



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 299 686**

⑮ Int. Cl.:

A61K 35/12 (2006.01)

A61K 35/14 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **03705713 .0**

⑯ Fecha de presentación : **10.01.2003**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1465643**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **13.10.2004**

⑭ Título: **Procedimientos y composiciones para el transporte de oxígeno con alta afinidad por el oxígeno.**

⑩ Prioridad: **11.01.2002 US 347741 P**
01.04.2002 US 114400

⑬ Titular/es: **Sangart, Inc.**
6175 Lusk Boulevard
San Diego, California 92121, US

⑮ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2008

⑭ Inventor/es: **Winslow, Robert, M. y**
Vandegriff, Kim, D.

⑮ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2008

⑭ Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 299 686 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

Procedimientos y composiciones para el transporte de oxígeno con alta afinidad por el oxígeno.

5 **Campo de la técnica**

La presente invención hace referencia a productos de la sangre, y en particular a composiciones que comprenden una hemoglobina modificada con alta afinidad por el oxígeno.

10 **Antecedentes de la invención**

El Sistema Circulatorio y la Naturaleza de la Hemoglobina

La sangre es el medio de transporte de los nutrientes a los tejidos, y de eliminación de los productos de desecho excretados por los mismos. La sangre se compone de plasma en el cual los glóbulos rojos (RBCs por sus siglas en inglés, "Red Blood Cells", o eritrocitos), los glóbulos blancos (WBCs por sus siglas en inglés "white blood cells") y las plaquetas se hallan en suspensión. Los glóbulos rojos comprenden aproximadamente el 99% de las células en la sangre, y su principal función es el transporte de oxígeno a los tejidos y la eliminación de dióxido de carbono de los mismos.

20 El ventrículo izquierdo del corazón bombea la sangre a través de las arterias y las arteriolas más pequeñas del sistema circulatorio. La sangre entra entonces por los capilares, donde se produce el intercambio de la mayoría de los nutrientes y productos de desecho. (véase por ejemplo, A. C. Guyton, "Human Physiology And Mechanisms Of Disease" (3ra. ed.; W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pa.), pp. 228-229 (1982)). A partir de entonces, la sangre viaja a través de las vénulas y venas en su retorno a la aurícula derecha del corazón. Aunque la sangre que retorna al corazón es pobre en oxígeno, comparada con la que se bombea desde el corazón, en reposo, la sangre que retorna todavía contiene sobre el 75% del contenido original de oxígeno.

30 La función de oxigenación reversible (es decir, el reparto de oxígeno) de los RBCs (por sus siglas en inglés, "Red Blood Cells") se lleva a cabo mediante la proteína hemoglobina. En mamíferos, la hemoglobina tiene un peso molecular de aproximadamente 64.000 daltons y se compone de aproximadamente de un 6% de grupo hemo y de un 94% de globina. En su forma nativa, contiene dos pares de subunidades (es decir, es un tetramero), cada una de las cuales contiene un grupo hemo y una cadena polipeptídica globina. En disolución acuosa, la hemoglobina se presenta en equilibrio entre las formas tetramérica (PM 64.000) y dimérica (PM 32.000). Aparte de los RBCs, los dímeros son excretados prematuramente por el riñón (vida media en plasma de aproximadamente 2-4 horas). Junto con la hemoglobina, los RBCs contienen el estroma (la membrana de los RBCs), que contiene proteínas, colesterol y fosfolípidos.

Productos Exógenos de la Sangre

40 Debido a la demanda de productos sanguíneos en los hospitales y otros establecimientos, una gran parte de la investigación se ha dirigido hacia el desarrollo de substitutos de la sangre y expansores del volumen plasmático. Un substituto de la sangre es un producto sanguíneo capaz de transportar y proporcionar oxígeno a los tejidos. Los substitutos de la sangre tienen determinados usos, incluyendo la reposición de la pérdida de sangre durante los procesos quirúrgicos y la consecuente hemorragia aguda, y los procesos de reanimación tras una lesión traumática. Los expansores del volumen del plasma o expansores plasmáticos son substitutos de la sangre que se administran al sistema vascular pero que normalmente no son capaces de transportar oxígeno. Los expansores plasmáticos pueden usarse, por ejemplo, para reemplazar las pérdidas de plasma a causa de quemaduras, para tratar el choque que se produce por la pérdida de volumen y para efectuar la hemodilución (por ejemplo, para mantener la normovolemia y reducir la viscosidad sanguínea). Esencialmente, los substitutos de la sangre pueden ser utilizados para estos propósitos o cualquier otro propósito en el que se administre sangre almacenada a los pacientes. (Véase por ejemplo la patente americana U.S. 4.001.401 de Bonson y col., y 4.061.736 de Morris y col.)

55 La fuente actual de sangre humana es limitada, y ello puede ser paliado gracias al uso de substitutos exógenos de la sangre. Por ejemplo, una disponibilidad generalizada de substitutos sanguíneos inocuos y efectivos, reduciría la necesidad de sangre almacenada (alogénica). Además, tales substitutos sanguíneos permitirían la inyección inmediata de una solución de reanimación tras una lesión traumática, sin considerar la compatibilidad sanguínea (requisito obligado para la sangre), ahorrando de este modo un tiempo valioso para resuministrar oxígeno al tejido isquémico. Además, los substitutos de la sangre pueden ser administrados a los pacientes antes de la cirugía, permitiendo retirar sangre autóloga de los pacientes que podría ser devuelta posteriormente durante el proceso, si es necesario, o después de la cirugía. Así, el uso de productos sanguíneos exógenos no sólo protege a los pacientes de la exposición a sangre no autóloga (alogénica), sino también, conserva la sangre autóloga o bien alogénica (almacenada y testada) para su uso óptimo.

65 *Limitaciones de los Substitutos Actuales de la Sangre*

Los intentos para producir substitutos de la sangre (a veces referidos como "expansores plasmáticos transportadores de oxígeno") han producido hasta ahora productos con una eficacia marginal, o cuya producción es tediosa, cara, o

ambas. Frecuentemente, el coste de producción de tales productos es tan elevado que excluye el uso generalizado de estos productos, particularmente en aquellos mercados donde existe mayor necesidad (por ejemplo, economías emergentes del tercer mundo).

5 Los substitutos de la sangre pueden agruparse en las siguientes tres categorías: i) emulsiones basadas en perfluorocarbonos, ii) hemoglobina encapsulada en liposomas, y iii) hemoglobinas modificadas libres de células. Como se describe más abajo, ninguna de ellas ha sido completamente satisfactoria, aunque se piensa que los productos que consisten en hemoglobina modificada libre de células son los más prometedores. Los compuestos basados en perfluoroquímicos disuelven oxígeno en lugar de unirlo como ligando. Para utilizarlos en sistemas biológicos, los perfluoroquímicos deben emulsionarse con un lípido, generalmente un fosfolípido de la yema de huevo. Pese a que las emulsiones de perfluorocarbono son baratas de producir, éstas no transportan suficiente oxígeno a dosis clínicamente toleradas para ser efectivas. Por el contrario, mientras la hemoglobina encapsulada en liposomas ha demostrado ser efectiva, es demasiado costosa para su uso generalizado. (Véase, Winslow, Robert M., "Hemoglobin-based Red Cell Substitutes", Johns Hopkins University Press, Baltimore (1992)).

10 15 La mayoría de los productos substitutos de la sangre utilizados en ensayos clínicos hoy en día, están basados en hemoglobina modificada. Estos productos, frecuentemente referidos como transportadores de oxígeno basados en hemoglobina (HBOCs), consisten generalmente en una solución acuosa homogénea de hemoglobina químicamente modificada, esencialmente libre de otros residuos de los glóbulos rojos (estroma). Aunque la hemoglobina libre de estroma (SFH) procedente de humanos es la materia prima más común para preparar un HBOC, se han usado otras 20 fuentes de hemoglobina. Por ejemplo, la hemoglobina puede ser obtenida o derivada de sangre animal (por ejemplo, hemoglobina bovina o porcina) o de bacterias o levadura o animales transgénicos o plantas molecularmente alterados para producir el producto deseado de hemoglobina.

25 30 La modificación química consiste en entrecruzamiento intramolecular, oligomerización y/o conjugación de polímeros, para modificar la hemoglobina de modo que su persistencia en la circulación se prolongue en relación a la hemoglobina sin modificar, y sus propiedades de unión al oxígeno sean similares a las de la sangre. El entrecruzamiento intramolecular une químicamente subunidades de la unidad de hemoglobina tetramérica para prevenir la formación de dímeros que, como se ha indicado previamente, se excretan prematuramente. (Véase, por ejemplo, patente americana U.S. 5.296.465 de Rausch y col.).

35 Los costes elevados de la producción de productos HBOC han limitado mucho su viabilidad comercial. Además, los presentes inventores han encontrado que los HBOCs conocidos tienen tendencia a liberar excesivas cantidades de oxígeno a los tejidos de las paredes de las arteriolas, en lugar de a los capilares. Esto puede resultar en una disponibilidad insuficiente de oxígeno para la distribución mediante HBOC a los tejidos circundantes a los capilares. Esto ocurre a pesar de que la carga inicial de oxígeno de HBOC pueda ser relativamente alta, comparada con la que normalmente se alcanza por los glóbulos rojos naturales, excepto en el caso de mutantes de muy baja afinidad.

40 45 En la mayoría de los casos, los HBOCs han sido diseñados para tener una afinidad por el oxígeno igual o inferior a la de la hemoglobina nativa. Sin embargo, tal como se describió más arriba, esto puede resultar en una distribución insuficiente de oxígeno a los tejidos. Por consiguiente, la presente invención hace referencia a un substituto de la sangre que consiste en un HBOC con alta afinidad por el oxígeno en un diluyente acuoso.

50 45 Ajisaka y col., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1980, Vol. 97, No. 3, pp. 1076- describen los primeros estudios con derivados de polietilénglico (PEG) de hemoglobina humana, como posibles candidatos para un substituto de la sangre. Los derivados fueron aparentemente preparados uniendo PEG a los grupos amino de la hemoglobina usando 2,4,6-tricloro-s-triazina como agente de unión.

55 La patente americana U.S. 4.061.736 describe el primer trabajo sobre hemoglobina entrecruzada intramolecularmente, para su uso como substituto de la sangre en el transporte de oxígeno. Las sub-unidades de los respectivos tetrámeros de la hemoglobina son entrecruzadas covalentemente (véase, por ejemplo, columna 3, líneas 4-6). El entrecruzamiento es llevado a cabo en presencia de al menos un agente entrecruzador covalente bi- o polifuncional, que normalmente une los grupos amino primarios de residuos de lisina para dar productos solubles en agua (véase, por ejemplo, columna 5, líneas 20-25). Entre los muchos agentes entrecruzadores que se mencionan, se encuentra el etilénglico diglicidil éter y propilénglico diglicidil éter (véase columna 8, líneas 16-21). Los ejemplos empleaban los siguientes agentes entrecruzadores: diisocianato de hexametileno, diepóxido de butadieno, y divinil sulfona.

60 65 La patente americana 6.054.427 describe el primer trabajo realizado por uno de los inventores de la presente solicitud. Ésta describe productos substitutos de la sangre que consisten en un componente transportador de oxígeno y un componente no transportador de oxígeno (véase, por ejemplo columna 3, líneas 28-31). Preferentemente, el componente transportador de oxígeno es un transportador de oxígeno basado en la hemoglobina (véase, por ejemplo columna 3, líneas 39-41). El transportador de oxígeno basado en la hemoglobina puede ser hemoglobina que ha sido subsecuentemente modificada por la adición de grupos químicos, incluyendo óxido de polialquíleno (PAO), tal como el polietilénglico (PEG) (véase, por ejemplo columna 3, líneas 41-46; columna 4, líneas 23-25). De acuerdo con este documento, la hemoglobina es modificada con PAO (por ejemplo PEG) con el propósito de aumentar la viscosidad y el tamaño molecular. Las modificaciones de la hemoglobina se discuten comenzando en la columna 22. La tabla 3 (en las columnas 23-26) incluye un número de modificaciones de la hemoglobina que han sido propuestas

previamente. Esta tabla incluye una sección final titulada “Surface Conjugates” que menciona las modificaciones con polietilénglico. Los conjugados de hemoglobina (por ejemplo, hemoglobina modificada por conjugación con polietilénglico) se describen, por ejemplo comenzando en la columna 69, línea 28. En el primer experimento (“1. Hemoglobin Conjugated to Polyoxyethylene”, columna 69, línea 33), se utilizó AT-hidroxilsuccinimidato de ácido 5 metoxipoli(etilen glicol) propionico (M-SPA).

En el Segundo experimento (“2. Hemoglobin Conjugated to Polyoxyethylene”, columna 69, línea 49), se utilizó monometoxipolioxetensuccinimidil ester (MPSE). En el tercer experimento, (“3. Hemoglobin- Polyethylene Glycol Conjugate”, columna 70, línea 1), se usó metoxipoli (etilen glicol)-AT-succinimidil carbonato (SC-PEG). En el cuarto 10 experimento (“4. Hemoglobin- Polyethylene Glycol Conjugate”, columna 70, línea 21), fue utilizado polietilénglico bis (succinimidil succinato). En los experimentos subsecuentes, se describen otros conjugados de la hemoglobina sin PEG.

La patente internacional WO 2003/059286 (publicada después de la fecha de registro de la presente solicitud) 15 describe el uso de una hemoglobina modificada en la superficie en plasma como substituto de la sangre (véase el párrafo [0013]). La hemoglobina modificada en la superficie puede ser hemoglobina a la cual se ha unido un óxido de polialquieno (véase el párrafo [0018]). En una realización, la modificación de la superficie es una unión covalente a las cadenas laterales expuestas de aminoácidos en la molécula de hemoglobina (véase el párrafo [0041]).

La patente internacional WO 2003/059287 (publicada después de la fecha de registro de la presente solicitud) 20 describe el uso de hemoglobina modificada y de un cristaloide en una solución acuosa como substituto de la sangre (véase el párrafo [0013]). La hemoglobina modificada puede ser una hemoglobina a la que se ha unido un óxido de polialquieno (por ejemplo, PEG) (véase en los párrafos [0021] y [0022]). En una realización, la modificación de la superficie es una unión covalente a las cadenas laterales de aminoácidos expuestas en la molécula de hemoglobina 25 (véase en los párrafo [0044]). En el Ejemplo 1 se describe una hemoglobina modificada con PEG que fue preparada primero por tiolación de la hemoglobina y luego reaccionando con PEG 5000 activado con maleimida (véase en el párrafo [0051]).

La patente internacional WO 2004/058291 (publicada después de la fecha de registro de la presente solicitud) 30 describe una hemoglobina modificada que tienen una serie de cadenas PEG unidas por medio de grupos tiol (tanto nativos como introducidos químicamente) por reacción con PEG que ha sido funcionalizado con un grupo maleimida (véase en los párrafos [0009] y [0010]).

Resumen de la invención

Un aspecto de la presente invención es un producto substituto de la sangre que contiene hemoglobina oxigenada modificada en la superficie, donde la hemoglobina oxigenada modificada en la superficie es una hemoglobina a la cual se ha unido covalentemente un óxido de polialquieno vía un grupo tiol de una cadena lateral de aminoácidos expuesta en la hemoglobina, encontrándose la hemoglobina en estado oxigenado; y donde la hemoglobina oxigenada 40 modificada en la superficie tiene una P50 menos que la hemoglobina libre de estroma procedente de la misma fuente animal, medida en las mismas condiciones.

En un realización, el óxido de polialquieno es óxido de polietileno, óxido de polipropileno, o un copolímero de de óxido de polietileno/polipropileno.

En una realización, el óxido de polialquieno es polietilénglico.

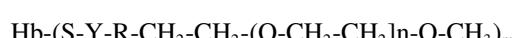
En una realización, el óxido de polialquieno es polietilénglico de acuerdo con la fórmula $H(OCH_2CH_2)_nOH$, donde n es mayor o igual a 4.

En una realización, el producto substituto de la sangre contiene hemoglobina oxigenada modificada en la superficie, en donde la hemoglobina oxigenada modificada en la superficie es una hemoglobina a la cual se ha unido covalentemente polietilénglico activado con maleimida vía un grupo tiol de la superficie de una cadena lateral de aminoácidos expuesta de la molécula de hemoglobina, hallándose la hemoglobina en estado oxigenado;

y donde la hemoglobina oxigenada modificada en la superficie tiene una P50 inferior al de la hemoglobina libre de estroma de la misma fuente animal, cuantificados en las mismas condiciones.

En una realización, el polietilénglico es polietilénglico de acuerdo con la fórmula $H(OCH_2CH_2)_nOH$, donde n es igual o superior a 4.

En una realización, el producto substituto de la sangre es un producto substituto de la sangre que contiene una hemoglobina oxigenada modificada en la superficie, en donde la hemoglobina oxigenada modificada en la superficie tiene la fórmula:



En donde:

5 Hb es una hemoglobina tetramérica;

10 S es un grupo tiol de la superficie;

15 Y es un conector covalente de succinimida;

20 R es un grupo alquilo, amida, carbamato, o fenilo;

n define la longitud del polímero y es igual o superior a 4; y

25 m es el número de polímeros de PEG unidos a la superficie de la hemoglobina; y

en donde la hemoglobina oxigenada modificada en la superficie tiene una P50 inferior al de la hemoglobina libre de estroma nativa procedente de la misma fuente animal cuando se cuantifica en las mismas condiciones.

30 En una realización, m es 4-5.

35 En una realización, antes de la modificación de la superficie, la hemoglobina ha sido tiolada.

40 En una realización, el producto substituto de la sangre tiene un cociente metemoglobina/hemoglobina total inferior a 0,10.

45 En una realización, la hemoglobina oxigenada modificada en la superficie tiene una P50 inferior a 10 torr (1333 Pa).

50 En una realización, la hemoglobina oxigenada modificada en la superficie tiene una P50 inferior a 7 torr (933 Pa).

55 En una realización, el producto substituto de la sangre es estable a la autooxidación a 24°C , dicho producto contiene un conjugado PEG-hemoglobina, donde el cociente metemoglobina/hemoglobina total es inferior a 0,10 y el conjugado PEG-hemoglobina tiene una P50 inferior 10 torr (1333 Pa).

60 Otro aspecto de la presente invención es una composición útil como substituto de la sangre, que comprende tal un producto substituto de la sangre como se describió mas arriba en un diluyente acuoso.

65 En una realización, la concentración de hemoglobina está entre 0,1 y 4,0 g/dl.

70 Otro aspecto de la presente invención es un producto substituto de la sangre tal como se describió más arriba para su uso en un procedimiento para el tratamiento o terapia del hombre o de un animal.

75 Otro aspecto de la presente invención es el uso de un producto substituto de la sangre tal como se describió más arriba para su uso en la producción de medicamentos para el tratamiento de traumatismos, isquemias, hemodilución, choque séptico, cáncer, anemia crónica, anemia falciforme, cardioplegia, o hipoxia.

80 Los procedimientos y composiciones descritos aquí son útiles en una diversidad de instalaciones incluyendo salas de emergencia, salas de operaciones, salas de emergencias militares, hospitales de cáncer, y clínicas veterinarias. La baja toxicidad y la alta estabilidad de las composiciones permiten su almacenamiento a temperatura ambiente sin poner en peligro la eficacia del substituto sanguíneo. Además, las composiciones evitan la necesidad de pruebas de compatibilidad sanguínea de la sangre y los ensayos de laboratorio asociados, permitiendo una intervención más rápida y segura en el tratamiento de los pacientes. La combinación de baja toxicidad, estabilidad a largo plazo y aplicabilidad universal de las composiciones presentan por tanto un substituto de la sangre particularmente útil.

85 Lo que aquí se describe es un producto compuesto por hemoglobina oxigenada modificada en la superficie, donde la hemoglobina oxigenada modificada en la superficie tiene una P50 menor que la hemoglobina nativa libre de estroma

ES 2 299 686 T3

de la misma fuente animal (es decir, de la misma especie animal) cuando se mide bajo las mismas condiciones. Las fuentes animales adecuadas incluyen, por ejemplo humanos, vacas, cerdos, caballos.

En una realización preferida, el producto substituto de la sangre toma la forma de una composición que contiene 5 la hemoglobina oxigenada modificada en la superficie y un diluyente acuoso.

En una realización específica, la hemoglobina oxigenada modificada en la superficie tiene una P50 inferior a 10 torr (1333 Pa), preferentemente inferior a 7 torr (933 Pa).

10 También se describe aquí un producto substituto de la sangre producido por acoplamiento covalente de uno o más óxidos de polialquíleno con la hemoglobina oxigenada.

En una realización específica, el producto substituto de la sangre se produce por acoplamiento covalente de un 15 polímero de óxido de polialquíleno tal como el polietilénglico (PEG) de fórmula $H(OCH_2CH_2)_nOH$, donde n es mayor o igual a 4. Preferiblemente, el producto tiene un cociente metemoglobina/hemoglobina total inferior a 0,10.

También se describe aquí un producto substituto de la sangre estable a la autooxidación a 24°C, que consiste en un 20 conjugado PEG-hemoglobina, donde el cociente metemoglobina/hemoglobina total es inferior a 0,10 y el conjugado PEG-hemoglobina tiene una P50 inferior a 10 torr (1333 Pa).

25 También se describe aquí un procedimiento para hacer una composición substituta de la sangre que comprende los pasos: a) preparación de la hemoglobina con un cociente metemoglobina/hemoglobina total inferior a 0,1; b) unión covalente del óxido de polialquíleno con la hemoglobina para formar hemoglobina oxigenada modificada en la superficie, con una P50 inferior a 10 torr (1333 Pa); y c) resuspensión de la hemoglobina oxigenada modificada en la superficie en un diluyente adecuado. Preferentemente, la preparación de hemoglobina conlleva además, aislar la hemoglobina de los glóbulos rojos.

Además, el paso para preparar hemoglobina puede conllevar el aislamiento de la hemoglobina de los glóbulos 30 rojos, en donde la hemoglobina tiene un cociente metemoglobina/hemoglobina total de 0,1 o superior, y la exposición de la hemoglobina a condiciones aeróbicas (es decir, a la atmósfera) durante un tiempo suficiente para disminuir el cociente metemoglobina/hemoglobina total a menos de 0,10. Este paso podría llevarse a cabo en ausencia de un agente reductor que contenga un grupo tiol.

También se describe aquí un procedimiento de utilización de un producto substituto de la sangre para distribuir 35 oxígeno a los tejidos, que consiste en administrar el producto en un diluyente acuoso a un mamífero que lo necesite.

Descripción resumida de las figuras

La Figura 1 describe EL cromatograma de la MalPEG-Hb y SFH.

40 La Figura 2 describe las curvas de equilibrio deL oxígeno para MalPEG-Hb y SFH.

La figura 3 describe patrones de FPLC de la elución para las dos hemoglobinas modificadas (PHP y POE) y la 45 hemoglobina (SFH). Advertir que los patrones para PHP y POE son cualitativamente, pero no cuantitativamente, similares. También advertir el pico pequeño de hemoglobina aparentemente no modificada en la curva POE.

La figura 4 describe la curva de equilibrio para las dos hemoglobinas modificadas con PEG (PHP y POE). Advertir que ninguna tiene cooperatividad significativa.

50 La Figura 5 describe el cociente de oxidación frente al tiempo, cuando MalPEG-hemoglobina está a temperatura ambiente. Las muestras fueron medidas por duplicado, de dos botellas separadas almacenadas de la misma manera. La tasa de oxidación es del 1 por ciento por hora de la hemoglobina total, yendo de 5,0 a 5,5 por ciento en 10 horas.

La Figura 6 describe el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de los dos grupos de animales que recibieron 55 bien PHP o POE.

La figura 7 describe la presión arterial media en animales que recibieron las dos hemoglobinas modificadas con PEG (PBP y POE). La respuesta es inmediata y mayor en los animales que recibieron PHP. Sin embargo, la presión se mantiene mejor en los animales con POE durante el periodo de hemorragia.

60 La figura 8 describe un resumen de varios cocientes de oxidación sobre el tiempo cuando la MalPEG-Hb es almacenada durante seis días a -20°C, cinco días a +4°C, y diez horas a temperatura ambiente (24°C).

La Figura 9 describe la tasa de oxidación sobre el tiempo cuando MalPEG-Hb es almacenada durante cinco días a 65 +4°C.

La Figura 10 describe el cociente de oxidación sobre el tiempo cuando MalPEG-Hb es almacenado durante diez horas a temperatura ambiente.

Descripción de la invención

La presente invención está dirigida a substitutos de la sangre que consisten en HBOCs que tienen alta afinidad por el oxígeno. Para ciertas aplicaciones, estas composiciones son capaces de distribuir el oxígeno a los tejidos de forma más eficiente que los substitutos de la sangre con afinidades por el oxígeno próximas a las de la hemoglobina nativa.

Definiciones

Para facilitar la comprensión de la invención que se presenta en la descripción que prosigue, se definen una serie de términos a continuación.

El término “hemoglobina” se refiere generalmente a la proteína que transporta oxígeno contenida en los glóbulos rojos. Cada molécula de hemoglobina tiene 4 subunidades, dos cadenas α y 2 cadenas β , dispuestas en una estructura tetramérica. Cada subunidad contiene también un grupo hemo, que es el centro que contiene el hierro que une oxígeno.

Así, cada molécula de hemoglobina puede unir cuatro moléculas de oxígeno.

El término “hemoglobina modificada” incluye, aunque no está limitado, la hemoglobina alterada mediante una reacción química tal como entrecruzamiento intra- e inter-molecular, manipulación genética, polimerización, y/o conjugación con otro grupo químico (por ejemplo, óxidos de polialquíleno, como por ejemplo polietilénglico, u otros aductos tales como proteínas, péptidos, carbohidratos, polímeros sintéticos y similares). En esencia, la hemoglobina está “modificada” si se han alterado alguna de sus propiedades estructurales o funcionales respecto a su estado nativo. Tal como se usa aquí, el término “hemoglobina” por sí mismo se refiere tanto a la hemoglobina nativa sin modificar, como a la hemoglobina modificada.

El término “hemoglobina modificada en la superficie” se utiliza para referirse a la hemoglobina descrita más arriba a la cual se han unido grupos químicos, tales como dextrano u óxido de polialquíleno, la mayoría covalentemente. El término “hemoglobina oxigenada modificada en la superficie” se refiere a la hemoglobina que se encuentra en el estado “R” cuando se ha modificado su superficie.

El término “hemoglobina libre de estroma” se refiere a la hemoglobina a la que se han eliminado todas de las membranas de los glóbulos rojos.

El término “metemoglobina” se refiere a una forma oxidada de la hemoglobina que contiene hierro en el estado férrico y no puede funcionar como trasportadora de oxígeno.

El término “MalPEG-Hb” se refiere a hemoglobina a la cual se ha conjugado PEG activado por maleimida. Tal MalPEG puede ser referido más adelante mediante la siguiente fórmula:



Formula I

40

donde Hb se refiere a hemoglobina tetramérica, S es un grupo tiol de superficie, Y es el enlace succinimido covalente entre Hb y MalPEG, R es un alquilo, amida, carbamato o grupo fenil (dependiendo de la fuente de la materia prima y del método de síntesis química), $[\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{]}_n$ son las unidades de oxietíleno que constituyen la cadena del polímero de PEG, donde n define la longitud del polímero (por ejemplo, PM = 5000), y O-CH_3 es el grupo metoxi terminal. PHP y POE son dos hemoglobinas diferentes modificadas por PEG.

El término “perfluorocarbonos” se refiere a moléculas sintéticas, inertes, que contienen átomos de flúor, y que consisten totalmente en átomos de halógeno (Br, F, Cl) y átomos de carbono. En la forma de emulsiones, éstos se encuentran en desarrollo como substancias sanguíneas, porque tienen la habilidad de disolver mucho más oxígeno que la cantidad equivalente de plasma o agua.

El término “expansor plasmático” se refiere a cualquier solución que pueda ser dada a un sujeto para tratar la pérdida de sangre.

55

El término “capacidad transportadora de oxígeno”, o simplemente “capacidad de oxígeno” se refiere a la capacidad de un substituto de la sangre para transportar oxígeno, pero no necesariamente se correlaciona con la eficiencia con la que lo distribuye. La capacidad transportadora de oxígeno generalmente se calcula a partir de la concentración de hemoglobina, ya que se conoce que un gramo de hemoglobina une 1,34 ml de oxígeno. Así, la concentración de hemoglobina en g/dl multiplicada por el factor 1,34 resulta en la capacidad de oxígeno en ml/dl. La concentración de hemoglobina puede ser medida por cualquier método conocido, tal como el Fotómetro de β -Hemoglobina (HemoCue, Inc., Angelholm, Suecia). Asimismo, la capacidad de oxígeno puede medirse por la cantidad de oxígeno liberada de una muestra de hemoglobina o sangre usando, por ejemplo, una célula de combustible (por ejemplo, Lex-O₂-Con; Lexington Instruments).

65

El término “afinidad por el oxígeno” se refiere a la avidez con la que un trasportador de oxígeno, como la hemoglobina une oxígeno molecular. Esta característica se define por la curva de equilibrio del oxígeno que relaciona el grado de saturación de la molécula de hemoglobina con el oxígeno (eje Y) con la presión parcial de oxígeno (eje X).

ES 2 299 686 T3

La posición de esta curva se indica por el valor de P50, la presión parcial de oxígeno a la cual el transportador de oxígeno está saturado a la mitad con oxígeno, y es inversamente proporcional a la afinidad por el oxígeno. De ahí que a menor P50, mayor afinidad por el oxígeno. La afinidad por oxígeno de la sangre (y componentes de la sangre como los glóbulos rojos y la hemoglobina) puede ser medida por varios métodos conocidos en la materia. (Véase, por ejemplo, Winslow y col., *J.Biol. Chem.* 252(7):2331-37 (1997)). La afinidad por oxígeno también puede ser determinada utilizando un analizador comercial HEMOX™ TM Analyzer (TCS Scientific Corporation, New Hope, Pennsylvania). (Véase, por ejemplo, Vandegriff y Shrager en "Methods in Enzymology" (Everse y col., eds) 232:460 (1994)).

5 El término "hipertónico" significa una disolución coloidal con una presión osmótica coloidal (oncótica) respecto a la sangre (>aproximadamente a 25-27 mmHg (3333-3600 Pa)). La presión coloide osmótica puede medirse por cualquier técnica apropiada, como en un instrumento Wescor.

10 15 El término "componente transportador de oxígeno" se refiere en general a una sustancia capaz de trasportar oxígeno en el sistema circulatorio y distribuir al menos una porción de ese oxígeno a los tejidos. En las realizaciones preferidas, el componente transportador de oxígeno es una hemoglobina nativa o modificada, y también es referida aquí como un "transportador de oxígeno basado en hemoglobina" o "HBOC".

20 El término "parámetros hemodinámicos" se refiere en general a medidas indicativas de la presión sanguínea, estado de flujo y volumen, incluyendo medidas como la presión sanguínea, gasto cardíaco, la presión de la aurícula derecha, y la presión diastólica final del ventrículo izquierdo.

25 El término "cristaloide" se refiere a pequeñas moléculas (normalmente menores de 10 Å (1 nm)) como sales, azúcares, y tampones. A diferencia de los coloides, los cristaloideos no contienen ningún componente activo oncóticamente y se equilibran en la circulación y en los espacios intersticiales muy rápidamente.

30 El término "coloide", en contraste con el de "cristaloide" se refiere a moléculas más grandes (normalmente mayores que 10 Å (1 nm)) que se equilibran a través de las membranas biológicas dependiendo de su tamaño y carga e incluyen proteínas como la albúmina y la gelatina, y almidones como el pentalmidón y el hetalmidón.

35 El término "presión osmótica coloidal" se refiere a la presión ejercida por un coloide para equilibrar el balance de fluidos a través de una membrana.

40 El término "estable a la autooxidación" se refiere a la habilidad de un HBOC para mantener un bajo cociente de oxidación. Un HBOC se considera estable a 24°C si el cociente metemoglobina/hemoglobina total no aumenta más que un 2% tras 10 horas a 24°C. Por ejemplo, si el cociente de autooxidación es 0,2 h⁻¹, entonces si el porcentaje inicial de metemoglobina es 5%, el HBOC sería considerado estable a temperatura ambiente durante 10 horas si el porcentaje no aumenta por encima del 7%.

45 40 El término "cociente metemoglobina/hemoglobina total" se refiere al cociente de hemoglobina desoxigenada sobre la hemoglobina total.

50 El término "mezcla" hace referencia a la agregación de dos o más substancias sin que reaccionen por la cual éstas perderían sus propiedades individuales; el término "disolución" se refiere a una mezcla de líquidos; el término "disolución acuosa" se refiere a una disolución que contiene agua y puede también contener una o más substancias líquidas con agua para formar una disolución multi-componente; el término "aproximadamente" se refiere a un valor concreto dentro de un intervalo, por ejemplo, 10% del valor indicado.

55 El término "polietilénglico" hace referencia a polímeros sólidos o líquidos de la fórmula general H(OCH₂CH₂)_nOH, donde n es mayor o igual a 4. Puede utilizarse cualquier formulación de PEG, substituida o sin substituir.

60 55 El significado de otra terminología empleada aquí debería ser fácilmente entendida por cualquier persona con experiencia razonable en el campo.

55 *Naturaleza de la Distribución y del Consumo de Oxígeno*

65 Aunque la utilización satisfactoria de las composiciones y procedimientos aquí descritos no requiere la compresión del mecanismo de distribución y consumo del oxígeno, un conocimiento básico de los mismos, puede ayudar a la comprensión de la discusión que prosigue. Generalmente se asume que los capilares son los principales transportadores de oxígeno a los tejidos. Sin embargo, respecto a los tejidos en reposo, los descubrimientos actuales indican que hay aproximadamente una igualdad entre la liberación de oxígeno arteriolar y capilar. Es decir, se cree que la hemoglobina en el sistema arterial distribuye aproximadamente un tercio de su contenido en oxígeno dentro de la red arteriolar, y un tercio en los capilares, mientras que el oxígeno restante sale de la microcirculación a través del sistema venoso.

65 Las arterias por sí mismas utilizan oxígeno. Por ejemplo, la pared arterial requiere energía para regular el flujo sanguíneo a través de la contracción en contra de la resistencia vascular. Así, la pared arterial es un sitio significativo para la difusión de oxígeno. Sin embargo, los compuestos actuales de distribución de oxígeno (por ejemplo, los HBOCs) pueden liberar demasiado oxígeno al sistema arterial, y por tanto, inducir una respuesta reductora de la perfusión capi-

lar. Por consiguiente, la eficacia de la distribución de oxígeno de un substituto de la sangre puede verse dificultada por tener demasiado oxígeno o una demasiada baja afinidad por el oxígeno.

La tasa de consumo de oxígeno por la pared vascular, es decir, la combinación del oxígeno requerido para un trabajo mecánico y el oxígeno requerido para la síntesis bioquímica, puede determinarse cuantificando el gradiente en la pared vascular. Véase por ejemplo, Winslow, y col., en "Advances in Blood substitutes" (1997), Birkhäuser, ed., Boston, MA, páginas 167-188. La tecnología actual permite la medida exacta de la presión parcial de oxígeno en diferentes vasos. El gradiente medido es directamente proporcional a la tasa de utilización de oxígeno por el tejido en la región medida. Tales medidas indican que la pared vascular tiene una línea base de utilización de oxígeno que aumenta con el aumento de la inflamación y la constrictión, y que disminuye con la relajación.

El gradiente en la pared vascular es inversamente proporcional a la oxigenación del tejido. La vasoconstricción aumenta el gradiente de oxígeno (metabolismo tisular), mientras que la vasodilatación disminuye el gradiente. Gradienes grandes indican que la pared vascular está utilizando más oxígeno, mientras que queda menos oxígeno disponible para el tejido. Se cree que el mismo fenómeno ocurre en la microcirculación.

Relación Entre la Vasoconstricción y la Afinidad por el Oxígeno

El fundamento del desarrollo de un HBOC con una alta afinidad por el oxígeno se basa, en parte, en estudios anteriores que utilizaron hemoglobinas libres de células como alternativa a las transfusiones de glóbulos rojos. Algunos de los efectos fisiológicos de estas disoluciones no se comprenden completamente. De éstos, el más controvertido es quizás la propensión a causar vasoconstricción, que puede manifestarse como hipertensión en animales y en el hombre (Amberson, W., "Clinical experience with hemoglobin-saline solutions", *Science* 106:117-117 (1947)) (Keipert, P., A. Gonzales, C. Gomez, V. Macdonald, J. Hess, and R. Winslow, "Acute changes in systemic blood pressure and urine output of conscious rats following exchange transfusion with diaspiron-crosslinked hemoglobin solution", *Transfusion* 33: 701-708, (1993)). La hemoglobina humana con las cadenas α entrecruzadas con bis-dibromosalicil-fumarato ($\alpha\alpha$ Hb) fue desarrollada por el ejército de EEUU como modelo de un substituto de los glóbulos rojos, pero fue abandonado por éste tras demostrar graves aumentos en la resistencia vascular pulmonar y sistémica (J. Hess, V. Macdonald, A. Mumay, V. Coppers, y C. Gomez, "Pulmonary and systemic hypertension after hemoglobin administration", *Blood* 78:356^a (1991). Una versión comercial de este producto fue abandonada tras resultados decepcionantes del ensayo clínico de Fase III (Winslow, R.M. "αα-Crosslinked hemoglobin: Was failure predicted by preclinical testing?" *Vox sang* 79: 1-20 (2000)).

La explicación más común para la vasoconstricción producida por la hemoglobina libre de células, es que ésta une fácilmente el factor relajante derivado del endotelio, el óxido nítrico (NO). De hecho, se han producido hemoglobinas recombinantes con afinidad reducida por el NO que parecen ser menos hipertensivas en experimentos de carga máxima con ratas (Doherty, D. H., M. P. Doyle, S. R. Curry, R. J. Vali, T. J. Fattor, J. S. Olson, y D. D. Lemon, "Rate of reaction with nitric oxide determines the hypertensive effect of cell-free hemoglobin", *Nature Biotechnology* 16: 672-676 (1998)) (Lemon, D. D., D. H. Doherty, S. R. Curry, A. J. Mathews, M. P. Doyle, T. J. Fattor, y J. S. Olson, "Control of the nitric oxide-scavenging activity of hemoglobin", *Art Cells, blood Subs., and Immob. Biotech* 24:378 (1996)). Sin embargo, los estudios sugieren que la unión de NO puede no ser la única explicación para la actividad vascular de la hemoglobina. Se ha hallado que ciertas moléculas grandes de hemoglobina, como aquellas modificadas con polietilenglicol (PEG), virtualmente estaban libres del efecto hipertensivo, incluso aunque sus tasas de unión a NO eran idénticas a las de la $\alpha\alpha$ Hb severamente hipertensiva (Rohlfs, R. J., E. Bruner, A. Chiu, A. Gonzales, D. Magde, K. D. Vandegriff, y R. M. Winslow, "Arterial blood pressure responses to cell-free hemoglobin solutions and the reactions with nitric oxide", *J. Biol. Chem.* 273: 12128-12134 (1998)). Además, se halló que la PEG-hemoglobina era extraordinariamente efectiva en la prevención de las consecuencias de la hemorragia cuando se administraba en una transfusión antes de la hemorragia. (Winslow, R. M., A. Gonzales, M. Gonzales, M. Magde, M. McCarthy, R. J. Rohlfs, y K. D. Vandegriff, "Vascular resistance and the efficacy of res cell substitutes", *J Appl Physiol* 85: 993-1003 (1998)).

Este efecto protector relacionado con la falta de hipertensión, sugiere que la vasoconstricción es responsable de la actuación indeseada de muchos de los productos basados en hemoglobina estudiados hasta la fecha. Basándose en estas observaciones, se desarrolló una hipótesis para explicar la vasocostricción, como alternativa, o posiblemente en adición al efecto de la unión a NO. Sin desear ser partidarios de ninguna teoría, se cree que un componente substancial del efecto vasoactivo de la hemoglobina es su respuesta a la difusión de la misma en el espacio libre de células. Esta hipótesis fue probada en un sistema capilar *in vitro*, y se demostró que la PEG-hemoglobina, que tiene una constante de difusión reducida, transfería O₂ de manera similar a la de los glóbulos rojos nativos (McCarthy, M. R., K. D. Vandegriff, y R. M. Winslow, "The role of facilitated diffusion in oxygen transport by cell-free hemoglobin: Implications for the design of hemoglobin-based oxygen carriers", *Biophysical Chemistry* 92: 103-117 (2001)). Se espera que la afinidad por el oxígeno de la hemoglobina juegue un papel importante en la difusión del mismo, ya que el cambio en la saturación desde la hemoglobina a la pared vascular es un determinante del gradiente de difusión de la propia hemoglobina.

La afinidad por el oxígeno de la hemoglobina libre de células puede jugar un papel adicional en la regulación del tono vascular, ya que la liberación de O₂ a la pared vascular en las arteriolas desencadena la vasoconstricción (L. Lindbom, R. Tuma, K. Arfors, "Influence of oxygen on perfusion capillary density and capillary red cell velocity in rabbit skeletal muscle", *Microvasc Res* 19:197-208 (1980)). En los vasos de los pliegues de la piel de los hámsters,

la PO_2 se encuentra entre 20-40 Torr (2666-5333 Pa), donde la curva de equilibrio del oxígeno para un glóbulo rojo normal es la más pendiente (Intaglietta, M., P. Johnson, y R. Winslow, "Microvascular and tissue oxygen distribution", *Cardiovasc Res* 32: 632-643 (1996)). Así, desde un punto de vista teórico, podría ser importante que la P50 de la hemoglobina libre de células sea inferior a la de los glóbulos rojos (es decir, mayor afinidad por el O_2), con el fin de prevenir la liberación de O_2 en los vasos arteriolares.

5 *Componentes Transportadores del Oxígeno*

10 El transportador de oxígeno (es decir, el componente transportador de oxígeno) es un transportador de oxígeno basado en hemoglobina, o HBOC. La hemoglobina puede ser tanto nativa (sin modificar); modificada posteriormente por una reacción química, como entrecruzamiento intra- o inter-molecularmente, polimerización o la adición de grupos químicos (por ejemplo, óxidos de polialquilenos u otros aductos); o puede ser diseñada recombinantemente. Los genes de las globinas alfa y beta humanas han sido clonadas y secuenciadas. Libhaber y col., P.N.A.S. 77: 7054-7058 (1980); Marotta y col., *J. Biol. Chem.* 353: 5040-5053 (1977) (cDNA de la beta-globina). Además, muchas 15 hemoglobinas modificadas producidas recombinantemente, se han producido utilizando mutagénesis dirigida, aunque se ha notificado que estas hemoglobinas "mutantes" tienen una afinidad por el oxígeno demasiado elevada. Véase, por ejemplo, Nagai, y col., P.N.A.S., 82:7252-7255 (1985).

20 La presente invención no está limitada por la fuente de hemoglobina. Por ejemplo, ésta puede derivarse de humanos y animales. Para ciertas aplicaciones, las fuentes preferidas de hemoglobina son el hombre, vacas y cerdos. Además, la hemoglobina puede producirse por otros procedimientos, incluyendo la síntesis química y las técnicas recombinantes. La hemoglobina se puede añadir a la composición del producto sanguíneo en forma libre, o puede estar encapsulada en una vesícula, como una partícula sintética, un microglobo o un liposoma. Los componentes transportadores de oxígeno deben ser libres de estroma y endotoxinas. Algunos ejemplos representativos de componentes transportadores 25 de oxígeno se describen en una serie de Patentes Americanas, entre las que se encuentran la Patente americana U.S. 4.857.636 de Hsia; patente americana U.S. 4.600.531 de Walder, patente americana U.S. 4.061.736 de Morris y col.; patente americana U.S. 3.925.344 de Mazur; patente americana U.S. 4.529.719 de Tye; patente americana U.S. 4.473.496 de Scannon; 4.584.130 de Bocci y col.; patente americana U.S. 5.250.665 de Kluger y col.; patente americana U.S. 5.028.588 a Hoffman y col.; y patente americana U.S. 4.826.811 y patente americana U.S. 5.194.590 de 30 Sehgal y col.

35 Además de las fuentes de hemoglobina mencionadas, se ha encontrado recientemente que la hemoglobina de caballo posee ciertas ventajas como componente transportador de oxígeno para la composición de la presente invención. Una ventaja es que existen cantidades comerciales de sangre de caballo fácilmente disponibles, de las cuales se puede purificar la hemoglobina de caballo. Otra ventaja es que la hemoglobina de caballo muestra propiedades químicas que 40 pueden incrementar su utilidad en los substitutos de la sangre de la presente invención.

45 En informes previos, se indica que la hemoglobina de caballo se auto-oxida a metemoglobina más rápidamente que la humana, lo que la haría menos indicada como componente substituto de la sangre. Véase, por ejemplo, J. G. McLean y I. M. Lewis, *Research in Vet Sci*, 19: 259-262 (1975). Para minimizar la oxidación, McLean y Lewis utilizaron un agente reductor, glutatión, tras la lisis de los glóbulos rojos. Sin embargo, la hemoglobina que se utiliza para preparar las 50 composiciones de la presente invención, independientemente de si la hemoglobina procede del hombre o del caballo, no requiere el empleo de agentes reductores para prevenir la auto-oxidación, tras la lisis de los glóbulos rojos.

55 Más recientemente, se ha notificado que la hemoglobina de caballo tiene una afinidad por el oxígeno diferente a la hemoglobina humana. Véase, por ejemplo, M. Mellegrini, y col., *Eur. J. Biochem.*, 268: 3313-3320 (2001). Esta diferencia, disuadiría de la selección de la hemoglobina de caballo para preparar substitutos de la sangre que mimeticen la hemoglobina humana. Sin embargo, cuando se incorpora en la composición de la presente invención, no se observa una diferencia significativa (inferior al 10%) en la afinidad por el oxígeno de los conjugados que contienen hemoglobina humana y de caballo.

60 Por consiguiente, a pesar de estas propiedades aparentemente indeseables, en las composiciones de la presente invención, la hemoglobina de caballo es equivalente, si no superior, a la hemoglobina humana.

65 Para utilizar en la presente invención, los HBOC tienen una afinidad por el oxígeno superior a la sangre completa, y preferentemente el doble de ésta, o alternativamente, mayor que la hemoglobina libre de estroma (SFH), cuando se miden en las mismas condiciones. En la mayoría de los casos, esto significa que el HBOC en el substituto de la sangre tendrá una P50 inferior a 10 Torr (1333 Pa), y preferentemente inferior a 7 Torr (933 Pa). En el estado libre, la SFH tiene una P50 de 15 torr (2000 Pa) aproximadamente, mientras que la P50 de la sangre entera es aproximadamente de 28 Torr. Previamente se ha sugerido que aumentando la afinidad por el oxígeno, y por tanto bajando la P50), se puede aumentar la distribución de oxígeno a los tejidos, aunque se aseguraba que una P50 inferior a la de la SFH no sería aceptable. Véase Winslow, y col. en "Advances in Blood Substitutes" (1997), Birkhauser, ed, Boston, MA, en la página 167, y la patente americana 6.054.427. Esta sugerencia se contradice con la creencia general de que las hemoglobinas modificadas que se utilizan como substitutos de la sangre, deberían tener una afinidad por el oxígeno más baja, y deberían tener la P50 similar a las de la sangre completa. Así, muchos investigadores han utilizado piridoxilfosfato para aumentar la P50 de la SFH de 10 Torr (1333 Pa) a 20-22 Torr (2666-2933 Pa), ya que la hemoglobina piridoxilfosfatada libera el oxígeno más fácilmente que la SFH.

Hay muchas propuestas científicas para producir HBOCs con alta afinidad por el oxígeno (es decir, aquellos con una P50 inferior a la de SFH). Por ejemplo, hay estudios que han identificado los aminoácidos que juegan un papel en la afinidad por el oxígeno, como la cisteína β -93, y por tanto hoy se puede llevar a cabo la mutagénesis dirigida para manipular la afinidad por el oxígeno al nivel deseado. Véase por ejemplo, la patente americana U.S. 5.661.124. En la 5 patente americana U.S. 6.054.427 se discuten muchas otras propuestas.

Toxicidad Asociada a la Hemoglobina

La hemoglobina se auto-oxida cuando cambia reversiblemente del estado ferroso (Fe^{2+}) al estado férrico (Fe^{3+}) o 10 metemoglobina. Cuando esto ocurre, el oxígeno molecular se disocia de la oxihemoglobina en forma de ión superóxido (O_2^-). Esto también resulta en la desestabilización del complejo hemo-globina y eventualmente en la desnaturalización de las cadenas de globina. Tanto la formación del radical oxígeno como la desnaturalización de la proteína, se cree que juegan un papel importante en la toxicidad *in vivo* de los HBOCs (Vandegriff, K. D., *Blood Substitutes, Physiological Basis of Efficacy*, páginas 105-130, Winslow y col., ed., Birkhauser, Boston, MA (1995).)

15 Con la mayoría de los HBOCs, hay una correlación negativa entre la afinidad por el oxígeno y la oxidación de la hemoglobina, es decir, a mayor afinidad por el oxígeno, menor es el cociente de auto-oxidación. Sin embargo, el efecto de las diferentes modificaciones de la hemoglobina en la afinidad por el oxígeno y la tasa de auto-oxidación, no es siempre predecible. Además, el equilibrio óptimo entre la afinidad por el oxígeno y la auto-oxidación no se entiende 20 completamente.

25 La presente invención, se relaciona, en parte, con el descubrimiento inesperado de que los conjugados PEG-Hb descritos aquí, muestran tasas de auto-oxidación muy bajos. Cuando se mide la tasa de auto-oxidación, ésta ha de ser lo más baja posible (es decir, un 0,2% por hora de la hemoglobina total, preferiblemente un 0,1% de la misma, a temperatura ambiente durante al menos 3 horas, y más preferiblemente durante al menos 10 horas). Así, los HBOCs de la presente invención se mantienen estables durante la administración y/o almacenamiento a temperatura ambiente.

Modificaciones del Componente Transportador de Oxígeno

30 El componente transportador de oxígeno es la hemoglobina modificada cuya modificación consiste en modificar la superficie, es decir, unir covalentemente grupos químicos a las cadenas laterales de aminoácidos expuestas de la molécula de hemoglobina.

35 La modificación se lleva a cabo principalmente para aumentar el tamaño molecular de la hemoglobina, generalmente por unión covalente de grupos poliméricos, como polímeros sintéticos, carbohidratos, proteínas y similares. Generalmente, se prefieren los polímeros sintéticos.

40 Los polímeros sintéticos hidrofílicos apropiados incluyen, entre otros, el óxido de polialquíleno, como el óxido de polietileno ($(CH_2CH_2O)_n$), el óxido de polipropileno ($(CH(CH_3)CH_2O)_n$) o un copolímero de los óxidos polietileno/polipropileno ($(CH_2CH_2O)_n-CH(CH_3)CH_2O)_n$). En el campo médico, se conocen otros polímeros sintéticos de cadena simple, cadena ramificada, y substituidos, que también podrían ser adecuados.

45 Comúnmente, el grupo químico unido a la hemoglobina es el polietilénglicol (PEG), debido a su aceptación farmacológica, y disponibilidad comercial. Los PEGs son polímeros de fórmula química general $H(OCH_2CH_2)_nOH$, donde n es, en general, mayor o igual a 4. Las formulaciones de PEG normalmente están seguidas de un número que corresponde a su peso molecular medio. Por ejemplo, el PEG-200 tiene un peso molecular medio de 200 y su peso molecular puede estar dentro del intervalo de 190-210. Los PEGs normalmente se encuentran disponibles en diferentes formas comerciales, y en muchos casos vienen preactivados, y listos para ser conjugados a proteínas.

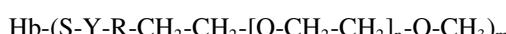
50 Un aspecto importante de las realizaciones preferidas de la presente invención, es que la modificación de la superficie tiene lugar cuando la hemoglobina se encuentra en el estado oxigenado o estado "R". Esto se consigue fácilmente, dejando a la hemoglobina equilibrarse con la atmósfera (o, alternativamente, se puede llevar a cabo una oxigenación activa) antes de la conjugación. Realizando la conjugación con hemoglobina oxigenada, se aumenta la afinidad por oxígeno de la hemoglobina resultante. Este paso generalmente se considera contraindicado, ya que muchos investigadores describen que la desoxigenación antes de la conjugación disminuye la afinidad por el oxígeno. Véase, por ejemplo, patente americana U.S. 5.234.903.

55 Aunque en muchos aspectos, la actuación de las hemoglobinas modificadas en la superficie es independiente de la unión entre la hemoglobina y el modificador (por ejemplo, PEG), se cree que cuanto más rígido sea la unión, como sustituyentes alifáticos o aromáticos C_1 a C_6 , es posible aumentar la producción y/o las características de los conjugados comparado con los que tienen un modo de unión más flexible y por tanto deformable.

60 El número de PEGs que se unen a la molécula de hemoglobina puede variar, dependiendo del tamaño del PEG. Sin embargo, el tamaño molecular de la hemoglobina modificada resultante debe ser lo suficientemente grande para evitar que sea eliminada por los riñones, y que pueda llegar a alcanzar la vida media deseada. Blumenstein y col., determinaron que este tamaño se alcanza por encima del peso molecular de 84.000. (Blumenstein, y col., en *Blood Substitutes ad Plasma Expanders*”, Alan R. Liss, editors, New York, New York, páginas 205-212 (1978)). Los autores conjugaron hemoglobina con dextrano de peso molecular variable. Reportaron que un conjugado de hemoglobina (con

un peso molecular de 64.000) y dextrano (con peso molecular de 20.000) “era retirado lenta e insignificante de la circulación por los riñones”, y que un aumento en el peso molecular por encima de 84.000 no alteraba las curvas de aclaramiento. Por consiguiente, como determinó Blumenstein y col. es preferible que el HBOC tenga un peso molecular de al menos 84.000.

5 En una realización de la presente invención, el HBOC es “MalPEG” que es hemoglobina a la que se ha conjugado PEG activado con maleimida. Este MalPEG podría ser referido posteriormente mediante la fórmula siguiente:



Fórmula 1

donde Hb se refiere a la hemoglobina tetramérica, S es un grupo tiol superficial, Y es el conector succinimida covalente entre la Hb y el Mal-PEG, R es un grupo alquilo, amida, carbamato, o grupo fenilo (dependiendo de la fuente de la materia prima y del procedimiento de síntesis química), $[\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{]}_n$ son las unidades de oxietileno que constituyen 15 la cadena del polímero de PEG, donde n define la longitud del polímero (por ejemplo, PM = 5000), y O-CH₃ es el grupo metoxilo terminal.

Componente Cristaloide

20 En una realización de la presente invención, el substituto de la sangre puede, también consistir en un cristaloide. El componente cristaloide puede ser cualquier cristaloide que, en la composición del substituto de la sangre, sea preferentemente capaz de alcanzar una osmolaridad superior a 800 mOsm/l, es decir, convertir al substituto sanguíneo en “hipertónico”. Ejemplos de cristaloideos apropiados y de sus concentraciones incluyen, por ejemplo, 3% NaCl, 7% NaCl, 7,5% NaCl, y 7,5% NaCl en 6% dextrano. Preferiblemente, el substituto de la sangre tiene una osmolaridad 25 entre 800 y 2400 mOsm/l. Previamente se ha reportado el uso de hemoglobinas recombinantes en disoluciones con osmolaridad entre 300-800 mOsm/l, que constituyen más bien un coloide (es decir, una molécula menos difundible que la dextrosa). Véase por ejemplo, la patente americana No. 5.661.124. Sin embargo, esta patente recomienda producir substitutos de la sangre con osmolaridades superiores a 800, y sugiere que la concentración de hemoglobina debe estar entre 6-12 g/dl. Sin embargo, la eficiencia transportadora de oxígeno de las composiciones de la presente 30 invención, permiten utilizar hemoglobinas a menor concentración, como a 6 g/dl e incluso 4 g/dl. Cuando el substituto de la sangre consiste en un cristaloide y es hipertónico, la composición de la presente invención puede conseguir una recuperación rápida de los parámetros hemodinámicos respecto a otras composiciones substitutas de la sangre, que incluyen los componentes coloidales. La inyección de un pequeño volumen de un cristaloide altamente hipertónico (por ejemplo, 1-10 ml/kg) proporciona beneficios significativos en la recuperación rápida y sostenida de los parámetros 35 hemodinámicos aceptables en una hemorragia controlada. (Véase, por ejemplo, Przybelsky, R. J., E. K. Daily, y M. L. Birnbaum, “The pressor effect of hemoglobin - good or bad?” en Winslow, RM., K. D. Vandegriff, M. Intaglietta, eds. Advances in Blood Substitutes. Industrial Opportunities and Medical Challenges. Boston, Birkhäuser (1997), 71-85). Sin embargo, las disoluciones de cristaloide solas, no reestablecen adecuadamente el transporte de oxígeno cerebral. Véase D. Prough, y col., “Effects of hypertonic saline versus Ringer’s solution on cerebral oxygen transport during 40 resuscitation from hemorrhagic shock”, J. Neurosurg. 64: 627-32 (1986).

Formulación

45 El substituto de la sangre de la presente invención se formula mezclando el transportador de oxígeno y otros excipientes opcionales, con un diluyente adecuado. Aunque la concentración del transportador de oxígeno en el diluyente puede variar dependiendo de la preparación, y en particular, basándose en la dilución esperada tras la administración, en las realizaciones preferidas, debido a las características de otras composiciones de la presente invención, que proporcionan una buena distribución del oxígeno y efectos terapéuticos, normalmente es innecesaria una concentración superior a 6 g/dl, y preferentemente entre 0,1 y 0,4 g/dl.

50 Los diluyentes adecuados (es decir, aquellos farmaceúticamente aceptables para la inyección intravenosa) incluyen, entre otros: proteínas, glicoproteínas, polisacáridos, y otros coloides. No se pretende que estas realizaciones se limiten a un diluyente en particular. Así, se pretende que el diluyente abarque disoluciones acuosas de albúmina libres de células, otros coloides, u otros componentes no transportadores de oxígeno, y que la disolución acuosa tenga una 55 viscosidad de al menos 2,5 cP. En algunas realizaciones preferidas, la viscosidad de la disolución acuosa está entre 2,5 y 4 cP. Se contempla que la presente invención también abarque disoluciones con viscosidad de 6cP o superior.

Aplicaciones

A. Aplicaciones Clínicas

60 Se contempla que la presente invención y sus realizaciones sean útiles en aplicaciones clínicamente indicadas en las que sea necesaria una reposición rápida de los niveles de O₂, un aumento de los niveles de O₂, o un reemplazamiento de los niveles de O₂. Véase por ejemplo, la patente americana U.S. Patent No. 6.054.427. Entre las diferentes situaciones 65 en las que las composiciones de la presente invención encuentran uso se hallan las siguientes:

Trauma. La pérdida aguda de sangre puede resultar en un desplazamiento de fluidos de los espacios intersticiales e intracelulares para reponer dicha pérdida, desviando sangre de los órganos de menor prioridad incluyendo piel e

intestinos. La desviación de la sangre de los órganos, reduce, y a veces elimina, los niveles de O₂ en los mismos, provocando muerte tisular progresiva. Se contempla la reposición rápida de los niveles de O₂ como modo de salvar estos tejidos en pacientes que sufren pérdidas de sangre agudas.

5 Isquemia. En la isquemia, un órgano particular (u órganos) son privados de oxígeno. Como consecuencia de la falta de O₂, pequeñas secciones del órgano, denominadas infartos, comienzan a morir. La reposición rápida de los niveles de O₂ es crítica en la prevención de la formación de infartos en tejidos críticos. Las condiciones que resultan en isquemia, incluyen ataque cardiaco, ictus, o trauma cerebrovascular.

10 Hemodilución: en esta aplicación clínica, se requiere un substituto de la sangre para reemplazar la sangre que es eliminada en el pro-operatorio. Se contempla que se retire sangre del paciente para prevenir la necesidad de transfusión alogénica post-operatoria. En esta aplicación, el substituto de la sangre se administra para reemplazar los niveles de O₂ de la sangre autóloga retirada. Esto permite la utilización de la sangre autóloga reemplazada para transfusiones posiblemente necesarias durante y tras la cirugía. Una de las operaciones que requieren retirar sangre pre-operatoria 15 sería el proceso de bypass cardio-pulmonar.

Choque séptico. En sepsis agudas, muchos pacientes pueden volverse hipertensos a pesar de la intensiva terapia de fluidos y debido al tratamiento con vasoconstrictores. En estos casos, la sobreproducción de óxido nítrico (NO) resulta en la disminución de la presión sanguínea. Por lo tanto, la hemoglobina es un tratamiento ideal para estos pacientes ya 20 que ésta une NO con una avidez paralela a la del O₂.

Cáncer. El aporte de O₂ al centro interno hipóxico de una masa tumoral aumenta su sensibilidad a radioterapia y quimioterapia. Debido a que la microvasculatura de un tumor es diferente a la de otros tejidos, la sensibilización a través de un aumento de los niveles de O₂ requiere descargar el oxígeno al centro hipóxico del tumor. En otras palabras, 25 la P50 debería ser muy baja para prevenir la descarga del oxígeno antes de tiempo, aumentando los niveles de O₂ para asegurar la sensibilización óptima del tumor para los tratamientos de radioterapia o quimioterapia subsecuentes.

Anemia crónica. En estos pacientes, la reposición de la hemoglobina perdida o metabolizada está comprometida o es completamente ausente. Se contempla que los substitutos sanguíneos deben reemplazar efectivamente, o aumentar 30 los niveles de O₂ en los pacientes.

Anemia falciforme. En la anemia falciforme, los pacientes se debilitan por pérdidas en los niveles de O₂ que ocurren durante la deformación del glóbulo rojo, además de por una alta tasa de recambio de glóbulos rojos. La deformación de los glóbulos rojos es función de la PO₂, donde a menor PO₂, mayor es la deformación. Se contempla que el substituto 35 de la sangre ideal re establezca los niveles de O₂ dentro del rango normal durante la crisis.

Cardioplegia. En ciertos procedimientos quirúrgicos cardiacos, se para el corazón mediante las disoluciones de electrolitos adecuadas y reduciendo la temperatura del paciente. La reducción de la temperatura reducirá significativamente la P50, posiblemente previniendo la descarga de oxígeno bajo cualquier condición fisiológica ordinaria. El 40 reemplazamiento de los niveles de O₂ se contempla para reducir el daño potencial de los tejidos y muerte durante tales procesos.

Hipoxia. Los soldados, los moradores en altitud y los deportistas de calidad internacional en condiciones extremas, 45 pueden verse sometidos a niveles de O₂ reducidos debido que la extracción de O₂ del aire en los pulmones es reducida. Esto limita el transporte de O₂. Se contempla que los substitutos de la sangre puedan reemplazar o aumentar los niveles de O₂ en tales individuos.

Perfusión del Órgano. Durante el tiempo que un órgano se mantiene *ex vivo*, mantener el contenido de O₂ es 50 esencial para preservar la integridad estructural y celular y para minimizar la formación de infartos. Se contempla que un substituto de la sangre podría suministrar los requerimientos de O₂ de dicho órgano.

Cultivo Celular. Este requerimiento es virtualmente idéntico al de la perfusión del órgano, excepto que la tasa de consumo de O₂ sería mayor.

55 Hematopoyesis. Se contempla que el substituto sanguíneo sirve como fuente de grupo hemo y hierro para su uso en la síntesis de nueva hemoglobina durante la hematopoyesis.

B. Aplicaciones Veterinarias

60 La presente invención no sólo se puede utilizar en humanos. Las composiciones de la presente invención pueden utilizarse en animales domésticos, como ganado y animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos, caballos, pájaros, reptiles), como también otros animales en acuarios, zoos, parques acuáticos, y otras instalaciones que alberguen animales. Se contempla que la presente invención encuentra utilidad en el tratamiento de emergencia de los animales domésticos y salvajes que sufren una pérdida sanguínea a causa de heridas, anemias hemolíticas, etcétera. Por ejemplo, 65 se contempla que las realizaciones de la presente invención son útiles en casos como anemia infecciosa equina, anemia infecciosa felina, anemia hemolítica debido a agentes químicos o físicos, infección bacteriana, fragmentación del Factor IV, hiperesplenismo y esplenomegalia, síndrome hemorrágico en aves de corral, anemia hipoplásica, ane-

mia aplásica, anemia hemolítica autoinmune idiopática, deficiencia de hierro, anemia hemolítica isoínmune, anemia hemolítica microangiopática, o parasitismo, etc. En particular, la presente invención encuentra uso en áreas donde los donantes de sangre para animales de especies raras y/o exóticas son difíciles de encontrar.

5

Ejemplos

Ejemplo 1

10 *Producción de Hemoglobina libre de estroma*

Paso 1

Obtención de glóbulos rojos en desuso

15 Los glóbulos rojos empaquetados y fecha de uso expirada se obtienen de una fuente comercial, tal como San Diego Blood Bank o la Cruz Roja Americana. Preferentemente, el material expirado no se recibe si tiene más de 45 días tras su recolección. Los glóbulos rojos empaquetados (pRBCs) se almacenan a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta el siguiente procesamiento (1-7 días). Todas las unidades son analizadas por infecciones víricas y sometidas a test de ácidos nucleicos antes de su 20 utilización.

Paso 2

25 *Agrupamiento de la sangre*

30 Los glóbulos rojos empaquetados se agrupan en recipientes esterilizados en una instalación limpia. El volumen de glóbulos rojos empaquetados es anotado y la concentración de hemoglobina se determina utilizando un co-oxímetro comercial u otro método reconocido en el área.

Paso 3

Leucodepleción

35 La leucodepleción (es decir, la eliminación de los glóbulos blancos) se lleva a cabo utilizando membranas de filtración. Se realizan contajes iniciales y finales de leucocitos para seguir la eficiencia de este proceso.

40 *Paso 4*

Separación y lavado de células

45 Los glóbulos rojos se lavan con seis volúmenes de 0,9% de cloruro de sodio. El proceso se lleva a cabo a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$. El lavado de las células se analiza para verificar la eliminación de componentes del plasma mediante un ensayo espectrofotométrico para albúmina.

Paso 5

50 *Lisis de los glóbulos rojos y eliminación de restos celulares*

55 Los glóbulos rojos lavados se lisan al menos durante 4 horas o durante una noche a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ con agitación empleando 6 volúmenes de agua. El lisado se procesa en frío para purificar la hemoglobina. Esto se consigue filtrando el lisado por una membrana de $0,16 \mu\text{m}$. La hemoglobina purificada se recolecta en un recipiente estéril despirogenado. Todos los pasos de este proceso se llevan a cabo a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Paso 6

60 *Eliminación vírica*

La eliminación de virus se lleva a cabo por ultrafiltración a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

65

ES 2 299 686 T3

Paso 7

Concentración y cambio de disolvente

5 La hemoglobina purificada del lisado y la ultrafiltración se intercambia en la solución Lactato de Ringer (RL) o un tampón fosfato salino (PBS, pH 7,4) utilizando una membrana de 10 kD. La hemoglobina se concentra entonces utilizando la misma membrana a una concentración final de 1,1-1,5 mM (tetrámero). Se utilizan de 10 a 12 volúmenes de RL o PBS para el cambio de disolvente. Este proceso se lleva a cabo a $4 \pm 2^\circ\text{C}$. El pH de la disolución preparada en RL se ajusta a 7,0-7,6.

10

Paso 8

Filtración estéril

15 La hemoglobina en PBS o en lactato de Ringer (RL) es filtrada de manera estéril a través de filtros desechables de 0,45 ó 0,2 μm y almacenados a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ antes de llevar a cabo la modificación química.

20 Se conocen otros procedimientos para purificar hemoglobina. Además, normalmente es innecesario el empleo de un agente reductor (por ejemplo, glutatión u otro agente reductor que contenga el grupo tiol) para prevenir la auto-oxidación tras la lisis celular.

Ejemplo 2

Modificación de la Hemoglobina Libre de Estroma

Paso 1

Tiolación

La tiolación se lleva a cabo usando un exceso molar de 10 veces de iminotiolano respecto a la hemoglobina durante 4 horas a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ con agitación continua.

35 Condiciones de la reacción:

- Hemoglobina (tetrámero) 1 mM en RL (pH 7,0-7,5) o PBS (pH 7,4)
- Iminotiolano 10 mM en RL (pH 7,0-7,5) o PBS (pH 7,4)

40 El cociente 1:10 SFH:iminotiolano y el tiempo de reacción se optimizaron para maximizar el número de grupos PEG-tiol y minimizar la heterogeneidad del producto.

45 Paso 2

PEGlicolación de la hemoglobina tiolada

50 La hemoglobina tiolada reacciona con PEG utilizando 20 veces de exceso molar de Mal-PEG (con un grupo de unión alquilo o fenilo) basado en la concentración inicial de hemoglobina tetramérica. La hemoglobina primero se equilibra con la atmósfera para oxigenarla. La reacción se lleva a cabo durante 2 horas a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ con agitación continua.

55 Condiciones de la reacción:

- hemoglobina tiolada 1 mM en RL o PBS (pH 7,4)
- Mal-PEG 20 mM en RL o PBS (pH 7,4)

60 Paso 3

Eliminación del exceso de reactivos

65 La hemoglobina-PEGlicolada se procesa a través de una membrana de 70 kD para quitar el exceso de reactivos o de hemoglobina sin reaccionar. Para asegurarla la eliminación de los reactivos se lleva a cabo una filtración de 20 volúmenes, que es seguida mediante cromatografía de exclusión por tamaño a 540 nm y 280 nm. La concentración de proteína se diluye a 4 g/dl. El pH se ajusta a $7,3 \pm 0,3$ utilizando NaOH 1N.

ES 2 299 686 T3

50 Paso 4

Filtración estéril

5 El producto final MalPEG-Hb se filtra de modo estéril utilizando una cápsula estéril de 0,2 μm desechable y se recoge en un recipiente estéril despirogenado a $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

55 Paso 5

Formulación de Mal-PEG-Hb

10 La Hb-PEG se diluye a 4 g/dl en RL, ajustando el pH a $7,4 \pm 0,2$.

15 Paso 6

Llenado estéril

20 La composición substituta de la sangre final se filtra de manera estéril (0,2 μm) y se alícuota por peso en viales estériles de vidrio, cerrados con tapones estériles de goma y sellados en una campana de flujo laminar y se almacenan a -80°C hasta su uso.

25 Ejemplo 3

Análisis fisicoquímico de MalPEG-Hb

Metodología para el Análisis Fisicoquímico

30 La homogeneidad y el tamaño molecular del substituto de la sangre MalPEG-Hb se caracterizan mediante Cromatografía Líquida (LC). La LC analítica se emplea para evaluar la homogeneidad de la hemoglobina-PEG y seguir con la eliminación del Mal-PEG no unido. Se utiliza la absorbancia a 540 nm para evaluar la hemoglobina y separarla de la que no ha reaccionado con el PEG según la posición del pico. La absorbancia a 280 nm se utiliza para separar la 35 Hb-PEG del Mal-PEG libre, que absorbe en el ultravioleta (UV) debido a los anillos que contiene.

40 Los espectros ópticos son recogidos utilizando un espectrofotómetro de dispositivos de fotodiodos de barrido rápido (Milton Roy 2000 o Hewlett Packard Model 8453) en las regiones de Soret y visible, que analiza la concentración de hemoglobina y el porcentaje de metemoglobina por análisis multicomponente (K. D. Vandegriff, R. E. Shrager. Evaluation of oxygen equilibrium binding to hemoglobin by rapid-scanning spectrophotometry and singular value decomposition. *Meth. Enzymol.* 232: 460-485 (1994)).

45 La concentración de MalPEG-Hb y el porcentaje de metemoglobina se determinan utilizando un cooxímetro. La viscosidad se determina utilizando un Rheometro. La Presión Osmótica Coloide se determina empleando un osmómetro coloidal. Los parámetros de unión de oxígeno se determinan a partir de las curvas de equilibrio del oxígeno.

Las especificaciones preferidas para las composiciones substitutas de la sangre se presentan en la Tabla 1 abajo:

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

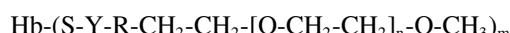
ES 2 299 686 T3

TABLA 1

Ensayo	Especificación
Concentración de hemoglobina (g/dL)	4,2 ± 0,2
Metemoglobina (%)	< 10
pH	7,4 ± 4
Conductividad (mS/cm)	12 ± 4
Endotoxinas (EU/mL)	< 0,5
Tiempo de retención FPLC (min)	43 ± 3
Anchura de pico a media altura FPLC (min)	6 ± 2
Viscosidad (cPs)	2,5 ± 1,0
COP (mmHg) (Pa)	50 ± 20 (6666 ± 2666)
P50 (Torr) (Pa)	6 ± 2 (800 ± 267)
Número de Hill (a P50)	1,2 ± 0,5
Esterilidad	Aprobado

Número de sitios PEG-glicolados en MalPEG-Hb

Para la modificación de la superficie, el número "m" en la Fórmula I es el parámetro que define el número de polímeros de PEG unidos a la superficie de la hemoglobina.



Fórmula I

Para determinar este número, se utiliza el ensayo colorimétrico de ditiopiridina (Ampulski R., Ayers V., Morell S. Determination of the reactive sulphydryl groups in heme proteins with 4, 4'-dipyridinedisulfide. Biochem Biophys Acta 163-169, 1969). Este método se utiliza para cuantificar el número de grupos tiol disponibles en la superficie de la Hb tetramérica antes y después de la tiolación, y luego también tras la PEG-glicolación. La hemoglobina humana contiene 2 grupos tiol reactivos intrínsecos en los residuos β 93Cys, confirmados por la reacción con ditiopiridina. Tras la tiolación de SFH en un a tasa de 1:10 SFH:iminotiolano, el número de grupos tiol reactivos aumenta de 2 a 6 tiolos según la reacción de ditiopiridina. Tras la reacción de PEG-glicosidación, el número de grupos tiol reactivos disminuye a 1,3. Esto indica que hay 4-5 sitios de PEG-glicosidación en la MalPEG-Hb.

Análisis por cromatografía de exclusión por tamaño de MalPEG-Hb frente a SFH

La FPLC se lleva a cabo para analizar el producto final, MalPEG-Hb. Los cromatogramas típicos se muestran en la Figura 1 para MalPEG-Hb comparada con la SFH sin modificar. El tiempo de retención para SFH es de aproximadamente 57 min. El tiempo de retención para MalPEG-Hb es de aproximadamente 44 min.

Características físicas y químicas de MalPEG-Hb

Las propiedades físicas de MalPEG-Hb comparadas con la sangre y la hemoglobina humana sin modificar (SFH) se muestran en la Tabla 2 abajo.

60

65

ES 2 299 686 T3

TABLA 2

		Sangre	SFH	MalPEG-Hb
5	P50 (Torr) (Pa)	28 (3733)	15 (2000)	5 (667)
10	N50 (Número de Hill)	2,9	2,9	1,2
15	Efecto Bohr (ΔLog P50/ ΔpH)	-	-0,46	-0,20
20	Viscosidad (cps) ¹	4,0	0,9	2,5
25	COP (mm Hg) ¹ (Pa)	27 (3600)	16 (2133)	50 (6666)
30	MW (kD) ²	N/A	65	90
35	Radio Molecular (nm)	4000	3,2 ²	9

¹Determinado a 15 g/dl para la sangre y a aproximadamente 4 g/dl para las disoluciones de hemoglobina

²Determinado por medidas de COP y FPLC

Afinidad por oxígeno

Las curvas de unión en equilibrio de hemoglobina-oxígeno fueron medidas tal como se describió previamente (Vandegriff K. D., Rohlf R. K., Magde M. D., Winslow R. M. Hemoglobin oxygen equilibrium curves measured during enzymatic oxygen consumption. *Anal. Biochem.* 256: 107-116, 1998). La MalPEG-Hb muestra una alta afinidad por el oxígeno (P50 = 5 mm Hg) (666 Pa) y baja cooperatividad (n50 = 1,0-1,4). La figura 2 muestra las curvas representativas que comparan la hemoglobina libre de estroma (SFH) y las soluciones de MalPEG-Hb.

Viscosidad

Esta propiedad de la solución de MalPEG-Hb es debida a la fuerte interacción entre las cadenas de polietilénglico y las moléculas de agua del disolvente. Se piensa que es un buen atributo para un substituto de la sangre por dos razones: 1) una mayor viscosidad disminuye la constante de difusión tanto de la molécula de PEG-Hb como de los ligandos gaseoso que se difunden por el disolvente, y 2) una mayor viscosidad aumenta la tensión de la solución que fluye contra la pared endotelial, provocando la liberación de vasodilatadores que contrarrestan la vasoconstricción. Como se muestra en la Tabla 2, la viscosidad de la MalPEG-Hb es de 2,5 cPs.

Presión Osmótica Coloidal (COP)

La COP de las disoluciones de hemoglobina que contienen hemoglobina sin modificar, entrecruzada intra- e intermolecularmente, o conjugada con PEG en la superficie se han medido para determinar sus propiedades macromoleculares en disolución (Vandegriff K. D., Rohlf R. J., Winslow R. M. Colloid osmotic effects of hemoglobin-based oxygen carriers. Winslow R. M., Vandegriff K. D., Intaglia M., eds, *Advances in Blood Substitutes Industrial Opportunities and Medical Challenges*. Boston, Birkhauser, pp. 207-232 (1997). Las hemoglobinas tetraméricas muestran un comportamiento cercano al ideal en disolución, mientras que las hemoglobinas conjugadas a PEG tienen una actividad osmótica coloidal significativamente mayor y se comportan en disolución de forma no ideal (Vandegriff K. D., Rohlf R. J. y Winslow R. M. Colloid osmotic properties of modified hemoglobins: chemically cross-linked versus polyethilene glycol surface-conjugated. *Biophys. Chem.* 69:23-30 (1997). Como se muestra en la Tabla 2, la COP de la disolución MalPEG-Hb es DE 50 mm Hg (6666 Pa).

Estabilidad

La estabilidad de las disoluciones de hemoglobina que contienen hemoglobina conjugada con PEG en la superficie, se ha determinado examinando el cociente de auto-oxidación. A temperatura ambiente, la auto-oxidación de la MalPEG-Hb aumentó desde aproximadamente 5% MetHb a 5,5% MetHb en 10 horas como muestra la figura 5. El cociente de auto-oxidación para la MalPEG-Hb fue de 0,05% por hora.

Ejemplo 4

Comparación de Hemoglobinas Modificadas con Diferentes P50s

5 El papel de la afinidad por el oxígeno en la eficacia de la hemoglobina libre de células utilizando hemoglobina modificada por conjugación con polioxietileno (POE) es de particular interés en el estudio de la eficacia de tales materiales como substitutos de la sangre. Esta modificación, descrita primero por Iwashita y coautores (Ajisaka K. y Iwashita Y. "Modification of human hemoglobin with polyethylene glycol: A new candidate for blood substitutes", Biochem Biophys Res Comm 97:1076-1081 (1980)), mantiene un efecto hipertensivo, y se ha encontrado útil en el
10 tratamiento del choque séptico. Como parte de la preparación de este producto, la hemoglobina se hizo reaccionar con piridoxal-5-fosfato (PLP) para alcanzar su P50, cercana al valor de la sangre humana. Así, fue posible preparar dos soluciones de hemoglobina modificada con POE, una con y otra sin modificación previa con PLP. Estas disoluciones son idénticas en todos los sentidos excepto por su P50, y su habilidad para desarrollar funciones fisiológicas en ratas fue probada durante hemorragia severa (60%).
15

Materiales y Métodos

Substitutos de la Sangre

20 Las disoluciones de hemoglobina modificada, con o sin modificación con PLP para formar "PHP" se prepararon tal como se describió más arriba en el Ejemplo 1.

Animales

25 Para este estudio se utilizaron ratas Sprague-Dawley. Las presiones sistólicas y diastólicas se controlaron durante el estudio; las presiones máximas y mínimas, respectivamente, y la presión arterial media (MAP) era diastólica + 1/3 presión (sistólica-diastólica). La dP/dt fue calculada de la máxima pendiente positiva para cada ciclo de presión. Los valores medios del ritmo cardíaco, sistólico, diastólico, presiones medias arteriales, presión de pulso y dP/dt fueron promediados para cada minuto.
30

Medidas de gases, hematológicas y de lactato en sangre

35 El pH arterial, la PCO₂ y PO₂ fueron medidas en un analizador de gases en sangre utilizando 100 µl de muestras de sangre heparinizada. El ácido láctico fue medido en sangre arterial utilizando un Analizador de Lactato. El CO₂ total, el bicarbonato estándar (HCO₃⁻) y el exceso de bases (BE) se calcularon de la PCO₂, el pH y la concentración de hemoglobina se calcularon usando los algoritmos descritos previamente (Winslow R., "A model for red cell O₂ uptake". Int. J. Clin. Monit. Comput. 2:81-93 (1985)). La hemoglobina total y la hemoglobina en plasma, fueron medidas utilizando equipos disponibles comercialmente: el hematocrito fue medido utilizando aproximadamente 50 µl de muestra de sangre arterial mediante microcentrifugación.
40

Transfusión de intercambio

45 La transfusión de intercambio fue llevada a cabo a una tasa de 0,5 ml/min aproximadamente hasta un volumen total que igualaba el 50% del volumen de sangre estimado. Se asumió un volumen de sangre de 65 ml/kg. La bomba peristáltica operaba de modo que la sangre se retiraba exactamente a la misma velocidad que se infundía el material de prueba. Las disoluciones de prueba fueron calentadas a 37°C en un baño de agua antes de su infusión y mantenidas calientes durante la misma.

Hemorragia

50 El protocolo de hemorragia que seguimos está basado en el método de Hannon y Wade (Hannon J., Wade C., Bossone C., Hunt M. Coppes R., Loveday J., "Blood gas and acid-base status of conscious pigs subjected to fixed-volume hemorrhage and resuscitated with hypertonic Salixtran", Circ Shock 32: 19-29 (1990)). La hemorragia se comenzó aproximadamente 3 minutos después de la finalización de la transfusión de intercambio bombeando fuera la sangre arterial de la arteria femoral a una velocidad de 0,5 ml/min para eliminar el 60% del volumen sanguíneo al final de 60 minutos. Cada 10 minutos se tomaron muestras de sangre (0,3 ml) para los análisis hematológicos y de gas en sangre.
55

Estadísticas y análisis de supervivencia

60 Para los análisis de supervivencia, los animales fueron observados durante un mínimo de 120 minutos tras el inicio de la hemorragia. Los datos fueron agrupados en intervalos de 10 minutos, y para cada intervalo se calculó la proporción acumulada de animales vivos y su error estándar.
65

*Resultados**Propiedades de la disolución*

5 Las disoluciones utilizadas se describen abajo en la Tabla 3. La concentración de hemoglobina total, la viscosidad y la presión osmótica coloidal (COP) son parecidas. La P50 de la PHP (19,7 Torr) (2626 Pa) era mayor que la de POE (12,2 Torr) (1626 Pa). El grado de cooperatividad (el parámetro de Hill, n) fue equivalente para las dos soluciones. Los patrones de FPLC para las dos soluciones se dan en la Figura 3. Mientras que hay un pico pequeño en cada uno, que
 10 corresponde a la hemoglobina sin modificar, la mayor parte de la hemoglobina aparece en un conjunto heterogéneo de picos que se eluyen significativamente antes que la hemoglobina sin modificar (SFH). Los patrones para las dos hemoglobinas modificadas con PEG fueron cualitativamente similares.

TABLA 3

15

Tabla 1. Propiedades de las disoluciones probadas		
	PHP	POE
20 Hb, g/dl	8,0	8,3
Viscosidad (cP)	2,8	2,8
25 COP, mmHg (Pa)	62,7 (8359)	56,5 (7532)
	*a ₁ ($\times 10^{-1}$)	2,228
	*a ₂ ($\times 10^{-3}$)	21,070
30		46,500
	*a ₃ ($\times 10^{-5}$)	
	*a ₄ ($\times 10^{-5}$)	8,766
35 P50 (Torr) (Pa)	19,7 (2626 Pa)	12,2 (1626 Pa)
N50	1,48	1,49

*Afinidad por el oxígeno medida a 37°C, pH 7,4

40

La afinidad por oxígeno de la POE era significativamente mayor que la de PHP (Figura 4). Ningún producto, sin embargo, muestra cooperatividad significativa.

45

Experimentos con Animales

Todos los experimentos se resumen en la Tabla 4. Hubo más animales que recibieron PHP (18) que POE (11), y el peso medio de los animales PHP fue significativamente superior al del grupo POE ($P<0,001$). Sin embargo, esta diferencia en el peso fue tenida en cuenta para calcular el grado de hemorragia, asumiendo un volumen total de sangre de 65 ml/kg. Por tanto, los volúmenes consecuentes para la transfusión de intercambio y la hemorragia fueron también diferentes. No obstante, el tiempo medio de muerte era significativamente más corto para los animales con PHP (93 minutos) comparado con los animales POE (116 minutos). Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($P<0,02$). Si los animales sobrevivían el periodo de observación, 120 min después de comenzar la hemorragia, éstos se consideraban "censurados" para la finalidad del análisis de supervivencia de Kaplan-Meier (Figura 5).

55

60

65

ES 2 299 686 T3

TABLA 4

5	WT	(g)	*Volumen	Volumen	Volumen	Tiempo de
			Sangre	Hemorragia	Hemorragia	Muerte
10	PHP	n	18	18	18	18
	PHP	291	18,89	11,10	58,79	93
	sd	24	1,59	0,90	0,35	29
15	POE	n	11	11	11	11
	POE	334	21,74	12,78	58,77	116
20	sd	41	2,65	1,60	0,39	12
	P	0,001	0,001	0,001	0,915	0,020

*Basado en 65 ml/Kg de volumen total de sangre

Hematología y regulación ácido-base

Las cuantificaciones del nivel basal y de post-ET y post-hemorragia (60 minutos) se muestran en la tabla 5. El hematocrito medio fue ligeramente superior en los animales POE comparado con los PHP, pero tras la transfusión de intercambio los valores fueron idénticos en los dos grupos. Al final del periodo de hemorragia, el hematocrito medio en los animales POE fue otra vez ligeramente superior que en los PHP. Diferencias similares se hallaron en los valores de hemoglobina total, con los valores de animales POE siendo ligeramente superiores en todos los puntos muestreados. La hemoglobina en plasma no fue diferente en los dos grupos, pero aumentó ligeramente en los animales POE tras el periodo de intercambio.

La concentración de ácido láctico arterial fue significativamente mayor en los animales POE comparado con los PHP en todos los pasos del estudio. Los valores de exceso de bases no fueron significativamente diferentes entre los dos grupos, aunque sugieren que los valores son menores en los animales PHP comparados con el grupo POE. Además, la diferencia entre los valores basales para los animales PHP (10,24 mEq/l) es mayor que para los animales POE (7,01 mEq/l).

TABLA 5

		n	PHP	sem	n	POE	sem	P	
50	HCT	Nivel basal	17	39,80	0,57	10	43,15	0,23	0,0032
		Post ET	17	17,89	0,43	10	19,25	0,62	0,3568
		60 min	15	13,29	0,47	10	15,85	0,14	0,0015
55	HB	Nivel basal	17	13,59	0,22	10	15,08	0,17	0,0057
		Post ET	17	8,70	0,18	10	9,74	0,07	0,0007

60

65

		60 min	15	6,34	0,21	10	7,38	0,06	0,0016
5	PLHB	Nivel basal	16	0,00	0,00	10	0,00	0,00	
		Post ET	16	2,86	0,07	10	2,99	0,09	0,6785
		60 min	15	1,93	0,07	10	2,47	0,02	0,0001
10	- LACT	Nivel basal	9	0,70	0,06	7	2,68	0,16	0,0001
		Post ET	9	1,59	0,10	7	4,21	0,24	0,0004
		60 min	9	10,62	0,89	7	17,27	1,18	0,0360
15	BE	Nivel basal	17	6,22	1,28	9	5,41	0,08	0,6530
		Post ET	17	6,20	1,41	5	5,60	0,13	0,8101
		60 min	15	-4,02	1,60	6	-1,60	0,53	0,4678

25

Presión arterial media durante la transfusión de intercambio

La presión arterial media durante la transfusión de intercambio se muestra en la Figura 6. El nivel basal de las presiones arteriales medias son indistinguibles en los dos grupos. Sin embargo, la respuesta de la presión sanguínea a la infusión de PEG-hemoglobina es significativamente diferente entre los dos grupos. El aumento inicial en la MAP es mayor en los animales PHP comparada con los POE, y se mantiene durante el periodo de infusión. En contraste, la MAP en los animales POE retorna al nivel basal al final de la infusión.

30 Al inicio de la hemorragia, la caída en la MAP es inmediata en los animales PHP y se retrasa en el grupo POE. Además, la MAP se mantiene en o cerca de los valores basales durante toda la hemorragia y después para el grupo POE, mientras que la MAP nunca retorna a los valores basales en los animales PHP. Especialmente en los animales PHP, la dispersión en los datos, como se indica con el aumento de los errores estándar, aumenta con el tiempo a medida que los animales quedan fuera del grupo PHP.

40 Discusión

En este estudio, estudiamos 2 soluciones de hemoglobina modificadas (substitutos de la sangre) estrechamente relacionadas, con respecto a su capacidad para proteger ratas de una hemorragia severa (60%). Para probar esta capacidad, los animales recibieron primero un 50% (de volumen de sangre) por transfusión de intercambio con una de las dos soluciones de prueba. Las soluciones diferían sólo en su afinidad por el oxígeno, y se parecían en sus patrones FPLC, presiones oncóticas, viscosidad y concentración. Otros estudios que intentaron mostrar los efectos de variables específicas en las respuestas fisiológicas no han sido capaces de presentar ambas soluciones tan bien correlacionadas. Véase, por ejemplo, Sakai H., Hara H., Tsai A. G., Tsuchida E., Johnson P. C., Intaglietta M., "Changes in resistance vessels during hemorrhagic shock and resuscitation in conscious hamster model", Am. J. Physiol 276(45), H563-H571. (1999), Sakai H., Hara H., Yuasa M., Tsai A., Takeoka S., Tsuchida E., Intaglietta M. "Molecular dimensions of Hb-based O₂ carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension", Am. J. Physiol 279: H908-H915, (2000). Estos experimentos representan el primer ejemplo en el que soluciones tan parecidas pueden ser comparadas con una sola variable, P50, siendo significativamente diferentes.

55 El grupo de animales que recibieron POE presentaron diferencias ligeras pero significativas: mayor hematocrito y niveles superiores de hemoglobina total y en plasma. Sin embargo, es poco probable que estas diferencias puedan explicar los resultados o interpretaciones de los experimentos. Claramente, las dos soluciones afectan a la presión sanguínea de manera diferente, como muestra la figura 4. En el momento de la infusión, el efecto sobre la presión debe ser función de las propiedades de la solución infundida, no del animal receptor. La respuesta de la presión sanguínea es mayor y se mantiene en los animales PHP comparados con los POE.

60 La supervivencia de los animales no está claramente relacionada con el efecto vasopresor de la solución de hemoglobina, como ha sido sugerido por algunos investigadores en el pasado, porque la supervivencia (y supuestamente un déficit basal inferior) es mejor en los animales POE comparados con los PHP, en los que los efectos de la presión sanguínea son menores y sólo transitorios. Véase Przybelsky R. J., Daily E. K., Birnbaum M. L., "The pressor effect of hemoglobin - good or bad?" en Winslow, R. M., Vandegriff K. D., Intaglietta M., eds. *Advances in Blood Substitutes. Industrial opportunities and Medical Challenges*. Boston, Birkhäuser (1997), 71-85.

En conjunto, estos resultados respaldan la hipótesis que una menor P50 es beneficiosa para el uso de hemoglobina libre de células como transportador de oxígeno. La hipótesis se basa en 2 conceptos. Primero, que el gradiente de difusión para la hemoglobina libre de células es una función del gradiente de oxihemoglobina entre la fuente de oxígeno, el glóbulo rojo, y la pared vascular. Este gradiente, en cambio, es dependiente de la forma y posición de la curva de equilibrio del oxígeno (McCarthy M. R., Vandegriff K. D., Winslow, R. M., "The role of facilitated diffusion in oxygen transport by cell-free hemoglobin: Implications for the design of hemoglobin-based oxygen carriers", Biophysical Chemistry 92: 103-117 (2001)). Segundo, esta consideración lleva a la segunda base de nuestra hipótesis, que una afinidad alta por el oxígeno (baja P50) de hecho "esconde" el O₂ de la circulación hasta que la molécula de hemoglobina llega a las regiones de la circulación en la que la PO₂ es muy baja, tal como en isquemias y tejidos hipóxicos.

Ejemplo 5

15 *Estabilidad de la MalPEG-Hb*

El propósito de este estudio fue determinar la estabilidad de la MalPEG-Hb durante la simulación de condiciones de almacenamiento y manipulación de las muestras en ensayo clínico de Fase I. Se valoró la estabilidad durante tres etapas de manipulación. La etapa I correspondía a la transición de la condición de congelación en el lugar de almacenamiento a las condiciones de temperatura durante el transporte a la instalación clínica (estudio de almacenamiento bajo congelación). La Etapa II correspondía con el descongelamiento de la MalPEG-Hb durante 24 horas a +4°C y su posterior almacenamiento a +4°C durante 5 días (estudio de refrigeración). La etapa III correspondía con la descongelación de la MalPEG-Hb durante 24 horas a +4°C y su posterior almacenamiento a temperatura ambiente durante varios días antes de la administración al paciente (estudio a temperatura ambiente).

25

Procedimientos Experimentales

La estabilidad se definió como el cociente de oxidación del material test MalPEG-Hb. El porcentaje de metemoglobina en la muestra fue medido utilizando un cooxímetro (IL Co-oximetry 682). Las medidas se hicieron por duplicado en cada punto de acuerdo con el protocolo.

La temperatura se siguió con un termómetro o con registradores gráficos de la temperatura. El estudio de almacenamiento bajo congelación se llevó a cabo en un rango de temperatura de -21,0 ± 3,0°C. El estudio de refrigeración se llevó a cabo en un rango de temperatura de +4,0 ± 0,2°C. El estudio a temperatura ambiente se hizo en un intervalo de temperatura de +21 ± 1,0°C.

La temperatura, la hemoglobina total, y el porcentaje de metemoglobina fueron registradas a cada uno de los puntos indicados. En los estudios de congelación y refrigeración, las medidas se tomaron a tiempo cero (completamente descongelado), tras una hora, y luego cada 24 horas durante cinco días. En el estudio a temperatura ambiente, las medidas se tomaron a tiempo cero (completamente descongelado) y después cada hora durante diez horas.

Resultados

45

La MalPEG-Hb no mostró ningún cambio en el porcentaje de metemoglobina durante su almacenamiento de 6 días a -20°C como muestra la Figura 8. Igualmente, la MalPEG-Hb no mostró ningún cambio en el porcentaje de metemoglobina durante su almacenamiento de 5 días a +4°C, como muestra la Figura 9. Durante el almacenamiento a temperatura ambiente, la MalPEG-Hb mostró menos de un 1% de aumento de metemoglobina en un periodo de 10 horas, como muestra la Figura 10.

Referencias citadas en la descripción

55 Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. Ésta no forma parte de ningún documento de patente europea. Aunque se ha tenido mucho cuidado en recopilar las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO renuncia a cualquier responsabilidad al respecto.

Documentos de Patentes citados en la descripción

60

- US 4001401 A, Bonson [0005]
- US 4061736 A, Morris [0005] [0014] [0093]
- US 5296465 A, Rausch [0010]
- US 6054427 A [0015] [0098] [0099] [0117]

- WO 2003059286 A [0017]
- WO 2003059287 A [0018]
- 5 • WO 2004058291 A [0019]
- US 4857636 A, Hsia [0093]
- 10 • US 4600531 A, Walder [0093]
- US 3925344 A, Mazur [0093]
- US 4529719 A [0093]
- 15 • US 4473496 A, Scannon [0093]
- US 4584130 A, Bocci [0093]
- US 5250665 A, Kluger [0093]
- 20 • US 5028588 A, Hoffman [0093]
- US 4826811 A [0093]
- 25 • US 5194590 A, Sehgal [0093]
- US 5661124 A [0099] [0113]
- US 5234903 A [0107]

30

Literatura no relativa a patentes citada en esta descripción

- Human Physiology And Mechanisms Of Disease. A. C. **GUYTON**. Human Physiology And Mechanisms Of Disease. W. B. Saunders Co, 1982, 228-229 [0003]
- 35 • **AJISAKA** y col.. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1980, vol. 97 (3), 1076-1081 [0013]
- **WINSLOW** y col.. *J. Biol. Chem.*, 1977, vol. 252 (7), 2331-37 [0072]
- 40 • **VANDEGRIFF; SHRAGER** y col.. *Methods in Enzymology*. 1994, vol. 232, 460 [0072]
- **WINSLOW** y col.. *Advances in Blood Substitutes*. 1997, 167-188 [0086]
- 45 • **AMBERSON**, W. Clinical experience with hemoglobin-saline solutions. *Science*, 1947, vol. 106, 117-117 [0088]
- **KEIPERT, P; A. GONZALES; C. GOMEZ; V. MACDONALD; J. HESS; R. WINSLOW**. Acute changes in systemic blood pressure and urine output of conscious rats following exchange transfusion with diaspirin-crosslinked hemoglobin solution. *Transfusion*, 1993, vol. 33, 701-708 [0088]
- 50 • **HESS, J; V. MACDONALD; A. MUMAY; V. COPPES; C. GOMEZ**. Pulmonary and systemic hypertension after hemoglobin administration. *Blood*, 1991, vol. 78, 356A [0088]
- **WINSLOW, R. M.** aa-Crosslinked hemoglobin: Was failure predicted by preclinical testing?. *Vox sang*, 2000, vol. 79, 1-20 [0088]
- 55 • **DOHERTY, D. H; M. P. DOYLE; S. R. CURRY; R. J. VALI; T. J. FATTOR; J. S. OLSON; D. D. LEMON**. Rate of reaction with nitric oxide determines the hypertensive effect of cell-free hemoglobin. *Nature Biotechnology*, 1998, vol. 16, 672-676 [0089]
- 60 • **LEMON, D. D; D. H. DOHERTY; S. R. CURRY; A. J. MATHEWS; M. P. DOYLE; T. J. FATTOR; J. S. OLSON**. Control of the nitric oxide-scavenging activity of hemoglobin. *Art Cells, Blood Subs., and Immob. Biotech*, 1996, vol. 24, 378 [0089]
- 65 • **ROHLFS, R. J; E. BRUNER; A. CHIU; A. GONZALES; M. L. GONZALES; D. MAGDE; M. D. MAGDE; K. D. VANDEGRIFF; R. M. WINSLOW**. Arterial blood pressure responses to cell-free hemoglobin solutions and the reaction with nitric oxide. *J Biol Chem*, 1998, vol. 273, 12128-12134 [0089]

- WINSLOW, R. M; A. GONZALES; M. GONZALES; M. MAGDE; M. MCCARTHY; R. J. ROHLFS; K. D. VANDEGRIFF. Vascular resistance and the efficacy of red cell substitutes. *J Appl Physiol*, 1998, vol. 85, 993-1003 [0089]
- 5 • MCCARTHY; M. R; K. D. VANDEGRIFF; R. M. WINSLOW. The role of facilitated diffusion in oxygen transport by cell-free hemoglobin: Implications for the design of hemoglobin-based oxygen carriers. *Biophysical Chemistry*, 2001, vol. 92, 103-117 [0090]
- 10 • LINDBOM, L; R. TUMA; K. ARFORSS. Influence of oxygen on perfusion capillary density and capillary red cell velocity in rabbit skeletal muscle. *Microvasc Res*, 1980, vol. 19, 197-208 [0091]
- 15 • INTAGLIETTA, M; P. JOHNSON; R. WINSLOW. Microvascular and tissue oxygen distribution. *Cardiovasc Res*, 1996, vol. 32, 632-643 [0091]
- 20 • LIEBHABER y col.. *P.N.A.S.*, 1980, vol. 77, 7054-7058 [0092]
- MAROTTA y col.. *J. Biol. Chem.*, 1977, vol. 353, 5040-5053 [0092]
- 25 • NAGAI y col.. *P.N.A.S.*, 1985, vol. 82, 7252-7255 [0092]
- 30 • J.G. MCLEAN; I.M. LEWIS. *Research in Vet. Sci.*, 1975, vol. 19, 259-262 [0095]
- M. MELLEGRINI y col.. *Eur. J. Biochem.*, 2001, vol. 268, 3313-3320 [0096]
- 35 • WINSLOW y col.. *Advances in Blood Substitutes*. 1997, 167 [0098]
- VANDEGRIFF, K. D y col.. *Blood Substitutes, Physiological Basis of Efficacy*. 1995, 105-130 [0100]
- 40 • BLUMENSTEIN y col.. *Blood Substitutes and Plasma Expanders*. Alan R. Liss, 1978, 205-212 [0109]
- 30 • The pressor effect of hemoglobin – good or bad?. PRZYBELSKI, R. J; E. K. DAILY; M. L. BIRNBAUM. Advances in Blood Substitutes. *Industrial Opportunities and Medical Challenges*. 1997, 71-85 [0113]
- 45 • D. PROUGH y col.. Effects of hypertonic saline véasesus Ringer's solution on cerebral oxygen transport during resuscitation from hemorrhagic shock. *J. Neurosurg*, 1986, vol. 64, 627-32 [0113]
- VANDEGRIFF, K.D; R.E., SHRAGER. Evaluation of oxygen equilibrium binding to hemoglobin by rapid-scanning spectrophotometry and singular value decomposition. *Meth. Enzymol*, 1994, vol. 232, 460-485 [0151]
- 50 • AMPULSKI, R; V. AYERS; S. MORELL. Determination of the reactive sulphydryl groups in heme proteins with 4, 4'-dipyridinesdisulde. *Biochem Biophys. Acta*, 1969, 163-169 [0155]
- 55 • VANDEGRIFF, K. D; R. K. ROHLFS; M.D. MAGDE; R M. WINSLOW. Hemoglobinoxygen equilibrium cures measured during enzymatic oxygen consumption. *Anal. Biochem.*, 1998, vol. 256, 107-116 [0158]
- 45 • VANDEGRIFF, K.D; R.J. ROHLFS; R. M. WISLOW. Colloid osmotic effects of hemoglobin-based oxygen carriers. *Advances in Blood Substitutes Industrial Opportunities and Medical Challenges*, 1997, 207-232 [0160]
- 50 • VANDEGRIFF, K.D; M. MCARTHY; R.J. ROHLS; R.M. WINSLOW. Colloid osmotic properties of modified hemoglobins: chemically cross-linked véasesus polyethylene glycol surface-conjugated. *Biophys. Chem*, 1997, vol. 69, 23-30 [0160]
- 55 • AJISAKA, K; Y. IWASHITA. Modification of human hemoglobin with polyethylene glycol: A new candidate for blood substitute. *BBRC*, 1980, vol. 97, 1076-1081 [0162]
- 60 • IWASAKI, K; K. AJISAKA; Y. IWASHITA. Modification of human hemoglobin with polyoxyethylene glycol: A new candidate for blood substitutes. *Biochem Biophys Res Comm*, 1980, vol. 97, 1076-1981 [0162]
- WINSLOW, R. A model for red cell O. *Int J Clin Monit Comput*, 1985, vol. 2, 81-93 [0166]
- 65 • HANNON, J; C. WADE; C. BOSSONE; M. HUNT; R. COPPES; J. LOVEDAY. Blood gas and acid-base status of conscious pigs subjected to fixed-volume hemorrhage and resuscitated with hypertonic sali dextran. *Circ Shock*, 1990, vol. 32, 19-29 [0168]
- SAKAI, H; HARA, H; TSAI, A. G; TSUCHIDA, E; JOHNSON, P. C; INTAGLIETTA, M. Changes in resistance vessels during hemorrhagic shock and resuscitation in conscious hamster model. *Am J. Physiol*, 1999, vol. 276 (45), H563-H571 [0177]

ES 2 299 686 T3

- SAKAI, H; H. HARA; M. YUASA; A. TSAI; S. TAKEOKA; E. TSUCHIDA; M. INTAGLIETTA. Molecular dimensions of Hb-based O₂ carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension. *Am J Physiol*, 2000, vol. 279, H908-H915 [0177]
- 5 • The pressor effect of hemoglobin - good or bad?. PRZYBELSKI, R. J; E. K. DAILY; M. L. BIRNBAUM. Advances in Blood Substitutes. Industrial Opportunities and Medical Challenges. *Birkhäuser*, 1997, 71-85 [0179]
- 10 • MCCARTHY, M. R; K. D. VANDEGRIFF; R. M. WINSLOW. The role of facilitated diffusion in oxygen transport by cell-free hemoglobin: Implications for the design of hemoglobin-based oxygen carriers. *Biophysical Chemistry*, 2001, vol. 92, 103-117 [0180]

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Producto substituto de la sangre que consiste en hemoglobina oxigenada modificada en la superficie, en donde la hemoglobina oxigenada modificada en la superficie es hemoglobina a la que se le ha unido covalentemente un óxido de polialquíleno a través de un grupo tiol superficial de una cadena lateral aminoacídica expuesta en la molécula de hemoglobina, mientras que la hemoglobina se halla en el estado oxigenado; y
10 en donde la hemoglobina oxigenada modificada en la superficie tiene una P50 menor que la hemoglobina nativa libre de estroma procedente de la misma fuente animal, siempre y cuando se cuantifiquen en las mismas condiciones.

15 2. Producto substituto de la sangre según la reivindicación 1, en donde el óxido de polialquíleno es óxido de polietileno, óxido de polipropileno o un copolímero de óxido de polietileno/polipropileno.

15 3. Producto substituto de la sangre según la reivindicación 1, en donde el óxido de polialquíleno es polietilénglico.

15 4. Producto substituto de la sangre según la reivindicación 1, en donde el óxido de polialquíleno es polietilénglico según la fórmula $H(OCH_2CH_2)_nOH$, donde n es mayor o igual a 4.

20 5. Producto substituto de la sangre según la reivindicación 1, que consiste en hemoglobina oxigenada modificada en la superficie, en donde la hemoglobina oxigenada modificada en la superficie es hemoglobina a la que se ha unido covalentemente polietilénglico activado con maleimidina a través de un grupo tiol superficial de una cadena lateral aminoacídica expuesta de la molécula de hemoglobina, mientras la hemoglobina se halla en el estado oxigenado; y en donde la hemoglobina oxigenada modificada en la superficie tiene una P50 menor que la hemoglobina nativa libre de estroma procedente de la misma fuente animal, siempre y cuando se cuantifiquen en las mismas condiciones.

25 6. Producto substituto de la sangre según la reivindicación 1, en donde el polietilénglico es polietilénglico según la fórmula $H(OCH_2CH_2)_nOH$, donde n es mayor o igual que 4.

30 7. Producto substituto de la sangre según la reivindicación 1 o la reivindicación 5, que consiste en hemoglobina oxigenada modificada en la superficie, en donde la hemoglobina oxigenada modificada en la superficie tiene la fórmula:

35
$$Hb-(S-Y-R-CH_2-CH_2-[O-CH_2-CH_2]_n-O-CH_3)_m$$

40 En donde:
40 Hb es hemoglobina tetramérica;
40 S es un grupo tiol superficial;
40 Y es un conector covalente succinimidilo;
45 R es un alquilo, amida, carbamato o grupo fenilo;
45 n define la longitud del polímero y es mayor o igual que 4;
50 m es el número de polímeros PEG unidos a la superficie de la hemoglobina; y
50 en donde la hemoglobina oxigenada modificada en la superficie tiene una P50 menor que la hemoglobina nativa libre de estroma procedente de la misma fuente animal, siempre y cuando se cuantifiquen en las mismas condiciones.

55 8. Producto substituto de la sangre según la reivindicación 7, en donde m es 4-5.

55 9. Producto substituto de la sangre según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde, antes de modificar la superficie, la hemoglobina ha sido tiolada.

60 10. Producto substituto de la sangre según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que tiene un cociente metemoglobin/hemoglobina total inferior a 0,10.

60 11. Producto substituto de la sangre según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la hemoglobina oxigenada modificada en la superficie tiene una P50 inferior a 10 torr (1333 Pa).

65 12. Producto substituto de la sangre según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la hemoglobina oxigenada modificada en la superficie tiene una P50 inferior a 7 torr (933 Pa).

ES 2 299 686 T3

13. Producto substituto de la sangre según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, estable a la auto-oxidación a 24°C que consiste en un conjugado PEG-hemoglobina, en donde el cociente metemoglobina/hemoglobina es inferior a 0,10 y el conjugado tiene una P50 inferior a 10 torr (1333 Pa).

5 14. Producto substituto de la sangre según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la hemoglobina es hemoglobina de caballo.

10 15. Composición útil como substituto de la sangre según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que consiste en un producto substituto de la sangre en un diluyente acuoso.

16. Composición según la reivindicación 15, en donde la concentración de hemoglobina se halla entre 0,1 y 4,0 g/dl.

17. Producto substituto de la sangre según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para su utilización en un procedimiento de tratamiento o terapia de humanos o animales.

18. Utilización de un producto substituto de la sangre según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la producción de un medicamento para el tratamiento de traumatismos, isquemia, hemodilución, choque séptico, cáncer, anemia crónica, anemia falciforme, cardioplegia, o hipoxia.

20 19. Utilización de un producto substituto de la sangre según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la producción de un medicamento para el tratamiento veterinario de la pérdida de sangre debida a heridas, anemia hemolítica, anemia infecciosa equina, anemia infecciosa felina, infección bacteriana, fragmentación del Factor IV, hiperesplenismo y esplenomegalia, síndrome hemorrágico en aves de corral, anemia hipoplásica, anemia aplásica, anemia hemolítica autoinmune idiopática, deficiencia de hierro, anemia hemolítica isoínmune, anemia hemolítica microangiopática, o parasitismo.

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

Cromatograma FPLC de la MalPEG-Hb y la SFH.

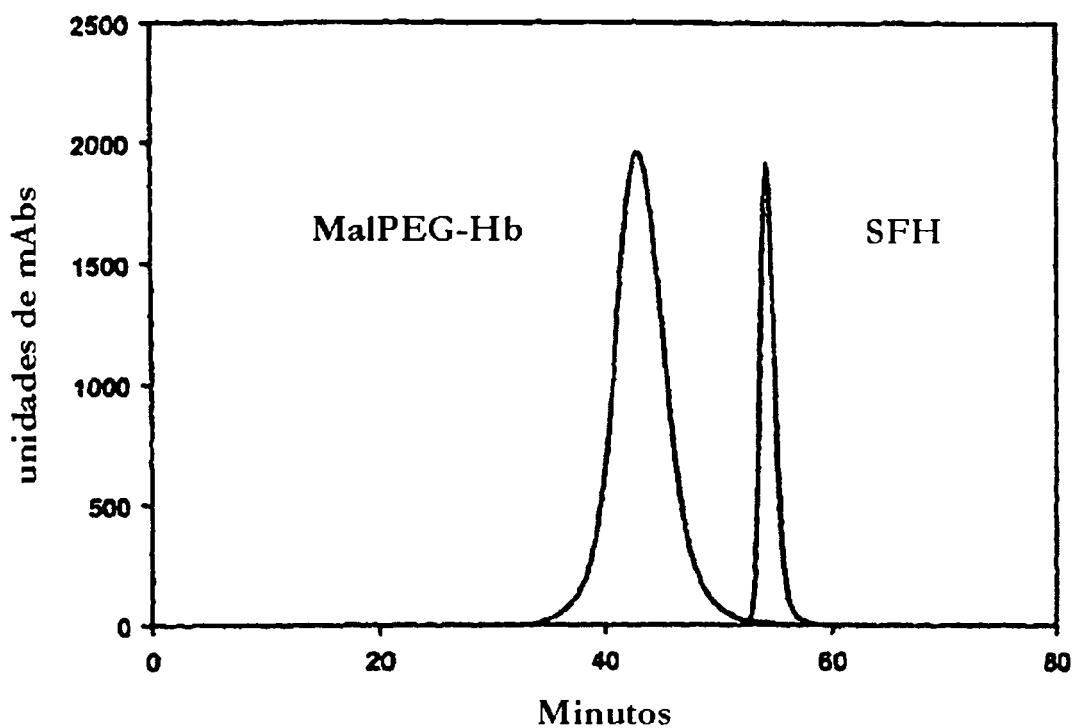


Figura 2
Curvas de equilibrio del oxígeno para SFH y MalPEG-Hb.

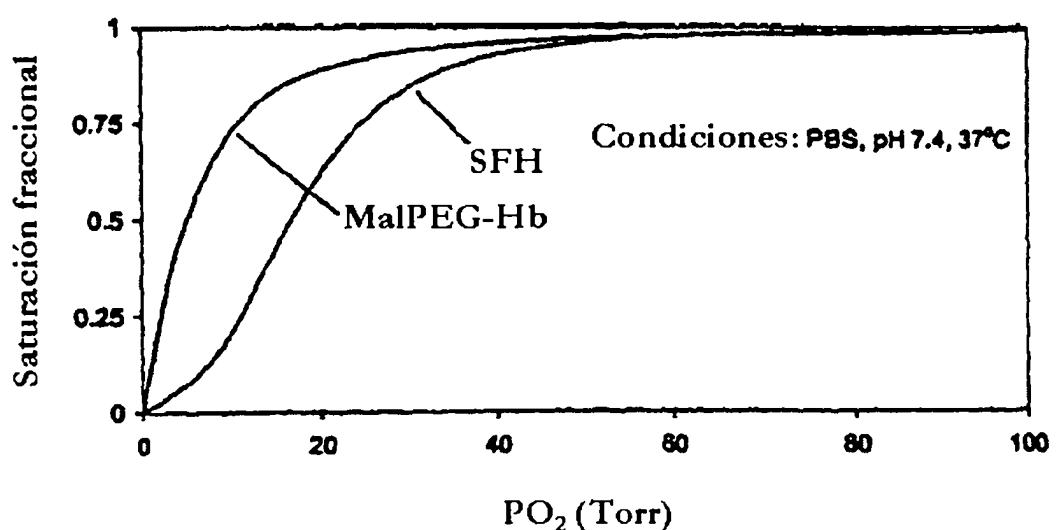


Figura 3
Cromatografía de Exclusión por Tamaño

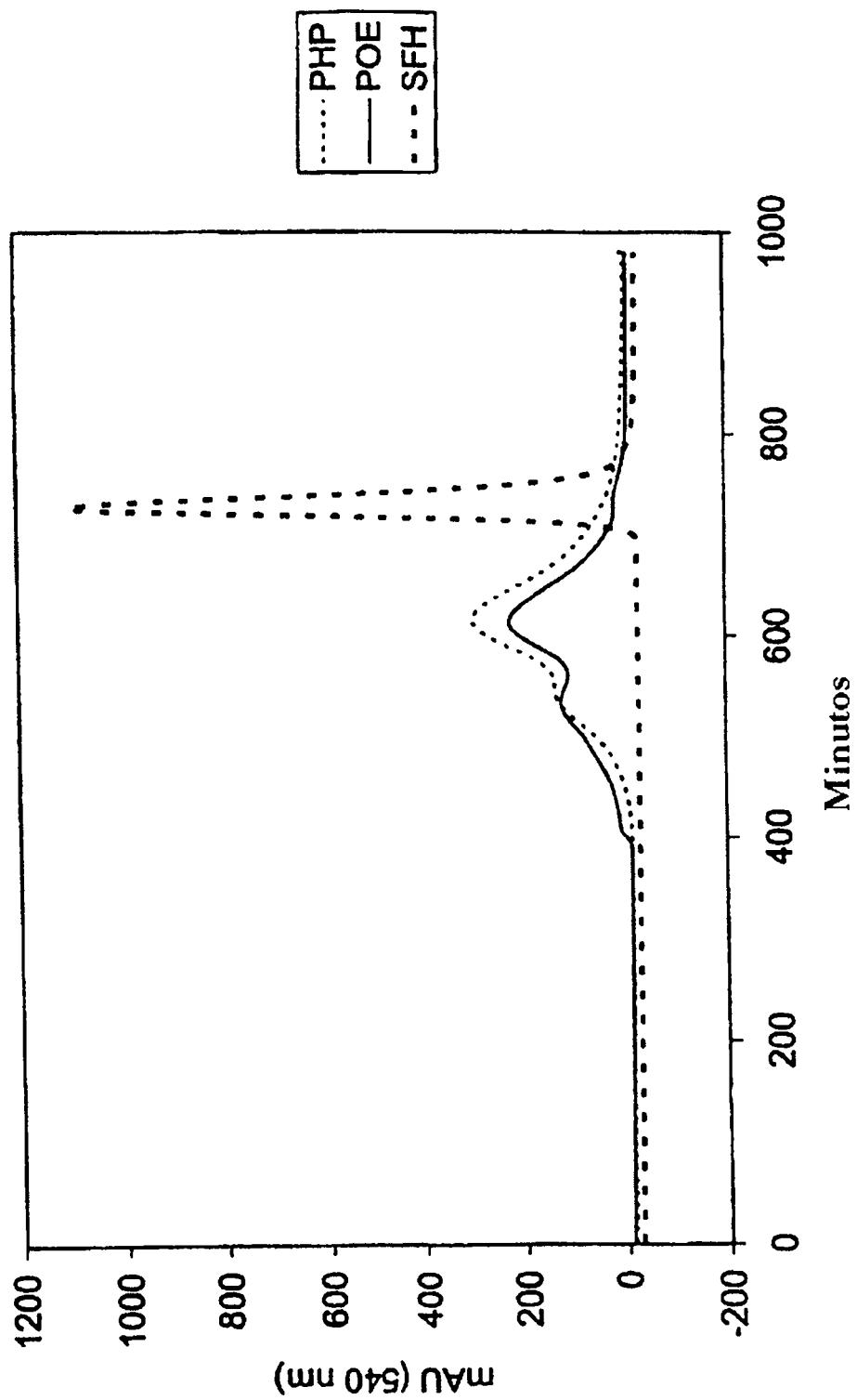
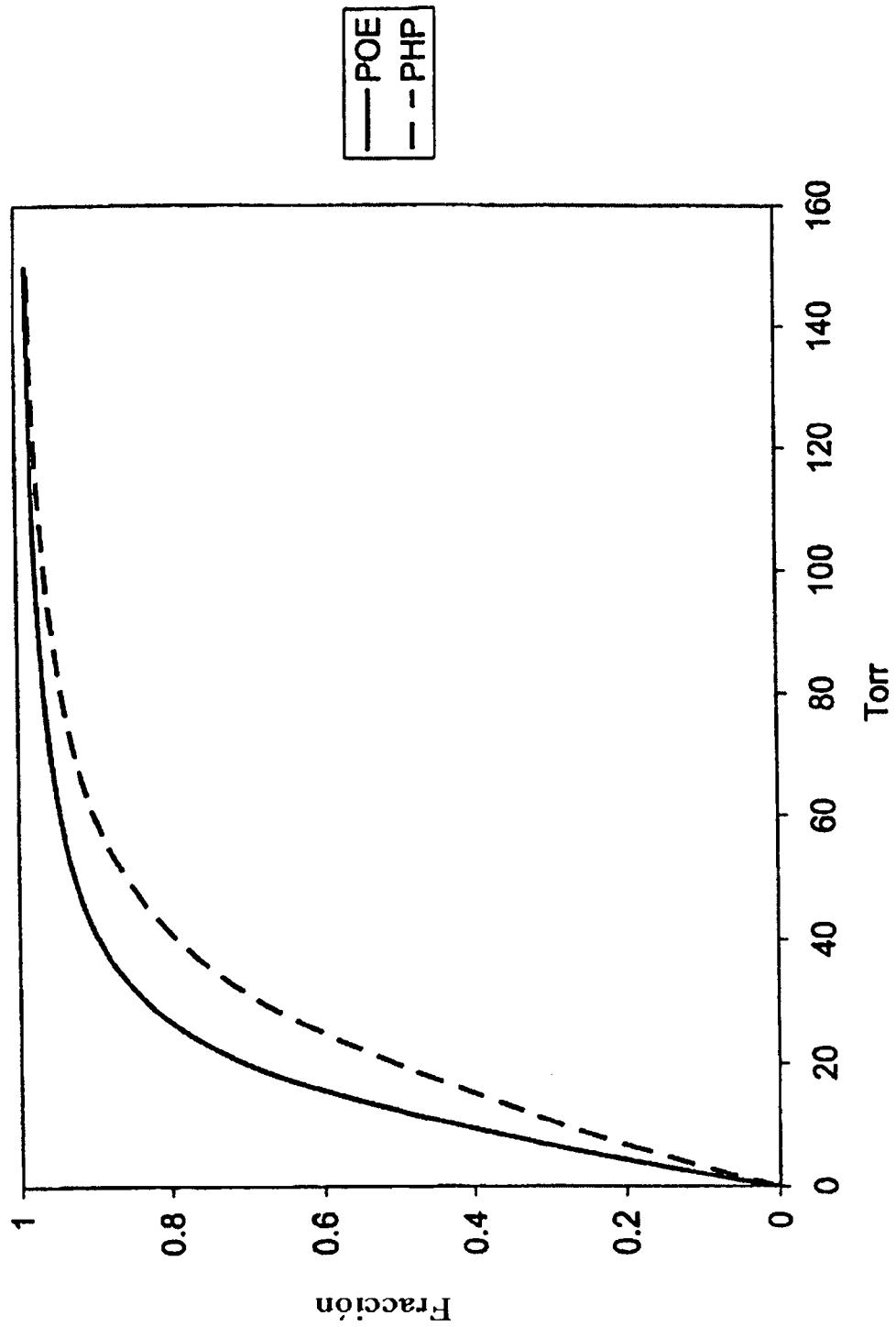


Figura 4



ES 2 299 686 T3

Figura 5

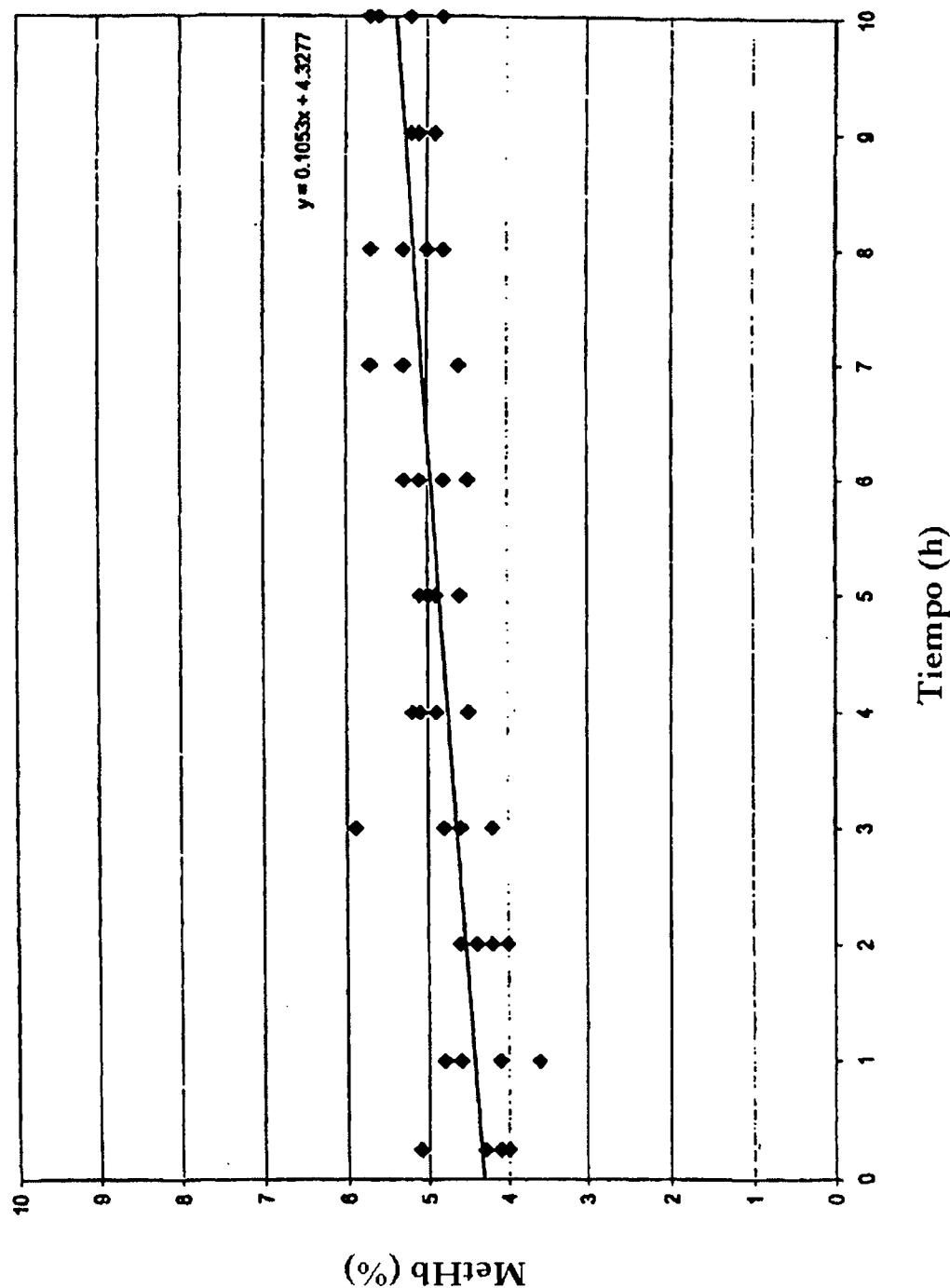


Figura 6

Análisis de Supervivencia Kaplan-Meier

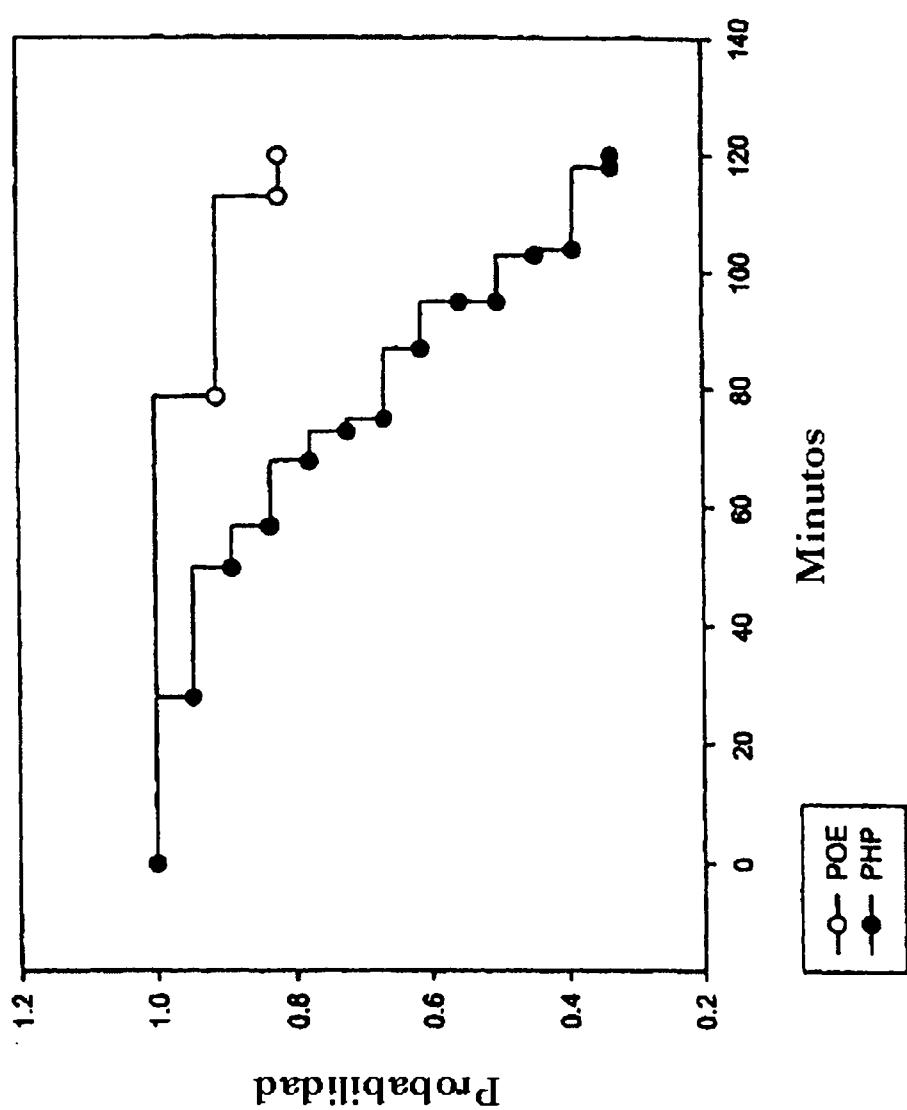


Figure 7

Presión Media Arterial

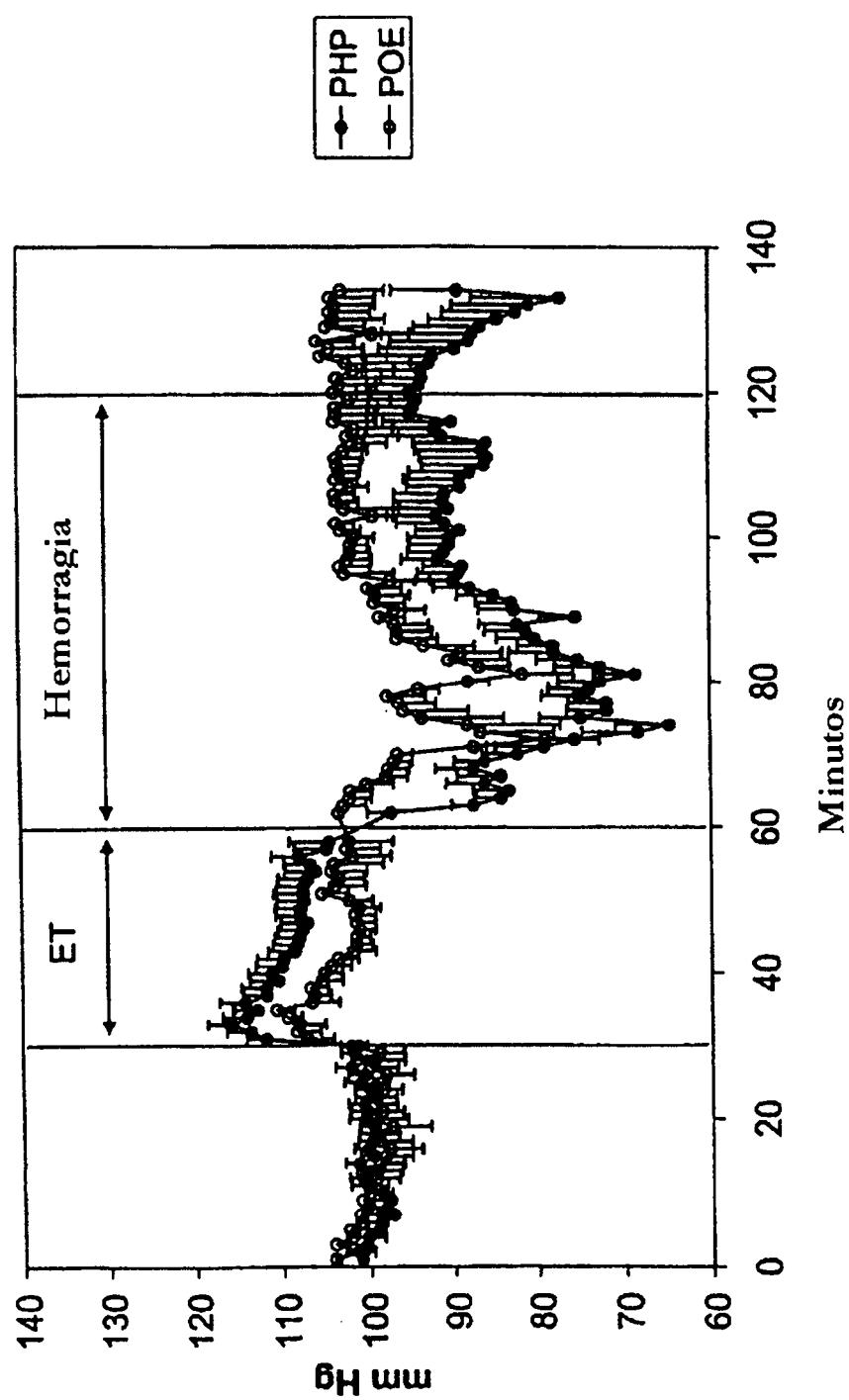


Figura 8

Estudio de Estabilidad a +4°C

Protocolo de Estudio de Estabilidad a 4 °C N°: SG 1019, Fase I.

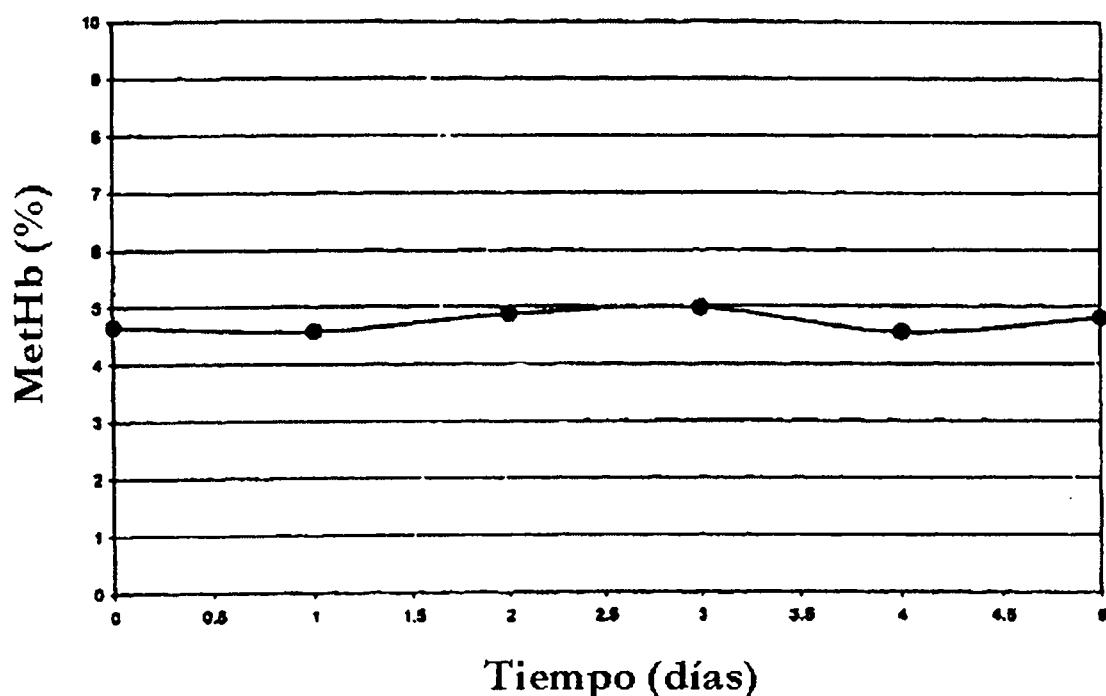


Figura 9

Estudio de Estabilidad a Temperatura Ambiente

Protocolo de Estudio de Estabilidad a Temperatura Ambiente N°: SG 1019, Fase II.

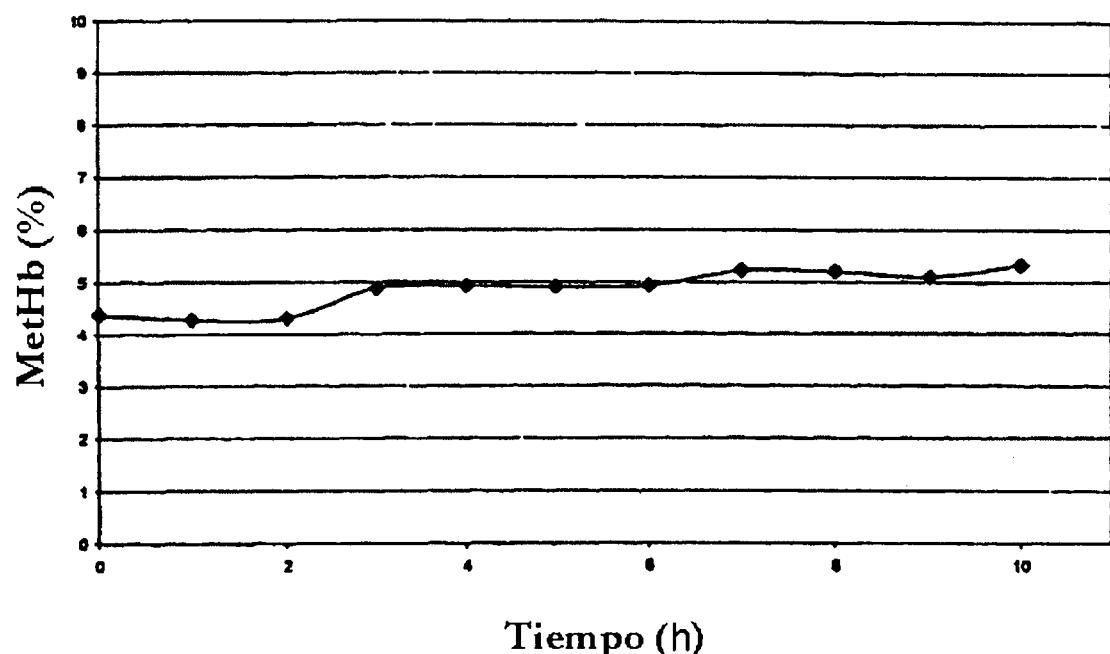
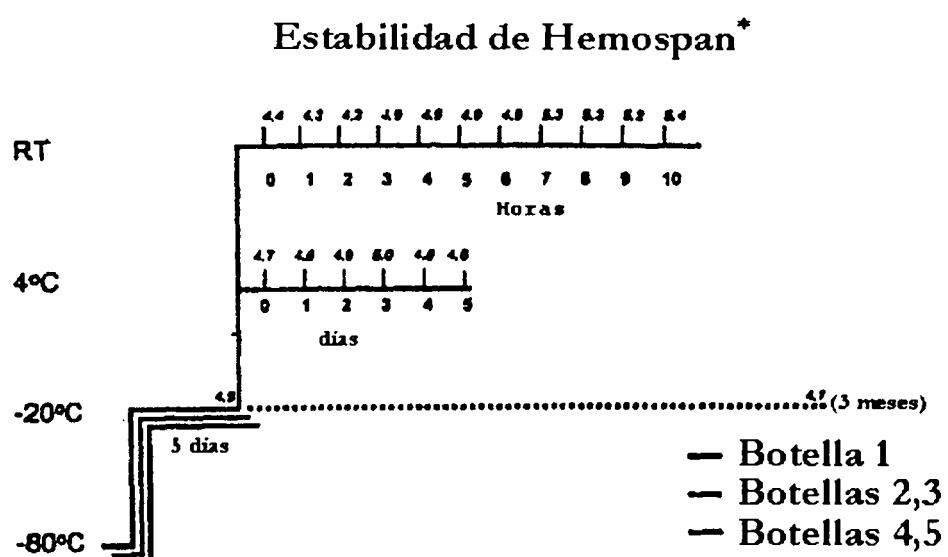


Figura 10

Perfil Esquemático de la Estabilidad de Hemospan



*Los porcentajes de metemoglobina se muestran en azul.