



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 215**

51 Int. Cl.:
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 38/42 (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03799982 .8**
96 Fecha de presentación : **18.12.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1585538**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.10.2005**

54 Título: **Hemoglobinas pegiladas no hipertensivas y sus procedimientos de preparación.**

30 Prioridad: **23.12.2002 US 436149 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2011

73 Titular/es: **Albert Einstein College of Medicine of
Yeshiva University
1300 Morris Park Avenue Chanin Building
Bronx, New York 10461, US**

72 Inventor/es: **Acharya, Seetharama, A. y
Manjula, Belur, N.**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 360 215 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

Hemoglobinas pegiladas no hipertensivas y sus procedimientos de preparación

La presente invención se refiere a una hemoglobina modificada y a los procedimientos para preparar la misma.

Antecedentes de la invención

5 La hemoglobina (Hb) es el constituyente principal de los eritrocitos que transportan oxígeno desde los pulmones a través del cuerpo. Cuando está contenida en los glóbulos rojos, Hb se encuentra como una estructura tetramérica compuesta por dos oxígenos unidos a dímeros $\alpha\beta$ teniendo cada uno un peso molecular de aproximadamente 32 Kd. Cada subunidad α y β de cada dímero tiene una cadena de proteína y una molécula hemo. Se conocen las
10 secuencias de las cadenas de proteínas α y β . Hb es un sustituto de la sangre potencialmente útil para transfusiones, y se ha propuesto como reactivo para atrapar óxido nítrico en los choques sépticos, y para modular la oxigenación del tejido durante la radioterapia contra el cáncer. La tecnología de ADN recombinante ha dado también como resultado la generación de Hb modificada con afinidades por el oxígeno moduladas según las necesidades especiales de las aplicaciones terapéuticas individuales.

15 La vasoactividad de la Hb acelular, es decir, la constricción de arteriolas y capilares, cuando se infunden con disoluciones de Hb acelulares purificadas, o Hb reticuladas intramolecularmente, ha sido el impedimento principal para el desarrollo de portadores de oxígeno basados en Hb (Savitzky y col. 1978, SLoan y col. 1999, Saxena y col. 1999). Se ha atribuido la vasoactividad al efecto secuestrante de NO de la Hb (Doharty y col. 1998). Se han propuesto dos enfoques moleculares, que son muy distintos entre sí en un intento de superar la actividad
20 secuestrante de NO de la Hb. El primer enfoque es el enfoque del ADN recombinante, que ha intentado reducir la actividad secuestrante de la Hb respecto del óxido nítrico modificando la actividad de unión del NO mediante mutagénesis sitioespecífica de la Hb de la bolsa hemo distal (Eich y col, 1996). El segundo enfoque es el enfoque químico, en el que el tamaño molecular de la Hb se aumenta mediante oligomerización, lo que reducirá o inhibirá de manera posiblemente completa la extravasación de Hb desde el espacio vascular al espacio intersticial (Hess y col. 1978, Thomas y col. 1993, Muldoon y col. 1996, Macdonal y col. 1994, Furchgott 1984, Kilbourn y col. 1994). Sin embargo, el enfoque que aumenta el tamaño será satisfactorio únicamente si la vasoactividad de Hb está mediada
25 esencialmente como resultado de la extravasación. Aunque el aumento de tamaño mediado por la oligomerización de Hb ha mostrado cierta reducción en la vasoactividad de Hb, no se ha generado una solución de Hb no hipertensiva ya sea mediante tecnología de ADN recombinante ya sea mediante el enfoque de aumento de tamaño que implica la oligomerización de la Hb usando un reactivo bifuncional de molécula pequeña. Una excepción es el producto oligomerizado de la Hb (Matheson y col. 2002), que tiene un tamaño molecular muy superior a 300 kDa y un radio molecular promedio de 24 nm, y que se encontró que no era hipertensivo y se encontró que no se extravasaba. Sin embargo, la mayoría de los productos oligomerizados actualmente en la etapa de ensayo clínico tienen un peso molecular en el intervalo de 200 a 250 kDa.

35 La demostración de que la Hb PEGilada de Enzon, que transporta diez copias de cadenas de PEG-5000 unidas a Hb en sus grupos amino α y ϵ no es hipertensiva ha estimulado la investigación en el campo de los sustitutos de la sangre (Rofls y col. 1998). La actividad de unión a NO de las Hb reticuladas intratetraméricamente, las Hb oligomerizadas y las Hb PEGiladas (Winslow y col., 1998, Vandegriff y col., 1997) no muestra una correlación directa con sus 'efectos hipertensores'. De esta manera, la reducción de la 'actividad hipertensora' no parece ser una correlación directa de, tanto la actividad de unión del NO de la preparación como del tamaño molecular de la
40 preparación. Pero las Hb PEGiladas presentan un nivel de vasoactividad considerablemente inferior en comparación con la Hb oligomerizada. La PEG-Bv-Hb de Enzon que transporta 10 copias de PEG-5000 no presentó prácticamente ningún 'efecto hipertensor'. Vandegriff y col (1998) han señalado que la PEG-Bv-Hb presentó viscosidad y presión oncótica elevadas en comparación con las de las muestras oligomerizadas de Hb. El radio molecular de la Bv-Hb PEGilada de Enzon calculado a partir de la presión oncótica fue considerablemente más grande (15 nm) que el de las Hb oligomerizadas y el radio molecular calculado no es consistente con su masa molecular calculada de 114.000 daltons (Vandegriff y col. 1998). Según esto, se ha teorizado que se debería aumentar el tamaño de la Hb hasta un radio molecular de aproximadamente 15 nm, y esto debería estar acompañado por un considerable aumento en la viscosidad y en la presión oncótica para generar una disolución de Hb no hipertensiva (Winslow, 1999).

50 En la Hb pegilada de Enzon no hipertensiva, las cadenas de PEG-5000 se unen a los grupos amino α y ϵ -amino de las cadenas PEG de Hb de bovino mediante enlaces isopeptídicos. El enlace covalente de PEG está acompañado por la pérdida de la carga positiva neta de los grupos amino derivatizados. En un estudio reciente, se demostró que la modificación monofuncional de la rHb1.1 con glutaraldehído, disminuye la vasoactividad de Hb en algún grado, aunque la oligomerización de rHb1.1 reduce la vasoactividad de Hb en un grado mayor. De esta manera, en la
55 comprensión de la base molecular de la neutralización de la vasoactividad de la Hb mediante PEGilación, necesita considerarse el papel potencial de la modificación de la carga superficial de la Hb que acompaña a la PEGilación.

Para exponer la correlación entre la perturbación de la carga superficial de la Hb resultante de la PEGilación con la generación de Hb no hipertensiva, se han desarrollado nuevos enfoques relacionados con la conservación de la PEGilación de la Hb, es decir, la modificación de la Hb mediante PEG sin alterar la carga superficial de la Hb

(Acharya y col. 1996). Se ha usado la elevada reactividad y selectividad de PEG-maleimida respecto de la Cys-93(β) de Hb en condiciones oxidantes para preparar Hb PEGilada homogénea que transporta dos copias de cadenas PEG por tetrámero. Se han generado tres diferentes preparaciones de PEG-HbA que transportan dos copias de PEG-5K, o PEG-10K o PEG-20K. Se han correlacionado los cambios en el volumen molecular (volumen hidrodinámico), el radio molecular, la viscosidad, y la presión oncótica de la Hb con la masa de PEG unido covalentemente a Hb; y se han correlacionado todas estas propiedades moleculares con el efecto hipertensor. Aunque la viscosidad y la presión oncótica de (PEG20K)₂-Hb es comparable a la de la PEG-Bv-Hb de Enzon, una molécula de Hb no hipertensiva, esta Hb PEGilada fue vasoactiva. De esta manera, no se puede conseguir resolver el problema de la vasoactividad dotando sencillamente la molécula de un aumento de la viscosidad, presión osmótica y el volumen molecular (volumen hidrodinámico).

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una Hb modificada que tiene un volumen molecular aumentado, elevada viscosidad, elevada presión oncótica, elevada afinidad por el O₂, no es hipertensiva y resuelve también el problema de la vasoactividad. Adicionalmente, se puede preparar la Hb modificada de la presente invención en un procedimiento sencillo, flexible y muy eficaz, que hace que la producción de la Hb modificada de la presente invención sea económica.

Más particularmente, la presente invención proporciona una molécula de hemoglobina (Hb) que tiene seis \pm una cadenas de PEG, en la que dos de dichas cadenas de PEG se unen a la Cys-93(β) de la Hb, y el resto de cadenas de PEG se unen a grupos tiol introducidos en ϵ -H₂ de la Hb.

La presente invención proporciona también un procedimiento para preparar una molécula de hemoglobina (Hb) modificada, comprendiendo las etapas de: (a) hacer reaccionar la Hb con un exceso de 8-15 veces de iminotiolano para formar Hb tiolada; y (b) hacer reaccionar la Hb tiolada con un exceso de 16-30 veces de PEG funcionalizado con un resto maleimida, para formar la Hb modificada.

Finalmente, la presente invención proporciona una molécula de Hb modificada preparada según el procedimiento anterior.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 proporciona una representación esquemática de la PEGilación de Hb basada en la química de la maleimida mediada por tiolación dependiente de iminotiolano. A: representa gráficamente la tiolación, la primera fase de la reacción de PEGilación de una manera simplificada y la conjugación de las cadenas de PEG funcionalizadas con maleimida a la proteína tiolada. Las cadenas de PEG unidas se representan gráficamente como brazos que se proyectan hacia afuera del núcleo de la proteína central (Hb). B: La reacción del iminotiolano con los grupos ϵ amino de la Hb que genera restos γ -mercapto butiramidinilo.

La Figura 2 representa gráficamente la PEGilación de Hb basada en PEG-maleimida mediada por tiolación. A: Influencia del iminotiolano en el aumento de tamaño de Hb tras la incubación con maleidofenil PEG-5000. Se incubó la Hb (0,5 μ m en forma tetramérica) en PBS pH 7,4 con maleidofenil PEG-5000 10 mM durante 4 horas a 4°C tanto en presencia como en ausencia de una concentración conocida de iminotiolano. Se analizaron los productos mediante cromatografía de exclusión molecular mediante FPLC usando dos columnas de superosa conectadas en serie. Se eluyó la columna con PBS a un caudal de 0,5 ml por minuto. Se marcaron las posiciones de elución de HbA, (PEG5k)₂-Hb, (PEG10k)₂-Hb y (PEG20K)₂-Hb como guía para seguir el aumento de tamaño de la molécula de Hb que acompaña la conjugación de las cadenas de PEG. 1: Control Hb 2: Se incubó HbA con maleidofenil PEG-5000 10 mM durante 4 horas en ausencia de iminotiolano. 3: PEGilación en presencia de iminotiolano 1 mM (exceso molar de dos veces). 4: PEGilación en presencia de iminotiolano 2,5 mM (exceso molar de 5 veces). 5: PEGilación en presencia de iminotiolano 5 mM (exceso molar de 10 veces). En el recuadro A se proporciona la cinética de la tiolación de Hb en presencia de un exceso molar de 10 veces de iminotiolano (sobre el de Hb). El recuadro b muestra la extensión de la tiolación de Hb (después de 4 horas de incubación) como función del exceso molar de iminotiolano sobre Hb. B: Influencia de la temperatura, el tamaño molecular del PEG en la PEG-maleimida y la química del enlazante (el enlace entre el PEG y el resto maleimida) sobre el aumento de tamaño de Hb. Todas las reacciones de PEGilación se llevaron a cabo usando un exceso molar de 10 veces de iminotiolano y un exceso molar de 20 veces de PEG-maleimida durante 4 horas a temperatura ambiente y durante la noche a 4°C. Se evaluó el aumento de tamaño mediante cromatografía de exclusión molecular según se explicó en A. a: HbA, b: Reacción a temperatura ambiente usando Mal-Phe-PEG-5000 como la PEG-maleimida. c: Reacción como en b usando Mal-Phe-PEG-10.000. d: Reacción como en b, pero llevada a cabo a 4°C durante la noche. e: Reacción como en d, pero llevada a cabo usando maleimidoetil PEG-5000 como la PEG-maleimida.

La Figura 3 representa gráficamente la purificación de (PEG5k)₆-Hb mediante cromatografía de exclusión molecular usando el explorador Acta. Los experimentos a escala preparativa se llevaron a cabo con una carga de 180 mg. Se llevó a cabo la elución usando PBS tal como se realizó en los experimentos a escala analítica (Fig 2). Se llevó a cabo la PEGilación a 4°C usando un exceso molar de 10 veces de iminotiolano y un exceso molar de 20 veces de Mal-Phe-PEG-5000. El recuadro compara el tamaño molecular de la (PEG5k)₆-Hb purificada con el de las otras Hb

5 PEGiladas y de la $\alpha\alpha$ fumaril Hb (una Hb reticulada intramolecularmente) reticulada intratetraméricamente usando bis maleidofenil PEG-600. Estas muestras ayudan a marcar la posición de las formas tetraméricas, octoméricas, dodecaméricas y dohexaméricas de la $\alpha\alpha$ fumaril Hb. 1: $\alpha\alpha$ fumaril Hb reticulada intertetraméricamente, 2: (PEG5k)₆-Hb purificada en una columna preparativa superosa-12. 3: Hb pegilada de Enzon; (PEG5k)10-Hb 4: muestra de Hb PEGilada de APEX Biosciences, (PEG3K)10-Hb.

La Figura 4 representa gráficamente los espectros de RMN de (PEG5k)₆-Hb.

La Figura 5 representa gráficamente la viscosidad de la Hb PEGilada en función de la concentración de proteína. Los círculos abiertos representan la (PEG5k)₆-Hb; el rombo relleno representa la Hb PEGilada de Enzon y los triángulos abiertos representan la (PEG5k)₂-Hb.

10 La Figura 6 representa gráficamente la presión osmótica coloidal de la (PEG5k)₆-Hb en función de la concentración de proteína. El triángulo abierto representa la (PEG5k)₂-Hb, los círculos abiertos representan la (PEG5k)₆-Hb; los círculos cerrados representan la (PEG5k)₆-Hb que se ha vuelto a dializar para asegurar que la muestra está exenta de cualquier reactivo de PEG libre. El diamante cerrado representa la Hb PEGilada de Enzon. Señalar que las presiones osmóticas coloidales de la PEG-Hb de Enzon y (PEG5k)₆-Hb son comparables.

15 La Figura 7 representa gráficamente la vasoactividad de la (PEG5k)₆-Hb. A: Presión arterial promedio. En hámster después que se infundió al animal con un 10% de la carga superior de 4 g % de (PEG5k)₆-Hb. B: El diámetro arteriolar después que se infundió al animal con un 10% de la carga superior de (PEG5k)₂-Hb y de (PEG5k)₆-Hb como función del tiempo.

20 La Figura 8 representa gráficamente una comparación de la densidad capilar funcional en hámster una vez que la transfusión de intercambio de los animales ha transcurrido en un 50% con (PEG5k)₆-Hb y $\alpha\alpha$ -fumaril Hb respecto al de control. Señalar que el diámetro de la arteria en el animal en el que se ha llevado a cabo la transfusión de intercambio con (PEG5k)₆-Hb es comparable al de la muestra de control, mientras que en el animal en el que se ha llevado a cabo el 50% de la transfusión de intercambio con $\alpha\alpha$ -fumaril Hb es más estrecho que en el control. Señalar también las diferencias en las densidades capilares de las transfusiones de intercambio con las dos muestras.

25 Descripción detallada de la invención

Según se usa en el presente documento, y a no ser que se señale otra cosa, "Hb" incluye hemoglobina de fuentes humanas y de mamíferos (por ejemplo, Hb de bovino, Hb de cerdo), Hb recombinante, así como Hb (Hb aislada o recombinante) que se ha modificado para aumentar o disminuir la afinidad por el oxígeno y/o la autooxidación. Adicionalmente, Hb puede incluir Hb cruzada intramolecularmente (Hb aislada o recombinante), que incluye por ejemplo, Hb que se ha reticulado en Cys-93(β) usando bis maleido-fenil PEG (el PM de la cadena de PEG del reactivo bifuncional tiene de 2000 a 10.000 daltons), $\alpha\alpha$ -fumaril Hb, o $\beta\beta$ -fumaril Hb o $\beta\beta$ subaril HbA.

30 En la presente invención la Hb tiene o transporta seis cadenas \pm una de PEG, en la que dos las cadenas de PEG se unen a la Cys-93(β) de Hb, y el resto de cadenas de PEG se unen a grupos tiol introducidos en ϵ H₂ de la Hb. Los grupos tiol se asocian preferiblemente con ϵ H₂ de Hb butiraminado con γ -mercapto. En la realización preferida, cada cadena de PEG tiene un peso molecular de 3000-10.000 daltons, y más preferiblemente, tiene un peso molecular de aproximadamente 5000 daltons. Las cadenas PEG se unen también preferiblemente a Hb mediante un enlace succinimidilo. En la realización preferida, las moléculas de Hb de la presente invención son también no hipertensivas.

40 La molécula de Hb de la presente invención se prepara haciendo reaccionar la Hb con un exceso de 8-15 veces de iminotiolano para formar Hb tiolada; y haciendo reaccionar a continuación la Hb tiolada con un exceso de 16-30 veces de PEG funcionalizado con un resto maleimida, para formar la Hb modificada. En la realización preferida, se hace reaccionar la Hb con un exceso de 9-12 veces de iminotiolano en la etapa (a) y se hace reaccionar preferiblemente la Hb tiolada con un exceso de 18-22 veces de PEG funcionalizado con un resto maleimida. En la realización más preferida, se hace reaccionar la Hb con un exceso de 10 veces de iminotiolano en la etapa (a) y se hace reaccionar la Hb tiolada con un exceso de 20 veces de PEG funcionalizado con un resto maleimida. Está también dentro de los límites de la presente invención que la tiolación de la Hb y la modificación del PEG de la Hb tiolada se pueden llevar a cabo tanto simultáneamente como en un procedimiento en dos etapas. Con respecto al peso molecular del PEG usado en el procedimiento, el PEG tiene preferiblemente un peso molecular de 3000-10.000 daltons, y más preferiblemente tiene un peso molecular de aproximadamente 5.000 daltons. En la realización más preferida, la Hb modificada resultante del procedimiento es no hipertensiva.

55 En el procedimiento de la invención, se puede preparar la Hb modificada directamente a partir de Hb de mamífero que transporta múltiples grupos tiol reactivos específicos para confirmación con oxi (Hb de perro, Hb de gato, Hb de pollo, Hb de ratón) o Hb humana recombinante con cisteínas reactivas adicionales en las posiciones deseadas de las cadenas α y β , que se trata con el exceso de PEG funcionalizado con un resto maleimida para llegar a la Hb modificada.

La química que rodea el procedimiento se presenta esquemáticamente en las Figs. 1A y 1B. El iminotiolano no

transporta grupos tiol libres, y el grupo tiol se genera in situ una vez que reacciona con los grupos ϵ amino. El grupo ϵ amino derivatizado (una amidina) retiene la carga positiva original de su grupo funcional (Fig. 1B). Por tanto, la Hb se puede incubar con PEG-maleimida junto con el reactivo de tiolación para generar la Hb PEGilada, sin peligro de que el reactivo de tiolación consuma el reactivo de PEG-maleimida. El nivel de PEGilación se determina mediante el nivel de tiolación (reacción del iminotiolano con Hb). Lo último es principalmente una función de la concentración de iminotiolano y de la reactividad de los grupos ϵ amino de Hb en un estado conformacional dado hacia la amidinación por el iminotiolano.

La reacción de PEGilación es flexible ya que la reacción es independiente del tamaño molecular del PEG en la maleimida y de la química del enlazante entre la maleimida y la cadena de PEG en la PEG-maleimida. El enfoque que se puede usar para aumentar el volumen molecular (tamaño) de Hb a cualquier nivel deseado es modular el nivel de tiolación de Hb y/o la masa molecular de PEG en la PEG-maleimida. Se ha optimizado la tecnología de la PEGilación conservativa para generar múltiples Hb PEGiladas con elevada afinidad por el oxígeno. La Hb modificada de la presente invención presenta un alto grado de homogeneidad molecular en términos de carga neta y de volumen hidrodinámico, correspondiendo el volumen hidrodinámico al de una proteína globular de un peso molecular de ~250.000 daltons. Se piensa que cualquier diseño de una HB PEGilada no hipertensiva debería intentar proteger una superficie molecular más grande de Hb usando un número más grande de cadenas PEG de masa más pequeña.

La presente invención puede comprenderse mejor por referencia al siguiente Ejemplo no limitante. El siguiente ejemplo se presenta con el fin de ilustrar más completamente las realizaciones preferidas de la invención, y no debería tomarse como limitante del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

I. Materiales y Procedimientos

Hemoglobina. Se purificó la HbA humana a partir del lisado de eritrocitos según se ha descrito anteriormente (Acharya y col. 1983).

Síntesis de reactivos de maleidofenil polietilenglicol (MalPhePEG). Se sintetizaron derivados monofuncionales de maleidofenilo de PEG5000 y PEG10000 según los procedimientos de Acharya, y col. 1996. Se adquirió maleidoetil PEG-5000 de Shaerwaters, Huntsville, Alabama.

Reacción de HbA con los reactivos de MalPhe-PEG. Se hizo reaccionar hemoglobina A (0,5 mM) en PBS, pH 7,4 con un exceso molar de 10 veces de Mal Phe PEG-5000 a 4°C. Se vigiló la modificación de HbA por PEG mediante cromatografía líquida de alta presión en fase inversa (RPHPLC) y cromatografía de exclusión molecular (SEC). Se dializó el producto de reacción frente a tampón Tris-acetato 50 mM, pH 8,5 y se sometió a purificación mediante cromatografía de intercambio iónico. Se purificaron las Hb PEGiladas mediante cromatografía de intercambio iónico en una resina Q-Sepharose de Alto Rendimiento de Amersham Biosciencias, usando un Sistema de Purificación de Proteínas AKTA Explorer 10. La columna Q-Sepharose de Alto Rendimiento (2,6 cm x 62 cm) se equilibró con tampón Tris-acetato 50 mM, pH 8,5, y se eluyó la proteína con un gradiente lineal de pH decreciente consistente en Tris-acetato 50 mM, pH 8,5 y Tris-acetato 50 mM, pH 7,0 en 8 volúmenes de columna. Se vigiló el efluente de la columna a 240 y 540 nm.

Medidas de afinidad por el oxígeno. Se midieron las curvas de equilibrio del oxígeno a 37°C usando un Hem-O-Scan (Aminco) en PBS, pH 7,4 a una concentración de hemoglobina tetramérica de 1 mM.

Medidas de la viscosidad. Se midió la viscosidad de las Hb PEGiladas en un reómetro, a una concentración de proteína de 4 g/dl, en tampón PBS, pH 7,4 y a 37°C. Se calibró el instrumento con agua desionizada antes de las medidas de la viscosidad de las muestras de Hb.

Medidas de la presión osmótica coloidal. Se determinó la presión osmótica coloidal de las hemoglobinas PEGiladas usando un Osmómetro Coloidal Wescor 4420. Se llevaron a cabo todas las medidas usando muestras de 2 g/dl de hemoglobina en PBS, pH 7,4 a temperatura ambiente. Se usó una membrana con un corte de 30 kDa. Se probó el instrumento con patrones de referencia Osmocoll antes de las medidas de las muestras.

Análisis de RPHPLC de las Hb PEGiladas. Se analizaron las cadenas de globina de las diversas Hb PEGiladas mediante RPHPLC, según los procedimientos descritos anteriormente. De manera breve, se llevó a cabo la separación en una columna Vydac C4 (4,6 x 250 mm), empleando un gradiente lineal de 35-50% de acetonitrilo que contenía TFA al 0,1% en 100 min. Se vigiló el efluente de la columna a 210 nm.

Vasoactividad de las Hb PEGiladas. Se llevaron a cabo investigaciones en un modelo ventana de microcirculación en pliegue de piel de hámster, esencialmente según los procedimientos anteriormente descritos (Mirhashemi y col. 1988, Tsai y col. 1996). Se llevaron a cabo estudios en hámster Golden Syrian machos (Charles River, EE.UU) de 55-70 g de peso corporal. Todos los estudios con animales fueron aprobados por el Animal Subject Committee de la Universidad de California, San Diego, y se llevaron a cabo según las directrices de la NIH para el cuidado y la

utilización de animales de laboratorio (publicación de la NIH nº 85-23 Rev. 1985).

Cada animal fue su propio valor inicial. Se realizó una infusión hipervolémica al 10% a una velocidad de 0,20 ml/min en el animal mediante catéter en la vena yugular usando una bomba de microinfusión (CMA 100 Microinjection Pump; CMA, Suecia). Se midieron la presión sanguínea, el diámetro arteriolar y la densidad capilar funcional inmediatamente después de la infusión y 30 min después de la infusión.

Cinética de la tiolación de Hb por el iminotiolano. Podría seguirse la amidinación de la Hb mediante el iminotiolano estimando la extensión de la tiolación. Se estimó el número de grupos tiol en una muestra de Hb incubada con una cantidad de iminotiolano para un plazo de tiempo dado usando ditiopiridina según se ha descrito por Ampuski (1969). Se preparó una disolución madre de 4,4' ditiopiridina (4-PDS, PM = 220,32, Aldrich Chemical Co.) disolviendo el reactivo en PBS hasta una concentración final de 3 mM (o mayor si se desea). Se incubó con ditiopiridina una alícuota de Hb incubada con iminotiolano y se estimó el número de grupos sulfhidrilo reactivos de la proteína mediante la conversión de 4-PDS a 4-tiopiridona (4-TP) que se puede vigilar a 324 nm ($\epsilon_{324} = 1,98 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

PEGilación conservativa de HbA basada en PEG-maleimida mediada por tiolación dependiente de iminotiolano. Se hizo reaccionar Hb (tetrámero 0,5 mM) en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) con un nivel deseado de exceso molar de iminotiolano (sistemas BioAffinity) a 4°C (o a temperatura ambiente) en presencia de un exceso molar de 2 veces de carbamato de maleidofenilo PEG-5000 (BioAffinity System) o maleidoetil PEG-5000 (Shearwaters) o carbamato de maleidofenilo PEG-1000 respecto del de iminotiolano durante un plazo de tiempo deseado. Se prefirió realizar la reacción a 4°C sobre la de a temperatura ambiente, debido a que a temperatura ambiente parece tener lugar alguna cantidad de oxidación de los grupos tiol de la Hb tiolada incluso en presencia de PEG-maleimida, y esto se reduce considerablemente a 4°C. Se llevó a cabo generalmente la reacción de PEGilación a una concentración de proteína de 0,5 mM, pero se podría llevar a cabo usando una concentración de Hb tanto de 0,25 mM como de 1 mM de Hb.

Se ha estudiado también la PEGilación mediada por tiolación en forma de reacción en 2 etapas; en primer lugar, se llevó a cabo la tiolación de Hb incubando la Hb con el exceso deseado de iminotiolano y a continuación se añadió el exceso molar deseado (sobre el de iminotiolano) de PEG-maleimida para conseguir la modificación del PEG de la Hb tiolada.

Para la generación de Hb no hipertensiva, se usó la tiolación con un exceso molar de 10 veces sobre la Hb (expresada como tetrámero) y la PEGilación de la proteína tiolada con un exceso molar de 20 veces de la PEG-maleimida deseada. Se llevó a cabo esto generalmente como una reacción en una etapa para reducir la oxidación de los grupos tiol. Si la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente, se necesita generalmente un tiempo de reacción de 4 a seis horas para conseguir la molécula deseada. Cuando la reacción se lleva a cabo a 4°C, normalmente la reacción se lleva a cabo durante la noche (~16 h).

Se ha llevado a cabo la decoración de la superficie de la Hb por la PEGilación basada en PEG-maleimida mediada por tiolación usando Mal-PEG-PEG-10.000 a una concentración de proteína de 25 mM debido a que la reacción a mayor concentración de Hb conduce a una reacción incompleta, debido presumiblemente a una mayor viscosidad de la mezcla de reacción cuando se usó un exceso molar de 20 veces de Mal-PEG-2000.

Se dializaron extensamente los productos de reacción frente a PBS usando una tubería de diálisis con un corte de 12.000 a 14.000 daltons. En la diálisis se eliminó la parte sin reaccionar (PEG-maleimida en exceso); se purificaron los productos PEGilados mediante cromatografía de exclusión molecular usando una columna Superose 12 conectada a Pharmacia Acta. La Hb PEGilada aislada de esta manera, (PEG5k)₆-Hb se almacenó a -80°C hasta que se necesitó posteriormente.

Medida del aumento de tamaño durante la PEGilación basada en PEG-maleimida mediada por tiolación. Se llevó a cabo el análisis del aumento de tamaño de Hb como función de varias PEGilaciones conservativas basadas en PEG-maleimida mediadas por tiolación usando un sistema Pharmacia FPLC. Se llevó a cabo la cromatografía de exclusión molecular usando 2 columnas Superose conectadas en serie. Se eluyeron las muestras usando PBS a pH 7,4 y un caudal de 0,5 ml/min a temperatura ambiente a 300,15 MHz a 29°C, usando una sonda de 5 mm. Las muestras de Hb tuvieron una concentración del 4 al 7% en 0,1 M.

II. Resultados

A) Desarrollo de la tecnología de la PEGilación conservativa

(i) Aumento del volumen hidrodinámico de HbA como resultado de la PEGilación de Hb basada en la química de la maleimida mediada por tiolación. En la Fig 2A se muestra el modelo cromatográfico de exclusión molecular de la Hb cuando se incubó con un exceso molar de 20 veces de Mal-Phe-PEG5K durante 4 ½ horas a temperatura ambiente en ausencia y presencia de iminotiolano. En ausencia del propio iminotiolano, Hb está completamente modificada con PEG-Phe-PEG-5000 (Fig. 2A, b). La Hb sin modificar se eluye alrededor de 57 minutos (Fig 2A, a) mientras que la HbA incubada con Mal-Phe-PEG5K eluye alrededor de 50 minutos. La posición de elución de este producto

corresponde a la Hb modificada en sus dos Cys-93(β) con Mal-Phe-PEG5K. Las posiciones de elución de (SP-PEG10k)₂-HbA así como de (SP-PEG20K)₂-HbA, con las respectivas cadenas PEG unidas a Cys-93(β) es de alrededor de 47 y 44 minutos en esta columna y están marcadas para referencia.

5 En la inclusión del iminotiolano en la mezcla de reacción de la Hb con Mal-Phe-PEG 5K, la Hb modificada se eluyó antes que la posición de (PEG5k)₂-HbA de la columna cromatográfica de exclusión por tamaño. Se han generado aparentemente nuevos sitios de PEG-maleimida, proporcionando por tanto nuevos sitios reactivos de PEG-maleimida en Hb. La Hb modificada (Hb PEGilada) se eluyó antes en la cromatografía de exclusión molecular de una manera dependiente de la concentración de iminotiolano. Cuanto mayor es la concentración de iminotiolano más temprana es la posición de elución de la Hb modificada, sugiriendo que los niveles crecientes de tiolación de Hb como función de la concentración creciente del iminotiolano en la mezcla de reacción son responsables del aparente aumento del tamaño molecular de la Hb. La Hb PEGilada generada en presencia de iminotiolano 2,5 mM (exceso molar de 5 veces por tetrámero) se eluye en una posición cercana a la de (SP-PEG10k)₂-HbA (Fig 2A, d). La muestra formada en presencia de iminotiolano 5 mM, se eluye muy cerca de la posición de SP-PEG20K)₂-HbA, pero parece tener un volumen hidrodinámico que es ligeramente más pequeño que el de (SP-PEG20K)₂-HbA (Fig 2A, e). Sin embargo, este material tiene un pequeño hombro en el lado ascendente del pico.

20 Al aumentar la concentración de iminotiolano más de 7,5 mM sin cambiar la concentración de la propia Mal-Phe-PEG (10 mM), el modelo de elución del pico de la Hb PEGilada se convierte en ligeramente más amplio, pero eluyendo únicamente un pequeño aumento en el rendimiento del producto como un hombro (no se muestran los datos). Incluso aumentando la concentración de iminotiolano a 10 mM, el modelo de elución no cambia significativamente, excepto por pequeños cambios en la concentración del hombro del lado ascendente.

La influencia de la concentración de PEG sobre el hombro en el lado ascendente ha sido estudiada también en función del aumento de la concentración de la PEG-maleimida. Este hombro se redujo considerablemente (casi desapareció) cuando aumentó la concentración de Mal-Phe-PEG hasta casi el doble de la concentración usada en la Fig 2e, tuvo poca influencia en la posición de elución del pico principal.

25 En la Fig 2A (recuadro a) se muestra la cinética de la tiolación de Hb con un exceso molar de 10 veces de iminotiolano. En promedio, la Hb tiolada con un exceso molar de 10 veces de iminotiolano transporta ~7 grupos -SH reactivos (frente a ditiopiridilo) por tetrámero, dos de los cuales son los grupos -SH intrínsecos de la Cys-93(β) y el resto los grupos tioles intrínsecos introducidos por la reacción del iminotiolano con los grupos ϵ amino de la superficie reactiva de Hb (γ -mercapto butiramidación de Hb). Debido a que se ha usado un exceso molar de 10 veces de iminotiolano, la eficacia de la tiolación está cercana al 50%. La Hb PEGilada tuvo aproximadamente 0,5 moles de tioles reactivos por tetrámero (en condiciones no desnaturizantes), lo que sugiere que, en promedio cerca de ~ 6,5 copias de la cadena de PEG se introdujeron en la Hb generando esta Hb PEGilada.

35 Se ha estudiado también la tiolación de la Hb en función de la concentración de iminotiolano a una concentración de proteína de 0,5 mM (Fig 2A. Recuadro b). El aumento de la concentración de iminotiolano desde un exceso molar de 10 veces, que introdujo en promedio cinco tioles extrínsecos por tetrámero, hasta 30 veces, se dobló prácticamente el número de tioles extrínsecos en la Hb tiolada. Sin embargo, el aumento de tamaño observado en la PEGilación es solo marginal, lo que sugiere que la Hb PEGilada es incapaz de reaccionar a todos los tioles extrínsecos de la Hb tiolada. Se ha interpretado que estos resultados sugieren que la PEGilación de Hb en presencia de un exceso molar de 10 veces de iminotiolano y un exceso molar de 20 veces de Mal-Phe-PEG5K cubre la superficie de la molécula de Hb significativamente creando una 'situación abarrotada' en la que la Hb tiolada en esta etapa de la PEG de potenciación del tamaño molecular mediante esta PEGilación dependiente de PEG-5000maleimida mediada por tiolación llega a ser más resistente para la modificación de los tioles extrínsecos adicionales de la Hb PEGilada. Según esto, para todos los estudios posteriores, se ha usado la Hb PEGilada generada por la decoración de la superficie de la Hb con PEG usando un exceso de diez veces de iminotiolano (sobre la proteína como tetrámero) en presencia de un exceso molar de 20 veces de Mal-Phe-5000 PEG.

50 (ii) *Flexibilidad en la modificación de HB con PEG basada en la maleimida-PEG mediada por tiolación.* Se ha investigado la influencia de la temperatura, el pH, la química del enlazante, y el tamaño molecular de la PEG en la PEG-maleimida sobre la formación de (PEG-5k)₆-HbA, usando un exceso molar de 20 veces de PEG-maleimida y la cromatografía de exclusión molecular en columnas Superose 12 como sistema de ensayo. Cuando se bajó la temperatura a 4°C parece retardarse la velocidad de la unión de las cadenas de PEG con la proteína tiolada, pero la velocidad de tiolación de la Hb no resultó afectada en un grado mayor, llevar la reacción a cabo durante 9 h aseguró la finalización de la reacción, pero se escogió de manera rutinaria la reacción durante la noche (14 a 16 h) por conveniencia (Fig 2B, curva c). Efectuar la PEGilación como un procedimiento en dos etapas, en primer lugar la tiolación y a continuación la PEGilación, no parece tampoco afectar el aumento de tamaño (no se muestran los datos). La decoración de la superficie con PEG se ha llevado a cabo a tres valores de pH, pH 6,5, 7,4 y 8,5. Se han comparado los productos PEGilados formado a pH 6,5, 7,5 y 8,5 usando tampón fosfato 10 mM con éste establecido a pH 7,4 en PBS. Todos los productos son comparables en términos de aumento de tamaño conseguido mediante decoración de la superficie.

60 El aumento de tamaño observado en la decoración de la superficie con PEG-5000 fue también independiente de la química del enlazante, los productos obtenidos usando Maledo-fenil-PEG-5000 tuvieron esencialmente el mismo

volumen hidrodinámico que el generado con PEG-Etil-PEG-5000 (Fig 2B, curva d). El aumento de tamaño de Hb, para un conjunto dado de condiciones de tiolación, es sensible al tamaño molecular de la PEG en la PEG-Maleimida. Al aumentar la masa de la cadena de PEG de 5000 a 10.000, el aumento de tamaño observado es mayor que el observado con PEG-5000 maleimida (Fig 2B, curva e).

5 (iii) *Purificación de (PEG5)₆-HbA*. Para la generación de materiales de hasta un g de (PEG)₆-HbA, se ha desarrollado un protocolo de filtración en gel. Se incubó HbA de manera rutinaria con un exceso molar de diez veces de iminotiolano y un exceso molar de 20 veces en disolución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) de cuatro a seis horas y a continuación se sometió la mezcla de reacción a tres cambios de diálisis frente a un exceso de 100 veces de PBS para eliminar el exceso (sin reaccionar) de iminotiolano y la maleimida PEG. Se concentró la muestra dializada hasta aproximadamente 1 mm y se sometió a filtración en gel usando una columna Superose 12 preparativa conectada a un Pharmacia Acta Explorer 10. En la Fig 6A se muestra un perfil cromatográfico típico de una muestra de HbA PEGilada bajo las condiciones discutidas anteriormente. Se vigiló la elución a tres longitudes de onda, para facilitar la vigilancia de la elución de cualquier PEG-maleimida que no haya reaccionado con Hb. La Hb PEGilada eluye mucho más allá de la PEG-maleimida sin reaccionar presente en la muestra. Se concentró la muestra PEGilada filtrada en gel hasta aproximadamente 6 g/dl. La HbA no experimenta ninguna autooxidación detectable para generar el tipo de productos met-Hb tanto durante la reacción de PEGilación basada en la química de la maleimida mediada por tiolación como durante las posteriores etapas de purificación. Se puede almacenar la muestra de la Hb PEGilada a -80°C sin experimentar ninguna autooxidación hasta al menos un año.

20 (iv) *Cuantificación del aumento de tamaño de la Hb resultante de la PEGilación conservativa de Hb*. Se ha comparado el modelo de elución de la (PEG-5k)₆-Hb purificada con el de la α -fumaril Hb cruzada intertetraméricamente usando Bis maleidofenil PEG-600. (Fig 3, recuadro, b y a). Según se ha señalado inicialmente, la Hb PEGilada conservativamente, (PEG-5k)₆-Hb, es ligeramente más pequeña que, (PEG20K)₂-HbA, y mayor que la de (PEG10k)₂-HbA. Su volumen hidrodinámico parece corresponder al de una proteína globular con una masa molecular de aproximadamente 250.000 daltons. Debido a esto, la masa de PEG es de ~ 30.000, y por tanto, la masa molecular calculada es solo de 95.000 daltons. Pero su volumen hidrodinámico corresponde al de una proteína de una masa molecular de 250.000. De esta manera, la incorporación de una masa de 30.000 en la Hb en forma de seis copias de cadenas de PEG-5000 es equivalente a incorporar una masa cercana a 180.000 de proteína globular en la Hb. De este modo, el PEG presenta un potencial para aumentar el volumen hidrodinámico de Hb que es casi seis veces el de una proteína globular estrechamente empaquetada. Esta conclusión es similar a la que Manjula y col (2002) han extraído recientemente de sus estudios de PEGilación en los que el sitio de la PEGilación estaba restringido a Cys-93 (β), se consiguió el aumento de tamaño como una función del tamaño molecular del PEG en la PEG-maleimida usada. De esta manera, el aumento de tamaño que se produce como resultado de la PEGilación parece ser una correlación directa de la masa del PEG unido a la Hb, y es aditiva cuando la masa de PEG se presenta como un número diferente de copias.

35 Se ha comparado el modelo cromatográfico de exclusión molecular de (PEG5k)₆-HbA generado por el nuevo protocolo de PEGilación basada en la química de la maleimida mediada por tiolación con el de la (PEG5k)₁₀-Bv-Hb de Enzon, una Hb PEGilada no vasoactiva (cuadrado de la Fig 3, curva c). Este material es también bastante homogéneo en términos de la distribución de tamaño molecular exactamente como la (PEG-5k)₆-Hb. Esta Hb PEGilada tiene diez copias de PEG-5000 (masa total de PEG de 50.000) por tetrámero y, según esto, se anticipa que tiene un mayor aumento de tamaño con respecto a la (PEG-5k)₆-Hb. Sin embargo, el aumento de tamaño observado con esta Hb no es tan grande como el observado con la (PEG-5k)₆-Hb. La base molecular de esta anomalía no es fácilmente evidente en esta etapa. Por otra parte, PHP, otra Hb PEGilada que transporta 10 copias de PEG-3000 por tetrámero, debería esperarse que tuviera un volumen hidrodinámico comparable al de la (PEG-5k)₆-Hb dado el hecho de que la cantidad de masa de PEG por tetrámero en este producto es comparable a la de en la (PEG-5k)₆-Hb. PHP es muy heterogénea (cuadrado de la Fig 3, curva d). Transporta algunas cantidades de material que tiene un aumento de tamaño más pequeño que el de la (PEG-5k)₆-Hb, y algún material con un aumento de tamaño comparable al de la (PEG-5k)₆-Hb, y alguno más grande que el de la (PEG-5k)₆-Hb. El uso de PEG-3000 bifuncional para la decoración de la superficie, y las reticulaciones intra y/o intertetraméricas presentes en esta muestra pueden haber contribuido al elevado nivel de heterogeneidad en la PHP.

50 *B) Caracterización molecular, coligativa y funcional de (PEG5)₆-HbA.*

55 (i) *Espectroscopia de RMN ¹H de (PEG5)₆-HbA*. La espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protones de Hb es una excelente herramienta para vigilar los cambios en la estructura terciaria y cuaternaria de la HbA que acompañan tanto a las modificaciones químicas como a las mutaciones para cualquier desplazamiento dado. La localización de la Cys-93 (β) es en una región conformacional sensible de la molécula, y la reactividad de la Cys-93 (β) hacia reactivos específicos de sulfhidrilo es una característica única de la conformación oxi de la molécula, en la conformación desoxi no es reactiva. La Fig. 4A compara los espectros de RMN de protón de (PEG20)₂-HbA y (PEG5)₆-HbA con el de la HbA en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,0 y 29°C en las formas monóxido y desoxi. Estas dos muestras tienen casi la misma cantidad de masa de PEG por tetrámero [40.000 en (PEG20)₂-HbA frente a 30.000 en (PEG5)₆-HbA]. Con la excepción de resonancias más amplias observadas con las muestras PEGiladas debido a un aumento en el tamaño molecular como resultado de la PEGilación de la Hb, no existen diferencias significativas en el desplazamiento químico en la región espectral de 10 a 14 ppm lo que indica

que no hay alteraciones en la interfase $\alpha\beta_1$ de la proteína como resultado de la PEGilación de la Hb tanto solo en Cys-93 (β) usando PEG-20.000 como en Cys-93(β) y al menos otros cuatro grupos ϵ amino de Hb usando PEG-5000. La Fig 4B compara las resonancias de protón con desplazamiento del anillo de las dos Hb PEGiladas con la de HbA en la forma de monóxido de carbono. Existen algunas alteraciones en las resonancias de protón con desplazamiento del anillo que reflejan cierta perturbación en el microentorno de las muestras hemo de las Hb PEGiladas. La Fig 4C muestra las resonancias $N\delta H^1H$ con desplazamiento hiperfino de los restos de histidina proximales de las cadenas α y β de las Hb PEGiladas en la forma desoxi. El desplazamiento químico a -75 ppm asignado al $N\delta H$ de la histidina proximal de la cadena β se desplaza campo arriba de -2 a -3 ppm reflejando la perturbación del entorno β -hemo en las muestras PEGiladas. Este desplazamiento campo arriba es algo más pronunciado en (PEG20)₂-HbA que en (PEG5)₆-HbA. La Fig 5D compara el desplazamiento hiperfino y las resonancias de protones intercambiables de las dos muestras PEGiladas de HbA con los de la HbA en la forma desoxi. Las resonancias con desplazamiento hiperfino son más amplias que la de HbA. Además existen algunos cambios en las resonancias en la región espectral de 16 a 24 ppm, que reflejan cambios en el microentorno de β -hemo de Hb como resultado de la PEGilación de la molécula. La resonancia a 14 ppm, asignada a un importante enlace de H entre la α -Tyr(42) y β -Asp(99) en la interfase de la subunidad $\alpha_1\beta_2$ permanece sin cambios en las muestras PEGiladas. De esta manera, no hay cambios en la interfase de la subunidad $\alpha_1\beta_2$ de la Hb PEGilada.

(ii) *Radio molecular de la (PEG5)₆-HbA.* Se ha determinado el radio molecular de la (PEG5)₆-HbA mediante dispersión dinámica de luz y se ha comparado con el de (PEG5)₂-HbA, y (PEG20)-HbA que los inventores habían medido anteriormente (véase, la Tabla I). El radio molecular de la (PEG5)₆-HbA es de alrededor de 6,8 nm. Este radio molecular es ligeramente más pequeño que el de (PEG20)2HbA, que se había estimado anteriormente de 7,04. Los valores para (PEG5)₂-HbA y HbA son 4,2 y 3,1 respectivamente. De esta manera, el radio molecular de la HbA es más del doble cuando la superficie está decorada con aproximadamente seis copias de cadenas de PEG-5K, incluso aunque la masa añadida a la proteína sea solo de aproximadamente 30.000. De esta manera, la (PEG5)₆-Hb presenta un tamaño molecular aumentado con respecto al esperado para una proteína globular de peso molecular 94.000, y el empaquetamiento de la PEG en esta región con aumento de tamaño de la Hb no es tan denso como en el núcleo de la proteína. El radio molecular de la PEG Bv-Hb de Enzon, que tiene una masa molecular de 114.000, tiene un radio molecular más pequeño que el de la (PEG5)₆-Hb, 5,53 nm, y está cercano al de la (PEG-10k)₂-HbA y (PEG-5k)4-Dog Hb. Se puede señalar también que el radio molecular de la (PEG5)₆-Hb generado usando Mal Etil PEG-5000 es casi un 10% más pequeño que el del generado usando Mal-Phe-5000. El radio molecular de (PEG-10k)₆-Hb es aproximadamente de 9,8, estableciéndose de esta manera la necesidad de usar una PEG con mayor tamaño molecular para conseguir la Hb PEGilada con un radio molecular más grande que el de 7 nm conseguido con la (PEG-5k)₆-HbA.

(iii) *Comparación de la densidad molecular de la Hb PEGilada generada mediante protocolos de PEGilación conservativos y no conservativos.* Debido a que el aumento de tamaño (aumento en el volumen hidrodinámico) que se consiguió mediante la PEGilación es casi seis veces más eficaz que en una proteína globular (sobre la base de una masa igual), esto implica que la densidad molecular de átomos en el volumen aumentado de la Hb PEGilada disminuye en comparación con la de en las proteínas globulares compactas. En la Tabla 1 se proporciona también la densidad molecular del PEG en el volumen molecular aumentado de varias Hb PEGiladas. La densidad molecular de PEG en el volumen molecular aumentado de la Hb disminuye en casi un 50% cuando la masa molecular de PEG unido a Cys-93(β) aumenta de 5000 a 20.000. Una disminución en la densidad molecular implica una menor interacción entre las cadenas de PEG y un aumento de ocupación de las moléculas del disolvente en el interior de la envoltura del PEG de una HB PEGilada dada. Cuando la densidad de la PEG en la envoltura de la PEG es baja, debería considerarse que está presente en una 'conformación de tipo hongo', mientras que si la densidad alta en la envoltura del PEG, debería considerarse que está presente 'en la conformación de tipo de borde en cepillo' y en la (PEG5)₆-Hb, la densidad molecular de la envoltura de la PEG es incluso más pequeña que en la de la (PEG20)₂-Hb. Por otra parte, la densidad molecular de la envoltura de PEG de la PEG Bv-Hb de Enzon es muy elevada, sugiriendo que las interacciones entre las cadenas de PEG en el interior de la envoltura del PEG son más fuertes con respecto a las de la envoltura del PEG de (PEG5)₆-Hb. Los estudios reflejan claramente las diferencias en el empaquetamiento de las cadenas de PEG entre la Hb PEGilada de Enzon y las nuevas Hb PEGiladas generadas mediante la tecnología de PEGilación conservativa. La muestra generada mediante la PEGilación conservativa se puede considerar que está presente en una 'conformación de tipo hongo' y la muestra de PEGilada de Enzon en una 'conformación de tipo de borde en cepillo'.

(iv) *Propiedades coligativas de la (PEG5)₆-HbA.* La Fig 5 compara la viscosidad de (PEG5)₂-HbA y (PEG5)₆-HbA en función de la concentración de proteína en el intervalo de 1 a 10 g/dl. La viscosidad de (PEG5)₂-HbA mostró solo un pequeño aumento en la viscosidad, a medida que aumentó la concentración de la proteína de 1 g/dl a 10 g/dl, y la viscosidad de la disolución PEGilada parece ser directamente proporcional a la concentración de la proteína. Por otra parte, incluso aunque la viscosidad de la disolución de (PEG5)₆-HbA es comparable a la de (PEG5)₂-HbA en disoluciones muy diluidas (1 g/dl), la viscosidad de la anterior aumentó exponencialmente con la concentración de la proteína. Se muestra también para comparación la viscosidad de la Hb bovina modificada con PEG de Enzon, que transporta 10 equivalentes de cadenas de PEG-5K (en el α y ϵ H₂ de la Hb bovina a través de enlaces isopeptídicos) en el intervalo de concentración de 1 a 5 g/dl. A todas las concentraciones estudiadas, la viscosidad de la Hb bovina con PEG de Enzon es comparable a la de la viscosidad de la (PEG5)₆-HbA. Los resultados sugieren que cualquiera que sea la naturaleza química del enlace y los sitios de PEGilación, tiene una fuerte influencia sobre

la PEGilación o la viscosidad de una disolución de Hb PEGilada alcanza un valor de saturación con la presencia de seis copias de la cadena de PEG-5K por tetrámero.

En la Fig 6 se muestra la presión oncótica coloidal de las muestras de la Hb PEGilada en de la concentración de proteína. La presión oncótica de la muestra aumentó como una función de la concentración de proteína. Este aumento es pequeño con la (PEG5)₂-HbA, y parece aumentar linealmente con la concentración de proteína (en el intervalo de 1 a 6,8 g/dl). Por otra parte, la presión oncótica de las disoluciones de (PEG5)₆-HbA aumentó exponencialmente a medida que aumentó la concentración de proteína. De nuevo, cuando se emparejan las concentraciones, la presión oncótica de la (PEG5)₁₀-Bv-Hb de Enzon es comparable a la de la (PEG5)₆-HbA. Los resultados sugieren que la presión oncótica de una muestra de Hb PEGilada es una correlación directa de la viscosidad de la muestra.

(v) *Propiedades funcionales de la (PEG5)₆-HbA.* En la Tabla I se muestra la afinidad por el oxígeno de la (PEG5)₆-HbA en Bis-Tris 50 mM/Tris acetato 50 mM, pH 7,4 y 37°C y su modulación en presencia de efectores alostéricos. La P50 de Hb disminuyó (una afinidad creciente por el oxígeno) la PEGilación de la HbA, desde el valor control de 8,0 a 6,5. La presencia de un exceso de cinco veces de DPG, un efector que disminuye la afinidad por el oxígeno de la HbA mediante la unión en la hendidura ββ no tuvo influencia significativa sobre la afinidad por el oxígeno. Por otra parte, la presencia de cloruro de sodio 1 M disminuyó la afinidad por el oxígeno de la ligeramente PEGilada (P50 aumento desde 6,5 a 8,5), y es comparable a la de la HbA no modificada en ausencia de cloruro. La afinidad por el oxígeno de la Hb sin modificar, por otra parte, disminuyó significativamente en presencia de cloruro 1,0 M. En presencia de L-35, un efector alostérico que reduce la afinidad por el oxígeno de Hb mediante la unión en el extremo αα de la molécula, aumentó la P50 de (PEG5)₆-HbA, lo que tuvo alguna influencia reductora en la afinidad por el oxígeno, sin embargo, la redujo marcadamente con respecto a la observada en la HbA sin modificar. De esta manera, la PEGilación de HbA basada en la química de la maleimida mediada por tiolación ha inhibido casi completamente la propensión de HbA a responder a la presencia de DPG, y redujo drásticamente la propensión de la molécula de responder al cloruro y a L-35.

Se ha determinado también la afinidad por el O₂ de (PEG5)₆-HbA en PBS, ya que el valor de la muestra en circulación debería ser comparable al obtenido en PBS. Incluso en PBS, (PEG5)₆-HbA presenta una mayor afinidad por el oxígeno (P50 = 9,5 mm de Hg) con respecto a la HbA control (P50 = 15 mm de Hg). La afinidad por el oxígeno de (PEG5)₆-HbA es solo ligeramente mayor que la de (PEG5)₂-HbA (P50 = 11,8). Debido a que la (PEG5)₆-HbA tiene su Cys-93(β) modificada como en la (PEG5)₂-HbA, además de las modificaciones adicionales en los grupos ε H₂ de los restos de la lisina de HbA, los resultados de afinidad por el oxígeno sugieren que la PEGilación mediada por tiolación de los grupos ε amino de HbA por sí mismos no afecta significativamente la afinidad de la Hb por el oxígeno. Decoloración superficial de la HbA mediada por tiolación usando maleido-etil-PEG5K: Los reactivos de maleimida PEG comercialmente disponibles tienen un separador alquilo unido entre el resto maleimida y la cadena de PEG. En un intento por establecer la generalidad del nuevo procedimiento de PEGilación desarrollado en la presente memoria análogamente para los reactivos de maleimida alquil PEG, los inventores han sustituido ahora Mal-Phe-PEG5K en la química de la maleimida mediada por tiolación basándose en la reacción con Mal-Etil-PEG5K. La reacción de la HbA con este PEG procedió también según lo esperado, excepto por una eficacia ligeramente inferior de la reacción. El producto generado y esperado que transporta en promedio seis cadenas de PEG [(SE-PEG5k)₆-HbA proporcionó un modelo de filtración en gel similar al del de (SP-PEG5k)₆-HbA excepto por una elución algo retardada en la filtración en gel. Además, según se muestra en la Tabla 2, el radio molecular de (SE-PEG5k)₆-HbA es ligeramente más pequeño que el de (SP-PEG5k)₆-HbA.

B. Actividad hipertensiva de (PEG5k)₆-HbA.

(i) *Estudios en hámster mediante experimentos de carga superior al 10%.* Se han investigado los cambios en la actividad vasoconstrictora de Hb en la PEGilación con dos y seis copias de cadenas de PEG5K en un experimento de carga superior al 10% en un modelo de ventana en pliegue de piel de hámster midiendo la presión arterial promedio así como midiendo el diámetro arteriolar (A2). Como se observa en la Fig 7A, la infusión de (PEG5k)₂-HbA produjo un aumento inmediato de la presión sanguínea que se resolvió en minutos. Por otra parte, la muestra de (PEG5k)₆-HbA no produjo cambios en la presión sanguínea durante el mismo periodo. La Fig 7B compara el diámetro de la arteria tras varios periodos de infusión del hámster con una carga superior del diez por ciento de disoluciones de (PEG5k)₂-HbA y (PEG5k)₆-HbA. La muestra de (PEG5k)₆-HbA conserva el diámetro alveolar mucho más cercano al valor de partida que el de la muestra de (PEG5k)₂-HbA. Este análisis confirma que la PEGilación de la Hb acelular, a un nivel de seis copias de cadenas de PEG5K, inhibe la vasoactividad intrínseca de la Hb acelular a un nivel significativo.

(ii) *Influencia de la transfusión con un intercambio del 50% con (PEG5k)₆-HbA sobre la densidad capilar funcional en hámsteres.* La Fig 8 representa gráficamente el flujo de sangre capilar en el hámster transfundido con un intercambio del 50% con (PEG5k)₆-HbA y lo compara con el del control (sin transfusión con intercambio) así como con el transfundido con un intercambio del 50% con αα-fumaril HbA. De esta manera, es evidente que los hámsteres transfundidos con un intercambio del 50% con (PEG5k)₆-HbA mantienen una elevada densidad capilar mientras que la αα-fumaril HbA reduce la densidad capilar funcional significativamente. De esta manera, la decoración de la superficie de Hb con cadenas de PEG-5000 puede neutralizar la actividad vasoconstrictora de la Hb acelular.

III. Discusión

Se ha desarrollado un protocolo nuevo, sencillo y flexible para aumentar el tamaño molecular de la Hb sin alterar la carga superficial de la proteína mediante la PEGilación. Este implica la activación de un conjunto de grupos \equiv amino de Hb en condiciones tanto oxi como desoxi mediante reacción con iminotiolano en sitios PEG-maleimida reactivos (tiolación) y a continuación, modificación de la Hb tiolada con la PEG-maleimida deseada. Se ha optimizado esta solución para generar una Hb PEGilada que transporta seis copias de PEG-5000, y se ha encontrado que esta no era hipertensiva.

En ausencia de iminotiolano, la PEGilación de Hb usando PEG-maleimida bajo condiciones oxi está restringida a la modificación de Cys-93(β), es decir, dos copias por tetrámero. Esta Hb PEGilada presenta un volumen hidrodinámico comparable al de la proteína globular con un peso molecular de 128 KDa. Los otros cuatro restos de cisteína están soterrados y no son accesibles para la reacción con la PEG maleimida en las condiciones de reacción usadas. La Cys-93(β) también deja de estar disponible para la reacción con la PEG-maleimida.

El iminotiolano, activa alguno de los grupos \equiv amino de Hb como sitios PEG-maleimida reactivos de manera dependiente de la concentración de iminotiolano. El iminotiolano, que es la forma cíclica del γ -mercaptobutirimidato, no transporta grupos tiol libres, y genera in situ el grupo tiol una vez que reacciona con los grupos \equiv amino. En su reacción con la Hb, un conjunto de grupos \equiv amino reactivos de amidato están derivatizados como restos γ -mercapto butirimidinilo, con un grupo -SH libre en el extremo distal. La carga positiva intrínseca del grupo \equiv amino se conserva en estos grupos \equiv amino derivatizados. Estos nuevos grupos tiol extrínsecos de los grupos tiol son los sitios dirigidos a la unión con las cadenas de PEG de tamaño molecular deseado funcionalizadas como maleimidadas. Sin embargo, otras soluciones para funcionalizar PEG como maleimidadas que utilizan un enlazante de alquilo o un enlazante de alquilamida entre el PEG y la maleimida son igualmente agentes PEGilantes eficaces, es decir, la reacción de PEGilación está basada en la química de la maleimida. Esta solución de PEGilación tiene, de esta manera, la ventaja de conservar la carga neta de la Hb en la Hb PEGilada.

La oxiHb incubada con un exceso molar de diez veces de iminotiolano activa casi cinco grupos \equiv amino de la Hb como sitios PEG-maleimida reactivos. Cuando está presente un exceso molar de 20 veces de PEG-maleimida junto con un exceso molar de 10 veces de iminotiolano, se genera [(PEG5)₆-Hb], un producto PEGilado que tiene, en promedio, seis cadenas de PEG5K. Dos de las seis cadenas de PEG introducidas se encuentran en los grupos sulfhidrilo de Cys-93(β) y el resto en los restos Lys tiolados de la Hb. La Hb que transporta seis cadenas de PEG-5000 parece haber desarrollado un grado de resistencia a la introducción de cadenas de PEG-5000 adicionales. No está claro en esta etapa si esto refleja un grado de cubierta superficial uniforme en la Hb, enmascarando los grupos tiol de otros grupos α -amino superficiales de la Hb que se activan mediante el iminotiolano a partir de la reacción con PEG-maleimida.

La masa calculada de (PEG5)₆-Hb es de ~94 KDa. Sin embargo, en la cromatografía de exclusión molecular, (PEG5)₆-Hb se comporta como si tuviera un tamaño molecular de aproximadamente 250 kDa, es decir, (PEG5)₆-Hb presenta un volumen hidrodinámico que corresponde al de una proteína globular con una masa molecular de ~250 KDa. De esta manera, en la escala molecular de las proteínas globulares, las cadenas de PEG aumentan el volumen hidrodinámico, el volumen molecular de la Hb casi seis veces el de una proteína globular.

Una correlación de aumento en el volumen molecular entre la Hb PEGilada generada anteriormente utilizando PEG-maleimidadas con las generadas en los estudios de la presente invención sugieren respecto a la masa del PEG usado en la dotación de tal aumento de tamaño, sugiere que el empaquetamiento de las cadenas de PEG en cada producto es diferente. En los anteriores estudios de productos PEGilados sitioespecíficos, un aumento en la masa molecular de las cadenas de PEG disminuye la densidad molecular del PEG en la envoltura de PEG de las molecular de tamaño aumentado. Esto puede interpretarse como que el tamaño molecular de las cadenas de PEG ancladas a ambas Cys-93(β), pueden interactuar entre sí, aumentando de esta forma el volumen molecular que el que las cadenas de PEG se que encuentran en movimiento molecular (la envoltura de PEG alrededor de la proteína). Cuando la envoltura de la Hb se ha generado mediante seis cadenas PEG-5000 [dos en las Cys-93(β) y las otras cuatro en los grupos α -amino activados con iminotiolano], parece que se tiene acceso al espacio máximo de sus movimientos moleculares. Los cálculos preliminares con (PEG10)₆-Hb sugieren que el espacio molecular en el interior de las cadenas de PEG que flexan tiene una densidad molecular comparable con la envoltura de PEG de (PEG5)₆-Hb o puede incluso ser menos densa en comparación con la de (PEG5)₆-Hb.

Una observación sorprendente es el hecho que la densidad molecular de la envoltura de PEG de la PEG Hb de Enzon, es considerablemente superior a la de (PEG5)₆-Hb. Las dos Hb PEGiladas se ensamblan mediante dos químicas muy diferentes. la presente PEGilación se lleva a cabo mediante un protocolo conservativo, de forma que la carga neta sobre la molécula de Hb se conserva en el producto PEGilado, es decir, la envoltura hidratada de la proteína debe haber experimentado solo una perturbación limitada en la Hb PEGilada. La PEGilación de Enzon se lleva a cabo mediante un protocolo no conservativo en el que la carga positiva original de los grupos amino α y γ no se ha conservado en el producto final. Por tanto, se puede anticipar que este protocolo perturba la envoltura hidratada de la proteína. Cualquiera que sea la base molecular, los dos enfoques parecen haber generado envolturas de PEG alrededor de la HB que tienen una arquitectura muy diferente (densidad molecular) de las

cadena de PEG en el interior de la envoltura de PEG que está conteniendo la molécula de Hb.

La densidad molecular de la envoltura de PEG de (PEG5)₆-Hb generada mediante la maleidetil-PEG-5000 es superior a la de la envoltura de PEG de la (PEG5)₆-Hb generada con la maleidofenil PEG-5000, pero no tan elevada como la de la PEG-Hb de Enzon. La química de las cadenas de PEG en el sitio de anclado que representa el linaje de conjugación la unión del separador entre el PEG y el grupo de funcionalización, en los tres productos, Hb succinimidofenil PEGilada, Hb succinimidoetil PEGilada y Hb acetamido PEGilada, se ha comparado seguidamente a continuación de manera esquemática. Tanto la Hb maleidofenil PEGilada como la Hb maleidoetil PEGilada tienen un brazo de activación (γ -mercaptobutirimidilo), un grupo de conjugación (succinimidilo) como entidades moleculares comunes. El reactivo Mal-Phe-PEG tiene un fenil etil carbamato como enlazante entre las cadenas PEG y el brazo de conjugación, mientras que el reactivo Mal-etil-PEG tiene un enlazante de etilo. Así, en el primer caso, se utiliza una cadena enlazante más larga, y la presencia del grupo fenilo del enlazante, hace que la cadena sea rígida en esta parte del anclado, mientras que la ausencia del anillo de fenilo en el último caso proporciona a las cadenas de PEG unidas a la Hb un mayor grado de libertad rotacional. Por otra parte, la PEG-Hb de Enzon no tiene este brazo de activación, y por tanto, la cadena de PEG está muy próxima a la superficie de la proteína. Tiene un resto acetamidilo como grupo de conjugación, y ni dispone de grupo enlazante entre la unidad de conjugación y las cadenas PEG. Como se espera que la unión isopeptídica del brazo de conjugación tenga un carácter parcial de doble enlace, se puede anticipar también un grado de rigidez intrínseco para este enfoque químico de la PEGilación. De este modo, en la estrategia de Enzon (enfoque conservativo para la PEGilación), coloca el PEG muy cerca de la superficie de la proteína (a unos 2-3 Å desde la carga positiva original del grupo ϵ amino) mientras que la PEGilación basada en PEG-maleimida mediada por tiolación coloca la cadena de PEG lejos de la superficie de la proteína (aproximadamente 15 a 21 Å lejos en la conformación extendida desde la carga positiva original de los grupos ϵ amino). Por tanto, la envoltura de PEG generada por PEGilación conservativa podría tener una esfera de hidratación bien definida de la Hb entre el núcleo de la proteína y la envoltura de la PEG. Esto sugiere que la densidad molecular del PEG en el interior de la envoltura de PEG en la Hb PEGilada es función tanto de la química del enlazante (unión entre el PEG y la maleimida) y la química de acoplamiento, la unión entre las cadenas secundarias de PEG Hb.

El hallazgo importante de la presente invención es que la (PEG5k)₆-Hb es no hipertensiva. Son las propiedades fisicoquímicas de la (PEG5k)₆-Hb las que dan como resultado la neutralización de la actividad hipertensiva intrínseca de la Hb acelular. (PEG5k)₆-HbA es claramente una molécula de Hb de tamaño aumentado. El aumento del tamaño molecular de la Hb ha sido una de las primeras estrategias de diseño avanzadas para superar la actividad hipertensiva de la Hb basándose en el concepto de que Hb se extravasa al espacio intersticial y de este modo sería más efectiva para atrapar el NO que la Hb circulante en el plasma. Este concepto parece estar respaldado por la observación de que la Hb oligomerizada con un tamaño molecular en el intervalo de 250 kDa es menos vasoactiva. Es de interés resaltar aquí que, muy recientemente, Matheson y col han producido un producto oligomerizado que tiene un tamaño molecular bastante superior a 300 kDa y que tiene un radio molecular promedio de 24 nm (un producto heterogéneo con distribución de radios entre 12 y 33 nm) que no aparece en la linfa hilar renal lo que indica ausencia de extravasación. Este producto también resulta completamente inhibido por la respuesta hipertensora. La observación de Sakai demuestra una correlación entre el tamaño molecular y los efectos hipertensores, la extensión de la respuesta hipertensora es inversamente proporcional al tamaño molecular. La Hb encapsulada con diámetros cercanos a 1000 nm no produce vasoconstricción. Sin embargo, el tamaño molecular de la (PEG5k)₆-Hb es solo de aproximadamente 7 nm y es comparable al tamaño molecular de la versión presente de muchas Hb oligomerizadas que se encuentran en los ensayos clínicos. como la mayor parte de estas muestras grados variables de vasoconstricción, el aumento de tamaño por sí mismo no puede ser el factor principal que vuelve la (PEG5k)₆-Hb no hipertensiva.

Sin embargo, el hecho de que la Hb PEGilada conservativamente de la presente invención transporta, de promedio, seis copias de las cadenas PEG-5000 sea no hipertensiva y muestre una viscosidad y la presión oncótica comparable a la de la PEG-Bv-Hb de Enzon representa una serie de ventajas potenciales de la nueva tecnología de PEGilación conservativa de la presente invención. (i) La PEGilación conservativa de Hb con seis copias de cadenas PEG-5000 por tetrámero da lugar a un aumento de tamaño (aumento en el volumen hidrodinámico) mejor que el proporcionado mediante la PEGilación no conservativa de la Hb bovina con diez copias de cadenas PEG-5000. (ii) La mayor eficacia para aumentar el volumen hidrodinámico en la PEGilación conservativa de sugiere que el empaquetamiento de las cadenas PEG en la superficie molecular de la Hb es menos densa. Esto es consistente con la densidad molecular calculada del PEG en la nueva envoltura hidratada (envuelta rellena de agua) generada por las cadenas de PEG alrededor de la molécula de Hb. (iii) La tecnología de PEGilación conservativa aumenta la viscosidad y la presión oncótica de forma más eficaz que la PEGilación no conservativa; esto resulta cuando la comparación se normaliza a una cadena PEG--5000 unida covalentemente a la Hb. Esto sugiere el papel potencial de la densidad molecular del PEG en la nueva envoltura de PEG generada alrededor de la Hb mediante PEGilación en la determinación de los cambios de viscosidad asociados a la decoración superficial con PEG, y a su propensión para generar una molécula de Hb no hipertensiva.

Los diseños anteriores de los portadores de oxígeno basados en Hb intentaron imitar la afinidad de los eritrocitos por el oxígeno, para conseguir una baja afinidad por el oxígeno. La elección de la Hb bovina para generar Hb PEGilada por Enzon fue para dotar al producto final de una baja afinidad por el oxígeno. Al aumentar la afinidad por el oxígeno

de la Hb bovina mediante la PEGilación no conservativa, la afinidad por el oxígeno de la actual Hb PEGilada conservativamente es considerablemente superior que la de la Hb PEGilada de Enzon. La teoría de la autorregulación a revelado que cuando se infunden portadores de oxígeno basados en Hb con baja afinidad por el oxígeno a parece la vasoconstricción como consecuencia de un mayor suministro de oxígeno en el lado arterial de la circulación. Predice que la vasoconstricción se puede reducir al aumentar la afinidad por el oxígeno de los portadores de oxígeno basados en Hb. La afinidad por el oxígeno de la (PEG5k)₆-HbA es superior a la de la PEG-Hb de Enzon, y el aspecto no hipertensivo de la Hb PEGilada conservativamente actual como solo seis copias de PEG-5000 (en comparación con la que tiene diez copias de PEG-5000 en la PEG-Hb de Enzon que tiene una afinidad por el oxígeno ligeramente inferior a la de la Hb PEGilada conservativamente actual) puede ser el reflejo de la contribución de la mayor afinidad por el oxígeno de la presente preparación. Según esto especulamos que la propiedad no hipertensiva de la (PEG5k)₆-Hb es un evento multifactorial, y requiere el diseño de varias especies de Hb, que imiten solo una de las propiedades físicas o funcionales de la Hb y establezcan la vasoactividad de dichas moléculas.

(PEG5k)₆-Hb, la Hb PEGilada conservativamente, tiene muchos de los atributos que se han avanzado durante años como necesarios para minimizar la vasoactividad de la Hb acelular: (i) afinidad por el oxígeno de la Hb aumentada para limitar la baja carga de oxígeno de la Hb acelular en las arteriolas vasoactivas; (ii) retención de la unión cooperativa para asegurar la baja carga del oxígeno en el lecho capilar; (iii) un tamaño molecular (volumen hidrodinámico) aumentado para reducir la extravasación; (iv) un aumento en la viscosidad de la disolución de Hb tanto para crear la tensión de cizalladura adecuada en las paredes de las arteriolas como para disminuir las constantes de difusión de la oxiHb y el oxígeno, dióxido de carbono y/o óxido nítrico; y (v) un aumento de la presión coloidal respecto de las Hb modificadas convencionales, lo que aumenta la eficacia del sustituto sanguíneo como expensor del plasma, que es un rasgo diseñado en la formulación de muchos expansores de plasma. Así, la observación de que (PEG5k)₆-Hb no lo hace resulta una sorpresa.

Aunque la(s) identidad(es) de los diferentes parámetros físicos y propiedades funcionales con las que (PEG5k)₆-Hb está dotada no son evidentes en la molécula en este momento, esta nueva Hb PEGilada conservativamente debe considerarse como un miembro de una clase novedosa de portadores de oxígeno basados en Hb in que se separa de las estrategias de diseño convencionales para desarrollar portadores de oxígeno basados en Hb. También debe reseñarse aquí, que dotar de un conjunto de propiedades coligativas y de afinidad por el oxígeno no es suficiente por sí mismo para volver la molécula no hipertensiva. Como demostraron recientemente Manjula y col (2003) el aumento del volumen molecular con una Hb PEGilada con una elevada afinidad por el oxígeno (afinidad por el oxígeno comparable a la de la (PEG5k)₆-Hb) [PEGilada de forma sitioespecifica en la Cys-93(β)], la viscosidad y la presión oncótica aumentaron, pero sin ningún cambio significativo en la vasoactividad de la Hb. Por otra parte, (PEG5k)₆-Hb que tiene una masa neta inferior de cadena PEG por tetrámero que la (PEG20)₂-Hb es no hipertensiva. El mejor apantallamiento de la superficie molecular de la Hb por las seis copias de cadenas PEG-5K en relación al conseguido por las dos copias de PEG-20K es probablemente la mejor explicación de esta observación. Esto suscita una importante pregunta, que es conocer si el posicionamiento de las cadenas de PEG-5K en la superficie molecular de la Hb tiene algún papel en la consecución del apantallamiento de la superficie molecular de la Hb. Si esto es así, puede tratarse de la contribución de la tiolación mediada por iminotiolano sobre la . La identificación de los sitios de la Hb que se encuentran tiolados mediante el iminotiolano y la preparación de Hb PEGilada de forma sitioespecificas con un número de copias de cadenas PEG-5000 bien definidas es fundamental para mejorar el conocimiento sobre este aspecto de la reacción de PEGilación. Como la Hb PEGilada de Enzon, primer ejemplo de Hb no hipertensiva que pertenece a la clase de PEGilado que transporta diez cadenas PEG, tampoco es evidente si se necesita un mayor nivel de PEGilación en la Hb para generar una Hb no hipertensiva cuando se utiliza un protocolo no conservativo para generar la Hb PEGilada y también cuál es el nivel óptimo de PEGilación, de afinidad por el oxígeno necesaria para generar una Hb no hipertensiva.

La decoración de la superficie de la molécula basada en PEG-maleimida mediada por tiolación dependiente de iminotiolano con cadenas de PEG-5000 ha superado los principales impedimentos actuales para el desarrollo de portadores de oxígeno basados en Hb, concretamente la actividad hipertensiva de la Hb acelular. La tecnología de PEGilación desarrollada aquí es muy simple, se puede llevar a cabo en condiciones oxi y no implica complejos protocolos de purificación cromatográfica para aislar la Hb PEGilada. En el diseño de esta tecnología de la PEGilación conservativa, se ha considerado especialmente la minimización de reacciones secundarias, especialmente en comparación con la reacción de acilación, la reacción de PEGilación no conservativa utilizada para desarrollar la Hb PEGilada de Enzon. La selectividad de la amidinación de los grupos ϵ amino de la Hb por el iminotiolano, la elevada eficacia de la derivatización que es considerablemente superior a la acilación de los grupos α y ϵ amino tanto mediante el uso de ésteres o anhídridos activos son algunos de los aspectos ventajosos de este protocolo de PEGilación novedoso. La estabilidad del iminotiolano, así como de la PEG-maleimida, es considerablemente superior a la de los ésteres activos de succinimidilo y de los anhídridos de ácido de los PEG-ácido. De acuerdo con esto, el exceso de PEG-maleimida necesario para introducir un número dado de cadenas PEG mediante la tiolación conservativa mediada por iminotiolano será considerablemente inferior a la necesaria en el protocolo de PEGilación no conservativa utilizada para generar la versión anterior de la Hb PEGilada no hipertensiva. La producción de una molécula de Hb no hipertensiva mediante esta tecnología no necesita un complejo montaje de desoxidación. De acuerdo con esto, la nueva tecnología de PEGilación es muy económica para generar una Hb no hipertensiva.

Tabla I: Dimensiones moleculares de la HbA PEGilada con Mal-Phe-PEG

Muestra	Masa en daltons	Radio nm	Volumen molecular m ³	Masa del PEG daltons	Aumento del volumen	PEGMasa/Inc. en Vol (Densidad molecular de la envoltura de PEG)
HbA	64000	3,12	127	0	-	-
P5K2-HbA	74000	4,2	310	10000	183	54,6
P10K2-HbA	84000	5,54	712	20000	585	34,2
P20K2-HbA	104000	7,0	1436	40000	1309	30,6
P5K6-HbA	94000	6,81	1322	30000	1195	25,1
P10K6-HbA	124000	9,25	3314	60000	3186	18,8
Enzon PEG-Hb	114000	5,53	708	50000	581	86,1
(P5K10-Hb Bovina)						
Octámero	128000	4,12	293	-	-	-
Dodecámero	192000	5,56	720	-	-	-

Tabla II: Afinidad por el oxígeno de la (PEG5k)₆-HbA y su modulación mediante efectores alostéricos

Tampón	HbA	(PEG5k) ₆ -HbA
Sin efectores	8,0 (2,5)	6,5 (2,2)
DPG	22,5 (2,3)	5,5 (2,0)
NaCl	24,0 (2,4)	8,2 (1,9)
L35	57,0 (1,7)	12,0 (1,5)
PBS	15,3 (2-7)	8,5 (1,8)

5

Se determinó la afinidad por el oxígeno de las muestras en Bis-tris 50 mM/tris acetato 50 mM, pH 7,4 y a 37 °C usando el Hem-O-scan. La concentración de proteína se mantuvo alrededor de 0,6 mM. Las muestras analizadas mostraron menos de 2% met Hb.

Listado de referencias citadas

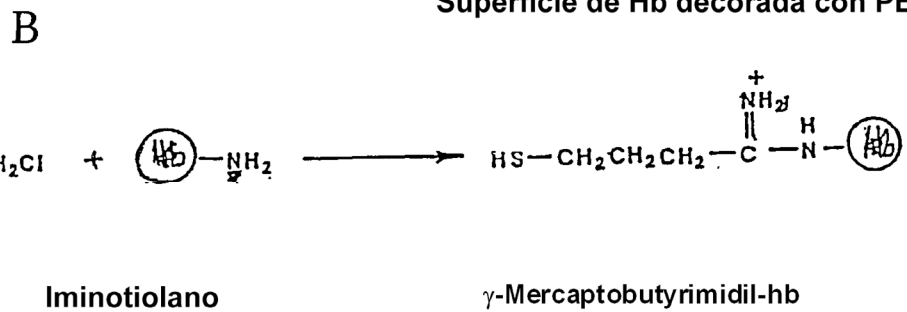
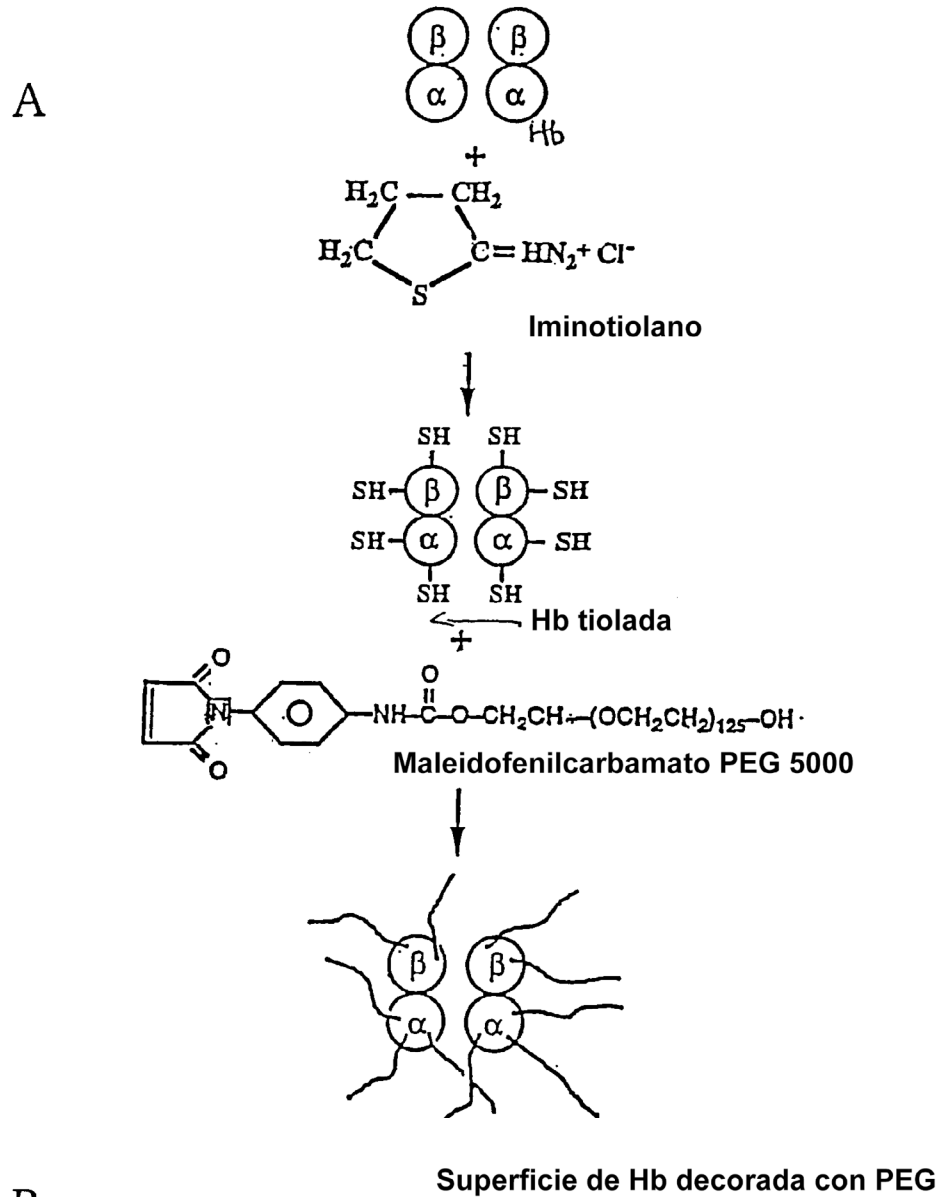
- 10 Savitsky J, Doczi J, Black J y col. A clinical safety trial of stroma-free hemoglobin. Clin Pharmacol Therap 1978;23:73-80.
- Sloan EP, Koenigsberg M, Gens D y col. Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock. A randomized controlled efficacy trial. J Amer Med Assoc 1999;282:1857-64.
- 15 Saxena R, Wijnhoud AD, Carton H y col. Controlled safety study of a hemoglobin-based oxygen carrier, DCLHb, in acute ischemic stroke. Stroke 1999;30:993-6.
- Hess, J.R., Macdonald, V.W. y Brinkley, W.W. (1993) Systemic and pulmonary hypertension after resuscitation with cell free hemoglobin. J.Appl.Physiol. 74:1769-1778.
- Thomson, A., McGarry, A.E., Valeri, C.R. y Lieberthal. W. (1994) Stroma-free hemoglobin increases blood pressure and GFR in the hypotensive rat: role of nitric oxide. J.Appl.Physiol. 77:2348-2354.
- 20 Muldoon, S.M., Ledvina, M.A., Hart, J.L. y Macdonald, V.W. (1996) Hemoglobin-induced contraction of pig pulmonary veins. J.Lab.Clin.Med. 128:579-584.

- Macdonald, V.W. y Motterlini. R. (1994) Vasoconstrictor effects in isolated rabbit heart perfused with bis(3,5-dibromosalicyl) fumarate crosslinked hemoglobin. *Artificial Cells, Blood Substitutes and Immobilization Biotechnology* 22:565-575.
- 5 Furchgott, R. (1984) The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Ann.Rev. Pharmacol.* 24:175-197.
- Kilbourn, R., Ghislaine, J., Cashon, B., DeAngelo, J. y Bonaventura. J. (1994) Cell-free hemoglobin reverses the endotoxin mediated hyporesponsivity of rat aortic rings to α -adrenergic agents. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 199:155-162.
- 10 Doherty DH, Doyle MP, Curry SR y col. Rate of reaction with nitric oxide determines the hypertensive effect of cell-free hemoglobin. *Nature Biotechnology* 1998;16:672-6.
- Winslow, R.M., Gonzales, A., Gonzales, M.L., Magde, M.D., McCarthy, M., Rohlfes, R.J. y Vandegriff. K.D. (1998) Vascular resistance and efficacy of red cell substitutes in a rat hemorrhage model. *J.Appl.Physiol.* 85:993-1003.
- 15 Vandegriff, K.D., Rohlfes, R.J. y Winslow, R.M. (1997) Colloid osmotic effects of hemoglobin-based oxygen carriers. In *Advances in Blood Substitutes: Industrial Opportunities and Medical Challenges*. R.M. Winslow, K.D. Vandegriff, and M. Intaglietta, editors. Birkhauser, Boston. 207-227.
- Vandegriff K, McCarthy M, Rohlfes R y col. (1998) Colloid osmotic properties of modified hemoglobins: chemically cross-linked versus polyethylene glycol surface-conjugated. *Biophys Chem* 1997;69:23-30.
- 20 Winslow RM, Vandegriff KD. Hemoglobin oxygen affinity and the design of red cell substitutes. In: Winslow RM, Vandegriff KD, Intaglietta M, eds. *Advances in Blood Substitutes. Industrial Opportunities and Medical Challenges*. Boston: Birkhäuser, 1997;167-88.
- Vandegriff K, Winslow R. A theoretical analysis of oxygen transport: A new strategy for the design of hemoglobin-based red cell substitutes. En: Winslow R, Vandegriff K, Intaglietta M, eds. *Blood substitutes. Physiological basis of efficacy*. Nueva York: Birkhäuser, 1995;143-54.
- 25 McCarthy MR, Vandegriff KD, Winslow RM. The role of facilitated diffusion in oxygen transport by cell-free hemoglobin: Implications for the design of hemoglobin-based oxygen carriers. *Biophysical Chemistry* 2001;92:103-17.
- Acharya, A. S., Manjula, B. N. y Smith, P. K. Hemoglobin crosslinkers. (1996) US Patent 5,585,484. Winslow RM. *New transfusion strategies: Red cell substitutes*. *Ann Rev Med* 1999;50:337-53.
- 30 Traut, R. R., Bollen, A., Sun, T. T., Hershey, J. W. B., Sundberg, J., y Pierce, L. R., (1973). Methyl mercapto bytyrimidate as a cleavable croo-linking reagent and its application to the Escherichia coli 30 S ribosome, *Biochemistry*, 12, 3266.
- Acharya A.S. y Manning J.M. (1983) Reaction of glycolaldehyde with proteins: Latent crosslinking potential of α -hydroxy aldehydes. *Proc.Natl.Acad.Sci., USA* 80:3590-3594.
- Ampulski R, Ayers V, Morell S. Determination of the Reactive Sulfhydryl Groups in Heme Proteins with 4,4'-dipyridinedisulfide. *Biochem Biophys Acta* 1969;163-9.
- 35 Juszcak, L.J., Manjula B.N., Bonaventura, C., Acharya A.S. and Friedman, J.M. (2002) UV Resonance Raman study of β 93-modified hemoglobin A: Chemical modifier-specific effects and added influences of attached poly (ethylene glycol) chains. *Biochemistry* 41:376-385.
- Khan, I, Dansker, D., Samuni, U., Friedman, A.J., Bonaventura, C., Manjula B.N., Acharya, A.S. and Friedman, J.M. (2001) Cys-93(b) modified hemoglobin: Kinetic and conformational consequences. *Biochemistry* 40:7581-7592.
- 40 Mirhashemi y col., (1998) Effects of hemodilution on skin microcirculation. *Am J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.* 23) 254:H411-H416.
- Tsai y col. (1996) Microvascular oxygen distribution: effects due to free hemoglobin plasma. In *Blood Substitutes. New Challenges*. R.M. Winslow, K.D., Vandegriff and M. Intaglietta, editors, Boston. 124-131.
- 45 Matheson, y col. (2002). Vascular response to infusions of a nonextravasating hemoglobin polymer. *J. Appl. Physiol.* 93: 1479-86.
- Sakai y col. (2000). Molecular dimensions of Hb-based O₂ carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension. *Am. J. Physiol.* 279:H908-H915.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de hemoglobina (Hb) no hipertensiva que tiene de seis a siete cadenas de PEG, en la que dos de dichas cadenas de PEG están unidas a la Cys-93(β) de la Hb, y el resto de cadenas de PEG están unidas a grupos tiol introducidos en ϵ -H₂ de la Hb.
- 5 2. La molécula de hemoglobina de la reivindicación 1, en la que cada cadena de PEG tiene un peso molecular de 3000-10.000 daltons.
3. La molécula de hemoglobina de la reivindicación 1 o 2, en la que cada cadena de PEG tiene un peso molecular de 5000 daltons.
- 10 4. La molécula de hemoglobina de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que cada cadena de PEG está unida a la Hb mediante un enlace succinimidilo.
5. Un procedimiento para preparar una molécula de hemoglobina (Hb) no hipertensiva modificada para tener de seis a siete cadenas de PEG, que comprende las etapas de:
- (a) hacer reaccionar la Hb con un exceso de 8-15 veces de iminotiolano para formar Hb tiolada;
- 15 (b) hacer reaccionar la Hb tiolada con un exceso de 16-30 veces de PEG funcionalizado con un resto maleimida, para formar la Hb modificada que tiene de seis a siete cadenas de PEG; y
- (c) aislar la Hb modificada que tiene de seis a siete cadenas de PEG.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la Hb se hace reaccionar con un exceso de 9-12 veces de iminotiolano en la etapa (a).
- 20 7. El procedimiento de la reivindicación 5 o 6, en el que la Hb se hace reaccionar con un exceso de 10 veces de iminotiolano en la etapa (a).
8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en el que la Hb tiolada se hace reaccionar con un exceso de 18-22 veces de PEG funcionalizado con un resto maleimida en la etapa (b).
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en el que la Hb tiolada se hace reaccionar con un exceso de 20 veces de PEG funcionalizado con un resto maleimida en la etapa (b).
- 25 10. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la Hb se hace reaccionar con un exceso de 9-12 veces de iminotiolano en la etapa (a), y la Hb tiolada se hace reaccionar con un exceso de 18-22 veces de PEG funcionalizado con un resto maleimida en la etapa (b).
- 30 11. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la Hb se hace reaccionar con un exceso de 9-12 veces de iminotiolano en la etapa (a), y la Hb tiolada se hace reaccionar con un exceso de 20 veces de PEG funcionalizado con un resto maleimida en la etapa (b).
12. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la Hb se hace reaccionar con un exceso de 10 veces de iminotiolano en la etapa (a), y la Hb tiolada se hace reaccionar con un exceso de 18-22 veces de PEG funcionalizado con un resto maleimida en la etapa (b).
- 35 13. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la Hb se hace reaccionar con un exceso de 10 veces de iminotiolano en la etapa (a), y la Hb tiolada se hace reaccionar con un exceso de 20 veces de PEG funcionalizado con un resto maleimida en la etapa (b).
14. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 5-13 en el que el PEG tiene un peso molecular de 3.000-10.000 daltons.
- 40 15. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 5-14 en el que el PEG tiene un peso molecular de 5.000 daltons.

FIG. 1



Amidinación del grupo amino de la Hb mediante iminotiolano

FIG. 2A

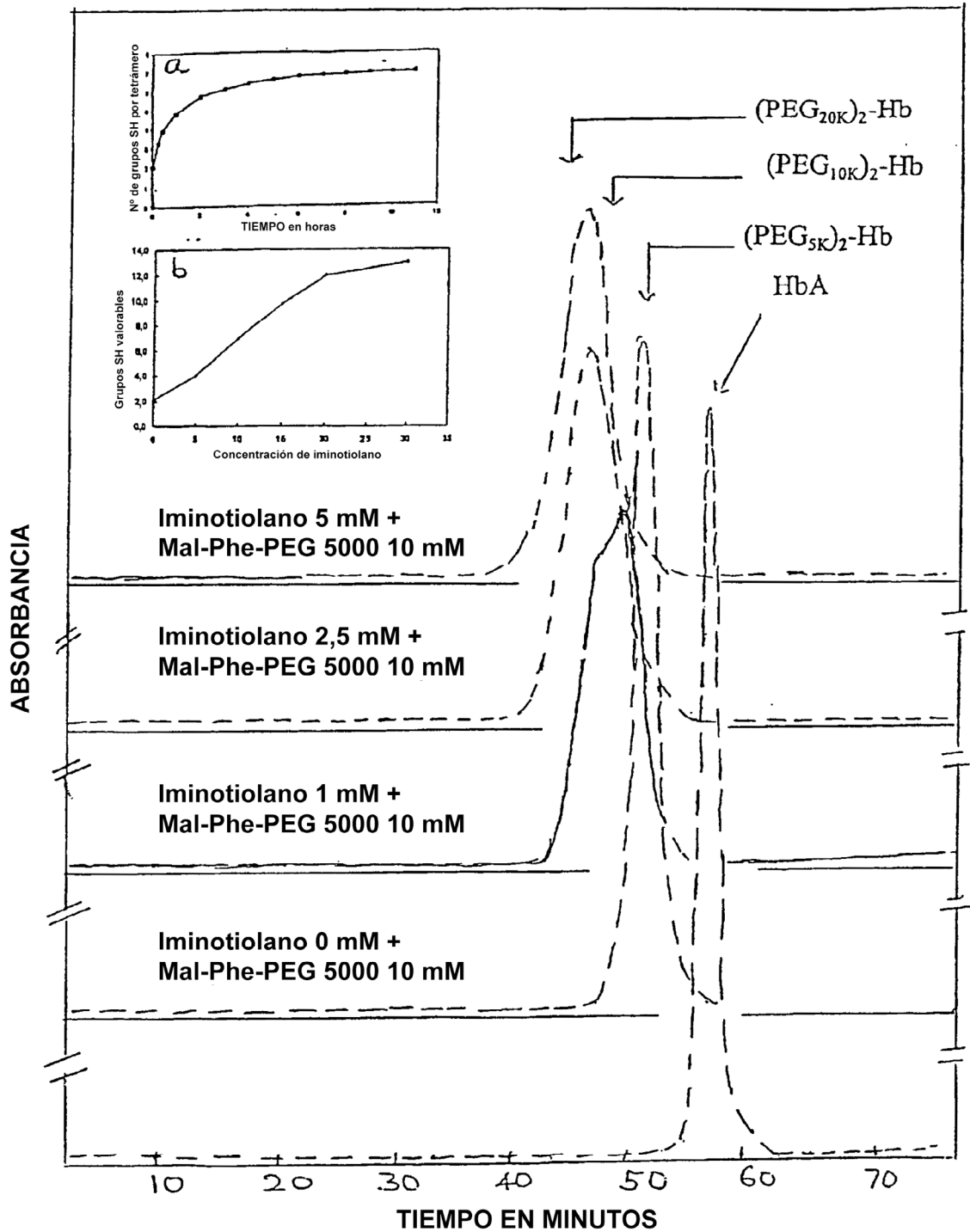


FIG. 2B

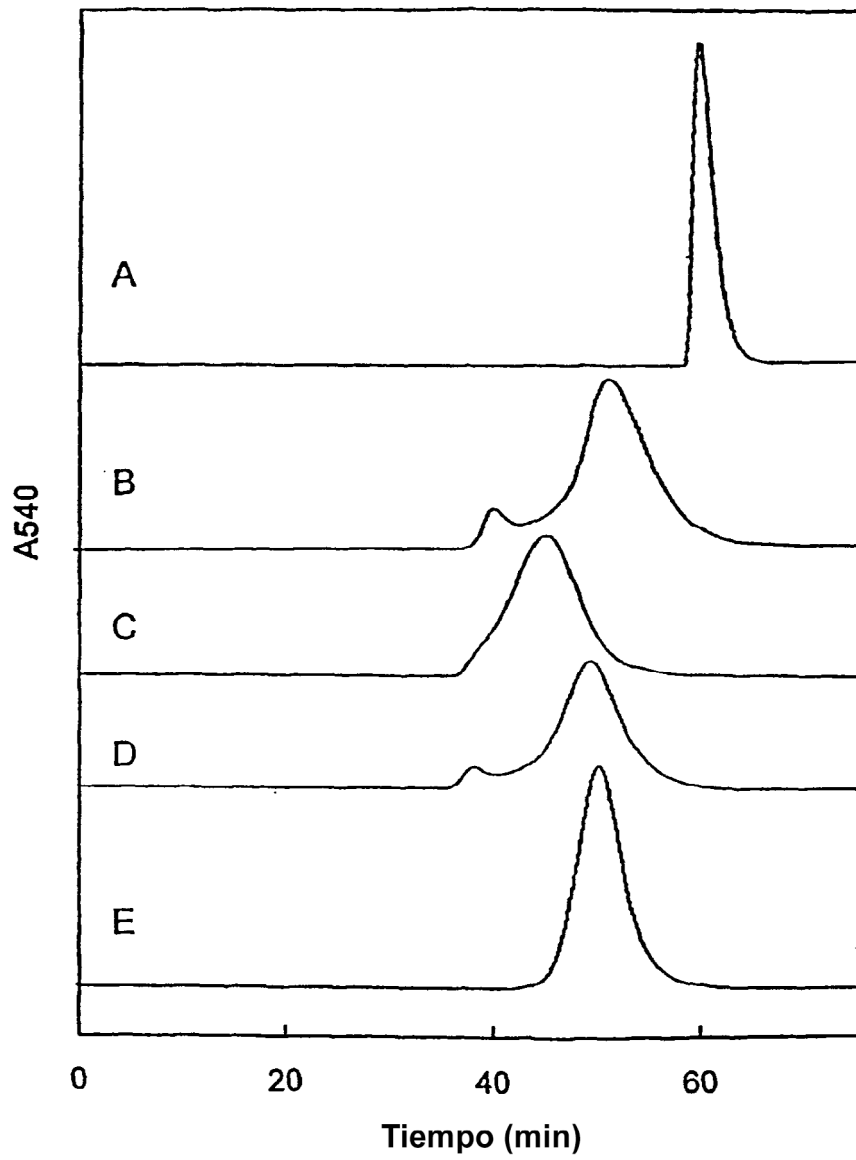


FIG. 3

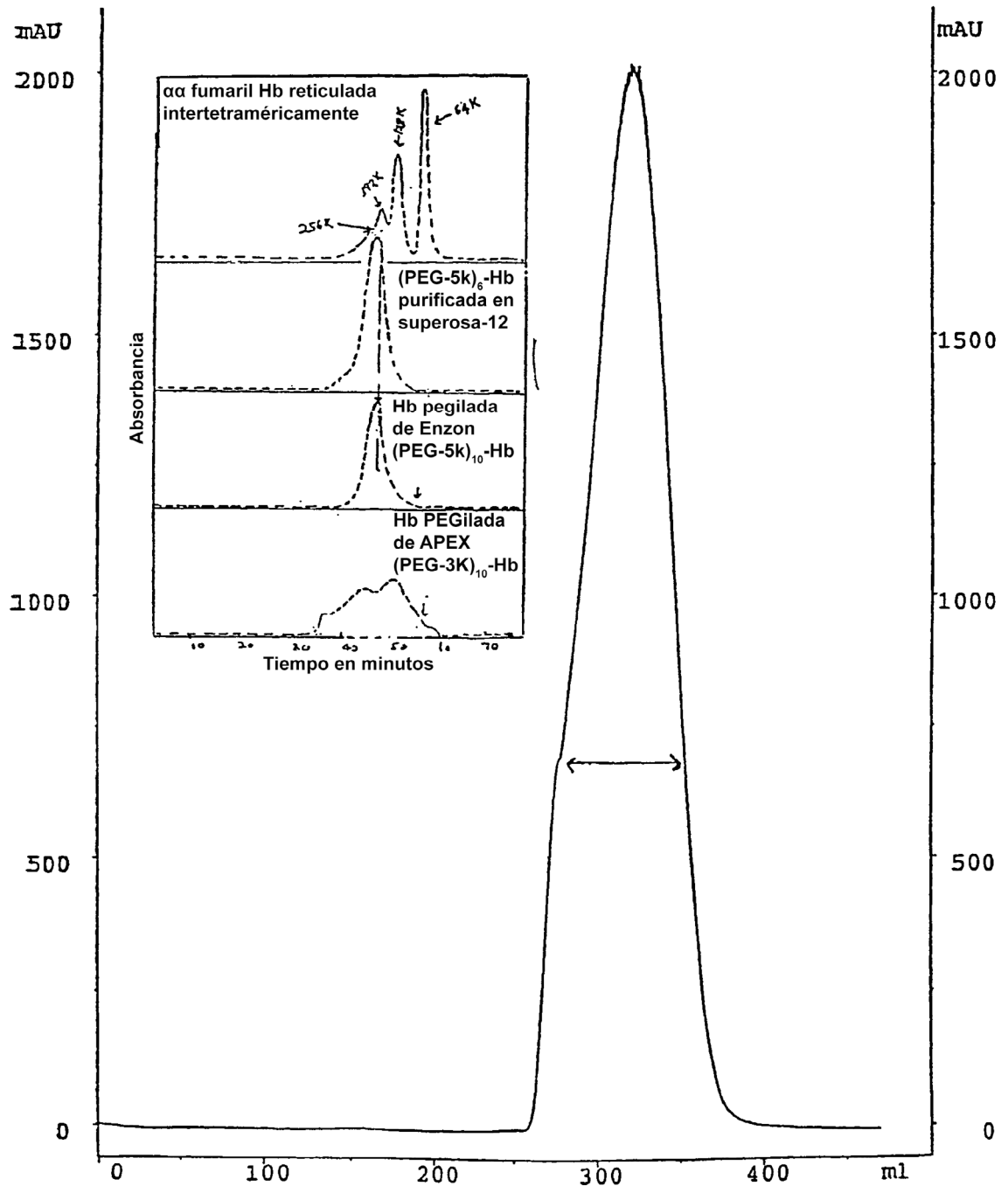
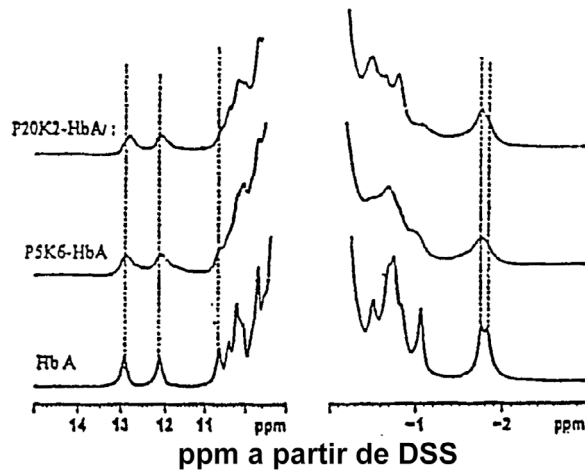


FIG. 4

Espectros de RMN ^1H a 300 MHz de disoluciones al 3% de HbA, P5K6-HbA, P20K2-HbA/ en forma CO [(A) y (B)] y en la forma desoxi [(C) y (D)] en H_2O en tampón fosfato 0,1M en presencia de D_2O al 5% a pH 7,0 y a 29° C.

A. Resonancias de protón intercambiable

B. Resonancias de protón con desplazamiento actual de anillo



C. Resonancias de histidinas proximales en $\text{N}\delta\text{H}$ con desplazamiento hiperfino

D. Resonancias de protón intercambiable y con desplazamiento hiperfino

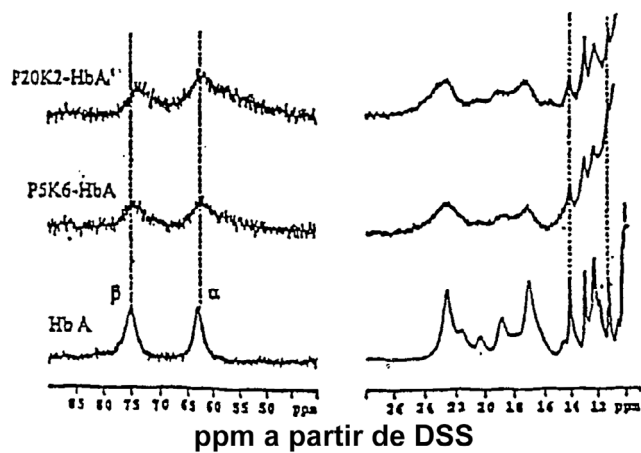


FIG. 5

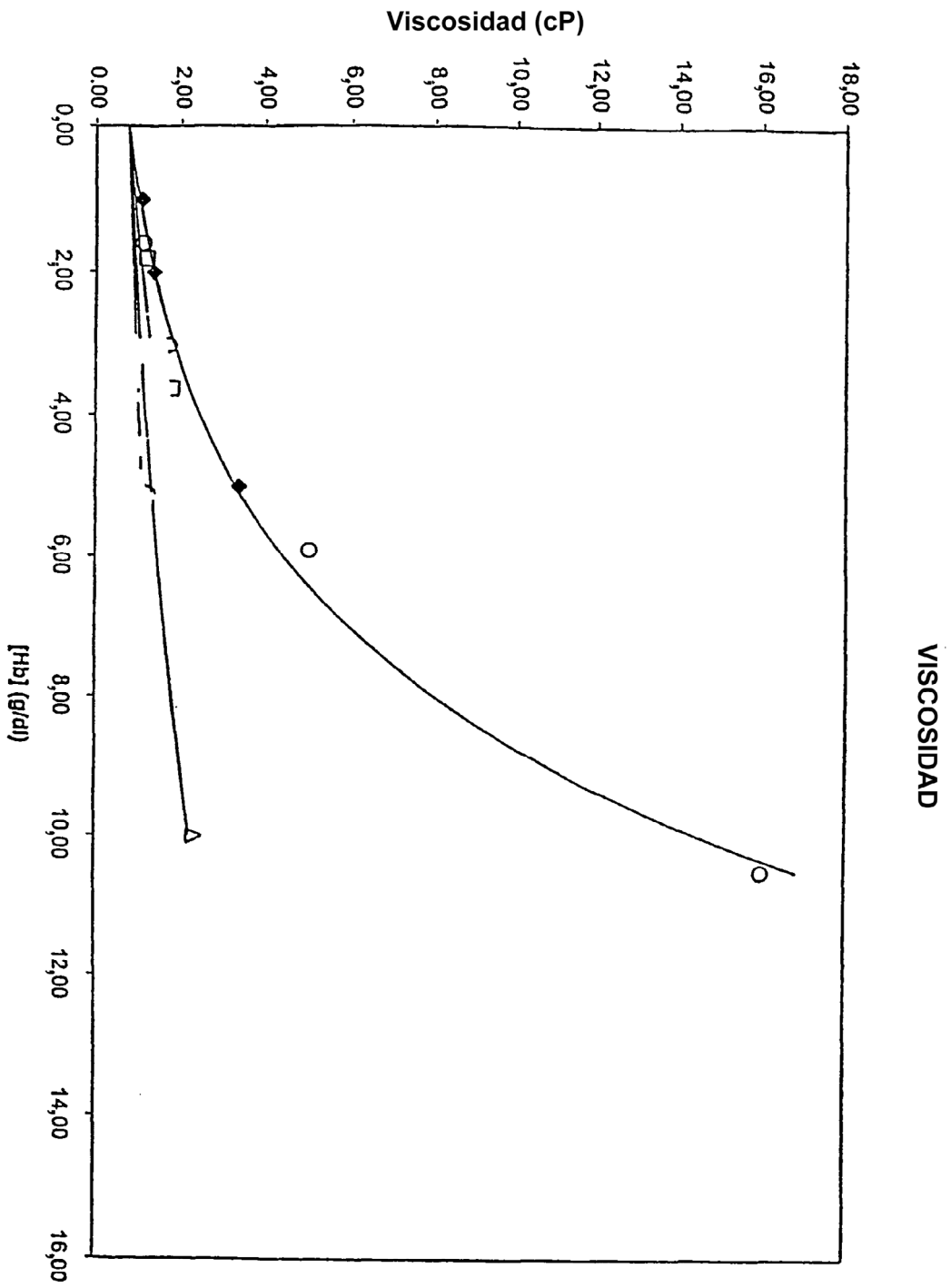
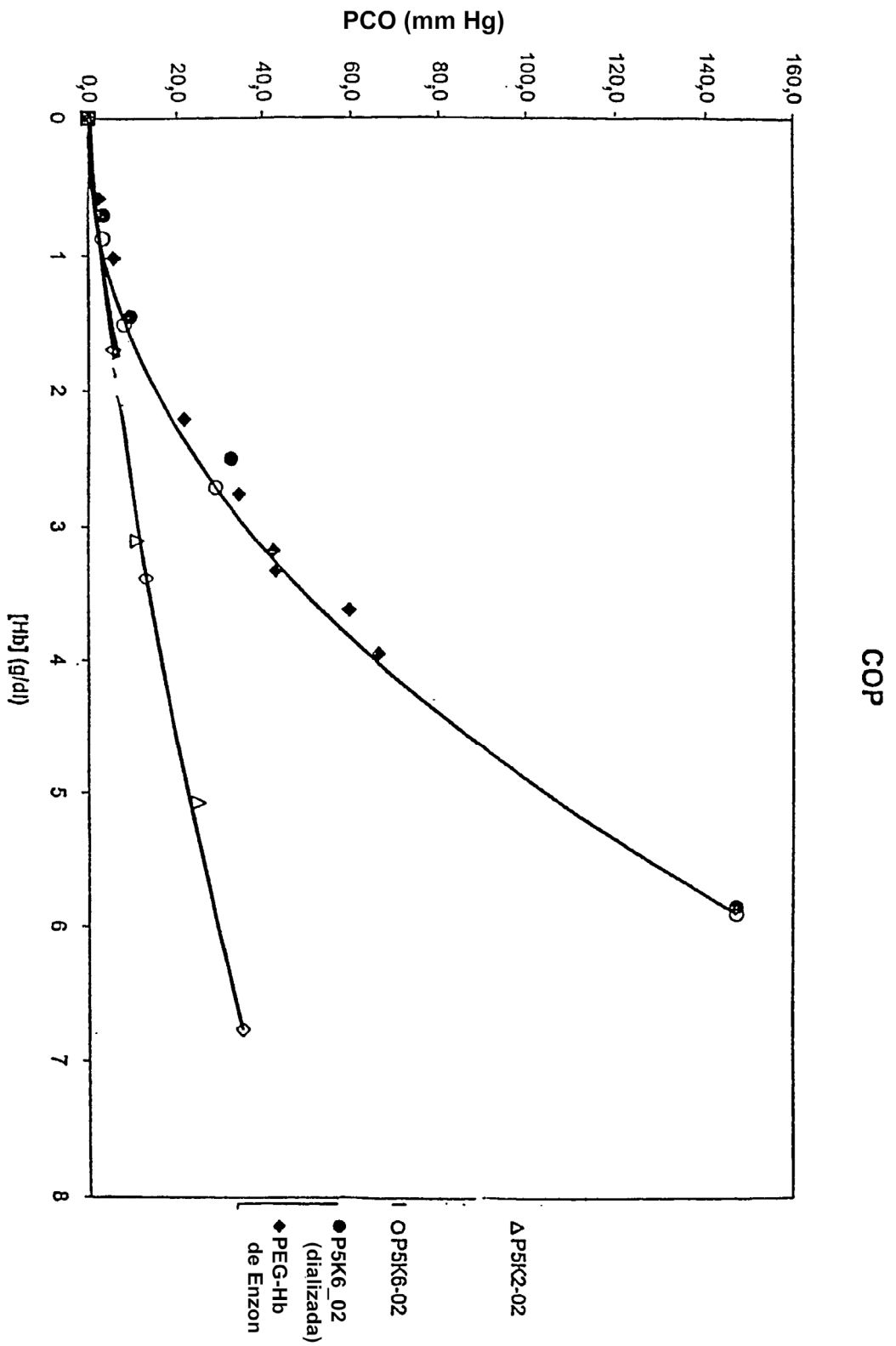


FIG. 6



Presión sanguínea

FIG. 7A

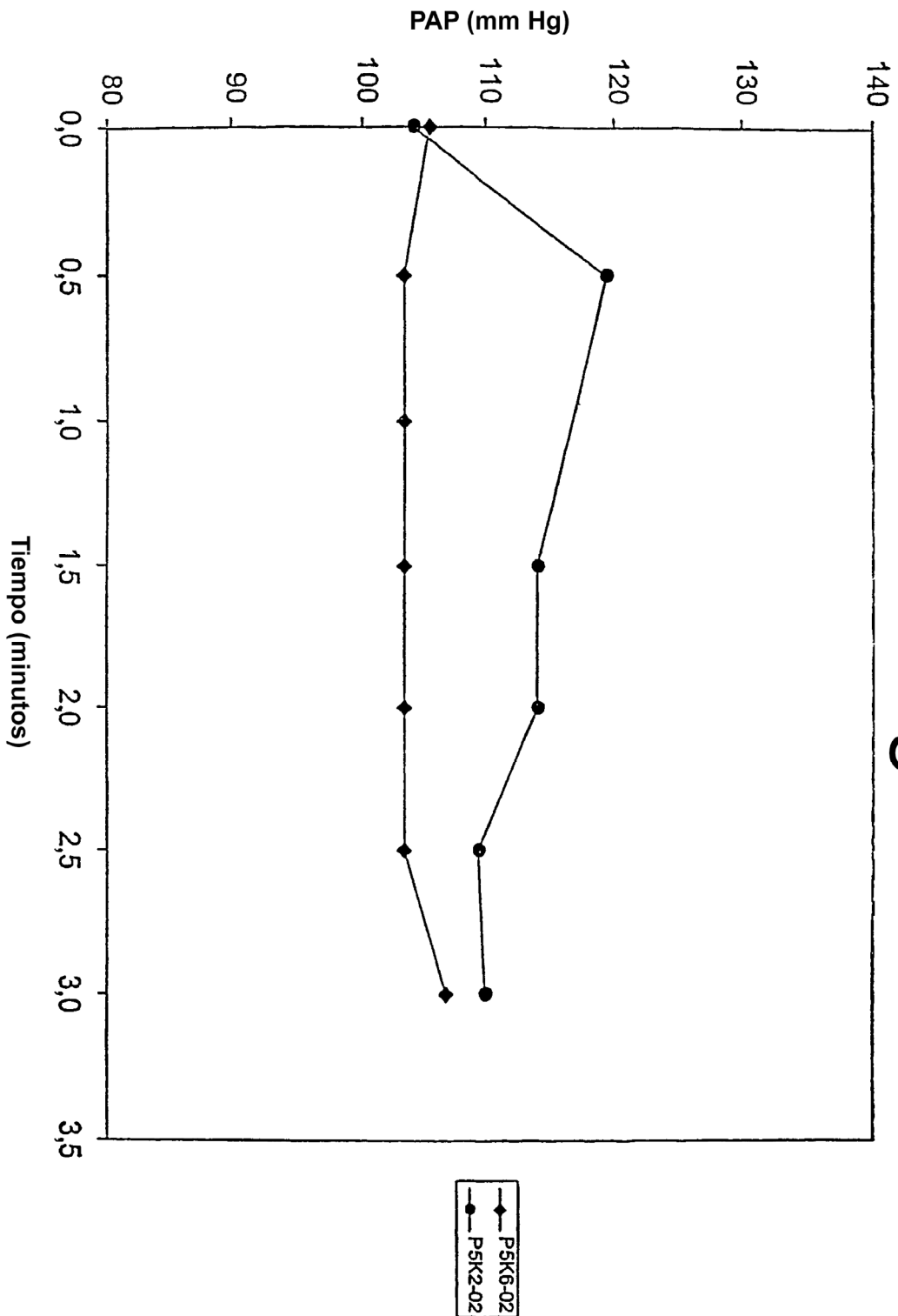
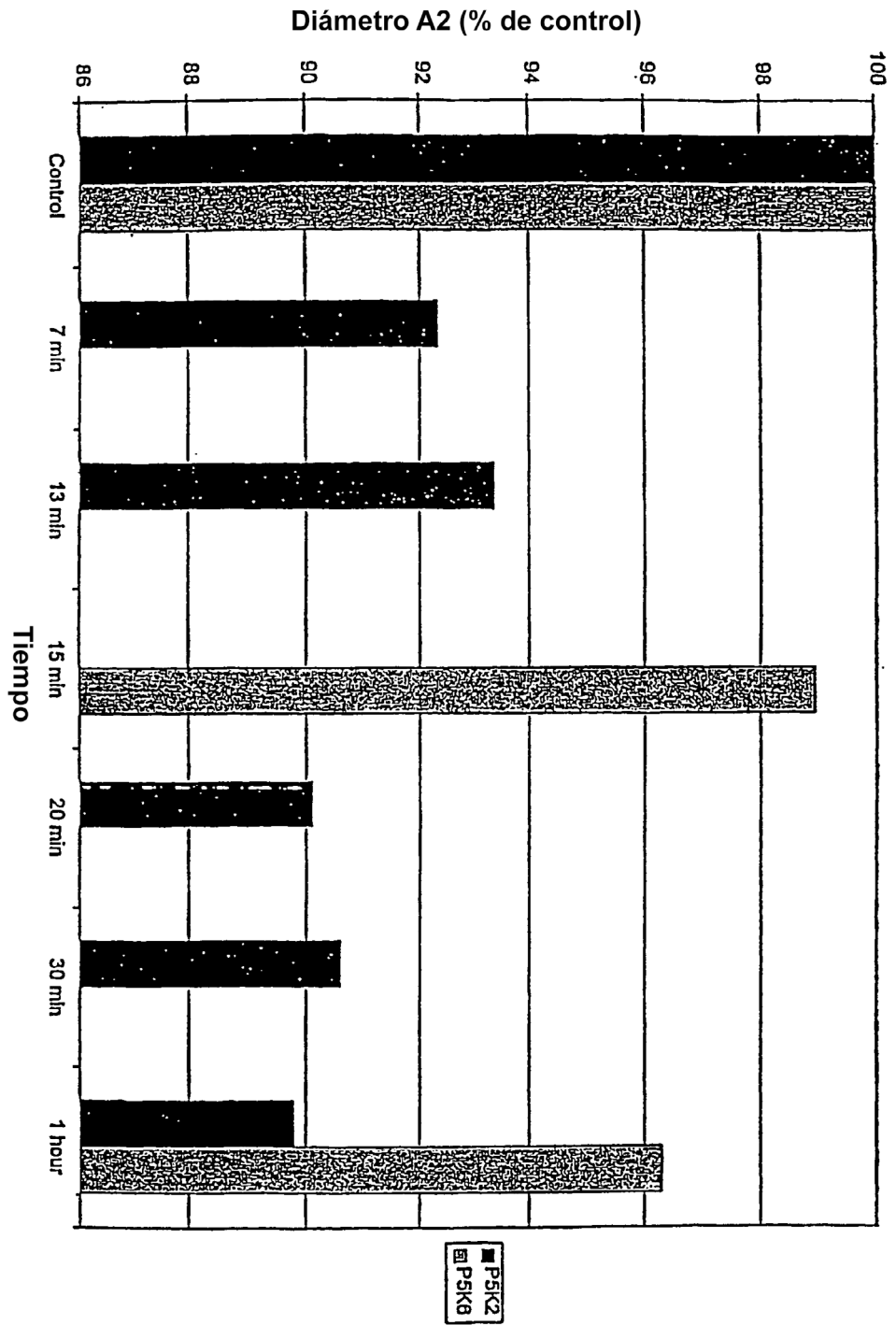


FIG. 7B



Efectos de un 10% de la carga superior de P5K2 (negro) y P5K6 (gris) sobre el diámetro arteriolar A₂ de hámster durante 1 h.

FIG. 8

