fenoxi etanol en NaCl al 0,9 %. La composición se dividió en partes que se envasaron en contenedores de aerosol, respectivamente.

5 C) Se aisló una parte adicional de hemoglobina de sangre entera de cerdos por un método como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO2003/077941 sin cargar la hemoglobina durante la preparación: la hemoglobina se liberó del plasma y los constituyentes de la membrana celular sin calentamiento, mediante centrifugación y ultrafiltración, y se purificó.

10 Se preparó una solución lista para su uso para tratamiento de heridas, que comprende un 10 % de hemoglobina purificada, un 0,05 % de N-acetil cisteína y 0,7 % de fenoxi etanol en NaCl al 0,9 %. La composición se separó en 10 partes que se envasaron en un contenedor de aerosol, respectivamente.

15 Se preparó un aerosol nuevo de hemoglobina no cargada, preparado de esta manera, durante el periodo de tratamiento tan a menudo como fuera necesario (cada uno de los tres días) y se almacenó a 4 °C como máximo durante un día antes de su uso.

Tratamiento de pacientes:

20 Se trataron varios pacientes masculinos (edad 65-75) con úlcera de pie diabético en la parte inferior de la pierna durante tres meses con aerosol de hemoglobina de acuerdo con A) (almacenado a 10 °C durante hasta 6 meses) o un aerosol de hemoglobina recién preparado de acuerdo con C) (almacenamiento a 4 °C durante 3 días máximo, es decir, cada uno de los tres días se usó una composición fresca) hasta que se obtuvo una curación completa de la herida en todos los pacientes. De acuerdo con los dermatólogos asistentes, la curación de la herida obtenida con las
25 composiciones de acuerdo con A) mostró en todos los casos menor secreción, menor incrustación y/o menor supuración en comparación con las heridas tratadas por el aerosol de hemoglobina de acuerdo con C) y, en particular, en comparación con las heridas tratadas convencionalmente. Debido a problemas mínimos, las heridas tratadas con la composición de hemoglobina cargada de acuerdo con A) mostraron una curación más rápida por cm² que las heridas tratadas con el aerosol de hemoglobina no cargada C) y mucho más rápido que las heridas tratadas
30 convencionalmente. Los pacientes tratados con la composición A) presentaron además menos molestias.

Ejemplo 7:

35 Se prepararon muestras de composiciones de acuerdo con el Ejemplo 6A), Ejemplo 6B) o Ejemplo 6C), respectivamente, se examinaron considerando la carga de O₂ de las muestras así como a la producción de methemoglobina, una especie que es incapaz de unirse al O₂. Además la methemoglobina afecta a las moléculas de hemoglobina en la proximidad inmediata, de manera que estas puedan aún unirse al O₂, pero no puedan liberarse de este nunca más.

40 Todas las muestras de la Tabla 1 se diluyeron 1:1 con una solución de NaCl al 0,9 % para imitar las condiciones de un tratamiento de herida. Las muestras 7.1 a 7.8 se midieron inmediatamente después de la dilución (el almacenamiento de las muestras 7.5 a 7.8 fue a temperatura ambiente antes de la dilución). El tratamiento con gas fue el siguiente: 6 ml de dicha solución diluida se transfirieron a 30 ml de cada matraz de vidrio. El tratamiento con gas se llevó a cabo llenando los matraces de vidrio completamente con el gas respectivo, cerrando el matraz y
45 haciendo pivotar la muestra durante 30 s. Todas las muestras se almacenaron durante el periodo de tiempo mencionado a 30 °C. Las muestras se trataron de acuerdo con las condiciones descritas en la Tabla 1 y se midieron la cantidad total de hemoglobina (hemoglobina + methemoglobina), el contenido de oxígeno, el contenido de methemoglobina y opcionalmente el contenido de CO.

50 Tabla 1

Ejemplo	muestra	tratamiento	Hb total g/dl	% O ₂	% CO	% MetHb
7.1	Comp. recién preparada de acuerdo con en el Ejemplo 6A)	ninguno	5,5	1,7	96,3	3,9
7.2	Comp. recién preparada de acuerdo con en el Ejemplo 6B)	ninguno	5,7	26,8		5,1
7.3	Comp. recién preparada de acuerdo con en el Ejemplo 6C)	ninguno	5,6	27,0		4,7
7.4	Composición del Ejemplo 6A), almacenada durante 3 meses (10 °C)	ninguno	5,9	1,8	96,5	3,8
7.5	Composición del Ejemplo 7.2	Almacenado durante 24 h	5,6	26,9		11,2

7.6	Composición del Ejemplo 7.2	Almacenado durante 48 h	5,5	27,0		17,0
7.7	Composición del Ejemplo 7.3	Almacenado durante 24 h	5,7	26,5		10,5
7.8	Composición del Ejemplo 7.3	Almacenado durante 48 h	5,6	26,7		16,2
7.9	Composición del Ejemplo 7.4	0,5 h O ₂	5,8	13,7	84,7	4,4
7.10	Composición del Ejemplo 7.4	1 h O ₂	5,7	19,6	79,1	4,2
7.11	Composición del Ejemplo 7.4	2 h O ₂	5,8	25,7	73,1	4,3
7.12	Composición del Ejemplo 7.4	3 h O ₂	5,9	30,7	68,1	4,2
7.13	Composición del Ejemplo 7.4	24 h O ₂	5,7	33,5	59,6	9,8
7.14	Composición del Ejemplo 7.4	48 h O ₂	5,8	32,5	55,9	15,5
7.15	Composición del Ejemplo 7.4	72 h O ₂	5,7	31,7	55,8	16,0
7.16	Composición del Ejemplo 7.4	0,5 h CO ₂	5,8	4,0	91,8	5,7
7.17	Composición del Ejemplo 7.4	1 h CO ₂	5,7	6,0	90,0	5,7
7.18	Composición del Ejemplo 7.4	2 h CO ₂	5,9	9,2	86,7	5,8
7.19	Composición del Ejemplo 7.4	3 h CO ₂	5,7	9,6	85,1	6,9
7.20	Composición del Ejemplo 7.4	24 h CO ₂	5,6	4,9	77,5	19,7
7.21	Composición del Ejemplo 7.4	48 h CO ₂	5,8	8,2	68,2	27,4
7.22	Composición del Ejemplo 7.4	72 h CO ₂	5,7	9,4	65,9	28,3
7.23	Composición del Ejemplo 7.4	0,5 h aire	5,8	9,2	89,0	4,5
7.24	Composición del Ejemplo 7.4	1 h aire	5,7	12,4	85,9	4,4
7.25	Composición del Ejemplo 7.4	2 h aire	5,9	18,0	80,5	4,3
7.26	Composición del Ejemplo 7.4	3 h aire	5,6	20,7	77,9	4,3
7.27	Composición del Ejemplo 7.4	24 h aire	5,8	24,3	69,3	9,1
7.28	Composición del Ejemplo 7.4	48 h aire	5,7	25,4	64,3	13,9
7.29	Composición del Ejemplo 7.4	72 h aire	5,7	26,8	62,2	14,3

5 Como puede verse a partir de los resultados en la Tabla 1 las composiciones de la invención, en las que el portador de oxígeno se carga con CO₂, no solo pueden almacenarse durante un largo tiempo sin formar methemoglobina, sino que además son capaces de reemplazar el CO unido por O₂ cuando este se ofrece al portador de oxígeno cargado. Si se exponen a 100 % de O₂ (ejemplos 7.9 a 7.15) la saturación de O₂ en la hemoglobina aumenta muy rápido.

10 Si la composición se expone a CO₂, que representa la situación dentro del tejido activo para la ruta de mamíferos, se forma una mayor cantidad de methemoglobina (ejemplos 7.16 a 7.22).

15 La presión parcial de O₂ en aire es de solo aproximadamente 21 %, esto de acuerdo con la curva de saturación de O₂ de la hemoglobina mostrada en la Figura 1, la saturación máxima posible de O₂ de la hemoglobina con oxígeno en aire es de aproximadamente 29 %. Considerando los ejemplos 7.23 a 7.29, el resultado sorprendente es que en 3 horas la composición expuesta al aire se carga con 20,7 % de oxígeno, pero aún tiene un contenido de methemoglobina muy bajo. Cuando se tratan heridas externas, la composición se pulveriza en la superficie de la herida (limpiada) y permanece en contacto con el aire.

20 Estos resultados muestran que una composición de acuerdo con la invención comprende un portador de oxígeno estabilizado que después de varios meses de almacenamiento proporciona un alto transporte de oxígeno cuando está en contacto con el aire.

REIVINDICACIONES

1. Un contenedor de aerosol, preferiblemente un contenedor de aerosol envasado a presión, que contiene una composición que comprende
- 5 (a) un portador de oxígeno, que es hemoglobina o mioglobina, en donde en al menos un 40 % de dicho portador de oxígeno el sitio de unión a oxígeno está cargado con monóxido de carbono y
- 10 (b) al menos un ingrediente adicional, seleccionado de electrolito(s), conservante(s), estabilizador(es), antifloculante(s), anticoagulante(s), agente(s) de tamponador(es) del pH, disolvente(s), antioxidante(s), agente(s) formadores de película o agente(s) reticulante(s).
2. Composición de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizada por que** la composición es una solución acuosa u orgánica.
- 15 3. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizada por que** al menos un 50 %, preferiblemente al menos un 60 %, más preferido al menos un 70 %, incluso más preferido al menos un 80 %, particularmente preferido al menos un 90 % del portador de oxígeno se proporciona en forma cargada con monóxido de carbono.
- 20 4. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada por que** el portador de oxígeno es hemoglobina o mioglobina natural de origen humano o animal, o es una hemoglobina o una mioglobina de origen humano o animal tratadas, reticuladas o modificadas artificialmente.
- 25 5. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 proporcionada en forma esterilizada.
6. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el contenido de virus de dicha composición es menor de 10, preferiblemente menor de 5, más preferiblemente menor de 2 partículas de virus por ml, e incluso más preferido de 0.
- 30 7. Método para preparar una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que
- (i) el portador de oxígeno se carga con el ligando protector de monóxido de carbono durante o después del aislamiento de su entorno natural, (ii) se añade al menos otro ingrediente (b), (iii) la composición se esteriliza opcionalmente y (iv) la composición se envasa en un contenedor de aerosol.
- 35 8. Método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la composición se esteriliza en la etapa (iii) por calentamiento, filtración, centrifugación, adición de conservantes, aplicación de vapor, aplicación de gas o aplicación de UV o una combinación de al menos dos de los mismos.
- 40 9. Proceso para purificar un portador de oxígeno, que es hemoglobina o mioglobina, para la preparación de una composición como se describe en la reivindicación 1 o la reivindicación 6, a partir de sangre entera, que comprende las etapas de:
- 45 a. separar el plasma de la sangre entera
- b. lisar los glóbulos rojos de la sangre
- c. cargar el portador de oxígeno con monóxido de carbono
- d. calentar la muestra a una temperatura en el intervalo de 40 a 85 °C
- e. separar el portador de oxígeno de cualquier componente sanguíneo no deseado,
- 50 en el que la etapa (e) incluye al menos una etapa de filtración.
10. Proceso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la filtración en la etapa (e) comprende el uso de un filtro estéril y/o un filtro para virus.
- 55 11. Solución o composición que comprenden un portador de oxígeno, seleccionado de hemoglobina o mioglobina, que se preparan mediante un proceso de acuerdo con las reivindicaciones 9 a 10.
12. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicho portador de oxígeno se prepara de acuerdo con las reivindicaciones 9 o 10.
- 60 13. Portador para oxígeno seleccionado de hemoglobina o mioglobina, purificado por un proceso de acuerdo con las reivindicaciones 9 o 10 para su uso en un método para el tratamiento externo de heridas.
- 65 14. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende una solución de acuerdo con la reivindicación 11 o un portador de oxígeno, seleccionado de hemoglobina o mioglobina, purificado por un proceso de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10, para su uso en un método para el tratamiento

externo de heridas.

Figura 1

