

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
—
PARIS
—

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 551 660

②1 N° d'enregistrement national : **83 14545**

⑤1 Int Cl⁴ : A 61 K 37/14; C 08 H 1/00.

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 13 septembre 1983.

③0 Priorité :

⑦1 Demandeur(s) : *CENTRE NATIONAL DE LA RE-
CHERCHE SCIENTIFIQUE. — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : Edith Dellacherie, Michèle Leonard, Pierre
Labrude, Jean Maurice Léon Neel et Claude Vigneron.

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 11 du 15 mars 1985.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Cabinet Plasseraud.

⑤4 Hémoglobine modifiée chimiquement, sa préparation, solutions aqueuses en contenant et leur utilisation.

⑤7 L'hémoglobine modifiée selon l'invention est caractérisée en ce que chaque molécule modifiée d'hémoglobine porte à sa périphérie, liés chimiquement, des greffons macromoléculaires hydrophiles, hémocompatibles, peu ou pas biodégradables en milieu plasmatique, non antigéniques et non toxiques, de formule : A-L dans laquelle : A est un radical organique terminal chimiquement inactif, et L est un enchaînement macromoléculaire hydrophile, linéaire, dont la masse molaire est comprise entre 2 000 et 50 000 g, de préférence un radical (M)_x-X— dans lequel (M)_x est notamment une chaîne polyoxyéthylène et X un « bras » tel que —NH—CO—CH₂—CH₂—, —O—CH₂— ou —OCO—CH₂—CH₂—.

Cette hémoglobine est caractérisée par une courbe de Barcroft très voisine de celle de l'hémoglobine native.

Elle est utilisable comme transporteur réversible d'oxygène, notamment dans les interventions transfusionnelles.

FR 2 551 660 - A1

- 1 -

"Hémoglobine modifiée chimiquement, sa préparation, solutions aqueuses en contenant et leur utilisation"

La présente invention concerne une hémoglobine chimiquement modifiée, sa préparation, les solutions aqueuses la contenant et leur utilisation comme transporteurs d'oxygène, notamment, dans des interventions transfusionnelles.

On sait que l'on peut injecter, par voie intraveineuse, une solution aqueuse d'hémoglobine exempte de stromas et rendue isotonique du sang par addition d'adjuvants divers. Le but de cette opération est de remédier à une éventuelle hémorragie en suppléant la déficience sanguine par la perfusion d'un volume équivalent d'un fluide semi-artificiel compatible contenant de l'hémoglobine et capable d'assurer la fonction oxyphorique du sang naturel. On aurait pu s'attendre à ce que l'emploi d'une telle solution permette la perfusion d'un volume relativement important et la survie d'un sujet dont l'hématocrite aurait été réduit à une faible valeur. En fait, jusqu'à présent, un tel substitut n'a jamais pu être utilisé efficacement en thérapeutique. Les raisons de cet échec sont multiples :

- la solution d'hémoglobine, trop peu visqueuse, s'écoule trop rapidement dans le réseau vasculaire pour que les échanges de gaz aux niveaux pulmonaire et tissulaire s'effectuent de façon satisfaisante ;

- l'hémoglobine est une sphéroprotéine de structure dense et, malgré sa masse moléculaire élevée (64 500 g par mole), son diamètre hydrodynamique équivalent est insuffisant pour l'empêcher de diffuser rapidement à travers le filtre rénal ;

- sans la protection qu'assure la paroi érythrocytaire à l'intérieur de laquelle elle se trouve naturellement confinée, la chromoprotéine est progressivement dégradée

- 2 -

en métabolites diffusibles, ce qui réduit encore son temps de séjour dans le système circulatoire.

Pour remédier à ces défauts, on a récemment proposé différentes solutions dont aucune ne s'est cependant révélée satisfaisante. Ainsi, on a proposé d'accroître artificiellement la viscosité des solutions d'hémoglobine, pour limiter la diffusion extra-vasculaire de ce transporteur et pour le protéger contre une métabolisation trop rapide. Les procédés qui ont été décrits jusqu'ici consistent généralement à lier chimiquement la chromoprotéine à un substrat macromoléculaire hydrosoluble, de diamètre hydrodynamique suffisant, choisi parmi les espèces notoirement dénuées de toxicité, peu antigéniques et compatibles avec les protéines plasmatiques. A cette fin, on a souvent eu recours à certains polysaccharides tels que notamment le dextrane, l'hydroxyéthyl-amidon ou l'albumine.

On a aussi préconisé d'augmenter le volume hydrodynamique du transporteur naturel, l'hémoglobine, en combinant partiellement les molécules grâce à un processus dit de "polymérisation" mis en oeuvre par réaction chimique avec un composé organique di-ou polyfonctionnel tel qu'un dialdéhyde.

Du point de vue de l'utilisation pratique, ces différentes techniques n'ont pas abouti parce que le traitement chimique auquel l'hémoglobine est ainsi soumise en modifie sensiblement la structure et les propriétés.

On sait, en effet, que ce transporteur est en fait composé par un assemblage subtil de quatre chaînes polypeptidiques liées chacune à une entité ferroporphyrinique (hème) qui contient le site de fixation réversible de l'oxygène. La situation relative de ces différentes sous-unités se modifiant quand l'organite élémentaire qu'elles

- 3 -

constituent absorbe ou libère de l'oxygène, on conçoit que la mobilité intense du système ainsi formé soit une condition impérativement requise pour qu'il puisse assurer convenablement ses fonctions physiologiques oxyphoriques.

5 Cette liberté conformationnelle lui confère en particulier un comportement allostérique très caractéristique qui se traduit par l'allure sigmoïde de la courbe (dite courbe de BARCROFT) décrivant la variation de la quantité d'oxygène retenue par unité de masse du transporteur en fonction
10 de la pression partielle de l'oxygène contenu dans l'atmosphère à laquelle la solution est exposée. Dans le cas d'une solution aqueuse d'hémoglobine native (concentration = 15 μ moles par litre), cette variation est représentée par le tracé de référence reproduit sur la figure 1 annexée, obtenu à pH 7,2 et à une température de 25°C.

15 Pour décrire plus commodément un tel comportement, on utilise communément trois données numériques caractéristiques, à savoir :

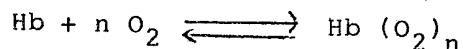
- La capacité maximale de fixation d'oxygène (notée $q_{\max}$). Cette grandeur est la quantité maximale d'oxygène que le
20 transporteur considéré peut fixer réversiblement quand il est saturé. Elle est généralement exprimée en moles d'oxygène par mole d'hémoglobine (soit 64 500 g d'hémoglobine).

- La pression de demi-saturation (notée p_{50}).

Il s'agit de la pression partielle d'oxygène à laquelle
25 il faut soumettre la solution de chromoprotéine pour qu'elle absorbe une masse d'oxygène équivalant à 50% de la quantité maximum à laquelle elle est capable de se combiner ($0,5 q_{\max}$).

- Le coefficient de HILL (noté n).

30 En se fondant sur l'équation équilibrée



Hb = Hémoglobine

HILL a proposé une expression mathématique empirique pour représenter la courbe de BARCROFT caractéristique d'une solution d'hémoglobine native, à savoir :

$$\log \frac{Y}{1-Y} = n \log p_{O_2} + \text{constante},$$

5 Y étant défini par le rapport: $Y = \frac{[Hb(O_2)_n]}{[Hb] + [Hb(O_2)_n]}$,

les valeurs entre crochets représentant les concentrations molaires ;

- p_{O_2} étant la pression partielle de l'oxygène dans

l'atmosphère placée au contact de la solution d'hémoglobine, exprimée en torrs (1 torr = $1,33 \cdot 10^2$ Pa) ;

- le coefficient de Hill, n, étant un multiplicateur adimensionnel.

L'expérience montre que n est pratiquement invariant dans la mesure où Y reste compris entre 0,1 et 0,9. Sa
15 valeur détermine l'apparence plus ou moins sigmoïde de la courbe de BARCROFT et elle reflète le caractère plus ou moins coopératif de la fixation de l'oxygène sur l'organe élémentaire précédemment décrit. La valeur de n permet d'apprécier la permanence du comportement allostérique
20 de l'hémoglobine. Dans le cas de l'hémoglobine native, le coefficient de HILL est compris entre 2,7 et 3,0.

Il est clair qu'un substitut sanguin ne peut jouer un rôle équivalent à celui qu'assure l'hémoglobine native que dans la mesure où la combinaison qu'il forme
25 avec l'oxygène est réversible et où la courbe de BARCROFT qui le caractérise est pratiquement superposable à celle qui est reproduite sur la figure 1. Or, il s'avère que toute réaction chimique insuffisamment contrôlée, effectuée sur la chromoprotéine naturelle, s'accompagne d'une
30 altération profonde de sa courbe de BARCROFT. Ainsi, avec les hémoglobines modifiées connues, on observe souvent une perte totale de la sigmoïdité, ce qui implique que la fixation d'oxygène ne procède plus selon

- 5 -

un mécanisme coopératif. Dans les rares cas où ce comportement est conservé, on constate une translation plus ou moins importante du tracé qui se traduit par une variation sensible de la pression de demi-saturation (généralement une diminution de la p_{50} indiquant que le

5 transporteur artificiel retient trop énergiquement l'oxygène pour pouvoir le restituer rapidement au niveau des tissus irrigués).

L'invention a pour but de remédier, au moins en

10 partie, à ces inconvénients en créant une hémoglobine modifiée de telle sorte que simultanément le volume hydrodynamique moléculaire de l'hémoglobine soit augmenté, réduisant ainsi sa diffusivité extravasculaire et qu'elle soit protégée contre une dégradation rapide, sans

15 toutefois altérer sensiblement ses propriétés oxyphoriques telles qu'elles peuvent être appréciées en comparant sa courbe de BARCROFT avec celle qui caractérise le comportement de la chromoprotéine native.

Ce but a été atteint selon l'invention qui fournit

20 une hémoglobine modifiée chimiquement, présentant une structure chimique bien définie.

Plus précisément, l'invention a pour objet une hémoglobine hydrosoluble modifiée chimiquement, caractérisée en ce que chaque molécule modifiée d'hémoglobine

25 porte à sa périphérie, liés chimiquement, des greffons macromoléculaires hydrophiles, hémocompatibles, peu ou pas biodégradables en milieu plasmatique, non-antigéniques et non toxiques, de formule :

A - L - (I)

30 dans laquelle

A est un radical organique terminal chimiquement inactif, et

—

- 6 -

L est un enchaînement macromoléculaire hydrophile, linéaire, dont la masse molaire est comprise entre 2 000 et 50 000 g.

Le radical A peut être un radical aliphatique rectiligne ou ramifié, alicyclique, aromatique ou mixte, chimiquement inactif tel que, par exemple, un groupe méthyle, éthyle, isopropyle, phényle, cyclohexyle, benzyle, etc...).

Le groupe bivalent -L- peut être de nature synthétique, par exemple, de type polyéther, notamment une chaîne polyoxyéthylène, ou naturelle, par exemple, une chaîne
10 polypeptidique.

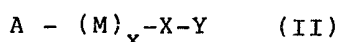
Dans cette hémoglobine modifiée, l'hémoglobine de base, c'est-à-dire avant modification, est soit sous la forme oxyhémoglobine, soit sous la forme désoxyhémoglobine, soit encore à l'état de complexe hydrosoluble obtenu en
15 associant l'hémoglobine, de préférence sous sa forme désoxy, à un composé porteur de fonctions carboxylate et/ou phosphate tel que notamment l'inositol-pentaphosphate, l'inositol-hexaphosphate (IHP) ou le diphospho-2,3-glycérate de sodium (2,3 DPG) ou des composés apparentés.

20 Quels que soient l'hémoglobine de base et les greffons A-L tels que définis ci-dessus, on observe que, de façon tout à fait surprenante et inattendue, l'hémoglobine modifiée selon l'invention présente un volume hydrodynamique moléculaire accru, ce qui se traduit par une augmentation de la
25 viscosité des solutions la contenant et par une réduction de sa diffusivité extravasculaire, tout en étant protégée contre une métabolisation trop rapide, sans que l'"enrobage" interposé constitué par les greffons A-L ralentisse sensiblement les échanges gazeux avec l'extérieur.

30 L'hémoglobine modifiée selon l'invention peut être préparée selon tout procédé connu de l'homme du métier permettant de fixer à la surface de l'hémoglobine de base choisie telle que définie précédemment, des greffons

- 7 -

A-L. Elle peut, en particulier, être préparée selon un procédé caractérisé en ce qu'il consiste essentiellement à faire réagir, en solution aqueuse, l'hémoglobine (Hb) avec un polymère monoréactif P de formule générale :



dans laquelle

A est défini comme précédemment.

(M)_x représente un enchaînement polymère hydrophile, hémocompatible, non antigénique et dénué de toxicité, dont la masse molaire est comprise entre 2000 et 50 000, x représentant le nombre de maillons élémentaires (M), X est un groupement divalent permettant de relier la fonction terminale de l'enchaînement polymère (M)_x à Y, Y est un groupe activateur monovalent capable de réagir en milieu aqueux dans les conditions de la réaction, sur certaines des fonctions chimiques portées par l'hémoglobine,

a) à des concentrations telles qu'il ne se produise pas de démixtion, de précipitation ou de cristallisation spontanée,

b) dans des conditions de température et de pH telles que l'hémoglobine ne subisse aucune dénaturation la rendant inapte à servir de transporteur d'oxygène,

c) les conditions de pH étant en outre telles que l'hydrolyse du polymère monoréactif P ne soit pas plus rapide que sa condensation sur les sites réactifs de la protéine,

d) la proportion des réactifs et la durée de la réaction étant en outre telles que toutes les molécules d'hémoglobine soient substituées par plusieurs greffons provenant de P.

L'hémoglobine (Hb) peut être prise soit sous la forme oxyhémoglobine, soit sous la forme désoxyhémoglobine, soit encore sous la forme d'un complexe

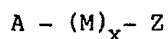
- 8 -

hydrosoluble tel que défini plus haut.

Le polymère monoréactif P peut être obtenu selon des procédés classiques bien connus de l'homme du métier à partir d'un composé connu, notamment commercial, comprenant l'enchaînement polymère $-(M)_x-$.

5 Comme exemples de tel enchaînement, on peut citer des chaînes de nature synthétique, par exemple, de type polyéther, notamment la chaîne polyoxyéthylène $-(O-CH_2-CH_2)_x-$, ou naturelles, par exemple, de type polypeptidique.

X est introduit lors de la synthèse de P et choisi en fonction
10 de la nature de la fonction terminale Z de la chaîne polymère



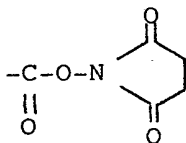
utilisée comme réactif de départ dans la préparation de P.

X est choisi de préférence parmi les groupements non biodégradables ou peu biodégradables en milieu plasmatique tels que notamment
15 les segments de molécules contenant des groupes éther ou amide. Comme exemples de groupements X on peut ainsi citer les groupes $-NH-CO-CH_2-CH_2-$ et $-O-CH_2-$. Des groupements ester tels que $-COO-CH_2-CH_2-$ peuvent aussi convenir.

Il convient ici de noter que la chaîne -L- dans la formule générale I est une forme générale du groupement $-(M)_x-X-$ dans la formule
20 générale II. Plus précisément la chaîne -L- est constituée par un enchaînement linéaire de maillons identiques -M- portant un "bras" -X- qui peut être de nature différente de celle du maillon élémentaire -M- et dont le rôle est de porter le groupe activateur -Y du réactif P.

En tant que groupes activateurs monovalents Y utilisables selon
25 l'invention, on peut citer les groupes utilisés en synthèse peptidique ou ceux qui rendent "réactifs" les colorants synthétiques utilisés pour teindre les fibres cellulosiques ou protéiniques. A titre d'exemple de groupe Y on peut citer le groupe ester du N-hydroxysuccinimide, Y_1 , de formule :

30



Pour qu'il ne se produise pas de démixtion, de
35 précipitation ou de cristallisation spontanée dans la solution de réaction, il convient que les concentrations

des réactifs en présence restent dans certaines limites qui dépendent de la masse molaire du réactif P. On peut toutefois indiquer que le plus souvent la concentration en hémoglobine est au départ voisine de 7,5% en poids.

Il est essentiel que l'hémoglobine ne subisse au cours de sa modification, ni dénaturation importante, ni réduction sensible de la mobilité relative des diverses entités qui la constituent afin de conserver, au moins en partie, ses caractéristiques de composé oxyphorique. Pour cela, il convient de réaliser la réaction à une température relativement basse, de préférence de 0 à 15°C, et à une valeur de pH peu éloignée de la neutralité.

par ailleurs, pour que l'hydrolyse du polymère monoréactif P ne soit pas plus rapide que sa condensation, il convient également que le milieu soit convenablement tamponné à une valeur voisine de la neutralité.

La valeur exacte du pH optimum voisin de la neutralité dépend essentiellement de la nature chimique du groupe activateur $\underline{Y}$. Par exemple, quand ce groupe est Y_1 tel qu'indiqué plus haut, le pH optimum se situe entre 5,6 et 6,0, et peut être obtenu avec du tampon phosphate 0,1M, pH 5,8.

Le rapport des concentrations molaires $[P]/[Hb]$ doit, en outre, être tel que chaque molécule d'hémoglobine présente dans le milieu ait la possibilité de fixer plusieurs greffons.

A titre d'exemple, on peut indiquer qu'en faisant réagir, à une température de 0 à 15°C, en solution dans un milieu aqueux tamponné à un pH voisin de 6, un mélange Hb + P dans lequel $\underline{Y}$ est égal à Y_1 et où le rapport des concentrations molaires $[P]/[H_b]$ est initialement compris entre 5 et 30, on parvient à fixer rapidement sur chaque molécule d'hémoglobine plusieurs greffons obtenus à partir

- 10 -

du polymère P. Le conjugué obtenu, dont la masse molaire est sensiblement accrue par rapport à celle de la chromoprotéine de départ (elle peut dans ce cas atteindre 170.000) reste néanmoins soluble dans le milieu réactionnel. Cette transformation s'accompagne d'un fort accroissement du diamètre hydrodynamique moléculaire du transporteur et permet de l'enrober par une gaine protectrice qui ralentit ultérieurement sa dégradation par les agents métabolisants. En outre, du fait du caractère monoréactif du composé P, la transformation se limite à une plurisubstitution et ne s'accompagne d'aucune "polymérisation" ni d'aucune réticulation interne de l'entité centrale hémoprotéique, qui conserve ainsi son aptitude à se déformer et à être le siège d'un processus coopératif. De plus, l'enrobage étant perméable aux gaz, le conjugué obtenu a, comme il sera montré plus loin, un comportement oxyphorique très voisin de celui de l'hémoglobine native.

En règle générale, il convient, pour que toutes les molécules d'hémoglobine soient substituées efficacement par plusieurs greffons de travailler, avec un fort excès de P ($[P]/[Hb]$ de préférence compris entre 10 et 30) et de laisser la réaction se poursuivre pendant une durée relativement prolongée (en moyenne 2 heures).

L'examen chromatographique de la préparation finalement obtenue par mise en oeuvre du procédé selon l'invention décrit ci-dessus montre qu'elle ne contient plus d'hémoglobine non transformée et que les principales impuretés qui la souillent se réduisent, d'une part, à du polymère P désactivé par hydrolyse et, d'autre part, à des contaminants formés lors de la réaction des groupes Y sur les fonctions nucléophiles de la protéine. Ces composants indésirables, ainsi que la majeure partie des ions, par exemple phosphate, apportés par le tampon, doivent être ultérieurement extraits par dialyse prolongée. (par exemple

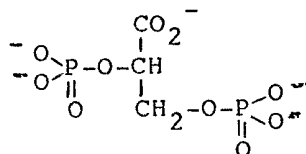
- 11 -

12 heures) contre de l'eau distillée ou par tout autre procédé connu d'élimination de telles impuretés.

Suivant les qualités particulières recherchées pour l'hémoglobine modifiée selon l'invention et les applications envisagées, la modification est effectuée soit sur la forme naturelle oxygénée de l'hémoglobine, soit sur sa forme naturelle désoxygénée, soit encore sur un complexe hydrosoluble de l'hémoglobine tel que défini plus haut.

10 L'hémoglobine naturelle préalablement désoxygénée est conservée, manipulée et traitée par le composé P en atmosphère inerte, par exemple, sous azote, en milieu aqueux préalablement désoxygéné.

Dans certains cas particuliers, il est intéressant d'avoir recours, en tant qu'hémoglobine (Hb) à un complexe hydrosoluble de l'hémoglobine naturelle. En effet, on sait que dans le milieu intraérythrocytaire, la molécule d'hémoglobine est accompagnée par un composé porteur de fonctions chargées négativement, phosphate et carboxylate, le diphospho-2,3 glycérate (noté 2,3 DPG), de formule



En interagissant spécifiquement, par liaisons ioniques, avec certains sites électropositifs contenus dans la chromoprotéine, cet agent vient occuper une cavité centrale située à l'intérieur des organites élémentaires déjà décrits. Pour des raisons d'ordre structural, il se complexe plus fortement à la forme désoxygénée qu'à la forme oxygénée de l'hémoglobine. Cette action préférentielle

- 12 -

stabilise donc le premier de ces états (désoxy) aux dépens du second (oxy), ce qui entraîne une diminution de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène. Ainsi, dans le milieu intraérythrocytaire, la chromoprotéine est

5. caractérisée par une pression de demi-saturation p_{50} qui est environ 2,5 fois plus élevée que celle qu'elle manifeste à l'état libre.

En revanche, la complexation avec le 2,3 DPG ne semble pas modifier sensiblement le comportement allostérique du

10 transporteur dont le coefficient de HILL s'élève seulement de 2,7 à 3,0.

Cette propriété du 2,3 DPG est, au moins partiellement, partagée par d'autres espèces organiques apparentées dont la molécule porte une ou plusieurs fonctions carboxylate

15 et/ou phosphate telles que, notamment, l'inositol-pentaphosphate et l'inositol-hexaphosphate (IHP) de sodium.

L'IHP, en particulier, est un produit commercial donc d'accès facile, que l'on peut avantageusement utiliser, entre autres, soit pour déplacer l'équilibre de fixation de

20 l'oxygène, soit pour protéger, pendant la réaction de P sur Hb, certains des sites de l'hémoglobine qui interviennent directement dans le déclenchement de ses transitions conformationnelles.

L'utilisation de tels agents (appelés ci-après "effecteurs") pour complexer l'hémoglobine rend la condensation

25 avec P plus sélective, d'une part, parce qu'ils stabilisent préférentiellement certaines conformations moléculaires de l'hémoglobine et, d'autre part, parce qu'ils sont en interaction de type ionique avec certains des sites qui

30 pourraient éventuellement réagir sur P.

On utilise alors de préférence de l'hémoglobine préalablement désoxygénée.

Avantageusement, la formation du complexe et la réaction avec le polymère P se font dans le même milieu

35 réactionnel.

- 13 -

Ainsi, avec l'hémoglobine préalablement désoxygénée, on effectue ces deux réactions sous atmosphère inerte, par exemple, sous atmosphère d'azote, en milieu aqueux préalablement désoxygéné en introduisant l'effecteur dans le milieu avant le polymère réactif P.

- 5 globine soit pratiquement complète, il convient que le rapport molaire $\frac{[\text{effecteur}]}{[\text{désoxyhémoglobine}]}$ soit au moins égal à 4.

L'hémoglobine modifiée selon l'invention peut être conservée à l'état de solution aqueuse.

- 10 En particulier lorsqu'elle est préparée selon le procédé de l'invention décrit ci-dessus, la solution d'hémoglobine modifiée obtenue après purification, notamment par dialyse contre de l'eau distillée, puis contre une solution de Tyrode, peut être conservée en solution aqueuse déminéralisée ou isotonique du sang, à une température voisine de 4-5°C.

- 15 L'hémoglobine modifiée selon l'invention peut également être isolée en lyophilisant, en présence d'un agent de protection de la protéine tel que par exemple le glucose ou des aminoacides comme le N-acétyl-tryptophane, une solution aqueuse déminéralisée la contenant et être con-
20 servée à l'état lyophilisé.

- Cette hémoglobine modifiée, notamment en solution aqueuse, sert de transporteur réversible d'oxygène. Ses solutions isotoniques avec le sang jouent avantageusement le rôle de substituts du sang notamment dans des interven-
25 tions transfusionnelles ou pour la perfusion d'organes.

L'invention vise, par conséquent, également les solutions aqueuses renfermant l'hémoglobine modifiée selon l'invention, notamment les solutions isotoniques du sang.

- 30 A titre d'exemple, on indiquera qu'une solution à base d'hémoglobine modifiée selon l'invention, destinée à remplacer le sang, par exemple dans une intervention transfusionnelle, peut être obtenue en préparant, à partir de la solution aqueuse purifiée décrite ci-dessus

- 14 -

ou de l'hémoglobine modifiée lyophilisée, une solution isotonique du sang, notamment par dialyse contre une solution de Tyrode.

L'invention vise en outre l'utilisation de l'hémoglobine selon l'invention, notamment en solution aqueuse.

Des préparations d'hémoglobine modifiée obtenues selon le procédé de l'invention et épurées dans les conditions précédemment définies ont été examinées en tant que transporteurs d'oxygène potentiels. on a pu s'assurer qu'elles sont effectivement capables de fixer réversiblement ce gaz et que cette propriété est conservée après de nombreux cycles d'oxygénation et de désoxygénation. Ces essais ont été réalisés dans un hémoximètre de type RADIOMETER OSM2.

Les mesures effectuées ont montré que la capacité maximale de fixation d'oxygène des produits ainsi transformés (exprimée en moles d'oxygène par mole de transporteur) est réduite d'environ 30% par rapport à celle de l'hémoglobine native. Cette diminution est vraisemblablement due à une dénaturation partielle du substrat et éventuellement à la formation d'un peu de méthémoglobine au cours des cycles imposés.

La caractéristique la plus remarquable de ces préparations est que leur courbe de BARCROFT demeure bien sigmoïde et qu'elle se superpose presque parfaitement avec celle du transporteur naturel. Ainsi que l'illustrent les résultats rapportés dans le tableau I, qui rassemble les observations faites avec les produits obtenus dans les conditions décrites dans les exemples 1 à 7 qui suivent, il apparaît que ces préparations sont caractérisées par des pressions de demi-saturation p_{50} dans la gamme de 5 à 7,8 torrs (soit d'environ 665 à 1037 Pa), alors que celle de l'hémoglobine native

- 15 -

est égale à 7,8 torrs, (soit environ 1037 Pa) et que leur coefficient de HILL n se situe dans la gamme de 2,40 à 2,70, alors que celui de l'hémoglobine de référence est de 2,80.

- 5 Par ailleurs, on s'est assuré que l'hémoglobine modifiée selon l'invention est dépourvue de toxicité, grâce aux essais décrits ci-dessous.

La préparation à l'étude, très soigneusement épurée par dialyse prolongée sous atmosphère inerte, a été
10 ensuite reconcentrée par ultrafiltration dans une cellule AMICON (modèle 402), pour élever son titre à 7 g de transporteur par litre. On a ensuite injecté par voie intrapéritoniale 0,5 ml du concentrat ainsi obtenu à 10 souris de souche SWISS dont le comportement a
15 ensuite été observé pendant une période de 10 jours.

Effectués sur les quatre transporteurs préparés dans les conditions décrites dans les exemples 1 à 6, ces essais n'ont permis de déceler aucun symptôme d'intoxication aigüe.

TABLEAU I

Type d'hémoglobine utilisée	P ₅₀ en torrs (p ₅₀ en Pa) a)	Coefficient de HILL $\frac{n}{a}$	Capacité de fixation de l'oxygène $q_{\max}/q_{\max}(\text{Hb}) \%$
Hémoglobine native	7,8 (≈ 1037)	2,80	99
Hémoglobine traitée par le polymère P ₁ ^{Me, 5000} dans les conditions de l'exemple 1. Forme initiale oxy	5,6 (≈ 745)	2,40	70
Hémoglobine traitée par le polymère P ₁ ^{Me, 5000} dans les conditions de l'exemple 2. Forme initiale désoxy	6,5 (≈ 865)	2,55	71
Hémoglobine traitée par le polymère P ₂ ^{Me, 5000} dans les conditions de l'exemple 3. Forme initiale oxy	6,2 (≈ 825)	2,50	69
Hémoglobine traitée par le polymère P ₂ ^{Me, 5000} dans les conditions de l'exemple 4. Forme initiale désoxy	7 (≈ 931)	2,70	70
Hémoglobine traitée par le polymère P ₂ ^{Me, 5000} dans les conditions de l'exemple 5. Forme initiale désoxy + 2,3DPG*	7,3 (≈ 971)	2,50	70
Hémoglobine traitée par le polymère P ₂ ^{Me, 5000} dans les conditions de l'exemple 6. Forme initiale désoxy + IHP**	7,8 (≈ 1037)	2,45	68
Hémoglobine traitée par le polymère P ₃ ^{Me, 5000} dans les conditions de l'exemple 7. Forme initiale oxy	5 (≈ 665)	2,45	72

- 17 -

a) La courbe de BARCROFT a été tracée en opérant avec une préparation dont le pH a été fixé à 7,2 par un tampon phosphate 0,1 M. La concentration en transporteur y était de 15 μ M et la température de 25°C.

- 5 * 2,3 DPG = Diphospho-2,3 glycérate de sodium
 ** IHP = Inositol hexaphosphate de sodium

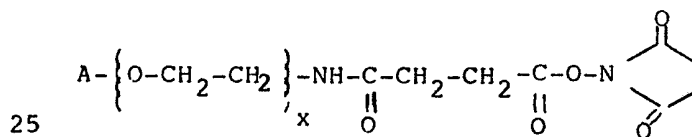
• L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples qui suivent donnés à titre illustratif.

10 Exemples préliminaires : préparation du polymère P

On donne ci-après des exemples de trois types de polymères P_1 , P_2 et P_3 dans lesquels $\underline{M}$ est le groupe oxyéthylène $-O-CH_2-CH_2-$ et $\underline{Y}$ est Y_1 tel que défini
 15 plus haut, c'est-à-dire le groupe ester de N-hydroxy-succinimide. Ces polymères peuvent être préparés à partir de composés de formule $A-(O-CH_2-CH_2)_x-OH$, notamment ceux commercialisés par la Société ALDRICH (Belgique).

20 Exemple préliminaire 1 :

Synthèse du polymère P_1 de formule

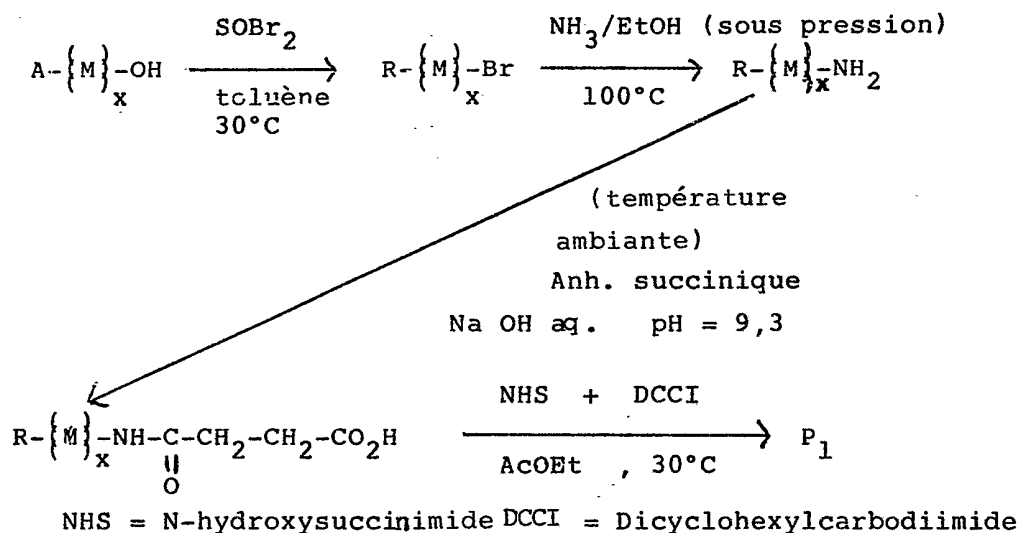
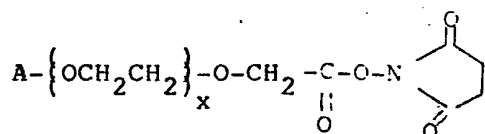


Le produit de départ a pour formule $A-(M)_x-OH$ avec

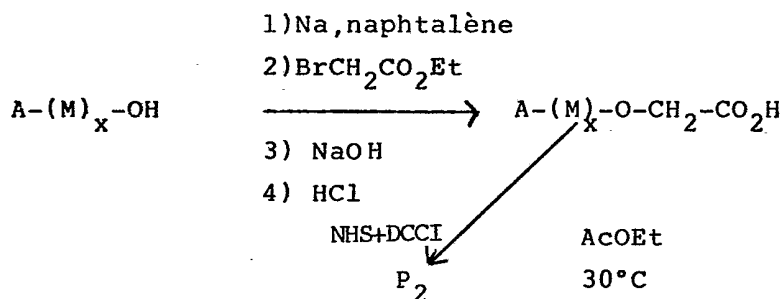
$M=-O-CH_2-CH_2-$

30 Le schéma réactionnel est le suivant.

-18-

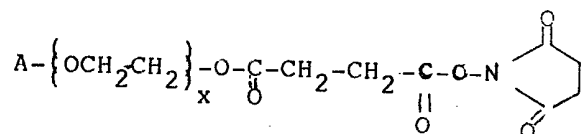
Exemple préliminaire 2 :Synthèse du polymère P_2 de formule

En partant du même produit de départ que dans l'exemple préliminaire 1, le schéma réactionnel est le suivant

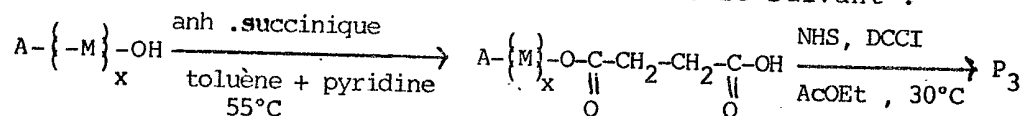


Exemple préliminaire 3 :

Synthèse du polymère P₃ de formule



En partant toujours du même polymère que dans l'exemple
5 préliminaire 1, le schéma réactionnel est le suivant :



Ce polymère P₃ se singularise par le fait qu'il
contient une fonction intermédiaire ester aliphatique qui
se trouve ultérieurement incorporée dans l'hémoglobine
10 modifiée finalement obtenue. Cette fonction étant rela-
tivement sensible à l'action des agents métabolisants,
les transporteurs d'oxygène obtenus à l'aide de ce réac-
tif P₃ sont plus rapidement biodégradés après leur
injection dans la circulation intravasculaire que les réac-
15 tifs P₁ et P₂ qui contiennent respectivement une fonction
amide et une fonction éther à la place de la fonction
ester aliphatique du polymère P₃.

Dans les exemples préliminaires 1 à 3 ci-dessus,
en employant systématiquement un excès de réactif par
20 rapport à la quantité de polyoxyéthylène à transformer,
on peut assurer, à chacune des étapes de ces synthèses,
un rendement proche de 100%. L'examen spectrométrique des
polymères P₁, P₂ et P₃ finalement obtenus montre, en
effet, qu'ils contiennent de 0,92 à 0,96 groupe ester
25 de N-hydroxysuccinimide par chaîne.

Exemples de préparation d'hémoglobine modifiée :

Exemple 1 :

Fixation du polymère P_1 de masse moléculaire 5000 dans lequel A = méthyle sur l'oxyhémoglobine.

a) Préparation du polymère $P_1^{Me,5000}$

5 Cette préparation est effectuée selon les procédés décrits par G. JOHANSSON, Biochim. Biophys. Acta 1970, 222,381 et A.F. BUCKMANN et Coll, Makromol. Chem.1981, 182,1379).

20 g de monométhoxypolyoxyéthylène (masse
10 moléculaire : 5000-ALDRICH, Belgique) sont dissous à chaud dans 160 ml de toluène anhydre. Pour éliminer l'eau contenue dans le polymère, on effectue une distillation azéotropique en écartant les 30 ml du liquide distillé en tête. A 30°C, on ajoute ensuite 0,7 ml
15 de triéthylamine et, goutte à goutte, 25 ml de toluène contenant 0,6 ml de bromure de thionyle. La solution est amenée et gardée au reflux pendant 30 mn. Elle est ensuite filtrée à chaud, traitée au noir animal et filtrée à nouveau. Par cristallisation à froid, on
20 obtient un solide qui est repris par l'éthanol bouillant. Le mélange est filtré sur charbon actif et remis au froid. Le solide cristallisé est redissous dans l'éthanol à chaud et reprécipité à partir de cette solution par addition d'éther. On obtient 13 g de polymère possédant
25 0,95 mol.Br/mol de polymère. Ces 13 g de polymère sont dissous dans 78 ml d'éthanol saturé en NH_3 à 0°C. Cette solution est mise en autoclave à 100°C. Après 48 h, on élimine l'éthanol et l'ammoniac par évaporation. Le solide obtenu est dissous dans le chloroforme puis repré-
30 cipité par l'éther. Le polymère ainsi isolé est purifié une dernière fois par dissolution dans une solution de soude 0,1 N et dialysé contre de l'eau pendant 24 h. Après lyophilisation, on obtient 12 g de polymère contenant 0,93 mol. NH_2 /mol de polymère. Ces 12 g sont

- 21 -

dissous dans 24 ml d'eau et on ajoute par petites quantités 0,27 g d'anhydride succinique, tandis que le pH du milieu est maintenu à 9-9,5 par des ajouts simultanés de soude 0,2N. Après 3 h la réaction est complète et la solution est acidifiée jusqu'à pH 3 par addition d'HCl 1 N. La phase aqueuse est extraite au chloroforme plusieurs fois. La fraction chloroformique est ensuite lavée à l'eau, séchée sur Na_2SO_4 et traitée à l'éther. Le solide qui précipite est filtré et séché. On obtient 9,1 g de polymère contenant 0,90 mol COOH /mol de polymère. Pour transformer ce dérivé carboxylique en ester actif, les 9,1 g isolés précédemment sont dissous dans 155 ml d'acétate d'éthyle anhydre et traités par 0,27 g de N-hydroxysuccinimide en présence de 0,47 g de dicyclohexylcarbodiimide. Le mélange est agité à 30°C pendant 15 h. La dicyclohexylurée formée est éliminée par filtration et le polymère est précipité à l'éther. Le solide isolé est repris par le chloroforme et de nouveau précipité à l'éther. Cette opération est répétée 3 fois. Après séchage du précipité, on obtient 9 g de polymère contenant 0,90 mol d'ester succinimidyle/mol de polymère.

b- condensation du polymère P_1 sur l'oxyhémoglobine

On mélange 15 ml d'une solution à 10% d'hémoglobine et 20 ml de tampon phosphate, pH 5,8 (0,1 M en phosphate). A ce mélange maintenu à 5°C, on ajoute 3,5 g du polymère $P_1^{\text{Me}, 5000}$. Le pH est ajusté précisément à 5,8 par ajout d'une petite quantité d'HCl 0,1N. La réaction est poursuivie pendant 2 h sous agitation et à 5°C. A ce moment, un échantillon est prélevé et chromatographié sur un gel Ultrogel Aca 44 IBF-FRANCE (zone de fractionnement linéaire 10 000-130 000 daltons ; exclusion 200 000 daltons).

- 22 -

Le diagramme d'élution qui est observé est celui représenté à la figure 2 dans laquelle V_e est le volume d'élution, V_o est le volume exclu de la colonne et D.O. est la densité optique. La totalité de la

5 préparation est ensuite soumise à une dialyse extensive contre de l'eau pendant 1 nuit et la courbe d'affinité pour O_2 est tracée en milieu tamponné (phosphate 0,1 M pH 7,2) à 25°C .

- 10 La p_{50} obtenue est de 5,6 torrs (env. 745 Pa) et le coefficient de HILL a une valeur de 2,40 (voir tableau I).
Exemple 2

Fixation sous azote du polymère P_1 de masse moléculaire 5000, dans lequel A = méthyle, sur la déoxyhémoglobine.

- La réaction de condensation entre le polymère $P_1^{Me,5000}$,
- 15 préparé comme dans l'exemple 1 et la protéine, est effectuée en boîte à gants, sous atmosphère d'azote. Pour désoxygéner tous les réactifs nécessaires au couplage, ceux-ci sont conservés plusieurs jours sous atmosphère d'azote. On vérifie avant la réaction que l'hémoglobine est bien sous forme désoxygénée en faisant une mesure à
- 20 l'hémoximètre OSM2 RADIOMETER qui permet de déterminer la quantité d'oxyhémoglobine.

- A part la présence d'azote, toutes les autres conditions de la condensation entre le polymère et la protéine (quantités et concentrations des réactifs,
- 25 nature du tampon, pH, température et durée de réaction) sont identiques à celles utilisées dans la réaction de condensation décrite dans l'exemple 1. Sur le chromatogramme obtenu par passage sur Ultrogel Aca44 d'un échantillon prélevé après 2 h de réaction, on observe un
- 30 déplacement et un élargissement très légers du pic vers les plus petites masses moléculaires par rapport au profil d'élution reporté dans l'exemple 1 (voir figure 3).

- 23 -

Après dialyse contre de l'eau, la préparation obtenue possède une valeur de P_{50} de 6,5 torrs (environ 865 Pa) et le coefficient de HILL est voisin de 2,55 (voir talbeau I).

5 Exemple 3 -

Fixation du polymère P_2 de masse moléculaire 5000, dans lequel A = méthyle sur l'oxyhémoglobine.

a) Préparation du polymère $P_2^{Me, 5000}$

10 Cette préparation est effectuée selon le procédé décrit par A.F. BUCKMANN et coll., Makromol.Chem. 1981, 182, 1379).

20 20 g de monométhoxypolyoxyéthylène (masse molaire 5000 - ALDRICH, Belgique) sont dissous dans 400 ml de THF maintenu au reflux sous azote. Parallèlement du naphthalène-sodium est préparé par addition de 15 2,3 g de sodium dans 100 ml de THF contenant 18,2 g de naphthalène et agitation vigoureuse pendant 3 h à température ambiante, sous azote.

Après refroidissement de la solution contenant le 20 polymère, on lui ajoute lentement à température ambiante et sous azote, le mélange renfermant le naphthalène-sodium en maintenant une agitation vigoureuse. La formation d'alcoolate est complète lorsqu'il apparaît dans le milieu une coloration verte due à un excès de naphthalène- 25 sodium. On ajoute alors goutte à goutte, 40 ml d'acétate d'éthyle contenant 1 g de bromoacétate d'éthyle. Après 4 h de réaction à température ambiante, le polymère est précipité par addition d'éther froid au milieu réactionnel. Il est alors filtré et traité par 320 ml 30 d'une solution de soude 0,1 N pendant 24 h à 55°C. Le mélange est ensuite acidifié jusqu'à pH 2,8 par addition

- 24 -

d'HCl 1N puis lavé au chloroforme ; la phase organique est lavée à l'eau, filtrée sur charbon actif, séchée sur Na_2SO_4 et additionnée d'éther jusqu'à précipitation complète du polymère. Ce dernier est alors
 5 séché sous vide. On obtient 17,6 g de polymère contenant 0,95 mol COOH/Mol de polymère. Ce dérivé carboxylique est ensuite estérifié par le N-hydroxysuccinimide dans les mêmes conditions que celles qui sont décrites dans l'exemple 1. On obtient finalement 17,5 g de polymère
 10 $\text{P}_2^{\text{Me},5000}$ contenant 0,95 mol d'ester succinimidyle/mol de polymère.

b) Condensation de P_2 sur l'oxyhémoglobine

La réaction de condensation entre le polymère $\text{P}_2^{\text{Me},5000}$ et l'oxyhémoglobine est effectuée dans des conditions
 15 rigoureusement identiques à celles qui ont été décrites dans l'exemple 1 pour la fixation du polymère $\text{P}_1^{\text{Me},5000}$ sur l'oxyhémoglobine.

La réaction est complète après 2 h d'agitation. Le chromatogramme obtenu sur Ultrogel AcA 44 est représenté
 20 à la figure 4.

La courbe de BARCROFT est caractérisée par une P_{50} de 6,2 torrs (environ 825 Ba) et un coefficient de HILL de 2,55 (voir tableau I).

Exemple 4

25 Fixation sous azote du polymère P_2 de masse moléculaire 5000, dans lequel A = méthyle sur la déoxyhémoglobine.

La réaction de condensation entre le polymère $\text{P}_2^{\text{Me},5000}$, préparé comme dans l'exemple 3 et la déoxyhémoglobine est réalisée dans des conditions strictement
 30 analogues à celles qui sont rapportées dans l'exemple 2 pour la fixation du polymère $\text{P}_1^{\text{Me},5000}$ sur la déoxyhémoglobine et en ayant recours aux mêmes précautions pour la désoxygénation des réactifs.

- 25 -

Le profil d'élution du mélange obtenu par chromatographie sur Ultrogel AcA 44 présente un pic majoritaire qui, par rapport à celui caractérisant l'exemple 3, est très légèrement décalé et élargi vers les V_e plus élevés (voir fig. 5).

Après dialyse contre de l'eau, la préparation obtenue possède une valeur de p_{50} de 7 torrs (environ 931 Pa) et le coefficient de HILL est voisin de 2,7 (voir tableau I).

10 Exemple 5 -

Fixation du polymère P_2 de masse moléculaire 5000, dans lequel A = méthyle sur la déoxyhémoglobine en présence de diphospho-2,3 glycérate de sodium et sous azote.

15 Les conditions de la réaction sont les mêmes que celles décrites dans l'exemple 2 : toutes les opérations sont effectuées en boîte à gants sous atmosphère d'azote et les réactifs sont parfaitement désoxygénés avant utilisation.

20 On mélange 15 ml d'une solution à 10% de déoxyhémoglobine et 15 ml de tampon phosphate pH 5,8 (0,1 M en phosphate). A ce mélange maintenu à 5°C, on ajoute d'abord 5 ml d'une solution obtenue en dissolvant 175 mg de 2,3 diphosphoglycérate de sodium (2,3 DPG) dans du
25 tampon phosphate 0,1 M, pH 5,8 et en réajustant le pH à 5,8 ; 3,5 g du polymère $P_2^{Me,5000}$ sont ensuite additionnés à cette solution sous agitation douce.

La réaction est poursuivie pendant 2 h à 5°C et un échantillon du milieu réactionnel est chromatographié
30 sur Ultrogel AcA 44. Le chromatogramme est tout à fait superposable à celui qui caractérise le dérivé obtenu à l'exemple 4.

Pour tracer la courbe d'affinité pour l'oxygène des

- 26 -

conjugués d'hémoglobine ainsi préparés, il faut, au préalable, les débarasser du diphospho-2,3 glycérate de sodium utilisé pendant la réaction. Ceci est réalisé en chromatographiant un échantillon de la préparation

5 sur un gel de filtration Ultrogel AcA 202 IBF-France (zone de fractionnement linéaire 1000-15000 daltons ; exclusion 22 000 daltons) en utilisant comme éluant une solution aqueuse 0,1 M de NaCl amenée et maintenue à pH 9. Après ce traitement, la p_{50} mesurée dans les condi-

10 tions standard est de 7,3 torrs (env. 971 Pa) et le coefficient de HILL a une valeur de 2,50 (voir tableau I).

Exemple 6

Fixation du polymère P_2 de masse moléculaire 5000, dans lequel A = méthyle sur la déoxyhémoglobine en présence

15 d'inositolhexaphosphate de sodium et sous azote -

La réaction de condensation entre le polymère $P_2^{Me,5000}$ et la déoxyhémoglobine en présence d'inositol hexaphosphate de sodium (IHP) est réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites dans l'exemple 5, en utilisant 107 mg d'IHP au lieu des 175 mg de 2.3 DPG,

20 pendant la réaction.

Le chromatogramme obtenu dans ce cas est identique à celui qui caractérise la préparation décrite dans l'exemple 4. Après élimination du phosphate organique

25 comme dans l'exemple 5, la p_{50} mesurée dans les conditions standard est de 7,8 torrs (environ 1037 Pa) et le coefficient de HILL a une valeur de 2,45 (voir tableau I).

Exemple 7

Fixation du polymère P_3 de masse moléculaire 5000 dans lequel A = méthyle sur l'oxyhémoglobine -

30 a) Préparation du polymère $P_3^{Me,5000}$ -

Cette préparation est effectuée selon le procédé décrit par P. FERRUTI et Coll., Makromol. Chem. 1981,

182, 2183.

20 g de monométhoxypolyoxyéthylène (masse moléculaire 5000 - ALDRICH, Belgique) sont dissous à chaud dans 160 ml de toluène anhydre. Pour éliminer l'eau contenue dans le polymère, on effectue une distillation azéotropique en écartant les 30 ml du liquide distillé en tête. Après refroidissement, on ajoute à la solution 1 g d'anhydride acétique et 1,6 ml de pyridine anhydre. Le mélange est gardé à 55°C sous agitation pendant 48 heures. Le toluène est ensuite évaporé et le solide résiduel dissous dans une solution aqueuse à 10 % de NaHCO_3 . La solution est alors filtrée, refroidie à 4°C, acidifiée par HCl 1N jusqu'à pH 3 et lavée au chloroforme. La phase organique est lavée plusieurs fois à l'eau, séchée sur sulfate de sodium et filtrée. Le polymère est reprécipité à partir de cette solution par addition d'éther. Il est ensuite filtré et séché sous vide. On obtient 17,6 g de polymère contenant 0,64 mol. COOH/mol. de polymère. Ce dérivé carboxylique est ensuite estérifié par le N-hydroxysuccinimide dans les mêmes conditions que celles qui sont décrites dans l'exemple 1. On obtient finalement 17,4 g de polymère $\text{P}_3^{\text{Me},5000}$ contenant 0,64 mol. d'ester succinimidyle/mol. de polymère.

b) Condensation de P_3 sur l'oxyhémoglobine

La réaction de condensation entre le polymère $\text{P}_3^{\text{Me},5000}$ et l'oxyhémoglobine est effectuée dans des conditions identiques à celles qui ont été décrites dans l'exemple 1, si ce n'est que le pH est ajusté à une valeur de 6,2 au moyen de tampon phosphate pH 6,2 (0,1 M en phosphate).

La réaction est complète après 2 heures d'agitation. Le chromatogramme obtenu sur Ultrogel ACA 44 est tout à fait comparable à celui qui caractérise la préparation décrite dans l'exemple 1.

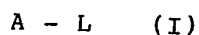
La courbe de Barcroft présente une p_{50} de 5 torrs (environ 665 Pa) et un coefficient de Hill de 2,45 (voir tableau I).

- 28 -

Nota : dans les figures 2 à 5, les flèches indiquent le volume d'élution des protéines dont la masse moléculaire figure sur les graphiques.

REVENDEICATIONS

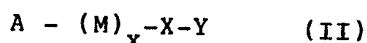
1. Hémoglobine hydrosoluble modifiée chimiquement, caractérisée en ce que chaque molécule modifiée d'hémoglobine porte à sa périphérie, liés chimiquement, des greffons macromoléculaires hydrophiles, hémocompatibles, peu ou pas biodégradables en milieu plasmatique, non antigéniques et non toxiques, de formule :



dans laquelle :

- 10 A est un radical organique terminal chimiquement inactif, et L est un enchaînement macromoléculaire hydrophile, linéaire, dont la masse molaire est comprise entre 2000 et 50 000 g.

2. Procédé de préparation de l'hémoglobine modifiée selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste essentiellement à faire réagir, en solution aqueuse, l'hémoglobine (Hb) avec un polymère monoréactif P de formule générale :



- 20 dans laquelle

- A est défini comme à la revendication 1, $(M)_x$ représente un enchaînement polymère hydrophile, hémocompatible, non antigénique et dénué de toxicité, dont la masse molaire est comprise entre 2000 et 50 000, x représentant le nombre de maillons élémentaires (M), X est un groupement divalent permettant de relier la fonction terminale de l'enchaînement polymère $(M)_x$ à Y, Y est un groupe activateur monovalent capable de réagir en milieu aqueux dans les conditions de la réaction, sur certaines des fonctions chimiques portées par l'hémoglobine,

a) à des concentrations telles qu'il ne se produise pas de démixtion, de précipitation ou de cristallisation spontanée,

- 30 -

b) dans des conditions de température et de pH telles que l'hémoglobine ne subisse aucune dénaturation la rendant inapte à servir de transporteur d'oxygène,

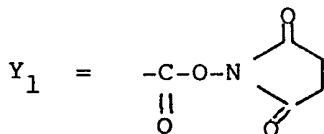
c) les conditions de pH étant en outre telles

5 que l'hydrolyse du polymère monoréactif P ne soit pas plus rapide que sa condensation sur les sites réactifs de la protéine,

d) la proportion des réactifs et la durée de la réaction étant en outre telles que toutes les molécules
10 d'hémoglobine soient substituées par plusieurs greffons provenant de P.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que la température est de 0 à 15°C.

4. Procédé selon la revendication 2 ou 3, caractérisé en ce que Y représente le groupe ester du
15 N-hydroxysuccinimide



5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que le pH est compris entre 5,6 et 6,0.

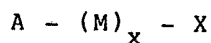
20 6. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que la solution aqueuse est tamponnée à un pH voisin de 6, la température est de 0 à 15°C, Y est le groupe Y_1 et le rapport des concentrations molaires $[P]/[Hb]$ est initialement compris entre 10 et 30.

25 7. Procédé selon l'une des revendications 2 à 6, caractérisé en ce que l'hémoglobine (Hb) est utilisée sous sa forme désoxy, complexée par un composé dont la molécule porte une ou plusieurs fonctions carboxylique et/ou phosphate, de préférence le 2,3 DPG ou l'IHP, et

- 31 -

en ce que la formation du complexe et la réaction avec le polymère P se font dans le même milieu réactionnel.

8. Utilisation de l'hémoglobine modifiée selon la revendication 1 comme transporteur réversible d'oxygène.
9. Solution aqueuse, notamment isotonique du sang, caractérisée en ce qu'elle contient, en tant que transporteur réversible d'oxygène, l'hémoglobine modifiée selon la revendication 1.
10. Hémoglobine hydrosoluble modifiée selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle porte à sa périphérie des greffons de formule



15

dans laquelle

- A représente le groupe méthyle,
- $(M)_x$ est une chaîne polyoxyéthylène, et
- X est un groupe $-NH-CO-CH_2-CH_2-$, $-O-CH_2-$ ou $-OCO-CH_2-CH_2-$.

20

1/2

