

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 404 405**

51 Int. Cl.:

A61K 41/00 (2006.01)

C07K 14/805 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2011 E 11161816 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2013 EP 2399606**

54 Título: **Un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica que contiene un portador de oxígeno termoestable**

30 Prioridad:

23.06.2010 US 821214

01.12.2010 US 957430

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

27.05.2013

73 Titular/es:

BILLION KING INTERNATIONAL LIMITED

(100.0%)

Room 2301, 23rd Floor, Fu Fai Commercial

Centre, 27 Hillier Street, Sheung Wan

Hong Kong, HK

72 Inventor/es:

WONG, BING LOU y

KWOK, SUI YI

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 404 405 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

Un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica que contiene un portador de oxígeno termoestable

5

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas:

[0001] Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 12/821.214, presentada el 23 de junio de 2010, y de la solicitud de continuación en parte de patente de EE.UU. nº de serie 12/957.430, presentada el 1 de diciembre de 2010.

10

Notificación/permiso de derechos de autor

[0002] Una parte de la divulgación de este documento de patente contiene material que está sujeto a la protección de derechos de autor. El poseedor de los derechos de autor no tiene objeciones a la reproducción facsimilar de cualquiera de los documentos de patente o divulgaciones de patente como aparecen en el archivo o registros de patentes de la Oficina de Patentes y Marcas, pero se reserva por lo demás absolutamente todos los derechos de autor. La siguiente notificación se aplica a los procesos, experimentos y datos como se describen a continuación y a los dibujos adjuntos a los mismos: Copyright © 2010, Billion King International Limited, todos los derechos reservados.

15

20

Campo técnico

[0003] La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica que contiene un portador de oxígeno termoestable y a la composición preparada mediante el proceso.

25

[0004] Se da a conocer también el uso de la composición farmacéutica que contiene un portador de oxígeno termoestable para el tratamiento de cáncer, trastornos por privación de oxígeno y conservación de órganos para seres humanos y otros animales.

30

Antecedentes de la invención

[0005] La hemoglobina desempeña un papel importante en la mayoría de los vertebrados para el intercambio gaseoso entre el sistema vascular y los tejidos. Es responsable de portar oxígeno desde el sistema respiratorio a las células corporales mediante la circulación sanguínea y también de portar el producto de desecho metabólico dióxido de carbono fuera de las células corporales al sistema respiratorio, donde se exhala el dióxido de carbono. Puesto que la hemoglobina tiene este rasgo de transporte de oxígeno, puede usarse como un potente suministrador de oxígeno si puede estabilizarse *ex vivo* y usarse *in vivo*.

35

[0006] La hemoglobina de origen natural es un tetrámero que es generalmente estable cuando está presente en los eritrocitos. Sin embargo, cuando se retira la hemoglobina de origen natural de los eritrocitos, se vuelve inestable en el plasma y se escinde en dos dímeros $\alpha\text{-}\beta$. Cada uno de estos dímeros es de un peso molecular de aproximadamente 32 kDa. Estos dímeros pueden causar una lesión renal sustancial cuando se filtran a través de los riñones y se excretan. La degradación del ligamiento del tetrámero influye negativamente también sobre la sostenibilidad de la hemoglobina funcional en circulación.

40

45

[0007] Para resolver el problema, los desarrollos recientes en el procesamiento de hemoglobina han incorporado diversas técnicas de reticulación para crear enlaces intramoleculares en el tetrámero así como enlaces intermoleculares entre los tetrámeros, formando hemoglobina polimérica. La técnica anterior enseña que la hemoglobina polimérica es la forma preferida para aumentar la semivida en circulación de la hemoglobina. Sin embargo, como se determina por los presentes inventores, la hemoglobina polimérica se convierte más fácilmente en metahemoglobina en la circulación sanguínea. La metahemoglobina no puede unir oxígeno y por lo tanto no puede oxigenar tejidos. Por lo tanto, la reticulación enseñada por la técnica anterior que causa la formación de hemoglobina polimérica es un problema. Existe la necesidad en la materia de una técnica que permita una reticulación intramolecular para crear tetrámeros estables sin la formación simultánea de hemoglobina polimérica.

50

55

[0008] Los problemas adicionales con los intentos de la técnica anterior de estabilizar la hemoglobina incluyen la producción de hemoglobina tetramérica que incluye un porcentaje inaceptablemente alto de unidades diméricas; la presencia de dímeros hace a la composición de hemoglobina insatisfactoria para administración a mamíferos. La

forma dimérica de la hemoglobina puede causar lesión renal grave a un cuerpo de mamífero, y esta lesión renal puede ser suficientemente grave para causar la muerte. Por lo tanto, existe la necesidad en la materia de crear hemoglobina tetramérica estable con una forma dimérica indetectable en el producto final.

5 **[0009]** Otro problema con los productos de hemoglobina de la técnica anterior es un aumento repentino de la presión sanguínea después de la administración. En el pasado, se han registrado eventos de vasoconstricción por portadores de oxígeno basados en hemoglobina de generaciones anteriores. Por ejemplo, el producto Hemopure® (Biopure Co., EE.UU.) daba como resultado una presión arterial media un 30% más alta ($16,5 \pm 1,2$ kPa) cuando se comparaba con el valor basal ($12,8 \pm 1,3$ kPa) como se da a conocer por Katz y col., 2010. Los intentos anteriores
10 de resolver este problema se han basado en reactivos de sulfhidrilo que reaccionaban con grupos sulfhidrilo de hemoglobina, supuestamente para evitar la unión del factor de relajación derivado de endotelio con los grupos sulfhidrilo. Sin embargo, el uso de tratamiento de sulfhidrilo añade etapas de procesamiento, dando como resultado un coste añadido e impurezas que deben retirarse después de la composición de hemoglobina. Por tanto, existe la necesidad en la materia de un proceso para preparar hemoglobina que no cause vasoconstricción ni hipertensión
15 cuando se aplica a un mamífero.

[0010] Los problemas adicionales con los intentos de la técnica anterior de crear hemoglobina estable incluyen la presencia de impurezas proteicas tales como inmunoglobulina G que pueden causar efectos alérgicos en mamíferos. Por lo tanto, existe la necesidad en la materia de un proceso que pueda producir hemoglobina tetramérica estable sin impurezas proteicas.
20

[0011] Además de los problemas anteriores, existe la necesidad en la materia de una hemoglobina tetramérica estabilizada que esté exenta de dímeros, exenta de fosfolípidos y pueda producirse a escala industrial.

25 Resumen de la invención

[0012] La presente invención proporciona un procedimiento para procesar una hemoglobina tetramérica reticulada purificada termoestable no polimérica adecuada para uso en mamíferos sin causar lesión renal grave, efectos vasculares perjudiciales ni eventos adversos graves, incluyendo la muerte. La presente invención retira la forma dimérica de hemoglobina, la hemoglobina tetramérica no reticulada, fosfolípidos e impurezas proteicas.
30 Adicionalmente, la presente invención usa (1) un aparato de citólisis instantánea para una lisis hipotónica precisa y controlada, (2) una cromatografía en columna de flujo continuo continuo, (3) un aparato de alta temperatura/corto tiempo (ATCT) para procesamiento térmico de la disolución de hemoglobina en el proceso de purificación para retirar los dímeros de hemoglobina no estabilizados indeseables y para retirar las impurezas proteicas, por ejemplo
35 inmunoglobulina G, de modo que puedan evitarse lesiones renales, efectos vasculares perjudiciales y otras reacciones tóxicas y (4) un envase de bolsa de infusión hermético para evitar la entrada de oxígeno al producto.

[0013] El procedimiento incluye un material de partida de sangre completa de mamífero que incluye al menos eritrocitos y plasma. Los eritrocitos se separan del plasma en la sangre completa de mamífero, seguido de filtración
40 para obtener una fracción de eritrocitos filtrados. Se lava la fracción de eritrocitos filtrados para retirar las impurezas proteicas plasmáticas. Se disgregan los eritrocitos lavados mediante lisis hipotónica controlada durante un tiempo suficiente para lisar los eritrocitos sin lisar los leucocitos en un aparato de citólisis instantánea a un caudal de 50-1000 l/h. Se efectúa una filtración para retirar al menos una parte del retenido de desecho del lisado. Se extrae una primera disolución de hemoglobina del lisado.
45

[0014] Se efectúa un primer proceso de ultrafiltración usando un filtro de ultrafiltración configurado para retirar las impurezas que tienen un peso molecular mayor que la hemoglobina tetramérica y para retirar adicionalmente cualquier virus y retenido de desecho residual de la primera disolución de hemoglobina, obteniéndose una segunda disolución de hemoglobina. Se efectúa una cromatografía de columna de flujo continuo con la segunda disolución de
50 hemoglobina para retirar las impurezas proteicas, hemoglobina dimérica y fosfolípidos, formando una disolución de hemoglobina exenta de fosfolípidos. Se efectúa un segundo proceso de ultrafiltración con la disolución de hemoglobina exenta de fosfolípidos usando un filtro configurado para retirar las impurezas, dando como resultado una disolución de hemoglobina exenta de fosfolípidos purificada concentrada.

55 **[0015]** Se reticular al menos las subunidades $\alpha\text{-}\alpha$ de la hemoglobina purificada mediante fumarato de bis-3,5-dibromosalicilo, formando hemoglobina reticulada termoestable sin formación de hemoglobina polimérica, de tal modo que el peso molecular de la hemoglobina tetramérica reticulada no polimérica resultante sea de 60-70 kDa. La expresión "no polimérica", como se usa en la presente memoria, hace referencia a hemoglobina tetramérica que no está reticulada intermolecularmente con otras moléculas de hemoglobina ni ninguna otra molécula no de

hemoglobina tal como PEG. Se intercambia un tampón fisiológico adecuado, tal como disolución salina tamponada con fosfato (PBS), disolución de lactato de Ringer, disolución de acetato de Ringer o tampón Tris, por la hemoglobina tetramérica reticulada. Se retira cualquier producto químico residual usando filtración por flujo tangencial.

5

[0016] Después de este procedimiento, se trata térmicamente la hemoglobina reticulada para retirar cualquier hemoglobina tetramérica no reticulada residual y cualquier hemoglobina no estabilizada, por ejemplo la forma dimérica de hemoglobina, y cualquier otra impureza proteica.

10 **[0017]** El tratamiento térmico es un tratamiento a alta temperatura durante corto tiempo realizado a 70 a 95°C durante 30 s a 3 h en una o más de las condiciones siguientes: seguido inmediatamente de enfriamiento aproximadamente a 25°C; y/o se añade *N*-acetilcisteína a la hemoglobina tetramérica reticulada antes del tratamiento térmico. Antes del tratamiento térmico, se añade opcionalmente *N*-acetilcisteína a una concentración de aproximadamente 0,2% a la hemoglobina tetramérica reticulada para impedir la formación de metahemoglobina.

15 Inmediatamente después del tratamiento térmico y enfriamiento, se añade *N*-acetilcisteína a una concentración de aproximadamente 0,2 a 0,4% para impedir adicionalmente la formación de metahemoglobina.

[0018] Se retira cualquier precipitado formado durante el tratamiento térmico mediante centrifugación o un aparato de filtración, formando una disolución transparente después de ello.

20

[0019] Se añade entonces la hemoglobina tetramérica reticulada no polimérica termoestable exenta de impurezas proteicas, exenta de fosfolípidos y exenta de dímero a un portador farmacéuticamente aceptable.

25 **[0020]** Después de ello, se formula la hemoglobina tetramérica reticulada termoestable y se envasa en una bolsa de infusión a medida y hermética de polietileno, etileno-acetato de vinilo, etileno-alcohol vinílico (PE, EVA, EVOH). El envasado impide la contaminación que da como resultado la formación de metahemoglobina inactiva.

30 **[0021]** Se usa la hemoglobina tetramérica reticulada termoestable producida mediante el procedimiento anterior para el tratamiento de diversos cánceres tales como leucemia, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer nasofaríngeo y cáncer de esófago. El mecanismo para destruir células es mejorar la oxigenación de tumores en condiciones hipóxicas, potenciando así la sensibilidad hacia la radiación y los agentes quimioterapéuticos. La hemoglobina tetramérica reticulada termoestable se usa también para la conservación de tejidos de órganos durante transplantes o para la conservación del corazón en situaciones en que hay una falta de suministro de oxígeno *in vivo*, tal como en un corazón privado de oxígeno.

35

Breve descripción de los dibujos

[0022] La FIG. 1 representa el alineamiento de secuencia aminoacídica de diferentes hemoglobinas.

40 **[0023]** La FIG. 2 es un diagrama de flujo que representa una visión general del proceso de la presente invención.

[0024] La FIG. 3 representa esquemáticamente un aparato de citólisis instantánea usado en el proceso de la presente invención.

45

[0025] La FIG. 4 representa un análisis de cromatografía líquida de alta resolución para (a) hemoglobina tetramérica reticulada no termotratada y (b) hemoglobina tetramérica reticulada termoestable que ha experimentado un tratamiento térmico a 90°C durante 45 s a 2 min o a 80°C durante 30 minutos.

50 **[0026]** La FIG. 5 representa un análisis de espectrometría de masas con ionización por electropulverización (EM-IEP) de hemoglobina tetramérica reticulada termoestable.

[0027] La FIG. 6 muestra un análisis de espectroscopia de dicroísmo circular de (a) una disolución de hemoglobina purificada y (b) hemoglobina tetramérica reticulada termoestable.

55

[0028] La FIG. 7 muestra la mejora de oxigenación en tejido normal. La inyección de una disolución de hemoglobina tetramérica reticulada termoestable 0,2 g/kg da como resultado un aumento significativo de (A) la concentración plasmática de hemoglobina y (B) el suministro de oxígeno al músculo. Se observa un aumento significativo de oxigenación durante un periodo mayor de tiempo en comparación con el nivel de hemoglobina

plasmática.

[0029] La FIG. 8 muestra la mejora de oxigenación en tejido tumoral hipóxico. La inyección de una disolución de hemoglobina tetramérica reticulada termoestable 0,2 g/kg da como resultado un aumento significativo del suministro de oxígeno a un xenoinjerto de carcinoma escamoso de cabeza y cuello (HNSCC).

[0030] La FIG. 9 muestra la reducción tumoral parcial en modelos de roedor de (A) carcinoma nasofaríngeo (NPC) y (B) tumor hepático.

10 **[0031]** La FIG. 10 demuestra los cambios de presión arterial media en un modelo de rata de choque hemorrágico grave después de tratamiento con hemoglobina tetramérica reticulada termoestable.

[0032] La FIG. 11 es un perfil de elución para cromatografía en columna de flujo continuo; la disolución de hemoglobina está en la fracción de flujo continuo.

15

[0033] La FIG. 12 representa esquemáticamente un sistema de cromatografía de columna CM de flujo continuo con ultrafiltración para operación a escala industrial.

20 **[0034]** La FIG. 13 es una representación esquemática de un aparato usado para la etapa de procesamiento térmico ATBT.

[0035] La FIG. 14 demuestra el perfil de temperatura en el aparato de procesamiento de ATBT y el tiempo tomado para retirar el tetrámero inestabilizado (dímero) del sistema a 85 y 90°C de la presente invención.

25 **[0036]** La FIG. 15 demuestra la velocidad de formación de metahemoglobina en el sistema a 85 y 90°C en el aparato de procesamiento de ATBT de la FIG. 13.

[0037] La FIG. 16 es una representación esquemática de una bolsa de infusión de hemoglobina tetramérica reticulada termoestable de la presente invención.

30

Descripción detallada de la invención

[0038] La hemoglobina es una proteína transportadora de oxígeno que contiene hierro en los eritrocitos de la sangre de mamíferos y otros animales. La hemoglobina exhibe características tanto de estructura terciaria como cuaternaria de proteínas. La mayoría de los aminoácidos de la hemoglobina forman hélices α conectadas por segmentos cortos no helicoidales. Los enlaces de hidrógeno estabilizan las secciones helicoidales dentro de la hemoglobina, causando atracciones dentro de la molécula y plegándose así cada cadena polipeptídica con una forma específica. Una molécula de hemoglobina se ensambla a partir de cuatro subunidades proteicas globulares. Cada subunidad está compuesta por una cadena polipeptídica dispuesta en un conjunto de segmentos estructurales de hélice α conectados en una disposición de "plegamiento de mioglobina" con un grupo hemo incrustado.

45 **[0039]** El grupo hemo consiste en un átomo de hierro mantenido en un anillo heterocíclico, conocido como porfirina. El átomo de hierro se une igualmente a los cuatro átomos de nitrógeno en el centro del anillo, que se encuentra en un plano. El oxígeno puede unirse entonces al centro de hierro perpendicularmente al plano del anillo de porfirina. Por tanto, una sola molécula de hemoglobina tiene la capacidad de combinarse con cuatro moléculas de oxígeno.

50 **[0040]** En adultos humanos, el tipo más común de hemoglobina es un tetrámero llamado hemoglobina A consistente en dos subunidades α y dos β unidas no covalentemente designado como $\alpha_2\beta_2$, cada una compuesta por 141 y 146 residuos aminoácidos, respectivamente. El tamaño y estructura de las subunidades α y β son muy similares entre sí. Cada subunidad tiene un peso molecular de aproximadamente 16 kDa para un peso molecular total del tetrámero de aproximadamente 65 kDa. Las cuatro cadenas polipeptídicas están unidas entre sí por puentes salinos, enlaces de hidrógeno e interacción hidrófoba. La estructura de la hemoglobina bovina es similar a la de hemoglobina humana (90,14% de identidad en la cadena α ; 84,35% de identidad en la cadena β). La diferencia es que los dos grupos sulfhidrilo en la hemoglobina bovina están colocados en β Cys93, mientras que los sulfhidrilos en la hemoglobina humana están colocados en α Cys 104, β Cys 93 y β Cys 112, respectivamente. La FIG. 1 muestra el alineamiento de secuencias aminoácidas de hemoglobina bovina, humana, canina, porcina y equina, marcadas respectivamente B, H, C, P y E. Se somborean los aminoácidos distintos de diversas fuentes. La FIG. 1 indica que la hemoglobina humana comparte una alta similitud con la bovina, canina, porcina y equina cuando se

comparan sus secuencias aminoacídicas.

- [0041]** En la hemoglobina de origen natural dentro de los eritrocitos, la asociación de una cadena α con su correspondiente cadena β es muy fuerte y no se disocia en condiciones fisiológicas. Sin embargo, la asociación de un dímero de $\alpha\beta$ con otro dímero de $\alpha\beta$ es bastante débil fuera de los eritrocitos. El enlace tiene tendencia a escindirse en dos dímeros de $\alpha\beta$ cada uno de aproximadamente 32 kDa. Estos dímeros indeseados son suficientemente pequeños para filtrarse por los riñones y excretarse, siendo el resultado una lesión renal potencial y un tiempo de retención intravascular sustancialmente reducido.
- 10 **[0042]** Por lo tanto, es necesario estabilizar cualquier hemoglobina que se use fuera de los eritrocitos tanto por eficacia como por seguridad. El proceso para producir hemoglobina estabilizada se esboza a continuación; se presenta una visión general del proceso de la presente invención en el diagrama de flujo de la FIG. 2.
- [0043]** Inicialmente, se selecciona una fuente de sangre completa como fuente de hemoglobina de eritrocitos.
- 15 Se selecciona sangre completa de mamífero incluyendo, pero sin limitación, sangre completa humana, bovina, porcina, equina y canina. Se separan los eritrocitos del plasma, se filtran y se lavan para retirar las impurezas proteicas plasmáticas.
- [0044]** Para liberar la hemoglobina de los eritrocitos, se lisa la membrana celular. Aunque pueden usarse 20 diversas técnicas para lisar eritrocitos, la presente invención usa lisis en condiciones hipotónicas de manera controlable con precisión a volúmenes adecuados para producción a escala industrial. Con este fin, se usa un aparato de citólisis instantánea como se observa en la FIG. 3 para lisar los eritrocitos. La lisis hipotónica crea una disolución de lisado que incluye hemoglobina y un retenido de desecho. Para posibilitar la producción a escala industrial, se controla cuidadosamente la lisis de tal modo que se lisen solo los eritrocitos sin lisar leucocitos u otras 25 células.
- [0045]** Se selecciona el tamaño del aparato de citólisis instantánea de tal modo que los eritrocitos atraviesen el aparato en 2 a 30 s o de otro modo un tiempo suficiente para lisar los eritrocitos, y preferiblemente 30 s. El aparato de citólisis instantánea incluye un mezclador estático. Se usa agua desionizada y destilada como disolución 30 hipotónica. Se entiende, por supuesto, que el uso de otras disoluciones hipotónicas que tengan diferentes concentraciones salinas daría como resultado diferentes periodos de tiempo para la lisis de eritrocitos. Debido a que el procedimiento de lisis controlada lisa solo los eritrocitos, no los leucocitos ni material celular, se minimiza la liberación de proteínas tóxicas, fosfolípidos o ADN de eritrocitos y otro material celular. Se añade una disolución hipertónica inmediatamente después de 30 s, es decir, después de que la disolución que contiene eritrocitos haya 35 atravesado la parte de mezclador estático del aparato de citólisis instantánea. La hemoglobina resultante tiene una mayor pureza y menores niveles de contaminantes, tales como ADN indeseado y fosfolípidos, que la hemoglobina resultante de usar otras técnicas de lisis. No se detectan ácidos nucleicos indeseados de leucocitos ni impurezas fosfolípicas en la disolución de hemoglobina por los métodos de reacción en cadena de la polimerasa (límite de detección= 64 pg) ni cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, límite de detección= 1 $\mu\text{g/ml}$), respectivamente.
- 40 **[0046]** Se efectúan dos procesos de ultrafiltración: uno que retira las impurezas que tienen pesos moleculares mayores que la hemoglobina antes de la cromatografía en columna de flujo continuo, y otro que retira las impurezas que tienen pesos moleculares menores que la hemoglobina después de cromatografía en columna de flujo continuo. El último proceso de ultrafiltración concentra la hemoglobina. En algunas realizaciones, se usa un filtro de 100 kDa 45 para la primera ultrafiltración, mientras que se usa un filtro de 30 kDa para la segunda ultrafiltración.
- [0047]** Se usa la cromatografía en columna de flujo continuo para retirar las impurezas proteicas de la disolución de hemoglobina purificada, tales como inmunoglobulina G, albúmina y anhidrasa carbónica. En algunas realizaciones, se lleva a cabo la cromatografía en columna usando una o una combinación de columnas de 50 intercambio iónico comercialmente disponibles tales como una columna de DEAE, columna de CM, columna de hidroxapatito, etc. El pH para cromatografía en columna es típicamente de 6 a 8,5. En una realización, se usa una etapa de cromatografía en columna de CM de flujo continuo para retirar las impurezas proteicas a pH 8,0. Se efectúa un ensayo de inmunosorción ligado a enzima (ELISA) para detectar las impurezas proteicas y los fosfolípidos que quedan en la mezcla después de elución de la cromatografía en columna. Esta separación de cromatografía en 55 columna de flujo continuo única posibilita un esquema de separación continua para producción a escala industrial. El resultado de ELISA muestra que la cantidad de estas impurezas es sustancialmente baja en la hemoglobina eluida (inmunoglobulina G: 44,3 ng/ml; albúmina: 20,37 ng/ml; anhidrasa carbónica: 81,2 $\mu\text{g/ml}$). Se muestran en la Tabla 1 siguiente los resultados de la retirada de impurezas proteicas usando diferentes clases de columna con diferentes valores de pH.

Tabla 1

Columna (condición de pH)	Porcentaje de retirada (%)		
	Anhidrasa carbónica	Albúmina	Inmunoglobulina G
DEAE (a pH 7,5)	-	68	29,8
DEAE (a pH 7,8)	-	60	50,9
CM (a pH 6,2)	-	32	21,8
CM (a pH 8,0)	5,6	53,2	66,4
Hidroxiapatito (a pH 7,5)	4,5	23,5	22,8

5 **[0048]** Después del proceso cromatográfico en columna, se somete la hemoglobina a reticulación con fumarato de bis-3,5-dibromosalicilo (DBSF). Para impedir la formación de hemoglobina polimérica, se controla cuidadosamente la reacción en un entorno desoxigenado (preferiblemente menos de 0,1 ppm de nivel de oxígeno disuelto) con una relación molar de hemoglobina a DBSF de entre 1:2,5 y 1:4,0 durante un periodo de tiempo de 3 a 16 horas a temperatura ambiente (15-25°C), preferiblemente a un pH de aproximadamente 8-9, de tal modo que la hemoglobina reticulada resultante sea hemoglobina tetramérica que tiene un peso molecular de 60-70 kDa, demostrando que no está presente hemoglobina polimérica. El rendimiento de la reacción de DBSF es alto, > 99%, y la concentración de dímero en el producto final es baja. Opcionalmente, el presente proceso no requiere reactivos de tratamiento con sulfhidrilo tales como yodoacetamida para reaccionar con la hemoglobina antes de la reticulación, como se usan en diversos procesos de la técnica anterior.

15 **[0049]** En este punto, se intercambia disolución salina tamponada con fosfato (PBS), un tampón fisiológico, con la disolución de reticulación y se retira cualquier producto químico residual mediante filtración por flujo tangencial.

20 **[0050]** Después del proceso de reticulación de hemoglobina por DBSF en condiciones desoxigenadas, la presente invención proporciona una etapa de procesamiento térmico para la disolución de hemoglobina tetramérica reticulada en un entorno desoxigenado. Antes del tratamiento térmico, se añade opcionalmente *N*-acetilcisteína para impedir la formación de metahemoglobina (hemoglobina inactiva). Después de la etapa de procesamiento térmico, se enfría la disolución y se añade inmediatamente *N*-acetilcisteína para mantener un nivel bajo de metahemoglobina. Si se añade *N*-acetilcisteína antes y después del tratamiento térmico, la cantidad añadida antes del tratamiento térmico es de aproximadamente un 0,2%, mientras que la cantidad añadida después del tratamiento térmico es de aproximadamente 0,2% a 0,4%. Sin embargo, si se añade *N*-acetilcisteína solo después del tratamiento térmico, entonces la cantidad añadida es de un 0,4%.

30 **[0051]** Se calienta la disolución de hemoglobina tetramérica reticulada en un intervalo de temperaturas de 70 a 95°C y durante tiempos desde 30 s a 3 h. En algunas realizaciones preferidas, se calienta la disolución de hemoglobina tetramérica reticulada a menos de 80°C durante 30 minutos. Y en aún otras realizaciones preferidas, se calienta la disolución de hemoglobina reticulada a 90°C durante 30 s a 3 min, se enfría entonces rápidamente a aproximadamente 25°C en aproximadamente 15 a 30 s y se añade *N*-acetilcisteína como se expone anteriormente. 35 Resulta una cantidad muy baja de metahemoglobina, por ejemplo, menos de 3%. Sin el uso de *N*-acetilcisteína, la cantidad de metahemoglobina formada es de aproximadamente un 16%, un porcentaje inaceptablemente alto para aplicaciones farmacéuticas.

40 **[0052]** Se usan cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), espectrometría de masas con ionización por electropulverización (EM-IEP), espectroscopia de dicroísmo circular (DC) y Hemox Analyzer para medidas de p50 después para analizar y caracterizar la hemoglobina tetramérica reticulada termoestable. Para una hemoglobina originada en una fuente de sangre bovina, la FIG. 4 muestra que la forma dimérica de hemoglobina es indetectable en un sistema de HPLC (límite de detección: 2,6 µg/ml o 0,043%) para hemoglobina que ha experimentado un tratamiento térmico a 90°C durante 45 s a 2 min o a 80°C durante 30 min. Se encuentra como termoestable a 80 o 45 90°C la hemoglobina tetramérica no polimérica reticulada durante un periodo de tiempo. La etapa de procesamiento térmico (alta temperatura/corto tiempo, ATCT) es una potente etapa para desnaturalizar la forma tetramérica no reaccionada natural y la forma dimérica de hemoglobina.

50 **[0053]** Para analizar el resultado de esta etapa de ATCT, se usa un procedimiento analítico de HPLC para detectar la cantidad de dímero después de esta etapa de procesamiento térmico. La fase móvil para análisis de HPLC contiene cloruro de magnesio (0,75 M) que puede separar la hemoglobina dimérica (tetrámero no estabilizado) y la tetramérica reticulada termoestable. Para promover la disociación de hemoglobina en dímeros, el

cloruro de magnesio es aproximadamente 30 veces más eficaz que el cloruro de sodio a la misma fuerza iónica. La etapa de procesamiento térmico actúa también como etapa de desnaturalización para retirar drásticamente aquellas impurezas proteicas indeseadas de la hemoglobina tetramérica reticulada (inmunoglobulina G indetectable, albúmina indetectable, 99,99% de reducción de anhidrasa carbónica). Se efectúa un ensayo de inmunosorción ligado a 5 enzima (ELISA) para detectar las impurezas proteicas en la muestra. Por tanto, la disolución de hemoglobina tetramérica reticulada termoestable purificada tiene un nivel indetectable de dímero (menor que el límite de detección: 0,043%) e inmunoglobulina G y una cantidad muy baja de albúmina (0,02 µg/ml) y anhidrasa carbónica (0,014 µg/ml). La Tabla 2 muestra los resultados experimentales respecto a las impurezas proteicas y la retirada de 10 dímero por la etapa de procesamiento térmico de ATCT. Esta etapa térmica de ATCT posibilita la separación selectiva del tetrámero reticulado termoestable del tetrámero inestable y dímero.

Tabla 2

Condiciones de la muestra	Impurezas proteicas (por ELISA)			Por HPLC		p50 a 37°C (mm de Hg)
	Inmunoglobulina G (µg/ml)	Albúmina (µg/ml)	Anhidrasa carbónica (µg/ml)	Tetrámero (%)	Dímero (%)	
Sin tratamiento térmico	0,36	0,57	355,41	90,1	5,4	38
80°C durante 10 min	Indetectable	0,33	0,032	92,7	3,4	Sin datos
80°C durante 15 min	Indetectable	0,14	0,022	93,3	2,9	Sin datos
80°C durante 30 min	Indetectable	0,03	0,014	95,6	Indetectable	32
Sin tratamiento térmico	0,29	0,52	261,80	91,8	5,3	38
90°C durante 1,0 min	Indetectable	0,21	>0,063	93,4	2,0	29
90°C durante 1,5 min	Indetectable	0,04	0,022	94,9	0,6	31
90°C durante 2,0 min	Indetectable	0,02	0,016	96,1	Indetectable	31

15 **[0054]** Después de la etapa de procesamiento térmico para hemoglobina reticulada en condiciones desoxigenadas, la hemoglobina tetramérica reticulada termoestable está lista para formulación farmacéutica y envasado. La presente invención describe una etapa de envasado hermético de la disolución de hemoglobina tetramérica reticulada termoestable en un entorno desoxigenado. La hemoglobina tetramérica reticulada termoestable de la presente invención es estable en condiciones desoxigenadas durante más de dos años.

20 **[0055]** En esta invención, la composición farmacéutica que contiene portador de oxígeno se pretende principalmente para aplicación por inyección intravenosa. Tradicionalmente, los productos anteriores usan una bolsa de sangre de PVC o bolsa de sangre Stericon que tiene una alta permeabilidad al oxígeno que dado el caso acortará la vida útil del producto, puesto que lo vuelve rápidamente metahemoglobina inactiva (en unos pocos días) en 25 condiciones oxigenadas.

[0056] El envasado usado en la presente invención da como resultado una hemoglobina tetramérica reticulada termoestable que es estable durante más de dos años. Se usa un envasado multicapa de material EVA/EVOH para minimizar la permeabilidad gaseosa y evitar la formación de metahemoglobina inactiva. Se prepara 30 una bolsa de infusión de 100 ml diseñada para uso con la hemoglobina tetramérica reticulada purificada y termoestable de la presente invención a partir de cinco capas de material laminado de EVA/EVOH con un grosor de 0,4 mm, que tiene una permeabilidad al oxígeno de 0,093-2 cm³/m² por 24 horas por atmósfera a temperatura ambiente. Este material es un plástico de clase VI (como se define en USP<88>) que satisface los ensayos de reactividad biológica *in vivo* y el ensayo fisicoquímico y es adecuado para fabricar una bolsa de infusión con fines de 35 inyección intravenosa. Esta bolsa primaria es particularmente útil para proteger la disolución de hemoglobina tetramérica reticulada termoestable de la exposición a oxígeno a largo plazo que causa su inestabilidad y dado el caso afecta a sus propiedades terapéuticas.

[0057] Para una protección secundaria de los productos sanguíneos, se ha conocido usar un envoltorio de aluminio para proteger frente a una fuga potencial de aire y para mantener al producto en estado desoxigenado. Sin embargo, existe el potencial de orificios en el envoltorio de aluminio que comprometen su hermeticidad y hacen al producto inestable. Por lo tanto, la presente invención usa como envasado secundario un saquito de envoltorio de aluminio que impide la oxigenación e impide también la exposición a la luz. La composición del saquito de envoltorio incluye 0,012 mm de poli(tereftalato de etileno) (PET), 0,007 mm de aluminio (Al), 0,015 mm de nailon (NY) y 0,1 mm de polietileno (PE). La película de envoltorio tiene un grosor de 0,14 mm y un índice de transmisión de oxígeno de 0,093 cm³/m² por 24 horas por atmósfera a temperatura ambiente. Este envasado secundario alarga el tiempo de estabilidad de la hemoglobina, prolongando la duración de almacenamiento del producto.

[0058] Se analiza la hemoglobina de la presente invención mediante diversas técnicas, incluyendo EM-IEP. La EM-IEP posibilita el análisis de moléculas muy grandes. Es una técnica de ionización que analiza el compuesto de alto peso molecular ionizando la proteína y separando entonces la proteína ionizada basándose en la relación de masa/carga. Por lo tanto, el peso molecular y las interacciones proteicas pueden determinarse exactamente. En la FIG. 5, el resultado del análisis de EM-IEP indica que el tamaño de la hemoglobina tetramérica reticulada termoestable es de 65 kDa (tetrámeros de hemoglobina no polimérica). Los espectros de DC de UV lejano de 190 a 240 nm revelan las estructuras secundarias de la parte de globina de la hemoglobina. En la FIG. 6, la consistencia de los espectros de la disolución de hemoglobina purificada y hemoglobina tetramérica reticulada termoestable revela que las cadenas de hemoglobina se pliegan apropiadamente incluso después del tratamiento térmico a 90°C. El resultado de DC muestra que la hemoglobina tetramérica reticulada termoestable tiene aproximadamente un 42% de hélice α , un 38% de lámina β , un 2,5% de giros β y un 16% de ovillo aleatorio. Confirma adicionalmente que la hemoglobina tetramérica reticulada es termoestable.

[0059] El proceso de esta invención es aplicable a la producción a gran escala industrial de hemoglobina tetramérica reticulada termoestable. Además, la hemoglobina tetramérica reticulada termoestable en combinación con un portador farmacéutico (por ejemplo, agua, tampón fisiológico o en forma de cápsula) es adecuada para uso en mamíferos.

[0060] La presente divulgación se refiere adicionalmente a los usos de la composición farmacéutica que contiene portador de oxígeno en la mejora de la oxigenación de tejidos, tratamiento de cáncer, tratamiento de trastornos por privación de oxígeno tales como choque hemorrágico y conservación cardíaca en un entorno de bajo contenido en oxígeno (por ejemplo, trasplante cardíaco). La dosificación se selecciona para tener un intervalo de concentración de aproximadamente 0,2-1,3 g/kg con una velocidad de infusión de menos de 10 ml/hora/kg de peso corporal.

[0061] Para usos en el tratamiento de cáncer, la composición farmacéutica que contiene portador de oxígeno de la presente invención sirve como agente de oxigenación de tejidos para mejorar la oxigenación en tejidos tumorales, potenciando así la quimiosensibilidad y la radiosensibilidad.

[0062] Además, se demuestra en esta invención la capacidad de la hemoglobina tetramérica reticulada termoestable de mejorar la oxigenación en tejidos normales (FIG. 7) y en tumores extremadamente hipóxicos (FIG. 8) como carcinoma nasofaríngeo humano (usando la línea celular CNE2). Se muestra en la FIG. 8 el perfil de oxígeno representativo a lo largo del seguimiento en tejido de un xenoinjerto de CNE2 humano. La presión parcial de oxígeno (pO₂) en la masa tumoral se monitoriza directamente mediante un sensor de oxígeno de fibra óptica (Oxford Optronix Limited) acoplado con un sistema de microlocalización (DTI Limited). Después de la inyección intravenosa de hemoglobina tetramérica reticulada termoestable 0,2 g/kg, el valor medio de pO₂ se eleva desde el valor basal a aproximadamente dos veces la presión parcial de oxígeno media relativa al cabo de 15 minutos, y se prolonga durante 6 horas. Adicionalmente, el nivel de oxígeno de media se sigue manteniendo a un nivel de 25 a 30% por encima del valor basal a las 24 a 48 horas después de la infusión. Ningún producto comercial ni tecnología existente muestra una eficacia tan alta en comparación con la composición farmacéutica que contiene portador de oxígeno preparada en esta invención.

[0063] Para la oxigenación de tejido tumoral, se muestra en la FIG. 8 un perfil de oxígeno representativo de un xenoinjerto de carcinoma escamoso de cabeza y cuello humano (HNSCC) (FaDu). Después de la inyección intravenosa de hemoglobina tetramérica reticulada termoestable 0,2 g/kg, se observa un aumento significativo de la pO₂ media de más de 6,5 veces y 5 veces a las 3 y 6 horas, respectivamente (FIG. 8).

[0064] Para aplicaciones en el tratamiento de cáncer, la composición farmacéutica que contiene portador de

oxígeno de la presente invención sirve como agente de oxigenación de tejido para mejorar la oxigenación en tejidos tumorales, potenciando así la quimiosensibilidad y radiosensibilidad. En conjunto, la irradiación de rayos X y la hemoglobina tetramérica reticulada termoestable retardan el crecimiento tumoral. En la FIG. 9A, las curvas representativas muestran una reducción tumoral significativa en modelos de roedor de carcinoma nasofaríngeo. Se

5 tratan ratones atímicos portadores de xenoinjertos de CNE2 con rayos X solo (2 Gy) o en combinación con la hemoglobina tetramérica reticulada termoestable (2 Gy + Hb). Se inyecta hemoglobina tetramérica reticulada termoestable 1,2 g/kg por vía intravenosa en el ratón aproximadamente 3 a 6 horas antes de la irradiación con rayos X, dando como resultado una reducción parcial del xenoinjerto de carcinoma nasofaríngeo.

10 **[0065]** En una realización, se observa una reducción de tumor hepático significativa después de inyectar la composición junto con un agente quimioterapéutico. En la FIG. 9B, el diagrama representativo muestra una reducción tumoral significativa en un modelo de cáncer hepático ortotópico en rata. Se tratan ratas pardas portadoras de un ortoinjerto de tumor hepático (línea celular CRL1601) con cisplatino 3 mg/kg solo o en combinación con hemoglobina tetramérica reticulada termoestable 0,4 g/kg (cisplatino + Hb). La administración de la hemoglobina

15 tetramérica reticulada termoestable antes de la inyección de cisplatino da como resultado una reducción parcial del tumor hepático.

[0066] Para uso en el tratamiento de trastornos por privación de oxígeno y para conservación cardíaca, la composición farmacéutica que contiene portador de oxígeno de la presente invención sirve como sustituto

20 sanguíneo que proporciona oxígeno a un órgano diana.

[0067] Se muestran en la FIG. 10 los cambios de presión arterial media en un modelo de rata de choque hemorrágico grave después de tratamiento con hemoglobina tetramérica reticulada termoestable 0,5 g/kg. En un modelo de rata de choque hemorrágico grave, se devuelve la presión arterial media a un nivel seguro y estable y se

25 mantiene en o aproximadamente el valor basal después del tratamiento con la hemoglobina tetramérica reticulada termoestable. Después del tratamiento con la hemoglobina tetramérica reticulada termoestable, el tiempo requerido para que la presión arterial media vuelva a la normal es incluso más corto que al administrar sangre de rata autóloga, que sirve como control positivo. Los resultados indican que no ocurre un evento de vasoconstricción después de la transfusión de la hemoglobina tetramérica reticulada termoestable.

30

Ejemplos

[0068] Se proporcionan los siguientes ejemplos a modo de descripción de realizaciones específicas de esta invención, sin pretender limitar el alcance de esta invención en modo alguno.

35

[0069] Los Ejemplos 7 a 10, que muestran los usos de hemoglobina tetramérica reticulada termoestable, no forman parte de la presente invención y se proporcionan como comparaciones.

40 **[0070] Ejemplo 1**

[0071] Visión general del proceso

[0072] Se ilustra en la FIG. 2 un diagrama de flujo esquemático del proceso de la presente invención. Se recoge sangre completa bovina en un envase/bolsa estéril cerrado que contiene una disolución de citrato de trisodio al 3,8% (p/v) como anticoagulante. Se mezcla bien inmediatamente entonces la sangre con la disolución de citrato de trisodio para inhibir la coagulación sanguínea. Se aíslan los eritrocitos (RBC) y se recogen del plasma y otras células sanguíneas menores mediante un mecanismo de aféresis. Se usa un "lavador celular" para este procedimiento, con un cuenco de centrifuga desechable esterilizable por rayos gamma. Se lavan los RBC con un volumen igual de disolución salina al 0,9% (cloruro de sodio en p/v).

45

50

[0073] Se lisan los RBC lavados para liberar el contenido de hemoglobina mediante manipulación por choque hipotónico de la membrana celular de los RBC. Se usa con este fin un aparato de citólisis instantánea especializado como dispositivo de lisis de RBC representado en la FIG. 3. Después de la lisis de RBC, se aíslan las moléculas de hemoglobina de otras proteínas mediante ultrafiltración por flujo tangencial usando una membrana de 100 kDa. Se recoge la hemoglobina en el filtrado para cromatografía en columna de flujo continuo y se concentra adicionalmente a 12-14 g/dl mediante una membrana de 30 kDa. Se lleva a cabo la cromatografía en columna para retirar las impurezas proteicas.

55

[0074] Se hace reaccionar en primer lugar la disolución de hemoglobina concentrada con DBSF, formando

moléculas de hemoglobina tetramérica reticulada termoestable en condiciones desoxigenadas. Se efectúa entonces una etapa de tratamiento térmico en condiciones desoxigenadas a 90°C durante 30 s a 3 min antes de la formulación final y envasado.

5 **[0075] Ejemplo 2**

[0076] Tiempo y lisis hipotónica controlada y filtración

[0077] Se recoge sangre completa bovina reciente y se transporta en condiciones enfriadas (2 a 10°C). Se separan los eritrocitos del plasma mediante un lavador celular y posteriormente con una filtración por 0,65 µm. Después de lavar el filtrado de eritrocitos (RBC) con disolución salina al 0,9%, se disgrega el filtrado por lisis hipotónica. Se efectúa la lisis hipotónica usando el aparato de citólisis instantánea representado en la FIG. 3. El aparato de citólisis instantánea incluye un mezclador estático para ayudar a la lisis celular. Se mezcla una suspensión de RBC de concentración de hemoglobina controlada (12-14 g/dl) con 4 volúmenes de agua purificada, generando un choque hipotónico en las membranas celulares de RBC. El periodo de choque hipotónico se controla para evitar una lisis indeseada de leucocitos y plaquetas. La disolución hipotónica pasa a través de la parte de mezclador estático del aparato de citólisis instantánea durante 2 a 30 s o de otro modo un tiempo suficiente para lisar los eritrocitos, preferiblemente 30 s. Se termina el choque después de 30 s mezclando el lisado con 1/10 de volumen de tampón hipertónico a medida que sale del mezclador estático. La disolución hipertónica usada es tampón fosfato 0,1 M, 7,4% de NaCl, pH 7,4. El aparato de citólisis instantánea de la FIG. 3 puede procesar de 50 a 1000 l de lisado por hora, y preferiblemente al menos 300 l por hora, de manera continua.

[0078] Después de la lisis de RBC, se filtra el lisado de eritrocitos por un filtro de 0,22 µm para obtener una disolución de hemoglobina. No se detectan ácidos nucleicos de los leucocitos ni impurezas fosfolipídicas en la disolución de hemoglobina mediante el procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (límite de detección= 64 pg) y HPLC (límite de detección= 1 µg/ml), respectivamente. Se efectúa una primera ultrafiltración de 100 kDa para retirar las impurezas que tienen un peso molecular mayor que la hemoglobina. Sigue una cromatografía en columna de flujo continuo para purificar adicionalmente la disolución de hemoglobina. Se efectúa entonces una segunda ultrafiltración de 30 kDa para retirar las impurezas que tienen un peso molecular menor que la hemoglobina y para concentración.

[0079] Ejemplo 3

[0080] Estudio de aclaramiento vírico en disolución de hemoglobina exenta de estroma

[0081] Para demostrar la seguridad del producto de esta invención, se demuestran las capacidades de retirada de virus de (1) una etapa de diafiltración por 0,65 µm y (2) una etapa de ultrafiltración de 100 kDa mediante un estudio de validación de virus. Esto se realiza mediante la adición deliberada a una versión a menor escala de estos dos procesos de diferentes virus modelo (virus de encefalomiocarditis, virus de pseudorrabia, virus de diarrea vírica bovina y parvovirus bovino). En este estudio, se usan cuatro tipos de virus (véase la Tabla 3). Estos virus varían en sus rasgos biofísicos y estructurales y presentan una variación de resistencia a agentes o tratamientos físicos y químicos.

Tabla 3

Virus diana	Virus modelo	Taxonomía	Genoma	Estructura	Tamaño (nm)	Estabilidad*
Virus de la hepatitis C (HCV)	Virus de la diarrea vírica bovina (BVDV)	<i>Flaviviridae</i>	ARNmc	Con cubierta	40-60	Baja
-	Virus de encefalomiocarditis (EMCV)	<i>Picornavirus</i>	ARNmc	Sin cubierta	25-30	Media
Parvovirus B19	Parvovirus bovino (BPV)	<i>Parvoviridae</i>	ADNmc	Sin cubierta	18-26	Muy alta
Virus de la hepatitis B (HBV)	Virus de pseudorrabia (PRV)	<i>Herpesviridae</i>	ADNbc	Con cubierta	120-200	Baja a media

[0082] Se muestra brevemente en la siguiente Tabla 4 el esquema de validación.

Tabla 4

Diafiltración	Ultrafiltración
Lavado celular	Adición de virus
↓	↓
Adición de virus	Ultrafiltración
↓	↓
Diafiltración	Ensayos de virus
↓	
Ensayos de virus	

5

[0083] Se muestra en la siguiente tabla 5 el resumen de los resultados de reducción logarítmica de los 4 virus en (1) diafiltración por 0,65 µm y (2) ultrafiltración de 100 kDa. Los cuatro virus, BVDV, BPV, EMCV y PRV, se retiran eficazmente mediante diafiltración por 0,65 µm y ultrafiltración de 100 kDa.

10

Tabla 5

Virus	BVDV		BPV		EMCV		PRV	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Diafiltración por 0,65 µm	2,69	3,20	3,73	3,53	3,25	≥ 3,90	2,67	2,63
Ultrafiltración de 100 kDa	≥ 4,68	≥ 4,38	5,87	5,92	3,60	3,43	≥ 6,05	3,27
Máximo acumulado	≥ 7,88		9,65		≥ 7,50		≥ 8,72	
Mínimo acumulado	≥ 7,07		9,40		6,68		5,90	
Anotación: ≥ sin infectividad residual determinada								

[0084] **Ejemplo 4**

15 [0085] **Cromatografía en columna de flujo continuo**

[0086] Se usa una columna de CM (comercialmente disponible en GE Healthcare) para retirar adicionalmente cualquier impureza proteica. El tampón de partida es acetato de sodio 20 mM (pH 8,0) y el tampón de elución es acetato de sodio 20 mM, NaCl 2 M (pH 8,0). Después de equilibrar la columna de CM con tampón de partida, se carga la muestra de proteína en la columna. Se lavan las impurezas proteicas no unidas con al menos 5 volúmenes de columna de tampón de partida. Se efectúa la elución usando un tampón de elución al 25% (NaCl 0-0,5 M) en 8 volúmenes de columna. Se muestra en la FIG. 11 el perfil de elución; la disolución de hemoglobina está en la fracción de flujo continuo. Se analiza la pureza de la fracción de flujo continuo por ELISA. Se indican los resultados en la siguiente Tabla 6.

25

Tabla 6

	Impurezas proteicas		
	Inmunoglobulina G	Anhidrasa carbónica	Albúmina
Antes de la columna de CM	1320 ng/ml	860,3 µg/ml	435,2 ng/ml
Flujo continuo (que contiene hemoglobina)	44,3 ng/ml	81,2 µg/ml	20,4 ng/ml

[0087] Como la disolución de hemoglobina está en el flujo continuo de la cromatografía en columna de CM a pH 8 (no en el eluido), es un buen enfoque para operación a escala industrial continua. Se conecta la primera disposición de ultrafiltración directamente al flujo continuo del sistema de cromatografía en columna de CM, y los tubos de flujo continuo pueden conectarse con la segunda disposición de ultrafiltración para operación a escala industrial. Se muestra en la FIG. 12 la configuración del proceso industrial esquemático.

35 [0088] **Ejemplo 5**

[0089] **Preparación de hemoglobina tetramérica reticulada termoestable**

[0090] (5a) Reacción de reticulación con DBSF

[0091] Se lleva a cabo la reacción de reticulación en condiciones desoxigenadas. Se añade DBSF a la disolución de hemoglobina, formando hemoglobina tetramérica reticulada sin formación de hemoglobina polimérica.

5 El procedimiento de estabilización de DBSF estabiliza la forma tetramérica de la hemoglobina (65 kDa) e impide la disociación en dímeros (32 kDa), que son excretados a través de los riñones. En esta realización, se usa una relación molar de hemoglobina a DBSF de 1:2,5 y el pH es de 8,6. Este proceso se lleva a cabo durante un periodo de 3-16 horas a temperatura ambiente (15-25°C) en atmósfera inerte de nitrógeno para impedir la oxidación de la hemoglobina formando metahemoglobina férrica, que es fisiológicamente inactiva (nivel de oxígeno disuelto
10 mantenido a menos de 0,1 ppm). Se monitoriza la terminación de la reacción con DBSF midiendo el DBSF residual usando HPLC. El rendimiento de la reacción de DBSF es alto, > 99%.

[0092] (5b) Etapa de procesamiento térmico de ATCT

15 **[0093]** Se muestra un aparato de procesamiento de alta temperatura/corto tiempo (ATCT) en la FIG. 13. Se efectúa un proceso de calentamiento que usa el aparato de procesamiento de ATCT con la hemoglobina tetramérica reticulada. En este ejemplo, las condiciones para tratamiento térmico son de 90°C durante 30 s a 3 min, y preferiblemente de 45 a 60 s, aunque pueden seleccionarse otras condiciones como se discute anteriormente y modificar el aparato en consecuencia. Se bombea una disolución que contiene hemoglobina reticulada
20 opcionalmente con *N*-acetilcisteína al 0,2% añadida a la misma a un aparato de procesamiento de ATCT (la primera sección del intercambiador de calor de ATCT se precalienta y mantiene a 90°C) a un caudal de 1,0 l/min, con el tiempo de residencia en la primera sección del aparato a entre 45 y 60 s, se pasa entonces la disolución al mismo caudal a otra sección del intercambiador de calor que se mantiene a 25°C. El tiempo requerido para enfriar es entre 15 y 30 s. Después de enfriar a 25°C, se añade inmediatamente *N*-acetilcisteína a una concentración de 0,2% a
25 0,4%, preferiblemente a 0,4%. Esta adición química después del proceso de calentamiento de ATCT es muy importante para mantener la metahemoglobina (hemoglobina inactiva) a un nivel bajo. Se controla fácilmente la disposición del aparato de procesamiento para operación industrial. Se muestra en la FIG. 14 un perfil de temperatura con el contenido de dímero. Si la hemoglobina no está reticulada, no es termoestable y forma un precipitado después de la etapa térmica. Se retira entonces el precipitado mediante centrifugación o aparato de
30 filtración, formando una disolución transparente después de ello.

[0094] Durante el proceso de calentamiento de ATCT a 90°C, aumenta la metahemoglobina (hemoglobina inactiva) (mostrado en la FIG. 15). Después de la adición inmediata de *N*-acetilcisteína, puede mantenerse un nivel bajo de metahemoglobina aproximadamente menor del 3%.

35 **[0095]** La siguiente Tabla 7 muestra que las impurezas proteicas tales como inmunoglobulina G, albúmina, anhidrasa carbónica y tetrámero no estabilizado o dímeros indeseables se retiran después del tratamiento térmico. Se mide la cantidad de inmunoglobulina G, albúmina y anhidrasa carbónica usando un procedimiento de ELISA, mientras que se determina la cantidad de dímero mediante un procedimiento de HPLC. La pureza de la hemoglobina tetramérica reticulada termoestable es extremadamente alta después de la etapa de procesamiento térmico por
40 ATCT, en el intervalo de 98,0 a 99,9%. Se mantiene el valor de p50, presión parcial de oxígeno a la que la disolución de hemoglobina está semisaturada (al 50%), medida por un Hemox Analyzer, a aproximadamente 4 a 5,3 kPa a lo largo de la etapa de procesamiento térmico de ATCT y, por lo tanto, la hemoglobina tetramérica reticulada termotratada es estable a 90°C.

45

Tabla 7

Condiciones de la muestra	Impurezas proteicas (por ELISA)			Por HPLC		p50 a 37°C (mm de Hg)
	Inmunoglobulina (µg/ml)	Albúmina (µg/ml)	Anhidrasa carbónica (µg/ml)	Tetrámero (%)	Dímero (%)	
Sin tratamiento térmico	0,29	0,52	261,80	91,8	5,3	38
90°C durante 2 min	Indetectable	0,02	0,016	96,1	Indetectable	31
Retirada (%)	100,0	96,15	99,99	-	100,0	-

[0096] Ejemplo 6

[0097] Envasado

[0098] Debido a que el producto de la presente invención es estable en condiciones desoxigenadas, el envasado del producto es importante para minimizar la permeabilidad gaseosa. Para aplicación intravenosa, se prepara una bolsa de infusión de 100 ml diseñada a medida a partir de material laminado de EVA/EVOH de cinco capas con un grosor de 0,4 mm que tiene una permeabilidad al oxígeno de $0,093\text{-}2\text{ cm}^3/\text{m}^2$ por 24 horas por atmósfera a temperatura ambiente. Este material específico es un plástico de clase VI (como se define en USP<88>), que satisface los ensayos de reactividad biológica *in vivo* y el ensayo fisicoquímico y es adecuado para fabricar envases con fines de inyección intravenosa (obsérvese que pueden prepararse otras formas de envasado a partir de este material también, dependiendo de la aplicación deseada). Se aplica también un saquito de envoltura de aluminio de envasado secundario a la bolsa de infusión de envasado primario que proporciona una barrera adicional, minimizando la exposición a la luz y la difusión de oxígeno. Las capas del saquito comprenden: 0,012 mm de poli(tereftalato de etileno) (PET), 0,007 mm de aluminio (Al), 0,015 mm de nailon (NY) y 0,1 mm de polietileno (PE). La película de envoltura tiene un grosor de 0,14 mm y un índice de transmisión de oxígeno de $0,093\text{ cm}^3/\text{m}^2$ por 24 horas por atmósfera a temperatura ambiente. Se representa una representación esquemática de la bolsa de infusión en la FIG. 16. La permeabilidad al oxígeno global para cada bolsa de infusión según la presente invención es de $0,0025\text{ cm}^3$ por 24 horas por atmósfera de temperatura ambiente.

20 **[0099] Ejemplo 7 (comparativo)****[0100] Mejora de oxigenación**

[0101] (7a) Mejora de oxigenación en tejido normal

25

[0102] Se llevan a cabo algunos estudios de la oxigenación de tejido normal por hemoglobina tetramérica reticulada termoestable (mostrados en la FIG. 7). Se realiza un estudio farmacocinético y farmacodinámico comparativo en ratas pardas. Se administra individualmente a ratas pardas macho endogámicas disolución de hemoglobina tetramérica reticulada termoestable 0,2 g/kg o tampón acetato de Ringer (grupo de control) a través de la vena del pene de las ratas mediante inyección en embolada. Se determina el perfil de concentración-tiempo de hemoglobina plasmática mediante un fotómetro Hemocue™ a las 1, 6, 24, 48 horas y se compara con la lectura del valor basal. Los procedimientos están basados en la medida fotométrica de hemoglobina, en que la concentración de hemoglobina se lee directamente como g/dl. La presión parcial de oxígeno (pO_2) se mide directamente mediante el monitor de oxigenación de tejido y temperatura Oxylab™ (Oxford Optronix Limited) en el músculo de la pata trasera de ratas pardas. Se anestesian las ratas mediante una inyección intraperitoneal de disolución de pentobarbitona 30-50 mg/kg seguida de inserción de un sensor de oxígeno en el músculo. Se registran todas las lecturas de pO_2 mediante el sistema de adquisición de datos Datatrax2 (World Precision Instrument) de manera instantánea. Los resultados demuestran que después de la inyección intravenosa de hemoglobina tetramérica reticulada termoestable 0,2 g/kg, el valor medio de pO_2 se eleva desde el valor basal a aproximadamente dos veces la presión parcial de oxígeno media relativa al cabo de 15 minutos, y se prolonga hasta 6 horas. Adicionalmente, el nivel de oxígeno de media se sigue manteniendo a un 25 a 30% por encima del valor basal a las 24 a 48 horas después de la inyección (FIG. 7B).

[0103] (7b) Mejora significativa de la oxigenación en zonas tumorales extremadamente hipóxicas

45

[0104] Se evalúa la mejora de oxigenación en una zona tumoral extremadamente hipóxica mediante un modelo de xenoinjerto de carcinoma escamoso de cabeza y cuello humano (HNSCC). Se obtiene un carcinoma escamoso hipofaríngeo (línea celular FaDu) de la American Type Culture Collection. Se inyectan por vía subcutánea aproximadamente 1×10^6 células cancerosas en ratones BALB/c AnN-nu (atómicos) endogámicos de 4 a 6 semanas de edad. Cuando el xenoinjerto tumoral alcanza un diámetro de 8-10 mm, se monitoriza directamente la presión parcial de oxígeno (pO_2) en la masa tumoral con el monitor de oxigenación de tejido y temperatura Oxylab™ (Oxford Optronix Limited). Se registran todas las lecturas de pO_2 mediante el sistema de adquisición de datos Datatrax2 (World Precision Instrument) de manera instantánea. Cuando se estabiliza la lectura de pO_2 , se inyecta por vía intravenosa una disolución de hemoglobina tetramérica reticulada termoestable 0,2 g/kg a través de la vena de la cola de los ratones y se mide la oxigenación de tejido. Los resultados demuestran que, después de la inyección intravenosa de dicha hemoglobina tetramérica reticulada termoestable 0,2 g/kg, se observa un aumento significativo de la pO_2 media de más de 6,5 veces y 5 veces a las 3 y 6 horas, respectivamente (FIG. 8).

[0105] Ejemplo 8 (comparativo)

[0106] Estudios de tratamiento de cáncer: reducción tumoral significativa en carcinoma nasofaríngeo

[0107] Se observa una reducción tumoral significativa después de la administración de una disolución de hemoglobina tetramérica reticulada termoestable en combinación con irradiación con rayos X (FIG. 9A). Se emplea un modelo de xenoinjerto de carcinoma nasofaríngeo humano. Se inyectan por vía subcutánea aproximadamente 1×10^6 células cancerosas (línea celular CNE2) a ratones BALB/c AnN-nu (atómicos) endogámicos de 4 a 6 semanas de edad. Cuando el xenoinjerto tumoral alcanza un diámetro de 8-10 mm, se aleatorizan los ratones portadores de tumor en los tres grupos siguientes:

10

[0108] Grupo 1: Tampón acetato de Ringer (Ctrl)

[0109] Grupo 2: Tampón acetato de Ringer + irradiación con rayos X (2 Gy)

15 **[0110]** Grupo 3: Hemoglobina tetramérica reticulada termoestable + irradiación con rayos X (2 Gy+Hb)

[0111] Se irradian ratones atómicos portadores de xenoinjertos de CNE2 con radiación X solo (Grupo 2) o en combinación con hemoglobina tetramérica reticulada termoestable (Grupo 3). Para la irradiación con rayos X (Grupos 2 y 3), se anestesian los ratones mediante la inyección intraperitoneal de disolución de pentobarbitona 50 mg/kg. Se suministran 2 Gy de rayos X al xenoinjerto de los ratones portadores de tumor mediante un sistema acelerador lineal (Varian Medical Systems). Para el Grupo 3, se inyecta por vía intravenosa hemoglobina tetramérica reticulada termoestable 1,2 g/kg a través de la vena de la cola al ratón antes del tratamiento con rayos X. Se registran las dimensiones tumorales y pesos corporales cada dos días partiendo del primer día de tratamiento. Se calculan los pesos tumorales usando la ecuación $1/2LW^2$, en la que L y W representan la longitud y anchura de la masa tumoral medidas con un calibre digital (Mitutoyo Co, Tokio, Japón) en cada medida. El Grupo 1 es el grupo de control sin tratamiento. Los resultados (mostrados en la FIG. 9) demuestran que se observa una reducción significativa del xenoinjerto de CNE2 en ratones tratados con la disolución de hemoglobina tetramérica reticulada termoestable junto con irradiación con rayos X (Grupo 3, FIG. 9A).

30 **[0112] Ejemplo 9 (comparativo)**

[0113] Estudios de tratamiento de cáncer: una reducción significativa en tumor hepático

[0114] Además, se observa una reducción tumoral significativa después de la administración de una disolución de hemoglobina tetramérica reticulada termoestable en combinación con cisplatino (FIG. 9B). Se emplea un modelo de cáncer hepático ortotópico en rata. Se inyectan aproximadamente 2×10^6 células de tumor hepático marcadas con gen de luciferasa (CRL1601-Luc) en el lóbulo izquierdo del hígado en una rata parda. Se monitoriza el crecimiento tumoral mediante el sistema de formación de imágenes *in vivo* Xenogen. Dos a tres semanas después de la inyección, se recoge el tejido tumoral, se disecciona en trozos pequeños y se implanta ortotópicamente en el lóbulo hepático izquierdo de un segundo grupo de ratas. Las ratas portadoras de tumor hepático se aleatorizan en los tres grupos siguientes:

[0115] Grupo 1: Tampón acetato de Ringer (control)

45 **[0116]** Grupo 2: Tampón acetato de Ringer + cisplatino (cisplatino)

[0117] Grupo 3: Hemoglobina tetramérica reticulada termoestable + cisplatino (cisplatino+Hb).

[0118] Se tratan ratas implantadas con tejido tumoral hepático con cisplatino 3 mg/kg solo (Grupo 2) o junto con hemoglobina tetramérica reticulada termoestable (Grupo 3). Para los grupos 2 y 3, se anestesian las ratas mediante inyección intraperitoneal de una disolución de pentobarbitona 30-50 mg/kg y se administra cisplatino por la vena porta izquierda. Para el grupo 3, se inyecta por vía intravenosa hemoglobina tetramérica reticulada termoestable 0,4 g/kg a través de la vena del pene de la rata antes del tratamiento con cisplatino. El grupo 1 es el grupo de control sin tratamiento. De forma importante, se observa una reducción significativa del tumor hepático 3 semanas después del tratamiento (FIG. 9B).

50 **[0119] Ejemplo 10 (comparativo)**

[0120] Tratamiento de choque hemorrágico grave agudo en ratas

- [0121]** La hemoglobina tetramérica reticulada termoestable se usa también como agente de resucitación en un modelo de choque hemorrágico grave agudo en ratas. Se dividen aleatoriamente 50 ratas Sprague-Dawley en 3 grupos según los agentes de resucitación, de 16 a 18 ratas en cada grupo.
- 5 **[0122]** Grupo 1: Disolución de lactato de Ringer (control negativo, 16 ratas)
- [0123]** Grupo 2: Sangre autóloga del animal (control positivo, 16 ratas)
- 10 **[0124]** Grupo 3: Grupo de tratamiento con hemoglobina tetramérica reticulada termoestable (0,5 g de Hb/kg de peso corporal, 18 ratas).
- [0125]** Se establece un choque hemorrágico grave agudo extrayendo un 50% de la sangre completa del animal, que se estima como un 7,4% del peso corporal. Después de establecer el choque hemorrágico durante 10 minutos, se infunden en los animales disolución de lactato de Ringer, sangre autóloga del animal o hemoglobina tetramérica reticulada termoestable 0,5 g de Hb/kg. Se fija la velocidad de infusión de la hemoglobina tetramérica reticulada termoestable a 5 ml/h, después de ello, se observan todos los animales experimentales durante 24 horas. Se observan y analizan un panel de parámetros durante el periodo de estudio, incluyendo supervivencia, hemodinámica, mecánica miocárdica, gasto cardíaco, función cardíaca, gases sanguíneos, suministro y consumo de oxígeno en tejidos, perfusión de tejido y tensión de oxígeno (hígado, riñón y cerebro), función hepática y renal, hemorreología (viscosidad sanguínea) e índice de control respiratorio mitocondrial (hígado, riñón y cerebro). Por encima de todo, la supervivencia es el criterio de valoración principal. Después de 24 horas de observación, el grupo de tratamiento con hemoglobina tetramérica reticulada termoestable tiene una tasa de supervivencia mucho mayor en comparación con el grupo de disolución de lactato de Ringer o control negativo y el grupo de sangre autóloga (mostrado en la siguiente Tabla 8).
- 25

Tabla 8

Grupos	Nº de supervivientes después de 24 horas	Tasa de supervivencia a las 24 horas (%)
Control negativo	3 de 16 ratas	18,8
Sangre autóloga de rata	10 de 16 ratas	62,5
0,5 g de Hb/kg	13 de 18 ratas	72,0

*Hb= hemoglobina tetramérica reticulada termoestable

- 30 **[0126]** Aunque la invención anterior se ha descrito con respecto a diversas realizaciones, dichas realizaciones no son limitantes. Se entenderían numerosas variaciones y modificaciones por los expertos en la materia. Dichas variaciones y modificaciones se considera que están incluidas dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica que contiene un portador de oxígeno altamente purificado y termoestable, incluyendo la composición farmacéutica que contiene un portador de oxígeno hemoglobina, consistiendo la hemoglobina esencialmente en hemoglobina tetramérica reticulada no polimérica, y comprendiendo el procedimiento:
- 5 a) proporcionar sangre completa de mamífero que incluye al menos eritrocitos y plasma;
- 10 b) separar los eritrocitos del plasma en la sangre completa de mamífero;
- c) filtrar los eritrocitos que se separaron del plasma para obtener una fracción de eritrocitos filtrados;
- d) lavar la fracción de eritrocitos filtrados para retirar las impurezas proteicas plasmáticas, dando como resultado
15 eritrocitos lavados;
- e) disgregar los eritrocitos lavados mediante una lisis hipotónica precisa y controlada durante 2 a 30 s o un tiempo por otro lado suficiente para lisar los eritrocitos en un aparato de citólisis instantánea, creando una disolución que comprende un lisado de eritrocitos disgregados a un caudal de 50-1000 l/h;
20
- f) efectuar una filtración para retirar al menos una parte del retenido de desecho del lisado;
- g) extraer una primera disolución de hemoglobina del lisado;
- 25 h) efectuar un primer proceso de ultrafiltración usando un filtro de ultrafiltración configurado para retirar las impurezas que tienen un peso molecular mayor que la hemoglobina y para retirar adicionalmente cualquier virus y retenido de desecho residual de la primera disolución de hemoglobina, obteniéndose una segunda disolución de hemoglobina;
- 30 i) efectuar una cromatografía en columna de flujo continuo con la disolución de hemoglobina purificada para retirar las impurezas proteicas;
- j) efectuar un segundo proceso de ultrafiltración usando un filtro de ultrafiltración configurado para retirar impurezas y para concentrar la disolución de hemoglobina;
35
- k) reticular al menos las subunidades α - α de la hemoglobina con fumarato de bis-3,5-dibromosalicilo, formando hemoglobina reticulada en un entorno desoxigenado, en el que la hemoglobina reticulada es hemoglobina tetramérica reticulada no polimérica;
- 40 l) intercambiar un tampón fisiológico adecuado por la hemoglobina tetramérica reticulada;
- m) retirar cualquier producto químico residual por filtración por flujo tangencial;
- n) tratar térmicamente la hemoglobina reticulada en un entorno desoxigenado para desnaturalizar y precipitar
45 cualquier hemoglobina no reaccionada residual, hemoglobina dimérica no estabilizada y cualquier otra impureza proteica de tal modo que la hemoglobina tetramérica reticulada termoestable resultante tenga una concentración indetectable de dímero y consista esencialmente en hemoglobina tetramérica reticulada no polimérica, en el que el tratamiento térmico se efectúa a 70 a 95°C durante un tiempo de 30 s a 3 h en una o más de las siguientes condiciones:
50
- n1) seguido inmediatamente por enfriamiento a aproximadamente 25°C, y/o
- n2) se añade *N*-acetilcisteína a la hemoglobina tetramérica reticulada antes del tratamiento térmico;
- 55 o) añadir *N*-acetilcisteína inmediatamente después de tratar térmicamente la hemoglobina tetramérica reticulada para mantener un bajo nivel de metahemoglobina;
- p) retirar el precipitado mediante una centrifugación o un aparato de filtración formando una disolución transparente;
y

q) añadir la hemoglobina tetramérica reticulada purificada y termoestable a un portador farmacéuticamente aceptable.

- 5 2. El procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica que contiene un portador de oxígeno altamente purificado y termoestable según al reivindicación 1, en el que se añade *N*-acetilcisteína en una cantidad de 0,2 a 0,4% inmediatamente después de la etapa de enfriamiento n1.
3. El procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica que contiene un portador de oxígeno altamente purificado y termoestable según al reivindicación 1, en el que la adición de *N*-acetilcisteína antes del tratamiento térmico n2 es en una cantidad de aproximadamente 0,2%.
- 10 4. El procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica que contiene un portador de oxígeno altamente purificado y termoestable según la reivindicación 1, en el que la sangre completa es sangre completa humana, bovina, porcina, canina o equina.
- 15 5. El procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica que contiene un portador de oxígeno altamente purificado y termoestable según la reivindicación 1, en el que dicha cromatografía en columna comprende una o más columnas de intercambio catiónico o columnas de intercambio aniónico.
- 20 6. El procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica que contiene un portador de oxígeno altamente purificado y termoestable según la reivindicación 5, en el que la columna de cromatografía es una o más de columna de DEAE, columna de CM y/o columna de hidroxipatito.
- 25 7. El procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica que contiene un portador de oxígeno altamente purificado y termoestable según la reivindicación 1, en el que el portador farmacéuticamente aceptable es un tampón fisiológico o agua.

Cadena α de hemoglobina

B -

VLSAADKGNVKAAWGKVGGAHAAEYGAEALERMFLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDL
PGA 79

H

MVLSPADKTNVKAAWGKVGGAHAGEYGAEALERMFLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGKVVADALTNVAHVDD
MPNA 80

C -

VLSPADKTNIKSTWDKIGGHAGDYGGAEALDRTFQSFPTTKTYFPHFDLSPGSAQVKAHGKVVADALTTAVAHLLDLP
GA 79

P -

VLSAADKADVKAAYGKVGGAHAGEAGAEALERMFLGFTTKTYFPHFDLSHGSDVKAHGKVVADALTKAVGHLDDM
PGA 79

E

MVLSAADKTNVKAAWSKVGGAHAGEFGAEALERMFLGFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKAHGKVVGDALTLAVGHLDD
LPGA 80

B LSELSDLHAHKLRVDPVNFKLLSHSLVTLASHLPDFTPAVHASLDKFLANVSTVLTISKYR 141

H LSALSDDLHAHKLRVDPVNFKLLSHCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTISKYR 142

C LSALSDDLHAYKLRVDPVNFKLLSHCLLVTLACHHPTEFTPAVHASLDKFFAAVSTVLTISKYR 141

P LSALSDDLHAHKLRVDPVDFKLLSHCLLVTLAVHLPDDFTPAVHADLDKFLADVSTVLTISKYR 141

E LSNLSDDLHAHKLRVDPVNFKLLSHCLLVTLAVHLPNDFTPAVHASLDKFLSSVSTVLTISKYR 142

Cadena β de hemoglobina

B M--

LTAEEKAAVTAFWGKVKVDEVGGEALGRLLVWYPWTQRFFESFGDLSTADAVMNNPKVKAHGKVVLDSEFNGMKHL
D 78

H

MVHLTPEEKSAVTALWGKVVNDEVGGEALGRLLVWYPWTQRFFESFGDLSTPDAVMGNPKVKAHGKVVLGAFSDGL
AHL D 80

P

MVHLSAEEKEAVLGLWGKVVNDEVGGEALGRLLVWYPWTQRFFESFGDLSNADAVMGNPKVKAHGKVVLSQSFSDG
LKHLD 80

E

MVQLSGEEKAAVLALWDKVNNEEVGGEALGRLLVWYPWTQRFFDSFGDLSNPGAVMGNPKVKAHGKVVLSHFGE
VHLD 80

B DLKGTFAALSELHCDKLHVDPENFKLLGNLVVVLARNFGKEFTPVLQADFQKVVAGVANALAHRYH 145

H NLKGTFAALSELHCDKLHVDPENFRLLGNLVVVLARHFGKEFTPVQAAAYQKVVAGVANALAHKYH 147

P NLKGTFAALSELHCDQLHVDPENFRLLGNLVVVLARRLGHDFNPNVQAAFQKVVAGVANALAHKYH 147

E NLKGTFAALSELHCDKLHVDPENFRLLGNLVVVLARHFGKDFPELQASYQKVVAGVANALAHKYH 147

FIG. 1

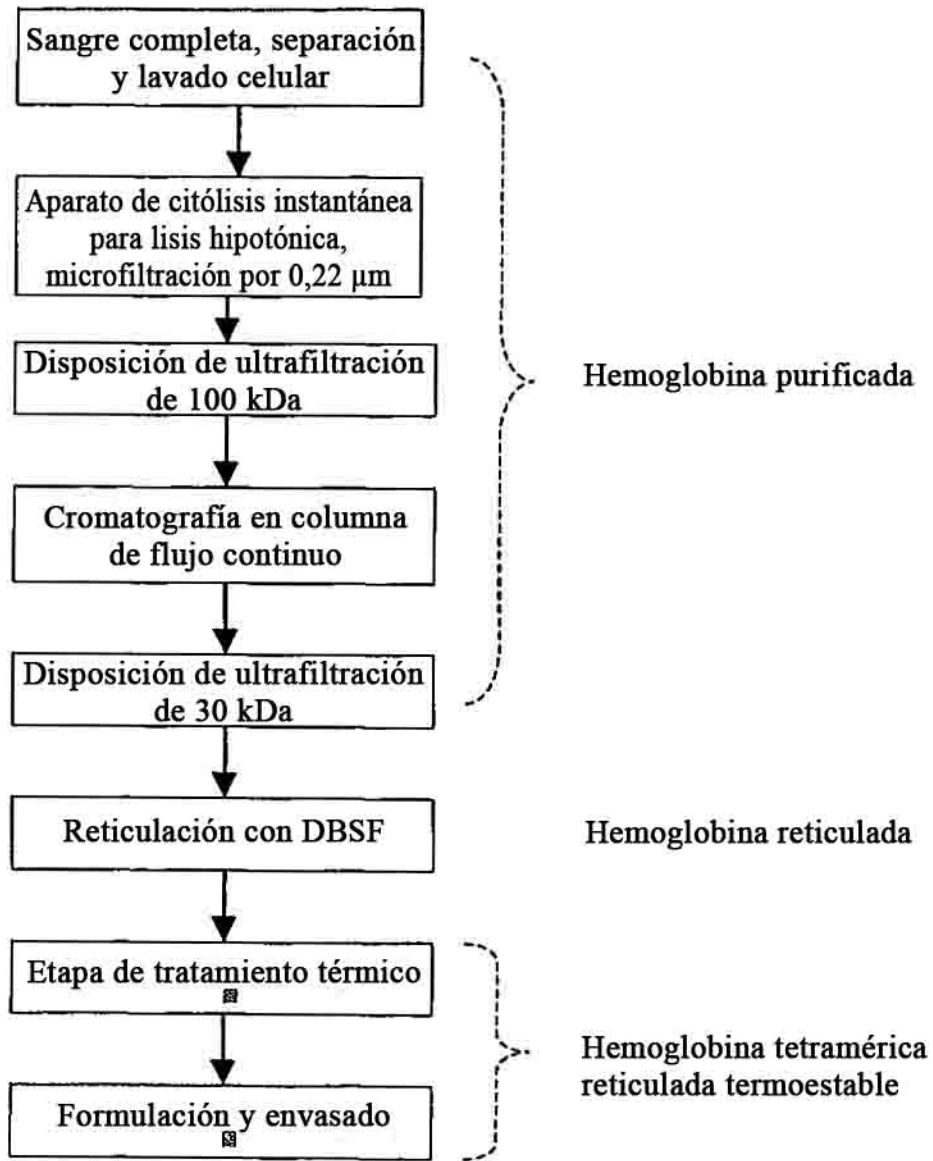


FIG. 2

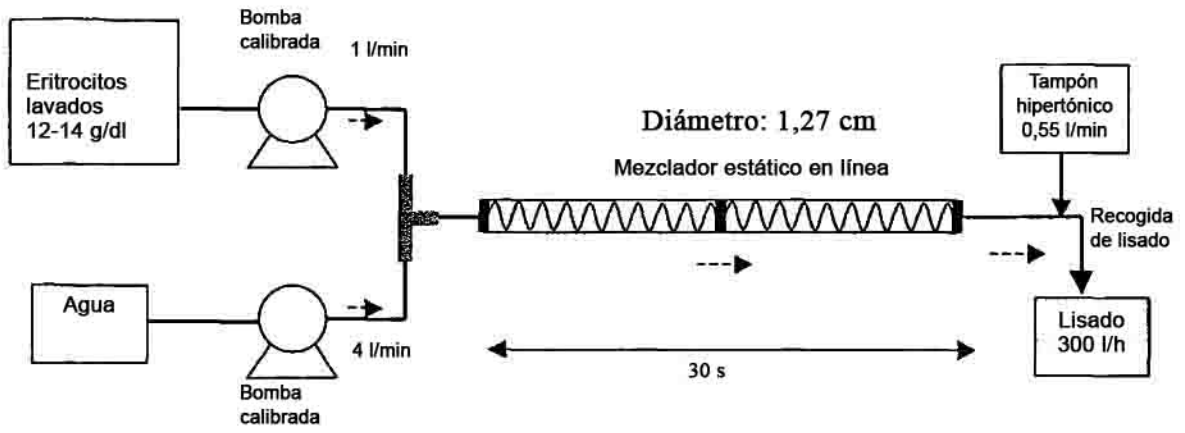
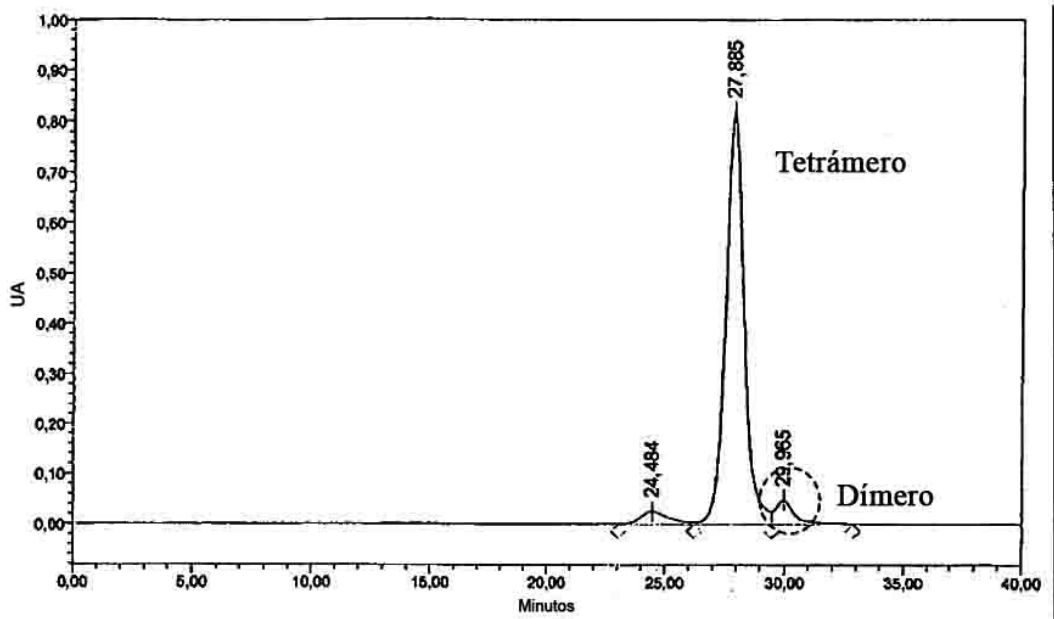
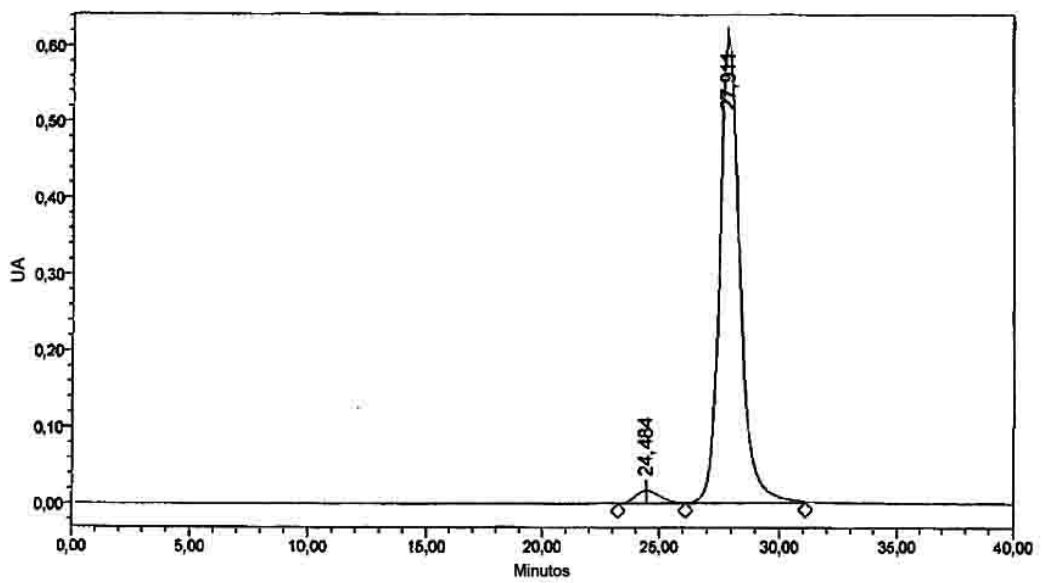


FIG. 3



(a) Sin tratamiento térmico



(b) Hemoglobina tetramérica reticulada estabilizada tratada térmicamente (90°C durante 45 s-2 min u 80°C durante 30 min)

FIG. 4

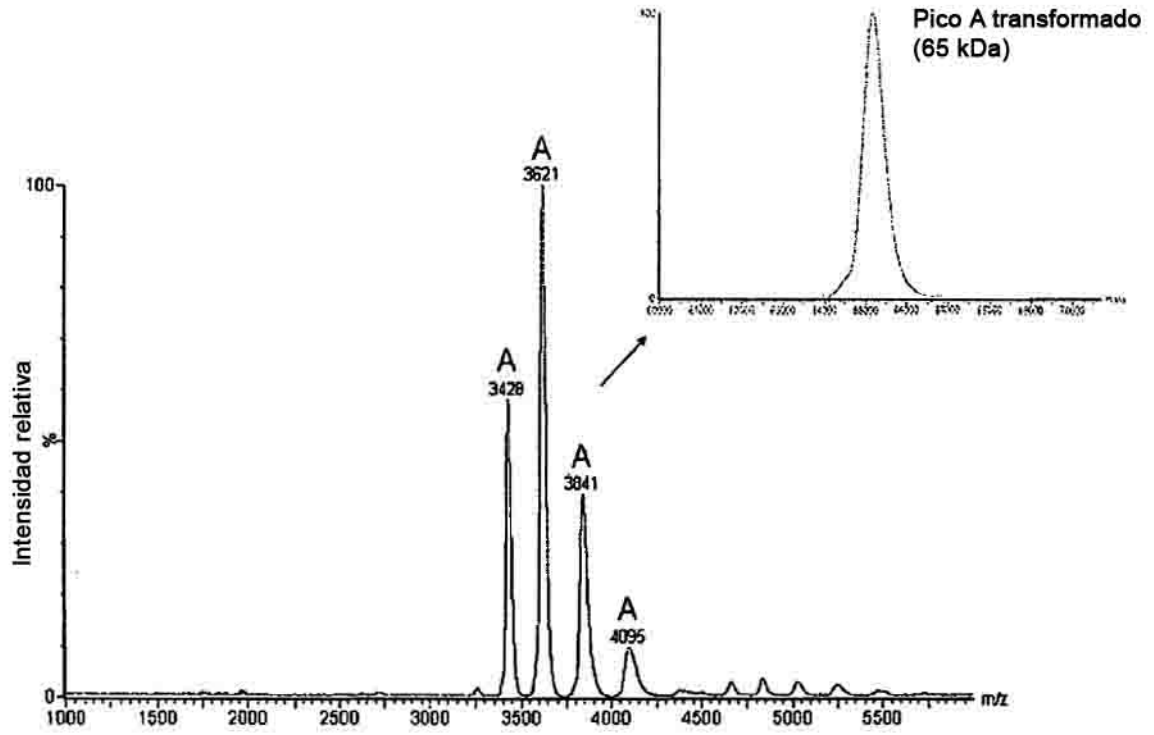


FIG. 5

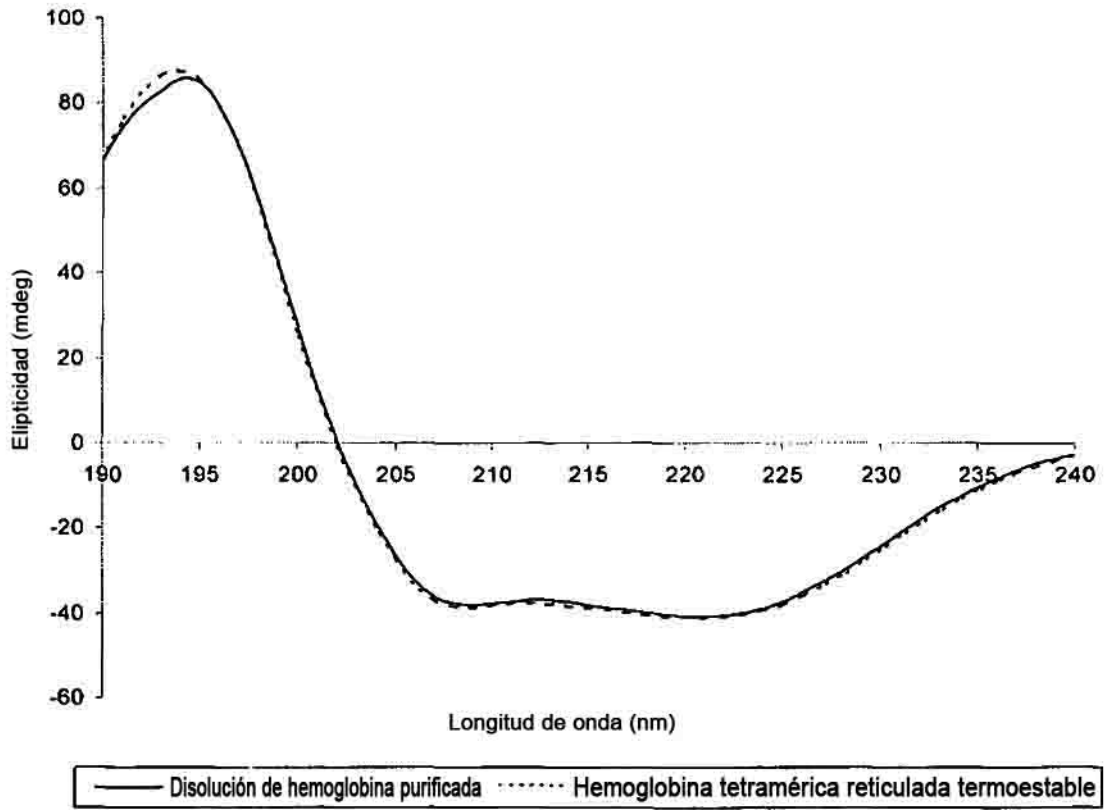


FIG. 6

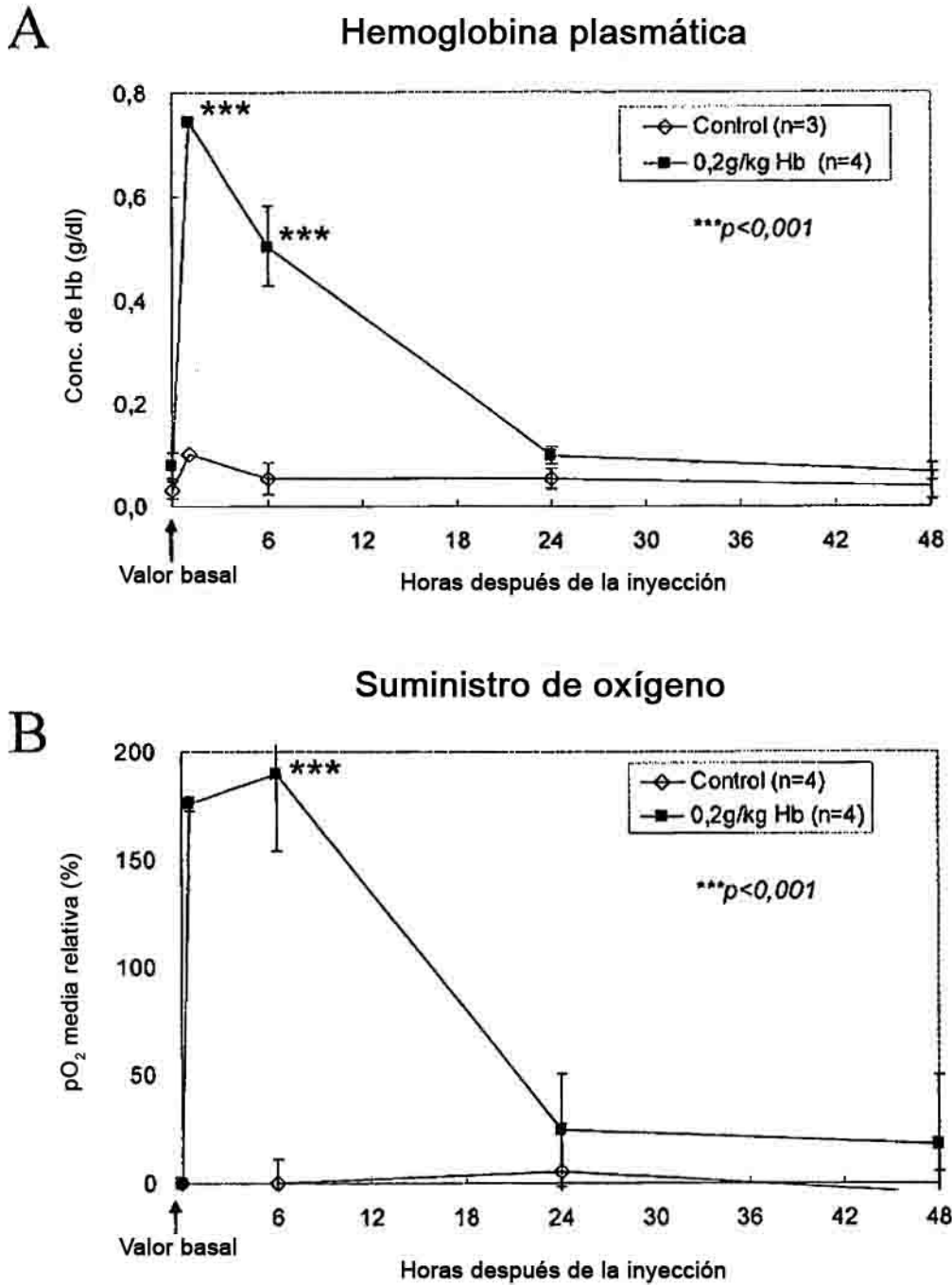


FIG. 7

Suministro de oxígeno a tumor

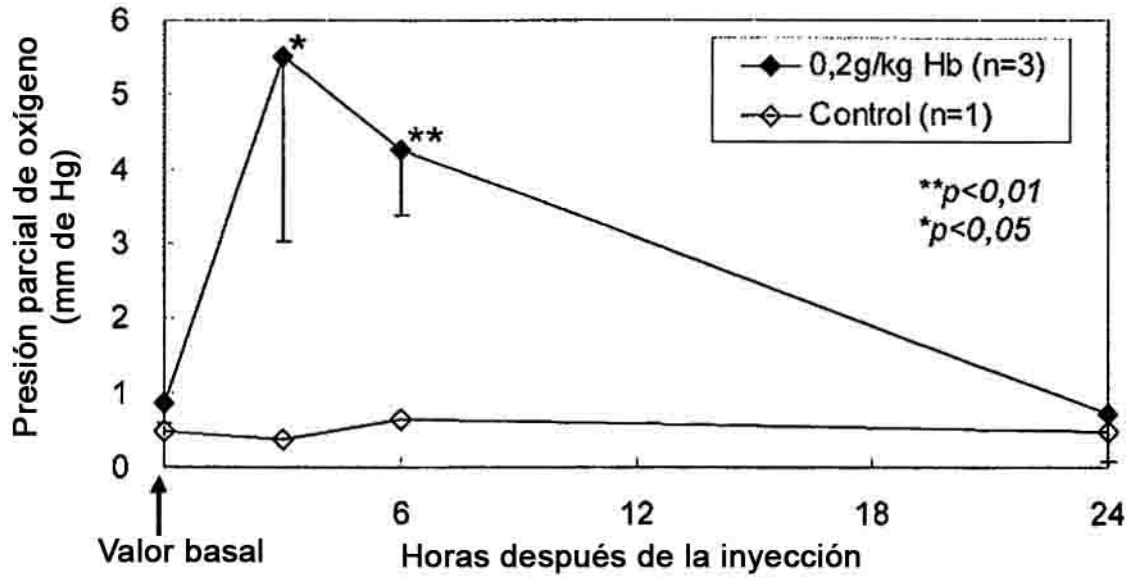
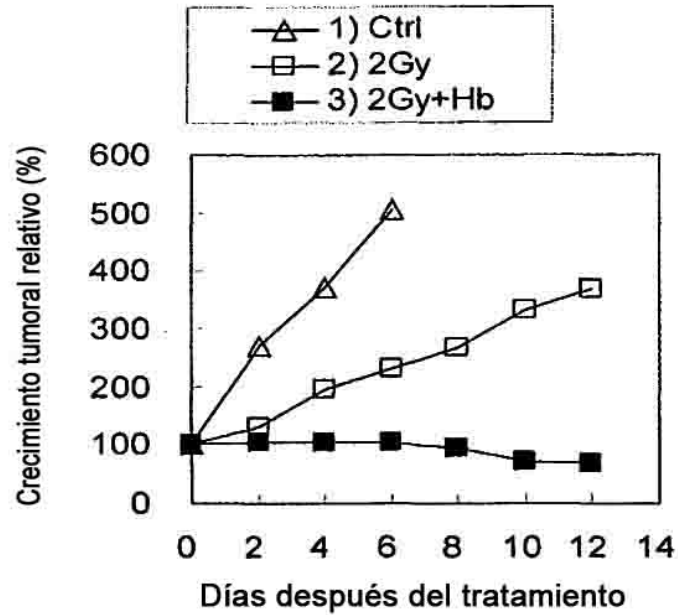


FIG. 8

A

Cáncer nasofaríngeo



B

Cáncer hepático

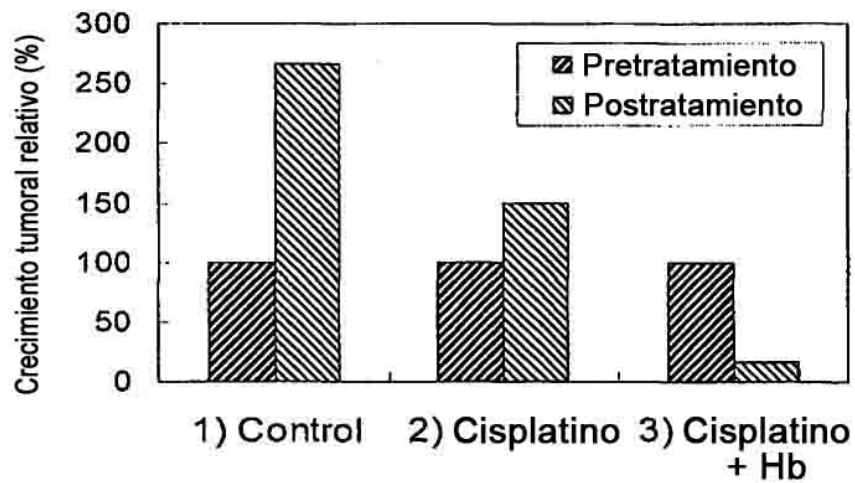


FIG. 9

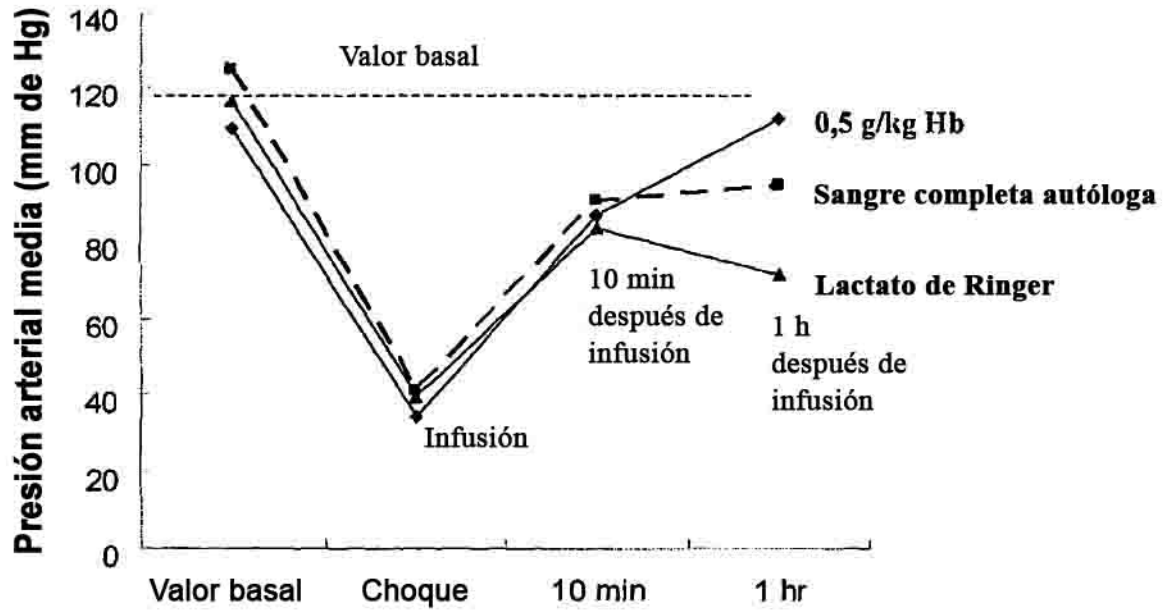


FIG. 10

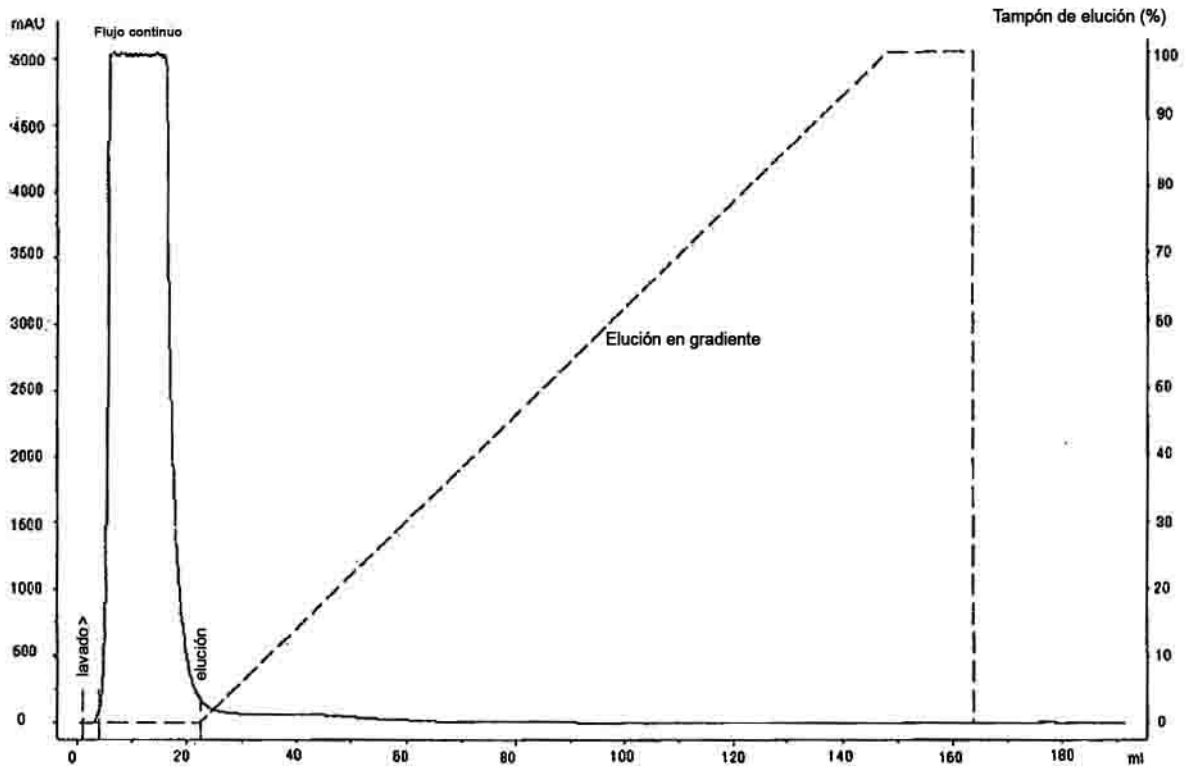


FIG.11

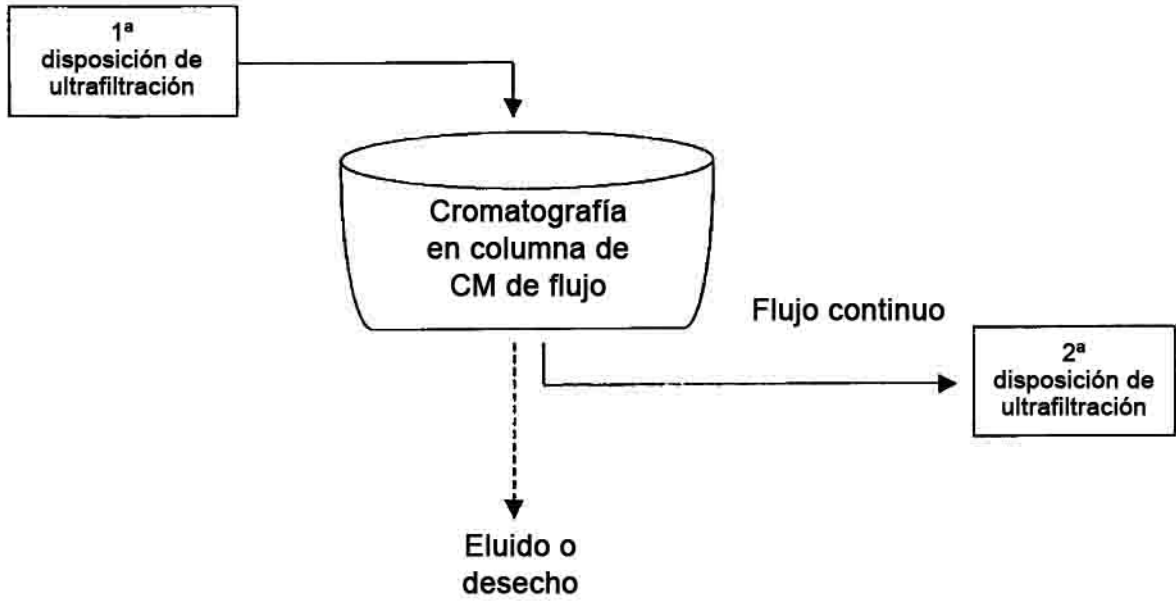


FIG 12

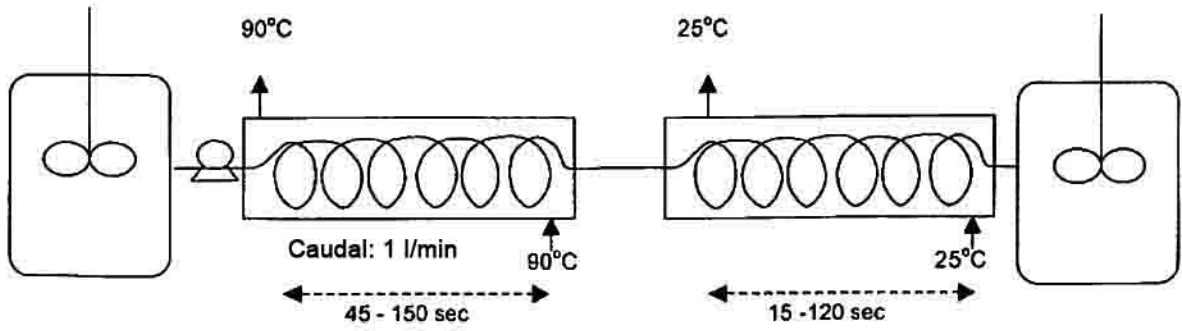


FIG. 13

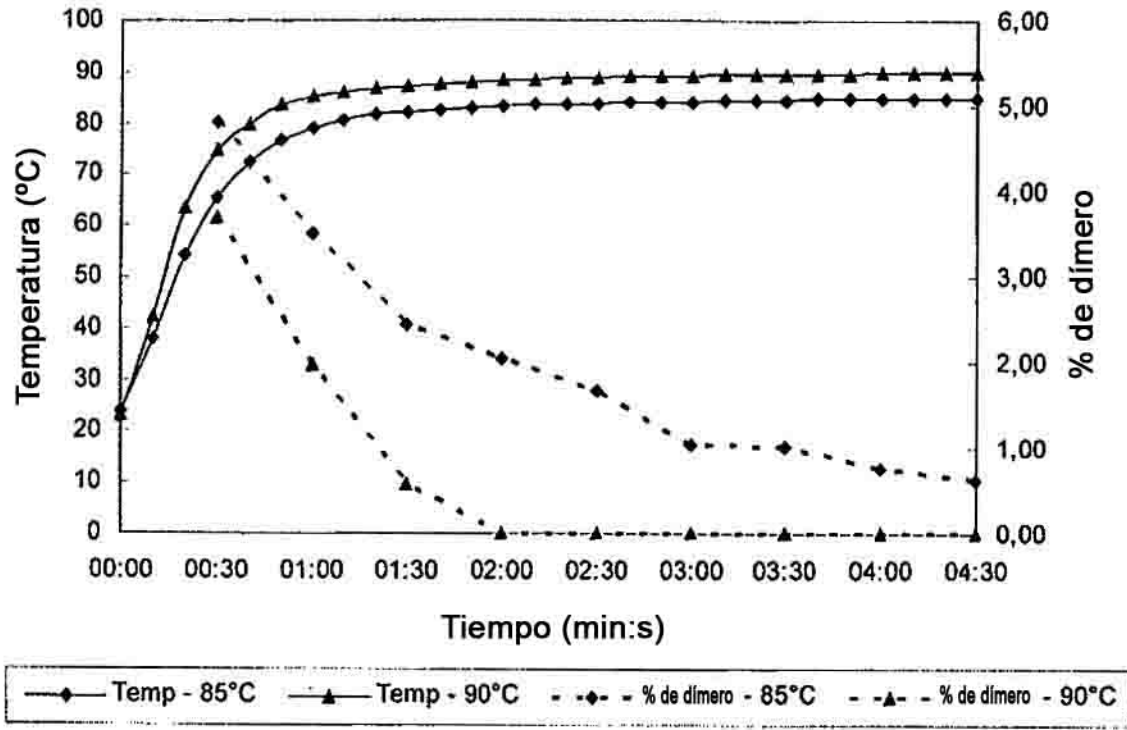


FIG. 14

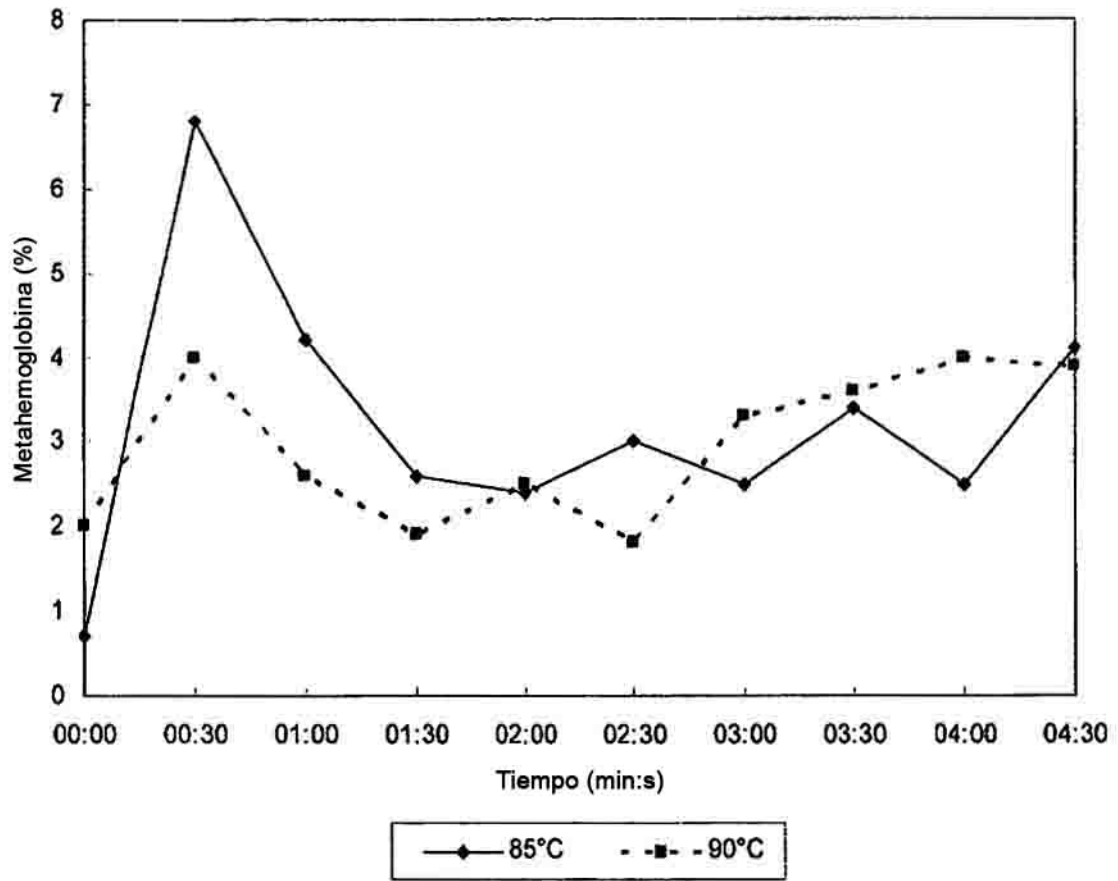


FIG. 15

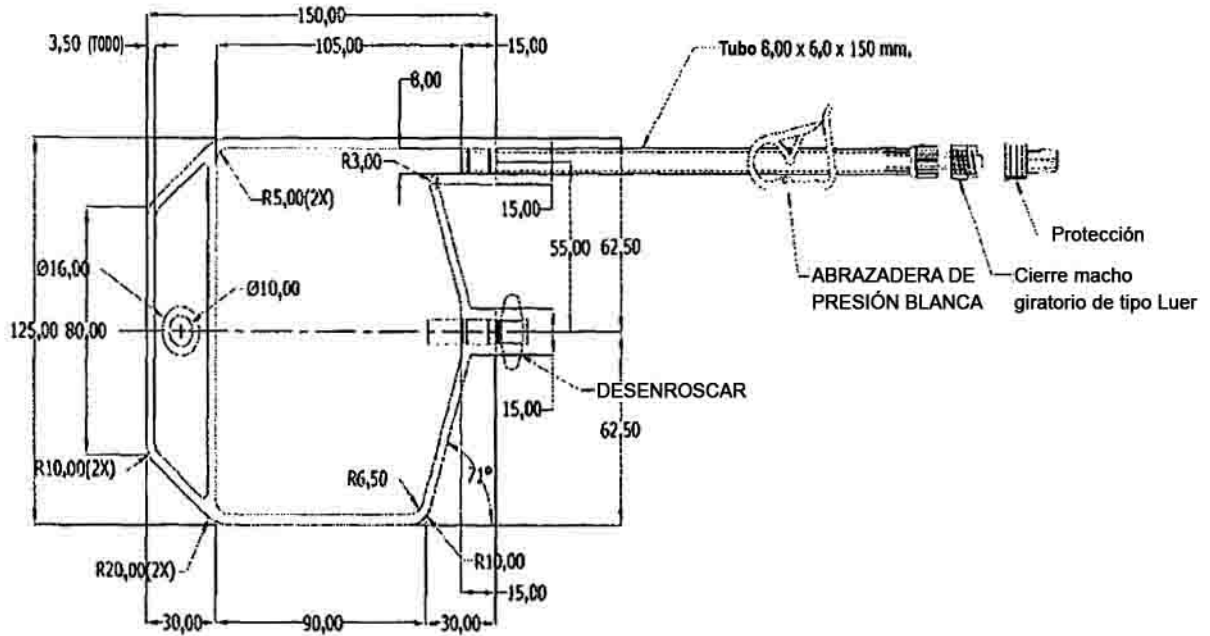


FIG. 16