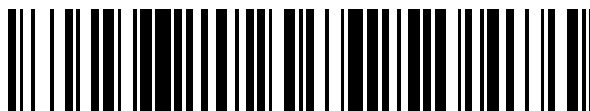


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 364**

51 Int. Cl.:

A61K 9/50 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01)
A61K 31/755 (2006.01)
A01N 1/02 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.07.2009 PCT/EP2009/004925**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2010 WO10003647**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2009 E 09777024 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2296635**

54 Título: **Portadores de oxígeno artificiales y su uso**

30 Prioridad:

09.07.2008 DE 102008032183
30.08.2008 DE 102008045152

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.01.2018

73 Titular/es:

UNIVERSITÄT DUISBURG-ESSEN (100.0%)
Universitätsstrasse 2
45141 Essen, DE

72 Inventor/es:

DE GROOT, HERBERT;
MAYER, CHRISTIAN;
PETRAT, FRANK y
KIRSCH, MICHAEL

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 649 364 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

Portadores de oxígeno artificiales y su uso

5 La presente invención se refiere al campo de los portadores de oxígeno artificiales, en especial como sustitutos de la sangre para el cuerpo humano o animal. En especial, la presente invención se refiere a portadores de oxígeno artificiales a base de cápsulas con contenido de perfluorocarbono, en especial nanocápsulas.

En especial, la presente invención se refiere a portadores de oxígeno artificiales en forma de dispersiones, que son apropiados en especial como sustitutos de la sangre para el cuerpo humano o animal, con preferencia, con fines de transfusión.

10 Además, la presente invención se refiere al uso de estas dispersiones en especial como sustitutos de la sangre para el cuerpo humano o animal, en especial con fines de transfusión, por ejemplo, para el tratamiento de estados después de pérdidas de sangre, estados isquémicos y estados después de reperfusión, pero también con otros fines de aplicación.

15 La sangre, que está a disposición para transfusiones, es un bien escaso. Las transfusiones de sangre son medidas que a menudo salvan vidas en caso de víctimas de accidentes, intervenciones quirúrgicas y en la terapia de anemias crónicas. La disponibilidad de conservas de sangre se vuelve cada vez menor, entre otras cosas, debido a riesgos de infecciones (por ejemplo, VIH, priones, hepatitis A, B o C, etc.) y una disminución de la disponibilidad de donantes (comp., por ejemplo, Habler, O., Pape, A., Meier, J., y Zwissler, B. (2005) [portadores de oxígeno artificiales como alternativa para la transfusión de sangre]. *Anaesthesist* 54, 741-754, así como Lowe, K. C. (2006) *Blood Substitutes: from chemistry to clinic. J Mat Chem* 16, 4189-4196).

20 Además, se acumulan los hallazgos que remiten a claras pérdidas de función en sangre conservada que ya se comprueban después de algunos días (comp., por ejemplo, Riess, J. G. (2001) *Oxygen carriers ("blood substitutes") raison d'être, chemistry, and some physiology. Chem Rev* 101, 2797-2920; Bennett-Guerrero, E., Veldman, T. H., Doctor, A., Telen, M. J., Ortel, T. L., Reid, T. S., Mulherin, M. A., Zhu, H., Buck, R. D., Califf, R. M., y McMahon, T. J. (2007) *Evolution of adverse changes in stored RBCs. Proc Natl Acad Sci USA* 104, 17063-17068; así como Reynolds, J. D., Ahearn, G. S., Angelo, M., Zhang, J., Cobb, F., y Stamler, J. S. (2007) *S-nitrosohemoglobin deficiency: a mechanism for loss of physiological activity in banked blood. Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17058-17062).

25 Las transfusiones de sangre pertenecen a los procedimientos médicos usados con mayor frecuencia. El abastecimiento de los órganos con oxígeno es la tarea individual de la sangre por mucho más importante; si se descompone, el afectado se muere en un lapso muy breve. Por ello, en el caso de una elevada pérdida de sangre, primero se asegura el transporte de oxígeno. Para ello, se usan rutinariamente eritrocitos de la sangre de los donantes; estas células contienen la proteína hemoglobina, que se unen muy eficazmente con el oxígeno y lo entregan al tejido. Sin embargo, la sangre de los donantes tiene algunas desventajas considerables: no hay suficientes donantes y no todo receptor puede recibir sangre de cualquier donante (incompatibilidad). La sangre puede contener materiales infecciosos desconocidos (por ejemplo, virus, etc.). El control de los patógenos peligrosos es muy dispendioso y costoso. Además, la sangre de los donantes es capaz de almacenarse sólo de modo restringido.

35 Una solución eficaz de este problema es el desarrollo de portadores de oxígeno artificiales que hacen superfluo el uso de conservas de sangre o al menos reducen claramente la cantidad de transfusiones de sangre.

Por ello, desde algunas décadas, se investiga en sustitutos sintéticos apropiados, por un lado, el uso de hemoglobina modificada y, por otro, el uso de hidrocarburos perfluorados (perfluorocarbonos), que poseen una capacidad muy buena de unión o de disolución de oxígeno.

40 Además de los portadores de oxígeno a base de derivados de hemoglobina, cuya producción está ligada con una problemática propia (como, por ejemplo, escasos recursos, contaminación con patógenos, reacciones inmunes, trastornos circulatorios, toxicidad, etc.), se desarrollaron y se desarrollan, entre otros, portadores de oxígeno a base de hidrocarburos perfluorados, los llamados perfluorocarbonos (comp. por ejemplo, la bibliografía previamente citada, así como Dinkelmann, S., y Northoff, H. (2003) *Artificial oxygen carriers a critical analysis of current developments. Anästhesiologie Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 38, 47-54, así como Spahn, D. R., y Kocian, R. (2005) *Artificial O₂ carriers: estado en 2005. Curr Pharm Des* 11, 4099-4114).

45 Los perfluorocarbonos poseen una elevada solubilidad para gases respiratorios como oxígeno y dióxido de carbono que los disuelven en cavidades, es decir, pequeños espacios huecos. Son químicamente muy inertes, incoloros e inodoros y de ningún modo actúan en forma corrosiva. Sus propiedades físicas como los puntos de fusión y de ebullición, varían como en el caso de los alcanos con el largo de la cadena o bien con el tamaño de la estructura carbonada. Su elevada inercia y la capacidad de metabolización faltante relacionada con ella son probablemente también el motivo para que los perfluorocarbonos prácticamente no sean tóxicos. Los perfluorocarbonos son extremadamente hidrofóbicos, pero más allá de ello, también son lipofóbicos. Por ello, se usan en el estado de la técnica como portadores de oxígeno artificiales junto con emulsificantes en forma de emulsiones, en donde como se usan emulsificantes, por ejemplo, polímeros sintéticos o, más recientemente, fosfolípidos (por ejemplo, lecitina, parcialmente junto con colesterol).

Los primeros ensayos con perfluorocarbonos como portadores de oxígeno artificiales tuvieron lugar ya en los años 60 (comp., por ejemplo, Clark, L. C., Jr., y Gollan, F. (1966) Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure. *Science* 152, 1755-1756). En experimentos parcialmente espectaculares –sobrevivieron ratones sumergidos en soluciones perfluorocarbonadas–, se mostró el potencial fundamental de estos compuestos como portadores de oxígeno. Los problemas esenciales de la primera generación de portadores de oxígeno perfluorocarbonados eran la escasa estabilidad de las emulsiones perfluorocarbonadas, así como los efectos colaterales que estaban relacionados con el emulsionante utilizado.

Estos problemas se pudieron solucionar con el uso de otros perfluorocarbonos como 1-bromoperfluorooctano (= bromuro de perfluorooctilo), así como de lecitina como emulsionante. Las preparaciones perfluorocarbonadas de la última generación como el preparado Oxygent[®], se usaron exitosamente en ensayos con animales y estudios clínicos (comp., por ejemplo, Spahn, D. R. (1999) Blood substitutes. Artificial oxygen carriers: perfluorocarbon emulsions. *Crit Care* 3, R93-97).

Esencialmente dos problemas unidos causalmente entre sí limitan actualmente, sin embargo, el ulterior uso clínico de los perfluorocarbonos como portadores de oxígeno artificiales: por un lado, es sólo un tiempo de residencia sólo relativamente escaso de los perfluorocarbonos de solamente algunas horas en el sistema vascular; lo cual hasta ahora sólo permite el uso a corto plazo de los perfluorocarbonos como medida provisional, pero evita un uso como alternativa real para la transfusión de sangre. Por otro lado, son una alteración del sistema inmune y, con ello, entre otros, síntomas relacionados similares a la gripe y el peligro de una elevada pensión a las infecciones.

El escaso tiempo de residencia en el sistema vascular como también el trastorno del sistema inmune se basan en el hecho de que las gotitas de emulsión de los perfluorocarbonos se extraen de células del sistema reticuloendotelial. Esta extracción se realiza, por un lado, muy rápidamente debido a la amplia expansión de este sistema y, por otro lado, las células del sistema reticuloendotelial se activan por medio de la extracción de perfluorocarbonos en algunas de sus funciones como la formación de mediadores de la inflamación, pero por el contrario, en otra función se debilitan, como la defensa contra agentes patógenos.

Más allá de ello, el documento WO 2007/134304 A1 describe una composición para la liberación controlada de peróxidos o de oxígeno en un entorno acuoso o no acuoso, en donde la composición contiene un material de cápsula o de recubrimiento, en el que están encerrados el peróxido de hidrógeno, peróxidos inorgánicos o aductos de peróxido. Al entrar agua en el interior de la cápsula o por medio de la actividad catalítica fuera de la cápsula, se convierten los peróxidos en oxígeno o en peróxido de hidrógeno. El sistema de cápsulas sólo se prevé para un suministro único de oxígeno o bien de peróxido de hidrógeno a la sangre o el tejido.

Con referencia a mayores detalles respecto de los portadores de oxígeno artificiales, en especial como alternativa de las transfusiones de sangre y las desventajas y riesgos ligados con ellos, se puede hacer remisión especialmente a Habler, O., Pape, A., Meier, J., y Zwissler, B. (2005) [portadores de oxígeno artificiales como alternativa de la transfusión de sangre]. *Anaesthesist* 54, 741-754 así como Riess, J. G. (2001) Oxygen carriers ("blood substitutes") raison d'être, chemistry, and some physiology. *Chem Rev* 101, 2797-2920.

Por ello, la presente invención tenía por objeto proporcionar portadores de oxígeno artificiales, con preferencia, a base de hidrocarburos fluorados, en especial hidrocarburos perfluorados, en especial a base de perfluorocarbonos, que evitan al menos en parte las desventajas previamente expuestas del estado de la técnica o al menos las debilitan. En especial, estos portadores de oxígeno artificiales deberían ser apropiados o estar en condiciones de ser usados, por ejemplo, como sustituto de la sangre ("sucedáneo de la sangre" o bien "sustituto de la sangre"), en especial en estados de pérdida o después de la pérdida de sangre del cuerpo humano o animal (por ejemplo, después de intervenciones quirúrgicas, accidentes, lesiones etc.), o para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de estados isquémicos o de estados después de reperfusión (llamado síndrome del torniquete o de reperfusión).

La solicitante halló ahora, sorprendentemente, que la tarea previamente definida se puede solucionar usando portadores de oxígeno artificiales a base de hidrocarburos fluorados, en especial hidrocarburos perfluorados, con preferencia, perfluorocarbonos, en donde se incluyen los hidrocarburos fluorados en un material de cápsula permeable al oxígeno, en especial se almacenan allí o se recubren con él.

Es así objeto de la presente invención según un primer aspecto de la presente invención una dispersión de portadores de oxígeno artificiales según la reivindicación 1; otras conformaciones ventajas de este aspecto de la invención son objeto de las reivindicaciones secundarias referidas a ello.

Otro objeto de la presente invención según un segundo aspecto de la presente invención es el uso de la dispersión según la invención de acuerdo con las reivindicaciones 9 a 14; otras conformaciones ventajosas de este aspecto de la invención son objeto de las reivindicaciones secundarias referidas a ello.

De hecho, se entiende que, a continuación, estas realizaciones, que se hacen respecto de un aspecto según la invención, también rigen correspondientemente para los otros aspectos de la invención sin que esto se observe expresamente o se haga referencia a ello.

Así, es objeto de la presente invención según un primer aspecto de la presente invención una dispersión de portadores

de oxígeno artificiales, en especial como sustituto de la sangre, con preferencia, con fines de transfusión, en donde la dispersión contiene cápsulas con capacidad de almacenamiento de oxígeno reversible, en donde las cápsulas comprenden un material de cápsula permeable al oxígeno, que contiene y/o comprende hidrocarburos fluorados, en especial hidrocarburos perfluorados, con preferencia, perfluorocarbonos, en donde el material de cápsula permeable al oxígeno comprende o está compuesto de un polímero orgánico permeable al oxígeno, en donde el polímero se selecciona del grupo de los poli(láctidos-co-glicólidos) y cianoacrilatos de polialquilo así como sus mezclas, en donde el polímero orgánico está conformado libre de puentes de sulfuro y presenta una estructura coherente, en la que en las cápsulas, la relación en peso de material de cápsula permeable al oxígeno a hidrocarburos fluorados está en el intervalo de 75 : 25 a 10 : 90, en donde los hidrocarburos fluorados presentan pesos moleculares en el intervalo de 250 a 2.000 g/mol y están conformados en forma líquida, en donde las cápsulas presentan un diámetro en el intervalo de 50 a 1.000 nm, en donde la dispersión contiene las cápsulas en cantidades relacionadas con el volumen del 1 al 70% en volumen, respecto de la dispersión, en donde la dispersión se ajusta a un valor fisiológico de pH y presenta una viscosidad específica η en el intervalo de 0,1 a 1,8 s, respecto de temperaturas en el intervalo de 10°C a 40°C, y en donde la dispersión es una dispersión de base acuosa y/o contiene agua como fase continua en forma de una solución fisiológica y/o isotónica de cloruro de sodio, en donde la dispersión es estable en almacenamiento.

Una particularidad de la presente invención se ha de ver así en el hecho de que los hidrocarburos fluorados, que están en condiciones de almacenar oxígeno de modo reversible, están presentes en forma encapsulada, en especial en forma de las llamadas nanocápsulas. Como se explica más adelante, esto lleva sorprendentemente a las ventajas de la presente invención enumeradas más abajo. Una idea decisiva de la presente invención es, así, el uso de cápsulas con contenido de perfluorocarbono, en especial nanocápsulas, como portadores de oxígeno artificiales.

La expresión de la capacidad de almacenamiento de oxígeno reversible respecto de las cápsulas usadas según la invención, en especial nanocápsulas, designa en especial a la capacidad de estas cápsulas de almacenar el oxígeno hasta que, en condiciones fisiológicas, en especial en el cuerpo humano o animal, se vuelva a entregar o liberar en caso de necesidad, en especial en los tejidos afectados, en los que hay déficit de oxígeno o bien estados isquémicos.

La expresión de la capacidad de almacenamiento de oxígeno designa todo tipo de almacenamiento, por ejemplo, por unión física y/o química, absorción, inclusión, adsorción, disolución, o similares.

De un modo preferido según la invención, se conforman las cápsulas, en especial las nanocápsulas, como las llamadas cápsulas de núcleo/cubierta. En este caso, el material de cápsula permeable al oxígeno conforma la cubierta de la cápsula, y los hidrocarburos fluorados están rodeados o incluidos por la cubierta de cápsula permeable al oxígeno, es decir, los hidrocarburos fluorados forman el interior o bien el núcleo de estas cápsulas de núcleo/cubierta.

Sin embargo, alternativamente, a pesar de que menos preferida según la invención, también es posible que las cápsulas, en especial las nanocápsulas, estén presentes como las llamadas cápsulas de matriz. En este caso, el material de cápsula permeable al oxígeno conforma una matriz, y los hidrocarburos fluorados se almacenan o se incluyen en la matriz a base de este material de cápsula permeable al oxígeno, con preferencia, en una distribución homogénea o uniforme.

En lo que respecta al material de cápsula permeable al oxígeno, en especial la cubierta de las cápsulas de núcleo/cubierta o el material de matriz de las cápsulas de matriz, comprende entonces o está compuesto por un polímero orgánico permeable al oxígeno. Los polímeros orgánicos permeables al oxígeno según la invención son poli(láctidos-co-glicólidos), que se pueden derivar eventualmente con compuestos perfluorados y/o con polialquilenglicol (en especial polietilenglicol), o cianoacrilatos de polialquilo, que pueden ser eventualmente fluorados, así como mezclas de estos polímeros. Por derivación de los polímeros previamente mencionados, se puede lograr en especial una tendencia reducida a la agregación, así como, en caso de aplicación, una fagocitosis mejorada.

De acuerdo con una realización especial, el material de cápsula permeable al oxígeno, en especial la cubierta de las cápsulas de núcleo/cubierta o el material de matriz de las cápsulas de matriz puede comprender o estar compuesto en especial por polímero orgánico permeable al oxígeno. En especial, el polímero orgánico se puede obtener o preparar por medio de procedimientos apropiados de polimerización, en especial polimerización de emulsión, polimerización interfacial o precipitación interfacial, con preferencia, polimerización interfacial o precipitación interfacial (por ejemplo, preparación por medio de precipitación interfacial de polímeros apropiados como, por ejemplo, en la preparación de los poli(láctidos-co-glicólidos) antes mencionados, pero también, por ejemplo, preparación por medio de polimerización interfacial, por ejemplo, en la preparación de los cianoacrilatos de polialquilo previamente mencionados). Según la invención, el polímero orgánico o bien la cubierta de la cápsula o la matriz de la cápsula formada a partir de él está libre de puentes de sulfuro, en especial se conforma libre de puentes de di- o polisulfuro, ya que podrían perjudicar la absorción de oxígeno y el transporte de oxígeno. Además, se prevé según la invención que el polímero orgánico, en especial la cubierta de las cápsulas de núcleo/cubierta o el material de matriz de las cápsulas de matriz presente una estructura coherente (es decir, relacionada) (por ejemplo, a diferencia de las cápsulas, cuya cubierta de cápsula está formada por aductos puros); de esta manera, se garantiza una capacidad confiable de almacenamiento y transporte de oxígeno.

Según una realización especial, el material de cápsula permeable al oxígeno, en especial la cubierta de las cápsulas de núcleo/cubierta o el material de matriz de las cápsulas de matriz, con preferencia, el polímero orgánico

especialmente permeable a oxígeno de la cubierta de cápsula o matriz, puede presentar una modificación, en especial una modificación de la superficie y/o grupos funcionales. La modificación, en especial una modificación de la superficie, y/o los grupos funcionales se pueden seleccionar en este caso, en especial, de: (i) grupos funcionales que impiden la agregación, (ii) la interacción con grupos funcionales que controlan las moléculas biológicas, (iii) grupos funcionales ácidos, (iv) grupos hidroxilo, (v) bajo valor fisiológico de pH, con preferencia, grupos aniónicos, en especial grupos de ácido carboxílico, sulfato, sulfonato, fosfato y fosfonato, (vi) grupos polialquilenpoliol, en especial grupos polietilenglicol, (vii) emulsificantes, (viii) dispersantes, así como sus combinaciones y/o mezclas entre sí. De esta manera, las propiedades de agregación de las cápsulas se controlan de modo dirigido y pueden lograr una dispersabilidad mejorada. También se puede lograr una mejora respecto de la fagocitosis, así como las propiedades de unión y de transferencia de oxígeno.

De un modo preferido según la invención, el material de cápsula permeable al oxígeno, en especial la cubierta de las cápsulas de núcleo/cubierta o bien el material de matriz de las cápsulas de matriz se conforma, además, de forma permeable al CO₂.

En cuanto al tamaño de las cápsulas, presentan un diámetro de a lo sumo 1.000 nm; de esta manera, se garantiza que las cápsulas atraviesen sin más los vasos sanguíneos, tejidos, órganos, etc. afectados. Por otra parte, las cápsulas presentan un diámetro mínimo de al menos 50 nm, en especial para disponer suficientes cantidades de capacidad de almacenamiento de oxígeno.

Según la invención, las cápsulas presentan un diámetro en el intervalo de 50 a 1.000 nm, con mayor preferencia aún, 50 a 975 nm.

De una manera de especial preferencia según la invención, las cápsulas están en forma de nanocápsulas, con preferencia, con estructura de núcleo/cubierta. Las nanocápsulas preferidas con estructura de núcleo/cubierta presentan un diámetro en el intervalo de 50 a 1.000 nm, con mayor preferencia aún, de 50 a 975 nm.

Ventajosamente, las cápsulas usadas según la invención están presentes en una distribución del tamaño de partícula multimodal. En especial, se tienen en cuenta en este caso diámetros medios D50 de las cápsulas en el intervalo de 50 a 1.000 nm, con mayor preferencia aún, de 50 a 950 nm.

De hecho, se entiende que, en el caso de todos los valores e indicaciones de intervalos mencionados tanto antes como después, el experto puede discrepar según la aplicación o condicionado por el caso individual de los valores e intervalos mencionados, sin apartarse del marco de la presente invención.

En lo que se refiere a la relación en peso de material de cápsula permeable al oxígeno a hidrocarburos fluorados en las cápsulas, debería ser de a lo sumo 75 : 25, con preferencia, de a lo sumo 50 : 50. Según la invención, la relación en peso de material de cápsula permeable al oxígeno a hidrocarburos fluorados en las cápsulas varía en el intervalo de 75 : 25 a 10 : 90, con preferencia, de 70 : 30 a 15 : 85. Cuanto mayor sea la proporción de hidrocarburos fluorados, mayor será la capacidad de almacenamiento de oxígeno, en donde, sin embargo, en proporciones demasiado pequeñas de material de cápsula, ya no se garantiza la estabilidad de las cápsulas usadas según la invención, lo cual explica los intervalos de valores previamente mencionados.

En general, las cápsulas usadas según la invención poseen una densidad de 1,5 a 2,5 g/ml, en especial de 1,8 a 2 g/ml, con preferencia, de 1,85 a 1,9 g/ml.

A pesar de que el desarrollo de las cápsulas, en especial nanocápsulas, se ha utilizado en general desde hace bastante tiempo para uso médico y se utilizan nanocápsulas en terapia y diagnóstico ya como vehículos para distintos medicamentos o bien diagnósticos o bien por lo menos se han propuesto para ello, hasta ahora no se han tenido en cuenta las nanocápsulas, en especial como vehículos para hidrocarburos fluorados como perfluorocarbonos, para la implementación como portadores de oxígeno artificiales, en especial para el uso como sustituto de la sangre ("sucedáneo de la sangre" o bien "sustituto de la sangre"). Un concepto de este tipo recién se pudo realizar sorprendentemente en el marco de la presente invención.

Recién en el marco de la presente invención se halló sorprendentemente que es posible desarrollar cápsulas, en especial nanocápsulas, con hidrocarburos fluorados, en especial perfluorocarbonos, que se pueden usar como portadores de oxígeno artificiales. Una preparación de este tipo hasta ahora no se ha considerado, porque la cubierta de la cápsula puede influir negativamente sobre la propiedad de transporte de oxígeno de estas sustancias, de modo que sólo resulte una capacidad de almacenamiento, de transporte y de liberación de oxígeno insuficiente. También el uso de sistemas particulados (es decir, cápsulas) a diferencia de las emulsiones se oponía a una aplicación, en especial en lo que respecta a la biocompatibilidad o compatibilidad fisiológica necesarias.

Pero ahora en el marco de la presente invención se halló inesperado que las nanocápsulas de perfluorocarbono según la invención poseen similares propiedades de transporte de O₂ como emulsiones puras de perfluorocarbono, pero -en especial con elección apropiada del material de cápsula- son absorbidas a una velocidad netamente menor por las células del sistema reticuloendotelial. De esta manera, en forma sorprendente, se pueden evitar decisivamente o bien se pueden reducir significativamente los problemas limitantes en el estado de la técnica del uso clínico de los perfluorocarbonos, en especial los breves tiempos de residencia en el sistema vascular, así como un trastorno del

sistema inmune.

5 En lo que se refiere a los hidrocarburos fluorados usados según la invención, en especial los hidrocarburos perfluorados, con preferencia, perfluorocarbonos, están en condiciones para el almacenamiento y/o la absorción reversible de oxígeno, en especial en condiciones fisiológicas, o bien poseen una capacidad de almacenamiento de oxígeno reversible, en especial en condiciones fisiológicas. A consecuencia de la reversibilidad de la capacidad de almacenamiento del oxígeno, los hidrocarburos fluorados están en condiciones de volver a suministrar o liberar el oxígeno en caso de necesidad, en especial en condiciones fisiológicas, directamente en el lugar de la necesidad, por ejemplo, en tejidos u órganos de estado isquémicos.

10 Usualmente, los hidrocarburos fluorados usados según la invención, en especial los hidrocarburos perfluorados, con preferencia, perfluorocarbonos, son líquidos, en especial en condiciones fisiológicas.

15 Los hidrocarburos fluorados usados según la invención, en especial los hidrocarburos perfluorados, con preferencia, perfluorocarbonos, poseen pesos moleculares en el intervalo de 250 a 2.000 g/mol, en especial de 300 a 1.000 g/mol, con preferencia, de 400 a 600 g/mol. En este caso, los hidrocarburos fluorados usados se conforman, con preferencia, en forma líquida, respecto de las condiciones normales, en especial temperaturas ambiente (por ejemplo, 20°C) y presión atmosférica.

En general, como hidrocarburos fluorados se usan hidrocarburos perfluorados, en especial perfluorocarbonos; en este caso, se trata de compuestos carbonados totalmente sustituidos con átomos de flúor. Sin embargo, también es posible según la invención usar hidrocarburos fluorados que contienen al menos un halógeno distinto del flúor, con preferencia, bromo como, por ejemplo, bromoperfluorooctano.

20 En general, los hidrocarburos fluorados usados según la invención se seleccionan del grupo de perfluorooctano, perfluorodecano, perfluorodecalina y bromoperfluorooctano así como sus mezclas, en especial perfluorooctano, perfluorodecano y perfluorodecalina, así como sus mezclas, con preferencia, perfluorooctano y/o perfluorodecano.

25 La cantidad relacionada con el volumen de cápsulas en las dispersiones según la invención puede variar en amplios intervalos. Las dispersiones según la invención contienen las cápsulas en cantidades relacionadas con el volumen del 1 al 70% en volumen, en especial del 5 al 65% en volumen, con preferencia, del 10 al 60% en volumen, con preferencia especial, del 20 al 50% en volumen, respecto de las dispersiones.

30 La cantidad relacionada con la masa de las cápsulas en las dispersiones según la invención puede variar de igual modo en amplios intervalos. En general, las dispersiones según la invención contienen las cápsulas en cantidades relacionadas con la masa del 5 al 80% en peso, en especial del 10 al 75% en peso, con preferencia, del 15 al 65% en peso, respecto de las dispersiones.

A fin de permitir un uso sin complicaciones en el tratamiento del cuerpo humano o animal, se regulan las dispersiones según la invención en un valor fisiológico de pH y/o una potencia iónica fisiológica y/o una osmolaridad fisiológica y/o una composición iónica fisiológica.

35 En general, el valor de pH de las dispersiones según la invención está en el intervalo de 6,5 a 7,9, en especial de 7 a 7,5, con preferencia, de 7 a 7,45, con preferencia especial, de 7,37 a 7,45, y equivale así esencialmente al valor de pH de la sangre natural o plasma sanguíneo.

Para regular o mantener el valor del pH, se puede prever la adición de un tampón o un sistema tamponante, en especial un tampón fisiológico o bien un sistema tamponante fisiológico, con preferencia, una base de fosfato.

40 Para un uso libre de complicaciones, las dispersiones según la invención deben presentar esencialmente una consistencia y viscosidad comparables a las de la sangre natural o el suero sanguíneo. Las dispersiones según la invención presentan una viscosidad específica η en el intervalo de 0,1 a 1,8 s, en especial de 0,2 a 1,5 s, con preferencia, de 0,25 a 1,25 s, en donde los valores de la viscosidad previamente mencionados se refieren en especial a temperaturas en el intervalo de 10°C a 40°C.

45 Las dispersiones según la invención se conforman como dispersión de base acuosa, es decir, las dispersiones según la invención contienen como fase continua (es decir, como agente dispersante o dispersante) agua, en especial en forma de una solución de cloruro de sodio preferentemente fisiológica y/o isotónica, con preferencia, con una concentración de cloruro de sodio del 0,9% en peso, respecto de la fase continua.

50 En cuanto a la osmolaridad de la dispersión según la invención, puede variar igualmente en amplios intervalos. En general, las dispersiones según la invención presentan osmolaridades en el intervalo de 250 a 350 mosmol/l, en especial de 280 a 310 mosmol/l.

Además, se puede prever que las dispersiones según la invención contienen, además excipientes y/o aditivos usuales, que se pueden seleccionar en especial del grupo de dispersantes, emulsificantes, extensores, aglutinantes, humectantes, estabilizantes, así como sus mezclas. Como emulsificantes se pueden usar, por ejemplo, lecitina y/o colesterol y/o derivados de ácidos biliares y/o sales de los compuestos previamente mencionados (por ejemplo,

colatos, como colato alcalino, con preferencia, colato de sodio). Sin embargo, la cantidad de tales excipientes y/o aditivos, en especial la cantidad de dispersantes y/o emulsificantes (por ejemplo, colato de sodio), en las dispersiones según la invención no superan ventajosamente una concentración de 50 $\mu\text{mol/l}$, en especial 40 $\mu\text{mol/l}$, con preferencia, 35 $\mu\text{mol/l}$. Contrariamente, una mayor concentración (por ejemplo, mayor concentración de emulsificante) pueden tener una influencia citotóxica y, por ello, debería evitarse.

La presente invención proporciona así portadores de oxígeno artificiales a base de hidrocarburos fluorados, en especial a base de perfluorocarbonos, en forma de dispersiones de las cápsulas previamente definidas de material de cápsula permeable al oxígeno e hidrocarburos fluorados aquí contenidos o encerrados por él como portadores de oxígeno propiamente dichos (es decir, almacenadores de oxígeno reversible en condiciones fisiológicas), que evitan parcialmente o debilitan las desventajas previamente expuestas del estado de la técnica.

En especial, los portadores de oxígeno artificiales o bien las dispersiones que los contienen son apropiados o están en condiciones, por ejemplo, de como sustituto de la sangre ("sucedáneo de la sangre" o "sustituto de la sangre"), en especial en estado con o después de la pérdida de sangre del cuerpo humano o animal (por ejemplo, después de intervenciones quirúrgicas, accidentes, lesiones etc.), o para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de estados isquémicos o de estados después de reperfusión (llamado síndrome del torniquete o síndrome de reperfusión).

En el marco de la presente invención, se pueden preparar nanocápsulas perfluorocarbonadas con distintos materiales de cápsula y propiedades superficiales y con distintos perfluorocarbonos.

La preparación de las cápsulas por usar según la invención, en especial (nano)cápsulas perfluorocarbonadas, se puede realizar en una forma en sí conocida por el experto en la técnica. Esto se puede formar, por ejemplo, por polimerización in situ de monómeros de partida apropiados, que luego forman el material de cápsula o las paredes de la cápsula, en presencia de los perfluorocarbonos por encapsular (por ejemplo, por medio de procedimientos de polimerización apropiados, en especial polimerización de emulsión, polimerización interfacial, etc.).

Las (nano)cápsulas perfluorocarbonadas y las dispersiones o medicamentos que las contienen se caracterizan en especial con métodos microscópicos y espectroscópicos y, además, se confirman su biocompatibilidad, su absorción en las células y su capacidad para el transporte de oxígeno o bien para el suministro de oxígeno en sistemas biológicos simples usando la microscopia por exploración láser y la microscopia intravital, así como también en sistemas más complejos hasta ensayos con animales.

En el marco de la presente invención, se usan, con preferencia, cápsulas, en especial nanocápsulas, opcionalmente con poli(láctidos-co-glicólidos) modificados con compuestos perfluorados y/o con polietilenglicol o con cianoacrilatos de polialquilo opcionalmente fluorados, en especial perfluorados como material de cápsula, en especial cubierta, y perfluorooctano, perfluorodecalina o bien perfluorodecano como interior de la cápsula o como núcleo de cápsula, que se pueden emplear en el cuerpo humano o animal como portadores de oxígeno artificiales. Así se impone una base decisiva como alternativa para la transfusión de sangre.

La cubierta de la cápsula de las (nano)cápsulas perfluorocarbonadas usadas a base de poli(láctido-co-glicólidos) opcionalmente modificados con compuestos perfluorados o a base de cianoacrilato de polialquilo opcionalmente fluorado, etc. determina en especial las propiedades biológicas, mientras que el núcleo de la cápsula con o de perfluorocarbonos como, por ejemplo, perfluorodecano, perfluorodecalina, perfluorooctano etc., es el portador de oxígeno propiamente dicho.

Las (nano)cápsulas perfluorocarbonadas proporcionadas según la invención o las dispersiones o los productos farmacéuticos (medicamentos) que las contienen permiten múltiples posibilidades de aplicación. A modo de ejemplo, se pueden usar en todos los estadios del déficit de oxígeno en el organismo humano o animal. Los ejemplos de ellos son daños de las células, los tejidos y los órganos por isquemia y reperfusión; los daños típicos por isquemia y reperfusión son infarto cardíaco, apoplejía, estados de shock después de una fuerte, así como el daño de órganos de donantes durante el trasplante. Los mecanismos que se investigaron en este sentido son el trastorno de la homeostasis iónica celular en la fase isquémica (es decir, la fase del déficit de oxígeno debido a la interrupción de la circulación), así como la participación de especies de oxígeno y nitrógeno reactivas en el daño en la fase de la reperfusión (es decir, la recirculación y con ello, el reabastecimiento con oxígeno, un proceso que está ligado con un componente autónomo de daño). Las (nano)cápsulas perfluorocarbonadas o bien las dispersiones o bien los productos farmacéuticos que las contienen que las contienen permiten así, por ejemplo, el uso como solución de protección o bien dispersión de protección para proteger los órganos durante el trasplante (como, por ejemplo, corazón, hígado, riñón, pulmón, páncreas, intestino, etc.).

En el marco de la presente invención, se usan dispersiones de cápsula unitarias y estables al almacenamiento de (nano)partículas perfluorocarbonadas. De un modo en sí conocido, la preparación de las cápsulas por emplear según la invención se puede realizar, por ejemplo, por medio de la formación intermedia de una miniemulsión que lleva a dispersiones particularmente estables con estrechas distribuciones de tamaños. Las dependencias entre los parámetros de preparación y las propiedades más importantes de las dispersiones de cápsula se trabajaron en series de ensayos sistemáticos usando planificaciones estadísticas de ensayos. En relación con el desarrollo de procedimientos de preparación, se desarrollaron más allá de ello nuevos métodos de caracterización que se basan en

especial en el uso de espectroscopia de resonancia magnética nuclear.

La elección del material de cubierta de cápsula se puede realizar en especial según los siguientes criterios: factibilidad y simplicidad de la preparación, en especial respecto de grandes cantidades, estabilidad en caso de un almacenamiento prolongado, permeabilidad para O₂ y/o CO₂, ninguna toxicidad existente, degradabilidad biológica, vida útil en el sistema circulatorio, posibilidades de la ulterior modificación de la superficie, etc.

De acuerdo con una realización preferida según la invención, la cubierta de la cápsula de las nanocápsulas perfluorocarbonadas se puede formar en especial a partir de poli(láctido-co-glicólido) opcionalmente modificado con compuestos perfluorados o a partir de cianoacrilato de polialquilo opcionalmente fluorado. En el caso de usar poli(láctido-co-glicólido) opcionalmente modificado con compuestos perfluorados, puede variar la relación de láctido/glicólido (por ejemplo, en el intervalo de 25 : 75 a 75 : 25). Como perfluorocarbonos se pueden usar, de modo preferido según la invención, perfluorodecano, perfluorodecalina y perfluorooctano.

Las (nano)cápsulas perfluorocarbonadas de poli(láctido-co-glicólido) usadas preferentemente según la invención se pueden preparar, por ejemplo, de la siguiente manera: el poli(láctido-glicólido) representa un polímero que se forma aleatorizado secuencialmente a partir de unidades de lactilo (-CH(CH₃)-CO-O-) y unidades de glicolilo (-CH₂-CO-O-) en relaciones variables de cantidades (comp., por ejemplo, Wang, L., Venkatraman, S., Gan, L. H., y Kleiner, L. (2005), Structure formation in injectable poly(lactide-coglycolide) depots. II. Nature of the gel. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 72, 215-222). Los distintos polímeros de poli(láctido-co-glicólido) se distinguen, por un lado, en el contenido de unidades de lactilo (por ejemplo, 50% al 85%), por otro lado, en el contenido dado de lactilo por medio de una diferente viscosidad. Todos los polímeros de poli(láctido-co-glicólido) se degradan en mamíferos en última instancia en agua y CO₂. Con ello, representan productos inocuos desde el punto de vista fisiológico y se usan como tales desde hace casi cuarenta años en la farmacología. Debido a su porosidad, las paredes de estas cápsulas son bien permeables a O₂ y CO₂. La encapsulación se produce sin pérdida de la funcionalidad. La preparación de las cápsulas se puede producir, por ejemplo, análogamente al procedimiento de preparación tal como se describe, por ejemplo, por Pisani, E., Tsapis, N., Paris, J., Nicolas, V., Cattel, L., y Fattal, E. (2006) Polymeric nano/microcapsules of liquid Perfluorocarbons for ultrasonic imaging: physical characterization. *Langmuir* 22, 4397-4402. El procedimiento allí descrito se puede usar correspondientemente para la encapsulación de perfluorocarbonos, en especial para preparar nanocápsulas como portadores de oxígeno, por ejemplo, con los núcleos de perfluorooctano, perfluorodecalina o perfluorodecano. El poli(láctido-co-glicólido) se puede modificar opcionalmente con compuestos perfluorados o bien se puede derivatizar.

Asimismo también se prefieren según la invención las (nano)cápsulas perfluorocarbonadas de cianoacrilato de polialquilo opcionalmente fluorado. El cianoacrilato de alquilo ofrece la ventaja como monómero reactivo de que se polimeriza en condiciones muy protectoras en la interfaz de una emulsión de aceite en agua, pudiendo formar así cápsulas (comp. por ejemplo, Couvreur, P., Kante, B., Roland, M., Guiot, P., Bauduin, P., y Speiser, P. (1979) Polycyanacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties. *J Pharm Pharmacol* 31, 331-332 así como Florence, A. T., Whateley, T. L., y Wood, D. A. (1979) Potentially biodegradable microcapsules with poly(alkyl 2-cyanoacrylate)membranes. *J Pharm Pharmacol* 31, 422-42). La polimerización aniónica se puede iniciar en este caso por medio de una modificación dirigida del valor del pH de la fase acuosa y puede llevar a una cubierta polimérica físicamente reticulada, pero relativamente porosa y permeable al gas. La preparación de (nano)cápsulas de cianoacrilato de polialquilo se describe en el ínterin en varias variantes y también se puede llevar a cabo en gran escala (comp. por ejemplo, Wohlgenuth, M., Machtle, W., y Mayer, C. (2000) Improved preparation and physical studies of polybutylcyanoacrylate nanocapsules. *J Microencapsul* 17, 437-448; Mayer, C. (2005) Nanocapsules as drug delivery systems. *Int J Artif Organs* 28, 1163-1171; Altinbas, N., Fehmer, C., Terheiden, A., Shukla, A., Rehage, H., y Mayer, C. (2006) Alkylcyanoacrylate nanocapsules prepared from miniemulsions: a comparison with the conventional approach. *J Microencapsul* 23, 567-581; Al Khouri Fallouh, N., Roblet-Treupel, L., Fessi, H., Devissaguet, J. P., y Puisieux, F. (1986) Development of a new process for the manufacture of polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules. *Int J Pharm* 28, 125-132; Lescure, F., Zimmer, C., Roy, D., y Couvreur, P. (1992) Optimization of polyalkylcyanoacrylate nanoparticle preparation influence of sulfur-dioxide and pH on nanoparticle characteristics. *J Colloid Interface Sci* 154, 77-86). En el caso de la preparación de nanocápsulas de cianoacrilato de polialquilo fluoradas se puede proceder en especial haciendo reaccionar cianoacrilato de alquilo (por ejemplo, cianoacrilato de etilo) en principio por transesterificación en cianoacrilato de alquilo fluorado, que luego se hace reaccionar, por ejemplo, por polimerización interfacial a gotitas dispersadas de perfluorocarbono (por ejemplo, perfluorodecalina) en cápsulas de cubierta de cápsula de cianoacrilato fluorado con cápsulas perfluorocarbonadas allí contenidas.

Las cápsulas usadas según la invención son mecánicamente y térmicamente estables y se pueden almacenar casi ilimitadamente tanto como dispersión como también en estado liofilizado. Menores moléculas como etanol o benceno están sujetas a un rápido intercambio a través de la cubierta de la cápsula, el tiempo de vida media en estado encapsulado es, en este caso, de sólo algunos milisegundos. Los diámetros de las cápsulas están en el intervalo de nanómetros a micrómetros (por ejemplo, entre 100 y 500 nm) y son controlables a través de las condiciones marco de la preparación. El polímero es biodegradable, los productos de degradación generados no tienen toxicidad o en todo caso, tienen una toxicidad extremadamente baja. Las nanocápsulas de cianoacrilato de polialquilo son así sistemas de soporte múltiples y adaptables para la presente invención. Las dispersiones de nanocápsulas de cianoacrilato de polialquilo se pueden estabilizar por medio de copolímeros de bloque anfífilos. A fin de lograr tiempos de ciclos

mayores en el organismo vivo, también se puede producir una estabilización con quitosano, que lleva a cápsulas con carga positiva. La ventaja especial de las nanocápsulas de cianoacrilato de polialquilo respecto de otros sistemas biodegradables radica sobre todo en la vida útil relativamente larga de las cápsulas en condiciones fisiológicas.

5 Otro objeto de la presente invención –según un segundo aspecto de la presente invención- es el uso de las dispersiones previamente descritas según la presente invención para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de estados deficientes de oxígeno del cuerpo humano o animal o bien para la preparación de un medicamento para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de estados deficientes de oxígeno del cuerpo humano o animal.

10 La expresión de estado de déficit de oxígeno del cuerpo humano o animal, como se usa en el marco de la presente invención, designa en especial estados isquémicos e hipóxicos del cuerpo humano o animal o bien de determinados tejidos u órganos, en donde en el marco de la presente invención, la expresión de isquemia designa en especial una menor irrigación o una falta de irrigación de un tejido o de un órgano (por ejemplo, estado después de la pérdida de sangre, sangrado, etc.) y acompañada con un déficit de oxígeno en el área afectada (con lo cual, a su vez, se impide el metabolismo celular o incluso, por ende, se paraliza), mientras que la expresión de hipoxia en el marco de la presente invención en especial se usa en especial para designar el déficit de oxígeno en el tejido (por ejemplo, estado después de una intoxicación gaseosa como, por ejemplo, intoxicación por monóxido de carbono, etc.) (en donde la ausencia total de oxígeno también se designa como anoxia).

Otro objeto de la presente invención es el uso de las dispersiones según la invención descritas previamente como sustitutos de la sangre, en especial con fines de transfusión.

20 A modo de ejemplo, las dispersiones según la invención se pueden usar para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de estados del cuerpo humano o animal con o después de la pérdida de sangre, en especial intervenciones quirúrgicas, accidentes, lesiones o similares.

25 Además, las dispersiones según la invención se pueden usar del mismo modo para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de estados isquémicos o de estados después de reperfusión, en especial del síndrome del torniquete (síndrome de reperfusión), o bien para la preparación de un medicamento para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de estados isquémicos o de estados después de reperfusión, en especial del síndrome del torniquete (síndrome de reperfusión).

30 Además, las dispersiones según la invención también se pueden usar para la protección de órganos en el marco de los trasplantes. De este modo, por ejemplo, se pueden proteger eficazmente los órganos extraídos o bien por trasplantar hasta el momento del implante en el receptor del órgano (por ejemplo, por perfusión con la dispersión según la invención).

35 Además, las dispersiones según la invención también se pueden usar para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de formación de burbujas de gas en la sangre o de embolias gaseosas del cuerpo humano o animal o bien para la preparación de un medicamento para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de formaciones de burbujas de gas en la sangre o de embolias gaseosas del cuerpo humano o animal (por ejemplo, para el tratamiento de embolias gaseosas, tal como pueden aparecer después de procesos de inmersión impropios en el sector de buceo). Aquí llegan a buen término en especial las buenas propiedades de desprendimiento de gas (por ejemplo, para oxígeno, dióxido de carbono, nitrógeno, etc.) de las dispersiones según la invención o bien de las cápsulas allí contenidas.

40 Además, las dispersiones según la invención también se pueden usar para la aplicación en máquinas de corazón/pulmón, en especial para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de embolias gaseosas del cuerpo humano o animal o bien para la preparación de un medicamento para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de embolias gaseosas del cuerpo humano o animal. De esta manera, se pueden impedir eficazmente, por ejemplo, daños cerebrales a consecuencia de estados deficientes de oxígeno.

45 Del mismo modo, las dispersiones según la invención se pueden usar para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de intoxicaciones gaseosas o intoxicaciones por humo del cuerpo humano o animal o bien para la preparación de un medicamento para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de intoxicaciones gaseosas o intoxicaciones por humo del cuerpo humano o animal (por ejemplo, en caso de intoxicaciones por humo debido a un incendio o también en caso de intoxicaciones gaseosas como, por ejemplo, intoxicaciones gaseosas con monóxido de carbono, cianuro de hidrógeno, etc.).

50 En el caso de los usos según la invención previamente mencionados y descritos a continuación, las dispersiones según la invención se pueden aplicar en especial en cantidades de 5 a 15.000 ml, en especial de 5 a 10.000 ml, con preferencia, de 10 a 3.000 ml, por dosis individual, con preferencia, por medio de transfusión.

55 En otras palabras, la presente invención describe el uso de hidrocarburos fluorados, en especial hidrocarburos perfluorados, con preferencia, perfluorocarbonos, como portadores de oxígeno artificiales para el tratamiento preventivo y/o terapéutico del cuerpo humano o animal o bien para la preparación de un medicamento para el tratamiento preventivo y/o terapéutico del cuerpo humano o animal, en especial como sustituto de la sangre, con preferencia, con fines de transfusión, en donde los hidrocarburos fluorados se aplican en forma de cápsulas con capacidad reversible de almacenamiento de oxígeno, en donde las cápsulas comprenden un material de cápsula

permeable al oxígeno, que contiene o incluye los hidrocarburos fluorados. En especial, las cápsulas se aplican o se usan en forma de una dispersión, como se describió previamente. En especial, se pueden usar las cápsulas previamente descritas para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de estados deficientes de oxígeno del cuerpo humano o animal o bien para la preparación de un medicamento para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de estados deficientes de oxígeno del cuerpo humano o animal. En especial, con los sistemas de cápsulas previamente descritos, se pueden tratar estados del cuerpo humano o animal con y/o después de la pérdida de sangre, en especial intervenciones quirúrgicas, accidentes, lesiones o similares, de modo preventivo y/o terapéutico. Del mismo modo, se tiene en cuenta un uso de las cápsulas previamente descritas para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de estados isquémicos o de estados después de reperfusión, en especial del síndrome del torniquete (síndrome de reperfusión).

Asimismo se tiene en cuenta el uso para la protección de órganos en el marco del trasplante, como se describió previamente. También se tiene en cuenta un uso de las cápsulas previamente descritas para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de formación de burbujas de gas en la sangre o de embolias gaseosas del cuerpo humano o animal o bien para la preparación de un medicamento para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de formaciones de burbujas de gas en la sangre o de embolias gaseosas del cuerpo humano o animal. También está comprendido un uso de las cápsulas previamente descrito para usar en máquinas de corazón/pulmón, en especial para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de embolias gaseosas del cuerpo humano o animal o bien para la preparación de un medicamento para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de embolias gaseosas del cuerpo humano o animal. Finalmente, se tiene en cuenta un uso de las cápsulas previamente descrito para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de intoxicaciones gaseosas o intoxicaciones por humo del cuerpo humano o animal o bien para la preparación de un medicamento para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de intoxicaciones gaseosas o intoxicaciones por humo del cuerpo humano o animal.

Del mismo modo, la presente invención describe el uso de cápsulas, en especial de nanocápsulas, con un material de cápsula permeable al oxígeno e hidrocarburos fluorados allí contenidos y/o encerrados, en especial hidrocarburos perfluorados, con preferencia, perfluorocarbonos, como portadores de oxígeno artificiales, en especial como sustituto de la sangre, en especial para los fines de uso y terapias previamente mencionados (por ejemplo, para la protección de órganos durante el trasplante o bien para la protección de órganos por trasplantar, en especial en el período entre la extracción del órgano y el implante etc.).

Para mayores detalles respecto del segundo aspecto de la presente invención, se puede remitir para evitar repeticiones innecesarias a las realizaciones anteriores respecto del primer aspecto de la invención, que son válidos respecto de los demás aspectos de la invención.

Las conformaciones, conversiones y variaciones de la presente invención son reconocibles y realizables sin más por el experto en la técnica con la lectura de la descripción, sin que se aparte en ello del marco de la presente invención.

Los siguientes ejemplos de realización sirven únicamente para visualizar la presente invención, sin embargo, sin limitar la presente invención a ellos.

35 Ejemplos de realización:

Preparación de (nano)cápsulas perfluorocarbonadas aplicables según la invención

Dispositivo para la síntesis de cápsulas de poli(D,L-láctido-co-glicólido) con un diámetro de $(2,5 \pm 1,5) \mu\text{m}$ y otros sistemas de cápsulas según la invención

El poli(D,L-láctido-co-glicólido) (100 mg) con una densidad interna de aproximadamente 0,45 a 0,6 g/cm³ y fluorodecalina (100 μl) se disuelve a temperatura ambiente en diclorometano (6 ml). Se disuelve colato de sodio (1,5%) en agua destilada, y esta solución se enfría luego hasta 4°C. La solución de diclorometano (6 ml) se mezcla luego con la solución acuosa fría de colato de sodio (20 ml) bajo agitación vigorosa en un baño de hielo. Para agitar, se usa un Ultraturrax con un adaptador de distribución (Ultraturrax T25/SN-25-10G de la empresa IKA, velocidad de agitación 13.500 rev/min, duración de agitación de 2 minutos). Para la visualización y caracterización, también se pueden preparar cápsulas, cuyo material de cápsula está enriquecido con el colorante de fluorescencia. Estas cápsulas se preparan de modo análogo al pipetear 150 μl de una solución concentrada de rojo Nilo (0,057 mg/ml en diclorometano) en una solución de diclorometano (6 ml), que contiene el poli(D,L-láctido-co-glicólido) y la fluorodecalina. En cada caso, después de la agitación, se separa la fase de diclorometano, lavando la mezcla de reacción bifásica (aproximadamente 26 ml) con un pequeño flujo de gas de oxígeno (0,1 a 100 ml/min) hasta que se haya sacado toda la fase orgánica. Las cápsulas se sedimentan lentamente ($t_{1/2}$ durante aproximadamente 6 horas) en la solución altamente concentrada de colato y así se pueden separar o bien absorber en solución al 0,9% de NaCl o bien transformar en dispersiones según la invención para el uso reglamentario ("sucedáneo de la sangre" o bien "sustituto de la sangre") (cantidades de aplicación: 5 a 15.000 ml, en especial 5 a 10.000 ml, con preferencia, 10 a 3.000 ml).

En otras síntesis, se preparan (nano)cápsulas perfluorocarbonadas útiles según la invención con relaciones variables en el poli(D,L-láctido-co-glicólido) en el intervalo de 25 : 75 a 75 : 25 y con densidades internas variables de las cápsulas de 0,16 a 1,3 dl/g.

De modo correspondiente, se preparan además (nano)cápsulas perfluorocarbonadas útiles según la invención con una cubierta de cápsula derivada con compuestos perfluorados a base de poli(D,L-láctido-co-glicólido), así como

(nano)cápsulas perfluorocarbonadas con una cubierta de cápsula derivada con polietilenglicol a base de poli(D,L-láctido-co-glicólido).

En la síntesis de cápsulas de poli(D,L-láctido-co-glicólido) modificadas, por ejemplo, con un diámetro de $(2,5 \pm 1,5) \mu\text{m}$ se puede proceder, por ejemplo, de la siguiente manera: poli(D,L-láctido-co-glicólido) (50 : 50, 92 mg) con grupos carboxilo terminales y la densidad interna de 0,45 a 0,6 dl/g se disuelve a temperatura ambiente en diclorometano (3 ml). Un segundo poli(D,L-láctido-co-glicólido) (50 : 50, 8 mg), que forma con polietilenglicol de 5.000 Dalton un copolímero 85 : 15, se disuelve asimismo a temperatura ambiente en diclorometano (3 ml). Después del proceso de solución de los polímeros, se unen las dos soluciones. Luego se disuelve la fluorodecalina (100 μl) a temperatura ambiente en esta solución de diclorometano (6 ml). El colato de sodio (al 1,5%) se disuelve en agua destilada, y esta solución se enfría luego hasta 4°C. La solución de diclorometano (6 ml) se mezcla luego con la solución acuosa fría de colato de sodio (20 ml) bajo agitación vigorosa en un baño de hielo. Para agitar, se usa un Ultraturax con un adaptador de distribución (por ejemplo, Ultraturax T25/S-25KV-25G-IL de la empresa IKA, velocidad de agitación 6000 rev/min, duración de agitación de 2 minutos). Para la visualización y caracterización, se pueden preparar también cápsulas cuyo material de cápsula se enriquece con colorante fluorescente de rojo Nilo. Estas cápsulas se preparan de modo análogo al pipetear 150 μl de una solución concentrada de rojo Nilo (0,057 mg/ml en diclorometano) a la solución de diclorometano que contiene poli(D,L-láctido-co-glicólido)/fluorodecalina (6 ml). En cada caso, se separa la fase de diclorometano después de la agitación, lavando la mezcla de reacción bifásica (aproximadamente 26 ml) con un pequeño flujo de gas oxígeno (0,1 a 1 ml/min) hasta que se haya sacado toda la fase orgánica. Las cápsulas se sedimentan lentamente ($t_{1/2}$ durante aproximadamente 6 horas) en la solución altamente concentrada de colato y se pueden separar así o bien absorber en solución al 0,9% de NaCl. Mediante la derivatización de los polímeros, se puede lograr una mejora respecto de la evitación de la agregación y la fagocitosis.

Además, las nanocápsulas perfluorocarbonadas útiles según la invención se preparan con una cubierta de cápsula a base de cianoacrilato de alquilo o a base de cianoacrilato de perfluoroalquilo.

Caracterización fisicoquímica de las (nano)cápsulas perfluorocarbonadas útiles según la invención o bien las dispersiones contenidas en ellas

Las nanocápsulas perfluorocarbonadas útiles según la invención se caracterizan en su tamaño, su estructura homogénea, su constitución y su composición mediante los siguientes procedimientos (métodos):

Microscopia confocal por exploración láser (LSM)

La microscopia confocal por exploración láser (LSM) se usa para la determinación del tamaño y la detección de la estructura homogénea de las nanocápsulas perfluorocarbonadas útiles según la invención. Para ello se colorean las nanocápsulas con el colorante fluorescente rojo Nilo (9-dietilamino-5H-benzo[α]fenoxazin-5-ona), que se acumula en la pared de la cápsula debido a sus propiedades lipofílicas. Las mediciones de LSM se llevan a cabo usando láser de helio/neón y objetivos de alta resolución. Las alícuotas de las nanocápsulas perfluorocarbonadas diluidas coloreadas y diluidas con un tampón de composición fisiológica se aplican sobre la superficie de cubreobjetos tratados con poli-L-lisina en cámaras Pentz modificadas y se exhibe la fluorescencia en distintos planos de enfoque de la columna de líquidos. Debido a la densidad de capa óptica muy escasa del sistema confocal, también son posibles así limitadamente representaciones espaciales de las nanocápsulas perfluorocarbonadas. Su tamaño y homogeneidad se cuantifica sobre la base de las señales detectadas por medio del correspondiente software "Physiology Evaluation" del sistema LSM 510.

Observación bajo microscopio óptico de las cápsulas dispersa en el campo oscuro

La microscopia por exploración láser es apropiada sólo limitadamente para la determinación de tamaños de nanocápsulas con un diámetro inferior a 1 μm . Por ello, se usa como otro procedimiento la observación bajo microscopio óptico de las cápsulas dispersas en el campo oscuro. La observación bajo microscopio óptico de las cápsulas dispersas en el campo oscuro sirve para la determinación del movimiento de partículas de Brown. En este caso, se procesan los movimientos de las partículas individuales por evaluación automática de imágenes de un archivo de video en tiempo real y en un histograma del tamaño de las cápsulas.

Microscopia de sonda de barrido (AFM)

Con la microscopia de sonda de barrido, se usa un método que no sólo permite la representación de las cápsulas, sino también la determinación de las propiedades mecánicas. En un ensayo de impresión, se registra un diagrama de fuerza-recorrido, que proporciona datos importantes acerca de la resistencia mecánica, la deformabilidad reversible y la elasticidad de las cápsulas. Más allá de ello, el tipo de plegado de la cubierta de cápsula según el ensayo de impresión, permite sacar conclusiones acerca del espesor de la membrana y la estructura interna de las cápsulas.

Espectroscopia de RMN ^{13}C y ^{19}F

Las mediciones por resonancia nuclear en átomos de carbono bajo observación del isótopo ^{13}C sirven para la caracterización química de la pared de la cápsula y suministran informaciones acerca del estado del curso de la reacción de polimerización. Más allá de ello, las mediciones en los núcleos de flúor usando gradientes de campo

- 5 pulsado sirven para la observación de propiedades de autodifusión del hidrocarburo fluorado, de lo que se pueden sacar conclusiones otra vez del estado de las fases y la homogeneidad de fases del contenido de la cápsula. De esta manera, por ejemplo, se asegura que el contenido líquido se halle en una cavidad libre y no en un medio aproximadamente fungoide-poroso. Además, el registro de espectros lineales ¹⁹F permite la observación de la absorción de oxígeno: el oxígeno influye por medio de sus propiedades paramagnéticas la señal de resonancia de los núcleos de flúor, de modo que resultan típicas ampliaciones de línea y acortamientos de los tiempos de relajación, cuya expresión permite sacar conclusiones directas de la concentración de oxígeno en el interior de las cápsulas. De esta manera, se puede determinar tanto la cinética de la absorción de oxígeno como también la posición del equilibrio de distribución.
- 10 En la siguiente tabla, se reproducen los parámetros de las cápsulas preparadas y caracterizadas o bien de las dispersiones que las contienen:

Parámetros	Valores
Densidad de las cápsulas	1,80 - 1,95 g/ml
Concentración en cápsulas	5 - 60% en volumen
Tamaño de las cápsulas	50 - 5.000 nm
Viscosidad de la solución específica η	0,25 - 1,25 s
Valor de pH de las dispersiones	7,00 - 7,45
Potencia iónica de las dispersiones	280 - 310 mosmol/l
Materiales de la cápsula (material de la cubierta de la cápsula)	A: cianoacrilato de alquilo B: cianoacrilato de perfluoroalquilo C: poli(D,L-láctido-co-glicólido) D: poli(D,L-láctido-co-glicólido) derivatizado con compuestos perfluorados E: poli(D,L-láctido-co-glicólido) derivatizado con polietilenglicol
Perfluorocarbonos	perfluorodecalina perfluorooctano perfluorodecano
Cantidad utilizada	5 a 15.000 ml, en especial 5 a 10.000 ml, con preferencia, 10 a 3.000 ml

Ensayo de la biocompatibilidad de las nanocápsulas perfluorocarbonadas, su absorción en células y su capacidad para el transporte de oxígeno/para el suministro de oxígeno en sistemas biológicos simples

- 15 En macrófagos y células endoteliales cultivados, por ejemplo, células del sistema del retículo endotelial, se ensayan los posibles efectos citotóxicos de las nanocápsulas perfluorocarbonadas, su absorción en las células, así como la activación/inactivación de las células por contacto con las nanocápsulas perfluorocarbonadas con técnicas establecidas. Para la detección de la acción citotóxica de las nanocápsulas perfluorocarbonadas, así como de su absorción en las células, se usa, entre otras cosas, la microscopia de exploración láser. La posible acción citotóxica de las nanocápsulas perfluorocarbonadas y su absorción en las células también se estudia en hígado de rata perfundido
- 20 *in vivo*. Para la detección del registro de las nanocápsulas (marcadas con fluorescencia con rojo Nilo) en las células del órgano intacto, se usa la microscopia intravital. En hígados de rata perfundidos *in vivo* se ensaya también comparativamente la capacidad de las nanocápsulas perfluorocarbonadas para el transporte de oxígeno o bien para el suministro de oxígeno a tejidos. Debido a la baja solubilidad física de oxígeno en fases acuosas, la perfusión usual de tampón saturado con carbogeno (95% de O₂, 5% de CO₂) de Krebs-Henseleit requiere de altos volúmenes de perfusión (30 ml/min), a fin de garantizar un suficiente abastecimiento de oxígeno. En ensayos con nanocápsulas
- 25 perfluorocarbonadas, así como emulsiones perfluorocarbonadas o bien dispersiones perfluorocarbonadas, se confirma que (en comparación con el tampón de Krebs-Henseleit) se puede bajar significativamente la tasa de flujo antes de que se produzca un daño isquémico en los tejidos, o bien que se puede lograr una tasa de flujo fisiológica.

REIVINDICACIONES

1. Dispersión de portadores de oxígeno artificiales, en especial como sustituto de la sangre, con preferencia, con fines de transfusión, en donde la dispersión contiene cápsulas con capacidad reversible de almacenamiento de oxígeno, en donde las cápsulas comprenden un material de cápsula permeable al oxígeno, que contiene y/o incluye hidrocarburos fluorados, en especial perfluorocarbonos, con preferencia, perfluorocarbonos, en donde el material de cápsula permeable al oxígeno comprende o está compuesto por un polímero orgánico permeable al oxígeno, en donde el polímero se selecciona del grupo de poli(láctidos-co-glicólidos) y cianoacrilatos de polialquilo, así como sus mezclas, en donde el polímero orgánico está conformado libre de puentes de sulfuro y presenta una estructura coherente, en donde en las cápsulas la relación en peso de material de cápsula permeable al oxígeno a hidrocarburos fluorados está en el intervalo de 75 : 25 a 10 : 90, en donde los hidrocarburos fluorados presentan pesos moleculares en el intervalo de 250 a 2.000 g/mol y están conformados en forma líquida, en donde las cápsulas presentan un diámetro en el intervalo de 50 a 1.000 nm, en donde la dispersión contiene las cápsulas en cantidades relacionadas con el volumen del 1 al 70% en volumen, respecto de la dispersión, en donde la dispersión se ajusta a un valor fisiológico de pH y presenta una viscosidad específica η en el intervalo de 0,1 a 1,8 s, respecto de temperaturas en el intervalo de 10°C a 40°C, y en donde la dispersión es una dispersión de base acuosa y/o contiene agua como fase continua en forma de una solución de cloruro de sodio fisiológica y/o isotónica, en donde la dispersión es estable en almacenamiento.
2. Dispersión según la reivindicación 1, caracterizada por que las cápsulas se conforman como cápsulas de núcleo/cubierta, en especial en donde el material de cápsula permeable al oxígeno conforma la cubierta de la cápsula y/o en especial en donde los hidrocarburos fluorados están rodeados y/o encerrados por la cubierta de la cápsula permeable al oxígeno y/o los hidrocarburos fluorados forman el interior de las cápsulas de núcleo/cubierta; o por que las cápsulas están presentes como cápsulas de matriz, en especial en donde el material de cápsula permeable al oxígeno conforma una matriz y los hidrocarburos fluorados se almacenan en la matriz a base del material de cápsula permeable al oxígeno, con preferencia, en distribución homogénea y/o uniforme.
3. Dispersión según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que el material de cápsula permeable al oxígeno, en especial la cubierta de cápsula de las cápsulas de núcleo/cubierta o el material de matriz de las cápsulas de matriz, con preferencia, el polímero orgánico especialmente permeable a oxígeno de la cubierta de cápsula o matriz presenta una modificación, en especial una modificación de la superficie y/o grupos funcionales, en especial en donde la modificación, en especial la modificación de la superficie y/o los grupos funcionales se seleccionan de (i) grupos funcionales que impiden la agregación, (ii) la interacción con grupos funcionales que controlan las moléculas biológicas, (iii) grupos funcionales ácidos, (iv) grupos hidroxilo, (v) bajo valor fisiológico de pH, con preferencia, grupos aniónicos, en especial grupos ácido carboxílico, sulfato, sulfonato, fosfato y fosfonato, (vi) grupos polialquilenpoliol, en especial grupos polietilenglicol, (vii) emulsificantes, (viii) dispersantes, así como sus combinaciones y/o mezclas entre sí.
4. Dispersión según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que las cápsulas presentan un diámetro en el intervalo de 50 a 975 nm.
5. Dispersión según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que en las cápsulas, la relación en peso de material de cápsula permeable al oxígeno a hidrocarburos fluorados es de a lo sumo 50:50 y/o por que en las cápsulas, la relación en peso de material de cápsula permeable al oxígeno a hidrocarburos fluorados varía en el intervalo de 70 : 30 a 15 : 85; y/o por que las cápsulas presenta una densidad de 1,5 a 2,5 g/ml, en especial de 1,8 a 2 g/ml, con preferencia, de 1,85 a 1,9 g/ml.
6. Dispersión según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que los hidrocarburos fluorados están en condiciones de un almacenamiento reversible y/o captación de oxígeno, en especial en condiciones fisiológicas y/o por que los hidrocarburos fluorados poseen una capacidad de almacenamiento de oxígeno reversible, en especial en condiciones fisiológicas; y/o por que los hidrocarburos fluorados presentan pesos moleculares en el intervalo de 300 a 1.000 g/mol, con preferencia, de 400 a 600 g/mol; y/o por que los hidrocarburos fluorados contienen al menos un halógeno distinto del flúor, con preferencia, bromo y/o por que los hidrocarburos fluorados se seleccionan del grupo de perfluorooctano, perfluorodecano, perfluorodecalina y bromoperfluorooctano, así como sus mezclas, en especial perfluorooctano, perfluorodecano y perfluorodecalina, así como sus mezclas, con preferencia, perfluorooctano y/o perfluorodecano.
7. Dispersión según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que

- la dispersión contiene las cápsulas en cantidades relacionadas con el volumen del 5 al 65% en volumen, con preferencia, del 10 al 60% en volumen, con preferencia especial, del 20 al 50% en volumen, respecto de la dispersión; y/o
- 5 por que la dispersión contiene las cápsulas en cantidades referidas a masa del 5 al 80% en peso, en especial del 10 al 75% en peso, con preferencia, del 15 al 65% en peso, respecto de la dispersión; y/o
- por que la dispersión se regula a una potencia iónica fisiológica y/o a una osmolaridad fisiológica y/o una composición iónica fisiológica; y/o
- por que la dispersión se regula a un valor de pH en el intervalo de 6,5 a 7,9, en especial de 7 a 7,5, con preferencia, de 7 a 7,45, con preferencia especial, de 7,37 a 7,45
- 10 y/o por que la dispersión contiene un tampón, en especial un tampón fisiológico, con preferencia, a base de fosfato; y/o
- por que la dispersión presenta una viscosidad específica η en el intervalo de 0,2 a 1,5 s, con preferencia, de 0,25 a 1,25 s, en especial respecto de temperaturas en el intervalo de 10°C a 40°C.
8. Dispersión según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que
- la dispersión presenta una osmolaridad en el intervalo de 250 a 350 mosmol/l, en especial de 280 a 310 mosmol/l; y/o
- 15 por que la dispersión contiene además excipientes y/o aditivos usuales, en especial seleccionados del grupo de auxiliares dispersantes, emulsificantes, extensores, aglutinantes, humectantes, estabilizantes, así como sus mezclas, con preferencia, en concentraciones de $\leq 50 \mu\text{mol/l}$, en especial $\leq 40 \mu\text{mol/l}$, con preferencia, $\leq 35 \mu\text{mol/l}$.
9. Uso de una dispersión según una de las reivindicaciones precedentes para preparar un medicamento para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de estados deficientes de oxígeno del cuerpo humano o animal.
- 20 10. Uso de una dispersión según las reivindicaciones precedentes, en especial uso según la reivindicación 9, como sustituto de la sangre, en especial con fines de transfusión.
11. Uso de una dispersión según las reivindicaciones precedentes, en especial uso según la reivindicación 9 ó 10, para preparar un medicamento para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de estados del cuerpo humano o animal en caso de y/o después de pérdida de sangre, en especial intervenciones quirúrgicas, accidentes, lesiones o similares,
- 25 pero también para la preparación de un medicamento para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de estados isquémicos o de estados después de reperfusión, en especial del síndrome del torniquete (síndrome de reperfusión), o para la protección de órganos durante el trasplante o bien para la protección de órganos por trasplantar, en especial en el período entre la extracción del órgano y el implante, en especial bajo perfusión.
12. Uso de una dispersión según las reivindicaciones precedentes, en especial uso según la reivindicación 9 ó 10, para la preparación de un medicamento para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de formaciones de burbujas de gas en la sangre o de embolias gaseosas del cuerpo humano o animal.
- 30 13. Uso de una dispersión según las reivindicaciones precedentes, en especial uso según la reivindicación 9 ó 10, para aplicar en máquinas de corazón/pulmón, en especial para la preparación de un medicamento para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de embolias gaseosas del cuerpo humano o animal, pero también para la preparación de un medicamento para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de intoxicaciones gaseosas o intoxicaciones por humo del cuerpo humano o animal.
- 35 14. Uso según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la dispersión se aplica en cantidades de 5 a 15.000 ml, en especial de 5 a 10.000 ml, con preferencia, de 10 a 3.000 ml, por dosis individual.