

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 147**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/805** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.12.2011 PCT/US2011/063921**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.06.2012 WO12078850**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2011 E 11846155 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2649096**

54 Título: **Composiciones de hemoglobina y métodos de uso**

30 Prioridad:

**08.12.2010 US 420914 P**

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

**19.09.2017**

73 Titular/es:

**BOSTON THERAPEUTICS, INC. (100.0%)  
354 Merrimack Street, 4  
Lawrence, MA 01843, US**

72 Inventor/es:

**PLATT, DAVID**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 633 147 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

Composiciones de hemoglobina y métodos de uso

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a agentes de transporte de oxígeno para la administración a pacientes para el tratamiento de hipoxia y de afecciones relacionadas. Más específicamente, la invención se refiere a una molécula híbrida de hemoglobina que está protegida por la adhesión de una molécula de carbohidrato para suministrar oxígeno a células en un estado de hipoxia.

Antecedentes de la invención

Un componente principal de morbilidad y de mortalidad atribuible a enfermedad cardiovascular se produce como consecuencia del bloqueo parcial o completo de los vasos que transportan sangre en la vasculatura coronaria y/o periférica. Cuando dichos vasos se ocluyen parcialmente, la ausencia de flujo sanguíneo causa isquemia a los tejidos musculares abastecidos por dicho vaso, inhibiendo por consiguiente la contracción muscular y la función apropiada. La oclusión total del flujo sanguíneo causa necrosis del tejido muscular. La necrosis del tejido muscular causa formación de cicatrices, conduciendo a remodelado e insuficiencia cardíaca.

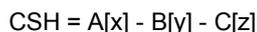
Las oclusiones de los vasos sanguíneos se tratan habitualmente potenciando mecánicamente el flujo sanguíneo en los vasos afectados. Dichas potenciaciones mecánicas a menudo se proporcionan empleando técnicas quirúrgicas que adhieren conductos naturales o sintéticos proximales y distales a las áreas de oclusión, proporcionando de ese modo injertos de derivación, o revascularización por diversos medios para agrandar físicamente el lumen vascular en el sitio de oclusión. Estos procedimientos de revascularización implican dispositivos tales como globos, bisturís endovasculares y tornos endovasculares. Desafortunadamente, las estrategias quirúrgicas están acompañadas por una significativa morbilidad e incluso mortalidad, mientras que los procesos de tipo angioplastia se complican por estenosis recidivante en muchos casos.

En algunos individuos, la oclusión de los vasos sanguíneos se compensa parcialmente por procesos naturales, en los que se forman nuevos vasos (llamado "angiogénesis") y se agrandan pequeños vasos (llamado "arteriogénesis") para reemplazar la función de los vasos alterados. Estos nuevos vasos pueden facilitar la restauración de flujo sanguíneo al tejido privado, constituyendo de ese modo una "derivación natural" alrededor de los vasos ocluidos. Sin embargo, algunos individuos son incapaces de generar suficientes vasos colaterales para compensar adecuadamente el disminuido flujo sanguíneo causado por la enfermedad cardiovascular. Por consiguiente, sería deseable proporcionar una composición para compensar la pérdida de sangre debida a una oclusión en la arteria coronaria y las arterias periféricas para tratar la isquemia. La hemoglobina, como componente transportador natural del oxígeno de la sangre, puede tener poco suministro en las áreas de oclusión debido a estas oclusiones mecánicas que causan afecciones isquémicas. La necesidad de alguna forma de modificación química de la hemoglobina para hacerla más adecuada para su uso como transportador mejorado del oxígeno puede compensar el disminuido suministro de sangre en las afecciones isquémicas.

Sumario de la invención

De acuerdo con la descripción, se describe un método y una composición para el tratamiento de hipoxia y afecciones relacionadas. Se contempla, dentro del alcance de la descripción, que la isquemia, la anemia y el traumatismo pueden describirse como estado de hipoxia. Sin limitarse a teoría particular alguna, se cree que la hipoxia induce activación transcripcional de genes que alteran el metabolismo celular y promueven la neoangiogénesis.

La composición de acuerdo con la descripción es un agente de transporte de oxígeno de hemoglobina modificada. De acuerdo con la descripción, se describe un método y una composición, donde la composición consiste principalmente en una hemoglobina protegida por carbohidrato (CSH<sup>TM</sup>) para suministrar oxígeno en la fase de hipoxia. La composición de acuerdo con la descripción se basa en la química de oxidación que se cree que desempeña tareas claves en isquemia y en anemia y tiene una estructura general como la siguiente:



- A. Hemoglobina estabilizada reticulada
- B. Enlace
- C. Derivado de pectina natural

La composición de acuerdo con la descripción es una hemoglobina protegida por carbohidrato (CSH<sup>TM</sup>) donde [x] unida desde A están unidas a [y] unida desde B y B está unido a [z] unida desde C. A es una hemoglobina tetramérica y [x] es 1 y hasta 6 unidades tetraméricas. C es un derivado natural de pectina y [z] es 1 y hasta 12 unidades. B es una entidad química o física o una combinación de estas que une forma un puente entre A y C, y [y] es 2 y hasta 24 enlaces definidos.

En un aspecto de la descripción, la molécula híbrida de hemoglobina contiene carbohidratos para estabilizar la actividad catalítica de las subunidades tetraméricas reticuladas de la proteína hemoglobina como transportador universal de oxígeno.

5 En un aspecto adicional de la descripción, la molécula híbrida de hemoglobina, que se inyecta por vía iv, circula en la sangre recogiendo el oxígeno de los pulmones y después se dirige al órgano hipóxico específico o al órgano lesionado o al órgano enfermo donde los biomarcadores o receptores presentados sobre la superficie de membrana inducen liberación del oxígeno al órgano. Se contempla dentro del alcance de la descripción que están disponibles  
10 otras vías de administración.

15 En un aspecto adicional de la descripción, los componentes A y C están unidos por un puente a través de puentes químicos y/o físicos a través de múltiples interacciones fuerzas iónicas y/o hidrófobas o de van der Waals [o interacción de van der Waals]. Las fuerzas de unión entre las moléculas de hemoglobina (o entre partes de la misma molécula) y los derivados de pectina natural debido a enlaces covalentes y/o a la interacción electrostática y/o van der Waals desempeñan una función fundamental en la estabilidad superior y en la actividad catalítica (transporte de oxígeno) de la hemoglobina híbrida.

20 En otro aspecto de la descripción, la molécula híbrida de hemoglobina penetra en las células y libera el oxígeno dentro de las células. Una vez que las células han quedado oxigenadas, se revertirá su estado de hipoxia.

25 En otro aspecto adicional más de la descripción, la molécula híbrida de hemoglobina tiene un mecanismo de acción para intervención directa de fármaco terapéutico para la hipoxia. La molécula de hemoglobina híbrida de acuerdo con la descripción tiene afinidad por oxígeno que imita los glóbulos rojos humanos y tiene mayor capacidad de transporte de oxígeno que los glóbulos rojos humanos y no causa ningún efecto adverso asociado con el desarrollo previo de hemoglobina modificada.

30 En otro aspecto de la descripción, la molécula híbrida de hemoglobina es compatible con todos los tipos de sangre y puede administrarse inmediatamente.

En un aspecto adicional de la descripción, la molécula híbrida de hemoglobina es una composición estable que tiene una vida útil de aproximadamente dos años.

35 En otro aspecto de la descripción, la molécula híbrida de hemoglobina puede almacenarse a temperatura ambiente sin degradación sustancial de la afinidad de transporte de oxígeno de la composición.

En un aspecto adicional más de la descripción, la molécula modificada de hemoglobina puede adaptarse para eficacia terapéutica para tratamientos de enfermedades degenerativas asociadas con hipoxia.

40 En otro aspecto de la invención, se cree que el crecimiento y la metástasis de tumores sólidos depende de forma crítica de la angiogénesis tumoral. Un estímulo principal para el reclutamiento de un tumor de vasos sanguíneos adicionales es la hipoxia celular. La hipoxia induce activación transcripcional de genes que alteran el metabolismo celular y promueven la neo-angiogénesis. Los tumores en la mayoría de los pacientes con cáncer en fase final están en un estado de hipoxia y están dividiéndose lentamente y sin responder a la mayoría de fármacos antineoplásicos.  
45 Por lo tanto, un aspecto de la invención es proporcionar la composición de acuerdo con la descripción para prevenir la neo-angiogénesis y restaurar la división celular normal del cáncer que permitirá que un fármaco antineoplásico trabaje de forma más eficaz.

50 En un aspecto adicional más de la descripción, la molécula híbrida de hemoglobina se dirige a receptores específicos sobre la superficie de membrana de células cancerosas, penetrando de ese modo en las células y liberando el oxígeno dentro de las células cancerosas. Una vez que las células cancerosas han quedado oxigenadas y se ha revertido su estado de hipoxia, los fármacos antineoplásicos tendrán una mayor tasa de eficacia.

Breve descripción de los dibujos

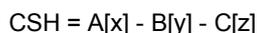
55 Las realizaciones descritas en la presente descripción se ilustran en las figuras de los dibujos adjuntos que se entiende que son ejemplares y no limitantes, en los que se pretende que referencias similares hagan referencia a partes similares o correspondientes, y en los que:

60 La figura 1 ilustra la estructura de la hemoglobina, incluyendo las posiciones de las subunidades alfa y beta.

Descripción detallada

65 La hemoglobina para su uso en la composición de la presente descripción es preferiblemente hemoglobina humana, derivada de glóbulos rojos. Sin embargo, la invención es aplicable también a otros tipos de hemoglobina para formar la base de un agente de transporte de oxígeno, tal como hemoglobina animal especialmente hemoglobina bovina y

hemoglobina porcina y similares, y hemoglobina derivada de cultivo celular. La molécula híbrida de hemoglobina de acuerdo con la descripción tiene una estructura general como la siguiente:



- 5      A. Hemoglobina estabilizada reticulada  
       B. Enlace  
       C. Derivado de pectina natural

10      La composición de acuerdo con la descripción es una hemoglobina protegida por carbohidrato (CSH™) donde [x] unida desde A están unidas a [y] unida desde B y B está unido a [z] unida desde C. A es una hemoglobina tetramérica y [x] es 1 y hasta 6 unidades tetraméricas. C es un derivado natural de pectina y [z] es 1 y hasta 12 unidades. B es una entidad química o física o una combinación de estas que une forma un puente entre A y C, y [y] es 2 y hasta 24 enlaces definidos.

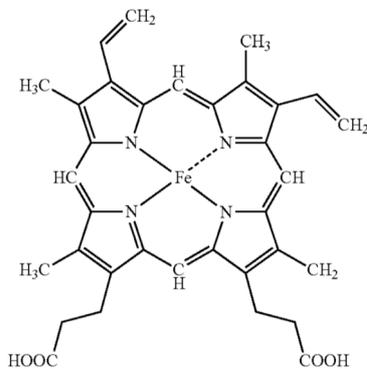
15      **Componente A:**

A es una estructura de hemoglobina estabilizada reticulada

20      **Estructura de hemoglobina**

25      La proteína hemoglobina transportadora de oxígeno se descubrió por Hünefeld en 1840. En 1851, Otto Funke publicó una serie de artículos en los que describía el crecimiento de cristales de hemoglobina por dilución sucesiva de glóbulos rojos con un disolvente tal como agua pura, alcohol o éter, seguido por evaporación lenta del disolvente de la solución de proteína resultante.

30      La oxigenación reversible de la hemoglobina se describió unos pocos años después por Félix Hoppe-Seyler. La función de la hemoglobina en la sangre se dilucidó por el fisiólogo Claude Bernard. El nombre *hemoglobina* es una voz compuesta de *hemo* y *globina*, que refleja el hecho de que cada unidad de hemoglobina es una proteína globular con un grupo hemo (o hem) incluido. Cada grupo hemo contiene un átomo de hierro que puede unirse a una molécula de oxígeno a través de fuerzas dipolares inducidas por iones. El tipo más común de hemoglobina en mamíferos contiene cuatro de dichas subunidades.



35      **Grupo hemo**

40      En la mayoría de los seres humanos, la molécula de hemoglobina es un ensamblaje de cuatro subunidades proteicas globulares. Cada subunidad está compuesta de una cadena proteica fuertemente asociada con un grupo hemo no proteico. Cada cadena proteica se dispone en un conjunto de segmentos estructurales de alfa-hélice conectados juntos en una disposición de plegamiento de globina, así llamado porque esta disposición es el mismo motivo de plegamiento usado en otras proteínas hemo/globina tales como mioglobina. Este patrón de plegamiento contiene un bolsillo que se une fuertemente al grupo hemo.

45      Un grupo hemo consiste en unión ion (átomo cargado) de hierro (Fe) mantenido en un anillo heterocíclico, conocido como porfirina. El ion de hierro, que es el sitio de unión del oxígeno, se coordina con los cuatro nitrógenos en el centro del anillo, que todos descansan en un plano. El hierro también se une fuertemente a la proteína globular a través del anillo imidazol del resto de histidina F8 por debajo del anillo de porfirina. Una sexta posición puede unirse de forma reversible al oxígeno por un enlace covalente coordinado, completando el grupo octaédrico de seis ligandos. El oxígeno se une en una geometría de "flexión longitudinal" donde un átomo de oxígeno se une a Fe y el otro sobresale a un ángulo. Cuando el oxígeno no está unido, una molécula de agua muy débilmente unida llena el sitio, formando un octaedro distorsionado.

50      El ion de hierro puede estar en estado Fe<sup>2+</sup> o Fe<sup>3+</sup>, pero la ferrihemoglobina (metahemoglobina) (Fe<sup>3+</sup>) no puede

unirse al oxígeno. En unión, el oxígeno oxida temporalmente ( $\text{Fe}^{2+}$ ) a ( $\text{Fe}^{3+}$ ), de modo que el hierro debe existir en el estado de oxidación +2 para unirse al oxígeno. La enzima metahemoglobina reductasa reactiva la hemoglobina encontrada en estado inactivo ( $\text{Fe}^{3+}$ ) reduciendo el centro de hierro.

5 En seres humanos adultos, el tipo de hemoglobina más común es un tetrámero (que contiene 4 proteínas de subunidad) llamado **hemoglobina A**, que consiste en dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$  unidas no covalentemente, cada una compuesta de 141 y 146 restos de aminoácido, respectivamente. Esto se indica como  $\alpha_2\beta_2$ . Las subunidades son estructuralmente similares y de aproximadamente el mismo tamaño. Cada subunidad  
10 tiene un peso molecular de aproximadamente 17.000 dalton, para un peso molecular total del tetrámero de aproximadamente 68.000 dalton (64.458 g/mol). 1 g/dl = 0,6206 mmol/l. La hemoglobina A es la más intensivamente estudiada de las moléculas de hemoglobina.

Las cuatro cadenas polipeptídicas se unen entre sí por puentes salinos, enlaces de hidrógeno e interacciones hidrófobas. Hay dos tipos de contactos entre las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ :  $\alpha_1\beta_1$  y  $\alpha_1\beta_2$ .

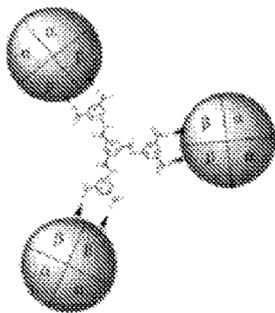
15 La *oxihemoglobina* se forma durante la respiración cuando el oxígeno se une al componente hemo de la proteína hemoglobina en los glóbulos rojos. Este proceso se produce en los capilares pulmonares adyacentes a los alveolos de los pulmones. El oxígeno entonces viaja a través del torrente sanguíneo para soltarse en las células donde se utiliza en la glucólisis aeróbica y en la producción de ATP por el proceso de fosforilación oxidativa. No ayuda, sin  
20 embargo, a contrarrestar una disminución en el pH sanguíneo. La ventilación, o la respiración, puede revertir este estado eliminando el dióxido de carbono, causando por tanto un desplazamiento en el pH.

La *desoxihemoglobina* es la forma de hemoglobina sin el oxígeno unido. Los espectros de absorción de la oxihemoglobina y la desoxihemoglobina difieren. La oxihemoglobina tiene una absorción significativamente inferior de la longitud de onda de 660 nm que la desoxihemoglobina, mientras que a 940 nm su absorción es ligeramente mayor. Esto justifica el color rojo de la hemoglobina y el color azul de la desoxihemoglobina. Esta diferencia se usa  
25 para la medición de la cantidad de oxígeno en la sangre del paciente por un instrumento llamado oxímetro de pulso.

Las matrices de proteínas conectadas químicamente tienen aplicaciones diversas significativas incluyendo la producción de sustitutos de glóbulos rojos, suministro de fármacos bioconjugados y terapias de proteínas. (Véase, Efficient generation of dendritic arrays of cross-linked hemoglobin: symmetry and redundancy, Dongxin Hu y Ronald Kluger).

35 Para preparar materiales de estructura definida, existe la necesidad de reactivos eficaces y accesibles. Aunque la reticulación química con una proteína de múltiples subunidades puede conseguirse en alto rendimiento, la conexión de las proteínas entre sí en un ensamblaje dendrítico junto con la reticulación simultánea ha tenido un éxito limitado. Ahora se ha superado a través del diseño e implementación de un reactivo fácilmente preparado con sitios de reacción añadidos que compensan la hidrólisis de competición. Se diseñó y se sintetizó *N,N',N''*-Tris[bis(metil fosfato  
40 sódico)isofalil]-1,3,5-bencenotricarboxamida (**1**), una tris-amida de hexaquis(fosfato de metilo) isofalil trimesoílo, en alto rendimiento en tres fases a partir de un núcleo de trimesoílo reactivo.

Este material tiene tres pares de sitios de reacción de reticulación co-planares en una matriz simétrica. La presencia de tres conjuntos de sitios aumenta enormemente la probabilidad de que al menos dos conjuntos produzcan reticulaciones dentro de los tetrámeros de hemoglobina (en competición con la hidrólisis) y de ese modo conecta dos  
45 tetrámeros reticulados en el mismo sitio. La reacción de **1** con desoxihemoglobina a pH 8,5 da un material que contiene dos tetrámeros de hemoglobina reticulados conectados entre sí y a un dímero  $\alpha\beta$  constituyente. Los productos se caracterizaron por SDS-PAGE, MS, digestión enzimática y HPLC. La hemoglobina dendrítica aislada con 2,5 componentes tetraméricos tiene la misma afinidad por oxígeno que la hemoglobina nativa ( $P_{50} = 5,0$  Torr) y retiene la cooperatividad ( $n_{50} = 2,0$ ). El análisis de los espectros de dicroísmo circular indica que el ensamblaje  
50 retiene el plegamiento apropiado de las cadenas de globina mientras que los hemo están en un entorno alterado.



55 SH está compuesto de hemoglobina bovina (de vaca) reticulada químicamente estabilizada situada en una solución salina. Se contempla dentro del alcance de la descripción que pueden usarse otras fuentes de hemoglobina

incluyendo hemoglobina humana, hemoglobina de cultivo celular y hemoglobina derivada de otros animales. La hemoglobina por sí misma es tóxica para los riñones porque contiene lípidos estromáticos, que están contaminados con endotoxinas. Si se eliminan los lípidos estromáticos, sin embargo, entonces la hemoglobina tiene una afinidad demasiado alta por el oxígeno, que significa menor descarga de oxígeno a los tejidos. Para asegurar que la hemoglobina no es tóxica, pero es aun terapéuticamente útil, debe estabilizarse. La estabilización puede conseguirse por reticulación de la hemoglobina. Esto se hace reticulando las dos subunidades alfa y las dos subunidades beta. Esto entonces estabiliza los dímeros alfa-beta, que a su vez hace que la molécula de hemoglobina sea más estable, y también reduce su afinidad por el oxígeno, haciendo que sea más fácil suministrar oxígeno a los tejidos. La estructura de la hemoglobina se representa en la figura 1, incluyendo las posiciones de las subunidades alfa y beta.

**Medidas de seguridad**

Como la hemoglobina estabilizada usada de acuerdo con la descripción se obtiene de vacas, la presente molécula de hemoglobina híbrida pasa por extensos periodos para asegurarse de que está: libre de patógenos, agentes infecciosos (BSE) y es químicamente pura, incluyendo: el uso solamente de rebaños muy controlados, donde el país de origen, el suministro de alimentos y la salud se supervisan estrechamente; el uso de expertos externos que regulan estrechamente el proceso estricto de fabricación de la molécula híbrida de hemoglobina para determinar la capacidad de eliminar los patógenos potenciales; y la observación estricta de la industria global y las normas reguladoras.

**Ventajas de la molécula híbrida de hemoglobina frente a RBC**

Las ventajas de la molécula híbrida de hemoglobina de acuerdo con la descripción sobre las de la fuente tradicional de glóbulos rojos (RBC) como agente de transporte de oxígeno se muestran en la tabla 1 a continuación:

Tabla 1

| CARACTERÍSTICAS | MOLÉCULAS HÍBRIDAS DE HEMOGLOBINA                | GLÓBULOS ROJOS                                  |
|-----------------|--|---|
| ALMACENAMIENTO  | Temperatura ambiente (de 2° a 30°C)              | Refrigerados                                    |
| VIDA ÚTIL       | 56 meses   | 42 días   |
| PREPARACIÓN     | Listas para su uso                               | Ensayo, tipado y compatibilidad                 |
| COMPATIBILIDAD  | Universal  | Específicos de tipo                             |
| EFICACIA        | Suministro de oxígeno inmediato                  | Dependiente de la duración de almacenamiento    |
| PUREZA          | Procesadas                                       | Ensayados y explorados para agentes infecciosos |
| MATERIAS PRIMAS | Son abundantes en hemoglobina, fuente controlada | Disponibilidad limitada, no controlada          |

La molécula híbrida de hemoglobina de acuerdo con la descripción es de tamaño más pequeño (hasta aproximadamente 1000 veces más pequeña que un glóbulo rojo típico) y tiene menos viscosidad que los glóbulos rojos humanos (que contienen hemoglobina). Esto significa que puede transportar más oxígeno a una presión sanguínea inferior que los glóbulos rojos. Además, a causa de su tamaño más pequeño, puede transportar oxígeno a través de vasos sanguíneos parcialmente obstruidos o restringidos, donde las RBC no pueden alcanzar.

La oxigenación tisular inadecuada resultante de las arterias ocluidas puede provocar ataque al corazón, angina o ataque isquémico transitorio, que es un precursor de apoplejía. Tradicionalmente, estas afecciones se han tratado por transfusiones de sangre, pero las RBC a menudo son demasiado grandes para pasar a través de la oclusión, que es por lo que la molécula híbrida de hemoglobina de acuerdo con la descripción puede ser potencialmente beneficiosa terapéuticamente.

Un vertebrado, que tiene una reducción localizada, regional o sistémica en el flujo de RBC, puede tener sistemas de transporte de oxígeno que sean por lo demás normales, o pueden tener anomalías adicionales que pueden afectar de forma perjudicial al transporte de oxígeno y transferencia en una parte del organismo, o por todo el organismo como conjunto.

Además, en este método, el vertebrado tiene un volumen de sangre normovolémico antes de la administración de la hemoglobina. Un volumen de sangre normovolémico se define como un volumen de sangre dentro del sistema circulatorio del vertebrado que no provocará choque hipovolémico, tal como puede producirse por una hemorragia masiva o una gran pérdida de fluidos después de vómitos, diarrea, quemaduras o deshidratación. Típicamente, un volumen de sangre normovolémico incluye al menos aproximadamente un 90% del volumen normal de sangre para ese vertebrado. En algunos casos, un volumen normovolémico puede contener tan poco como aproximadamente un 80% del volumen de sangre normal sin provocar choque hipovolémico.

Además, la sangre que constituye el volumen de sangre normovolémico, contiene al menos aproximadamente una concentración normal de RBC. Por ejemplo, la sangre en un volumen de sangre normovolémico de un ser humano típicamente tiene hematocrito en vasos principales de al menos aproximadamente un 30%.

5 En este método, un vertebrado también tiene una resistencia vascular sistémica normal o mayor que la normal en el sistema circulatorio, antes de la administración de la hemoglobina. Una resistencia vascular sistémica normal es una resistencia vascular que no produciría choque distributivo, tal como choque séptico en el vertebrado.

10 El flujo reducido de glóbulos rojos incluye cualquier reducción en el flujo de RBC, localizado, regionalizado y/o sistémico, por debajo de los niveles normales de flujo de RBC, incluyendo un estado de "ausencia de flujo de RBC". El flujo de RBC localizado consiste en RBC que fluyen a través de uno o más capilares dentro de un lecho capilar, donde dichos capilares normalmente proporcionarían un flujo de RBC para oxigenar un área tisular localizada. El flujo regionalizado de RBC proporciona flujo de RBC para oxigenar un área tisular mayor, tal como una extremidad o un órgano. El flujo sistémico de RBC es el flujo a través de los sistemas circulatorios principales del organismo, proporcionando por tanto RBC para oxigenar el organismo como conjunto.

15 En una realización ilustrativa del método de la descripción, se administra la molécula híbrida de hemoglobina (HHM) a un vertebrado que tiene, o tendrá, una obstrucción parcial del sistema circulatorio, tal como una estenosis o un bloqueo vascular, en una cantidad que reduce o imposibilita el flujo de RBC pasada la obstrucción parcial, pero por la que puede fluir al menos algo de plasma. La administración de HHM aumenta la oxigenación tisular en el tejido distal a una obstrucción parcial localizada o regionalizada y/o aumenta la oxigenación tisular en todo el organismo para tratar una obstrucción parcial sistémica.

20 Las RBC son significativamente más grandes que la molécula híbrida de hemoglobina de acuerdo con la descripción, siendo típicamente de 7-10 micrómetros de diámetro, por lo tanto, requiriendo aberturas vasculares significativamente mayores que HHM, para fluir pasada una obstrucción parcial.

25 Las obstrucciones parciales pueden producirse en todas las localizaciones tisulares y en todos los vasos sanguíneos, tales como arterias, venas y capilares. Además, las válvulas dentro del sistema circulatorio, tales como la válvula aortica, mitral y tricúspide, también pueden obstruirse parcialmente. Además, la cámara o las secciones del corazón pueden obstruirse parcialmente, tal como flujos de salida ventricular y la abertura ventricular a la arteria pulmonar.

30 Una obstrucción parcial del sistema circulatorio puede ser temporal, permanente o recurrente. Una obstrucción parcial del sistema circulatorio puede estar causada por diversos medios, tales como defectos de la pared del vaso, enfermedad, lesión, agregación de componentes sanguíneos, neoplasias, lesiones que ocupan el espacio, infecciones, cuerpos foráneos, compresión, fármacos, dispositivos mecánicos, vasoconstricción y vasoespasmos.

35 Una estenosis del sistema circulatorio, como se define en este documento, es un estrechamiento de cualquier canal o lumen en el sistema circulatorio. Típicamente, una estenosis puede producirse por enfermedad, tal como aterosclerosis; una anomalía de la pared del vaso, tal como una línea de sutura desde un injerto arterial, un punto de unión de adhesión para un injerto o una endoprótesis, un ensortijamiento o una deformidad en un vaso, injerto o endoprótesis, tejido curado o cicatrizado de una lesión o de un procedimiento invasivo (por ejemplo, cateterización, angioplastia, colocación de endoprótesis vascular, injerto vascular con prótesis, tejido alogénico y/o tejido autólogo); una prótesis vascular tal como una válvula o vaso artificial; compresión, tal como por una masa neoplásica, hematoma o medio mecánicos (por ejemplo, pinzamiento, torniquete o dispositivo de manguito); envenenamiento químico o efectos secundarios de fármacos; vasoconstricción; y vasoespasmos.

#### 50 **Componente B:**

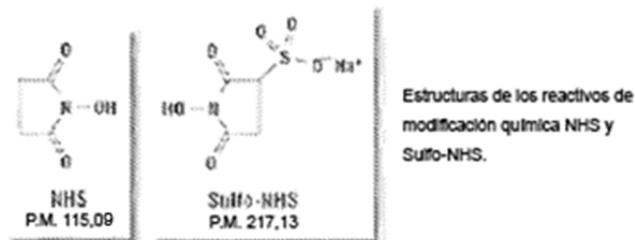
B es el "conector" "puente" entre A y C.

55 En una realización ilustrativa, los componentes A y C se unen por las varias tecnologías de unión comunes que incluyen, aunque sin limitación, Sulfo-NHS de Thermo Scientific Pierce (*N*-hidroxisulfosuccinimida) y su análogo no cargado NHS (*N*-hidroxisuccinimida) que son reactivos de modificación química para convertir grupos carboxilo en ésteres de Sulfo-NHS amina-reactivos para su aplicación en una diversidad de métodos de bioconjugación y reticulación.

60 En una realización ilustrativa, los componentes A y C se unen por puentes físicos además de a través de múltiples interacciones de naturalezas iónica y/o hidrofóbica o de fuerzas de van der Waals (o interacción de van der Waals). La fuerza de atracción o de repulsión entre las moléculas (o entre partes de la misma molécula) diferentes a las debidas a enlaces covalentes o a la interacción electrostática de iones entre sí o con moléculas neutras. El término incluye: fuerza entre un dipolo permanente y un dipolo inducido correspondiente instantáneo de dipolo inducido-dipolo inducido (fuerza de dispersión de London). Estas fuerzas pueden desempeñar una función fundamental en la actividad catalítica biológica de la hemoglobina híbrida y la estabilidad del polímero.

Los enlaces químicos se sintetizan fácilmente mezclando la Sulfo-NHS con una molécula que contiene carboxilo y un agente deshidratante tal como la carbodiimida EDC (EDAC). El método es la base para generar muchos tipos de reactivos de marcaje de proteínas, incluyendo colorantes fluorescentes amina-reactivos, marcas de afinidad por biotina y compuestos de pegilación.

5



En una realización ilustrativa adicional, se usa un agente de reticulación no escindible, impermeable a la membrana, soluble en agua como agente de unión. Este agente de unión es del siguiente modo:

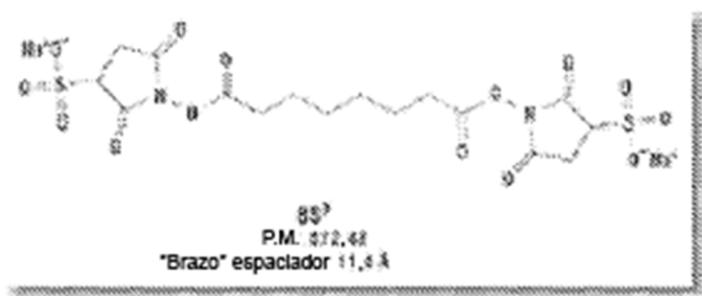
10

Bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS<sup>3</sup>) es un reticulante homobifuncional, soluble en agua no escindible e impermeable a membrana. Contiene un éster de *N*-hidroxisulfosuccinimida (NHS) amina-reactivo en cada extremo de un brazo espaciador de 8-carbonos. Los ésteres de NHS reaccionan con aminas primarias a pH 7-9 para formar enlaces amida estables, junto con la liberación del grupo saliente *N*-hidroxisulfosuccinimida. Las proteínas, incluyendo los anticuerpos, generalmente tienen varias aminas primarias en la cadena lateral de restos de lisina (K) y el extremo *N*-terminal de cada polipéptido que está disponible como dianas para reactivos de reticulación de éster de NHS.

15

Como contiene el resto sulfonilo hidrófilo, el reticulante BS<sup>3</sup> es soluble hasta ~10 mM en agua y muchos tampones habitualmente usados, evitando de ese modo el uso de disolventes orgánicos que pueden alterar la estructura proteica. DSS, el análogo no soluble en agua de BS<sup>3</sup> también está disponible para aplicaciones que requieren un reticulante menos hidrófilo (por ejemplo, para lograr la reticulación intracelular). DSS y BS<sup>3</sup> tienen actividad reticulante esencialmente idéntica hacia aminas primarias.

20



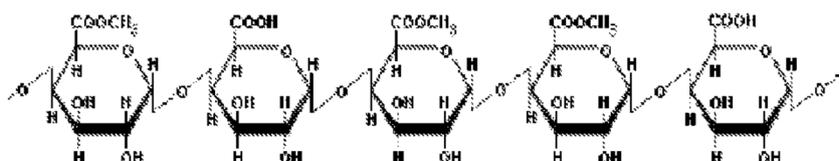
25

### Componente C: derivado de pectina natural

La estructura característica de la pectina natural es una cadena lineal de ácido *D*-galacturónico α-(1-4)-unido que forma la estructura de pectina, un homogalacturonano. La pectina es un polisacárido que actúa como un material de cimentación en las paredes celulares de todos los tejidos vegetales. La parte blanca de la corteza de los limones y de las naranjas contiene aproximadamente un 30% de pectina. La pectina natural es el éster metilado del ácido poligalacturónico, que consiste en cadenas de 300 a 1000 unidades de ácido galacturónico con enlaces 1α→4. El grado de esterificación (DE) afecta a las propiedades gelificantes de la pectina. La estructura mostrada aquí tiene tres formas de éster metílico (-COOCH<sub>3</sub>) por cada dos grupos carboxilo (-COOH), por tanto tiene un grado de esterificación de un 60%, normalmente llamado pectina DE-60.

30

35



La pectina es un polímero de un ácido α-galacturónico con una cantidad variable de grupos de éster metílico.

40

En esta estructura, hay regiones donde el ácido galacturónico está remplazado por L-ramnosa (1-2)-unida. A partir de los restos de ramnosa, las cadenas laterales de diversos azúcares neutros se ramifican. Este tipo de pectina se llama ramnogalacturonano I. Hasta cada 25.º ácido galacturónico en la cadena principal está remplazado con ramnosa. Algunos tramos consisten en ácido galacturónico y ramnosa alternos - "regiones pilosas", otras con

densidad inferior de ramnosa - "regiones suaves". Los azúcares neutros son principalmente D-galactosa, L-arabinosa y D-xilosa, variando los tipos y proporciones de azúcares neutros con el origen de la pectina.

5 Un tercer tipo estructural de pectina es ramnogalacturonano II, que es un polisacárido altamente ramificado y complejo menos frecuente.

La pectina natural aislada tiene un peso molecular de típicamente hasta 400.000 g/mol, variando con el origen y las condiciones de extracción.

10 En la naturaleza, aproximadamente un 80% de los grupos carboxilo del ácido galacturónico están esterificados con metanol. Esta proporción disminuye más o menos durante la extracción de la pectina. La relación de ácido galacturónico esterificado a no esterificado determina el comportamiento de la pectina en aplicaciones alimenticias. Esto es por lo que las pectinas se clasifican como pectinas de alto éster frente a bajo éster - o en pectinas cortas HM frente a LM, con más o menos de la mitad de todo el ácido galacturónico esterificado.

15 Las unidades no esterificadas de ácido galacturónico pueden ser ácidos libres (grupos carboxilo) o sales con sodio, potasio o calcio. Las sales de pectinas parcialmente esterificadas se llaman pectinatos, si el grado de esterificación es por debajo de un 5% las sales se llaman pectatos, la forma de ácido insoluble, ácido péctico.

20 La pectina amidada es una forma modificada de pectina. Aquí, parte del ácido galacturónico se convierte con amoníaco en amida de ácido carboxílico. Estas pectinas son más tolerantes a concentraciones variables de calcio que se producen en uso.

25 Las pectinas de alto éster sedimentan a temperaturas mayores que las pectinas de bajo éster. Sin embargo, las reacciones de gelificación con calcio aumentan según cae el grado de esterificación. Asimismo, valores de pH inferiores o sólidos solubles mayores (normalmente azúcares) aumentan la velocidad de gelificación.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para producir una molécula híbrida de hemoglobina, útil para formar un sustituto de sangre estable, a partir de hemoglobina contenida en una solución de hemoglobina, que comprende las etapas de:
- 5 a) desoxigenar dicha solución de hemoglobina;
- b) mezclar dicha solución de hemoglobina desoxigenada con un compuesto sulfhidrilo;
- 10 c) mezclar dicha solución de compuesto sulfhidrilo y hemoglobina con un agente reticulante para formar una mezcla de reacción de polimerización;
- d) polimerizar la mezcla de reacción de polimerización, formando de ese modo una solución de hemoglobina polimerizada;
- 15 e) hacer reaccionar dicha solución de hemoglobina polimerizada con agentes de unión convirtiendo de ese modo los grupos carboxilo en ésteres de Sulfo-NHS amina-reactivos que forman una molécula reactiva precursora; y
- 20 f) hacer reaccionar dicha molécula reactiva precursora con un polisacárido, en el que el polisacárido es un derivado de pectina natural.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha solución de hemoglobina comprende hemoglobina de mamífero.
- 25 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha solución de hemoglobina de mamífero se forma a partir de hemoglobina seleccionada de un grupo que consiste en hemoglobina humana, hemoglobina bovina, hemoglobina ovina, hemoglobina porcina.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la solución de hemoglobina desoxigenada tiene un contenido de oxihemoglobina de menos de aproximadamente un 10%.
- 30 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polisacárido es un ácido ramnogalacturónico sustancialmente metoxilado.
- 35 6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho compuesto sulfhidrilo se selecciona del grupo que consiste en N-acetil-L-cisteína, D,L-cisteína, glutatión, gamma-glutamyl-cisteína, 2,3-dimercapto-1-propanol, tioglicolato y 1,4-butanoditiol, o una fórmula general tiol-[CHO]<sub>n</sub>-tiol, para formar una solución del compuesto sulfhidrilo y dicha hemoglobina.
- 40 7. El método de la reivindicación 1, en el que dicha molécula híbrida de hemoglobina es una hemoglobina estabilizada protegida por carbohidrato.
8. Uso de una molécula híbrida de hemoglobina, preparada por el método de la reivindicación 1, para tratar un órgano hipóxico, que tiene heterogeneidad de oxígeno debido a proliferación incontrolada.
- 45 9. Uso de una molécula híbrida de hemoglobina, preparada por el método de la reivindicación 1, para aumentar la oxigenación tisular y, por consiguiente, aumentar la función orgánica de un vertebrado, mientras el órgano tiene suministro reducido de oxígeno debido a al menos una obstrucción parcial de un vaso sanguíneo dentro del sistema circulatorio del vertebrado, y en el que el vertebrado tiene un volumen de sangre normovolémico y al menos una resistencia vascular sistémica normal.
- 50 10. El uso de la reivindicación 8, en el que dicha molécula híbrida de hemoglobina es una hemoglobina estabilizada protegida por carbohidrato.
- 55 11. El uso de la reivindicación 8, en el que el órgano es un órgano con traumatismo seleccionado del grupo que consiste en músculo, corazón, cerebro, pulmón y piel.
12. El uso de la reivindicación 11, en el que el corazón tiene una estenosis parcial seleccionada del grupo que consiste en una estenosis del vaso sanguíneo, una estenosis de válvula, una estenosis de una abertura en el corazón y una estenosis de una cámara del corazón.
- 60 13. Uso de una molécula híbrida de hemoglobina, preparada por el método de la reivindicación 1, para aumentar la oxigenación tisular y, por consiguiente, aumentar la función orgánica de un vertebrado, mientras el órgano tiene suministro reducido de oxígeno debido a al menos una obstrucción parcial de un vaso sanguíneo dentro del sistema circulatorio del vertebrado, y en el que el vertebrado tiene un hematocrito de vasos principales de al menos aproximadamente un 30% y al menos una resistencia vascular sistémica normal.
- 65

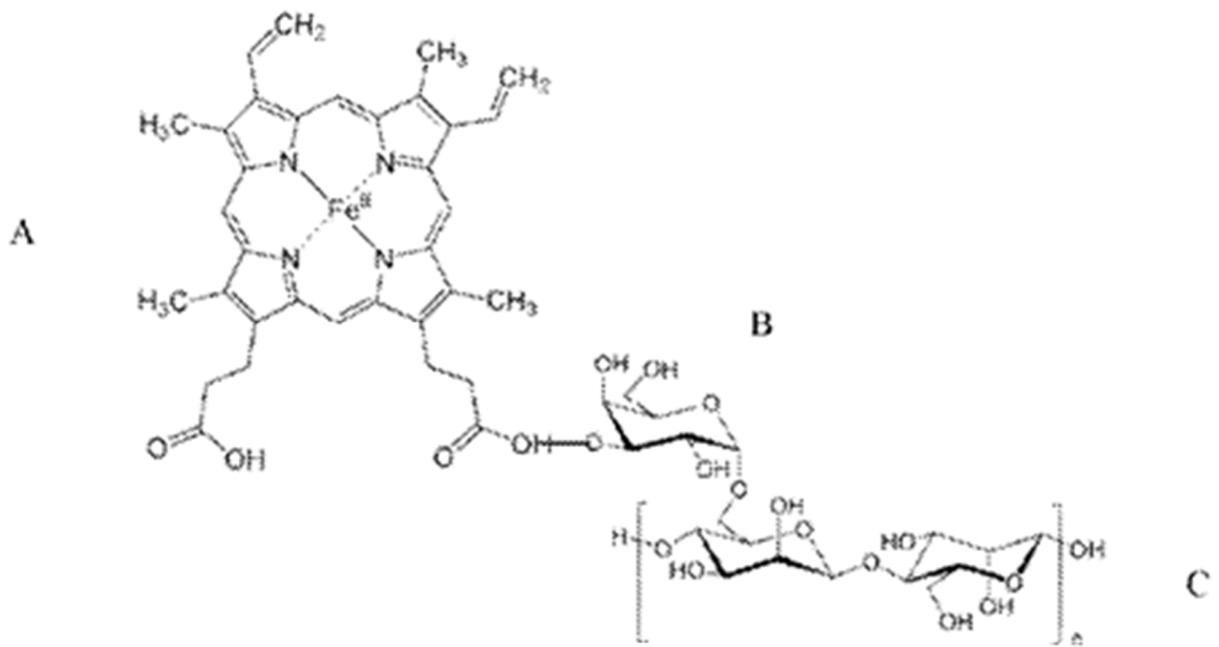


Figura 1