

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 835**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2000 E 00910473 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2012 EP 1163010**

54 Título: **Conjugados de hemoglobina-antioxidante**

30 Prioridad:

18.03.1999 CA 2266174

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

03.04.2013

73 Titular/es:

**THERAPURE BIOPHARMA INC. (100.0%)
2585 MEADOWPINE BLVD
MISSISSAUGA ON L5N 8H9, CA**

72 Inventor/es:

**ADAMSON, JAMES, GORDON y
MCINTOSH, GREG, ANGUS**

74 Agente/Representante:

PERAL CERDÁ, David

ES 2 399 835 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

Conjugados de hemoglobina-antioxidante.

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a composiciones de hemoglobina, y más específicamente a composiciones de hemoglobina-antioxidante para su administración a seres vivos para fines de transporte de oxígeno y fines terapéuticos anti-oxidantes.

10 Antecedentes de la invención

La interrupción temporal del flujo sanguíneo hacia el tejido es una etapa necesaria en muchos procedimientos quirúrgicos, tales como cirugía cardíaca y conservación o trasplante de órganos, con el fin de impedir la pérdida de sangre y para facilitar la cirugía. Los vasos sanguíneos también pueden bloquearse durante acontecimientos patológicos, tales como infarto de miocardio, accidente cerebrovascular trombótico, oclusiones vasculares embólicas, angina de pecho e insuficiencia vascular periférica. La falta de suministro de sangre en estas circunstancias da como resultado isquemia, que se invierte tras la reperfusión del tejido isquémico con sangre u otra disolución que porta oxígeno. Aunque esta readmisión de oxígeno es crítica para la función continuada del tejido, se acepta generalmente que el oxígeno recién introducido contribuye a la formación de radicales libres derivados de oxígeno que provocan daño tisular. Un mecanismo mediante el cual se hace tóxico el oxígeno introducido es mediante conversión a superóxido mediante xantina oxidasa. Los niveles de esta enzima pueden aumentar durante el período isquémico. Simultáneamente, se empobrecen los niveles de agentes reductores, que eliminan la toxicidad, tales como glutatión. El daño tisular que se produce como resultado de estos acontecimientos se conoce como lesión por reperfusión, y se sabe que se produce durante la reperfusión con sangre y se anticipa en algunas circunstancias con el uso de sustitutos de sangre.

Una clase de sustitutos de sangre, los portadores de oxígeno a base de hemoglobina (HBOC), están compuestos por hemoglobina acelular modificada químicamente. La hemoglobina acelular presenta una fuente adicional de especies de oxígeno reactivas potencialmente dañinas. La hemoglobina en sangre está normalmente contenida dentro de los glóbulos rojos de la sangre, en los que circula a través del cuerpo para cumplir su función de transporte de oxígeno. La hemoglobina en los glóbulos rojos se une al oxígeno a medida que la sangre circula a través de los pulmones, suministra el oxígeno a los tejidos corporales y lo libera ahí, para sus funciones metabólicas normales. El comportamiento químico de la hemoglobina en sangre está restringido por su presencia en los glóbulos rojos, que también contienen muchos otros componentes tales como enzimas que influyen en el comportamiento químico de la hemoglobina en los mismos. Cuando la hemoglobina se extrae a partir de glóbulos rojos y se purifica lista para su uso como transportador de oxígeno acelular en aplicaciones de sustitutos de sangre, se pierde la influencia química sobre la hemoglobina de los otros componentes de glóbulos rojos, y viceversa.

Una de estas influencias se refiere a reacciones oxígeno-hemoglobina, y la generación de especies de oxígeno tóxicas. La oxidación de hemoglobina mediante oxígeno ligada produce metahemoglobina, en la que se oxida hierro hémico al estado Fe (III), y en la que se genera el radical libre de oxígeno "superóxido", O₂⁻. La metahemoglobina no tiene ninguna función útil significativa, puesto que no puede unirse a ni transportar oxígeno. Sin embargo, el superóxido está asociado a varios efectos perjudiciales en el cuerpo, tales como daño oxidativo y lesión a componentes vasculares incluyendo tejido del endotelio y subendotelial. En el glóbulo rojo, están presentes enzimas para convertir estas especies de oxígeno tóxicas en subproductos inocuos. Por tanto, el sistema enzimático de metahemoglobina reductasa está presente para reducir la metahemoglobina en hemoglobina. La superóxido dismutasa y catalasa están presentes, respectivamente, para convertir superóxido en peróxido de hidrógeno, y para convertir peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular.

La hemoglobina fuera del glóbulo rojo no tiene reactivos enzimáticos de este tipo a la mano para tratar con estos subproductos de oxidación. Por consiguiente, el uso de hemoglobina acelular como transportador de oxígeno puede producir cantidades excesivas de productos de oxidación perjudiciales tales como superóxido, que surge del oxígeno unido o que se une a la propia hemoglobina. Asimismo, el oxígeno disuelto en la disolución de HBOC, o en la sangre mezclada reintroducida en el tejido isquémico, puede dar como resultado especies de oxígeno reactivas que dan lugar a lesión por reperfusión mediante los mecanismos descritos anteriormente. Sin embargo, la necesidad de volver a conseguir suministro de oxígeno es primordial, e invalida los riesgos asociados con la lesión por reperfusión e introducción de radicales de oxígeno.

60 Biomater. Artif. Cells Immobilization Biotechnol. 1992; 20(2-4):587-95 se refiere a un estudio de propiedades farmacocinéticas de hemoglobina humana polimerizada con rafinosa con apertura de anillo, oxidada con peryodato, tras transfusión en la rata.

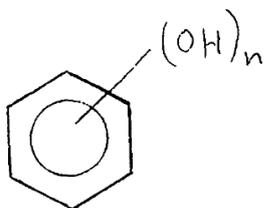
65 Chem. Res. Toxicol. Enero de 1998; 11(1):54-63 trata las propiedades antioxidantes de 2,3-dimetoxi-5-metil-6-(10-hidroxidecil)-1,4-benzoquinona (idebenona).

El documento WO 98/34955 da a conocer conjugados de hemoglobina y un aceptor de electrones.

Es un objeto de la presente invención proporcionar una composición de hemoglobina novedosa que pueda proporcionar oxígeno mientras se supera o al menos se reduce el problema anterior.

Sumario de la invención

La preparación de sustancias de transporte de oxígeno, sintéticas o semisintéticas tales como HBOC ofrece la oportunidad de la unión de sustancias mejoradoras tales como antioxidantes seleccionados. Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición química según las reivindicaciones adjuntas. También se da a conocer en el presente documento una composición química que tiene capacidad de transporte de oxígeno y que comprende moléculas de transporte de oxígeno biocompatibles unidas químicamente a uno o más antioxidantes biocompatibles seleccionados de: compuestos fenólicos no enzimáticos, es decir compuestos que contiene uno o más grupos de fórmula:



en la que n es un número entero desde 1 - 3, estando el anillo aromático sustituido adicionalmente, y estando opcionalmente condensado o unido a otro sistema de anillo carbocíclico o heterocíclico; pirazolinas; compuestos carotenoides y retinoides; quinonas; polipirroles; indoles y aminoindoles; análogos de purina; ácido ascórbico; y antioxidantes esteroides y alcaloides.

Los conjugados de la presente invención proporcionan la funcionalidad antioxidativa en la proximidad unida químicamente a las moléculas de transporte de oxígeno. Por consiguiente, las especies de oxígeno reactivas generadas mediante reacción de disoluciones que contienen oxígeno se someten inmediatamente a los efectos de la función antioxidante, una característica altamente deseable puesto que las especies de oxígeno viven un tiempo corto y no viajan lejos antes de provocar daño. Esto es especialmente importante cuando se usan HBOC a base de hemoglobina modificada, puesto que se conoce que las hemoglobinas modificadas se extravasan, y entonces la actividad antioxidante se transportará a cualquier sitio al que se mueva el HBOC. Además, el resto antioxidante oxidado conjugado con el transportador de oxígeno puede reducirse *in vivo* a un estado químico en el que puede tener una actividad antioxidante adicional, y recircularse el conjugado en el cuerpo para tal acción adicional.

Breve referencia a los dibujos

Las figuras 1 y 2 son presentaciones gráficas de los resultados del ejemplo 2 más adelante.

Las figuras 3 y 4 son presentaciones gráficas de los resultados del ejemplo 7 más adelante.

Descripción de las realizaciones preferidas

Los compuestos fenólicos para su uso como antioxidantes en las composiciones dadas a conocer en el presente documento son antioxidantes fenólicos sustituidos y polifenólicos tales como probucol y ésteres del mismo, bis(1,1-metiletil)-4-[(1-etilamino)metilfenol y sales de adición del mismo, y 5-(3,5-diterc-butil-4-hidroxi-bencil)tiazolidin-4-ona; éteres fenólicos tales como (3,5-diterc-butil-4-hidroxi-feniltio)alcanoles; ácidos hidroxámicos sustituidos con diterc-butilhidroxifeniltio; compuestos a base de cromano tales como cromanoles y dihidrobenzofuranoles; flavonoides e isoflavonoides tales como flavanona y dihidroflavanol; galatos; catecoles y derivados de catecol; y ácidos fenólicos tales como ácido p-hidroxibenzoico, ácido dihidroxibenzoico y ácido 2-(2,3-dihidro-5-acetoxi-4,6,7-trimetil)benzofuranilacético. Se prefieren especialmente los cromanoles tales como tocol y los tocoferoles, y más especialmente los 6-hidroxicromanos tales como ácidos 6-hidroxicromancarboxílicos y 6-hidroxicromano-2-carbonitrilos. Otro compuesto fenólico preferido es 3,4-dihidro-6-hidroxi-2H-1-naftopirano.

Pirazolinonas adecuadas se ejemplifican mediante norfenazona y 3-metil-1-fenil-pirazolin-5-ona.

Compuestos carotenoides y retinoides son vitamina A, carotenos, licopeno y luteína.

Entre los compuestos antioxidantes de quinona adecuados están la coenzima Q y las diversas quinonas derivadas de plantas tales como las plastiquinonas.

Un ejemplo de un compuesto de tetrapirrol es bilirrubina.

La melatonina es un ejemplo de un compuesto de indol adecuado para su uso en el presente documento.

5 Los análogos de purina útiles en el presente documento incluyen ácido úrico, alopurinol y oxipurinol.

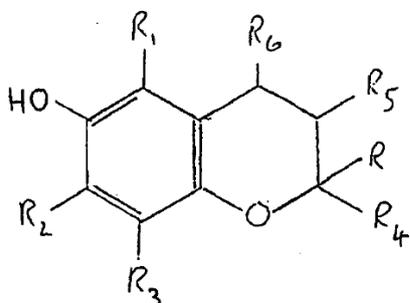
Entre los antioxidantes esteroideos adecuados se prefiere el succinato de metilprednisolona y lazaroides (21-aminoesteroideos) tales como tirilazad.

10 La química de conjugación del antioxidante biocompatible con la sustancia de transporte de oxígeno está dentro de la experiencia de la técnica, basándose en una consideración de los grupos químicos disponibles en el antioxidante elegido y aquéllos en el transportador de oxígeno elegido. Es necesario tener cuidado para garantizar que ni la función de transporte de oxígeno ni la capacidad antioxidante se vean afectadas significativamente por la forma elegida de conjugación.

15 El compuesto de transporte de oxígeno puede ser una macromolécula de hemoproteína tal como hemoglobina o hemoalbúmina, que transportan oxígeno mediante la unión reversible del oxígeno con el resto hemo, que disuelve el oxígeno gaseoso y lo suministra como disolución. Entre los compuestos de transporte de oxígeno disponibles se prefiere la hemoglobina.

20 La especie de hemoglobina para su uso en conjugados preferidos de la presente invención puede ser sustancialmente cualquier hemoglobina biocompatible que pueda transportar oxígeno. Puede ser de origen humano o animal. Por tanto puede obtenerse de glóbulos rojos de mamífero, por ejemplo sangre humana antigua, mediante lisis de los glóbulos rojos y separación y purificación de la hemoglobina así obtenida, mediante métodos conocidos en la técnica. La hemoglobina resultante debe estar libre de estromas y libre de endotoxinas, para la mejor biocompatibilidad. Alternativamente, la hemoglobina puede prepararse, en forma nativa o mutante, mediante técnicas recombinantes y técnicas de cultivo celular conocidas en la técnica. El uso de especies de hemoglobina mutantes naturales o no naturales está también dentro del alcance de la invención.

30 Una clase específica de conjugados de transportador de oxígeno-antioxidante dada a conocer en el presente documento es un conjugado químico de un compuesto de transporte de oxígeno y un compuesto de 6-hidroxicromano que tiene propiedades antioxidantes y que corresponde a la fórmula general:



35 en la que cada uno de R_1 , R_2 y R_3 se selecciona independientemente de H, alquilo C_1-C_8 y $(CH_2)_nX$ en el que n es un número entero de desde 0 hasta 20; cada uno de R , R_4 , R_5 y R_6 se selecciona independientemente de H, alquilo C_1-C_{20} , X y $-(CH_2)_mX$ en el que m es un número entero de desde 0 - 20; y X es un grupo funcional reactivo seleccionado junto con el compuesto de transporte de oxígeno elegido de modo que sea reactivo con el mismo para llevar a cabo la unión química del compuesto de transporte de oxígeno al compuesto de cromano; con la condición de que el compuesto de cromano incluya al menos un grupo funcional X.

45 En tales conjugados, el compuesto de transporte de oxígeno es preferiblemente una macromolécula de hemoproteína, tal como una especie de hemoglobina, y el grupo funcional X en el cromano es un grupo que puede hacerse reaccionar con residuos de aminoácido de las cadenas de proteína de la misma. Ejemplos de elecciones adecuadas para el grupo X son halógeno, carboxilo, amino, hidroxilo, tiol, azida, azo, aldehído, guanidina y fosfato.

50 Una clase especialmente preferida de conjugados según la presente invención son conjugados de hemoglobina-ácido cromanocarboxílico, es decir el grupo X es COOH, unido covalentemente de manera química a la hemoglobina usando su función carboxilo. La unión puede ser directa, a grupos amina primaria en las cadenas de globina de hemoglobina. Alternativamente puede usarse un ligador químico apropiado. Los ácidos cromanocarboxílicos usados en la presente invención se conocen en muchos casos como antioxidantes bioaceptables, que pueden eliminar superóxido y otras especies de oxígeno reactivas formadas *in vivo*. Se ha encontrado según la presente invención que la función antioxidante de los ácidos cromanocarboxílicos permanece al menos sustancialmente no afectada tras la conjugación con la especie de hemoglobina, y de hecho parece que aumenta mediante la conjugación, con respecto

al efecto antioxidante de una mezcla física de hemoglobina y el ácido cromanocarboxílico. Los conjugados de hemoglobina de la presente invención conservan la capacidad de transporte de oxígeno.

Una forma preferida de especie de hemoglobina para su uso en la presente invención es hemoglobina reticulada, en la que se han reticulado intramolecularmente de manera química las unidades de hemoglobina tetraméricas para impedir la disociación en dímeros de hemoglobina. Como es bien conocido, esta tendencia a la disociación de los tetrameros de hemoglobina naturales en dímeros es otra consecuencia de extraer hemoglobina de los glóbulos rojos de la sangre. Los dímeros de hemoglobina formados mediante tal disociación, de peso molecular de aproximadamente 32.000 Dalton, se pierden prematuramente del sistema mediante excreción a través del riñón, y por tanto debe minimizarse la disociación. Se conocen y se dan a conocer una variedad de métodos en la técnica para reticular intramolecularmente hemoglobina para evitar tal disociación, usando una variedad de reticuladores químicos tales como glutaraldehído, polialdehídos tales como los derivados de apertura de anillo oxidativa de azúcares y polisacáridos, compuestos de diaspirina, compuestos de piridoxilo, compuestos de trimesoilo y similares. La hemoglobina usada en la presente invención también puede polimerizarse mediante la unión intermolecular de dos o más de tales tetrameros, preferiblemente hasta doce de tales tetrameros, en forma polimérica, usando los mismos o múltiples reactivos de reticulación. Son particularmente deseables mezclas que contienen dos o más de tales especies diferentes de hemoglobina reticulada intramolecularmente y unida intermolecularmente.

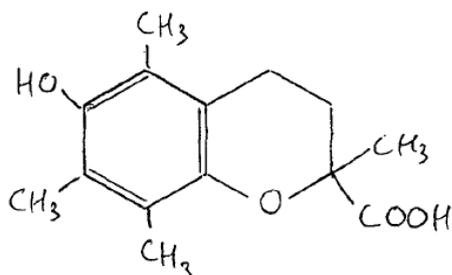
En una alternativa según la presente invención, el ácido cromanocarboxílico se acopla a una hemoglobina no reticulada, y se emprende posteriormente la reticulación del conjugado, para formar complejos de hemoglobina-antioxidante tetraméricos estabilizados intramolecularmente, opcionalmente en mezcla con tales complejos oligomerizados o polimerizados. El reactivo de reticulación usado en un procedimiento de este tipo puede ser cualquiera de los mencionados anteriormente, aunque se prefiere rafinosa con apertura de anillo de manera oxidativa (a continuación en el presente documento "o-rafinosa"), teniendo en cuenta la composición de producto deseable que produce. Las condiciones de la reacción de reticulación de hemoglobina, cuando se realiza tras la conjugación con el antioxidante de ácido cromanocarboxílico, no son significativamente diferentes de las utilizadas para la hemoglobina de reticulación sola.

Usando cualquier estrategia, mediante la cual se conjuga hemoglobina con el ácido cromanocarboxílico antes de la reticulación de la hemoglobina, o se conjuga hemoglobina reticulada con el ácido cromanocarboxílico, puede modificarse cualquier hemoglobina no reticulada con el ácido cromanocarboxílico. Esto es beneficioso puesto que la hemoglobina no reticulada todavía puede generar especies de oxígeno reactivas a las que debe aplicarse un efecto de eliminación de oxígeno, y se sabe que esta forma no reticulada de hemoglobina tiene propiedades de biodistribución diferentes en comparación con las hemoglobinas reticuladas. También pueden usarse métodos conocidos para la eliminación de hemoglobina no reticulada para controlar la cantidad de tales especies.

La presente invención también puede usarse con otras formas modificadas de hemoglobina, tales como hemoglobina conjugada con polímeros, por ejemplo poli(óxido de etileno) (PEG) funcionalizado apropiadamente, polisacáridos, poliaminoácidos, proteínas y soportes insolubles, y hemoglobina encapsulada. Todos pueden beneficiarse de la presencia de moléculas de antioxidante unidas a la misma, tal como se describe en el presente documento.

El ácido cromanocarboxílico usado en los conjugados dados a conocer en el presente documento y que corresponde a la fórmula química anterior puede ser un derivado de ácido carboxílico de vitamina E, por ejemplo uno en el que el radical R es una cadena de alquilo ramificada de 16 átomos de carbono, tal como 4,8,12-trimetil-tridecilo o 4,8,12-trimetil-3,7-11-tridecatrienilo, con cualquiera de las diversas estereconfiguraciones posibles. Se prefieren compuestos en los que al menos uno de R₁, R₂ y R₃ es metilo, y R₄ es un enlace directo. Otro grupo preferido de compuestos son aquellos de la fórmula anterior en la que R representa metilo.

El más preferido entre los ácidos cromanocarboxílicos para su uso en la presente invención es 2,5,7,8-tetrametil-2-carboxi-croman-6-ol, comúnmente conocido como Trolox, de fórmula química:



Por consiguiente la invención se describirá adicionalmente con referencia específica al uso de Trolox, para facilitar la descripción. Trolox, un análogo de vitamina E con solubilidad de agua superior a la de la vitamina E, tiene actividad antioxidante. Según este aspecto de la invención, se ha encontrado que la conjugación de Trolox con hemoglobina

aumenta la solubilidad del Trolox, para lograr concentraciones eficaces superiores a las posibles con Trolox libre, para conducir a un efecto antioxidativo superior del mismo. La semivida circulatoria *in vivo* del Trolox también aumenta significativamente como resultado de aumentar su masa a través de la conjugación.

- 5 Trolox y hemoglobina de cualquiera de los tipos mencionados anteriormente pueden unirse químicamente entre sí. La función carboxilo del residuo de Trolox, a través de activación apropiada, reacciona con un grupo amina primaria en una cadena de globina de hemoglobina, por ejemplo un residuo de lisina, para formar un enlace amida covalente.

10 La reacción de Trolox y la hemoglobina pueden facilitarse mediante el uso de un compuesto químico de activación tal como clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) u otras carbodiimidias (solas o en combinación con otros activadores tales como N-hidroxisulfosuccinimida), derivados de isoxazolio tales como reactivo de Woodward K, cloroformatos, N,N'-carbonildiimidazol, N-carbalcoxidihidroquinolinas y similares. El Trolox puede usarse en ácido, derivado de ácido o forma de anhídrido simétrica. Los compuestos de activación tales como EDC reaccionan en primer lugar con el Trolox para activar el grupo carboxilo del Trolox, que luego reacciona con un grupo

15 amino de la hemoglobina, con eliminación de la funcionalidad de EDC. El uso de tales compuestos de activación permite cargas más grandes de Trolox sobre hemoglobina y un mejor control sobre la cantidad de tal carga. Pueden usarse diversos disolventes según sea necesario en combinación con la disolución acuosa de hemoglobina para ayudar a la solubilidad del Trolox y los reactivos de acoplamiento.

20 Las condiciones y los procedimientos para hacer reaccionar la hemoglobina con tales compuestos de carbodiimida están bien dentro de la experiencia de la técnica. Las reacciones tienen lugar adecuadamente a temperaturas ambiente, usando disoluciones acuosas.

25 En lugar de unión directa, puede utilizarse un espaciador o ligador químico, de modo que el conjugado comprende hemoglobina a la que están unidas una o más moléculas distintas de Trolox, y el Trolox está unido a los residuos químicos distintos de Trolox. Los ejemplos de tales ligadores incluyen azúcares y polisacáridos funcionalizados, poliaminoácidos tales como polilisina, derivados de PEG y diversos ligadores bi- o polifuncionales. El uso de tales ligadores puede proporcionar varios sitios de unión a Trolox por enlace a la hemoglobina, para proporcionar una carga superior con Trolox con menos modificación de la hemoglobina. También permite diversas modificaciones de las propiedades de los conjugados (solubilidad, actividad, etc.) mediante la elección de un ligador apropiado.

30

El grupo o grupos precisos en las cadenas de globina que se usan para unirse al Trolox, opcionalmente a través del ligador, no parecen ser críticos. Los sitios pueden estar en cualquiera o en ambas de las cadenas de alfa-globina y las cadenas de beta-globina. Para fines de unión química, pueden usarse no sólo los grupos amino sino también otros grupos funcionales tales como tiol, carboxilato, guanidino, imidazol o hidroxilo, de la especie de hemoglobina, con elección apropiada de ligadores y su química aplicable. Tales elecciones están dentro de la experiencia de la técnica.

35

Una característica preferida del procedimiento de la invención es la adición de la cantidad deseada de Trolox en varias alícuotas secuenciales, por ejemplo 2 - 5, en lugar de una adición individual de toda la cantidad. Se demostró que tal adición secuencial aumenta la carga de Trolox sobre la hemoglobina, y da como resultado productos con actividad antioxidante superior.

40

La cantidad preferida de Trolox conjugado con hemoglobina según la presente invención se determina basándose en proporcionar suficiente Trolox para realizar su función antioxidante, de eliminación de radicales en la práctica, pero no tanto como para interferir con la capacidad de transporte de oxígeno y afinidad de oxígeno del HBOC. La cantidad puede controlarse mediante el control de la cantidad de material de activación y/o Trolox añadido a la disolución de reacción en la que se prepara el conjugado. Tales cantidades relativas adecuadas de hemoglobina y Trolox son de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 100, siendo las cantidades más preferidas de desde

45

50 aproximadamente 10 hasta aproximadamente 100.

Tras la preparación del conjugado tal como se describió, el producto se purifica cuidadosa y meticulosamente para eliminar los reactivos no cambiados y cualquier otro contaminante, si se desea. La purificación puede ser mediante cromatografía (exclusión molecular, cromatografía por interacción hidrófoba, afinidad, intercambio iónico, etc.) u otros métodos conocidos en la técnica, incluyendo diálisis/diafiltración, ultrafiltración o precipitación selectiva, centrifugación, extracción o cualquier otra forma de separación. El conjugado se almacena adecuadamente en condiciones selladas, no oxidativas, a temperaturas de refrigerador tales como 4°C o a temperaturas más altas, como disolución acuosa lista para su administración a un paciente según se requiera. También pueden usarse condiciones de almacenamiento alternativas tales como polvo liofilizado y disolución congelada.

55

60 La invención se describe adicionalmente, para fines ilustrativos, en los siguientes ejemplos específicos:

Descripción específica de las realizaciones más preferidasEjemplo 1 - Preparación y caracterización de conjugados

5 Se realizaron una serie de experimentos en los que se conjugó Trolox (TX) con carbonomonoxihemoglobina (COHb) usando clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) como agente de acoplamiento en condiciones diferentes expuestas en la tabla 1 a continuación. En cada caso, se combinaron EDC, EDC y Trolox (TX) en concentración equimolar en acetonitrilo durante 10 minutos a temperatura ambiente para proporcionar una disolución de TX-EDC madre (1,55 M). Se diluyó la disolución de TX-EDC madre con acetonitrilo, si era necesario, justo antes de la adición a Hb de modo que el contenido en acetonitrilo y TX-EDC final de la reacción de conjugación fuera tal como se indicaba en la tabla 1. Se realizaron todas las conjugaciones en tampón MES 40-50 mM a los valores de pH indicados. Se mantuvieron las mezclas de reacción a 22°C durante hasta 24 horas bajo gas de CO. Se filtraron y dializaron muestras frente a solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4, antes del análisis.

15 Tabla 1: Preparación de disoluciones de reacción de Trolox-Hb

Rxn	Trolox (mM)	CO-Hb (mM)	Razón TX:Hb	pH	Tiempo (h)	Acetonitrilo (% en volumen)
1	1,55	1,55	1	7	24	10
2	1,55	0,155	10	7	24	10
3	15,5	1,55	10	7	24	10
4*	15,5	0,155	100	7	24	10
5*	155	1,55	100	7	24	10
6	155	1,55	100	7	20	10
7	15,5	0,155	100	7	20	1
8	155	1,55	100	7	4	10
9	155	1,55	100	6	4	10

20 Para la caracterización de los conjugados así preparados, se usó HPLC en fase inversa para separar las cadenas de globina (nativas o modificadas) de conjugados. También se separa el resto hemo durante este procedimiento. Se usó espectrometría de masas por electropulverización acoplada a HPLC en fase inversa (LCMS) para determinar los pesos moleculares de las cadenas (tabla 2). Normalmente, las cadenas modificadas se eluyeron después que las cadenas no modificadas. Se identificaron tres cadenas modificadas principales mediante LCMS (tabla 3): cadena beta con una molécula de Trolox unida ($\beta(TX)_1$), y cadenas alfa con una ($\alpha(TX)_1$) o dos ($\alpha(TX)_2$) moléculas de Trolox unidas. Las masas están de acuerdo con los conjugados unidos a amida. Las reacciones control, en las que se trató Hb con acetonitrilo solo, no mostraron evidencia de modificación de la cadena de globina.

25 El examen de los datos de modificación de la cadena de globina revela el control logrado mediante la manipulación apropiada de las condiciones de reacción. La razón de TX con respecto a hemoglobina durante la conjugación tiene el efecto más grande sobre la modificación de la cadena de globina. El aumento de la razón TX:Hb desde 1:1 hasta 10:1 hasta 100:1 a 1,55 mM de Hb aumentó la modificación de la cadena de globina desde el 1,5 hasta el 24,0 hasta el 50,5% en las reacciones 1, 3 y 5, respectivamente. A 0,155 mM de Hb, el aumento de la razón TX:Hb desde 10:1 hasta 100:1 aumentó la modificación de la cadena de globina desde el 22,0 hasta el 79,5% en las reacciones 2 y 4, respectivamente. El aumento de la concentración del reactante tuvo poco efecto usando una razón TX:Hb de 10:1, produciendo el 22,0 y el 24,0% de modificación de cadena a 0,155 y 1,55 mM de Hb en las reacciones 2 y 3, respectivamente. Se redujo la modificación de globina (del 79,5 al 50,5%) aumentando la concentración de Hb desde 0,155 hasta 1,55 mM a TX:Hb 100:1. Una dilución de 10 veces de todos los reactantes, manteniendo TX:Hb constante a 100:1, dio como resultado una disminución de poca importancia en la modificación de globina (reacciones 6 frente a 7), como un tiempo de reacción más corto (reacciones 5 frente a 8), y un aumento de pH desde 6 hasta 7 (reacciones 8 frente a 9). La disminución del contenido en acetonitrilo desde el 10 hasta el 1% (v/v) dio como resultado modificaciones de globina del 79,5 y del 59,4% en las reacciones 5 y 8, respectivamente.

40

Tabla 2: Distribución de cadenas de globina modificadas en diversas condiciones de reacción de TX-EDC.

Rxn	Cadenas modificadas (%)	$\alpha(\text{TX})_1$ (%)	$\alpha(\text{TX})_2$ (%)	$\beta(\text{TX})_1$ (%)	Otros (%)	Razón TX:Hb conjugada*
1	1,5	1,5	0,0	0,0	0,0	0,1
2	22,0	13,9	1,1	4,0	3,1	0,8
3	24,0	12,4	0,0	6,0	5,6	0,7
4	79,5	26,3	21,0	24,5	7,6	3,7
5	50,5	32,8	4,7	4,8	8,2	1,9
6	66,7	35,6	7,0	11,5	12,6	2,4
7	59,4	25,3	3,9	10,4	19,8	1,7
8	43,7	26,4	3,9	5,4	7,9	1,6
9	52,6	33,6	3,6	8,2	7,2	2,0

*La razón TX:Hb conjugada no incluye especies no caracterizadas enumeradas como otras.

Tabla 3: Masas calculadas y observadas para cadenas de globina de conjugados de Hb-TX

Cadena de globina	Masa calculada (Da)	Masa observada (Da)
α	15126	15125
β	15868	15864
$\alpha(\text{TX})_1$	15358	15358
$\alpha(\text{TX})_2$	15591	15595
$\beta(\text{TX})_1$	16100	16099

5

Ejemplo 2 – Medición de la actividad antioxidante

Se recogió sangre en tubos heparinizados y se separaron eritrocitos mediante centrifugación y se lavaron 3 veces con 10 volúmenes de PBS, pH 7,4. Durante el último lavado, se centrifugaron los eritrocitos a 1000x g durante 10 minutos para obtener una preparación celular empaquetada de manera consistente. Se realizó el ensayo de hemólisis mediada por radicales peroxilo mediante un método modificado de Miki *et al.*, (M. Miki, H. Tamai, M. Mino, Y. Yamamoto y E. Niki., Arch. Biochem. Biophys. 258:373-380 (1987)). Se combinaron en orden volúmenes iguales de una suspensión al 30% de eritrocitos nuevos en PBS a pH 7,4, muestra de prueba, y 300 mM de 2,2'-azobis(diclorhidrato de 2-amidinopropano) (AAPH, un generador de radicales). Se prepararon muestras bajo gas de CO y la concentración de hemoglobina de prueba en la suspensión de ensayo de glóbulos rojos fue de 12-13 mg/ml. Se mantuvieron las mezclas a 37°C, y se diluyeron 20 veces alícuotas en PBS y se centrifugaron a 1000x g durante 10 minutos. Como medida de la Hb liberada debido a la lisis de glóbulos rojos, se midieron las absorbancias de los sobrenadantes a 540 nm tras la conversión de toda la Hb en CN-metaHb según el método de Tentori (Meth. Enzymology 75:707 (1981)). Se corrigieron los niveles de Hb de sobrenadante para determinar la Hb añadida en las muestras de prueba.

En la figura 1 se presentan gráficamente los resultados para dos productos, una representación gráfica de la lisis de glóbulos rojos relativa frente al tiempo para los diversos productos. Se prepararon los productos analizados tal como se describió para la reacción n.º 6 (Hb-Trolox B) y la reacción n.º 7 (Hb-Trolox A) en la tabla 1 del ejemplo 1. En ausencia del conjugado (sólo AAPH), se evidencia la lisis de glóbulos rojos mediante el aumento de los niveles de Hb en el sobrenadante a lo largo del periodo de incubación. Los niveles de Hb de sobrenadante no aumentan hasta el mismo nivel a lo largo de este periodo en las mezclas de prueba que contienen conjugados de Hb-Trolox, lo que indica una protección frente al efecto lítico del generador de radicales. También se determinó la protección relativa mediante la comparación de las áreas bajo la curva (AUC) obtenidas representando gráficamente la absorbancia de

25

lisado de glóbulos rojos frente al tiempo. Se determina el AUC mediante el tiempo de comienzo, la velocidad y la extensión global de la lisis de glóbulos rojos. Menores valores de AUC indican una protección superior de los glóbulos rojos frente a la lisis. Las AUC para Hb-Trolox A y B fueron significativamente menores que para los productos de las reacciones control correspondientes (sin TX-EDC añadido, tabla 4).

5

Tabla 4 - Grado de protección antioxidante mediante conjugados de Hb-Trolox y controles.

Muestra	Concentración de Trolox (TX) (mM)	Concentración de hemoglobina (mM)	AUC con respecto a control de AAPH (%)
AAPH	0	0	100
Trolox libre	0,50	0	88
Hb libre (A)	0	0,20	39
Hb libre (B)	0	0,20	35
TX + Hb libres	0,50	0,20	28
Hb-Trolox A	0,32	0,20	10
Hb-Trolox B	0,45	0,20	4
PBS	0	0	0

También se muestran los datos de AUC para la lisis de glóbulos rojos en presencia de Trolox libre, hemoglobina libre (control) y una mezcla de Trolox y hemoglobina libres. Tanto el Trolox como la hemoglobina, solos, muestran menos protección que los conjugados de hemoglobina-Trolox correspondientes que contienen la misma cantidad de hemoglobina y la misma o menor concentración de Trolox en forma unida. La mezcla del Trolox y la hemoglobina libres muestra una protección superior a una concentración igual de cualquier compuesto solo, pero todavía menos protección que los conjugados de hemoglobina-Trolox correspondientes que contienen la misma cantidad de hemoglobina y la misma o menor concentración de Trolox en forma unida. Puesto que el conjugado y la mezcla tienen el mismo contenido en hemoglobina, y el conjugado contiene el mismo o menos Trolox que la mezcla, entonces la actividad superior del conjugado sugiere un efecto sinérgico, indicado por un aumento en la actividad antioxidante global debido a la conjugación.

10

15

Ejemplo 3: Polimerización de hemoglobina modificada con Trolox

20

Se dializaron conjugados de hemoglobina-Trolox (Hb-Trolox A y B) preparados en el ejemplo 1 frente a tampón Bis-Tris 50 mM, pH 6,8. Se añadieron tres equivalentes de o-rafinosa (patente estadounidense 5.532.352 Pliura *et al.*) disueltos en agua a disoluciones de hemoglobina-Trolox para dar una concentración final de hemoglobina de 42 mg/ml. Se mantuvieron las mezclas bajo gas de CO a 22°C durante 24 horas. Se prepararon las disoluciones de 30 mM en acetato de sodio, y se añadieron 20 equivalentes de dimetilaminoborano acuoso con respecto al contenido en o-rafinosa. Tras 24 horas, se dializaron las disoluciones frente a agua luego PBS a pH 7,4. La cromatografía de exclusión molecular en condiciones de disociación, no desnaturalizantes, indicó la formación de especies de hemoglobina-Trolox reticuladas intra e intermolecularmente (tabla 5). El Hb-Trolox no reticulado por o-rafinosa se eluye como dímeros de alfa-beta-globina de 32 kDa en las condiciones de cromatografía usadas. Esta especie de Hb no reticulada puede eliminarse si fuera necesario mediante medios convencionales tales como ultrafiltración o cromatografía. Es posible una optimización de las condiciones para controlar la cantidad de especie de Hb no reticulada.

25

30

Tabla 5: Distribución de peso molecular de hemoglobina polimerizada con o-rafinosa-Trolox

Especie de peso molecular (kDa)	Distribución de peso molecular (%)	
	Hb polimerizada-Trolox A	Hb polimerizada-Trolox B
32	12,2	11,8
64	44,7	41,1
>64	43,1	47,1

35

Ejemplo 4 - Preparación de conjugado de Hb polimerizada con Trolox

Se conjugó Trolox con Hb reticulada con o-rafinosa (poliOR-Hb, patente estadounidense 5.532.352 Pliura *et al.*) usando el método del ejemplo 1. Se hizo reaccionar un exceso molar de 100 veces de TX-EDC con poliOR-Hb en tampón MES 100 mM a pH 5,6 y 7. Se analizaron todas las muestras mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC) y HPLC en fase inversa (RP-HPLC). En poliOR-Hb, las cadenas alfa y beta están modificadas por o-rafinosa en un 33 y un 90%, respectivamente, antes de la reacción con TX-EDC (tabla 6). Tras la reacción con TX-EDC a tres valores de pH diferentes, se aumentó la modificación de las cadenas alfa y beta hasta un 67-77% y 93-99%, respectivamente, y se observaron mediante RP-HPLC varias nuevas cadenas modificadas. Algunas de estas cadenas modificadas con TX corresponden a las observadas tras la reacción de Hb con TX-EDC, tal como se identificó en el ejemplo 1.

40

45

Tabla 6 - Modificación de las cadenas de globina de conjugados de poliOR-Hb-TX

Rxn	Muestra	pH de rxn	% de modificación de globina en comparación con Hb		Aumento en % de la modificación de globina en comparación con poliOR-Hb	
			Beta	Alfa	Beta	Alfa
1	Hb	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
2*	poliOR-Hb	n/a	90,2	33,3	n/a	n/a
3	poliOR-Hb-TX	7	93,4	75,6	3,2	42,3
4	poliOR-Hb-TX	6	99,7	77,1	9,5	43,8
5	poliOR-Hb-TX	5	96,6	67,3	6,4	34

*Reacción control, sin Trolox ni EDC añadidos.

Ejemplo 5:

5

i) Conjugación de Trolox con respecto a hemoglobina polimerizada con o-rafinosa: adiciones individuales y múltiples de Trolox

Se preparó hemoglobina polimerizada con o-rafinosa (poliOR-Hb) tal como se describe en la patente estadounidense 5.532.352 Pliura *et al.* A cada una de las dos disoluciones separadas (reacciones A y B) de 0,50 g de poliOR-Hb en aproximadamente 50 ml de tampón MES 125 mM, pH 7,0 se le añadieron 0,194 g de Trolox que se había hecho reaccionar previamente durante 10 - 20 minutos a temperatura ambiente con 0,149 g de EDC en 1 ml de acetonitrilo. Se añadieron cantidades idénticas de Trolox/EDC a la reacción B a las 5 y 19 horas, para un total de tres adiciones. A la reacción A se le añadieron a los mismos tiempos volúmenes de 1 ml de acetonitrilo. Se agitaron ambas reacciones bajo gas de CO a 22°C durante un total de 27 horas. Se analizaron las muestras tras filtración y diálisis frente a agua, MgCl₂ 0,5 M tamponado con Tris y solución salina tamponada con fosfato a pH 7,4. No pudo detectarse Trolox libre mediante cromatografía. Se prepararon productos control mediante reacción con EDC solo sin Trolox añadido.

10

15

ii) Protección *in vitro* de glóbulos rojos frente a lisis:

20

Usando el método descrito en el ejemplo 2, se midieron las actividades antioxidantes de los dos conjugados. Se ligaron con CO las muestras y la concentración de los conjugados y los controles en la suspensión de ensayo de glóbulos rojos fue de 12 mg/ml. Ambos conjugados de Trolox mostraron una protección superior a la de los controles correspondientes sin Trolox. La protección fue la más grande en el producto obtenido tras tres adiciones de Trolox, que se mostró mediante el análisis de HPLC en fase inversa que está modificado de manera más extensa por Trolox que el producto obtenido mediante una adición individual de Trolox. El AUC para el producto de adición de 3 veces fue del 3% del control, mientras que el AUC del producto de adición individual fue del 33% de control. Se presentan los resultados en la tabla 7 a continuación.

25

30 Tabla 7 - Grado de protección antioxidante mediante conjugados de poliOR-Hb-Tx y controles

Muestra	AUC con respecto a control de AAPH (%)
AAPH	100
1X control	83
3X control	69
1X TX-EDC (reacción A)	27
3X TX-EDC (reacción B)	2
PBS	0

Ejemplo 6:

35

i) Preparación a gran escala de conjugado de Trolox de hemoglobina polimerizada con o-rafinosa (poliOR-Hb-TX):

Se preparó hemoglobina polimerizada con o-rafinosa (poliOR-Hb) tal como se describe en la patente estadounidense 5.532.352 Pliura *et al.* Se hicieron reaccionar 4,01 g de Trolox con 3,07 g de EDC en 40 ml de acetonitrilo durante 10-20 minutos a temperatura ambiente. Se añadió esta disolución a 18,9 g de poliOR-Hb en 2 l de tampón MES 126 mM, pH 7,0. Se hicieron adiciones idénticas de Trolox/EDC tras 3,5 y 21 horas, para un total de tres adiciones. Se agitó la reacción bajo gas de CO a 22°C durante todo el procedimiento. Tras 26 horas de tiempo de reacción total, se filtró la disolución y se diafiltró frente a agua, solución salina tamponada con fosfato y lactato de Ringer hasta una concentración de Hb final de 77 mg/ml. Se ajustó el pH a 7,24 con NaOH diluido durante la diafiltración de lactato de Ringer. No pudo detectarse Trolox libre mediante cromatografía. Se oxigenó una parte del producto antes del análisis adicional.

40

45

ii) Protección *in vitro* de glóbulos rojos frente a lisis:

Usando el método descrito en el ejemplo 1, se midió la actividad antioxidante del poliOR-Hb-TX. Los productos sometidos a prueba incluyeron oxígeno y poliOR-Hb ligado con CO (sin tratamiento con TX ni EDC), producto ligado con CO reservado antes de la oxigenación tal como se describió anteriormente, y producto oxigenado. Todos los productos estaban presentes en la suspensión de ensayo de lisis de glóbulos rojos a 11,7 mg/ml. Se presentan los resultados en la tabla 8 a continuación. Estos resultados indican una mejor protección de glóbulos rojos frente a lisis mediante las formas tanto oxigenadas como de monóxido de carbono de conjugados de Trolox que mediante los controles.

Tabla 8 - Grado de protección antioxidante mediante poliOR-Hb-Tx y controles

Muestra	AUC con respecto a control de AAPH (%)
AAPH	100
PoliOR-Hb (forma oxi)	39
PoliOR-Hb (forma de CO)	47
PoliOR-Hb-TX (forma oxi)	15
PoliOR-Hb-TX (forma de CO)	6
PBS	0

Ejemplo 7

Efecto hemodinámico de poliOR-Hb-TX tras una infusión hipervolémica del 10% en rata consciente

Se anestesiaron ratas Sprague-Dawley macho (250-350 g) con isoflurano el día del experimento. Se canularon la vena y arteria femoral derecha. Tras 1,5 horas de recuperación de la cirugía, se les infundió a los animales conscientes que se encontraban en jaulas metabólicas con cualquiera de dos disoluciones: PoliOR oxigenado-TX preparada en el ejemplo 6 o poliOR-Hb (sin tratamiento con TX-EDC; ambas disoluciones fueron de 7,7 g/dl en solución de Ringer lactada). El volumen de infusión fue igual al 10% del volumen de sangre estimado del animal. Se registraron la tensión arterial media (TAM) y la frecuencia cardíaca (FC) 30 minutos antes de la infusión para establecer valores iniciales, durante la infusión y durante 2 horas tras la infusión (figuras 3 y 4). Se sometieron a prueba cuatro animales en cada uno de los dos grupos. La TAM inicial antes de la infusión fue de 101±4 mm Hg (poliOR-Hb) y de 110±3 mm Hg (poliOR-Hb-TX). Tras la infusión, la TAM aumentó significativamente ($P < 0,01$) hasta 142±7 y 151±1 mm Hg en los grupos poliOR-Hb y poliOR-Hb-TX, respectivamente. La diferencia en el aumento no fue significativamente diferente entre los dos grupos ($P > 0,05$). La FC antes de la infusión fue de 407±17 y 394±17 latidos por minuto (lpm) en los grupos de poliOR-Hb y poliOR-Hb-TX, respectivamente. La FC tras la infusión disminuyó significativamente ($P < 0,01$) hasta 345±16 y 316±10 lpm en los grupos de poliOR-Hb y poliOR-Hb-TX, respectivamente. La diferencia en la disminución no fue significativamente diferente entre los dos grupos ($P > 0,05$). La conjugación de Trolox no alteró las propiedades hemodinámicas del HBOC poliOR-Hb en este estudio.

Ejemplo 8 - Conjugación en condiciones de desoxigenación

Se conjugó Trolox con poliOR-Hb en condiciones de desoxigenación para preparar un producto con una P_{50} alta, más adecuado para su uso como HBOC. Se desoxigenaron poliOR-Hb y tampón MES mediante medios convencionales. Se hicieron reaccionar 0,78 g de Trolox con 0,60 g de EDC en 4 ml de acetonitrilo durante 10-20 minutos a temperatura ambiente. Se añadió esta disolución a 2,04 g de poliOR-Hb en 200 ml de MES 120 mM a pH 7,0. Se hicieron dos adiciones idénticas tras 4 y 21 horas. A las 27 horas tras la primera adición, se cargó la mezcla de reacción con gas de CO, se filtró, se concentró y se dializó exhaustivamente frente a PBS. Se encontró que las P_{50} del poliOR-Hb de partida, el conjugado preparado en este ejemplo y el conjugado preparado en el ejemplo 6 fueron 41, 40 y 16 mm Hg respectivamente, a 37°C, usando un aparato Hemox-Analyzer (TCS Instruments, Southampton, Pensilvania, EE.UU.).

Ejemplo 9 - Comparación de actividades antioxidantes.

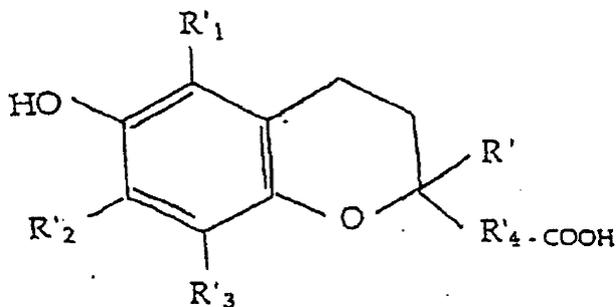
Usando el método descrito en el ejemplo 1, se midieron las actividades antioxidantes de los productos de poliOR-Hb-TX preparados en condiciones de desoxigenación (ejemplo 8) y condiciones de CO (ejemplo 6). Se ligaron con CO las muestras y la concentración de los conjugados y los controles en la suspensión de ensayo de glóbulos rojos fue de 12 mg/ml. Se evaluaron una concentración igual de poliOR-Hb, así como dos concentraciones de Trolox solo que representan 1x y 0,5x su límite de solubilidad en la disolución de prueba. Ambos conjugados mostraron una protección superior a la de controles de Trolox y poliOR-Hb. Esto se muestra en la tabla 9 a continuación. La protección fue comparable para los productos preparados en condiciones de desoxigenación y CO.

TABLA 9

Muestra (todas las muestras que contenían Hb en forma de CO)	AUC con respecto a control de AAPH (%)
AAPH	100
Trolox (0,26 mM)	87
Trolox (0,52 mM)	70
PoliOR-Hb (12 mg/ml)	28
PoliOR-Hb-TX (del ejemplo 6, 12 mg/ml)	0
PoliOR-Hb-TX (del ejemplo 8, 12 mg/ml)	3
PBS	0

REIVINDICACIONES

1. Composición química que tiene capacidad de transporte de oxígeno y que comprende moléculas de transporte de oxígeno biocompatibles unidas químicamente a un antioxidante biocompatible que consiste esencialmente en un ácido cromanocarboxílico que corresponde a la fórmula general:



- en la que R' es H o un radical alquilo de 1-20 átomos de carbono y R'1, R'2 y R'3 se seleccionan independientemente de H y alquilo C1-C4, y R'4 es un enlace directo o cadena de alquilo C1-8, en la que la sustancia de transporte de oxígeno es una macromolécula de hemoproteína.

2. Composición química según la reivindicación 1, en la que la macromolécula de hemoproteína es una especie de hemoglobina.

3. Composición según la reivindicación 1, en la que la composición es un conjugado unido covalentemente de dicho ácido cromanocarboxílico y hemoglobina humana.

4. Composición según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en la que la hemoglobina del conjugado se reticula para formar unidades tetraméricas estabilizadas.

5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en la que la hemoglobina del conjugado está al menos parcialmente oligomerizada en oligómeros de hasta doce unidades tetraméricas estabilizadas.

6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, que comprende una mezcla de unidades de hemoglobina tetraméricas estabilizadas conjugadas con el antioxidante de ácido cromanocarboxílico y oligómeros de desde 2-8 de tales unidades de hemoglobina estabilizadas conjugadas con el antioxidante de ácido cromanocarboxílico.

7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en la que la hemoglobina se reticula con un polialdehído, glutaraldehído, un compuesto de diaspirina, un compuesto de piridoxilo o un compuesto de trimesoílo.

8. Composición según la reivindicación 7, en la que la hemoglobina se reticula con un polialdehído derivado de la apertura de anillo oxidativa de un polisacárido.

9. Composición según la reivindicación 8, en la que el polisacárido es o-rafinosa.

10. Composición según las reivindicaciones 2 a 9, en la que el conjugado de hemoglobina-antioxidante está unido a un polímero biocompatible.

11. Composición según la reivindicación 10, en la que el polímero biocompatible es polietilenglicol, un polisacárido, un poliaminoácido o un soporte insoluble.

12. Composición según la reivindicación 1, en la que en la fórmula del ácido cromanocarboxílico, al menos uno de R'1, R'2 y R'3 es metilo.

13. Composición según la reivindicación 13, en la que, en la fórmula del ácido cromanocarboxílico, R'4 es un enlace directo.

14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que el antioxidante de ácido cromanocarboxílico es 2,5,7,8-tetrametil-2-carboxi-croman-6-ol.

15. Procedimiento de preparación de una composición de hemoglobina que tiene propiedades antioxidantes y adecuada para su administración a un paciente mamífero, que comprende hemoglobina libre de estroma, purificada,

que reacciona químicamente, con un ácido cromanocarboxílico según la reivindicación 1 para formar un conjugado químico unido covalentemente de los mismos.

- 5 16. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que antes de la conjugación con el ácido cromanocarboxílico, la hemoglobina se hace reaccionar con un reactivo de reticulación para estabilizarla en su forma de unidad tetramérica, frente a la disociación en unidades dimericas.
- 10 17. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que el conjugado de hemoglobina-ácido cromanocarboxílico se hace reaccionar posteriormente con un reactivo de reticulación de hemoglobina para llevar a cabo la estabilización de reticulación de la parte de hemoglobina del conjugado.
- 15 18. Procedimiento según la reivindicación 16 o la reivindicación 17, en el que el reactivo de reticulación es un polialdehído.
19. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que el polialdehído es o-rafinosa.
- 20 20. Procedimiento según la reivindicación 19, en el que la hemoglobina está al menos parcialmente oligomerizada mediante reacción adicional con o-rafinosa.
21. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que la reacción entre la hemoglobina y el ácido cromanocarboxílico se realiza en presencia de un compuesto activador.
22. Procedimiento según la reivindicación 21, en el que el compuesto activador es una carbodiimida.
- 25 23. Procedimiento según la reivindicación 22, en el que la carbodiimida es 1(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida.
24. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 15-23, en el que el ácido cromanocarboxílico es 2,5,7,8-tetrametil-2-carboxi-croman-6-ol.
- 30 25. Uso de una composición química según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la preparación de una composición líquida de transporte de oxígeno biocompatible para fines terapéuticos antioxidantes.
- 35 26. Composición química según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para su uso en una composición líquida de transporte de oxígeno biocompatible para terapia antioxidante.

Figura 1

Absorbancia de lisados de glóbulos rojos: conjugados de hemoglobina-Trolox y controles

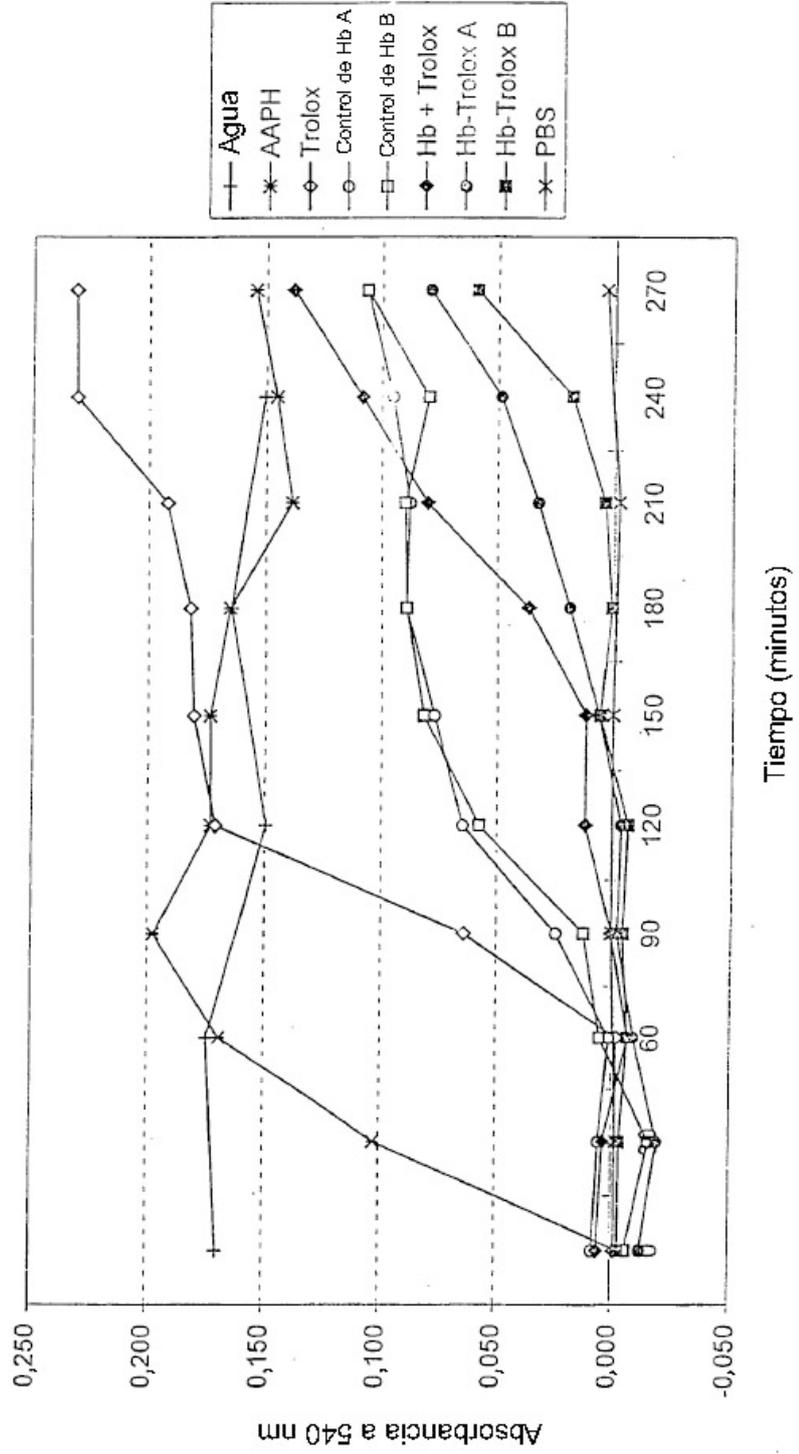


Figura 2

Valores de AUC de lisis de glóbulos rojos: conjugados de hemoglobina-Trolox preparados a diversas concentraciones de hemoglobina

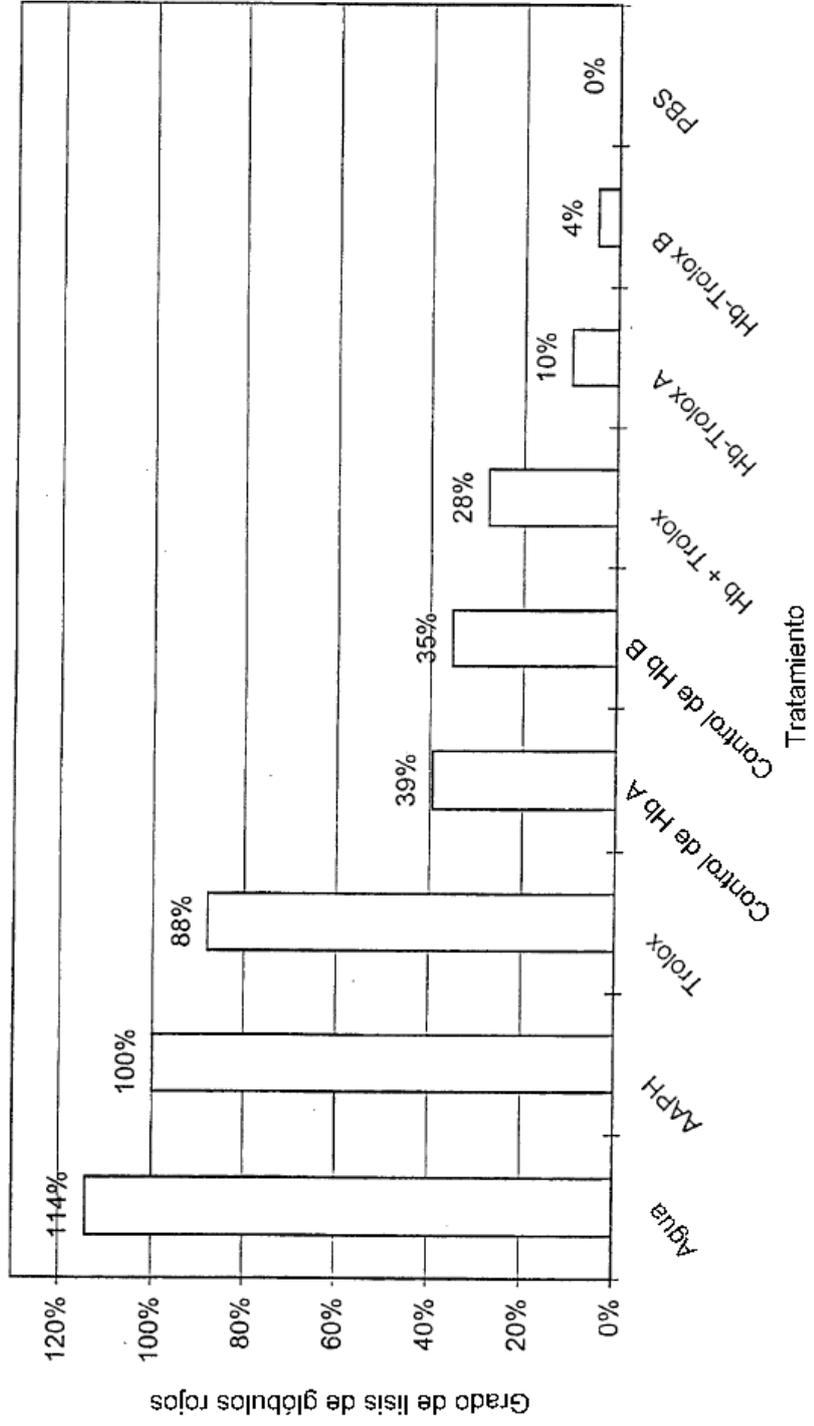


Figura 3 Infusión hipervolémica del 10% en rata consciente: tensión arterial media
(Media \pm EEM, n=4)

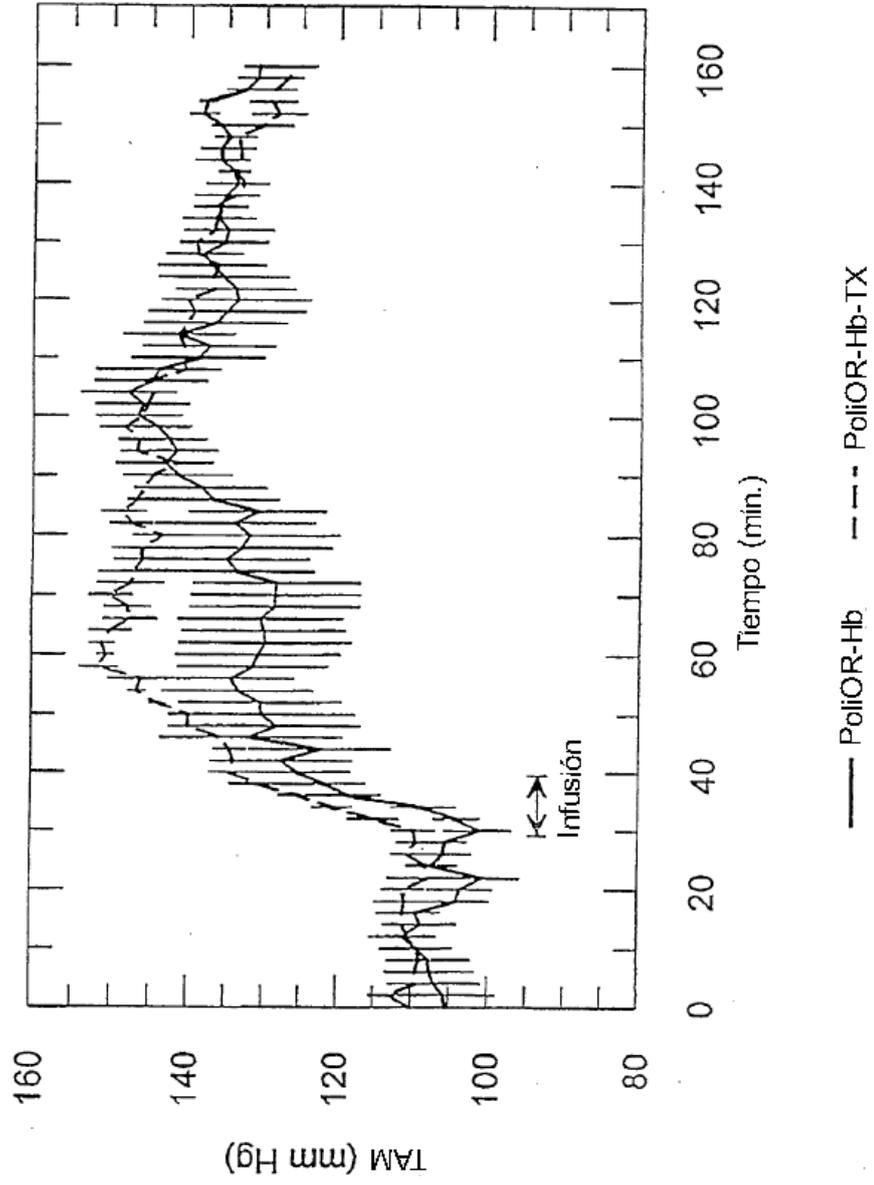


Figura 4 Infusión hipervolémica del 10% en rata consciente: frecuencia cardiaca
(Media \pm EEM, n=4)

