

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 894**

51 Int. Cl.:

C08H 1/00 (2006.01)

C07K 14/805 (2006.01)

A61K 38/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2001 E 01945245 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2012 EP 1299457**

54 Título: **Hemoglobinas de mamífero compatibles con plasma sanguíneo, reticuladas y conjugadas con poli(óxidos de alquileno) como portadores de oxígeno médicos artificiales, su preparación y su uso**

30 Prioridad:

29.06.2000 DE 10031744

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

15.02.2013

73 Titular/es:

**SANGUIBIOTECH GMBH (100.0%)
ALFRED-HERRHAUSEN-STRASSE 44
58455 WITTEN AN DER RUHR, DE**

72 Inventor/es:

BARNIKOL, WOLFGANG

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 395 894 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 de mamífero compatibles con plasma sanguíneo, reticuladas y conjugadas con poli(óxidos de alquileo) como portadores de oxígeno médicos artificiales, su preparación y su uso

- 5 La invención se refiere a hemoglobinas de mamífero covalentemente reticuladas con reticulantes bifuncionales seleccionados de diepóxido de butano, divinilsulfona, un diisocianato, un éster di-N-hidroxisuccinimidílico, un diimidoéster o un aldehído o glicolaldehído utilizando un exceso molar de 3 a 60 veces referido a hemoglobina monomérica a las que está unida covalentemente un poli(óxido de alquileo) cuyo grupo hidroxilo terminal está enmascarado con una molécula enmascaradora y cuyo peso molecular (masa molar) asciende a entre 200 y 5.000 g/mol. Tales hemoglobinas son sorprendentemente compatibles con proteínas de plasmas humanos y animales en todas las condiciones posibles en el aparato vascular del cuerpo. La invención se refiere además a la preparación de estas hemoglobinas reticuladas y unidas con poli(óxidos de alquileo), así como a su uso como portadores de oxígeno intravasales artificiales en el organismo humano o animal, en órganos individuales o para fines biomédicos. Los portadores de oxígeno artificiales son sustancias que se unen reversiblemente y liberan oxígeno de una forma adecuada para un organismo, así como sustituyen o apoyan la función de transporte de oxígeno de la sangre. Se han desarrollado preparaciones farmacéuticas de disoluciones o suspensiones de portadores de oxígeno artificiales para administrarse parenteralmente en el aparato vascular, especialmente intravenosamente, a seres humanos o animales para el tratamiento de estados de deficiencia de oxígeno agudos y crónicos, así como pérdidas de sangre agudas. Además, también pueden utilizarse para la perfusión de trasplantes de órganos o como adición de cultivos celulares para mejorar aquí el aporte de oxígeno.
- 10
- 15
- 20 Los portadores de oxígeno artificiales de hemoglobinas se han desarrollado en todo el mundo basándose en diferentes conceptos (estado de la técnica: Rudolph A. S. y col. (Hrsg.): Red Blood Cell Substitutes: Basic Principles and Clinical Applications, Marcel Dekker, Nueva York, entre otros 1998; Tsuchida E. (Hrsg.): Blood Substitutes: Present and Future Perspectives, Elsevier Science, Ámsterdam, 1998; Chang T. M. S. (Autor o Hrsg.): Blood Substitutes: Principles, Methods, Products and Clinical Trials, volumen 1 y volumen 2, Karger Landes, Basilea, entre otros, 1997 y 1998). Todos los conceptos tienen en común la preparación de portadores artificiales con propiedades de unión a oxígeno adecuadas que pueden garantizar el transporte de oxígeno *in vivo*. Estas propiedades dependen del campo de aplicación deseado del portador y la mayoría de las veces están orientadas a la sangre humana. La hemoglobina extracelularmente disuelta nativa no es adecuada como portador de oxígeno ya que se descompone intravasalmente en sus subunidades y ésta es rápidamente secretada por el riñón debido a su bajo peso molecular.
- 25
- 30 Por tanto, se intenta prolongar el tiempo de permanencia intravascular de hemoglobinas naturales o preparadas por tecnología genética en el organismo. Las prolongaciones del tiempo de permanencia intravascular resultan por
- Microencapsulación de disoluciones de hemoglobina en liposomas, los llamados hemosomas (Ogata Y. (1994): "Characteristics of Neo Red Cells, Their Function and Safety: In Vivo Studies", Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnologies 22: 875 - 881);
 - 35 - enlaces intramoleculares covalentes, es decir, una estabilización de la estructura cuaternaria de las hemoglobinas por reticulantes bifuncionales (Farmer M. C. y col. (1995): "Preclinical Data and Clinical Trials with Diaspirin Cross-linked Hemoglobin", - Tsuchida E. (Ed.): Artificial Red Cells, John Wiley 1995: 177 - 185; Bakker J. C. y col. (1988): "Properties of Hemoglobin Interdimerically Cross-linked with NFPLP", Biomaterials, Artificial Cells, and Immobilization Biotechnologies 16: 635 - 636) o por obtención por tecnología genética (Looker D. y col. (1992): "A Human Recombinant Haemoglobin Designed for Use as a Blood Substitute", Nature 356: 258 - 260);
 - unión covalente de macromoléculas con la hemoglobina, por ejemplo, polisacáridos, dextranos, hidroxietilalmidón, inulina o macromoléculas solubles en agua artificiales como polietilenglicoles (Xue H., Wong J. T.-F. (1994): "Preparation of Conjugated Hemoglobins", - Abelson J. N., Simon M. I. (Ed.): Methods of Enzymology, volumen 231 B, Academic Press 1994: 308 - 322; Tam S. C. y col. (1978): "Blood Replacement in Dogs by Dextran-Hemoglobin", Canadian Journal of Biochemistry 56: 981 - 984; memorias de patente DE-A 30 26 398 (1981): "Modifiziertes Hämoglobin enthaltender Blutersatz"; documento EP-A 0 069 026 (1982): "Oxygen Carrier"; documento EP-A 0 206 448 (1986): "Hemoglobin Combined with a Poly(Alkylene Oxide)"; documento US 5.234.903 (1993): "Chemically Modified Hemoglobin as an Effective, Stable, Non-immunogenic Red Blood Cell Substitute" y documento US 5.312.808 (1994): "Fractionation of Polyalkylene Oxide-Conjugated Hemoglobin Solutions");
 - reticulación intermolecular (polimerización) de hemoglobinas con reticulantes bifuncionales (Gould S. A. y col. (1998): "The Clinical Development of Human Polymerized Hemoglobin", - Chang T. M. S. (Ed.): Blood Substitutes: Principles, Methods, Products and Clinical Trials, volumen 2, Karger Landel Systems 1998: 12 - 28; Pearce L. B., Gawryl M. S. (1998): "Overview of Preclinical and Clinical Efficacy of Biopure's HBOCs", - Chang T. M. S. (Ed.): Blood Substitutes: Principles, Methods, Products and Clinical Trials, volumen 2, Karger Landel Systems 1998: 82 - 98; Bakker J. C. y col. (1992): "Preparation and Characterization of Crosslinked and Polymerized Hemoglobin Solutions", Biomaterials, Artificial Cells, and Immobilization Biotechnologies 20: 233 - 241).
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60 Los últimos portadores de oxígeno artificiales mencionados basados en hemoglobinas reticuladas poseen una serie de ventajas en comparación con los otros: las hemoglobinas reticuladas suficientemente grandes (polímeros de hemoglobina) disponen de una presión osmótica coloidal tan baja que no sólo pueden utilizarse como sustituto del

volumen de sangre que transporta oxígeno para sustituir la sangre que falta, debido a su tan baja presión osmótica coloidal inherente luego combinada con un expansor de plasma, sino que especialmente también pueden añadirse a la sangre como aditivo de la sangre transportador de oxígeno (Barnikol W. K. R. y col. (1996): "Hyperpolymere Hämoglobine als künstliche Sauerstoffträger. Ein innovativer Ansatz der medizinischen Entwicklung", Therapiewoche 46: 811 - 815). Las áreas de indicación para aditivos de transporte de oxígeno de este tipo son el tratamiento de muchos estados de deficiencia de oxígeno crónicos como, por ejemplo, anemias, accidentes cerebrovasculares o infartos cardíacos. El tratamiento con un aditivo tal siempre es posible incluso sin una pérdida de sangre; por el contrario, todos los otros sustitutos de volumen que transportan oxígeno mencionados son exclusivamente adecuados para el tratamiento de estados de deficiencia de oxígeno agudos después de pérdidas de sangre. Las hemoglobinas reticuladas con alto grado de reticulación poseen además la ventaja de un tiempo de permanencia intravascular especialmente prolongado. Además, después de su administración no debe contarse con elevaciones de la tensión arterial ya que no abandona los vasos sanguíneos debido a su tamaño y, por tanto, no pueden actuar de constrictores de la musculatura vascular (véase más adelante).

De manera equivalente además de la eficacia, en el centro de todos los desarrollos siempre está también la evaluación y dado el caso mejora de la inocuidad de los portadores de oxígeno artificiales (Fratantoni J. C. (1991): "Points to Consider in the Safety Evaluation of Hemoglobin-based Oxygen Carriers", Transfusion 31: 369 - 371). Por ejemplo, se observa un aumento de la tensión arterial y una elevación de la resistencia vascular periférica total en ratas anestesiadas después de la administración intravascular de hemoglobinas intramolecularmente reticuladas (Sharma A. C. y col. (1993): "Role of NO Mechanism in Cardiovascular Effects of Diaspirin Cross-linked Hemoglobin in Anesthetized Rats", American Journal of Physiology 269: H 1379 - H 1388). Esta acción vasoconstrictora de portadores de oxígeno artificiales molecularmente dispersos puede tanto basarse en una hiperoxigenación del tejido por los portadores muy efectivos (Rohlf's R. J. y col. (1998): "Arterial Blood Pressure Responses to Cell-free Hemoglobin Solutions and the Reaction with Nitric Oxide", Journal of Biological Chemistry 273: 12128 - 12134) como también atribuirse a la inhibición de la acción local del monóxido de nitrógeno (NO) por hemoglobinas (Sharma A. C. y col. (1993) - véase arriba), ya que el monóxido de nitrógeno repercute de forma dilatante sobre la musculatura lisa de las paredes de los vasos (Rodeberg D. A. y col. (1995): "Nitric Oxide: An Overview", American Journal of Surgery 170: 292 - 303). La hemoglobina abandona el aparato vascular debido a su bajo peso molecular, se une a monóxido de nitrógeno desprendido subendotelialmente y así desplaza el equilibrio prevaeciente en la musculatura vascular entre la vasodilatación y la vasoconstricción hacia la última. La reticulación de las moléculas de hemoglobina (con multímeros: oligómeros y polímeros) evita la difusión de los vasos y, por tanto, el aumento de la tensión arterial por los portadores artificiales (Vogel W. M., Valeri C. R. (1986): "Coronary Constrictor Effect of Stroma-free Hemoglobin Solutions", American Journal of Physiology 251: H 413 - H 420).

Además, es de gran interés la influencia de los portadores artificiales sobre el sistema de la coagulación, el sistema inmunitario, especialmente la activación del complemento, la activación del sistema reticuloendotelial y la respuesta inmunitaria específica. Pudo mostrarse (Ning J., Chang T. M. S. (1990): "Effects of Homologous and Heterologous Stroma-free Hemoglobin and Polyhemoglobin on Complement Activation, Leukocytes and Platelets", Biomaterials, Artificial Cells, and Artificial Organs 18: 219 - 233; Feola M., Simoni J. (1991): "Biocompatibility of Hemoglobin Solutions: The Effects of Contaminants, Hemoglobin and Hemoglobin Derivates", Biomaterials, Artificial Cells, and Artificial Organs 19: 382) que una activación del complemento no es desencadenada por la propia hemoglobina nativa o unida, sino esencialmente por impurezas, por ejemplo, endotoxinas o constituyentes del estroma de los eritrocitos que inicialmente contienen la hemoglobina nativa. Por tanto, la utilización de disoluciones de partida altamente puras para la preparación de portadores de oxígeno artificiales puede evitar una posterior activación del complemento.

Los homólogos de hemoglobinas (hemoglobinas de las mismas especies de animal a las que se administra), tanto sin son nativos como reticulados, tampoco repercuten inmunogénicamente en el modelo animal después de la administración repetida; por el contrario, las hemoglobinas heterólogas (hemoglobinas de otras especies distintas de las del receptor) o sus productos de reticulación pueden provocar una producción de anticuerpos y reacciones anafilácticas después de la administración repetida (Chang T. M. S. (1997): "How Safe are Modified Hemoglobins?", Blood Substitutes: Principles, Methods, Products and Clinical Trials, volumen 1, Karger Landel Systems 1997: 49 - 72). Los procedimientos para enmascarar la antigenicidad de hemoglobinas son la microencapsulación o la conjugación con polietilenglicol (por ejemplo, memoria de patente US 4.179.337: "Non-immunogenic Polypeptides").

En el marco de la investigación de la inocuidad de los portadores de oxígeno artificiales, hasta la fecha no se hizo ningún caso de las interacciones directas de éstos con las proteínas del plasma con las que se ponen en contacto en la administración intravascular. En investigaciones propias pudo detectarse con ayuda de una nueva prueba de biocompatibilidad *in vitro* que las hemoglobinas reticuladas y las proteínas del plasma son compatibles de forma diferente en función del valor de pH. Se producen precipitaciones de precipitados claros en su mayoría de matices rojos o rojizos que pueden apreciarse visualmente la mayoría de las veces, mediante mediciones de turbidez sensibles pueden detectarse precipitaciones menos evidentes. Estas precipitaciones se refieren o bien principalmente a las hemoglobinas reticuladas o las proteína del plasma, o bien igualmente a ambas. La eventual detección de la participación de las proteínas del plasma, es decir, la presencia de interacciones entre hemoglobinas reticuladas y proteínas del plasma, es apropiada porque en el sobrenadante de plasma, por ejemplo, electroforéticamente, también puede medirse una reducción del contenido de proteínas plasmáticas, especialmente de γ -globulinas. A este respecto, el grado de precipitaciones de hemoglobina depende, entre otras cosas, del peso molecular de las hemoglobinas reticuladas, de la hemoglobina usada y de reticulantes bifuncionales, así como de la presencia de efectores unidos covalentemente de las propiedades de unión a oxígeno de las hemoglobinas (Domack U. (1997): "Entwicklung and in vivo-Evaluation eines künstlichen Sauerstoffträgers auf Basis von Rinderhämoglobin".

Tesis doctoral, especialidad Química, Universidad Johannes Gutenberg, Mainz 1997). Por ejemplo, precipitan proporciones mayores de una hemoglobina bovina reticulada preparada con el reticulante bifuncional glutardialdehído con un grado de reticulación medio de aproximadamente 10 en plasma humano a valores de pH inferiores a 7,5. La modificación de las propiedades de unión a oxígeno de la hemoglobina bovina reticulada por unión covalente de piridoxal-5'-fosfato produce una reducción adicional de la compatibilidad con el plasma. En este caso, a valores de pH inferiores a 8,0 ya se observan precipitaciones de la hemoglobina. Las hemoglobinas bovinas reticuladas modificadas con piridoxal-5'-fosfato preparadas con glutardialdehído como reticulante sólo son compatibles con plasma humano hasta un grado de polimerización de aproximadamente cinco (oligómeros de hemoglobina) en el intervalo de pH fisiológicamente relevante.

Por el contrario, puede alcanzarse una influencia positiva sobre la biocompatibilidad entre hemoglobina bovina reticulada y plasma humano mediante el uso de reticulantes bifuncionales que incorporan grupos solvatozantes adicionales en la polimerización. Por ejemplo, con el reticulante ácido 2,5-diisotiocianatobencenosulfónico pueden prepararse polímeros bovinos de hemoglobina que también son solubles en plasma sin ningún tipo de precipitaciones a un grado de polimerización medio de 24. Pero estos polímeros son completamente inadecuados para una aplicación como portadores de oxígeno artificiales debido a sus propiedades de unión a oxígeno (Domack U. (1997), véase arriba).

Según el estado de la técnica actual, con muchos reticulantes bifuncionales no puede prepararse hemoglobina reticulada, especialmente mayores grados de reticulación, sin que después de la mezcla con el plasma bajo ciertas condiciones deba contarse con incompatibilidades en forma de precipitaciones. A valores de pH fisiológicos y patofisiológicos se observan incompatibilidades *in vitro* entre hemoglobinas reticuladas y proteínas del plasma: precipitan tanto proteínas del plasma como también hemoglobinas reticuladas, en determinados casos puede predominar la precipitación de una o de la otra. Esto es especialmente aplicable a hemoglobinas fuertemente reticuladas (polímeros de hemoglobina), menos para oligómeros de hemoglobinas menos reticulados. Cabe esperar que aquellas incompatibilidades hemoglobina-proteína del plasma también aparezcan en administraciones *in vivo* en el aparato vascular y conduzcan en casos extremos a múltiples oclusiones de vasos pequeños.

Para garantizar el funcionamiento de los portadores y para evitar efectos secundarios graves en la administración en el organismo humano o animal, por ejemplo, un choque por estasis capilar, las hemoglobinas reticuladas deben ser compatibles con la sangre, especialmente con las proteínas contenidas en el plasma, y concretamente tanto bajo condiciones fisiológicas como también bajo todas las posibles condiciones patofisiológicas: esto también es especialmente aplicable a una acidosis, como se produce localmente en tejido insuficientemente suministrado con oxígeno. Aquellas interacciones de hemoglobinas reticuladas con constituyentes del plasma deben prevenirse con seguridad bajo todas las condiciones posibles en el organismo que conducen a una precipitación de un componente. En TH, tomo 55,1999, páginas 2147-2156, así como Art Cell Blood Subs. and Immob. Biotech., tomo 22, n° 3,1994, página 923-931, Ton T. Hai y col. Informan de la unión covalente de hemoglobinas intramolecularmente unidas con diaspirina con estabilidad y tiempo de permanencia mejorados.

En el documento EP 0 206 448 A1 se describen hemoglobinas que alcanzan una estabilidad o tiempo de permanencia especial mediante la unión de poli(óxido de alquileno) mediante grupos carboxi.

El documento WO A 91/07190 se refiere a hemoglobinas conjugadas con un polietilenglicol con propiedades de unión a oxígeno mejoradas y estabilidad mejorada.

Por tanto, la invención se basa en el objetivo de generar hemoglobinas reticuladas para las que se garantiza que son compatibles después de una administración intravascular en el organismo con las proteínas del plasma, también bajo valores de pH patológicos extremos.

El objetivo se alcanza según la invención uniendo covalentemente poli(óxidos de alquileno) de peso molecular moderadamente alto, que son un producto de unión del poli(óxido de alquileno) con una molécula que enmascara un grupo hidroxilo terminal del poli(óxido de alquileno), a las moléculas de hemoglobina reticuladas con un reticulante. Los poli(óxidos de alquileno) unidos covalentemente a las hemoglobinas reticuladas en un grado suficiente solos provocan que incluso bajo condiciones de valor de pH patofisiológicas extremas (valores de pH entre 6,8 y 7,4) *in vitro* no puedan determinarse incompatibilidades de las hemoglobinas reticuladas y proteínas del plasma en forma de precipitaciones de uno y/u los otros componentes. Esto no era de esperar, ya que el problema es completamente nuevo y no están disponibles soluciones a problemas similares o incluso sólo análogos. Las acciones conocidas de una unión de poli(óxidos de alquileno) a proteínas son, como ya se ha mencionado, completamente distintas a las aquí descritas. Además, por una parte, una combinación tanto de la reticulación de la hemoglobina como también de la unión covalente de poli(óxido de alquileno) parece superficialmente superflua: ambos procedimientos provocan según el estado de la técnica el mismo tiempo de permanencia, concretamente una cierta prolongación del tiempo de permanencia intravascular, de portadores de oxígeno artificiales de hemoglobina modificada, pero el grado necesario ya se alcanza mediante la realización de uno de los procedimientos. Por otra parte se sabe que los polialquilenos son precipitantes efectivos para proteínas mediante exclusión de disolventes. En esto se basan procedimientos técnicos para la separación preparativa de proteínas mediante precipitación fraccionada durante la elevación consecutiva de las concentraciones de poli(óxidos de alquileno). Fue tanto más sorprendente que en la manera de proceder según la invención pudiera resolverse el problema en el que se basa la solicitud.

Como material de partida de hemoglobina para la exposición según la invención es adecuada hemoglobina monomérica, nativa o con ciertos efectores, por ejemplo, la afinidad por el oxígeno de la hemoglobina como, por ejemplo, piridoxal-5'-fosfato o 2-nor-2-formil-piridoxal-5'-fosfato (como se describe en Kothe y col. (1985), Surgery,

Gynecology & Obstetrics 161: 563 -569 o Van Der Plas y col. (1987), Transfusion 27: 425 - 430 y (1988), Transfusion 28: 525 - 530, otras citas en: Rudolph A.S. y col. (Hrsg.): Red Blood Cell Substitutes: Basic Principles and Clinical Applications, Marcel Dekker, Nueva York, entre otros, 1998; Tsuchida E. (Hrsg.): Blood Substitutes: Present and Future Perspectives, Elsevier Science, Ámsterdam 1998, volumen 1 y volumen 2, Karger Landes, Basilea, entre otros, 1997 y 1998, véase también el documento EP 0 528 841, allí se describe la piridoxilación de hemoglobina), químicamente modificada y modificada de seres humanos, de cerdo o de res. Se prefiere hemoglobina humana y especialmente de cerdo. Dado el caso, la hemoglobina puede desoxigenarse (dado el caso también carbonilarse) de manera conocida.

Reticulaciones de hemoglobina monomérica, nativa o unida con efectores con varios reticulantes son conocidas y en la bibliografía se han descrito reiteradamente, a modo de ejemplo son de mencionar:

Las memorias de patente US 4.001.200 y US 4.001.401 se refieren a hemoglobinas reticuladas, así como a su utilización como sucedáneo de la sangre y expansor de plasma. Los pesos moleculares (masas molares) de estas hemoglobinas reticuladas ascienden a de 65.000 a 1.000.000 g/mol. Pueden prepararse mediante una pluralidad de reactivos de unión conocidos como, por ejemplo, divinilsulfona, epíclorhidrina, diepóxido de butadieno, hexametildiisocianato, los dialdehídos glioxal y glutardialdehído, así como los diimidoésteres suberimidato de dimetilo, malonimidato de dimetilo y adipimidato de dimetilo.

La memoria de patente DE 24 49 885 también se refiere (entre otros) a hemoglobinas reticuladas que pueden prepararse mediante reacción de hemoglobinas no reticuladas con varios dialdehídos, por ejemplo, malondialdehído, succindialdehído, glutardialdehído, dialdehído adipico y dialdehído subérico.

La memoria de patente US 4.857.636 describe la preparación de distintas hemoglobinas reticuladas mediante reacción de hemoglobina con varios dialdehídos y polialdehídos, por ejemplo, simples como glutardialdehído y glioxal, pero también con estructuralmente más complejos que se forman mediante apertura de anillo oxidativa de las estructuras de hemiacetales y hemicetales cíclicas de las moléculas de azúcar en monosacáridos y oligosacáridos, así como derivados de éstos.

La memoria de patente US 5.439.882 trata de hemoglobinas reticuladas que se preparan mediante reacción con los dialdehídos o-adenosina y o-ATP formados mediante oxidación por apertura de anillo de las ribosas en adenosina y en adenosintrifosfato. Estas hemoglobinas reticuladas poseen pesos moleculares de 65000 a 390000 g/mol.

La memoria de patente EP 0 201 618 se refiere a un procedimiento para preparar polímeros de hemoglobina solubles de peso molecular extremadamente alto, los llamados hiperpolímeros (peso molecular hasta 15.000.000 g/mol) a partir de disoluciones altamente concentradas de hemoglobinas monoméricas.

Según la invención, para la reticulación de hemoglobinas se seleccionan reticulantes bifuncionales, concretamente diepóxido de butano, divinilsulfona, un diisocianato, especialmente hexametildiisocianato, ciclohexildiisocianato y ácido 2,5-bisisocianatobencenosulfónico, un éster di-N-hidroxisuccinimidílico, un diimidoéster o un dialdehído, especialmente glioxal, el glicolaldehído que reacciona análogamente o glutardialdehído. Se prefiere glutardialdehído.

La reticulación se realiza de manera muy especialmente preferida con glutardialdehído como, por ejemplo, en Pötzschke H. y Bamikol W. (1992), Biomaterials, Artificial Cells, and Immobilization Biotechnology 20: 287 - 291, o como se describe en los siguientes ejemplos.

Con referencia a la hemoglobina monomérica, en cada caso se utilizan relaciones molares de los reticulantes bifuncionales usados de 3 a 60 veces, preferiblemente 6 a 35 veces. En relación con el glutardialdehído se utiliza preferiblemente entre un exceso molar de 7 y 10 veces de glutardialdehído. Las uniones químicamente no estables, especialmente las bases de Schiff, que se forman en la reacción de grupos aldehído funcionales con grupos amino de las hemoglobinas se estabilizan de manera conocida reductoramente mediante reacción con agentes reductores adecuados como, por ejemplo, borohidruro de sodio en un exceso molar suficiente, referido respectivamente a hemoglobina monomérica, preferiblemente 2 a 100 veces, especialmente preferiblemente 5 a 20 veces, bajo condiciones conocidas adecuadas.

Se conocen varias uniones covalentes de poli(óxidos de alquileo) a proteínas, especialmente también a hemoglobina (sin reticular) y se describen en la bibliografía (el estado de la técnica describe ampliamente: Harris J. M. (Hrsg.): Poly (Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, Plenum, Nueva York, entre otros, 1992). La unión del poli(óxido de alquileo) se realiza en muchos de estos procedimientos mediante un puente molecular ("espaciador", de "spacer") que crea, por ejemplo, un ligador bifuncional. Considerado estrictamente, en estos casos también se une un producto de unión de un poli(óxido de alquileo) a la proteína con un reactivo de unión.

Para la unión covalente de los poli(óxidos de alquileo) se usan preferiblemente aquellos derivados de poli(óxidos de alquileo) que ya contienen unido covalentemente un agente de unión con un grupo funcional que da una reacción química directa con grupos amino, alcohol o sulfhidrilo de las hemoglobinas con formación de uniones covalentes de los poli(óxidos de alquileo), por ejemplo, poli(óxidos de alquileo) con grupos éster N-hidroxisuccinimidílico, (éter glicidílico de) epoxi, aldehído, isocianato, vinilsulfona, yodo-acetamida, formiato de imidazolilo, reactivos de tresilato, entre otros. Muchos de aquellos polietilenglicoles monofuncionalmente activados pueden obtenerse comercialmente, por ejemplo, los mencionados, y concretamente con pesos moleculares entre aproximadamente 500 y 5.000 g/mol. Según la invención se utilizan preferiblemente derivados de un poli(óxido de alquileo), especialmente seleccionados de poli(óxido de etileno), poli(óxido de propileno) o copolímeros de los mismos. Se utilizan

preferiblemente especialmente productos de unión de poli(óxido de alquileo), especialmente de los mencionados, con una molécula que enmascara un grupo hidroxilo terminal, especialmente un éter, éster, esteramida con resto orgánico alifático (C₁ - C₅) de cadena corta. Alternativamente, poli(óxidos de alquileo) no activos pueden activarse inicialmente químicamente en cualquier otro modo adecuado, o eventualmente después de una derivatización necesaria adicional, unirse con la hemoglobina mediante reactivos de unión químicos, por ejemplo, mediante reacción química con cianuro de bromo, una carbodiimida como, por ejemplo, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida o N,N'-dicitlohexilcarbodiimida, cloruro de cianuro (polietilenglicoles activados con éste, 4,6-dicloro-s-triazin-poli(etilenglicoles), también pueden obtenerse comercialmente), u otros reactivos de unión conocidos como, por ejemplo, 2,2'-diclorobencidina, p,p'-difluoro-m,m'-dinitrodifenilsulfona, 2,4-dicloronitrobenzoceno y otros (visión general en: Harris J. M. (Hrsg.): Poly (Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, Plenum, Nueva York, entre otros 1992). Como poli(óxidos de alquileo) son especialmente adecuados poli(óxidos de etileno) (polietilenglicoles), poli(óxidos de propileno) (polipropilenglicoles), así como copolímeros (polímeros mixtos) de óxido de etileno y óxido de propileno, especialmente, como se ha mencionado, ciertos derivados de éstos como compuestos que enmascaran un grupo hidroxilo, por ejemplo, (mono-)éteres con un alcohol de cadena corta, preferiblemente con 1 a 5 átomos de carbono, como éter monometílico, éter monoetilico, éter monopropílico, etc., (mono-)ésteres con ácidos carboxílicos de cadena corta, preferiblemente con 1 a 5 átomos de carbono, como éster monometílico, éster monometílico, éster monopropílico, etc., y productos de deshidratación con una amina alifática con 1 a 5 átomos de carbono como monometilamina, monoetilamina, monopropilamina, etc., con los anteriormente especificados. Se prefieren especialmente polietilenglicoles y sus derivados mencionados.

El peso molecular de los poli(óxidos de alquileo) usados asciende a entre 200 y 5000 g/mol, especialmente a entre 500 y 2000 g/mol.

Éstos se utilizan preferiblemente en una cantidad de 1 a 40, especialmente de 4 a 15 moles por mol de hemoglobina.

Como ya se ha mencionado, se conoce la unión de poli(óxidos de alquileo) a proteínas (por ejemplo: patente US 4.179.337 (1979): "Non-immunogenic Polypeptides"), especialmente también a hemoglobinas, concretamente también a portadores de oxígeno artificiales basados en hemoglobinas modificadas (memorias de patente US 5.478.805 (1995): "Fractionation of Polyalkylene Oxide-Conjugated Hemoglobin Solution", US 5.386.014 (1995): "Chemically Modified Hemoglobin as an Effective, Stable, Non-immunogenic Red Blood Cell Substitute", EP-A 0 206 448 (1986): "Hemoglobin Combined with a Poly (Alkylene Oxide)". Documento EP-A 0 067 029 (1982): "Oxygen Carrier"). Por tanto, el contenido de estos documentos se incorpora en la presente. No obstante, la unión de poli(óxidos de alquileo) a portadores de oxígeno artificiales basados en hemoglobinas modificadas nunca se realizó en una hemoglobina reticulada según la bibliografía conocida, y siempre sirvió para alcanzar tipos de objetivos completamente diferentes, por ejemplo, una prolongación del periodo de permanencia intravascular, o también para la reducción de la potencia inmunogénica de los portadores de oxígeno artificiales.

La realización de las uniones según la invención es análoga a como se ha descrito anteriormente y depende de los requisitos de las reacciones químicas seleccionadas: hemoglobinas nativas y modificadas, monoméricas y reticuladas son polielectrolitos y, por tanto, están para la reacción con poli(óxidos de alquileo) activos o para la reacción de unión con poli(óxidos de alquileo) mediante activadores o reactivos de unión en electrolitos acuosos con concentraciones de iones de hasta 300 mmol/l, preferiblemente entre 50 y 170 mmol/l. Las temperaturas durante las reacciones ascienden a entre 2 y 65 °C, preferiblemente entre 3 y 30 °C, la actividad protónica en las disoluciones, expresada como valores de pH a entre 5 y 11, preferiblemente a entre 6,0 y 10,5 y los tiempos de reacción, dependiendo de la reacción especial seleccionada para la unión de los poli(óxidos de alquileo) respectivos a las hemoglobinas correspondientes, también en función de la temperatura, valor de pH, concentración de iones, etc., a entre pocos minutos y hasta 24 horas, preferiblemente a menos de 5 horas, y muy preferiblemente a menos de 2 horas.

Por tanto, la hemoglobina reticulada puede unirse con poli(óxido de alquileo) con ayuda de procedimientos conocidos como se ha descrito arriba, por ejemplo, mediante combinación directa con ayuda de un agente de condensación como cianuro de bromo, o con ayuda de un reactivo de reticulación como, por ejemplo, cloruro de cianuro (véase el documento DE-OS 30 26 398), o mediante reacción con un poli(óxido de alquileo) activado, por ejemplo, un éster N-hidroxisuccinimidílico de un derivado de poli(óxido de alquileo). De esta manera se unen al menos 1, especialmente 1 a 40, y preferiblemente 4 a 15 moléculas del poli(óxido de alquileo) usado según la invención por cada molécula de hemoglobina monomérica.

A modo de ejemplo, los siguientes procedimientos pueden aplicarse para la unión de los poli(óxidos de alquileo), manteniéndose su integridad estructural

- (1) Se hace reaccionar polietilenglicol (no activado) con la cantidad molar de 2 a 5 veces, preferiblemente la cantidad molar de 3 veces, de cianuro de bromo a un valor de pH de 9 a 10. El cianuro de bromo restante se elimina de la mezcla de reacción por filtración en gel, diálisis, etc., y el producto se hace reaccionar luego con una cantidad molar necesaria, por ejemplo, 0,1 a 0,002 veces, preferiblemente 0,02 a 0,01 veces, de hemoglobina a pH 7 a 9, preferiblemente 7,5 a 8, en solución acuosa (véase el documento DE-OS 3 026 398);
- (2) Se añade polietilenglicol a benceno que contiene una cantidad en exceso de carbonato de sodio y luego se hace reaccionar con la cantidad molar de 2 a 5 veces, preferiblemente la cantidad molar de 3 a 4 veces,

de cloruro de ácido cianúrico. El producto de reacción, polietilglicol-4,6-dicloro-s-triazina, se separa y se hace reaccionar con la cantidad deseada, por ejemplo, 1 a 0,002 moles, preferiblemente 0,1 a 0,01 moles, referidos a un mol del producto de reacción previamente mencionado, de hemoglobina en una solución tampón con un valor de pH de 8 a 9,5 (véase el documento DE-OS 30 26 398);

(3) Se añade poli(óxido de alquileo) activado, por ejemplo, un éster N-hidroxisuccinimidílico de un poli(óxido de alquileo), en un exceso molar de 1 a 40 veces, referido a hemoglobina monomérica, a una solución acuosa con un pH entre 7 y 10 de una hemoglobina que va a unirse con el poli(óxido de alquileo) y se dejan reaccionar.

Los procedimientos previamente explicados también pueden aplicarse en el caso de otros polímeros usados según la invención.

La unión química de poli(óxidos de alquileo) a los portadores de oxígeno artificiales de hemoglobinas reticuladas se realiza en el transcurso de la preparación de los derivados de hemoglobina según la invención acoplado los derivados de poli(óxido de alquileo) a la hemoglobina reticulada ya sintetizada, es decir, a continuación de la reacción de los monómeros de hemoglobina altamente puros, nativos o modificados con efectores, con un reticulante bifuncional.

El derivado de hemoglobina obtenido según la invención puede purificarse de modo habitual conocido, por ejemplo, mediante centrifugación, filtración clara, ultrafiltración o una cromatografía preparativa, por ejemplo, cromatografía por exclusión de volumen, por ejemplo, en gel Sephadex G-25 o como en los documentos anteriormente mencionados, o los documentos EP-A 0 854 151, EP-A 95 107 280, o se describe en Curling J.M.: Methods of Plasma Protein Fractionation, Academic Press, Londres, 1980.

Según la invención, la hemoglobina monomérica, preferiblemente en estado desoxigenado, se reticula inicialmente en un electrolito acuoso (que contiene, por ejemplo, NaHCO_3 o NaCl o lactato de sodio o varios de éstos), por ejemplo, con reticulantes bifuncionales como diepóxido de butano, divinilsulfona, un diisocianato, especialmente hexametildisocianato, ciclohexildisocianato y ácido 2,5-bisisocianatobencenosulfónico, un éster di-N-hidroxisuccinimidílico, un diimidoéster o un dialdehído, especialmente glioxal, el glicolaldehído que reacciona análogamente, y de manera muy especialmente preferida glutardialdehído, por ejemplo, en un exceso molar de 3 a 60 veces, preferiblemente de 6 a 35 veces, referido a hemoglobina monomérica, especialmente un exceso molar de 7 a 10 veces en caso de glutardialdehído. Los reactivos en exceso pueden eliminarse de manera habitual mediante aditivos adecuados, por ejemplo, mediante la adición de cianoborohidruro de sodio o borohidruro de sodio en caso de dialdehídos (como, por ejemplo, glutardialdehído), por ejemplo, en un exceso molar de 2 a 100 veces, especialmente de 5 a 20 veces, referido a su vez a la hemoglobina monomérica.

La hemoglobina reticulada obtenida en solución pueden entonces unirse directamente con uno de los poli(óxidos de alquileo) anteriormente mencionados, por ejemplo, un polietilenglicol, un polipropilenglicol o un copolímero de óxido de etileno y óxido de propileno, o uno de los derivados anteriormente mencionados de los mismos, especialmente un polietilenglicol activado como metoxi-polietilenglicol-propionato de N-hidroxisuccinimidilo (mPEG-SPA) como se ha descrito. Para esto, el poli(óxido de alquileo) se utiliza en exceso, por ejemplo, en la relación molar de 1 a 40 veces, especialmente preferiblemente de 4 a 15 veces, referida a hemoglobina monomérica. El exceso restante puede eliminarse de nuevo de manera conocida o inactivarse, por ejemplo, mediante reacción con lisina en exceso. Los poli(óxidos de alquileo) tienen una masa molar de 200 a 5.000, especialmente 500 a 2.000 g/mol.

La solución así obtenida puede luego purificarse de forma conocida adecuada, por ejemplo, cromatográficamente (por ejemplo, mediante cromatografía por exclusión de volumen preparativa) mediante centrifugación, filtración (clara) o ultrafiltración, o mediante precipitación, por ejemplo, con poli(óxido de etileno), y a continuación procesarse dando una preparación farmacéutica.

La concentración de electrolito y, por tanto, también el valor de pH pueden ajustarse de manera conocida respectivamente correspondientemente a las condiciones requeridas como se ha descrito.

De esta manera, como producto se obtiene una hemoglobina reticulada y unida con poli(óxido de alquileo) que es sorprendentemente completamente compatible con plasma, incluso bajo condiciones fisiológicas extremas, especialmente el valor de pH. A este respecto, la compatibilidad es independiente del tipo y del peso molecular de la hemoglobina, del reticulante usado, efectores o del tipo de poli(óxido de alquileo) utilizado.

Esto no pudo esperarse en cuanto al estado de la técnica, ya que allí sólo se consiguió un tiempo de permanencia mejorado o una menor inmunogenicidad tanto por unión covalente de poli(óxidos de alquileo) como también por reticulación *in vivo*, pero ninguna compatibilidad con el plasma.

Las sorprendentes ventajas del derivado de hemoglobina según la invención pueden resumirse del siguiente modo:

1. Poli(óxido de alquileo) unido covalentemente a hemoglobina reticulada da portadores de oxígeno artificiales compatibles con plasma. A este respecto, la compatibilidad con el plasma de estas hemoglobinas reticuladas no depende de la hemoglobina usada, del tamaño de molécula de las hemoglobinas reticuladas o del reticulante.

2. Mediante la unión de los poli(óxidos de alquileo) a las hemoglobinas reticuladas también se garantiza,

bajo condiciones de valor de pH desfavorables, que en el organismo no deba contarse con interacciones entre proteínas del plasma y hemoglobinas reticuladas que conducen a precipitaciones de las hemoglobinas reticuladas o de proteínas del plasma.

5 3. La modificación de hemoglobinas reticuladas con poli(óxido de alquileo) permite la administración intravascular de hemoglobinas reticuladas de alto grado de multimerización (polímeros de hemoglobina), sin una unión tal sólo sería posible una administración de oligómeros para evitar fenómenos de precipitación u otras interacciones, por ejemplo, con proteínas, pero también con las células sanguíneas en el plasma. Por tanto, estos polímeros de hemoglobina abren, además de la administración como sucedáneo del volumen de sangre perdido, otros campos de aplicación del sector de estados de deficiencia de oxígeno crónicos.

10 Debido a su alto tamaño molecular pueden administrarse al paciente como portadores de oxígeno adicionales, como un aditivo transportador de oxígeno.

4. Además, la unión de poli(óxidos de alquileo) sugiere un elevado tiempo de permanencia vascular, como también una reducida inmunogenicidad.

15 En este respecto, los derivados de hemoglobina según la invención puedan usarse como tales o en forma de preparaciones adecuadas, por ejemplo, farmacéuticas, como portadores de oxígeno artificiales intravascularmente, como agente farmacéutico o para fines biomédicos, como sustitución de la sangre para el tratamiento de una deficiencia de volumen de sangre, como adición a la sangre para el tratamiento de estados de deficiencia de oxígeno patógenos o como una solución nutritiva, en organismo humano o animal, en órganos o en aplicaciones biotécnicas. Para la preparación de los productos que van a administrarse, los derivados de hemoglobina según la invención se disuelven en medios adecuados como disoluciones para infusión, por ejemplo, en solución acuosa de cloruro sódico o glucosa, preferiblemente en las concentraciones isotónicas en el plasma sanguíneo.

20 Configuraciones de la invención especialmente preferidas se explican más detalladamente a continuación inicialmente mediante un procedimiento de preparación general de las hemoglobinas reticuladas y unidas con poli(óxido de alquileo):

25 1. Hemoglobina de cerdo, humana o bovina purificada con una concentración entre 10 y 420 g/l, preferiblemente entre 150 y 400 g/l, se disuelve en una solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio ésta posee una concentración entre 10 y 150 mmol/l, preferiblemente entre 40 y 60 mmol/l. Se realiza una desoxigenación de la hemoglobina mediante circulación con nitrógeno puro y agitación de esta solución de hemoglobina a una temperatura del intervalo de 2 a 42 °C, preferiblemente entre 3 y 25 °C. El pH de la solución se valora con ácido láctico o solución de sosa cáustica (una concentración entre 0,1 y 1 mol/l) a un valor entre 6 y 9, preferiblemente entre 6,5 y 7,5.

30 2. Al valor de pH así ajustado se realiza luego la reacción de la hemoglobina con un reticulante bifuncional elegido de diepóxido de butano, divinilsulfona, un diisocianato, especialmente hexametildisocianato, ciclohexildisocianato y ácido 2,5-bisisocianatobencenosulfónico, un éster di-N-hidroxisuccinimidílico, un diimidoéster o un dialdehído, especialmente glioxal, el glicolaldehído que reacciona análogamente y de manera muy especialmente preferida glutardialdehído. La relación molar del reticulante con respecto a la hemoglobina monomérica asciende a entre 3 y 60, preferiblemente a entre 6 y 35. Después de la reticulación con uno de los dialdehídos mencionados, por ejemplo, las bases de Schiff formadas se reducen con borohidruro de sodio en una relación molar con respecto a la hemoglobina monomérica entre 2 y 100, preferiblemente entre 5 y 20. Esta reducción se realiza a un pH entre 7,5 y 9, preferiblemente entre 7,8 y 8,8; este valor de pH se ajusta con solución de sosa cáustica o ácido láctico como se ha descrito arriba (N° 1).

35 3. Después del nuevo ajuste del valor de pH entre 7 y 9,5 (con solución de sosa cáustica o ácido láctico), las hemoglobinas reticuladas se unen con uno de los derivados de poli(óxido de alquileo) anteriormente mencionados que se añaden a la mezcla de reacción en una relación molar con respecto a hemoglobina monomérica de 1 a 40, preferiblemente entre 4 y 15. Los pesos moleculares de los poli(óxidos de alquileo) usados ascienden a entre 200 y 5.000 g/mol, preferiblemente a entre 500 y 2.000 g/mol. Los poli(óxidos de alquileo) pueden ya activarse monofuncionalmente como se ha mencionado anteriormente para la reacción, especialmente con los grupos amino de las hemoglobinas, o, como también se ha descrito, unirse activa o pasivamente.

50 La invención se explica más detalladamente mediante los siguientes ejemplos. A este respecto, las Figuras 1 a 6 muestran lo siguiente:

Figura 1:

55 Una distribución ponderada en masa de los tamaños de molécula y pesos moleculares (M) del polímero de glutardialdehído-hemoglobina de cerdo del Ejemplo 1, representada como cromatograma por exclusión de volumen (obtenido con gel Sephacryl S-400 HR, Pharmacia, Friburgo, D). E_{425nm} es la extinción en el eluato de cromatografía a 425 nm, V_E el volumen de elución, la vitamina B₁₂ sirve de sustancia de referencia (patrón interno).

Figura 2:

Resultados de la prueba de compatibilidad *in vitro* de una mezcla de polímeros de hemoglobina de cerdo del Ejemplo 1 con plasma humano (mezcla isovolémica), representados como cambio de las concentraciones de hemoglobina relativas en función del valor de pH después de la acidificación con ácido láctico

- : polímeros de hemoglobina de cerdo (sin poli(óxido de alquileno) unido covalentemente),
- : polímeros de hemoglobina de cerdo con PEG-1000 unido covalentemente,
- ◆: polímeros de hemoglobina de cerdo con PEG-2000 unido covalentemente.

Figura 3:

Una distribución ponderada en masa de los tamaños de molécula y pesos moleculares (M) del polímero de glutardialdehído-hemoglobina humana fraccionado del Ejemplo 2, representada como cromatograma por exclusión de volumen (obtenido con gel Sephacryl S-400 HR, Pharmacia, Frigurgo, D). E_{425nm} es la extinción en el eluato de cromatografía a 425 nm, V_E el volumen de elución, la vitamina B₁₂ sirve de sustancia de referencia (patrón interno).

Figura 4:

Resultados de la prueba de compatibilidad *in vitro* de una mezcla de polímeros de hemoglobina humana fraccionados del Ejemplo 2 con plasma humano (mezcla isovolémica), representados como cambio de las concentraciones de hemoglobina relativas en función del valor de pH después de la acidificación con ácido láctico

- : polímeros de hemoglobina humana (sin poli(óxido de alquileno) unido covalentemente),
- : polímeros de hemoglobina humana con PEG-1000 unido covalentemente.

Figura 5:

Una distribución ponderada en masa de los tamaños de molécula y pesos moleculares (M) del polímero de glutardialdehído-hemoglobina bovina del Ejemplo 3, representada como cromatograma por exclusión de volumen (obtenido con gel Sephacryl S-400 HR, Pharmacia, Frigurgo, D). E_{425nm} es la extinción en el eluato de cromatografía a 425 nm, V_E el volumen de elución, la vitamina B₁₂ sirve de sustancia de referencia (patrón interno).

Figura 6:

Resultados de la prueba de compatibilidad *in vitro* de una mezcla de polímeros de hemoglobina bovina fraccionados del Ejemplo 3 con plasma humano (mezcla isovolémica), representados como cambio de las concentraciones de hemoglobina relativas en función del valor de pH después de la acidificación con ácido láctico

- : polímeros de hemoglobina bovina (sin poli(óxido de alquileno) unido covalentemente),
- : polímeros de hemoglobina bovina con PEG-1000 unido covalentemente.

Ejemplo 1

Unión covalente de propionato de N-hidroxi-succinimidilo-poli(etilenglicol) monofuncional (mPEG-SPA) con masas molares de 1000 g/mol (mPEG-SPA-1000) y 2000 g/mol (mPEG-SPA-2000) a hemoglobina de cerdo covalentemente reticulada

La síntesis de hemoglobinas de cerdo reticuladas se realizó (ligeramente modificada) según las instrucciones de Dinkelmann S. ("Präparation und *in vitro* Charakterisierung eines künstlichen Sauerstoffträgers auf der Basis von Schweinehämoglobin und seine Evaluierung im Kleintier", tesis doctoral, especialidad Medicina, Universidad Johannes Gutenberg, Mainz 1997, véase también Pötzschke H. y col., Art. Cells, Blood Subst. and Immob. Biotechn. 25 (1997), 527-540) y Domack U. ("Entwicklung und *in vivo*-Evaluation eines künstlichen Sauerstoffträgers auf der Basis von Rinderhämoglobin", tesis doctoral, especialidad Química, Universidad Johannes Gutenberg, Mainz 1997): hemoglobina de cerdo desoxigenada, concentrada, altamente pura disuelta en un electrolito acuoso de la composición 50 mmol/l de NaHCO₃ y 100 mmol/l de NaCl se hizo reaccionar a temperatura ambiente con el exceso molar de 14 veces de glutardialdehído. Se añadió cianoborohidruro de sodio, en exceso molar de 10 veces, a la hemoglobina (monomérica), redujo las bases de Schiff formadas en la reticulación y estabilizó la reticulación covalente. La solución obtenida de las hemoglobinas reticuladas se dividió en tres partes (A, B y C) y se procesaron posteriormente de forma distinta.

La parte A permaneció invariable, la determinación de la distribución de peso molecular (según Pötzschke H. y col. (1996): "Vernetzte globuläre Proteine – eine neue Klasse halbsynthetischer polymerer Moleküle: Charakterisierung ihrer Struktur in Lösung am Beispiel hyperpolymeren Hämoglobins und Myoglobins mittels Volumenausschluß-Chromatographie, Viskosimetrie, Osmometrie und Lichtstreuung", Macromolecular Chemistry and Physics 197, 1419 - 1437, así como Pötzschke H. y col. (1996): "Ein neuartiges Verfahren zur Bestimmung Molarer Massen breit verteilter Polymerer mit Hilfe der Gel-Chromatographie und der Viskosimetrie am Beispiel Hämoglobin-Hyperpolymerer", Macromolecular Chemistry and Physics 197, 3229 - 3250) con aplicación de la cromatografía por exclusión de volumen con el gel Sephacryl S-400 HR (Pharmacia Biotech, Friburgo, D) dio para la hemoglobina de

cerdo reticulada (la Figura 1 muestra un cromatograma) un valor modal de la distribución de peso molecular de 520 kg/mol.

Los polímeros de la proporción B se unieron covalentemente con mPEG-SPA-1000 activo monofuncional (Shearwater Polymers Europe, Enschede, NL): Inicialmente se añadió hidrogenocarbonato de sodio como sustancia sólida hasta una concentración final de 150 mmol/l a la solución de hemoglobinas reticuladas, a continuación se realizó la adición de mPEG-SPA-1000 en exceso molar de 12 veces (referido al monómero de hemoglobina) también como sustancia sólida. Después de un tiempo de reacción de una hora se añadió lisina en exceso molar de 60 veces (referido a hemoglobina) y reaccionó con las moléculas de mPEG-SPA-1000 todavía activas. Parte C: con la solución de hemoglobinas reticuladas se procedió exactamente igual que se ha descrito para la parte B, pero usando mPEG-SPA-2000 (Shearwater Polymers Europe, Enschede, NL).

A continuación se realizó un intercambio de disolvente en las tres disoluciones A, B y C (con ayuda de una ultrafiltración, "Ultraminisetete 10 kDa", Pall Gelman Sciences, Rossdorf, D, o una cromatografía por exclusión de volumen en el gel "Sephadex G-15 M", Pharmacia Biotech, Friburgo, D) a una solución en un electrolito acuoso (StLg) de la composición: NaCl 125 mM, KCl 4,5 mM y NaN₃ 3 mM.

La investigación de la compatibilidad con el plasma de la hemoglobina de cerdo no modificada (A), así como de la reticulada modificada con PEG (B y C), se realizó mediante una prueba de precipitación *in vitro* normalizada (Domack U. (1997), véase arriba). Las disoluciones de hemoglobina se mezclaron con las mismas cantidades de plasmas humanos esterilizados por filtración obtenidos y a continuación se añadieron a respectivamente 500 µl de la mezcla hasta 20 µl de ácido láctico 0,5 molar y se incorporaron mediante mezclado, de manera que para cada derivado de hemoglobina que iba a investigarse resultaron respectivamente valores de pH de un intervalo entre aproximadamente 7,4 y 6,8. Después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente y centrifugación de las muestras se realizó la determinación del contenido de hemoglobina (procedimiento de cianohemoglobina modificado según Drabkin: "Hämoglobin-Farbstest MRP 3", Boehringer Mannheim, D) y el valor de pH correspondiente (analizador de sangre "ABL 5", Radiometer, Willich, D) en el sobrenadante.

En la Figura 2 se representan las concentraciones de hemoglobina relativas (referidas a la concentración de partida de hemoglobina antes de la adición de ácido láctico) en función del valor de pH de la mezcla de hemoglobina-plasma, resultan reducciones por la precipitación de proporciones no compatibles. Para valores de pH inferiores a 7,0 se observaron precipitaciones rojas en la muestra A (polímero de hemoglobina de cerdo no modificada) que se representan como reducción de la concentración de hemoglobina. Para esta hemoglobina de cerdo reticulada, en el intervalo de pH de 7,4 a 6,8 también debe contarse *in vivo* con aquellas incompatibilidades. Por el contrario, en las hemoglobinas reticuladas modificadas con PEG B y C no se observaron precipitaciones en el intervalo fisiológicamente interesante entre los valores de pH 7,4 y 6,8 y más allá de éste, incluso hasta 5,5, no disminuyó el contenido de hemoglobina.

Por tanto, en el intervalo de pH fisiológicamente y patofisiológicamente interesante de 7,4 a 6,8, por la unión covalente tanto de PEG-1000 como también de PEG-2000 a hemoglobinas de cerdo reticuladas pudo alcanzarse una protección eficaz de éstas, como también de las proteínas del plasma, de las precipitaciones causadas por interacciones.

Ejemplo 2

Unión covalente de mPEG-SPA-1000 (propionato de N-hidroxi-succinimidilo-polietilenglicol con una masa molar de 1000 g/mol) a hemoglobina humana reticulada.

La síntesis de la hemoglobina reticulada con glutardialdehído se realizó como en el Ejemplo 1, pero usando hemoglobina humana concentrada altamente purificada y utilizando el exceso molar de 16 veces de reticulante. Los polímeros se obtuvieron mediante fraccionamiento de la solución de los productos de reticulación con ayuda de una cromatografía por exclusión de volumen preparativa (según el documento EP-A 95 10 72 80,0: "Verfahren zur Herstellung molekular-einheitlicher hyperpolymerer Hämoglobine" con el gel Sephacryl S-300 HR, Pharmacia Biotech, Friburgo, D) (aquí como el primer 57 % en masa eluido de la hemoglobina reticulada).

Las hemoglobinas reticuladas se dividieron en dos partes A y B. La hemoglobina A (véase la Figura 3) demostró ser hemoglobina principalmente polimérica con un valor modal de la distribución de peso molecular de 950 kg/mol (Ejemplo comparativo 1). La unión covalente de mPEG-SPA-1000 monofuncionalmente activo se realizó análogamente a la manera de proceder descrita en el Ejemplo 1 para la hemoglobina de cerdo reticulada. Después de la adición de hidrogenocarbonato de sodio (hasta 150 mM) a la solución de los polímeros, un exceso molar de 12 veces de mPEG-SPA-1000 pudo reaccionar con el monómero de hemoglobina. A continuación de un tiempo de reacción de una hora se añadió lisina en el exceso molar de 60 veces para 'atrapar' moléculas todavía activas de mPEG-SPA-1000. Como preparación para la prueba de biocompatibilidad *in vitro* siguió el re-lavado (intercambio de disolventes) de las disoluciones A y B en los electrolitos acuosos "StLg" (completamente análogo a como se describe en el Ejemplo 1).

La prueba de precipitación, los resultados se representan en la Figura 4, dio precipitaciones rojas para las hemoglobinas reticuladas A en el intervalo de pH investigado total de 7,9 a 5,1. Por tanto, por ejemplo, en el caso de la simulación de una acidosis con un valor de pH de 6,8 precipitaron aproximadamente el 8 % de los polímeros de hemoglobina. A un pH de 5,7 se alcanzó un máximo de las precipitaciones. Sólo la modificación con mPEG-1000 impide la aparición de los precipitados de hemoglobina hasta bien entrado en el intervalo ácido, hasta un pH de 5,7.

Ejemplo 3

Unión covalente de mPEG-SPA-1000 a hemoglobina bovina reticulada

La preparación de hemoglobinas bovinas reticuladas se realizó mediante reticulación de hemoglobina bovina concentrada altamente pura con un exceso molar de 14 veces de glutardialdehído según el Ejemplo 1, un fraccionamiento molecular de los productos de síntesis, la unión de mPEG-SPA-1000 y la preparación preparativa para la valoración por precipitación *in vitro* según el Ejemplo 2.

5 La Figura 5 muestra una distribución de peso molecular del polímero de hemoglobina no modificado, concretamente un eluograma de una cromatografía por exclusión de volumen (en el gel "Sephacryl S-400 HR", Pharmacia Biotech, Friburgo, D), el valor modal de la distribución de peso molecular asciende aquí a 810 kg/mol.

10 En la prueba de precipitación *in vitro* (la Figura 6 muestra los resultados) se observaron precipitaciones de polímero de hemoglobina para el polímero de hemoglobina bovina no modificada fraccionado en el intervalo de pH de 7,9 a 5,3. Por el contrario, los vasos de muestra de los polímeros de hemoglobina bovina fraccionados modificados con PEG con valores de pH entre 8,0 y 6,7 no contuvieron centrifugados después de la centrifugación.

Mediante la unión covalente de PEG-1000, la compatibilidad con el plasma de la hemoglobina bovina reticulada se eleva hasta tal grado que es posible una administración parenteral, ya que no debe contarse con precipitaciones *in vivo*.

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Derivado de hemoglobina compatible con plasma humano y animal, **caracterizado porque** la hemoglobina está reticulada covalentemente mediante un reticulante bifuncional para proteínas seleccionado de diepóxido de butano, divinilsulfona, un diisocianato, un éster di-N-hidroxisuccinimidílico, un diimidoéster o un dialdehído o glicolaldehído utilizando un exceso molar de 3 a 60 veces referido a hemoglobina monomérica y a continuación un poli(óxido de alquileo) con un peso molecular (masa molar) entre 200 y 5.000 g/mol que es un producto de unión de poli(óxido de alquileo) con una molécula que enmascara un grupo hidroxilo terminal del poli(óxido de alquileo) está unido covalentemente a la hemoglobina.
- 10 2. Derivado de hemoglobina según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el diisocianato está seleccionado de hexametilendiisocianato, ciclohexildiisocianato, ácido 2,5-bisisocianatobencenosulfónico.
3. Derivado de hemoglobina según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el dialdehído está seleccionado de glioxal o glutardialdehído.
4. Derivado de hemoglobina compatible con plasma según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** la hemoglobina es de origen humano, de res o de cerdo.
- 15 5. Derivado de hemoglobina compatible con plasma según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** un derivado de poli(óxido de alquileo) seleccionado de poli(óxido de etileno), poli(óxido de propileno) o copolímeros de óxido de etileno y óxido de propileno está unido a la hemoglobina.
6. Derivado de hemoglobina según la reivindicación 5, **caracterizado porque** el número de poli(óxidos de alquileo) unidos asciende a entre 1 y 40 moléculas de poli(óxido de alquileo) por molécula del monómero de hemoglobina.
- 20 7. Derivado de hemoglobina según la reivindicación 6, **caracterizado porque** la hemoglobina está reticulada mediante glutardialdehído.
8. Derivado de hemoglobina según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** el poli(óxido de alquileo) unido covalentemente posee una masa molar entre 500 y 2000 g/mol.
- 25 9. Procedimiento para la preparación de derivados de hemoglobina como portadores de oxígeno artificiales que son compatibles con plasma sanguíneo humano/animal, **caracterizado porque** la hemoglobina está reticulada covalentemente con un reticulante bifuncional para proteínas seleccionado de diepóxido de butano, divinilsulfona, un diisocianato, un éster di-N-hidroxisuccinimidílico, un diimidoéster o un dialdehído o glicolaldehído utilizando un exceso molar de 3 a 60 veces, referido a hemoglobina monomérica, y un poli(óxido de alquileo) con un peso molecular (masa molar) entre 200 y 5.000 g/mol que es un producto de unión del poli(óxido de alquileo) con una molécula que enmascara un grupo hidroxilo terminal de poli(óxido de alquileo) está unido covalentemente a la hemoglobina reticulada.
- 30 10. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado porque** se utilizan hemoglobinas de ser humano, res o cerdo.
- 35 11. Procedimiento según la reivindicación 9 ó 10, **caracterizado porque** la hemoglobina se reticula en una solución electrolítica acuosa tanto con un exceso molar de 3 a 60 veces, referido a hemoglobina monomérica, de un reticulante bifuncional para proteínas como también se une covalentemente con un exceso molar de 1 a 40 veces, referido a hemoglobina monomérica, de un poli(óxido de alquileo) y a continuación se elimina el exceso de reactivos y se purifica el producto.
- 40 12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 a 11, **caracterizado porque** el diisocianato está seleccionado de hexametilendiisocianato, ciclohexildiisocianato y ácido 2,5-bisisocianatobencenosulfónico.
13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9-12, **caracterizado porque** el dialdehído está seleccionado de glioxal, el glicolaldehído que reacciona análogamente o glutardialdehído.
14. Procedimiento según la reivindicación 13, **caracterizado porque** el reticulante bifuncional para proteínas es glutardialdehído.
- 45 15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 a 14, **caracterizado porque** como poli(óxido de alquileo) se utiliza un derivado de un poli(óxido de etileno), poli(óxido de propileno) o copolímeros de óxido de etileno y óxido de propileno.
- 50 16. Uso de una hemoglobina reticulada compatible con plasma según una de las reivindicaciones 1 a 8 o preparada según una de las reivindicaciones 9 a 15 para la preparación de un agente para la aplicación intravascular o biomédica como portador de oxígeno artificial.
17. Uso según la reivindicación 16, **caracterizado porque** el agente se usa en forma de una preparación farmacéutica como sucedáneo de la sangre, o como una adición a la sangre o a una solución nutritiva, en el

organismo humano y animal, en órganos individuales o en aplicaciones biotécnicas.

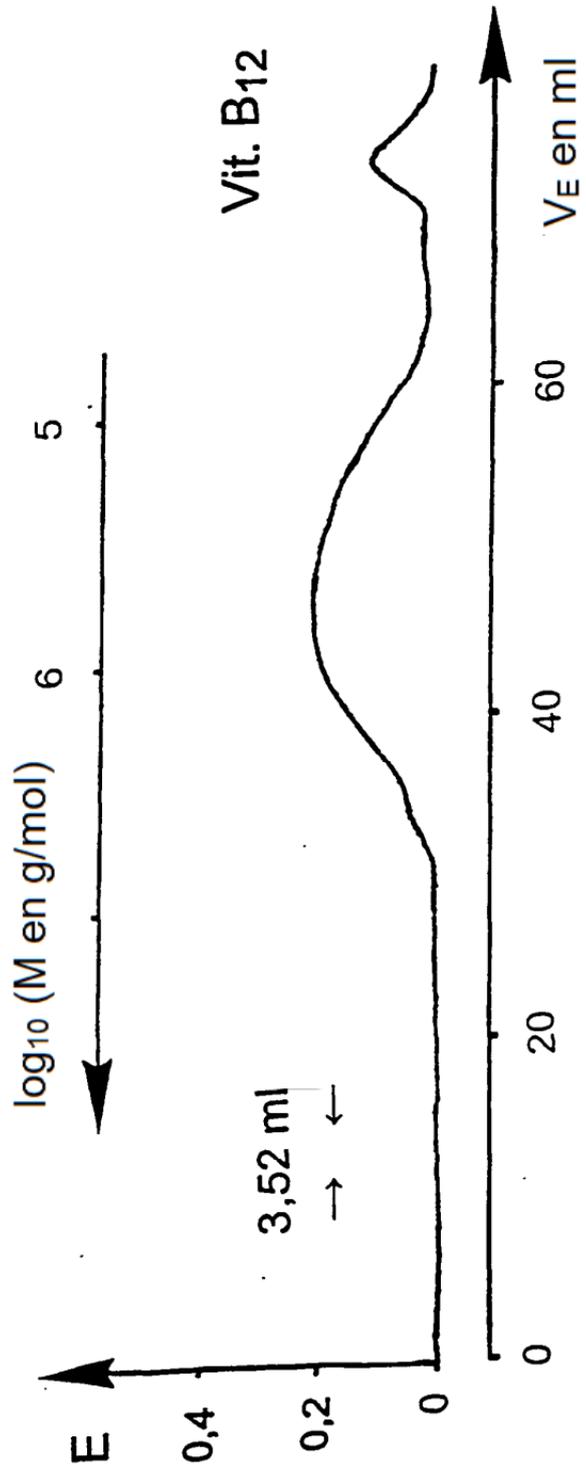


Figura 1

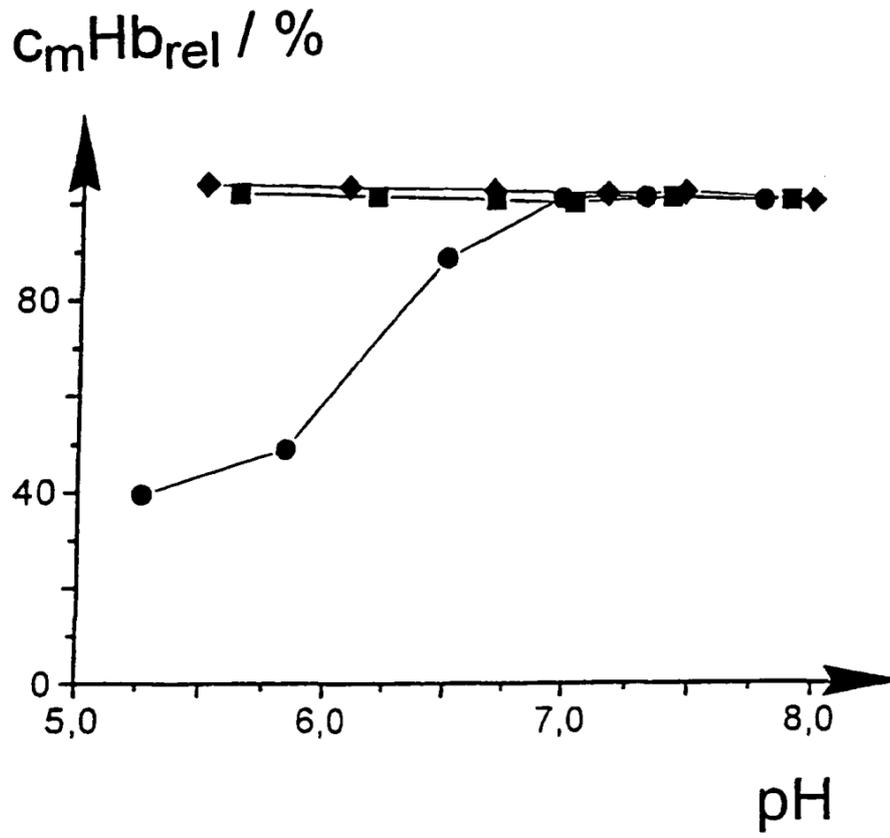


Figura 2

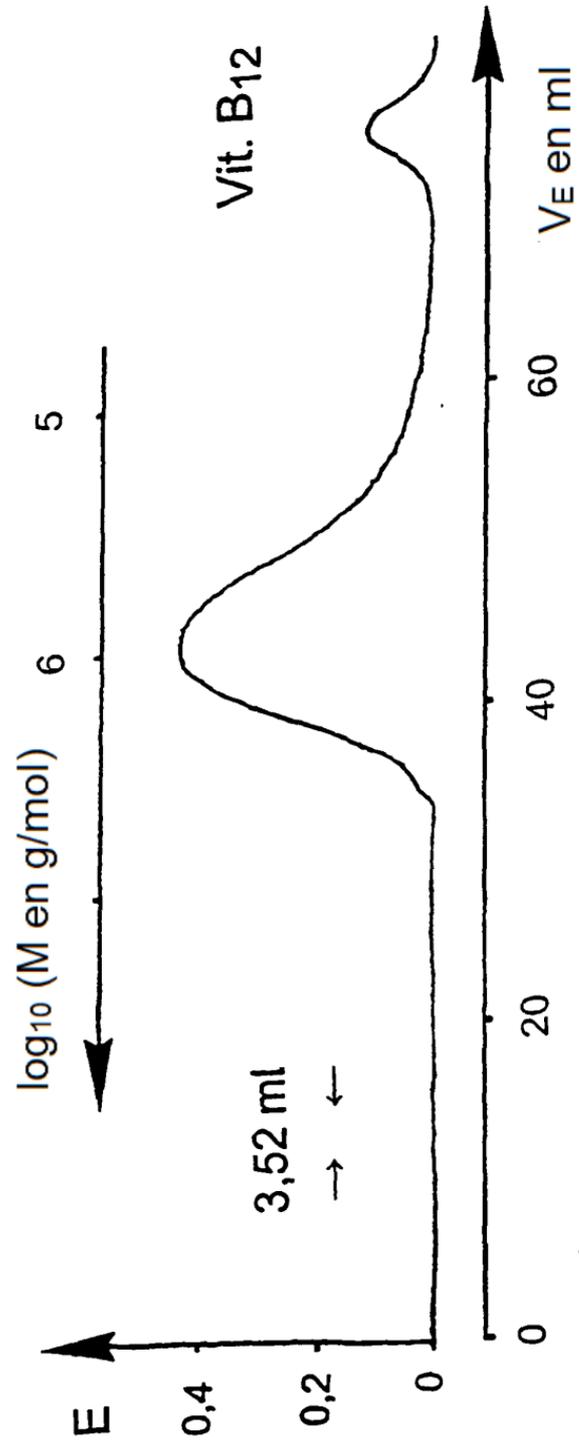


Figura 3

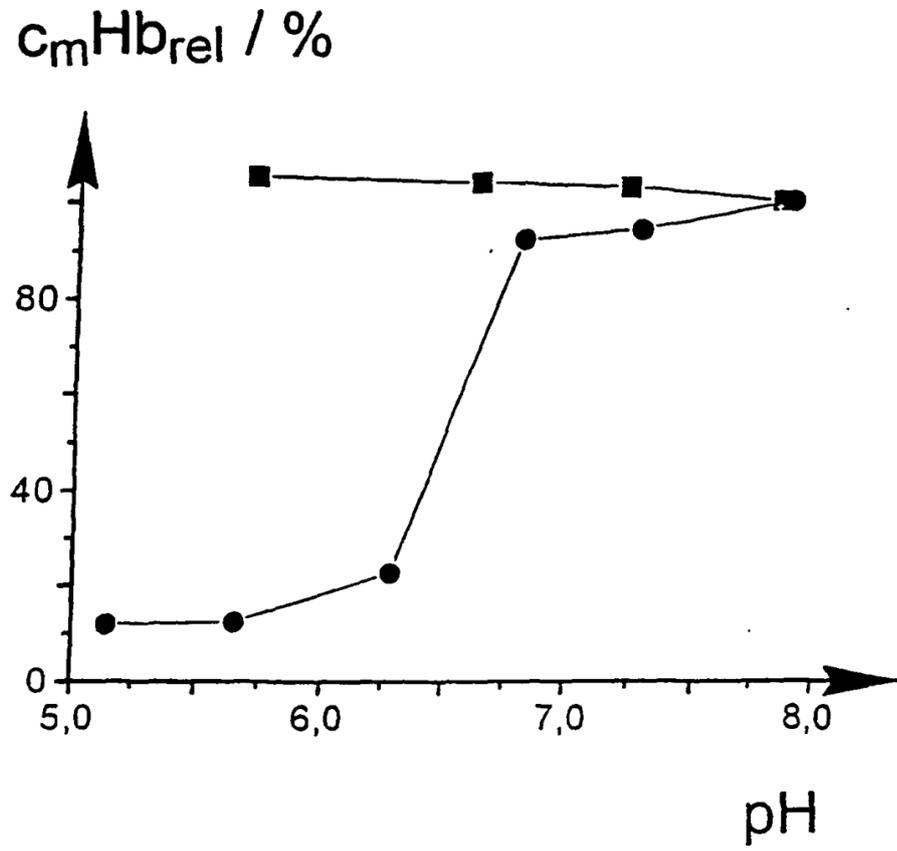


Figura 4

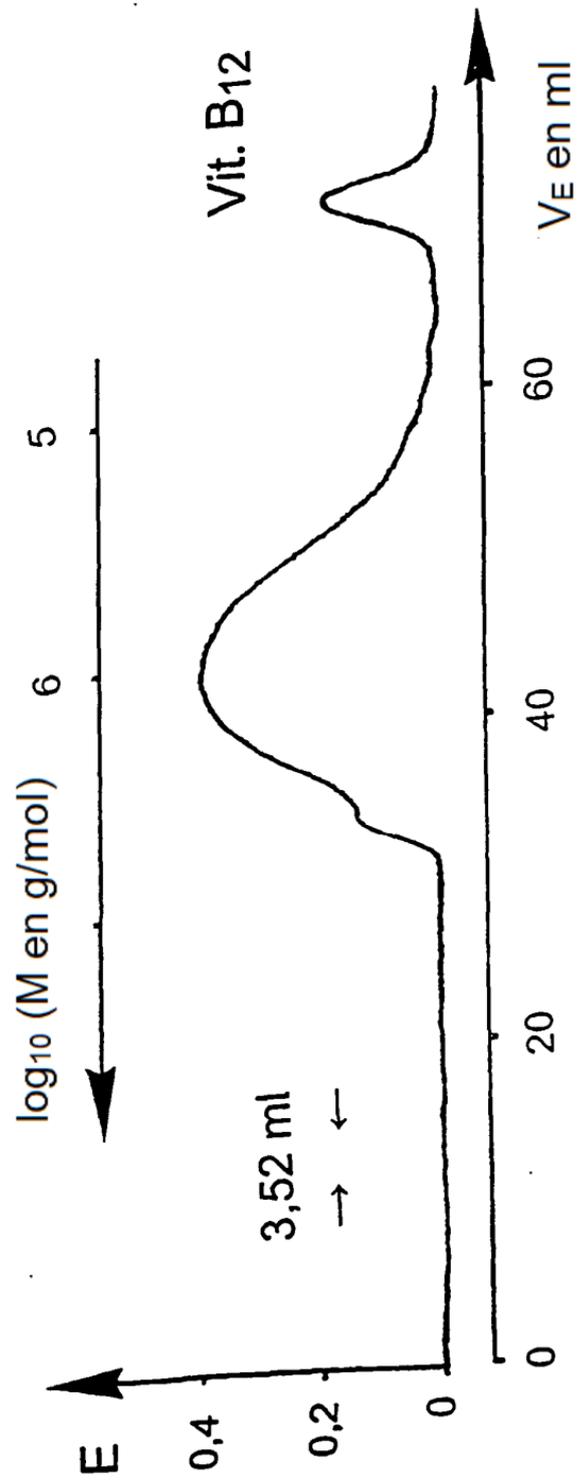


Figura 5

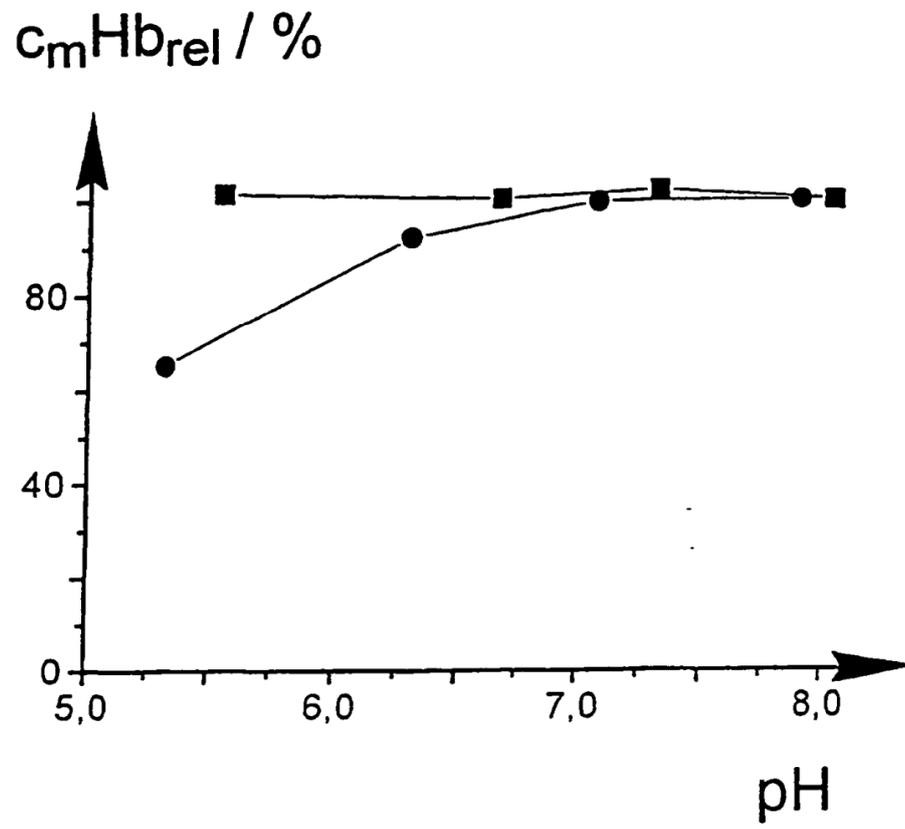


Figura 6