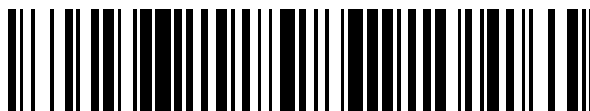


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 482 098**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/805** (2006.01)

**C08H 1/00** (2006.01)

**A61K 38/42** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2001 E 01998564 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014 EP 1358212**

54 Título: **Procedimientos para la síntesis de una disolución de hemoglobina modificada**

30 Prioridad:

**29.11.2000 US 253758 P**

**16.08.2001 US 930905**

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

**01.08.2014**

73 Titular/es:

**BREONICS, INC. (100.0%)  
W.A. Harriman Campus Drive, Building 7A  
Suite 310  
Albany, NY 12206 , US**

72 Inventor/es:

**PRIVALLE, CHRISTOPHER, THOMAS;  
STACEY, CYRUS, JOHN y  
TALARICO, TODD, LEWIS**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 482 098 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimientos para la síntesis de una disolución de hemoglobina modificada

## 5 CAMPO DE LA INVENCÓN

[0001] La invención se refiere a un procedimiento de preparación de una disolución de hemoglobina modificada químicamente.

## 10 ANTECEDENTES DE LA INVENCÓN

[0002] Han aparecido avances en los últimos años en el desarrollo de sustitutos de la sangre basados en hemoglobina. Dichos fluidos de transfusión sirven como alternativas a la sangre completa o fracciones de sangre para uso como portadores de oxígeno, expansores del plasma, potenciadores de radiación y quimioterapia y secuestrantes de óxido nítrico. Los sustitutos de la sangre basados en hemoglobina se producen mediante la modificación de hemoglobina ultrapurificada o exenta de estroma usando una variedad de reacciones intermoleculares o intramoleculares. Estas diversas modificaciones se diseñan para estabilizar la proteína, modular las propiedades de unión a oxígeno a niveles fisiológicos aceptables y para disminuir la toxicidad renal. Debido a la presencia de los restos hemo y hierro, la molécula de hemoglobina tiene una toxicidad potencial resultante de la rápida autooxidación de la hemoglobina después de interacciones con radicales libres y vasoconstricción mediada por hemoglobina. Adicionalmente, la hemoglobina puede reaccionar con oxidantes celulares tales como peróxido de hidrógeno, dando como resultado la producción tanto de metahemoglobina ( $\text{Fe}^{3+}$ ) como de ferrilhemoglobina ( $\text{Fe}^{4+}$ ), un fuerte oxidante que se ha reseñado que reticula proteínas y peroxida lípidos.

[0003] Los sistemas antioxidantes en los eritrocitos controlan estas reacciones de radicales libres y protegen la función e integridad estructural de la hemoglobina. Por ejemplo, en el eritrocito, enzimas antioxidantes endógenas tales como superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) catalizan la degradación de superóxido y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), respectivamente, y sirven por ello para mantener la integridad funcional y estructural de la hemoglobina. Por ello, la capacidad de suministro de oxígeno de disoluciones de hemoglobina polimerizada puede potenciarse mediante la asociación con estas enzimas antioxidantes.

[0004] Un enfoque experimental reciente ha dado como resultado el diseño de una segunda generación de portadores de oxígeno basados en hemoglobina en que la reactividad del radical libre está limitada. El diseño está basado en la reticulación mediada por glutaraldehído de SOD y catalasa purificadas con hemoglobina purificada. Véanse, por ejemplo, D'Agnillo y col. (1998) Nature Biotechnol. 16: 667-671 y la patente de EE.UU. nº 5.606.025. Se ha reseñado que la modificación evita la formación de ferrilhemoglobina mediada por  $\text{H}_2\text{O}_2$  (D'Agnillo y col. (1998) Free Rad. Bio. Med. 24: 906-912) y reduce la generación de radicales hidroxilo tanto *in vitro*, en un modelo de miembro posterior de rata de lesión por reperfusión isquémica (D' Agnillo y col. (1998) Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol. 25: 181-192) como *in vivo*, en un modelo de rata de lesión por reperfusión isquémica intestinal (Razack y col. (1997) Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol. 25: 163-180). Estos estudios han conducido a la propuesta de que las hemoglobinas modificadas con actividad antioxidante pueden reducir la toxicidad potencial de los portadores de oxígeno basados en hemoglobina en ciertas aplicaciones al mantener la forma ferrosa portadora de oxígeno de la hemoglobina y disminuir la aparición de especies radicales libres asociadas a hemoglobina potencialmente dañinas o la liberación de productos de degradación de hemoglobina que pueden ser dañinos para los tejidos circundantes.

[0005] Aunque se ha sugerido que el complejo polipeptídico reticulado que comprende hemoglobina, SOD y catalasa tiene beneficios potenciales *in vivo*, los procedimientos enseñados por la patente de EE.UU. nº 5.606.025 para la producción de producto de hemoglobina modificada comprenden combinar hemoglobina purificada con catalasa y superóxido dismutasa bovinas purificadas en la reacción de reticulación. Existen varias desventajas prácticas a la adición de enzimas de vuelta a hemoglobina purificada. En primer lugar, la adición de enzimas bovinas o cualquiera derivada de no humanos es potencialmente un problema basado en la inmunogenicidad asociada a las enzimas durante la administración humana. En segundo lugar, la purificación de las enzimas de sangre humana es costosa y puede ser inhibidora de la producción de un producto económico.

[0006] La hemoglobina piridoxalada conjugada con polioxi-etileno (PHP) es una hemoglobina derivada de ser humano modificada químicamente. La molécula de PHP es una hemoglobina de superficie recubierta que contiene actividades enzimáticas antioxidantes endógenas (Privalle y col. (1998) Free Rad. Bio. Med. 25: (Supl. 1) S65 resumen; Privalle y col. (2000) Acta Physiol. Scand. 167: (Supl. 645) p200 resumen; Privalle y col. (1999) Free Rad. Bio. Med. 28: 1507-1517 y Talarico y col. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1476: 53-65. Se ha demostrado que la PHP, en varios modelos *in vitro*, exhibe una reactividad disminuida hacia la oxidación mediada por peróxido de hidrógeno cuando se compara con hemoglobina no modificada o hemoglobina reticulada  $\alpha, \alpha$ . Por ello, la reactividad redox de las preparaciones de hemoglobina puede manipularse y la presencia de antioxidantes endógenos puede reducir el potencial prooxidante de la hemoglobina. Por lo tanto la PHP, en virtud de la presencia de antioxidantes eritrocíticos endógenos, puede funcionar como hemoglobina exenta de célula con el potencial antioxidante del eritrocito intacto,

evitando o reduciendo por tanto el potencial prooxidante de la hemoglobina.

**[0007]** Surge un grave problema asociado a los sustitutos de la sangre basados en hemoglobina derivada de animal o ser humano por la posibilidad de contaminantes víricos en la disolución de hemoglobina modificada. La eliminación e inactivación de vírica se efectúa comúnmente usando cromatografía o inactivación térmica. Sin embargo, el tratamiento de las disoluciones de hemoglobina usando estos procedimientos retira o anula la actividad beneficiosa de los antioxidantes asociados a la molécula de hemoglobina.

**[0008]** Por ejemplo, los procedimientos anteriores para la síntesis de un producto de hemoglobina modificada químicamente empleaban medios de filtración que evitaban el paso de partículas víricas, pero también evitaban el paso de enzimas antioxidantes endógenas. Se proporcionan procedimientos alternativos en la patente de EE.UU. nº 5.741.894, que da a conocer un procedimiento para la preparación de una hemoglobina de pureza farmacéutica. La patente de EE.UU. nº 5.464.814 da a conocer un proceso para preparar una hemoglobina piridoxilada polimerizada reticulada exenta de estroma y exenta de tetrámero. Ambos procedimientos emplean una etapa de filtración que permite el paso de hemoglobina, enzimas antioxidantes endógenas y partículas víricas. Las partículas víricas se inactivan posteriormente en una etapa de tratamiento térmico que anula la actividad tanto de partículas víricas como de enzimas antioxidantes. En otros procedimientos, las partículas víricas se retiran junto con las enzimas antioxidantes por cromatografía. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.264.565 y 5.988.361.

**[0009]** Como alternativa, la patente de EE.UU. nº 5.194.590 da a conocer un procedimiento de preparación de una hemoglobina humana que comprende la lisis de eritrocitos y la retirada del estroma de eritrocitos por un proceso de filtración microporosa que permite que la hemoglobina y los contenidos enzimáticos de los eritrocitos pasen a través del filtro usando un filtro de 0,1 µm. Después de la modificación química, se efectúa un proceso de purificación en tres etapas que retira los tetrámeros no modificados y reduce también la contaminación vírica. La etapa de cromatografía adicional es esencial para retirar los contaminantes víricos de la disolución de hemoglobina, que pasaban a través del filtro de 0,1 µm.

**[0010]** Debido a que las enzimas antioxidantes proporcionan propiedades ventajosas a la hemoglobina modificada, son necesarios procedimientos para preparar hemoglobina purificada que esté exenta de virus pero siga reteniendo actividad antioxidante.

**[0011]** S. Matsumara y col. (1992, Biomat. Artif. Cells Immobilization Biotechnol., vol. 20, páginas 435-438) describe la producción a gran escala y caracterización de hemoglobina piridoxalada con polioxietileno liofilizada PHP.

**[0012]** T. L. Talarico y col. (1999, Biopharmacology, vol. 12, páginas 42-47) describe análisis de comparabilidad para apoyar que un cambio del sitio de fabricación y modificaciones de proceso para una etapa de cromatografía adicional biofarmacéutica son esenciales para retirar los contaminantes víricos de la disolución de hemoglobina, que pasaba a través del filtro de 0,1 µm.

**[0013]** Debido a que las enzimas antioxidantes proporcionan propiedades ventajosas a la hemoglobina modificada, son necesarios procedimientos para preparar hemoglobina purificada que esté exenta de virus pero siga reteniendo actividad antioxidante.

## RESUMEN DE LA INVENCION

**[0014]** La memoria descriptiva describe procedimientos y composiciones para la separación de moléculas de hemoglobina y enzimas antioxidantes endógenas de estroma de eritrocitos. El procedimiento de separación reduce adicionalmente el nivel de agentes fortuitos potenciales, de tal modo que se produce una disolución de hemoglobina/antioxidante sustancialmente exenta de virus. Específicamente, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una disolución de hemoglobina modificada que comprende enzimas antioxidantes endógenas de eritrocitos, como se indica en las reivindicaciones. El procedimiento comprende poner en contacto una disolución de hemoglobina exenta de estroma con al menos un medio de filtración que comprende un filtro de corte de peso molecular 500.000 que retiene las partículas víricas y permite el paso de un filtrado que comprende hemoglobina y enzimas antioxidantes endógenas, y el filtrado está sustancialmente exento de contaminación vírica; modificar químicamente el filtrado con un agente y aislar la hemoglobina modificada y enzimas antioxidantes, reteniendo al menos una de las enzimas antioxidantes endógenas la actividad enzimática. En una realización, el procedimiento de la presente invención se usa para sintetizar conjugado de hemoglobina piridoxalada con polioxietileno (PHP) como se indica en las reivindicaciones.

**[0015]** La presente invención proporciona por tanto un procedimiento de preparación de una disolución de hemoglobina modificada químicamente. El procedimiento consiste en poner en contacto una disolución de hemoglobina exenta de estroma con al menos un medio de filtración que comprende un filtro de corte de tamaño molecular 500.000, reteniendo un primer medio de filtración las partículas víricas y permitiendo el paso de un filtrado que comprende hemoglobina y enzimas antioxidantes endógenas, y el filtrado está sustancialmente exento de

contaminación vírica; modificar químicamente el filtrado con un agente y aislar la hemoglobina modificada y enzimas antioxidantes, reteniendo al menos una de las enzimas antioxidantes endógenas la actividad enzimática.

5 **[0016]** La presente memoria descriptiva describe una composición que comprende una disolución de hemoglobina modificada. La disolución de hemoglobina modificada comprende moléculas de hemoglobina modificada químicamente y al menos una enzima antioxidante endógena, en la que la modificación química comprende reticular con polioxi-etileno (POE) activado bifuncional. Los antioxidantes endógenos presentes en la disolución retienen actividad enzimática y la disolución está sustancialmente exenta de contaminación vírica.

## 10 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

### **[0017]**

15 La Figura 1 es una revisión esquemática de la síntesis de hemoglobina piridoxalada con polioxi-etileno (PHP).

La Figura 2 muestra los cambios espectrales de las moléculas de hemoglobina de PHP y HbA después de la oxidación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

20 La Figura 3 muestra la formación de sulfohemoglobina (A<sub>620</sub>) después de la oxidación mediada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como medida de la ferrilhemoglobina. Se muestra el espectro final de HbA, PHP y POE-HbA.

## **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

25 **[0018]** Los procedimientos descritos en la presente memoria proporcionan la separación de hemoglobina y varias enzimas antioxidantes endógenas de estroma de eritrocitos y agentes fortuitos potenciales. La composición de hemoglobina/antioxidante purificada se somete entonces a un proceso de modificación química. La composición de hemoglobina modificada/antioxidante resultante se fracciona posteriormente para retirar las especies de hemoglobina no modificadas y reactantes residuales, se formula en electrolitos y se vuelve estéril. El producto de hemoglobina modificada resultante está sustancialmente exento de contaminación vírica y contiene al menos una enzima antioxidante endógena que retiene actividad antioxidante.

30 **[0019]** Los procedimientos de la presente invención proporcionan un medio novedoso para preparar una disolución de hemoglobina modificada químicamente que retiene la actividad de al menos una enzima antioxidante endógena y está sustancialmente exenta de contaminantes víricos, como se indica en las reivindicaciones. Específicamente, la presente invención emplea una única etapa de filtración que comprende un filtro de corte de peso molecular 500.000 durante el proceso de purificación de hemoglobina que ofrece un medio para disminuir sustancialmente la contaminación vírica de una disolución de hemoglobina modificada y retener las enzimas antioxidantes endógenas.

35 **[0020]** La presente invención proporciona un procedimiento novedoso de preparación de una disolución de hemoglobina modificada químicamente como se indica en las reivindicaciones. El procedimiento comprende: (a) poner en contacto una disolución de hemoglobina exenta de estroma con al menos un medio de filtración que comprende un filtro de corte de peso molecular 500.000, reteniendo dicho medio de filtración las partículas víricas y permitiendo el paso de un filtrado sustancialmente exento de virus que comprende hemoglobina y enzimas antioxidantes endógenas; (b) modificar químicamente el filtrado con un agente y (c) aislar una disolución de hemoglobina modificada químicamente y enzimas antioxidantes endógenas, reteniendo al menos una enzima antioxidante endógena la actividad enzimática.

40 **[0021]** Además, la presente invención proporciona un procedimiento de preparación de una hemoglobina modificada químicamente consistente en: (a) poner en contacto una disolución de hemoglobina exenta de estroma con al menos un medio de filtración que comprende un filtro de corte de peso molecular 500.000, reteniendo dicho medio de filtración las partículas víricas y permitiendo el paso de un filtrado que comprende hemoglobina y enzimas antioxidantes endógenas, y estando el filtrado sustancialmente exento de contaminación vírica; (b) modificar químicamente el filtrado con un agente y (c) aislar una composición que comprende hemoglobina modificada y enzimas antioxidantes endógenas, reteniendo al menos una de las enzimas antioxidantes endógenas la actividad enzimática.

45 **[0022]** Como se usa en la presente memoria, el "medio de filtración" usado en los procedimientos de la presente invención comprende una etapa de ultrafiltración que permite el aislamiento de un ultrafiltrado que comprende moléculas de hemoglobina y al menos una enzima antioxidante endógena que está sustancialmente exenta de contaminación vírica. Se pretende por "sustancialmente exento de contaminación vírica" una disolución que tiene un título vírico menor de 1 unidad infecciosa/ml.

50 **[0023]** El medio de filtración reduce el nivel de contaminación vírica en el filtrado resultante. En los procedimientos de la presente invención, una reducción de la contaminación vírica abarca cualquier disminución del

nivel global de partículas víricas y/o una disminución de la actividad de las partículas víricas. El medio de ultrafiltración de la presente invención reduce los niveles de virus con cubierta y/o sin cubierta incluyendo, por ejemplo, partículas víricas del intervalo de tamaño de 120-200 nm (tales como herpes simple de tipos I y II, herpesvirus 6 y 7, virus de Epstein-Barr y citomegalovirus), 80-100 nm (tales como VIH, HTLV-I y II), 50-70 nm (tales como hepatitis G, hepatitis C, HCV y DHBV) y 25-30 nm (virus sin cubierta tales como hepatitis A).

**[0024]** Como se define en la presente memoria, una reducción del nivel de partículas víricas activas abarca un factor de aclaramiento por retirada vírica después del primer medio de filtración que es mayor de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más unidades logarítmicas, medido contando unidades de formación de placa (UFP). La disminución del título vírico puede determinarse ensayando los materiales de partida, intermedios de proceso y producto final mediante ensayos de formación de placa estándares conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, Bechtel y col. (1988) Biomat. Art Cells Art. Org. 16: 123-128. Como alternativa, una reducción de las partículas víricas activas abarca una disminución del título vírico, como se determina por los valores de TCID<sub>50</sub>. TCID<sub>50</sub> se define en la presente memoria como la dosis infecciosa en cultivo de tejido que da como resultado la muerte de un 50 % de las células.

**[0025]** Son bien conocidos en la técnica otros ensayos para determinar si el filtrado resultante está sustancialmente exento de virus (concretamente, tiene un nivel reducido de partículas víricas). Por ejemplo, puede detectarse la ausencia de ADN vírico por técnicas de hibridación de ADN usando sondas específicas de virus para virus de hepatitis B, citomegalovirus, herpesvirus simple y virus de Epstein-Barr. El ADN puede extraerse del filtrado, someterse a análisis Southern y sondearse con ADN marcado con <sup>32</sup>P o marcado con biotina específico del virus. La contaminación de partículas víricas puede detectarse también mediante procedimientos ELISA conocidos por detectar antígenos víricos específicos tales como proteínas nucleares.

**[0026]** Además, la disolución sustancialmente exenta de virus producida después del medio de filtración se caracteriza por no inducir efectos fisiopatológicos característicos de infección vírica tras administración *in vivo* a un sujeto (concretamente, un mamífero, preferiblemente un ratón, bovino, cerdo, mono, ser humano, etc.). Por ejemplo, los síntomas fisiológicos de hepatitis no A y no B incluyen monitorizar la actividad aspartato aminotransferasa, la actividad alanina aminotransferasa y la fisiología hepática (como se ensaya por microscopio óptico o de electrónico) durante un periodo de 4, 10, 14 o 24 semanas. Son bien conocidos en la materia los efectos fisiopatológicos resultantes de la infección de otras partículas víricas. Por ello, como se usa en la presente memoria, una disolución sustancialmente exenta de virus no es infecciosa, de tal modo que la disolución puede transfundirse o manipularse sin dañar ni infectar a nadie expuesto a ella.

**[0027]** El medio de filtración usado en los procedimientos de la presente invención permite adicionalmente el aislamiento de un filtrado que comprende una molécula de hemoglobina y al menos una enzima eritrocítica endógena. Son de particular interés las enzimas antioxidantes endógenas. Se pretende por enzima o polipéptido antioxidante "endógeno" cualquier polipéptido antioxidante que se libere por eritrocitos durante el procedimiento de aislamiento de estroma de eritrocito. Como se usa en la presente memoria, enzimas antioxidantes "endógenas" no abarca enzimas antioxidantes purificadas de eritrocitos humanos o animales o enzimas antioxidantes expresadas recombinantemente que se añadan de vuelta a la disolución de hemoglobina durante el proceso de modificación después de la etapa de lisis. Las enzimas antioxidantes endógenas de interés particular incluyen superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa.

**[0028]** Los antioxidantes de los eritrocitos son útiles para eliminar especies de oxígeno activado tales como peróxido de hidrógeno y superóxido, que se generan en el cuerpo durante la lesión. Adicionalmente, cada subunidad de hemoglobina contiene un grupo hierro-hemo que debe existir en estado ferroso para que la hemoglobina transporte oxígeno. Los antioxidantes ayudan eficazmente a mantener la hemoglobina en un estado ferroso y evitan la aparición de especies radicales libres asociadas a proteína hemo dañinas potenciales o la liberación de productos de degradación de hemoglobina. Por ello, la presencia de antioxidantes enzimáticamente activos a lo largo de los procedimientos de aislamiento y modificación de la presente invención ayudará a reducir el nivel de formación de metahemoglobina en el producto modificado final y durante la circulación del producto en un sujeto.

**[0029]** El medio de filtración da como resultado un filtrado que comprende actividad antioxidante (concretamente catalasa, glutatión peroxidasa o superóxido dismutasa). La actividad de los antioxidantes particulares puede medirse mediante procedimientos usados comúnmente. Por ejemplo, la catalasa es una proteína de peso molecular 240.000 a 250.000 con una actividad específica de 70.000 a 80.000 U/mg. Una unidad de actividad catalasa corresponde a una cantidad de enzima que descompone 1 μmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto a pH 7,0 y 25 °C. Los procedimientos para medir la actividad catalasa son conocidos en la materia y se describen en Beers y Sizer (1952) J. Biol. Chem. 195: 133-140. Brevemente, se añade una disolución que contiene catalasa a una Curette que contiene peróxido de hidrógeno en tampón fosfato de sodio 50 mM. Se mide la velocidad de desaparición de peróxido de hidrógeno durante un periodo de 30 s espectrofotométricamente. Véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.606.025 y D'Agnillo y col. (1998) Nature Biotechnology 16: 667-671. En los procedimientos de la presente invención, el filtrado puede retener una actividad catalasa de aproximadamente 5.000 unidades/ml; 6.000 unidades/ml; 7.000 unidades/ml; 9.000 unidades/ml; 12.000 unidades/ml; 14.000 unidades/ml; 16.000 unidades/ml; 20.000 unidades/ml; 24.000 unidades/ml; 28.000 unidades/ml o más. Como alternativa, la actividad catalasa puede

estar en el intervalo entre aproximadamente 5.000 a 30.000 unidades/ml, de 7.000 a 25.000 unidades/ml o de 7.800 a 23.000 unidades/ml.

5 **[0030]** La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima antioxidante de peso molecular 32.000 con una actividad específica de 4.000 U/mg. Una unidad de actividad SOD se define como la cantidad de enzima que inhibe la velocidad inicial de reducción de citocromo c en un 50 %. Se describen ensayos para medir la actividad en Crapo y col. (1978) Methods of Enzymology 52: 382-387. Brevemente, puede añadirse una disolución reactiva consistente en xantina y citocromo c a la disolución que contiene SOD. Se añade también catalasa libre a la reacción para evitar cualquier interferencia que dé como resultado una interacción de hemoglobina-peróxido de hidrógeno. Puede monitorizarse la velocidad de reducción de citocromo c espectrofotométricamente a 550 nm. Se describen con detalles ensayos de reducción de citocromo c en la patente de EE.UU. nº 5.606.025 y D'Agnillo y col. (1998) Nature Biotechnology 16: 667-671. Otros ensayos usados para medir el nivel de actividad SOD incluyen, por ejemplo, la inhibición de la reducción de azul de nitrotetrazolio (Beyer y col. (1987) Anal. Biochem. 161: 559-566.

15 **[0031]** La anhidrasa carbónica es una proteína de peso molecular 84.000 con una actividad específica mayor de 700 U/mg. Una unidad de actividad anhidrasa se define como la cantidad de enzima que causa que el pH de un tampón Tris 20 mM caiga de 8,3 a 6,3 por minuto a 0 °C. Pueden encontrarse ensayos para medir el nivel de anhidrasa carbónica, por ejemplo, en Wilber y col. (1948) J. Biol. Chem. 250: 3523.

20 **[0032]** La glutatión peroxidasa es una proteína de peso molecular 29.000 con una actividad específica mayor de 3000 U/mg. Una unidad de actividad glutatión peroxidasa cataliza la oxidación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1 µmol de glutatión reducido a glutatión oxidado por minuto a pH 7,0 y 25 °C. Los ensayos para medir el nivel de glutatión peroxidasa incluyen, por ejemplo, aquellos expuestos en Mannervik y col. (1985) Methods in Enzymol. 113: 490 y Meister *et al.* (1983) Ann. Review Biochem. 52: 711.

25 **[0033]** El nivel global de actividad antioxidante endógena puede ensayarse monitorizando los espectros de absorbancia de la molécula de hemoglobina después de la exposición oxidativa. Por ejemplo, puede añadirse peróxido de hidrógeno al filtrado y pueden registrarse los espectros de absorbancia (450 nm- 700 nm) con el tiempo para monitorizar las reacciones de peróxido de hidrógeno o radicales libres de oxígeno resultantes con los componentes de hemoglobina de la disolución de hemoglobina aislada. La presencia de enzimas antioxidantes dará como resultado un nivel disminuido de degradación del resto hemo y se reflejará en el análisis de los espectros. Pueden efectuarse exposiciones oxidativas similares usando un sistema generador de xantina/xantina oxidasa o superóxido/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

30 **[0034]** Por ejemplo, puede ensayarse la formación de metahemoglobina después de exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 µM a una disolución de hemoglobina (hemo 20 µM).

35 **[0035]** La formación de metahemoglobina se reflejará en una disminución de la absorbancia a 541 nm y 577 nm. El nivel de enzimas antioxidantes en el filtrado después del medio de filtración será tal que evite que menos de aproximadamente un 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3%, 2 % y 1 % de la hemoglobina se convierta en metahemoglobina, en comparación con una disolución de hemoglobina purificada exenta de antioxidante. Como alternativa, el nivel de enzimas antioxidantes en el filtrado después del medio de filtración será tal que evite que menos de aproximadamente 50 % a aproximadamente 5 %, de aproximadamente 20 % a aproximadamente 1 %, de aproximadamente 10 % a aproximadamente 1 % o de aproximadamente 5% a menos de 1 % de la hemoglobina se convierta en metahemoglobina, en comparación con una disolución de hemoglobina purificada exenta de antioxidante.

40 **[0036]** De forma similar, la presencia de formación de ferrilhemoglobina después del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> del filtrado de la presente invención puede detectarse espectrofotométricamente después de la adición de Na<sub>2</sub>S, que da como resultado la posterior formación de sulfohemoglobina. Un pico marcado a 620 nm caracteriza esta especie de hemoglobina. El nivel de enzimas antioxidantes en el filtrado después del medio de filtración será tal que evite que menos de aproximadamente un 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % y 1 % de la hemoglobina se convierta en sulfohemoglobina, en comparación con una disolución de hemoglobina purificada exenta de antioxidante. Como alternativa, el nivel de enzimas antioxidantes en el filtrado después del medio de filtración será tal que evite que menos de aproximadamente 50 % a aproximadamente 5 %, de aproximadamente 20 % a aproximadamente 1 %, de aproximadamente 10 % a aproximadamente 1 % o de aproximadamente 5 % a menos de 1 % de la hemoglobina se convierta en sulfohemoglobina, en comparación con una disolución de hemoglobina purificada exenta de antioxidante. Dichos procedimientos para ensayar el nivel de actividad enzimática antioxidante se describen con detalle en Privalle *et al.* (2000) Free Rad. Biol. Med. 28: 1507-1517.

#### 60 1. El proceso

65 **[0037]** Como se describe anteriormente, la presente invención indicada en las reivindicaciones proporciona un procedimiento de preparación de una disolución de hemoglobina modificada químicamente que comprende: (a) poner en contacto una disolución de hemoglobina exenta de estroma con al menos un medio de filtración que

comprende un filtro de corte de peso molecular 500.000, reteniendo dicho medio de filtración las partículas víricas y permitiendo el paso de un filtrado que comprende hemoglobina y enzimas antioxidantes endógenas, y estando el filtrado sustancialmente exento de contaminación vírica; (b) modificar químicamente el filtrado de la etapa (a) con un agente; y (c) aislar la disolución de hemoglobina modificada químicamente y enzimas antioxidantes endógenas, reteniendo al menos un antioxidante endógeno la actividad enzimática.

#### A. Aislamiento de hemoglobina exenta de estroma:

**[0038]** El material de partida preferido en el proceso de la presente invención es sangre humana caducada. Sin embargo, todos los procedimientos de la presente invención pueden usarse con otra sangre de mamífero (concretamente, bovina, porcina, ovina) con solo modificaciones menores que están dentro de las habilidades del especialista en la materia. Preferiblemente, la sangre usada en los procedimientos de la invención es sangre de no más de 8 semanas después de la fecha de caducidad en la bolsa. Se lavan los eritrocitos concentrados para retirar los componentes plasmáticos. Se ponen en contacto posteriormente los eritrocitos lavados con una disolución hipotónica. Da como resultado la liberación de hemoglobina y enzima antioxidante endógena. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 4.412.989 y 5.264.555. Otros procedimientos para el aislamiento de disolución de hemoglobina exenta de estroma incluyen la desestabilización de los eritrocitos mediante degradación mecánica. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.296.465.

**[0039]** Se prepara una hemoglobina exenta de estroma a partir de eritrocitos lisados. Como se define en la presente memoria, "hemoglobina exenta de estroma" es una disolución de hemoglobina y enzimas antioxidantes con un nivel reducido de contaminantes estromales incluyendo, por ejemplo, ADN, fosfolípidos, antígenos de grupo sanguíneo residuales y proteínas séricas. El nivel de contaminantes de estroma eritrocítico contaminante en la hemoglobina exenta de estroma se reduce al menos aproximadamente un 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más.

**[0040]** Puede usarse en los procedimientos de la presente invención cualquier procedimiento que retire los componentes estromales de la hemoglobina pero no retire las proteínas antioxidantes ni agote la actividad enzimática antioxidante. Por ejemplo, la disolución eritrocítica lisada puede clarificarse mediante paso a través de una unidad de filtrado de acetato de celulosa de 0,1 µm o 0,2 µm, tales como aquellas fabricadas por Sartorius. Como alternativa, puede usarse una membrana de lámina plana de flujo tangencial (TFF) de 0,45 µm, 0,2 µm o 0,1 µm con canales abiertos que permitan fluir libremente los eritrocitos (tales como membrana de canal biplanar Supor de Pall Filtron o membrana de canal abierto Sartorius); o una membrana de fibra hueca o TFF de 0,45 µm a 0,1 µm. Pueden usarse también otros filtros de estos tamaños de poro hechos de PVDF o polietersulfona, por ejemplo aquellos fabricados por Pall, Millipore y Sartorius. Como alternativa, puede efectuarse un lavado en una membrana de 0,65 µm, 0,45 µm o 0,2 µm (fibra hueca o TFF) y la purificación de hemoglobina se lleva a cabo en una membrana de 0,1 µm.

#### B. Purificación de hemoglobina exenta de estroma

**[0041]** Se pone en contacto a continuación la disolución de hemoglobina exenta de estroma con un "medio de filtración". Como se discutió anteriormente, el medio de filtración es una membrana de ultrafiltración que retiene las partículas víricas y permite el paso de un ultrafiltrado que comprende hemoglobina y enzimas antioxidantes endógenas. El ultrafiltrado se caracteriza por retener la actividad de al menos una enzima antioxidante endógena y por tener una reducción significativa de la carga vírica.

**[0042]** Se reconoce que la retención de virus y proteínas difiere entre membranas de fabricante a fabricante. Por tanto, puede usarse en los procedimientos de la presente invención cualquier medio de ultrafiltración que produzca un ultrafiltrado que esté sustancialmente exento de contaminación vírica y contenga polipéptidos antioxidantes endógenos enzimáticamente activos. Por ejemplo, la hemoglobina exenta de estroma puede pasarse a través de una membrana de polisulfona de corte de peso molecular 500.000 con un diámetro de lumen de 1 mm (AG-Technology). El diámetro de lumen de esta membrana puede variar en los procedimientos de la invención.

**[0043]** Podrían usarse también membranas de otros fabricantes en modo TFF como medio de filtración en los procedimientos de la invención. La memoria descriptiva describe procedimientos que usan una membrana de tamaño de poro intermedio tal como la membrana de corte de peso molecular 150.000 de Pall Filtron, o incluso membranas de otros fabricantes tales como la membrana de corte de peso molecular 100.000 de Sartorius, en la etapa de ultrafiltración. Ahora que la presente invención ha demostrado que puede usarse un medio de filtración para preparar una disolución de hemoglobina modificada sustancialmente exenta de virus que retiene actividad antioxidante, está dentro de las habilidades del especialista en la materia identificar otros medios de ultrafiltración y condiciones operativas (concretamente, caudal, presión transmembrana y flujo transversal) que optimicen el paso de hemoglobina y enzima antioxidante y reduzcan significativamente la contaminación vírica. Se describen en la presente memoria ejemplos de ensayos de antioxidantes y actividad vírica.

**[0044]** Se reconoce adicionalmente que un "segundo medio de filtración" puede encontrar uso en los

procedimientos de la presente invención. La segunda etapa de filtración comprende una filtración frontal que da como resultado una reducción adicional del nivel de partículas víricas activas y sigue permitiendo el paso de hemoglobina y enzimas antioxidantes endógenas. Una reducción del nivel de partículas víricas activas usando el segundo medio de filtración abarca una reducción de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más unidades logarítmicas medida por UFP o TCID<sub>50</sub>. Puede usarse cualquier medio de filtración frontal para la segunda etapa de filtración en los procedimientos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, puede pasarse la hemoglobina exenta de estroma purificada a través de un filtro de cartucho, tal como un Pall DV-50 o DV-20. Otras membranas de interés para esta etapa de filtración suplementaria incluyen el filtro Viresolve NFR de Millipore.

**[0045]** Se concentra el filtrado aislado del segundo medio de filtración para conseguir la concentración de hemoglobina deseada. Puede usarse una membrana de serie Omega T-screen de corte de peso molecular 10.000 de Pall Filtron en esta etapa. Sin embargo, podrían usarse también otras membranas siempre que el tamaño de poro sea suficientemente pequeño para evitar el paso de hemoglobina y enzimas tales como superóxido dismutasa. Son ejemplos las membranas TFF Biomax 5.000 o 10.000 de Millipore; las membranas TFF 10.000 de Sartorius y las membranas de fibra hueca 5.000 de AG Technology. Se lava la disolución con tampón para retirar los contaminantes de pequeño peso molecular minimizando el paso de hemoglobina y enzima. Se diluye la disolución concentrada con tampón y se filtra a través de un filtro de 0,2 µm. Se obtiene hemoglobina exenta de estroma purificada lista para modificación química.

#### C. Modificación química del ultrafiltrado:

**[0046]** La hemoglobina es un tetrámero con dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$ . Cuando se purifica, la hemoglobina no modificada se infunde al cuerpo y el tetrámero ( $\alpha_1\beta_1\alpha_2\beta_2$ ) se degrada en dímeros tóxicos ( $\alpha_1\beta_1$  y  $\alpha_2\beta_2$ ), que se filtran rápidamente por los riñones a los túbulos renales, donde las altas concentraciones se vuelven tóxicas. Por lo tanto, la forma "no modificada" nativa de la hemoglobina es demasiado tóxica para usarse como sustituto de la sangre, y por ello se han desarrollado procedimientos para modificar la molécula de hemoglobina y reducir su toxicidad. La molécula de hemoglobina contiene grupos amino reactivos. La modificación química de estos grupos amino reactivos da como resultado una hemoglobina modificada químicamente. Por ello, la disolución sustancialmente exenta de virus que comprende hemoglobina y enzimas antioxidantes endógenas producida mediante los procedimientos descritos anteriormente puede modificarse posteriormente produciendo una disolución de hemoglobina modificada.

**[0047]** Como se usa en la presente memoria "modificar químicamente" el ultrafiltrado abarca cualquier modificación estructural de la hemoglobina y/o moléculas antioxidantes que altere la forma, tamaño, función o cualquier característica física de los polipéptidos. Las modificaciones químicas útiles en los procedimientos de la presente invención incluyen, por ejemplo, reticulación o conjugación usando cualquier agente y procedimiento conocido en la materia. Se pretende por conjugación la unión de polímeros solubles tanto a hemoglobina como a enzimas antioxidantes endógenas. Los agentes de conjugación usados en la presente invención pueden ser monofuncionales o bifuncionales e incluir, por ejemplo, polímeros solubles tales como dextrano, inulina, polioxi-etileno y polietilenglicol (PEG).

**[0048]** Se pretende por reticulación el uso de un agente bifuncional que forme ligamientos intermoleculares o intramoleculares. Por ello, una modificación reticulante puede dar como resultado ligamientos intermoleculares entre las enzimas antioxidantes endógenas y las subunidades de hemoglobina. La reticulación puede comprender adicionalmente el establecimiento de ligamientos intramoleculares entre dímeros de hemoglobina. Una reticulación intramolecular no cambia el tamaño molecular del tetrámero de hemoglobina ni de la enzima antioxidante, mientras que un evento de reticulación intermolecular da como resultado la polimerización o anclaje de polipéptidos y un peso molecular aumentado.

**[0049]** Por ello, una disolución que comprende la "hemoglobina modificada" de la presente invención puede comprender cualquier combinación de los siguientes complejos modificados:

(a) productos reticulados intermoleculares, incluyendo:

antioxidante:antioxidante

hemoglobina:hemoglobina

antioxidante: hemoglobina

(b) productos reticulados intramoleculares, incluyendo:

hemoglobina  $\alpha_1\beta_1$ :hemoglobina  $\alpha_2\beta_2$

(c) productos conjugados, incluyendo:



hemoglobina:polímero soluble

antioxidante:polímero soluble

5 hemoglobina:antioxidante:polímero soluble.

**[0050]** Son conocidos en la técnica agentes y procedimientos para la generación de una disolución que comprende cualquiera de los complejos modificados anteriores o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, pueden usarse agentes bifuncionales no específicos para reticular los grupos amino reactivos de hemoglobina y enzimas antioxidantes, produciendo una disolución que comprende complejo de hemoglobina polimerizada modificada químicamente y enzima antioxidante. En la preparación de dicho complejo, puede usarse cualquier agente que se haya reseñado anteriormente que establece una reticulación intermolecular entre dos polipéptidos. Dichos agentes bifuncionales no específicos incluyen, por ejemplo, cloruro de sebacilo (Chang y col. (1964) Science 146: 524-525 y Chang y col. (1972) Artificial Cells), glutaraldehído (Chang y col. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 44: 1531-1533; la patente de EE.UU. 5.194.590), derivados de diasprina (patente de EE.UU. 4.529.719), polialdehidos y polímeros bifuncionales.

**[0051]** En una realización de la presente invención, el agente reticulante/conjugador bifuncional es diéster hidroxisuccinimidílico de  $\alpha$ -carboximeti- $\varphi$ -carboximetoxipolioxietileno (POE). El uso de este agente reticulante particular se discute con más detalle en la sección experimental y en Iwashita y col. (1995) "Artificial Red Blood Cells" John Wiley & Sons y en las patentes de EE.UU. nº 4.301.144, 4.412.989 y 4.670.417. Otros reactivos bifuncionales incluyen, por ejemplo, polímeros activados tales como otros derivados de PEG, inulina o dextrano. Además, puede usarse una combinación de derivados de PEG bifuncionales y derivados de PEG monofuncionales para lograr la distribución de peso molecular deseada de la hemoglobina modificada.

**[0052]** Como alternativa, puede usarse la tecnología de enlace nulo para formar un complejo reticulado. La tecnología de enlace nulo implica la activación de grupos COOH sobre la superficie de un polipéptido seguido de reacción con un grupo NH<sub>2</sub> disponible sobre la superficie de moléculas de hemoglobina o antioxidante adyacentes. Véase por ejemplo la patente de EE.UU. nº 5.998.361.

**[0053]** Se entiende en la materia que alterar los parámetros específicos de los protocolos de modificación química puede controlar el nivel de modificación química. El grado de modificación química deseado será aquel que produzca una disolución de hemoglobina modificada que no produzca efectos fisiopatológicos implicados con la administración intravenosa de disoluciones de hemoglobina no modificada (concretamente, vasoconstricción, toxicidad renal, hemoglobinuria, etc.). Adicionalmente, el nivel de modificación química optimizará la semivida de la hemoglobina modificada y los polipéptidos antioxidantes y el valor P<sub>50</sub> de la hemoglobina. Se pretende por "semivida" el periodo de tiempo después de la administración en que la concentración del polipéptido cae a la mitad de sus niveles iniciales. El término P<sub>50</sub> está reconocido en la materia para describir la interacción entre oxígeno y hemoglobina y representa la presión parcial de O<sub>2</sub> a un 50 % de saturación de hemoglobina. Esta interacción se representa frecuentemente como una curva de disociación de O<sub>2</sub> con el % de saturación de hemoglobina representado frente a mm de Hg o torr.

**[0054]** Puede usarse cualquiera de los procedimientos *in vitro* discutidos anteriormente para determinar el nivel de actividad antioxidante en la disolución de hemoglobina modificada químicamente final. Además, la presencia de actividad antioxidante en el producto modificado final de la presente invención puede ensayarse también *in vivo*. Por ejemplo, puede usarse un modelo de rata de reperusión por isquemia intestinal *in vivo*. Después de un evento isquémico intestinal, la disolución de hemoglobina que comprende un producto de hemoglobina/antioxidante de la invención puede perfundirse sin recirculación. Pueden recogerse muestras de efluente de vena porta y puede determinarse la generación de radicales libres, ensayada mediante la hidroxilación de 4-hidroxibenzoato a 3,4-dihidroxibenzoato (3,4-DHBA) usando detección electroquímica (D'Agnillo y col. (1998) Nature Biotechnology 16: 667-671).

**[0055]** Por ello, el medio de filtración usado en los procedimientos de la presente invención da como resultado una hemoglobina modificada químicamente que contiene aproximadamente un aumento de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 %, 200 %, 250 % o más de actividad antioxidante endógena por unidad de hemoglobina encontrada en eritrocitos. Como alternativa, la disolución de hemoglobina modificada químicamente puede comprender aproximadamente un aumento de 10 %-40 %, 40 %-80 %, 80 %-120 %, 120 %-160 %, 160 %-200 %, 200 %-250 %, o como alternativa 50 %-200 %, de actividad antioxidante por unidad de hemoglobina encontrada en eritrocitos. Este aumento de la actividad antioxidante puede reflejar una actividad aumentada de una sola enzima antioxidante (concretamente, SOD, glutatión, peroxidasa, etc.) o, como alternativa, el aumento puede reflejar una elevación global de la actividad antioxidante.

**[0056]** El nivel de actividad antioxidante en el producto de hemoglobina modificada final será tal que evite que menos de aproximadamente un 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % y 1 %

de la hemoglobina se convierta en ferrilhemoglobina y/o metahemoglobina, en comparación con una disolución de hemoglobina modificada que carezca de enzimas antioxidantes. Como alternativa, el nivel de enzimas antioxidantes en el producto de hemoglobina modificada final será tal que evite que menos de aproximadamente 50 % a aproximadamente 5 %, de aproximadamente 20 % a aproximadamente 1 %, de aproximadamente 10 % a aproximadamente 1 % o de aproximadamente 5 % a menos de aproximadamente 1 % de la hemoglobina se convierta en ferrilhemoglobina y/o metahemoglobina, en comparación con una disolución de hemoglobina modificada que carezca de enzimas antioxidantes.

**[0057]** Se reconoce adicionalmente que puede usarse un segundo agente modificador para establecer reticulaciones intermoleculares en el tetrámero de hemoglobina, tal como bis-(*N*-maleimidometil)éter y fumarato de bis-(3,5-dibromosalicilo). Véanse, por ejemplo, Bunn y col. (1969) *J. Exp. Med.* 129: 909-924 y Walder y col. (1979) *Biochemistry* 18: 4265-4270.

**[0058]** Dependiendo de la fuente de eritrocitos, puede ser deseable derivatizar en la hendidura  $\beta$  de la molécula de hemoglobina con 5'-fosfato de piridoxal (PLP) antes del procedimiento de modificación química discutido anteriormente. Los procedimientos de piridoxilación aumentan la  $P_{50}$  del complejo y son comúnmente conocidos por el especialista en la materia. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.194.590. La modificación de la hendidura beta puede conseguirse también usando el dialdehído o-rafinosa. Véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 4.857.636 y Adamson y col. (1998) "Blood Substitutes: Principles, Methods, Products, and Clinical Trials" vol II 62-79.

**[0059]** Adicionalmente, se reconoce que la modificación química y derivatización en la hendidura  $\beta$  discutidas anteriormente pueden llevarse a cabo en condiciones desoxigenadas. Un procedimiento de desoxigenación comprende el burbujeo continuo de gas  $N_2$  durante la reacción de modificación. Están disponibles varias otras técnicas en la materia para la desoxigenación y reoxigenación de disoluciones de hemoglobina incluyendo, por ejemplo, intercambios de membrana como Liqui-cell de Hoechst Celanese y técnicas de capa fina para intercambio de gas a contracorriente.

**[0060]** La hemoglobina modificada químicamente preparada mediante los procedimientos de la presente invención puede encapsularse dentro de una célula artificial. Dichos procedimientos son conocidos en la materia e incluyen, por ejemplo, encapsulación en eritrocitos artificiales con membranas artificiales, eritrocitos artificiales de membrana lipídica pequeña preparados usando liposomas de membrana lipídica y nanocápsulas de hemoglobina de polímero biodegradable (concretamente, encapsulación en poli(ácido láctico)). Véanse, por ejemplo, Chang y col. (1988) *Biomater. Artif. Cells Artif. Organs* 16:1-9; Chang y col. (1968) *Nature* 218: 242-245; Rudolph y col. (1998) "Blood substitutes: Principles, Methods, Products, and Clinical Trials" (vol II) 197-205 y Tsuchida y col. (1995) "Artificial Red Cells", John Wiley & Sons.

#### D. Aislamiento y formulación del complejo de hemoglobina modificada/antioxidante

**[0061]** Después del proceso de modificación química, puede aislarse la disolución de hemoglobina/antioxidante mediante cualquier procedimiento conocido en la materia, a condición de que la actividad antioxidante no se destruya. Dichos procedimientos pueden incluir, por ejemplo, cromatografía o filtración. Por ejemplo, la disolución de hemoglobina conjugada puede aislarse por diafiltración usando una membrana de serie Omega T-screen de corte de peso molecular 100.000 TFF de Pall-Filtron. Pueden usarse en la etapa de aislamiento otras membranas de peso molecular 100.000 de otros fabricantes en la etapa de aislamiento. Puede usarse una membrana de tamaño de poro menor, tal como una membrana de corte de peso molecular 85.000 o 70.000 de Pall-Filtron, si el proceso de lavado se modifica. En consecuencia, la disolución se lava posteriormente con agua purificada o un tampón adecuado para retirar los reactantes residuales y para reducir el contenido de hemoglobina no modificada.

**[0062]** Se elimina la disolución de hemoglobina modificada lavada de las membranas y se formula en agua o PlasmaLyte A. Se añaden electrolitos para hacer la disolución isoosmótica en comparación con la sangre. Como alternativa, la disolución puede formularse mediante diafiltración frente al tampón de formulación final. Da como resultado una disolución de hemoglobina modificada sustancialmente exenta de virus que comprende un complejo de hemoglobina:antioxidante conjugado.

**[0063]** La hemoglobina modificada puede liofilizarse también, formando una preparación para uso como fármaco. Aunque las enzimas antioxidantes presentes en el complejo modificado servirán probablemente como agentes estabilizantes e inhibirán la producción de metahemoglobina y material insoluble, pueden añadirse otros agentes comúnmente usados en la materia. Dichos compuestos incluyen sulfito de sodio, bisulfito de sodio, sulfato de hierro (II) y compuestos amino tales como EDTA y sales de los mismos. Se usan también como agentes estabilizantes eficaces monosacáridos tales como D-galactosa y D-glucosa, disacáridos tales como sacarosa, maltosa y lactosa y aminoácidos. Pueden encontrarse procedimientos para preparaciones liofilizadas de disoluciones de hemoglobina modificada, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 4.670.417.

**[0064]** En una realización, se usan los procedimientos de la presente invención para la síntesis de PHP, como se indica en las reivindicaciones. La PHP sintetizada mediante los procedimientos descritos anteriormente está sustancialmente exenta de virus y comprende hemoglobina reticulada covalentemente con enzimas antioxidantes endógenas enzimáticamente activas. La PHP sintetizada mediante estos procedimientos contiene un perfil antioxidante similar al de eritrocitos intactos. La PHP contiene típicamente más de 90 % de actividad catalasa y SOD por unidad de hemoglobina encontrada en RBC. Los antioxidantes endógenos que permanecen asociados a la hemoglobina modificada en la PHP pueden atenuar la actividad rédox, reducir el potencial prooxidante y mejorar las propiedades secuestrantes de óxido nítrico de la hemoglobina modificada. Por tanto, la PHP modificada puede tener efectos beneficios en el tratamiento de ciertos estados patológicos.

**[0065]** Se proporcionan procedimientos de síntesis y caracterización de PHP en la sección experimental. Pueden encontrarse detalles adicionales que describen el proceso de síntesis de caracterización, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 4.301.144, 4.421.989, 4.670.417; Iwashita y col. (1995) "Artificial Red Blood Cells" John Wiley & Sons; Talarico y col. (2000) Biochimica 1476: 53-65 y Privalle y col. (2000) Free Rad. Biol. Med. 28: 1507-1517.

## II. Procedimientos de uso

**[0066]** La presente solicitud describe adicionalmente procedimientos para usar la hemoglobina modificada de la invención para tratamiento médico mediante administración intravenosa a un mamífero necesitado de dicho tratamiento de una cantidad terapéuticamente eficaz de la hemoglobina modificada junto con un portador no tóxico farmacéuticamente aceptable. Se reconoce que la cantidad farmacéuticamente eficaz varía en relación con la terapia deseada para la enfermedad o afección médica particular que se esté tratando. Se reconoce adicionalmente que los parámetros de dosificación típicos variarán también dependiendo, por ejemplo, del peso corporal del paciente. Resultará evidente para un especialista en la materia cómo seleccionar una cantidad de dosificación en cualquier situación dada. Pueden encontrarse generalmente técnicas y formulaciones para administrar las composiciones que comprenden la hemoglobina modificada en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Meade Publishing Col., Easton, Pa., última edición.

**[0067]** Las disoluciones de hemoglobina modificada de la presente invención pueden utilizarse, por ejemplo, en el tratamiento de traumatismo, infarto de miocardio, apoplejía, anemia aguda y trastornos de deficiencia de oxígeno tales como hipoxemia o hipoxia debida a disfunción o fallo del pulmón para oxigenar totalmente la sangre. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.733.896 y 6.090.779. Además, la hemoglobina modificada de la presente invención puede usarse como sustituto de la sangre y expansor de la sangre. Por ello, como expansor de la sangre, la disolución de hemoglobina modificada encuentra uso en el alivio de choque anafiláctico y alérgico, el reemplazo de plasma perdido después de quemaduras y en choque hipovolémico. La disolución de hemoglobina modificada de la presente invención encuentra uso adicional en el reemplazo de sangre perdida que ocurre durante hemorragia aguda, durante operaciones quirúrgicas, en procedimientos de resucitación después de una pérdida de sangre accidental, para suministrar oxígeno y generalmente para mantener el volumen sanguíneo en afecciones relacionadas. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.905.141. Adicionalmente, el sustituto de la sangre de la presente invención puede usarse como disolución de intercambio de oxígeno artificial en oxigenadores convencionales.

**[0068]** En una realización, se usa la disolución de hemoglobina modificada descrita en la presente memoria para el tratamiento de hipotensión sistémica o choque séptico inducido por la producción de óxido nítrico interno. Dicha producción de óxido nítrico interno puede ser el resultado del tratamiento de un animal con una citocina, como en el caso de hipotensión sistémica. Como alternativa, la hemoglobina modificada puede usarse para el tratamiento de hipotensión sistémica en un paciente inducida por tratamiento quimioterapéutico. En choque séptico, la producción de óxido nítrico es el resultado de la exposición de un animal a una endotoxina bacteriana. Puede encontrarse también que endotoxinas producidas por bacterias, virus u hongos inducen directa o indirectamente la sobreproducción de NO mitigable mediante la administración de la hemoglobina modificada de la presente invención. En una realización, la hemoglobina se administra por vía intravascular. La disolución de hemoglobina modificada de la presente invención puede usarse también para el tratamiento de choque de SIRS y artritis reumatoide. La cantidad de hemoglobina modificada administrada, la cantidad terapéuticamente eficaz, es una cantidad suficiente para unirse al óxido nítrico en exceso presente, retirando por tanto el óxido nítrico libre de la circulación. Dicha cantidad eficaz puede determinarse por un especialista en la materia. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.674.836, 5.296.466, 5.612.310 y Bone y col. (1998) J. Appl. Physiol. 84: 1991-1998, Kilbourn y col. (1997) "The Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine", Berlín: Springer-Verlag 230-239 y Bone y col. (1997) Crit. Care Med. 25: 1010-1018.

**[0069]** La hemoglobina modificada descrita en la presente memoria puede mezclarse con un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, tampones fisiológicamente compatibles como disolución de Hank o Ringer, disolución salina fisiológica, una mezcla consistente en disolución salina y glucosa, disolución de citrato de sodio-ácido cítrico-dextrosa heparinizada y similares. La hemoglobina para uso en los procedimientos descritos en la presente memoria puede mezclarse con sustitutos del plasma de tipo coloidal y expansores del plasma tales como polisacáridos lineales (por ejemplo dextrano),

hidroxietilalmidón, gelatina fluida equilibrada y otras proteínas plasmáticas. Adicionalmente, la hemoglobina modificada puede mezclarse con sustitutos del plasma poliméricos hidrosolubles y fisiológicamente aceptables, cuyos ejemplos incluyen polivinilalcohol, poli(óxido de etileno), polivinilpirrolidona y condensados de óxido de etileno-polipropilenglicol y similares.

5

## SECCIÓN EXPERIMENTAL

### Ejemplo 1: Aislamiento de una disolución de hemoglobina/antioxidante sustancialmente exenta de virus

10 *A. Aislamiento de hemoglobina exenta de estroma:*

**[0070]** Antes del procesamiento, se combinan asépticamente eritrocitos en un recipiente de proceso esterilizado y se muestrean para análisis de pH, concentración de hemoglobina y contenido de metahemoglobina. Antes de liberar para procesamiento adicional, se satisfacen los criterios expuestos en la Tabla 1.

15

**Tabla 1**

Especificaciones en el proceso para eritrocitos combinados		
Prueba	Procedimiento	Especificación
pH	pH-metro	6,0-7,0
Concentración de hemoglobina	Cooxímetro	>150 mg/ml
Contenido de metahemoglobina	Cooxímetro	< 3%

20 **[0071]** Se diluyen eritrocitos 2 veces con tampón fosfato de sodio 50 mM/tampón cloruro de sodio 150 mM a pH 7,4 (tampón A). Se diafiltran los eritrocitos diluidos con 7 volúmenes del mismo tampón en la membrana. Se concentran los eritrocitos al 70 % de su volumen original y se añade agua para reducir la osmolaridad de la disolución. Se libera la hemoglobina de los eritrocitos lavando las células con 3 volúmenes de agua. Se clarifica la disolución de hemoglobina por pasada a través de una unidad de filtrado de acetato de celulosa 0,1 µm (Sartorius), dando como resultado hemoglobina exenta de estroma (SFH).

25

*B. Ultrafiltración de hemoglobina exenta de estroma:*

30 **[0072]** Se pasa hemoglobina exenta de estroma a través de una membrana de corte de peso molecular 500.000 (AG Technology, membrana de polisulfona de corte de peso molecular 500.000 con diámetro de lumen de 1 mm) para retirar los fragmentos de membrana de eritrocito residuales y partículas víricas (véanse los estudios de retirada e inactivación víricas del Ejemplo 4). Los parámetros preferidos para la etapa de ultrafiltración incluyen un caudal flujo transversal de 0,0014 a 0,0022 l/min/cm<sup>2</sup> y una presión de entrada de 184 a 212 kPa y una TMP de 143 a 163 kPa.

35 **[0073]** Se concentra la disolución y se lava a un volumen de aproximadamente un 25 % del volumen de partida. Se efectúa el lavado con tampón A. Típicamente, se usan de 1 a 3 volúmenes de tampón A. Se elige el volumen usado para proporcionar una recuperación aceptable de hemoglobina y enzimas de hemoglobina exenta de estroma.

40 **[0074]** Puede usarse una segunda etapa de filtración como etapa de retirada de virus suplementaria. Se pasa el ultrafiltrado a través de un filtro de cartucho Pall DV-50 o DV-20, que es eficaz para permitir el paso de hemoglobina y enzimas. Como alternativa, puede usarse un filtro Viresolve NFR de Millipore. Típicamente, se filtra la disolución aplicando una presión al fluido de 239 a 446 kPa. El caudal del filtrado depende de la presión y el filtro usados. El ultrafiltrado resultante tiene una carga vírica reducida.

45

50 **[0075]** La hemoglobina exenta de estroma purificada es el material de partida para la modificación química y debe satisfacer las especificaciones en el proceso para pH, conductividad y concentración de hemoglobina para asegurar parámetros óptimos para el procesamiento posterior. Debe poseer un bajo contenido de endotoxina y una contaminación microbiana mínima. Su pureza se monitoriza mediante la detección de contaminantes tales como antígenos de grupo sanguíneo residuales, proteínas séricas y fosfolípidos. Se valora la integridad de la hemoglobina analizando el contenido de metahemoglobina y P<sub>50</sub>. Se muestran las especificaciones para cada uno de estos análisis en la Tabla 2.

55 **[0076]** Se concentra la hemoglobina exenta de estroma purificada y se diafiltra en una membrana de polisulfona de 10.000. Específicamente, se usa una membrana de la serie Omega T-screen de corte de peso molecular 10.000 de Pall Filtron hasta alcanzar una concentración de hemoglobina de 100 mg/ml. Se lava la disolución con 3 volúmenes de tampón A para retirar los contaminantes de bajo peso molecular. Se minimiza el paso de hemoglobina y enzima. Se diluye la disolución concentrada a 60 mg/ml con tampón A y se filtra a través de un filtro de 0,2 µm. Se obtiene hemoglobina exenta de estroma purificada lista para modificación química.

60

Tabla 2

Especificaciones en el proceso para hemoglobina exenta de estroma purificada		
Prueba	Procedimiento de análisis	Especificación
pH	pH-metro	7,4 ± 0,5
Conductividad	Conductivímetro	10-17 mS/cm
Concentración de hemoglobina	Cooxímetro	55-65 mg/ml
Contenido de metahemoglobina	Cooxímetro	< 5 %
P <sub>50</sub>	Hemox	1,20-1,87 kPa
Contenido de sulfohemoglobina	Espectrofotométrico	< 3 %
Endotoxina	LAL	< 1,00 UE/ml
Proteínas séricas residuales	Transferencia Western o ELISA	< 1,0 % de HAS < 0,3 % de IgG
Fosfatidiletanolamina	HPLC	< 1 ppm
Sustancia de grupo sanguíneo residual	inmunoprecipitación	No detectable

**Ejemplo 2: Producción de PHP**

**[0077]** Se llevan a cabo todas las operaciones para la síntesis de PHP a 10 °C. En primer lugar, se derivatiza la hemoglobina en la hendidura β con 5-fosfato de piridoxal y se modifican los polipéptidos con polioxietileno. Se desoxigena la hemoglobina exenta de estroma purificada burbujeando nitrógeno a través de la disolución. Se añade *N*-octanol a la disolución (aproximadamente 0,3 ml por l de disolución de hemoglobina) como agente antiespumante. Se añaden 16 g de 5-fosfato de piridoxal por kg de hemoglobina presente y se deja reaccionar durante 30 minutos. Se añaden 11,8 g de borohidruro de sodio por kg de hemoglobina y se deja reaccionar durante 30 minutos. Se añaden 11,6 g de glicina por kg de hemoglobina. Se ajusta el pH de la disolución a 8 con ácido fosfórico. Se añade un exceso de aproximadamente 10 x molar de polioxietileno (en comparación con hemoglobina) a la disolución y se deja reaccionar durante 20 minutos.

**[0078]** A continuación, se ajusta el pH de la disolución a 7,5 con hidróxido de sodio 1 N y se deja reposar la disolución durante 20 minutos adicionales. Se añaden 1,2 g de borohidruro de sodio por kg de hemoglobina y se deja reaccionar durante 20 minutos. Se reoxigena entonces la disolución burbujeando oxígeno a través de la disolución. Se retiran las partículas de la disolución mediante filtración a través de una serie de filtros que terminan con un filtro de 0,2 μm. Durante este proceso, ocurre la inactivación química de los virus con cubierta.

**[0079]** Se concentra la hemoglobina modificada químicamente 4 veces a aproximadamente 100 mg/ml de hemoglobina en una membrana de la serie Omega T-screen de corte de peso molecular 100.000 TFF de Pall-Filtron. Se lava la disolución con 10 volúmenes de agua purificada para retirar los reactantes residuales y para reducir el contenido de hemoglobina no modificada. Se elimina la disolución lavada de la membrana y se diluye a 80 mg/ml de hemoglobina.

**[0080]** Para asegurar la eficacia y uniformidad del producto final, la disolución de polioxietilhemoglobina piridoxalada (PPHb) debe estar exenta de contaminantes, como se determina ensayando la biocarga, endotoxina y POE libre. Se monitoriza el estado físico del producto ensayando el pH y conductividad de la disolución y las concentraciones de hemoglobina, metahemoglobina y sulfohemoglobina. Se determina la consistencia del proceso de modificación química analizando el peso molecular, P<sub>50</sub> y polidispersidad (DCT) de la PPHb. La Tabla 3 enumera las especificaciones para la disolución de PHP no formulada bruta final.

Tabla 3

Características de la disolución de PPHb		
Prueba	Procedimiento	Especificación
pH	pH-metro	8,0 ± 0,5
Conductividad	Conductivímetro	0,5-2,0 mS/cm
Concentración de hemoglobina	Cooxímetro	90-120 mg/ml
Contenido de metahemoglobina	Cooxímetro	< 7 %
Contenido de sulfohemoglobina	Espectrofotométrico	< 3 %
P <sub>50</sub>	Hemox	2-3,3 kPa
Peso molecular	HPLC	75-126 kDa
DCT	HPLC	> 80 %
POE libre	Espectrofotométrico	< 2,2 mg/ml
Endotoxina	LAL	< 1 UE/ml

**[0081]** Se añaden electrolitos a la disolución de PPHb descrita anteriormente y se ajusta la concentración de hemoglobina al 8 % para conseguir la forma de dosificación final de PHP. Se esteriliza por filtración la disolución

formulada a través de un filtro de 0,1 µm y se rellena en envases de producto.

**[0082]** Se monitoriza la calidad del producto final valorando esterilidad, seguridad general, contenido de pirógenos y contenido de fosfatidiletanolamina. Se valora la integridad de la hemoglobina midiendo P<sub>50</sub>, concentración de hemoglobina, contenido de metahemoglobina, peso molecular y DCT de la PHP. Se valora el estado físico del producto midiendo pH y osmolalidad del producto final. Se muestran las diversas características químicas y físicas del producto de PHP final en las Tablas 4 y 5.

**[0083]** Se añaden electrolitos para hacer la disolución isoosmótica en comparación con la sangre, una disolución sustancialmente exenta de virus isoosmótica en comparación con la sangre. Da como resultado una disolución sustancialmente exenta de virus que comprende hemoglobina piridoxalada con polioxietileno (PHP). Se describen con detalle las propiedades físicas y características estructurales de PHP, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 4.301.144, 4.412.989, 4.670.417; Iwashita y col. (1995) "Artificial Red Blood Cell", John Wiley & Sons; Talarico y col. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1476: 53-65.

**Tabla 4**

<b>Características del conjugado de hemoglobina piridoxalada-polioxietileno (PHP)</b>		
<b>Prueba</b>	<b>Ensayo</b>	<b>Especificaciones</b>
Apariencia	Inspección visual	Disolución rojo oscuro
pH a 20 °C ± 2 °C	USP	7,5 ± 0,5
Osmolalidad (mmol/kg)	Osmómetro	240-300
P <sub>50</sub> (kPa)	HEMOX	2,67 ± 0,67
Met-Hb (%)	Cooxímetro	< 15,0
DCT (%)	HPLC	> 80
Peso molecular (kDa)	HPLC	75-126
Concentración total de Hb (mg/ml)	Cooxímetro	80 ± 8,0
Fosfatidiletanolamina (ppm)	HPLC	< 1
Esterilidad	USP	Estéril
Prueba de seguridad general	USP	Pasada
Pirógeno	USP	Pasada
Endotoxina (UE/ml)	USP (LAL)	< 1,0

**Tabla 5**

<b>Características adicionales de la PHP</b>	
<b>Procedimiento de prueba</b>	<b>Media ± DE</b>
Sulfohemoglobina (%)	0,75 ± 0,27
Hierro libre (ppm)	2,5 ± 0,9
Espectroscopía: UV (nm)	276,5 ± 1,1
Delta (nm)	341,5 ± 2,8
Soret (nm)	414,3 ± 0,4
Beta (nm)	541,7 ± 0,3
Alfa (nm)	576,8 ± 0,3
Antiespumante residual (ppm)	4,0 ± 3,5
Etanol residual (ppm)	2,4 ± 1,1
Antígeno de superficie A	Negativo
Antígeno de superficie B	Negativo

**Ejemplo 4: Reducción de la actividad vírica**

*A. Ensayos de ADN vírico en el producto final:*

**[0084]** Se validó el proceso de producción por la retirada de VIH a 1/40 de una escala de producción típica. Se monitorizaron parámetros tales como contenido de hemoglobina y metahemoglobina, pH, contenido de endotoxina, P<sub>50</sub>, peso molecular, etc. para el proceso a escala reducida para asegurar que los parámetros del proceso a esta escala eran comparables con el proceso a escala completa. Se realizaron adiciones de cultivo de VIH en la corriente de proceso de partida. Se ensayó en material de partida, intermedios de proceso y productos el virus infeccioso mediante ensayo de placa y de la proteína nuclear de VIH mediante procedimientos ELISA, respectivamente. Se efectuó el ensayo de placa por duplicado en la línea celular MT-4.

**[0085]** Se mostró que el factor de aclaramiento de VIH para el proceso de producción de PHP descrito anteriormente era de ≥ 12,85 unidades log. medido por recuento de unidades de formación de placa (UFP).

**[0086]** Se efectuó un estudio para determinar si el ADN vírico estaba presente en el producto final en 7 lotes de PHP. Se detectó la ausencia de ADN vírico por técnicas de hibridación de ADN usando sondas específicas de virus para virus de la hepatitis B, citomegalovirus, herpesvirus simple y virus de Epstein-Barr. Se extrajo ADN de las muestras de PHP usando un procedimiento basado en fenol. Se transfirió ADN extraído y se sondeó con ADN marcado con <sup>32</sup>P o marcado con biotina específico del virus. Se compararon las señales de 7 lotes de PHP con patrones de ADN (100-0,3 pg de ADN) contenidos en la misma transferencia y se puntuaron basándose en la intensidad de señal. Se encontró que los 7 lotes de PHP estaban por debajo del límite de detección en la presencia de ADN de virus de la hepatitis B, citomegalovirus, herpesvirus simple y virus de Epstein-Barr.

**[0087]** Además de los estudios de seguridad de virus resumidos anteriormente, se han realizado estudios de validación de virus adicionales para el proceso de producción de PHP. Los virus elegidos para estos estudios incluían virus de la hepatitis A (HAV), que es conocido por ser transmitido por productos sanguíneos, y virus de la diarrea vírica bovina (BVD), que es un modelo de virus de la hepatitis C (HCV) (véase la Tabla 6).

**[0088]** Se realizaron los estudios de validación de virus usando operaciones unitarias a escala reducida que representaban exactamente las operaciones a escala de proceso con respecto a las condiciones operativas físicas, intermedios de producto y producto final. Se efectuó el cultivo y cuantificación de virus de acuerdo con las GLP. Se efectuó la validación de la cuantificación de virus antes del análisis. Se derivaron los niveles de reducción usando procedimientos estadísticos fiables y representan un nivel de confianza del 95 %.

**Tabla 6**

Características de los modelos víricos usados en el estudio de validación del proceso de PHP						
Modelo	Familia	Genoma	Con cubierta	Tamaño (nm)	Resistencia	Virus representativos
VIH	Retro	ARNmc	Sí	80-100	Baja	Virus de leucemia de linfocitos T humanos de tipo I y II (HTLV-I y II) Virus de inmunodeficiencia humanos de tipos 1 y 2 (VIH 1 y 2)
BVD	Flavi	ARNmc	Sí	50-70	Media	Hepatitis G, hepatitis C (anteriormente NANBHV), HCV
HAV	Picornia	ARNmc	No	25-30	Media-alta	Virus de hepatitis A, HAV

*Inactivación de virus de la diarrea vírica bovina (BVD) en el producto de PHP final*

**[0089]** La modificación química de hemoglobina para producir PHP requiere el uso de agentes reductores fuertes, alcohol, vitaminas y aminoácidos. Se esperaba que los agentes reductores fuertes y/o alcoholes inactivaran los virus con cubierta. Para validar esta inactivación, se diseñó un estudio para reproducir la reacción de modificación química a 1/100 de una reacción a escala completa típica. Se fabricó un reactor pequeño y se equipó con un mecanismo de agitación, colector de distribución de gas, sistema de control de temperatura y pH-metro. Se desoxigenó la disolución de hemoglobina, se hizo reaccionar y se reoxigenó en condiciones equivalentes a las usadas a escala de producción. Se midió la eficacia de la modificación por HPLC y se determinaron los parámetros físicos del producto mediante ensayos usados por control de calidad para valorar los intermedios de proceso. Todos los análisis confirmaron que el producto de reacción era equivalente al producto del proceso a escala completa.

**[0090]** Se adicionó al material de partida virus BVD a una concentración del 10 % del volumen de partida total antes de desoxigenación. Se llevó a cabo la reacción según el protocolo de fabricación y se muestreó el producto final para la operación unitaria. El proceso de inactivación eliminaba  $\geq 5,11 \pm 0,18$  unidades log. de virus BVD.

**B. Ensayos para la reducción de la actividad vírica por el “primer medio de filtración”:**

*Retirada de virus de la hepatitis A (HAV) por ultrafiltración*

**[0091]** La purificación de hemoglobina de eritrocitos se logra mediante una serie de etapas de filtración. Como se define en la presente memoria, el “primer medio de filtración” es una etapa de ultrafiltración que es eficaz en la retirada de virus. Para validar esto, se utilizó una unidad de membrana de fibra hueca a escala reducida (1/100 de una escala de producción típica) con longitud de fibra idéntica a los filtros del proceso a escala completa en una operación unitaria a pequeña escala. Se obtuvo el material de partida para el estudio de validación a partir de una corriente de proceso de fabricación a escala completa y representaba el material típico usado en la producción de PHP. Todos los parámetros de proceso para la operación de la unidad de ultrafiltración a pequeña escala se documentaron en registros de lotes de producción de PHP. Los flujos transversales, presiones operativas, temperatura, tampones y tiempos de operación eran representativos del proceso de fabricación a escala completa. El único parámetro que se modificó para la validación de virus fue el área de membrana. Antes de efectuar el estudio de validación con virus vivo, se efectuaron varias tandas de filtración a pequeña escala para asegurar que las corrientes de retenido y permeado eran equivalentes a las obtenidas con el proceso a escala completa.

[0092] Se adicionó a la corriente de entrada 1 % de HAV y se procesó la operación unitaria según el procedimiento de fabricación. Se determinó el título de HAV en las muestras de ensayo efectuando un ensayo de TCID<sub>50</sub> con células de pulmón de *Rhesus fetal* (FrhL-4). El proceso de ultrafiltración eliminaba  $\geq 5,60 \pm 0,28$  unidades log. de HAV.

5

*Retirada de virus de la diarrea vírica bovina (BVD) por ultrafiltración*

[0093] Se validó también la retirada de virus BVD usando la misma unidad de membrana de ultrafiltración que se usó para la validación de HAV. El proceso usado era similar al descrito anteriormente para la validación de HAV. Se adicionó a la corriente de entrada 1 % de virus BVD y se procesó la operación unitaria según el procedimiento de fabricación. Se determinó el título de virus BVD en las muestras de ensayo efectuando un ensayo de placa con células de tráquea bovina embrionaria (EBTr). El proceso de ultrafiltración eliminaba  $\geq 6,02 \pm 0,06$  unidades log. del virus BVD.

10

15 *C. Ensayos para la reducción de la actividad vírica por el "segundo medio de filtración":*

*Retirada del bacteriófago PP7 (25 nm)*

[0094] Se adicionaron a 60 ml de hemoglobina exenta de estroma purificada (20 mg/ml) 0,5 ml de disolución madre de fago (título=  $1 \times 10^{12}$  UFP/ml). Se dispuso la disolución de hemoglobina adicionada en un recipiente de acero inoxidable a presión que contenía un filtro DV-20 de 47 mm (Pall). Se pasó la disolución a través del filtro DV-20 a 308 kPa. Se recogió el filtrado y se ensayó la presencia de PP7 mediante ensayo de placa usando *Pseudomonas aeruginosa*. El proceso de filtración eliminaba 5 unidades log. de PP7. La actividad catalasa de la disolución de hemoglobina pasaba por el filtro junto con la hemoglobina.

20

25

*Retirada del bacteriófago PR772 (50 nm)*

[0095] Se adicionaron a 100 ml de hemoglobina exenta de estroma purificada (20 mg/ml) 1 ml de bacteriófago PR772 (título=  $4,5 \times 10^{10}$  UFP/ml). Se dispuso la disolución de hemoglobina adicionada en un recipiente de acero inoxidable a presión que contenía un filtro Viresolve NFR de 47 mm (Millipore) a la salida del recipiente. Se filtró la disolución a presión a 308 kPa. Se recogió el filtrado y se ensayó la presencia de fago mediante ensayo de placa usando *Escherichia coli*. El proceso de filtración eliminaba  $\geq 8$  unidades log. de PR772. La actividad catalasa pasaba por el filtro junto con la hemoglobina.

30

### 35 Ejemplo 5: Ensayo de la actividad antioxidante endógena

[0096] A. Se examinaron moléculas de PHP sintetizadas por los procedimientos descritos anteriormente frente a moléculas de hemoglobina y moléculas de POE-HbA (moléculas de PHP preparadas usando una hemoglobina purificada cromatográficamente) con respecto a la formación de metahemoglobina y ferrilhemoglobina después de la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Privalle y col. (1999) "The Biology of Nitric Oxide", parte 7. Londres: Portland Press. Se añadieron mezclas de reacción que contenían 20  $\mu$ M (hemo) de las hemoglobinas indicadas en fosfato de sodio 50  $\mu$ M, pH 7,4, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200  $\mu$ M) y se obtuvieron los espectros después de una incubación de 5 min a temperatura ambiente. Las adiciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200  $\mu$ M a HbA dieron como resultado una disminución de A541 y A577. La cuantificación del estado de oxidación de la hemoglobina reveló que aproximadamente un 50 % de la oxiHbA se había convertido en metHbA en estas condiciones. En contraposición, la PHP era relativamente estable a este tratamiento, con menos de 5 % de la hemoglobina convertida en la forma de metahemoglobina. Véase la Figura 2. Se muestra en la Figura 3 la presencia de formación de ferrilhemoglobina después del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La ferrilhemoglobina puede detectarse fácilmente por espectrofotometría después de la adición de Na<sub>2</sub>S, que da como resultado la formación posterior de sulfohemoglobina. Esta especie de hemoglobina se caracteriza por un pico marcado a 620 nm. Se obtuvo el espectro de la hemoglobina indicada (hemo 50  $\mu$ M) a T= 0. Se añadió entonces un exceso molar de 5 veces de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (250  $\mu$ M) y se incubó la mezcla de reacción durante 5 minutos. Se añadió catalasa (500 unidades) para descomponer el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en exceso. Se añadió entonces Na<sub>2</sub>S (2 mM) y se obtuvo el espectro después de 1 min. Se muestra el espectro final para HbA, PHP y POE-HbA. Después de la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la formación de ferrilhemoglobina es mucho mayor en HbA que en PHP.

40

45

50

55

B. Se determinó el nivel de actividad antioxidante en unidades/mg de hemoglobina en el producto de PHP final. Se efectuaron los ensayos para medir la actividad antioxidante como sigue. La Tabla 7 proporciona las composiciones antioxidantes típicas de PHP.

60



**Tabla 7**

<b>Composición antioxidante de PHP</b>	
<u>Enzima</u>	<u>Actividad específica</u>
Catalasa	448 ± 60 U/mg de Hb
Glutación peroxidasa	120 ± 24 U/mg de Hb
Superóxido dismutasa	1,0 ± 0,1 U/mg de Hb

5 **[0097]** Se proporciona en la Tabla 8 la actividad catalasa media de eritrocitos (RBC), hemoglobina exenta de estroma purificada (PSFHb) y PHP, basada en hemoglobina. La actividad es la actividad catalasa media encontrada en 5 lotes de PHP.

**Tabla 8**

<b>RBC</b>	<b>PSFHb</b>	<b>PHP</b>
264 ± 81 U de actividad catalasa/mg de Hb	239 ± 19 U de actividad catalasa/mg de Hb	322 ± 29 U de actividad catalasa/mg de Hb

10 **[0098]** Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de los especialistas en la materia a la que pertenece esta invención.

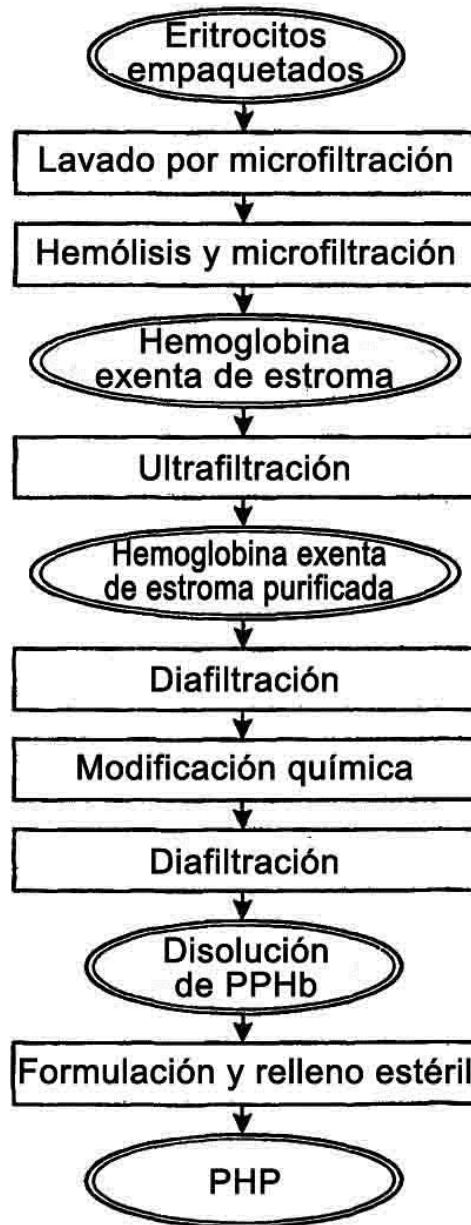
**REIVINDICACIONES**

- 5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65
1. Un procedimiento de preparación de una disolución de hemoglobina modificada químicamente que comprende:
    - (a). poner en contacto una disolución de hemoglobina exenta de estroma con al menos un medio de filtración que comprende un filtro de corte de peso molecular 500.000, reteniendo dicho medio de filtración las partículas víricas y permitiendo el paso de un filtrado que comprende un polipéptido de hemoglobina y una enzima antioxidante endógena, y estando el filtrado sustancialmente exento de contaminación vírica;
    - (b). modificar químicamente el filtrado de la etapa (a) con un agente; y
    - (c). aislar la disolución de hemoglobina modificada químicamente y enzima antioxidante endógena, reteniendo al menos una de las enzimas antioxidantes endógenas la actividad enzimática.
  2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que al menos una de las enzimas antioxidantes endógenas que retienen actividad enzimática se selecciona del grupo consistente en superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa.
  3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho medio de filtración permite el paso de al menos un 50 % de las enzimas antioxidantes endógenas.
  4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el medio de filtración comprende un filtro de corte de peso molecular 500.000 de AG Technology.
  5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho medio de filtración reduce el paso de partículas víricas que son de entre aproximadamente 200-25 nm de tamaño.
  6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dicho medio de filtración reduce el paso de partículas víricas que son de 80-100 nm de tamaño.
  7. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dicho medio de filtración reduce el paso de partículas víricas que son de entre aproximadamente 80-50 nm de tamaño.
  8. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dicho medio de filtración reduce el paso de partículas víricas que son de entre aproximadamente 50-25 nm de tamaño.
  9. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dicho medio de filtración reduce el paso de dichas partículas víricas de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 unidades logarítmicas.
  10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho medio de filtración produce un filtrado que tiene una reducción de la carga vírica de al menos 3 unidades logarítmicas.
  11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el agente es un agente modificador bifuncional.
  12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que dicho agente se selecciona del grupo consistente en cloruro de sebacilo, glutaraldehído, derivado de diaspirina, polialdehído, polioxietileno, dextrano e inulina.
  13. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el agente es un polioxietileno bifuncional.
  14. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el agente es una mezcla de un polioxietileno bifuncional y monofuncional.
  15. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que la disolución de hemoglobina modificada que comprende una enzima antioxidante endógena es PHP.
  16. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que modificar químicamente dicho filtrado con un agente comprende desoxigenación y piridoxalación.
  17. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha disolución de hemoglobina modificada químicamente aislada que comprende una enzima antioxidante endógena comprende un título vírico de hepatitis A de menos de aproximadamente 1 unidad de TCID<sub>50</sub>/ml.
  18. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la disolución de hemoglobina modificada químicamente comprende un aumento de aproximadamente 50 % a aproximadamente 200 % de la actividad

antioxidante eritrocitaria endógena por unidad de hemoglobina encontrada en eritrocitos.

## PROCESO PARA LA PREPARACIÓN DE PHP

Etapas de proceso



PPHb= polioxietilenhemoglobina piridoxalada  
PHP= hemoglobina piridoxalada con polioxietileno (producto final)

FIGURA 1

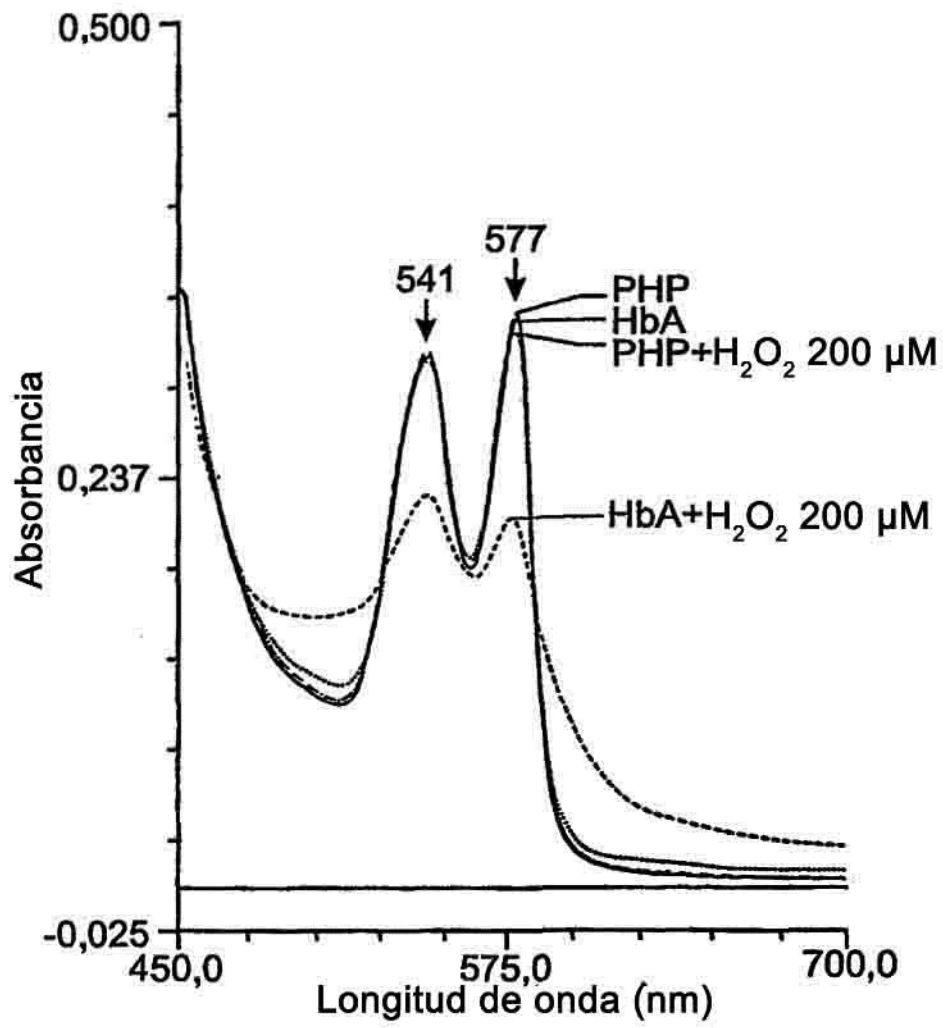


FIGURA 2

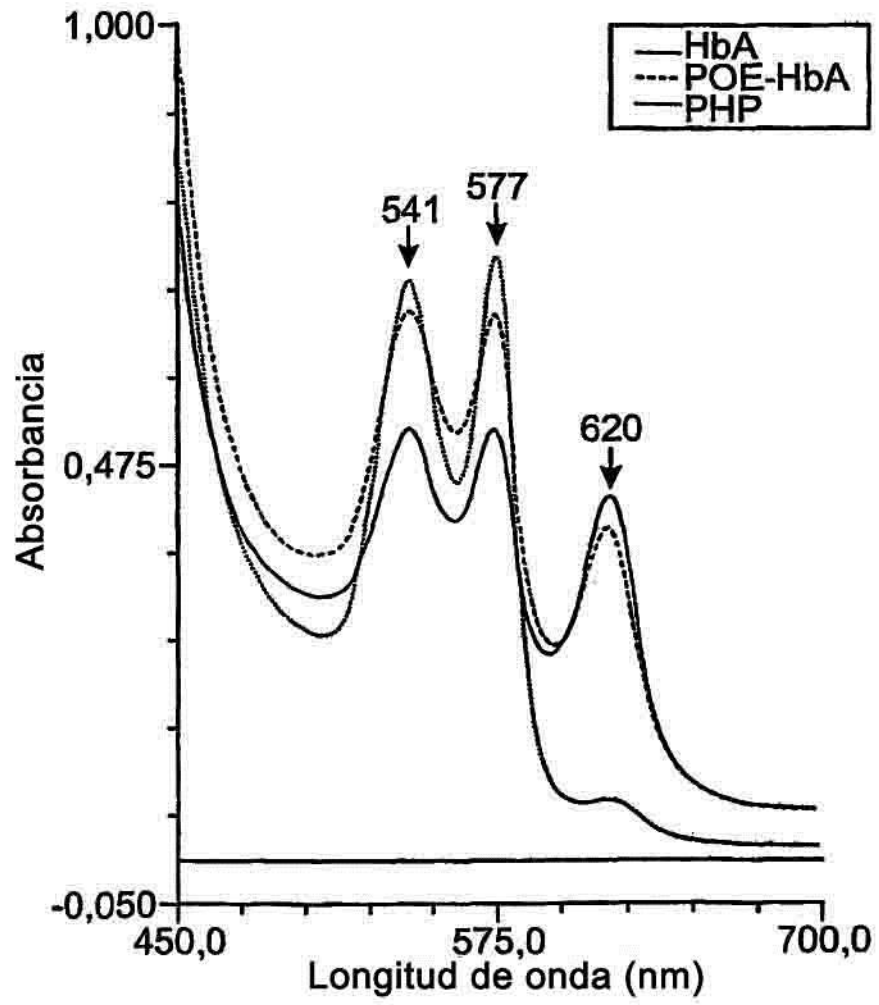


FIGURA 3