

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 462**

51 Int. Cl.:

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 38/42 (2006.01)

A61K 47/18 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2010 PCT/US2010/038046**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.12.2010 WO10144629**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2010 E 10727289 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2440239**

54 Título: **Composiciones de hemoglobina**

30 Prioridad:

09.06.2009 US 185547 P

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

23.11.2017

73 Titular/es:

**PROLONG PHARMACEUTICALS, LLC (100.0%)
300 Corporate Court Suite B
South Plainfield, NJ 07080, US**

72 Inventor/es:

**ABUCHOWSKI, ABRAHAM;
SLOSHBERG, STEVEN y
O'HARE, KEITH**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 643 462 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

Campo de la invención

5 La presente invención reside en el campo de sustitutos de la sangre y fluidos de reanimación, incluyendo la proteína modificada por polímero, por ejemplo, hemoglobina, formulaciones capaces de suministrar oxígeno o monóxido de carbono a los tejidos.

Antecedentes de la invención

10 El traumatismo es una de las principales causas de muerte en los Estados Unidos. La principal razón para la alta velocidad de mortalidad es la incapacidad para mantener la oxigenación del tejido del paciente entre el momento de la lesión y el tiempo de la cirugía en un centro médico. La falta de oxigenación resulta en daño tisular, fallo orgánico y muerte. Por lo tanto, un enfoque principal en el tratamiento del choque traumático es administrar agentes terapéuticos que proporcionan tanto oxígeno como sea posible a los tejidos y a los órganos internos de los pacientes.

15 Un enfoque obvio para mantener la oxigenación es la transfusión de sangre. Sin embargo, existen problemas prácticos significativos en la utilización de sangre en el tratamiento de puntos de atención que hacen que el uso rutinario de sangre humana almacenada para su uso fuera del centro médico sea poco práctico en una amplia base de distribución. Los enfoques estándar para tratar un traumatismo implican principalmente el mantenimiento del volumen circulante intravascular a través de la administración de ya sea soluciones isotónicas, hipertónicas o hiperoncóticas. Estos tratamientos no pueden aumentar uniformemente la oxigenación de los tejidos y órganos internos lo suficiente para prevenir con eficacia la isquemia y la insuficiencia de órganos.

20 Como consecuencia, existe un gran esfuerzo para desarrollar portadores de oxígeno basados en hemoglobina (HBOC) que son capaces de restablecer la capacidad portadora de oxígeno de los pacientes con traumatismo. Los HBOC tienen una serie de ventajas sobre el uso de sangre humana almacenada, incluyendo una menor probabilidad de transmisión de enfermedades, sin reactividad inmunológica, falta de necesidad de determinar el tipo de sangre y, lo que es más importante, mayor disponibilidad con menores requerimientos de almacenamiento. Varios grupos han desarrollado HBOC y varias compañías han llevado a cabo ensayos clínicos para desarrollar sus productos basados en hemoglobina como sustitutos de la sangre. La hemoglobina (HGB) aislada de sangre humana o animal, o un portador de oxígeno producido sintéticamente, tal como perfluorocarbono, son dos tipos de sustitutos de la sangre que han estado en ensayos clínicos. Otros sustitutos de glóbulos rojos, también se han desarrollado y caracterizado para su uso en pacientes. (Véase, por ejemplo, Red Blood Cell Substitutes, 1998, (Eds.) A. S. Rudolph, R. Rabinovici, and G. Z. Feuerstein, Dekker, New York, N.Y.). Tales sustitutos de glóbulos rojos se pueden usar juntamente con terapias médicas estándar, tales como sangre transfundida o productos sanguíneos. Como un ejemplo específico, Enzon, Inc. (Piscataway, N.J.), ha desarrollado una hemoglobina bovina modificada con polietilenglicol (PEG), abreviado PEG-HGB. PEG-HGB se produce mediante un procedimiento en el que las hebras de PEG se reticular a las superficies de moléculas de HGB, por ejemplo, como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,386,014 y 5,234,903 de Nho et al.). Otros ejemplos específicos incluyen Hemopure™ y Oxyglobin (Biopure, Cambridge, Mass.). Sin embargo, ninguno de estos productos se ha establecido para producir aumentos significativos en la oxigenación de tejidos y ninguno ha recibido la aprobación de la FDA, ya sea porque son ineficaces o producen una toxicidad significativa.

40 La falta de HBOC apropiados ha impedido en gran medida la investigación básica en la fisiología de la oxigenación de tejidos y nuestra comprensión de los mecanismos críticos implicados en el choque y su consiguiente daño tisular. Con respecto a los HBOC que han sido sometidos a pruebas clínicas y han producido una toxicidad significativa, se dispone de escasa información sobre la causa de estas toxicidades.

45 De este modo, los métodos de tratamiento de la hemorragia inducida por traumatismos son actualmente insuficientes. Mientras que la transfusión de sangre puede restaurar el oxígeno a los tejidos y reponer el volumen circulante perdido, el uso de la sangre como un medio para tratar la hemorragia fuera del centro médico tiene importantes problemas prácticos. En primer lugar, generalmente hay cantidades limitadas de sangre disponibles y para cada persona tratada, la determinación del tipo de sangre es necesaria para prevenir la muerte del paciente por una reacción inmune. Sin embargo, el problema más importante en el uso de la sangre para tratar a los pacientes con traumatismo fuera del centro médico es el almacenamiento y las limitaciones de envasado inherente en el uso de este tejido. De este modo, las transfusiones de sangre no se emplean normalmente en el tratamiento del punto de atención de los pacientes con traumatismo.

50 De hecho, los enfoques estándar para tratar un traumatismo implican principalmente el mantenimiento del volumen circulante intravascular a través de la administración de soluciones isotónicas, hipertónicas o hiperoncóticas. Estos enfoques están destinados a proporcionar reposición a corto plazo del volumen circulatorio y también pueden aumentar el flujo sanguíneo y, por consiguiente, el suministro de oxígeno a los tejidos. Sin embargo, cuando la hemorragia es severa, estos tratamientos no pueden aumentar uniformemente la oxigenación de los tejidos y órganos internos lo

suficiente para prevenir con eficacia la isquemia y la insuficiencia de órganos. Como consecuencia, se tiene una alta velocidad de mortalidad de las personas sujetas a traumatismo severo.

5 El documento US2004/0072729 describe soluciones que comprenden conjugados de polietilenglicol (SP-PEG) y hemoglobina que tienen una P50 entre 6 y 14 mmHg (Tabla 3: 10 mmHg). El documento US2004/0072729 también describe que se puede adicionar cisteína como estabilizante.

10 Durante años se han hecho intentos para desarrollar portadores de oxígeno basados en hemoglobina (HBOC) que son capaces de proporcionar oxígeno a los pacientes con traumatismo. Los HBOC tienen una serie de ventajas sobre el uso de sangre humana almacenada sin muchos de los problemas asociados con el uso de sangre para tratar un traumatismo. Estas ventajas incluyen una menor probabilidad de transmisión de enfermedades, no hay reactividad inmune, falta de necesidad de determinar el tipo de sangre, y lo más importante es la disponibilidad mejorada con menores requerimientos de almacenamiento. Idealmente, los HBOC deben ser capaces de unir el oxígeno y liberarlo a los tejidos necesarios. Debe estar en una solución lista para usar que está en una forma que es estable durante meses en la mayoría de las condiciones ambientales, especialmente aquellas comúnmente encontradas en condiciones de atención en las que los pacientes con traumatismo necesitan tratamiento.

15 A lo largo de los años se han hecho varios intentos para desarrollar HBOC como agentes terapéuticos de oxígeno usando hemoglobina humana ya sea nativa o recombinante, formas modificadas de hemoglobina humana o formas modificadas de hemoglobina desde otras especies. La hemoglobina no modificada se puede utilizar como agente terapéutico de oxígeno, sin embargo, se une a NOx y causa una vasoconstricción y una hipertensión severas. Como consecuencia de su peso molecular, la hemoglobina puede causar toxicidades significativas, especialmente en el riñón
20 donde obstruye el aparato glomerular. Como consecuencia, la mayoría de las hemoglobinas que se han probado en seres humanos se modifican para prolongar su vida media y reducir su toxicidad.

Un objeto de la invención es proporcionar nuevas moléculas que transportan y suministran oxígeno y monóxido de carbono que pueden servir como sustitutos de la sangre y/o tienen actividad terapéutica, y procedimientos para la preparación de estas moléculas.

25 Es un objeto adicional de esta invención proporcionar hemoglobina estabilizada e inactivada viralmente y conjugados de hemoglobina con polímeros solubles en agua útiles como agentes terapéuticos en medicina transfusional, la inactivación viral que hace que la hemoglobina nativa y las formulaciones de hemoglobina resultantes estén esencialmente libres de agentes infecciosos transmisibles. Los conjugados son capaces de suministrar oxígeno o monóxido de carbono unido a la hemoglobina a los tejidos.

30 Resumen de la invención

Entre sus numerosas realizaciones, la presente invención proporciona una molécula de PEG-hemoglobina ("PEG-Hb"), que puede transportar y difundir tanto oxígeno como monóxido de carbono (CO) en la vasculatura de mamíferos y en tejidos en contacto con la vasculatura y/o en contacto con la hemoglobina. Las composiciones de la invención incluyen hemoglobina nativa, funcional y soluble en agua. La composición incluye una fracción de hemoglobina soluble en agua,
35 que comprende un grupo de moléculas de hemoglobina nativas funcionales. Cada miembro de este grupo de moléculas de hemoglobina se conjuga covalentemente con al menos una molécula de dicho poli(etilenglicol) a través de una unidad estructural amina de un residuo de aminoácido (por ejemplo, una unidad estructural ε-amina de un residuo de lisina), está sustancialmente libre de agentes químicos de reticulación y tiene una P₅₀ desde 9 mm Hg a 14 mm Hg. La composición también incluye una fracción estabilizadora soluble en agua. La fracción estabilizadora hace que el grupo de moléculas de hemoglobina sea resistente a la oxidación. La fracción estabilizadora incluye un agente estabilizante que comprende un elemento estructural que es más reactivo con oxígeno (o especies reactivas de oxígeno (ROS)) que son las moléculas de hemoglobina. La composición incluye una fracción diluyente, generalmente una fracción diluyente acuosa. La fracción diluyente incluye un diluyente farmacéuticamente aceptable en el que la fracción de hemoglobina es soluble, opcionalmente en la que la fracción estabilizadora es también soluble. La composición comprende menos del
40 5% de metahemoglobina. El compuesto es viralmente inactivado, haciendo que la composición quede libre de actividad viral. La composición se prepara mediante un método que comprende:

i. someter una solución de hemoglobina desoxigenada y un agente estabilizante a un procedimiento térmico de inactivación viral que comprende: exponer dicha solución a una temperatura elevada suficientemente para inactivar toda la actividad viral en dicha solución (por ejemplo, 60°C), siendo dicha exposición durante un tiempo suficiente para lograr dicha inactivación de toda la actividad viral en dicha solución (por ejemplo, 10 horas),
50

comprendiendo dicho agente estabilizante un elemento estructural más reactivo con el oxígeno que dicha hemoglobina desoxigenada en dicha solución, minimizando así la unión del oxígeno por dicha hemoglobina desoxigenada, comprendiendo dicha solución una cantidad de dicho agente estabilizante suficiente para prevenir la formación de más de 5% de metahemoglobina en dicho procedimiento térmico de desactivación viral; y después de reoxigenar dicha hemoglobina desoxigenada para formar una solución de hemoglobina inactivada viralmente reoxigenada; y
55

ii. poner en contacto dicha solución de hemoglobina inactivada viralmente reoxigenada de la etapa (i) con una molécula activada de poli(etilenglicol) de reactividad complementaria a un residuo de aminoácido de dicha hemoglobina, formando así un conjugado covalente entre moléculas de poli(etilenglicol) y hemoglobina en dicha solución.

5 En realizaciones de ejemplo, la invención proporciona un conjugado de hemoglobina capaz de transferir oxígeno o monóxido de carbono desde la molécula de hemoglobina a tejidos in vivo (por ejemplo, a tejidos). La composición incluye un conjugado covalente entre una molécula de hemoglobina nativa funcional, opcionalmente desoxigenada y al menos una molécula de poli(etilenglicol). La hemoglobina se conjuga con al menos una molécula de poli(etilenglicol) (PEGilada), porque esta modificación prolonga la semivida de la hemoglobina natural. Esto supera un problema importante de la semivida corta in vivo de la propia hemoglobina nativa, y de algunos de los HBOC previamente desarrollados. Además, al prolongar la semivida de la hemoglobina, a través de la unión de tales polímeros, se aumenta el tamaño físico de la molécula. En realizaciones de ejemplo, la conjugación conduce a la formación de menos productos de degradación, reduciendo la posibilidad de toxicidad renal encontrada con hemoglobina nativa, así como con otros HBOC menos estables. La PEGilación reduce el reconocimiento inmunológico de la hemoglobina. De este modo, la hemoglobina de especies no humanas se puede utilizar en las composiciones y métodos de la invención. En una realización de ejemplo, la hemoglobina es hemoglobina bovina. La composición es una composición conjugada de hemoglobina inactivada viralmente.

20 La composición incluye una fracción de hemoglobina soluble en agua que comprende un grupo de moléculas de hemoglobina. El grupo de moléculas de hemoglobina está opcionalmente desoxigenada y está covalentemente conjugado con al menos una molécula de poli(etilenglicol) a través de una unidad estructural amina de un residuo de aminoácido (por ejemplo, una fracción s-amina de un residuo de lisina);. El conjugado de hemoglobina en la fracción de hemoglobina está libre de agentes químicos de reticulación; y tiene una P_{50} desde 9 mm Hg a 14 mm Hg, opcionalmente a aproximadamente 12 mm Hg. Las composiciones de ejemplo también incluyen una fracción estabilizadora soluble en agua que hace que el grupo de moléculas de hemoglobina sea resistente a la oxidación. La fracción estabilizadora incluye un agente estabilizante. Los agentes estabilizantes incluyen un elemento estructural que evita la reoxigenación de la hemoglobina desoxigenada. El agente estabilizante es más reactivo con el oxígeno que los miembros del grupo de moléculas de hemoglobina. La composición también incluye una fracción diluyente. Las fracciones diluyentes son diluyentes farmacéuticamente aceptables en los que la fracción de hemoglobina es soluble. La composición está esencialmente libre de actividad viral, e incluye menos del 5% de metahemoglobina.

30 La invención proporciona una composición de hemoglobina inactivada viralmente que comprende hemoglobina nativa funcional, opcionalmente desoxigenada, soluble en agua. La composición se prepara mediante un método que comprende, someter una solución de hemoglobina desoxigenada y un agente estabilizante a un procedimiento térmico de inactivación viral. El procedimiento térmico de inactivación viral incluye exponer la solución a una temperatura elevada suficientemente para inactivar esencialmente toda la actividad viral en la solución (por ejemplo, 60°C). El tratamiento a temperatura elevada es durante un tiempo suficiente para lograr la inactivación de esencialmente toda la actividad viral en la solución (por ejemplo, 10 horas). El agente estabilizante incluye un elemento estructural que evita la reoxigenación de la hemoglobina desoxigenada. Este elemento estructural se selecciona de modo que sea más reactivo con oxígeno o ROS que con la hemoglobina desoxigenada. El agente estabilizante cumple la función de minimizar la unión del oxígeno por la hemoglobina desoxigenada. En diversas realizaciones, la solución incluye una cantidad del agente estabilizante suficiente para prevenir la formación de más de 5% de metahemoglobina durante el procedimiento térmico de desactivación viral.

45 En realizaciones de ejemplo, la invención proporciona una composición de hemoglobina que comprende hemoglobina nativa funcional, desoxigenada, soluble en agua. Esta composición incluye menos del 5% de metahemoglobina. Cuando la composición está inactivada viralmente, se prepara opcionalmente mediante un método que comprende calentar una solución precursora de hemoglobina hasta aproximadamente 60°C, durante aproximadamente 12 horas (por ejemplo, desde aproximadamente 1 a aproximadamente 4 horas). La solución precursora incluye un agente estabilizante. El agente estabilizante incluye un elemento estructural que evita la reoxigenación de la hemoglobina desoxigenada. Este elemento estructural se selecciona de modo que sea más reactivo con el oxígeno que con la hemoglobina desoxigenada. El agente estabilizante cumple la función de minimizar la unión del oxígeno por la hemoglobina desoxigenada.

50 En una realización de ejemplo, la invención proporciona un método de preparación de la composición de hemoglobina de la invención. La composición incluye hemoglobina nativa soluble en agua, funcional, opcionalmente desoxigenada. La composición incluye una fracción de hemoglobina soluble en agua que comprende un grupo de moléculas de hemoglobina nativas, funcionales en las que cada miembro del grupo de moléculas de hemoglobina está en un estado opcionalmente desoxigenado; está sustancialmente libre de agentes químicos de reticulación; y tiene una P_{50} de 9 mm Hg a 14 mm Hg. La composición incluye una fracción estabilizadora soluble en agua, que incluye un agente estabilizante. El agente estabilizante incluye un elemento estructural que evita la reoxigenación de la hemoglobina desoxigenada. Este elemento estructural se selecciona de modo que sea más reactivo con el oxígeno que con la hemoglobina desoxigenada. El agente estabilizante cumple la función de minimizar la unión del oxígeno por la hemoglobina desoxigenada, manteniendo así las moléculas de hemoglobina en un estado desoxigenado. La composición incluye una fracción diluyente. La fracción diluyente incluye un diluyente farmacéuticamente aceptable en el que la fracción de hemoglobina es soluble. Las composiciones están esencialmente libres de actividad viral, y

comprenden menos del 5% de metahemoglobina. La composición está inactivada viralmente. El método de preparación de la composición inactivada viralmente incluye someter una mezcla que incluye la fracción de hemoglobina y la fracción estabilizadora a un procedimiento térmico de inactivación viral. El procedimiento térmico de inactivación viral incluye exponer la mezcla a una temperatura elevada suficientemente para inactivar esencialmente toda la actividad viral en la mezcla. El período de tiempo durante el cual la mezcla se encuentra a la temperatura elevada es suficiente para lograr dicha inactivación de esencialmente toda la actividad viral en dicha mezcla.

En cada una de las composiciones expuestas anteriormente, la hemoglobina se oxigena otra vez. En una realización, la hemoglobina se oxigenó otra vez después de la inactivación viral. Alternativamente, la hemoglobina está unida al monóxido de carbono. La unión al monóxido de carbono puede ocurrir en esencialmente cualquier punto durante la preparación de la composición o después de que se prepara la composición. En una realización de ejemplo, en la composición desoxigenada, el Fe (II) de la hemoglobina está unido a monóxido de carbono

La presente invención también proporciona las composiciones descritas en este documento para uso en métodos de tratamiento de traumatismos, choque, isquemia y otras enfermedades que son modificables para mejorar mediante el aumento del contenido de oxígeno o monóxido de carbono en tejidos u órganos. Las composiciones de la invención restituyen rápidamente la oxigenación tisular y compensan totalmente la deuda de oxígeno en modelos animales de choque traumático severo en los que al menos el 50% de los sujetos mueren normalmente por choque hemorrágico. Utilizando una formulación de ejemplo, una sola unidad de una composición de la invención compensa la deuda de oxígeno a todos los órganos principales, abre la microvasculatura y restituye la presión arterial media. Diversas composiciones de la invención son más eficaces y más rápidas revirtiendo la deuda de oxígeno que los glóbulos rojos empaquetados. En una realización de ejemplo, una formulación de la invención compensa al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 100% de deuda de oxígeno en un sujeto en aproximadamente 60 minutos a aproximadamente 160 minutos después de la administración de la formulación al sujeto. Alternativamente, las composiciones de la invención aumentan la concentración de monóxido de carbono en un tejido. En una realización de ejemplo, la formulación que devuelve la deuda de oxígeno o que aumenta el contenido de monóxido de carbono en los tejidos, incluye un conjugado de hemoglobina PEGilada de la invención.

De este modo, en una realización de ejemplo, la invención proporciona las composiciones descritas en este documento para uso en un método de suministro de oxígeno o monóxido de carbono a un miembro seleccionado de tejidos y órganos de un sujeto que necesita tal suministro. En una realización de ejemplo, el método incluye administrar al sujeto una cantidad de una composición de cualquiera de la invención suficiente para realizar el suministro de oxígeno o monóxido de carbono a uno o más tejidos y/u órganos.

En diversas realizaciones, la invención proporciona las composiciones descritas en este documento para uso en un método de revertir la deuda de oxígeno en un miembro seleccionado de tejidos y órganos de un sujeto que sufre de choque hemorrágico. En una realización de ejemplo, el método incluye administrar al sujeto una cantidad de una composición de cualquiera de la invención suficiente para revertir la deuda de oxígeno. También se proporcionan las composiciones descritas en este documento para uso en un método para aumentar el contenido de monóxido de carbono de un tejido, ya sea en respuesta a una pérdida de contenido de monóxido de carbono debido a una enfermedad, lesión, etc., o como un medio para obtener beneficios terapéuticos desde el aumento del contenido de monóxido de carbono en el tejido sobre los niveles normales encontrados en el tejido en un estado sano o de enfermedad.

En diversas realizaciones, la invención proporciona las composiciones descritas en este documento para uso en un método para inducir la angiogénesis en los tejidos de un sujeto mediante la administración al sujeto de una cantidad de una composición de la invención eficaz para inducir angiogénesis. En realizaciones de ejemplo, la angiogénesis se induce en tejidos que sufren de deficiencia de oxígeno. En otras realizaciones de ejemplo, los tejidos u órganos en los que se induce la angiogénesis son tejidos u órganos de un sujeto que sufre de deficiencia de oxígeno. En una realización de ejemplo, el método incluye administrar al sujeto una cantidad de una composición de cualquiera de la invención suficiente para revertir la deficiencia de oxígeno.

En diversas realizaciones, la invención proporciona las composiciones descritas en este documento para uso en un método para aumentar el flujo de sangre a tejidos que sufren de deficiencia de oxígeno. El método consiste en administrar al sujeto una cantidad de una composición de la invención eficaz para aumentar el flujo de sangre a los tejidos que sufren de deficiencia de oxígeno. En una realización de ejemplo, el tejido u órgano es un tejido o un órgano de un sujeto que sufre un flujo sanguíneo deficiente. En una realización de ejemplo, el método incluye administrar al sujeto una cantidad de una composición de cualquiera de la invención suficiente para revertir el flujo sanguíneo deficiente.

En diversas realizaciones, la invención proporciona las composiciones descritas en este documento para uso en un método para disminuir el daño neurológico y/o tejido infartado en tejidos que sufren de deficiencia de oxígeno. En una realización de ejemplo, el método incluye administrar a un sujeto y cantidad de una composición de la invención suficiente para disminuir el daño neurológico y/o infarto en el tejido que sufre de deficiencia de oxígeno. En una realización de ejemplo, el método incluye administrar al sujeto una cantidad de una composición de cualquiera de la invención suficiente para revertir la cantidad de tejido dañado neurológicamente y/o infartado.

En cada una de las realizaciones expuestas anteriormente, la hemoglobina en la formulación puede estar unida a oxígeno, monóxido de carbono o a ninguno de los dos. Además, las formulaciones en las que se incorpora el conjugado de hemoglobina pueden ser hipotónicas, isotónicas o hipertónicas relevantes para la tonicidad de la sangre de los sujetos.

5 Otras realizaciones, objetos y ventajas de la invención son evidentes a partir de la descripción detallada que sigue.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama de flujo de producción de una PEG-Hb de ejemplo.

La figura 2 es una comparación gráfica de PEG-Hb/HS y otros tratamientos para revertir la deuda de oxígeno en un modelo animal de choque traumático.

10 La figura 3 muestra la presión arterial (A) y el flujo Doppler láser, medido sobre la corteza parietal lateral y expresado como porcentaje de la línea base (B), durante 2 h de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) y los primeros 30 min de reperfusión en los grupos de ratas sometidas ya sea a no transfusión o transfusión con 10 ml/kg de PEG-albúmina o PEG-COHB a 20 min de MCAO (media \pm SE; n = 10 por grupo).

15 La figura 4 muestra la puntuación del déficit neurológico en una escala 0-4 (0 = sin déficit) a 1 o 24 h de reperfusión después de 2 h de MCAO en grupos sin transfusión o con transfusión de PEG-albúmina o PEG-COHB a 20 min de MCAO (media \pm SE; n = 10). * P <0.05 entre grupos PEG-COHB frente a grupos sin transfusión y PEG-albúmina.

20 La figura 5 es una representación gráfica del volumen del infarto en cada una de las 7 secciones coronales para la corteza cerebral (A) y estriado (B), y el volumen total de infarto se suma en las 7 secciones para corteza cerebral y estriado (C). Los valores se expresan como un porcentaje de la estructura total contralateral (media \pm SE, n = 10). * P <0.05 entre el grupo PEG-COHB frente a grupos sin transfusión y PEG-albúmina.

La figura 6 muestra que la cantidad de tejido cerebral viable (teñido oscuro) es mayor en ratas transfundidas con PEG-COHB (imagen derecha) de la invención, que en una rata control no infundida con PEG-COHB de la invención (imagen izquierda).

Descripción detallada de la invención

25 Introducción

30 Existe una necesidad de un agente de transferencia de oxígeno para tratar o prevenir la hipoxia resultante de una enfermedad, lesión e insulto, por ejemplo, pérdida de sangre (por ejemplo, de hemorragia aguda o durante operaciones quirúrgicas), resultante de anemia (por ejemplo, anemia perniciosa o anemia falciforme), o como resultado de choque (por ejemplo, choque por deficiencia de volumen, choque anafiláctico, choque séptico o choque alérgico). El uso de sangre total o de fracciones de sangre en estas capacidades presenta numerosas desventajas. Por ejemplo, el uso de sangre completa a menudo va acompañado del riesgo de transmisión de cualquier número de virus, incluyendo virus productores de hepatitis y virus que producen AIDS, lo que puede complicar la recuperación del paciente o dar como resultado muertes de pacientes. Además, el uso de sangre entera requiere la determinación del tipo de sangre y la compatibilidad cruzada para prevenir problemas inmunohematológicos e incompatibilidad entre donantes.

35 También existe una necesidad de agentes terapéuticos capaces de suministrar oxígeno o monóxido de carbono a tejidos en un sujeto. El agente terapéutico es útil para tratar, *inter alia*, las condiciones asociadas con la pérdida de sangre, e isquemia.

40 La presente invención satisface ambas necesidades mediante la provisión de formulaciones de PEG-hemoglobina en las que la hemoglobina está unida al oxígeno, unida al monóxido de carbono o no está unida a ninguna de las dos. El conjugado de hemoglobina se formula en un medio que es hipotónico, isotónico o hipertónico con respecto a la tonicidad de la sangre del sujeto al que se administra la formulación.

45 La hemoglobina humana, como un agente de suministro de oxígeno, un agente de suministro de CO y/o un sustituto de la sangre, posee actividad osmótica y la capacidad de transportar y transferir oxígeno, pero tiene el inconveniente de una eliminación rápida de la circulación por la vía renal y a través de las paredes vasculares, dando como resultado daño en los órganos y una semivida muy corta y, por lo tanto, insatisfactoria. Además, la hemoglobina humana también está frecuentemente contaminada con niveles tóxicos de endotoxinas, bacterias y/o virus.

La hemoglobina no humana sufre de las mismas deficiencias que la hemoglobina humana. Además, la hemoglobina de fuentes no humanas tiene el potencial de causar una respuesta del sistema inmune en el receptor.

50 La presente invención proporciona una formulación de hemoglobina y las formulaciones descritas en este documento para su uso en el tratamiento y la mejora de la hipoxia debida a enfermedad, lesión e insulto, o para suministrar CO a

tejidos en estos estados. Las formulaciones se inactivan viralmente y la hemoglobina se conjuga con al menos una molécula de poli(etilenglicol) (PEGilada). Las formulaciones de hemoglobina de la invención incluyen moléculas de hemoglobina con una P_{50} desde 9 mm Hg a 14 mm Hg que es diferente de la de la hemoglobina humana de origen natural. Las formulaciones de hemoglobina de la invención invierten la deuda de oxígeno en traumatismo, como se demuestra en un modelo animal de traumatismo severo, indicando que tiene una capacidad superior de transporte de oxígeno in vivo en comparación con otros productos. Una formulación de ejemplo de la invención es capaz de restituir rápidamente la oxigenación tisular y compensar completamente la deuda de oxígeno en traumatismo, como se demuestra en un modelo animal de choque traumático severo en el que al menos el 50% de los sujetos mueren normalmente por choque hemorrágico. Una sola unidad de una formulación de ejemplo de la invención compensa la deuda de oxígeno a todos los órganos principales, abre la microvasculatura y restituye la presión arterial media. Las formulaciones de ejemplo también proporcionan una estabilidad superior y capacidad de almacenamiento sobre cualquier otro HBOC. Una formulación de ejemplo es suficientemente estable para permanecer totalmente eficaz en un modelo animal después del almacenamiento durante al menos 4 semanas a 45°C (113°F), una condición ambiental extrema que valida que las formulaciones de ejemplo de la invención son útiles en situaciones de emergencia en un punto de atención.

Diversas formulaciones de la invención para uso clínico incluyen hemoglobina PEGilada, por ejemplo, hemoglobina bovina, y solución salina isotónica o hipertónica (PEG-Hb/HS) y hemoglobina PEGilada en forma de CO (PEG-Hb-CO) con o sin altas concentraciones de sal (esto es, isotónicas o hipertónicas). Las formulaciones de ejemplo de acuerdo con estas realizaciones aumentan la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre a través de su contenido de hemoglobina y aumentan el suministro de oxígeno a los tejidos dilatando la vasculatura (a través de sus acciones hipertónico-oncóticas o efecto de CO) y actuando como agente de transferencia de oxígeno entre los glóbulos rojos y los tejidos. Las formulaciones de ejemplo de la invención son también útiles para tratar la anemia de falciforme, los accidentes cerebrovasculares o la isquemia periférica debida a la diabetes. Una formulación de ejemplo incluye PEG-Hb-CO, y es altamente estable y tiene propiedades farmacológicas deseables. En diversas realizaciones, el PEG-Hb-CO tiene propiedades vasodilatadoras. En diversas realizaciones, el PEG-Hb-CO tiene propiedades antioxidantes. En diversas realizaciones, las formulaciones de PEG-Hb de la invención no dan lugar a especies reactivas de oxígeno en una cantidad suficiente para causar daño tisular. Esta formulación se puede usar para tratar cualquiera de las enfermedades, insultos o lesiones discutidas en este documento. En una realización de ejemplo, se proporciona la formulación descrita en este documento para uso en el tratamiento de la isquemia. Ejemplos de tipos de isquemia tratables por esta composición incluyen isquemia cerebral e isquemia diabética. De acuerdo con lo anterior, la invención proporciona las formulaciones descritas en este documento para su uso en métodos para tratar, mejorar y prevenir el daño posterior de eventos isquémicos. Un ejemplo de tipo de isquemia tratable por las composiciones de la invención es la isquemia periférica, por ejemplo, la isquemia diabética periférica.

Definiciones

"CO" se refiere a monóxido de carbono.

"HS" se refiere a sales altas, una formulación hipertónica.

"Sanguinate™" como se usa en este documento se refiere a una composición de PEG-HbCO de la invención.

Los términos "sustituto de la sangre", "fluido de reanimación", "PEG-Hb", "PEG-CO-Hb", "portador de oxígeno a base de hemoglobina" (HBOC) y "PEG-Hb/HS" se refieren a composiciones de Hb PEGilada de la invención y formulaciones que incorporan estas composiciones. Los términos llevan también con ellos la divulgación de un uso de ejemplo de la composición y su formulación. Por ejemplo, un "sustituto de sangre" es útil para reemplazar sangre en el contexto de, por ejemplo, traumatismo, accidente cerebrovascular, lesión por isquemia/reperfusión, cirugía, anemia u otras lesiones, insultos y enfermedades en las que puede estar indicada una transfusión de sangre. Estos términos, como se usa en este documento, también se refieren a formulaciones de Hb capaces de suministrar oxígeno o monóxido de carbono a un tejido. Estas formulaciones son de utilidad en lesiones, insultos y enfermedades caracterizadas porque el sujeto tiene un volumen sanguíneo adecuado, pero la sangre tiene capacidad inadecuada para transportar y/o suministrar oxígeno o monóxido de carbono a los tejidos. Los derivados de PEG-hemoglobina se formulan en forma de soluciones salinas hipotónicas, isotónicas o hipertónicas. De este modo, la composición de PEG-Hb desoxigenada de ejemplo en la que el Fe (II) no está unido o está unido a CO se puede formular en solución isotónica o hipertónica. De forma similar, el PEG-Hb oxigenado de ejemplo se puede formular en portadores isotónicos o hipertónicos.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural, por ejemplo, cisteína, y sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, esto es, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueleto de péptidos modificados, pero conservan la misma estructura química

básica que un aminoácido de origen natural. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de una manera similar a un aminoácido de origen natural.

5 "Péptido" y "polipéptido" se refieren a un polímero en el que los monómeros son aminoácidos y se unen entre sí a través de enlaces amida, denominados alternativamente polipéptido. Adicionalmente, se incluyen también aminoácidos no naturales, por ejemplo, β -alanina, fenilglicina y homoarginina. Los aminoácidos que no están codificados por el gen también se pueden usar en la presente invención. Además, también se pueden usar en la invención aminoácidos que han sido modificados para incluir grupos reactivos, sitios de glicosilación, polímeros, unidades estructurales terapéuticas, biomoléculas y similares. Todos los aminoácidos usados en la presente invención pueden ser ya sea el isómero D o L. El isómero L es generalmente preferido. Además, otros peptidomiméticos también son útiles en la presente invención. Como se usa en este documento, "péptido" se refiere tanto a péptidos glicosilados como no glicosilados. También se incluyen péptidos que están incompletamente glicosilados por un sistema que expresa el péptido. Para una revisión general, véase, Spatola, A. F., in CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983). Un péptido de ejemplo es la hemoglobina.

El término "conjugado de péptido", y "conjugado de hemoglobina" se refiere a especies de la invención en las que un polipéptido de hemoglobina se conjuga con un polímero soluble en agua, por ejemplo, poli(etilenglicol) (PEG), como se expone en este documento.

20 "Hemoglobina", como se usa en este documento, se refiere a un polipéptido activo, que se une a oxígeno (o unión a CO) que no está reticulado químicamente mediante tratamiento con agentes químicos de reticulación, por ejemplo, dialdehídos, etc. Una hemoglobina de ejemplo es la proteína nativa sin otras modificaciones que la conjugación de uno o más de PEG (por ejemplo, m-PEG). Como se usa en este documento, "sustancialmente libre de agentes químicos de reticulación", se refiere a moléculas de hemoglobina que no están reticuladas a propósito con agentes químicos de reticulación. Estas preparaciones de hemoglobina incluyen menos del 5%, menos del 3% o menos del 1% de hemoglobina reticulada.

El término "soluble en agua" se refiere a unidades estructurales que tienen algún grado detectable de solubilidad en agua. Los métodos para detectar y/o cuantificar la solubilidad en agua son bien conocidos en la técnica. Ejemplos de polímeros solubles en agua incluyen péptidos, sacáridos, poli(éteres), poli(aminas), poli(ácidos carboxílicos) y similares. Los péptidos pueden tener secuencias mezcladas de estar compuestos de un único aminoácido, por ejemplo, poli(lisina). Un polisacárido de ejemplo es poli(ácido siálico). Un poli(éter) de ejemplo es poli(etilenglicol). La poli(etilenimina) es una poliamina de ejemplo y el ácido poli(acrílico) es un poli(ácido carboxílico) representativo. El término "soluble en agua" como en un "polímero soluble en agua" es un polímero que es soluble en agua a temperatura ambiente. Por lo general, una solución de un polímero soluble en agua transmitirá al menos aproximadamente 75%, más preferiblemente al menos aproximadamente 95% de luz, transmitida por la misma solución después de filtrar. Sobre una base de peso, un polímero o segmento soluble en agua del mismo será preferiblemente al menos aproximadamente 35% (en peso) soluble en agua, más preferiblemente al menos aproximadamente 50% (en peso) soluble en agua, aún más preferiblemente aproximadamente 70% (en peso) soluble en agua, y aún más preferiblemente aproximadamente 85% (en peso) soluble en agua. Sin embargo, es muy preferido que el polímero o segmento soluble en agua sea aproximadamente 95% (en peso) soluble en agua o completamente soluble en agua.

40 Como se usa en este documento, el término "polímero soluble en agua" incluye aquellos polímeros solubles en agua que son biocompatibles y no inmunogénicos y excluyen específicamente cualquier segmento polimérico soluble en agua que no sea biocompatible ni inmunogénico. Con respecto a la biocompatibilidad, una sustancia se considera biocompatible si los efectos beneficiosos asociados con el uso de la sustancia sola o con otra sustancia (por ejemplo, agente activo) en relación con tejidos vivos (por ejemplo, administración a un paciente) compensan cualquier efecto perjudicial evaluado por un médico, por ejemplo, un médico. Con respecto a la no inmunogenicidad, una sustancia se considera no inmunogénica si el uso previsto de la sustancia in vivo no produce una respuesta inmune indeseada (por ejemplo, la formación de anticuerpos) o, si se produce una respuesta inmune, que dicha respuesta no se considera clínicamente significativa o importante como evaluada por un clínico. Se prefiere particularmente que los segmentos poliméricos solubles en agua descritos en este documento, así como los conjugados sean biocompatibles y no inmunogénicos.

El esqueleto polimérico del polímero soluble en agua puede ser poli(etilenglicol) (esto es, PEG). Sin embargo, se debe entender que otros polímeros relacionados son también apropiados para uso en la práctica de esta invención y que el uso del término PEG o poli(etilenglicol) se pretende que sea inclusivo y no exclusivo a este respecto. El término PEG incluye poli(etilenglicol) en cualquiera de sus formas, incluyendo PEG alcoxi, PEG difuncional, PEG multiarmado, PEG bifurcado, PEG ramificado, PEG colgante (esto es, PEG o polímeros relacionados que tienen uno o más grupos funcionales colgantes del esqueleto del polímero), o PEG con enlaces degradables en el mismo.

El esqueleto del polímero puede ser lineal o ramificado. Los esqueletos de polímeros ramificados son generalmente conocidas en la técnica. Por lo general, un polímero ramificado tiene una unidad estructural de núcleo de ramificación central y un grupo de cadenas de polímero lineal unido al núcleo de rama central. El PEG se usa comúnmente en

5 formas ramificadas que se pueden preparar por adición de óxido de etileno a diversos polioles, tales como glicerol, pentaeritritol y sorbitol. La unidad estructural de rama central también se puede derivar de varios aminoácidos, tales como lisina. El poli(etilenglicol) ramificado se puede representar en forma general como R-(PEG-OH)_m en la que R representa la unidad estructural de núcleo, tal como glicerol o pentaeritritol, y m representa el número de ramas. Las moléculas de PEG multiarmadas, tales como las descritas en la Patente de los Estados Unidos No. 5,932,462, también se puede usar como el esqueleto del polímero.

10 Muchos otros polímeros también son apropiados para la invención. Los esqueletos de polímero que no son peptídicos y son solubles en agua, con desde 2 a aproximadamente 300 terminales, son particularmente útiles en la invención. Ejemplos de polímeros apropiados incluyen, pero no se limitan a, otros poli(alquilenglicoles), tales como poli(propilenglicol) ("PPG"), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxipropilmetacrilamida), poli(α -hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfazeno, polioxazolina, poli(N-acrilomorfolina), tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5,629,384, y copolímeros, terpolímeros y mezclas de los mismos. Aunque el peso molecular de cada cadena del esqueleto del polímero puede variar, está por lo general en el intervalo desde aproximadamente 100 Da a aproximadamente 100,000 Da, a menudo desde aproximadamente 6,000 Da a aproximadamente 80,000 Da.

20 Aunque el peso molecular del polímero soluble en agua (así como el reactivo polimérico utilizado para formar el conjugado) puede variar, el peso molecular satisfará uno o más de los siguientes valores: mayor que 100 Dalton; mayor que 200 Dalton; mayor que 400 Dalton; mayor que 500 Dalton; mayor que 750 Dalton; mayor que 900 Dalton; mayor que 1,000 Dalton; mayor que 1,400 Dalton; mayor que 1,500 Dalton; mayor que 1,900 Dalton; mayor que 2,000 Dalton; mayor que 2,200 Dalton; mayor que 2,500 Dalton; mayor que 3,000 Dalton; mayor que 4,000 Dalton; mayor que 4,900 Dalton; mayor que 5,000 Dalton; mayor que 6,000 Dalton; mayor que 7,000 Dalton; mayor que 7,500 Dalton; mayor que 9,000 Dalton; mayor que 10,000 Dalton; mayor que 11,000 Dalton; mayor que 14,000 Dalton; mayor que 15,000 Dalton; mayor que 16,000 Dalton; mayor que 19,000 Dalton; mayor que 20,000 Dalton; mayor que 21,000 Dalton; mayor que 22,000 Dalton; mayor que 25,000 Dalton; y mayor que 30,000 Dalton. Se entiende que el límite máximo de peso molecular para cualquier segmento de polímero soluble en agua dado útil en este documento es aproximadamente 300,000 Dalton.

30 El peso molecular del polímero soluble en agua (así como todo el reactivo polimérico usado para formar el conjugado) también se puede expresar como un valor dentro de un intervalo de pesos moleculares. Ejemplos de intervalos incluyen: desde aproximadamente 100 Dalton a aproximadamente 100,000 Dalton; desde aproximadamente 500 Dalton a aproximadamente 80,000 Dalton; desde aproximadamente 1,000 Dalton a aproximadamente 60,000 Dalton; desde aproximadamente 2,000 Dalton a aproximadamente 50,000 Dalton; y desde aproximadamente 5,000 Dalton a aproximadamente 40,000 Dalton.

35 Ejemplos de pesos moleculares para cualquier polímero hidrosoluble dado (así como el reactivo polimérico completo) dentro de un reactivo polimérico incluyen aproximadamente 100 Dalton, aproximadamente 200 Dalton, aproximadamente 300 Dalton, aproximadamente 400 Dalton, aproximadamente 500 Dalton, aproximadamente 600 Dalton, aproximadamente 700 Dalton, aproximadamente 750 Dalton, aproximadamente 800 Dalton, aproximadamente 900 Dalton, aproximadamente 1,000 Dalton, aproximadamente 2,000 Dalton, aproximadamente 2,200 Dalton, aproximadamente 2,500 Dalton, aproximadamente 3,000 Dalton, aproximadamente 4,000 Dalton, aproximadamente 4,400 Dalton, aproximadamente 5,000 Dalton, aproximadamente 6,000 Dalton, aproximadamente 7,000 Dalton, aproximadamente 7,500 Dalton, aproximadamente 8,000 Dalton, aproximadamente 9,000 Dalton, aproximadamente 10,000 Dalton, aproximadamente 11,000 Dalton, aproximadamente 12,000 Dalton, aproximadamente 13,000 Dalton, aproximadamente 14,000 Dalton, aproximadamente 15,000 Dalton, aproximadamente 20,000 Dalton, aproximadamente 22,500 Dalton, aproximadamente 25,000 Dalton, aproximadamente 30,000 Dalton, aproximadamente 40,000 Dalton, aproximadamente 50,000 Dalton, aproximadamente 60,000 Dalton, aproximadamente 75,000 Dalton, y aproximadamente 80,000 Dalton.

50 Los expertos en el arte reconocerán que la discusión anterior relativa a polímero sustancialmente soluble en agua no es en modo alguno exhaustiva y meramente ilustrativa, y que se contemplan todos los materiales poliméricos que tienen las cualidades descritas anteriormente. Como se usa en este documento, el término "reactivo polimérico" se refiere generalmente a una molécula entera, que puede comprender un polímero soluble en agua y un grupo funcional. El término "polímero soluble en agua" se reserva generalmente para su uso en la discusión de una porción de una estructura molecular más grande tal como un reactivo polimérico, una molécula precursora, un conjugado, y así sucesivamente.

55 Cada parte (por ejemplo, grupo funcional, agente activo, polímero soluble en agua, etc.) del reactivo polimérico y otras estructuras descritas en este documento se pueden unir directamente entre sí a través de un enlace covalente directo. Más por lo general, sin embargo, cada parte está unida a través de una unidad estructural espaciadora compuesta por uno o más átomos que sirven para atar cada parte conjuntamente en un todo unificado.

Las unidades estructurales espaciadoras preferidas a través de las cuales las diversas partes de los reactivos poliméricos y otras estructuras descritas en este documento incluyen una cadena de átomos formada por átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno y/o azufre. Unidos a esta cadena de átomos, pueden ser uno o más otros átomos tales

5 como carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre e hidrógeno. La cadena puede ser corta y comprender tan sólo una cadena de dos a cinco átomos. También se contemplan cadenas más largas, por ejemplo, una cadena de átomos de diez, quince o más de longitud. Además, la unidad estructural espaciadora puede comprender un anillo de átomos que pueden ser saturados, insaturados, así como también aromáticos. Cuando está presente, una unidad estructural espaciadora comprende preferiblemente una secuencia de aproximadamente 1-20 átomos que excluye cualquier átomo ramificado. Preferiblemente, los átomos que constituyen la unidad estructural espaciadora (incluyendo cualquier átomo ramificado) comprenden alguna combinación de átomos de oxígeno, carbono, nitrógeno, azufre e hidrógeno. Las unidades estructurales espaciadoras pueden tener cualquier formato útil.

10 El término "semivida" o " $t_{1/2}$ ", como se usa en este documento en el contexto de la administración de un fármaco a un paciente, se define como el tiempo requerido para que la concentración en plasma de un fármaco en un paciente se reduzca a la mitad. La explicación adicional de "semivida" se encuentra en Pharmaceutical Biotechnology (1997, DFA Crommelin and RD Sindelar, eds., Harwood Publishers, Amsterdam, pp 101 - 120). En una realización de ejemplo, la semivida de un conjugado de PEG de la invención está entre aproximadamente 12 y aproximadamente 22 horas, que es considerablemente más larga que la hemoglobina no PEGilada.

15 Como se usa en este documento, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier material que, cuando se combina con el conjugado, retiene la actividad del conjugado y es no reactivo con los sistemas inmunes del sujeto. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los portadores farmacéuticos estándar tales como una solución salina reguladora con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsión aceite/agua y diversos tipos de agentes humectantes. Otros portadores también pueden incluir soluciones estériles, comprimidos incluyendo comprimidos recubiertos y cápsulas. Por lo general, tales portadores contienen excipientes tales como almidón, leche, azúcar, ciertos tipos de arcilla, gelatina, ácido esteárico o sales de los mismos, estearato de magnesio o calcio, talco, grasas o aceites vegetales, gomas, glicoles u otros excipientes conocidos. Tales portadores también pueden incluir aditivos de sabor y color u otros ingredientes. Las composiciones que comprenden dichos portadores se formulan por métodos convencionales bien conocidos. Ejemplos de portadores son cloruro de sodio hipertónico y cloruro de sodio isotónico (por ejemplo, solución salina reguladora con fosfato). Los portadores hipertónicos e isotónicos son de uso en la formulación de la hemoglobina PEGilada desoxigenada de la invención (por ejemplo, hierro unido al monóxido de carbono, e hierro no unido) y hemoglobina PEGilada de la invención en la que el átomo de hierro está unido al oxígeno.

30 Como se usa en este documento, "administración", significa administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intralesional o subcutánea. La administración parenteral incluye, por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular e intracraneal.

El término "que mejora" o "mejorar" se refiere a cualquier indicio de éxito en el tratamiento de una patología o condición, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo tal como reducción, remisión o disminución de síntomas o una mejora en un bienestar físico o mental del paciente. La mejoría de los síntomas se puede basar en parámetros objetivos o subjetivos; incluyendo los resultados de un examen físico y/o una evaluación psiquiátrica.

35 El término "terapia" se refiere a "tratar" o "tratamiento" de una enfermedad o condición incluyendo proporcionar alivio de los síntomas o efectos secundarios de la enfermedad (incluyendo tratamiento paliativo), y aliviar la enfermedad (causando la regresión de la enfermedad). Estos términos también se refieren al tratamiento de lesión, incluyendo choque hemorrágico, accidente cerebrovascular, lesión de isquemia/reperfusión, traumatismo y similares. En diversas realizaciones, estos términos se refieren también a la prevención de la enfermedad o condición que ocurre en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad, pero aún no experimenta o exhibe síntomas de la enfermedad (tratamiento profiláctico), inhibiendo la enfermedad (retardando o deteniendo su desarrollo).

45 El término "cantidad eficaz" o "una cantidad eficaz para" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" o cualquier término gramaticalmente equivalente significa la cantidad que, cuando se administra a un sujeto para tratar una enfermedad, condición o lesión, es suficiente para lograr el tratamiento para esa enfermedad. En realizaciones de ejemplo, este término se refiere a cualquier cantidad de un conjugado de la invención (o una formulación que incluya un conjugado de la invención) suficiente para compensar al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% al menos el 90% o hasta aproximadamente el 100% de la deuda de oxígeno de tejidos u órganos atribuible a enfermedad, insulto o lesión. Cuando se usa en el contexto de la administración de CO a un tejido, este término se refiere a una cantidad administrada suficiente para derivar un efecto terapéutico detectable a partir del suministro de CO a un tejido.

50 La composición de ejemplo de hemoglobina de la invención se denomina "capaz de transferir un miembro seleccionado entre oxígeno y monóxido de carbono unido a éste a un tejido". Esta frase se refiere a una composición de hemoglobina que tiene la capacidad de transferir oxígeno o monóxido de carbono unido al átomo de hierro de la hemoglobina a un tejido adentro. En composiciones de ejemplo, la transferencia es medible por alteración en un parámetro tisular (por ejemplo, vasodilatación, oxigenación tisular) o por una alteración detectable en un punto final clínicamente relevante (por ejemplo, finalización del procedimiento necrótico, disminución de la lesión por isquemia/reperfusión). En una realización de ejemplo, la transferencia de monóxido de carbono u oxígeno a un tejido se mide en términos de la cantidad de una deuda de oxígeno "compensada" por administración de un volumen seleccionado de una composición de la invención a un sujeto (o tejido) con una deuda de oxígeno. En otra realización de ejemplo, la cantidad de oxígeno o monóxido de carbono suministrada a un tejido se mide en términos de la masa de oxígeno o de CO transferida a una

masa preestablecida de tejido (por ejemplo, un gramo) mediante la administración de una dosis preseleccionada de una composición de la invención. La capacidad de transferir oxígeno o CO a un tejido también se puede medir funcionalmente in vivo y por comparación con sustitutos conocidos de la sangre a base de hemoglobina. En una realización de ejemplo, la hemoglobina está en "contacto" o "contacto operativo" con el tejido al que está suministrando oxígeno o monóxido de carbono. Se entiende por contacto operativo Bu la hemoglobina está lo suficientemente próxima al tejido que el oxígeno o monóxido de carbono se transfiere directamente, a través de un portador intermedio o por difusión al tejido.

Como se usa en este documento, "hemoglobina nativa" se refiere a hemoglobina que no está intencionalmente reticulada químicamente o conjugada con otra especie. La hemoglobina nativa incluye moléculas de hemoglobina en las que el átomo de hierro no está unido, está unida al oxígeno o está unida al monóxido de carbono. De acuerdo con la presente invención, la hemoglobina nativa puede formar el núcleo de hemoglobina de los conjugados de PEG-Hb de la invención.

"Desoxigenada" se refiere a la hemoglobina en la que el átomo de Fe (II) está unido a una especie distinta del oxígeno (por ejemplo, monóxido de carbono) o no está unido al oxígeno o a ninguna otra especie.

El término "aislado" se refiere a un material que está sustancial o esencialmente libre de componentes, que acompañan naturalmente al material, se usan para producir el material o son productos secundarios o de degradación de producir el material. Para conjugados peptídicos de la invención, el término "aislado" se refiere a material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente acompañan al material en la mezcla utilizada para preparar el conjugado peptídico. "Aislado" y "puro" se usan indistintamente. Por lo general, los conjugados peptídicos aislados de la invención tienen un nivel de pureza expresado preferiblemente como un intervalo. El extremo inferior del intervalo de pureza para los conjugados peptídicos es aproximadamente 60%, aproximadamente 70% o aproximadamente 80% y el extremo superior del intervalo de pureza es aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90% o más de aproximadamente 90 %. Las composiciones de hemoglobina inactivadas por calor viralmente de la invención se aíslan generalmente antes de la conjugación con un polímero soluble en agua. En realizaciones de ejemplo, se aísla la hemoglobina utilizada para preparar el conjugado. En diversas realizaciones, el conjugado de hemoglobina PEG se aísla. En realizaciones de ejemplo, la hemoglobina o el conjugado de hemoglobina de PEG se aísla con la excepción de la presencia de un agente estabilizante u otros excipientes. En diversas realizaciones, el conjugado de hemoglobina de PEG o hemoglobina se aísla de otras proteínas y particularmente de proteínas seleccionadas de dímeros u oligómeros de hemoglobina y otras proteínas portadoras de oxígeno

Cuando los conjugados peptídicos son más de aproximadamente 90% puros, sus purezas también se expresan preferiblemente como un intervalo. El extremo inferior del intervalo de pureza es de aproximadamente 90%, aproximadamente 92%, aproximadamente 94%, aproximadamente 96% o aproximadamente 98%. El extremo superior del intervalo de pureza es de aproximadamente 92%, aproximadamente 94%, aproximadamente 96%, aproximadamente 98% o aproximadamente 100% de pureza. Para los propósitos de esta invención, un conjugado o solución "pura" de un conjugado puro puede incluir un agente estabilizante.

La pureza se determina mediante cualquier método de análisis reconocido en la técnica (por ejemplo, intensidad de banda en un gel teñido con plata, electroforesis en gel de poliacrilamida, HPLC, o medios similares).

El término "reactivo" o "activado" cuando se usa junto con un grupo funcional particular, se refiere a un grupo funcional reactivo que reacciona fácilmente con un electrófilo o un nucleófilo en otra molécula. Esto contrasta con los grupos que requieren fuertes catalizadores o condiciones de reacción altamente impracticables para reaccionar (esto es, un grupo "no reactivo" o "inerte").

La expresión "cada miembro de un grupo" se usa para referirse a los miembros de una subpoblación en una formulación de la invención que tiene una característica particular. De este modo, al referirse a cada miembro de un grupo de moléculas de hemoglobina en una fracción de una formulación de la invención, no implica necesariamente que cada molécula de hemoglobina en la formulación tenga la característica descrita, sino que se refiere a un grupo (subpoblación) de moléculas de hemoglobina en la formulación que tiene la característica citada.

El término "agente estabilizante" se refiere a una especie que previene o retarda la reoxigenación de la hemoglobina desoxigenada. Un agente estabilizante de ejemplo es un compuesto que contiene amina, convenientemente, aunque no exclusivamente, un aminoácido. Cualquier compuesto que contiene amina puede servir como un agente estabilizante en las formulaciones de la invención. Un agente estabilizante de ejemplo adicional tiene uno o más elementos estructurales que reaccionan con oxígeno de preferencia a la hemoglobina que reacciona con el oxígeno. Un elemento estructural de ejemplo encontrado en los agentes estabilizantes de la invención es una unidad estructural tiol. Ejemplos de compuestos sulfhidrilos de uso como agentes estabilizantes incluyen, pero no se limitan a, N-acetil-L cisteína (NAC) D, L-cisteína, γ -glutamyl-cisteína, glutatión, 2,3-dimercapto-1-propanol, 1,4-butanoditiol, y otros compuestos sulfhidrilos biológicamente compatibles. Se prefiere generalmente que el agente estabilizante sea biocompatible y no sea tóxico en las cantidades en las que está incluido en las composiciones y formulaciones de la invención. En una realización de ejemplo, el PEG es en sí mismo un reactivo estabilizante. De este modo, en diversas realizaciones, el PEG conjugado con la Hb obvia la necesidad de un agente estabilizante separado o una fracción estabilizadora soluble en agua

separada. De acuerdo con lo anterior, la invención proporciona formulaciones equivalentes a las expuestas en el presente documento que incluyen una fracción estabilizadora soluble en agua, que, de hecho, no incluye esta fracción.

Como se usa en este documento, los términos tales como "sujeto", "paciente" y "mamífero" se usan indistintamente y se ejemplifican por un ser humano.

5 Como se usa en este documento, un "donante de óxido nítrico" o "donante de NO" se refiere a compuestos que donan, liberan y/o transmiten directa o indirectamente una especie de monóxido de nitrógeno y/o estimulan la producción endógena de óxido nítrico o factor relajante derivado del endotelio (EDRF) in vivo y/o elevan los niveles endógenos de óxido nítrico o (EDRF) in vivo y/o se oxidan para producir óxido nítrico y/o son sustratos para el óxido nítrico sintasa y/o citocromo P450. "Donante de NO" también incluye compuestos que son precursores de L-arginina, inhibidores de la
10 enzima arginasa y mediadores de óxido nítrico.

El término "óxido nítrico" abarca el óxido nítrico (NO) cargado y las especies de monóxido de nitrógeno cargadas, preferiblemente las especies de monóxido de nitrógeno cargadas, tales como el ion nitrosonio (NO⁺) y el ion nitroxilo (NO⁻). La forma reactiva del óxido nítrico puede ser proporcionada por óxido nítrico gaseoso. Los compuestos que liberan suministran o transfieren monóxido de nitrógeno tienen la estructura F-NO, en la que F es una unidad estructural de liberación, suministro o transferencia de monóxido de nitrógeno e incluyen cualquiera y todos los compuestos que proporcionan monóxido de nitrógeno al sitio de acción deseado en una forma activa para su propósito previsto.
15

Los términos "aductos de NO", "precursor de NO", y "agente liberador de NO" se usan indistintamente.

En realizaciones de ejemplo, el término "hipertónico" se refiere a una solución de Hb PEGilada que tiene desde aproximadamente 3% a aproximadamente 7% de sal.

20 Las realizaciones

La discusión expuesta a continuación es pertinente a las realizaciones expuestas a continuación, así como las expuestas anteriormente y en las reivindicaciones adjuntas. Los elementos de las realizaciones están destinados a ser combinados de cualquier manera, y la discusión presentada en este documento es ilustrativa de combinaciones de ejemplo y no es limitativa.

25 La invención proporciona una composición que comprende hemoglobina nativa soluble en agua, funcional, opcionalmente desoxigenada. Las composiciones se inactivan viralmente. La composición incluye una fracción de hemoglobina soluble en agua, que comprende un grupo de moléculas de hemoglobina nativas funcionales. Cada miembro de este grupo de moléculas de hemoglobina está generalmente en un estado desoxigenado, está libre de agentes químicos de reticulación y tiene una P₅₀ de 9 mm Hg a 14 mm Hg. Alternativamente, en diversas realizaciones, la P₅₀ de la hemoglobina es desde aproximadamente 9 mm Hg a aproximadamente 12 mm Hg. La composición también incluye una fracción estabilizadora soluble en agua. La fracción estabilizadora ayuda a mantener el grupo de moléculas de hemoglobina en un estado desoxigenado. La fracción estabilizante incluye un agente estabilizante. Los agentes estabilizantes tienen un elemento estructural más reactivo con el oxígeno que las moléculas de hemoglobina.
30

También se incluye en la composición una fracción diluyente, generalmente una fracción diluyente acuosa. La fracción diluyente incluye un diluyente farmacéuticamente aceptable en el que la fracción de hemoglobina es soluble, adecuadamente la fracción estabilizadora también es soluble. La composición está esencialmente libre de actividad viral. La composición comprende menos del 5% de metahemoglobina.
35

El Fe (II) de la hemoglobina desoxigenada de cualquiera de las especies de la invención se puede unir a CO o puede estar esencialmente no unido a ya sea oxígeno o CO. En diversas realizaciones, el Fe (II) de las moléculas de hemoglobina desoxigenada no está unido a oxígeno ni monóxido de carbono. En diversas realizaciones, la molécula de hemoglobina es un miembro de una población de moléculas de hemoglobina. En esta realización, un ejemplo de población de moléculas de hemoglobina incluye menos del 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o menos del 1% moléculas de hemoglobina en el estado oxigenado.
40

La fracción estabilizante de la composición incluye un agente que previene o retarda la oxidación de la hemoglobina desoxigenada. Se puede usar cualquier agente estabilizante conveniente y efectivo. En diversas realizaciones, el agente estabilizante es uno bien tolerado en sistemas biológicos y se puede administrar con seguridad a mamíferos. Un agente estabilizante de ejemplo en la fracción estabilizante es una amina, tal como un aminoácido, o un compuesto tiol. Un agente estabilizante de ejemplo es un aminoácido que contiene tiol, un análogo de aminoácido o un mimético de aminoácido. En diversas realizaciones, el aminoácido se selecciona de aminoácidos de origen natural y de origen no natural, por ejemplo, cisteína.
45
50

La composición incluye una fracción diluyente farmacéuticamente aceptable que puede comprender una sal. La sal se puede seleccionar entre esencialmente cualquier sal, aunque las sales actualmente preferidas son sales que son farmacéuticamente aceptables para su administración a mamíferos. En diversas realizaciones, la composición incluye cloruro de sodio. Las composiciones de la invención son isotónicas, hipertónicas o hipotónicas. En diversas

realizaciones, la composición es hipertónica. En una realización de ejemplo, la composición contenía suficiente cloruro de sodio para hacerla hipertónica. En otras realizaciones, el diluyente es solución salina tónica reguladora de fosfato.

5 En realizaciones de ejemplo, la presente invención proporciona fracciones de hemoglobina esencialmente sin grupos reticulantes sintéticos uniendo covalentemente dos o más moléculas de hemoglobina. Aunque se puede formar un pequeño porcentaje de enlaces cruzados entre las moléculas de hemoglobina durante la producción o el almacenamiento de las composiciones de la invención, estas especies reticuladas representan un pequeño porcentaje de la hemoglobina total y no se preparan ni se seleccionan deliberadamente durante la purificación. De acuerdo con lo anterior, las composiciones de ejemplo de la invención incluyen por lo general una población de moléculas de hemoglobina en las que menos del 10%, menos del 5%, menos del 4%, menos del 3%, menos del 2% o menos del 1% del contenido total de hemoglobina está en la forma de dos o más moléculas de hemoglobina en un estado reticulado.

La hemoglobina de uso en la presente invención se deriva de sustancialmente cualquier fuente de mamífero. Ejemplos de fuentes de hemoglobina incluyen animales comunes de ganado, por ejemplo, vacas, cerdos, ovejas y similares. La invención no está limitada por la fuente de la hemoglobina. En diversas realizaciones, la hemoglobina es hemoglobina bovina.

15 Las composiciones de hemoglobina de la invención incluyen cantidades mínimas de metahemoglobina, menos del 5%. En diversas composiciones, la cantidad de metahemoglobina es menos del 4%, menos del 3%, menos del 2% o menos del 1%.

En una realización de ejemplo, la hemoglobina se aísla antes de combinarse con la fracción estabilizante.

20 La invención proporciona conjugados covalentes entre una molécula de hemoglobina nativa funcional y al menos una molécula de poli(etilenglicol). Muchos polímeros solubles en agua son conocidos para los expertos en el arte y son útiles en la práctica de la presente invención. El término polímero soluble en agua abarca especies tales como sacáridos (por ejemplo, dextrano, amilosa, ácido hialurónico, poli(ácido siálico), heparanos, heparinas, etc.); poli(aminoácidos), por ejemplo, poli(ácido aspártico) y poli(ácido glutámico); ácidos nucleicos; polímeros sintéticos (por ejemplo, poli(ácido acrílico), poli(éteres), por ejemplo, poli(etilenglicol)); péptidos, proteínas, y similares.

25 La invención proporciona una composición de hemoglobina inactivada viralmente, que comprende un conjugado covalente entre una molécula de hemoglobina nativa funcional, opcionalmente desoxigenada y al menos una molécula de poli(etilenglicol). La composición incluye una fracción de hemoglobina soluble en agua que incluye un grupo de moléculas de hemoglobina. Opcionalmente, cada miembro del grupo de moléculas de hemoglobina está desoxigenado. El poli(etilenglicol) se conjuga covalentemente con la hemoglobina a través de una unidad estructural amina de un residuo de aminoácido. La hemoglobina está esencialmente libre de agentes químicos de reticulación introducidos. La hemoglobina tiene una P₅₀ de 9 mm Hg a 14 mm Hg. En diversas realizaciones, la P₅₀ es desde aproximadamente 9 mm Hg a aproximadamente 12 mm Hg. La composición también incluye una fracción estabilizadora soluble en agua que hace que el grupo de moléculas de hemoglobina sea resistente a la oxidación. La fracción estabilizadora incluye un agente estabilizante. Los agentes estabilizantes incluyen al menos un elemento estructural, que es más reactivo con el oxígeno que el grupo de moléculas de hemoglobina. Las formulaciones también incluyen una fracción diluyente que comprende un diluyente farmacéuticamente aceptable en el que la fracción de hemoglobina es soluble. Las formulaciones están esencialmente libres de actividad viral, y comprenden menos del 5% de metahemoglobina.

40 Los métodos para la activación de polímeros también se pueden encontrar en el documento WO 94/17039, la Patente de los Estados Unidos No. 5,324,844, WO 94/18247, WO 94/04193, la Patente de los Estados Unidos No. 5,219,564, la Patente de los Estados Unidos No. 5,122,614, WO 90/13540, la Patente de los Estados Unidos No. 5,281,698, y más WO 93/15189, y para la conjugación entre polímeros activados y péptidos, por ejemplo, el factor de coagulación VIII (WO 94/15625), la hemoglobina (WO 94/09027), la molécula portadora de oxígeno (la Patente de los Estados Unidos No. 4,412,989), la ribonucleasa y la superóxido dismutasa (Veronese et al., *App. Biochem. Biotech.* 11:141-45 (1985)).

45 El peso molecular en el contexto de un polímero soluble en agua de uso en las composiciones de la invención, tales como PEG, se puede expresar como ya sea un peso molecular promedio en número o un peso molecular promedio en peso. A menos que se indique lo contrario, todas las referencias al peso molecular se refieren en este documento al peso molecular promedio en peso. Ambas determinaciones de peso molecular, promedio en número y promedio en peso, se pueden medir usando cromatografía de permeación en gel u otras técnicas de cromatografía líquida. También se pueden usar otros métodos para medir los valores de peso molecular, tales como el uso de análisis de grupos finales o la medición de propiedades coligativas (por ejemplo, depresión de punto de congelación, elevación del punto de ebullición o presión osmótica) para determinar el peso molecular promedio en número o el uso de técnicas de dispersión de la luz, ultracentrifugación o viscosimetría para determinar el peso molecular promedio en peso.

50 Los reactivos poliméricos de la invención son por lo general polidispersos (esto es, el peso molecular promedio en número y el peso molecular promedio en peso de los polímeros no son iguales), que poseen bajos valores de polidispersidad de preferiblemente menos de aproximadamente 1.2, más preferiblemente menos de aproximadamente 1.15, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 1.10, aun así más preferiblemente menos de aproximadamente 1.05, y más preferiblemente menos de aproximadamente 1.03. Los polímeros solubles en agua de

ejemplo son aquellos en los que una proporción sustancial de las moléculas de polímero en una muestra del polímero tienen aproximadamente el mismo peso molecular; tales polímeros son "homodispersos".

5 La presente invención se ilustra adicionalmente haciendo referencia a un conjugado de poli(etilenglicol). Existen varias revisiones y monografías sobre la funcionalización y conjugación de PEG. Véase, por ejemplo, Harris, *Macromol. Chem. Phys.* C25: 325-373 (1985); Scouten, *Methods in Enzymology* 135: 30-65 (1987); Wong et al., *Enzyme Microb. Technol.* 14: 866-874 (1992); Delgado et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9: 249-304 (1992); Zalipsky, *Bioconjugate Chem.* 6: 150-165 (1995); y Bhadra, et al., *Pharmazie*, 57:5-29 (2002). Las rutas de preparación de moléculas reactivas de PEG y formar conjugados usando las moléculas reactivas son conocidas en la técnica. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,672,662 describe un conjugado soluble en agua y aislable de un éster activo de un ácido polimérico seleccionado entre poli(óxidos de alquileño) lineales o ramificados, poli(poliolios oxietilados), poli(alcoholes olefínicos), y poli(acrilomorfolina).

10 La Patente de los Estados Unidos No. 6,376,604 establece un método de preparación de un éster de 1-benzotriazolilcarbonato soluble en agua de un polímero soluble en agua y no peptídico haciendo reaccionar un hidroxilo terminal del polímero con di(1-benzotriazolil)carbonato en un solvente orgánico. El éster activo se usa para formar conjugados con un agente biológicamente activo tal como una proteína o un péptido.

15 El documento WO 99/45964 describe un conjugado que comprende un agente biológicamente activo y un polímero soluble en agua activado que comprende un esqueleto polimérico que tiene al menos un extremo unido al esqueleto del polímero a través de un enlace estable, en el que al menos un extremo comprende una unidad estructural ramificada que tiene grupos reactivos proximales unidos a la unidad estructural ramificante, en el que el agente biológicamente activo está unido a al menos uno de los grupos reactivos proximales. En el documento WO 96/21469 se describen otros poli(etilenglicoles) ramificados, la Patente de los Estados Unidos No. 5,932,462 describe un conjugado formado con una molécula de PEG ramificada que incluye un término ramificado que incluye grupos funcionales reactivos. Los grupos reactivos libres están disponibles para reaccionar con una especie biológicamente activa, tal como una proteína o péptido, formando conjugados entre el poli(etilenglicol) y las especies biológicamente activas. La Patente de los Estados Unidos No. 5,446,090 describe un enlazante de PEG bifuncional y su uso en la formación de conjugados que tienen un péptido en cada uno de los extremos del enlazante de PEG.

20 Los conjugados que incluyen enlaces degradables de PEG se describen en el documento WO 99/34833; y WO 99/14259, así como en la Patente de los Estados Unidos No. 6,348,558. Tales enlaces degradables son aplicables en la presente invención.

25 Los métodos reconocidos en la técnica de activación de polímeros expuestos anteriormente son de uso en el contexto de la presente invención en la formación de los polímeros ramificados expuestos en este documento y también para la conjugación de estos polímeros ramificados con otras especies, por ejemplo, azúcares, nucleótidos de azúcar y similares.

30 La composición de la presente invención incluye un conjugado covalente entre una molécula de hemoglobina nativa funcional y al menos una molécula de poli(etilenglicol), por ejemplo, metoxi-poli(etilenglicol). El poli(etilenglicol) usado en la presente invención no está restringido a ninguna forma particular o intervalo de peso molecular. Para moléculas de poli(etilenglicol) de cadena lineal, el peso molecular está preferiblemente entre 500 y 100,000. Se usa preferiblemente un peso molecular de 2000-60,000 y preferiblemente desde aproximadamente 5,000 a aproximadamente 40,000. En una realización de ejemplo, el PEG utilizado es un metoxi-PEG, con un peso molecular promedio de aproximadamente 5,000.

35 En otra realización, el poli(etilenglicol) es un PEG ramificado que tiene más de una unidad estructural de PEG unida. Ejemplos de PEG ramificados se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 5,932,462; la Patente de los Estados Unidos No. 5,342,940; la Patente de los Estados Unidos No. 5,643,575; la Patente de los Estados Unidos No. 5,919,455; la Patente de los Estados Unidos No. 6,113,906; la Patente de los Estados Unidos No. 5,183,660; WO 02/09766; Kodera Y., *Bioconjugate Chemistry* 5: 283-288 (1994); y Yamasaki et al., *Agric. Biol. Chem.*, 52: 2125-2127, 1998. En una realización preferida, el peso molecular de cada poli(etilenglicol) del PEG ramificado es menor o igual a 40,000 dalton.

40 En diversas realizaciones, la invención proporciona un conjugado de hemoglobina que tiene una o más unidades estructurales de PEG unidas a este. La PEG-hemoglobina está en forma de CO. En una realización de ejemplo, este conjugado se formula en solución salina reguladora con fosfato.

45 La invención proporciona un conjugado de hemoglobina que tiene una o más unidades estructurales de PEG unidos a este. En diversas realizaciones, la PEG-hemoglobina está desoxigenada y no está en la forma de CO. En otras realizaciones, la PEG-hemoglobina está en la forma de CO. En una realización de ejemplo, este conjugado, ya sea que el PEG-Hb esté en la forma oxigenada, CO o no unida, se formula en solución salina hipertónica (sal alta). Las concentraciones de sal de ejemplo (por ejemplo, NaCl) de uso en estas formulaciones hipertónicas son desde aproximadamente 4% a aproximadamente 8%, desde aproximadamente 4.5% a aproximadamente 7.5% o desde aproximadamente 5% a aproximadamente 7%. Las formulaciones de ejemplo incluyen aproximadamente 4%,

aproximadamente 5%, aproximadamente 6%, aproximadamente 7% o aproximadamente 8% de sal. En una formulación la concentración de sal es de 7.5%. En diversas realizaciones, la sal es NaCl. En realizaciones de ejemplo, la osmolalidad de la formulación es desde aproximadamente 300-400, o desde aproximadamente 325-375, o desde aproximadamente 340-360 mOsmol. En una realización de ejemplo, la sal es NaCl.

5 En una realización de ejemplo, la invención proporciona un fluido de reanimación basado en PEG-Hb que tiene al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% al menos un 95% o aproximadamente un 100% de la eficacia igual al plasma fresco congelado en la corrección de la coagulopatía. Las formulaciones de ejemplo de acuerdo con esta realización incluyen además factores de coagulación, plaquetas u otras sustancias conocidas para ayudar en la mitigación de la coagulopatía.

10 En diversas realizaciones, la invención proporciona un fluido de reanimación de PEG-Hb que tiene un volumen de fluido total desde aproximadamente 450 mL y que tiene una capacidad de transporte de oxígeno y/o capacidad de difusión de oxígeno equivalente a una unidad de glóbulos rojos empaquetados, preferiblemente glóbulos rojos humanos.

15 En diversas realizaciones, la invención proporciona una formulación de PEG-Hb (por ejemplo, un fluido de reanimación) capaz de transportar CO y difundirlo en tejidos. Una formulación de ejemplo tiene un volumen de fluido total de aproximadamente 450 mL, y que tiene una capacidad de transporte de CO y/o capacidad de difusión de CO suficiente para transferir una cantidad terapéuticamente relevante de CO a un tejido.

En una realización de ejemplo, la invención proporciona un fluido de reanimación de PEG-Hb que tiene factores de coagulación presentes. En diversas realizaciones, los factores de coagulación están presentes en una cantidad no inferior al 60%, no inferior al 70%, no inferior al 80% o no inferior al 90% del plasma fresco congelado.

20 En una realización de ejemplo, el fluido de reanimación incluye plaquetas. Se prefiere generalmente que los fluidos de reanimación de la invención incluyendo las plaquetas tengan un recuento y actividad celular que no sea inferior al 60%, no inferior al 70%, no inferior al 80%, no inferior al 90%, o es aproximadamente igual al de una sola unidad de aféresis.

25 La estabilidad al almacenamiento es un objeto importante de la presente invención. En diversas realizaciones, la presente invención proporciona un fluido de reanimación de PEG-Hb que es estable a temperatura ambiente (~ 25°C) durante al menos 4 meses, al menos seis meses, al menos 9 meses o al menos 12 meses.

La presente invención también proporciona, en diversas realizaciones, un fluido de reanimación de PEG-Hb que no es más inmunogénico que los productos sanguíneos en depósito corrientes. También se proporciona un fluido de reanimación de PEG-Hb que no es más trombogénico que los productos sanguíneos en depósito corrientes.

30 Las formulaciones de ejemplo de acuerdo con la invención incluyen una o más de estas características en cualquier combinación: aproximadamente 4.0-4.6 % en peso de Hb, aproximadamente 1.0-5.0 % en peso de Met, aproximadamente 0.0-5.0% de HbO₂, aproximadamente 95.0-100.0% de HbCO, a pH de aproximadamente 8.10-8.20, osmolalidad de aproximadamente 325-370 mOsmol, una P₅₀ (mm Hg) de aproximadamente 10.00-14.00, y un espectro óptico con picos principales a 538 nm y 568 nm con absorbancia de aproximadamente 1.4 y 1.9, respectivamente, una proporción de picos a 568 nm/500 nm de 2.5-3.0. En otras formulaciones de ejemplo, la formulación tiene un espectro
35 óptico con picos principales a 541 y 576 nm.

Incluso más específicamente, las formulaciones de ejemplo de la invención incluyen una o más de estas características en cualquier combinación: aproximadamente 4.5 % en peso de Hb, aproximadamente 1.1 % en peso de Met, aproximadamente 1.2% de HbO₂, aproximadamente 99.4% de HbCO, un pH de aproximadamente 8.14, osmolalidad de aproximadamente 356 mOsmol, una P₅₀ (mm Hg) de aproximadamente 12.2, y un espectro óptico con picos principales a 538 nm y 568 nm con absorbancia de aproximadamente 1,493 y aproximadamente 1,465, respectivamente, y una proporción de picos a 568 nm/500 nm de aproximadamente 2.6.

Preparación de los Conjugados

Preparación de hemoglobina viralmente desactivada

45 La hemoglobina precursora de uso en la preparación de los conjugados de la invención se puede aislar a partir de glóbulos rojos (RBC). Las fuentes de RBC apropiadas incluyen sangre humana, sangre bovina, sangre ovina, sangre porcina, sangre de otros sujetos y hemoglobina producida transgénicamente, tal como la Hb transgénica descrita en BIO/TECHNOLOGY, 12: 55-59 (1994).

50 La sangre se puede recoger de donantes vivos o recién sacrificados. Un método para recoger sangre entera bovina se describe en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,084,558 y 5,296,465, concedidas a Rausch et al. Se prefiere que la sangre se recoja de una manera sanitaria.

Se conocen muchos métodos en la técnica para el aislamiento y la purificación de la hemoglobina; estos métodos son generalmente aplicables a las composiciones de la presente invención. La siguiente discusión en este documento es ilustrativa y no limitativa.

5 En diversas realizaciones, en o poco después de la recogida, la sangre se mezcla opcionalmente con al menos un anticoagulante para prevenir la coagulación significativa de la sangre. Los anticoagulantes apropiados para la sangre son como se conocen clásicamente en la técnica e incluyen, por ejemplo, citrato de sodio, ácido etilendiaminotetraacético y heparina. Cuando se mezcla con sangre, el anticoagulante puede estar en forma sólida, tal como un polvo, o en una solución acuosa.

10 La solución sanguínea puede ser filtrada antes o durante la etapa de anticoagulación, por ejemplo, mediante filtración, para eliminar grandes agregados y partículas. Un tamiz de malla 600 es un ejemplo de un filtro apropiado.

15 Los RBC en la solución sanguínea son a continuación opcionalmente lavados por medios apropiados, tales como por diafiltración o por una combinación de etapas de dilución y concentración discretas con al menos una solución, tal como una solución isotónica, para separar los RBC de las proteínas plasmáticas extracelulares, tales como albúminas séricas o anticuerpos (por ejemplo, inmunoglobulinas (IgG)). Se entiende que los RBC se pueden lavar en un modo de alimentación discontinua o continua.

20 También se conocen en la técnica soluciones isotónicas aceptables y son de utilidad general en la preparación de las formulaciones de la invención. Una solución isotónica de ejemplo tiene un pH neutro y una osmolaridad entre aproximadamente 285-315 mOsm. Ejemplos no limitantes de solución isotónica incluyen soluciones, tales como una solución citrato/salina, que tiene un pH y una osmolaridad que no rompe las membranas celulares de los glóbulos rojos y que desplaza la parte de plasma de la sangre entera. Un ejemplo de la solución isotónica se compone de una solución acuosa de citrato de sodio dihidratado (6.0 g/L) y de cloruro de sodio (8.0 g/L).

25 El agua útil en el método de la invención incluye agua destilada, agua desionizada, agua para inyección (WFI) y/o agua baja en pirógenos (LPW). WFI, que se prefiere, es agua destilada, destilada que satisface las especificaciones farmacológicas de los EE.UU. para el agua para inyección. WFI se describe adicionalmente en Pharmaceutical Engineering, 11, 15 - 23 (1991). LPW, que se prefiere, es agua desionizada que contiene menos de 0.002 EU/ml.

30 Los RBC en la solución sanguínea se pueden lavar por diafiltración. Los diafiltros apropiados incluyen membranas microporosas con tamaños de poro que separarán los RBC de componentes de la solución sanguínea sustancialmente más pequeños, tales como un filtro de 0.1 μm a 0.5 μm (por ejemplo, un filtro de 0.2 μm). Al mismo tiempo, una solución isotónica filtrada se adiciona continuamente (o en lotes) como composición a una velocidad igual a la velocidad (o volumen) de filtrado perdido a través del diafiltro. Durante el lavado de los RBC, los componentes de la solución sanguínea que son significativamente más pequeños en diámetro que los RBC, o son fluidos tales como el plasma, pasan a través de las paredes del diafiltro en el filtrado. Los RBC, las plaquetas y los cuerpos más grandes de la solución sanguínea diluida, tales como los glóbulos blancos, se retienen y se mezclan con una solución isotónica, que se adiciona continuamente o por lotes para formar una solución sanguínea dializada.

35 Los RBC también se pueden lavar a través de una serie de etapas de dilución y concentración secuencial (o secuencial inversa), en donde la solución sanguínea se diluye adicionando al menos una solución isotónica, y se concentra por flujo a través de un filtro, formando así una solución sanguínea dializada.

40 El lavado de RBC se completa cuando el nivel de proteínas plasmáticas que contaminan los RBC se ha reducido sustancialmente (por lo general al menos aproximadamente 90%). El lavado adicional de RBC puede separar aún más las proteínas plasmáticas extracelulares de los RBC. Por ejemplo, la diafiltración con 6 volúmenes de solución isotónica puede eliminar al menos aproximadamente el 99% de IgG de la solución sanguínea.

La solución sanguínea dializada se expone entonces opcionalmente a medios para separar los RBC en la solución sanguínea dializada de los glóbulos blancos y plaquetas, tal como por centrifugación.

45 Se entiende que pueden emplearse otros métodos generalmente conocidos en la técnica para separar los RBC de otros componentes sanguíneos. Por ejemplo, la sedimentación, en la que el método de separación no rompe las membranas celulares de una cantidad significativa de los RBC, tales como menos de aproximadamente el 30% de los RBC, antes de la separación de los RBC de los otros componentes sanguíneos.

50 Después de la separación de los RBC, la hemoglobina se extrae de los RBC para formar una solución que contiene hemoglobina. La extracción se puede realizar por diversos métodos, incluyendo la lisis y la hinchazón hipoosmótica de los RBC. La lisis significa que se pueden usar diversos métodos de lisis, tales como lisis mecánica, lisis química, lisis hipotónica u otros métodos de lisis conocidos que liberan hemoglobina sin dañar significativamente la capacidad de la Hb para transportar y liberar oxígeno.

Alternativamente, la hemoglobina producida de forma recombinante, tal como la hemoglobina producida de forma recombinante descrita en Nature, 356: 258-260 (1992), se puede procesar en el método de la invención en lugar de los

RBC. Las células bacterianas que contienen la hemoglobina se lavan y se separan de los contaminantes como se ha descrito anteriormente. Estas células de bacterias se rompen entonces mecánicamente por medios conocidos en la técnica, tales como un molino de bolas, para liberar la hemoglobina de las células y formar una fase celular lisada. Esta fase celular lisada se procesa a continuación como la fase de RBC lisada.

5 Después de la lisis, la fase de RBC lisada es opcionalmente ultrafiltrada para eliminar desechos celulares más grandes, tales como proteínas con un peso molecular por encima desde aproximadamente 100,000 Dalton. Generalmente, los desechos celulares incluyen todos los componentes celulares enteros y fragmentados con la excepción de Hb, proteínas de células más pequeñas, electrolitos, coenzimas e intermedios metabólicos orgánicos. Los ultrafiltros aceptables incluyen, por ejemplo, filtros de 100,000 Dalton.

10 Se pueden emplear otros métodos para separar la Hb de la fase de RBC lisada, incluyendo sedimentación, centrifugación o microfiltración. El filtrado de Hb puede entonces ser ultrafiltrado para eliminar desechos celulares más pequeños, electrolitos, coenzimas, intermedios metabólicos y proteínas de peso molecular inferior a aproximadamente 30,000 Dalton, y agua del ultrafiltrado de Hb. Los ultrafiltros apropiados incluyen un ultrafiltro de 30,000 Dalton.

15 La solución concentrada de Hb se puede dirigir luego hacia una o más columnas cromatográficas paralelas para separar adicionalmente la hemoglobina mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de otros contaminantes tales como anticuerpos, endotoxinas, fosfolípidos y enzimas y virus. Ejemplos de medios apropiados incluyen medios de intercambio aniónico, medios de intercambio catiónico, medios de interacción hidrofóbicos y medios de afinidad. En una realización, las columnas cromatográficas contienen un medio de intercambio aniónico apropiado para separar la Hb de las proteínas no hemoglobinas. Los medios de intercambio aniónico apropiados incluyen, por ejemplo, sílica, alúmina, 20 gel Titania, dextrano reticulado, agarosa o una unidad estructural derivada, tal como una poliacrilamida, una polihidroxietilmetacrilato o un estireno divinilbenceno, que ha sido derivado con una funcionalidad química catiónica, tal como un grupo dietilaminoetil o aminoetil cuaternario. Un medio de intercambio de aniones apropiado y los eluyentes correspondientes para la absorción y la desorción selectiva de Hb en comparación con otras proteínas y contaminantes, que es probable que estén en una fase de RBC lisada, son fácilmente determinables por un experto razonable en la 25 técnica.

La solución de Hb está opcionalmente desoxigenada para formar una solución de Hb desoxigenada (en lo que sigue desoxi-Hb) por medios que desoxigena sustancialmente la Hb sin reducir significativamente la capacidad de la Hb en el eluato de Hb para transportar y liberar oxígeno, tal como ocurriría desde la desnaturalización de la formación de hemoglobina oxidada (metHb).

30 El eluido de Hb se puede desoxigenar mediante la transferencia de gas de un gas inerte a través de una membrana de fase. Tales gases inertes incluyen, por ejemplo, nitrógeno, argón y helio.

Se entiende que se pueden usar otros medios para desoxigenar una solución de hemoglobina, que son conocidos en la técnica, para desoxigenar el eluato de Hb. Tales otros medios pueden incluir, por ejemplo, burbujeo de nitrógeno del eluato de Hb, barrido químico con agentes reductores tales como N-acetil-L-cisteína (NAC), cisteína, ditionito de sodio o 35 ascorbato, o fotólisis por luz. La hemoglobina desoxigenada se puede convertir en la forma CO.

La desoxigenación continúa hasta que la pO_2 de la solución de Hb se reduce a un nivel deseado, por ejemplo, en el que el contenido de Hb oxigenado (oxohemoglobina o HbO_2) en la solución de Hb es desde aproximadamente 20% o menos, 10% o menos, 5% o menos 3% o menos o 1% o menos.

40 Durante la desoxigenación, la temperatura de la solución de Hb se mantiene por lo general a un nivel que equilibrará la velocidad de desoxigenación frente a la velocidad de formación de metahemoglobina. Se mantiene la temperatura para limitar el contenido de metahemoglobina a menos del 20%. Una temperatura óptima dará como resultado menos de aproximadamente 5% de contenido de metahemoglobina, y preferiblemente menos de aproximadamente 2.5% de contenido de metahemoglobina, mientras que todavía se desoxigena la solución de Hb. Por lo general, durante la desoxigenación, la temperatura de la solución de Hb se mantiene entre aproximadamente 15°C y aproximadamente 45 35°C. Durante la desoxigenación, y posteriormente a lo largo de las etapas restantes del método de la invención, la Hb se mantiene en un entorno con bajo contenido de oxígeno para minimizar la absorción de oxígeno por la Hb

La Hb desoxigenada se equilibra opcionalmente con una solución reguladora de almacenamiento con bajo contenido de oxígeno, que contiene un agente estabilizante, por ejemplo, un compuesto sulfhidrilo, para formar un desoxi-Hb estabilizada por oxidación. Los compuestos sulfhidrilos apropiados incluyen agentes no tóxicos tales como N-acetil-L-cisteína (NAC), D, L-cisteína, γ -glutamyl-cisteína, glutatión, 2,3-dimercapto-1-propanol, 1,4-butanoditiol, y otros 50 compuestos sulfhidrilos biológicamente compatibles. Se adiciona una cantidad de compuesto sulfhidrilo para establecer una concentración de sulfhidrilo que eliminará el oxígeno para mantener el contenido de metahemoglobina de menos de aproximadamente 15%, menos de aproximadamente 10%, o menos de aproximadamente 5% durante el período de almacenamiento. Por lo general, la cantidad de compuesto sulfhidrilo adicionada es una cantidad suficiente para establecer una concentración de sulfhidrilo entre aproximadamente 0.05% y aproximadamente 0.2% en peso. 55

La invención proporciona en diversas realizaciones, una composición de hemoglobina inactivada viralmente que comprende hemoglobina nativa soluble en agua, funcional, opcionalmente desoxigenada. La composición se prepara mediante un método que comprende someter una solución de hemoglobina desoxigenada y un agente estabilizante a un procedimiento térmico de inactivación viral. En una realización de ejemplo, el procedimiento térmico de inactivación viral incluye exponer la solución a una temperatura elevada suficientemente para inactivar esencialmente toda la actividad viral en dicha solución; el calor se eleva durante un tiempo suficiente para lograr la inactivación de esencialmente toda la actividad viral en la solución. El agente estabilizante incluye un elemento estructural más reactivo con el oxígeno que la hemoglobina desoxigenada en la solución, minimizando así la unión del oxígeno por la hemoglobina desoxigenada. La solución incluye una cantidad del agente estabilizante suficiente para prevenir la formación de más de 5%, 4% o 2% de metahemoglobina en el procedimiento térmico de desactivación viral. El agente estabilizante se selecciona y está presente en una cantidad suficiente para mantener la concentración de metahemoglobina a aproximadamente 5% o menos.

En diversas realizaciones, la composición incluye un conjugado covalente entre la hemoglobina y al menos al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, o al menos aproximadamente 10 unidades estructurales de polímeros solubles en agua unidos a la hemoglobina, donde el conjugado covalente incluye al menos una molécula de poli(etilenglicol). Cada miembro de dicho grupo de moléculas de hemoglobina está covalentemente conjugado con al menos una molécula de dicho poli(etilenglicol) a través de una unidad estructural amina de un residuo de aminoácido. Los polímeros solubles en agua están unidos a cualquier residuo apropiado sobre la hemoglobina. En un conjugado de ejemplo de la invención, uno o más de las unidades estructurales de polímeros solubles en agua está unido a una cadena lateral de aminoácido, por ejemplo, una unidad estructural ϵ -amina de un residuo de lisina. En una realización de ejemplo, la invención proporciona un conjugado de PEG-Hb como se ha expuesto anteriormente en el que cada molécula de Hb está conjugada con 7, 8, 9 ó 10 unidades estructurales de PEG. En diversas realizaciones, la invención proporciona una población de conjugados de PEG-Hb en los que el número medio de unidades estructurales de PEG por molécula de Hb es desde aproximadamente 7 a aproximadamente 10, o aproximadamente 8 y aproximadamente 9. En una realización de ejemplo, la unidad estructural de PEG es una unidad estructural de PEG 5000.

Síntesis de los conjugados

En diversas realizaciones, la invención proporciona conjugados entre una o más moléculas de poli(etilenglicol) y un polipéptido de hemoglobina. La hemoglobina precursora es una composición de hemoglobina inactivada viralmente que comprende hemoglobina nativa funcional, opcionalmente desoxigenada, soluble en agua. La composición se prepara mediante un método que comprende someter una solución de hemoglobina desoxigenada y un agente estabilizante a un procedimiento térmico de inactivación viral. En una realización de ejemplo, el procedimiento térmico de inactivación viral incluye exponer la solución a una temperatura elevada suficientemente para inactivar esencialmente toda la actividad viral en dicha solución; el calor se eleva durante un tiempo suficiente para lograr la inactivación de esencialmente toda la actividad viral en la solución. El agente estabilizante incluye un elemento estructural más reactivo con el oxígeno que la hemoglobina desoxigenada en la solución, minimizando así la unión del oxígeno por la hemoglobina desoxigenada. La solución incluye una cantidad del agente estabilizante suficiente para prevenir la formación de más de 5%, 4% o 2% de metahemoglobina en el procedimiento térmico de desactivación viral. El agente estabilizante se selecciona y está presente en una cantidad suficiente para mantener la concentración de metahemoglobina a aproximadamente 5% o menos.

En diversas realizaciones, el polipéptido precursor de hemoglobina es una composición de hemoglobina inactivada viralmente que comprende hemoglobina nativa, desoxigenada funcional, soluble en agua. La composición comprende menos de 5% de metahemoglobina y se prepara por un método que comprende calentar una solución precursora de hemoglobina a aproximadamente 60°C, durante aproximadamente 12 horas, por ejemplo, desde aproximadamente 1 hora a aproximadamente 4 horas. La solución precursora incluye un agente estabilizante. El agente estabilizante incluye una estructura que reacciona más fácilmente con oxígeno o especies de oxígeno reactivo que las moléculas de hemoglobina en la solución, minimizando así la unión de oxígeno por la hemoglobina desoxigenada y, formando así dicha composición.

Los conjugados entre polímeros solubles en agua y el péptido de hemoglobina viralmente inactivado se puede formar por reacción de un derivado activado del polímero soluble en agua y la hemoglobina bajo condiciones apropiadas. En diversas realizaciones, el polímero soluble en agua se conjuga con la hemoglobina a través de una cadena lateral de un residuo de aminoácido, por ejemplo, una unidad estructural ϵ -amina de un residuo de lisina. Ejemplos de conjugados de la invención incluyen al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10 unidades estructurales de polímero soluble en agua unidos a la hemoglobina.

En un método de formación de un conjugado de la invención, se oxigena una composición precursora de hemoglobina inactivada viralmente y se pone en contacto la hemoglobina oxigenada con una molécula activada de poli(etilenglicol) de reactividad complementaria a un residuo de aminoácido de la hemoglobina, formando así un conjugado covalente entre las moléculas de poli(etilenglicol) y de hemoglobina oxigenada en la solución de hemoglobina oxigenada. En una realización de ejemplo, la hemoglobina del conjugado covalente está desoxigenada o unida a CO. La desoxigenación

puede ser mecánica o química, proporcionando una molécula de hemoglobina en la que el hierro está o no unido o está unido a CO.

5 En general, la unidad estructural de PEG y el polipéptido están unidos entre sí mediante el uso de grupos reactivos, que se transforman por lo general mediante el procedimiento de enlace en un nuevo grupo funcional orgánico o especie que no es reactiva bajo condiciones fisiológicamente relevantes. El(los) grupo(s) funcional(es) reactivo(s) está(n) localizados en cualquier posición sobre el péptido y PEG. Los grupos reactivos y clases de reacciones útiles en la práctica de la presente invención son generalmente aquellos que son bien conocidos en la técnica de la química del bioconjugado. Las clases de reacciones actualmente favorecidas disponibles con unidades estructurales de aminoácidos reactivos son aquellas que se desarrollan en condiciones relativamente suaves. Estas incluyen, pero no se limitan a sustituciones nucleofílicas (por ejemplo, reacciones de aminas y alcoholes con haluros de acilo, ésteres activos), sustituciones electrofílicas (por ejemplo, reacciones de enamina) y adiciones a enlaces múltiples carbono-carbono y carbono-heteroátomo (por ejemplo, reacción de Michael, adición de Diels - Alder). Estas y otras reacciones útiles se discuten en, por ejemplo, March, *ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY*, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1985; Hermanson, *BIOCONJUGATE TECHNIQUE*, Academic Press, San Diego, 1996; y Feeney et al., *MODIFICATION OF PROTEINS*; Advances in Chemistry Series, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982.

Los grupos funcionales reactivos útiles pendientes de un polipéptido de hemoglobina o PEG incluyen, pero no se limitan a:

20 (a) grupos carboxilo y diversos derivados de los mismos incluyendo, pero sin limitarse a ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-hidroxibenzotriazol, haluros de ácido, acilimidazoles, tioésteres, ésteres de p-nitrofenilo, ésteres de alquilo, alquenilo, alquinilo y aromáticos;

(b) grupos hidroxilo, que pueden convertirse en, por ejemplo, ésteres, éteres, aldehídos, etc.

(c) grupos haloalquilo, en los que el haluro puede desplazarse posteriormente con un grupo nucleófilo tal como, por ejemplo, una amina, un anión carboxilato, un anión tiol, un carbanión o un ion alcóxido, dando lugar así a la unión covalente de un nuevo grupo en el grupo funcional del átomo de halógeno;

25 (d) grupos dienófilos, que son capaces de participar en reacciones de Diels-Alder tales como, por ejemplo, grupos maleimido;

(e) grupos aldehído o cetona, de manera que la posterior derivación es posible mediante la formación de derivados de carbonilo tales como, por ejemplo, iminas, hidrazonas, semicarbazonas u oximas, o a través de mecanismos tales como adición de Grignard o adición de alquil litio;

30 (f) grupos haluro de sulfonilo para la reacción posterior con aminas, por ejemplo, para formar sulfonamidas;

(g) grupos tiol, que pueden ser, por ejemplo, convertidos en disulfuros o reaccionados con haluros de acilo, o convertidos en tioésteres, por ejemplo, por reacción con maleimidias;

(h) grupos amina o sulfhidrilo, que pueden ser, por ejemplo, acilados, alquilados u oxidados;

(i) alquenos, que pueden sufrir, por ejemplo, cicloadiciones, acilación, adición de Michael, etc.;

35 (j) epóxidos, que pueden reaccionar con, por ejemplo, aminas y compuestos hidroxilo; y

(k) maleimidias, que pueden reaccionar con, por ejemplo, aminas y sulfhidrilos.

40 Los grupos funcionales reactivos pueden elegirse de tal manera que no participen ni interfieran en las reacciones necesarias para ensamblar el grupo modificador polimérico reactivo (PEG). Alternativamente, un grupo funcional reactivo puede estar protegido de participar en la reacción por la presencia de un grupo protector. Los expertos en el arte entienden cómo proteger un grupo funcional particular de tal manera que no interfiera con un conjunto elegido de condiciones de reacción. Para ejemplos de grupos protectores útiles, véase, por ejemplo, Greene et al., *PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS*, John Wiley & Sons, New York, 1991.

45 Condiciones de conjugación apropiadas son las condiciones de tiempo, temperatura, pH, concentración de reactivo, grupo(s) funcional(es) reactivo(s), grupos funcionales disponibles sobre el agente activo, solvente y similares suficientes para efectuar la conjugación entre un reactivo polimérico y un agente activo. Como es sabido en la técnica, las condiciones específicas dependen, entre otras cosas, del agente activo, del tipo de conjugación deseada, de la presencia de otros materiales en la mezcla de reacción, y así sucesivamente. Las condiciones suficientes para efectuar la conjugación en cualquier caso particular pueden ser determinadas por un experto en el arte tras una lectura de la divulgación en este documento, referencia a la bibliografía pertinente, y/o a través de experimentación rutinaria.

Por ejemplo, cuando el reactivo polimérico contiene un éster activo de N-hidroxisuccinimida (por ejemplo, succinato de succinimidilo, carbonato de succinimidilo, propionato de succinimidilo, y butanoato de succinimidilo), y el agente activo contiene un grupo amina (por ejemplo, un grupo amina terminal en un polipéptido y/o una épsilon amina de un polipéptido que contiene lisina), la conjugación se puede efectuar a un pH desde aproximadamente 7.5 a aproximadamente 9.5 a temperatura ambiente. Además, cuando el reactivo polimérico contiene un grupo reactivo de vinilsulfona o un grupo de maleimida y el agente farmacológicamente activo contiene un grupo sulfhidrilo (por ejemplo, un grupo sulfhidrilo de un polipéptido que contiene cisteína o que contiene metionina), la conjugación se puede efectuar a un pH desde aproximadamente 7 a aproximadamente 8.5 a temperatura ambiente. Por otra parte, cuando el grupo reactivo asociado con el reactivo polimérico es un aldehído o cetona y el agente farmacológicamente activo contiene una amina primaria, la conjugación se puede efectuar mediante aminación reductora en la que la amina primaria del agente farmacológicamente activo reacciona con el aldehído o cetona del polímero. Teniendo lugar a pH desde aproximadamente 6 a aproximadamente 9.5, la aminación reductora origina inicialmente un conjugado en el que el agente farmacológicamente activo y el polímero están unidos mediante un enlace imina. El tratamiento posterior del conjugado que contiene imina con un agente reductor apropiado tal como NaCNBH_3 reduce la imina a una amina secundaria.

Ejemplos de condiciones de conjugación incluyen llevar a cabo la reacción de conjugación a un pH desde aproximadamente 4 a aproximadamente 10, y, por ejemplo, a un pH de aproximadamente 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, o 10.0. Se deja que la reacción pase desde aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 72 horas, por ejemplo, desde aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 48 horas, por ejemplo, desde aproximadamente 4 horas a aproximadamente 24 horas. La temperatura bajo la cual puede tener lugar la conjugación es por lo general, aunque no necesariamente, en el intervalo desde aproximadamente 0°C a aproximadamente 40°C , y es a menudo a temperatura ambiente o menos. Las reacciones de conjugación se llevan a cabo a menudo usando una solución reguladora de fosfato, acetato de sodio o un sistema similar.

Con respecto a la concentración del reactivo, un exceso del reactivo polimérico se combina por lo general con la hemoglobina. Las proporciones de ejemplo de reactivo polimérico a hemoglobina incluyen proporciones molares de aproximadamente 1:1 (reactivo polimérico: hemoglobina), 5:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1 o 30:1. En diversas realizaciones, se permite que la reacción de conjugación continúe hasta que prácticamente no se produzca ninguna conjugación adicional, lo que generalmente se puede determinar controlando el progreso de la reacción a lo largo del tiempo.

El progreso de la reacción se puede controlar retirando partes alícuotas de la mezcla de reacción en diversos puntos temporales y analizando la mezcla de reacción mediante SDS-PAGE o espectrometría de masas MALDI-TOF o cualquier otro método analítico apropiado. Una vez que se alcanza una meseta con respecto a la cantidad de conjugado formado o la cantidad de reactivo polimérico no conjugado que queda, se supone que la reacción es completa. Por lo general, la reacción de conjugación toma desde minutos hasta varias horas (por ejemplo, de 5 minutos a 24 horas o más). La mezcla de producto resultante está preferiblemente, pero no necesariamente purificada, para separar el exceso de reactivo polimérico, los reactivos no conjugados (por ejemplo, el agente activo) y las especies no conjugadas múltiples no deseadas. Los conjugados resultantes se pueden caracterizar posteriormente mediante métodos analíticos tales como MALDI, electroforesis capilar, electroforesis en gel y/o cromatografía.

Los conjugados de polímero-hemoglobina se pueden purificar para obtener/aislar diferentes especies conjugadas. Alternativamente, y más preferiblemente para reactivos poliméricos de menor peso molecular (por ejemplo, menos de aproximadamente 20,000 Dalton, más preferiblemente menos de aproximadamente 10,000 Dalton) usados para formar conjugados, la mezcla de productos se puede purificar para obtener la distribución de segmentos poliméricos solubles en agua por agente activo. Por ejemplo, la mezcla de productos se puede purificar para obtener un promedio de un número deseado de uniones del reactivo polimérico por molécula de Hb, por lo general un promedio desde aproximadamente 7, 8, 9 ó 10 uniones por molécula de Hb. La estrategia para la purificación de la mezcla de reacción conjugada final dependerá de una serie de factores, incluyendo, por ejemplo, el peso molecular del reactivo polimérico empleado, la formulación particular de Hb, el régimen de dosificación deseado y la actividad residual y las propiedades in vivo del(los) conjugado(s) individual(es).

Si se desea, se pueden aislar conjugados que tienen diferentes pesos moleculares usando cromatografía de filtración en gel. Es decir, la cromatografía de filtración en gel se usa para fraccionar las proporciones poliméricas de agente reactivo-agente activo numeradas de forma diferente (por ejemplo, 1-mer, 2-mer, 3-mer, y así sucesivamente, en donde "1-mer" indica 1 polímero reactivo al agente activo, "2-mer" indica dos reactivos poliméricos al agente activo, y así sucesivamente) sobre la base de sus diferentes pesos moleculares (donde la diferencia corresponde esencialmente al peso molecular promedio de los segmentos poliméricos solubles en agua). Por ejemplo, en una reacción de ejemplo en la que una proteína de 100,000 Dalton se conjuga al azar con un PEG ramificado que tiene un peso molecular total de aproximadamente 20,000 Dalton (en el que cada "rama" polimérica del PEG ramificado tiene un peso molecular de aproximadamente 10,000 Dalton) la mezcla de reacción resultante puede contener proteína no modificada (que tiene un peso molecular de aproximadamente 100,000 Dalton), proteína monoPEGilada (que tiene un peso molecular de aproximadamente 120,000 Dalton), proteína diPEGilada (que tiene un peso molecular de aproximadamente 140,000 Dalton), y así sucesivamente.

Aunque este enfoque se puede usar para separar PEG y otros conjugados de agente activo polimérico que tienen diferentes pesos moleculares, este enfoque es generalmente ineficaz para separar isómeros posicionales que tienen diferentes sitios de unión de polímero dentro de la proteína. Por ejemplo, se puede usar cromatografía de filtración en gel para separar entre sí las mezclas de PEG 1-mers, 2-mers, 3-mers, y así sucesivamente, aunque cada una de las composiciones PEG-mer recuperadas pueden contener PEG unidos a diferentes grupos amino reactivos (por ejemplo, residuos de lisina) dentro del agente activo.

Las columnas de filtración en gel apropiadas para llevar a cabo este tipo de separación incluyen columnas Superdex™ y Sephadex™ disponibles en Amersham Biosciences (Piscataway, N.J.). La selección de una columna particular dependerá del intervalo de fraccionamiento deseado. La elución se lleva a cabo generalmente usando una solución reguladora apropiada, tal como fosfato, acetato, o similares. Las fracciones recogidas se pueden analizar mediante diversos métodos, por ejemplo, (i) densidad óptica (DO) a 280 nm para el contenido de proteína, (ii) análisis de proteína de albúmina de suero bovino (BSA), (iii) ensayo de yodo para PEG (Sims et al. (1980) Anal. Biochem, 107:60-63), y (iv) electroforesis en gel de poli(acrilamida de dodecilsulfato de sodio (SDS PAGE), seguido por tinción con yoduro de bario.

El polímero soluble en agua es PEG y en diversas realizaciones, tiene un peso molecular de aproximadamente 1 kD, 5 kD, 10 kD, 15 kD, 20 kD, 30 kD o 40 kD. Las unidades estructurales de PEG son especies de PEG lineales o ramificadas. El término de la unidad estructural de PEG, que no está unido al polipéptido (o a un enlazante unido al polipéptido), puede ser ya sea OH u otra unidad estructural, por ejemplo, grupo alquilo O-(C₁-C₄) sustituido o no sustituido. OMe (donde Me es un grupo metilo) se prefiere actualmente.

En una realización de ejemplo, el polímero soluble en agua es un PEG lineal o ramificado. En diversas realizaciones, los conjugados incluyen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 unidades estructurales de PEG por péptido. En una realización de ejemplo, el polímero soluble en agua es un PEG lineal y el conjugado incluye aproximadamente 6, 7, 8, 9 o 10 unidades estructurales de PEG por molécula peptídica. En otra realización de ejemplo, el polímero soluble en agua es un PEG ramificado y el conjugado incluye aproximadamente 1, 2, 3, 4 o 5 unidades estructurales de PEG por molécula peptídica.

En realizaciones de ejemplo, en las que el PEG es una especie lineal, la unidad estructural de PEG tiene un peso molecular que es desde aproximadamente 200 D a aproximadamente 20 kD. En diversas realizaciones, en las que la unidad estructural de PEG es una unidad estructural de PEG lineal, el peso molecular del PEG lineal es al menos aproximadamente 200 D, al menos aproximadamente 500 D, al menos aproximadamente 1 kD, al menos aproximadamente 2 kD, al menos aproximadamente 5 kD, al menos aproximadamente 10 kD, al menos aproximadamente 20 kD, al menos aproximadamente 30 kD o al menos aproximadamente 40 kD.

Una especie PEG de ejemplo de uso en la invención es un PEG ramificado que tiene dos o más ramas de PEG. Un ejemplo de esta realización se basa en un aminoácido de cadena lateral, por ejemplo, serina, cisteína o lisina y di-, tri- y tetrapéptidos formados a partir de estos aminoácidos individualmente o en combinación.

En otras realizaciones de ejemplo en las que la especie PEG está ramificada, el PEG ramificado incluye desde 2 a 6 ramas lineales de PEG. Ramas de PEG de ejemplo tienen un peso molecular desde aproximadamente 200 D a aproximadamente 30 kD. En diversas realizaciones, cada rama tiene un peso molecular seleccionado individualmente que es al menos aproximadamente 2 kD, al menos aproximadamente 5 kD, al menos aproximadamente 10 kD, al menos aproximadamente 15 kD, al menos aproximadamente 20 kD, al menos aproximadamente 30 kD o al menos aproximadamente 40 kD.

En la presente invención, al menos una unidad estructural poli(etilenglicol) está covalentemente conjugada a través de una unidad estructural amina de un residuo de aminoácido de las moléculas de hemoglobina. En una realización de ejemplo, el residuo de aminoácido es un residuo de lisina y al menos una unidad estructural poli(etilenglicol) está covalentemente conjugada con una unidad estructural ε-amina del residuo de lisina. Ejemplos de unidades estructurales de conjugación son a través de un enlace que es un miembro seleccionado entre una amida y un uretano.

45 Estabilidad de los Conjugados

En diversas realizaciones, la invención proporciona conjugados de PEG-hemoglobina que son altamente estables, según se mide por su resistencia a la formación de metahemoglobina. En una realización, la invención proporciona un conjugado que incluye menos del 5%, 4% o 3% de metahemoglobina después del almacenamiento a 45°C, durante al menos aproximadamente 4 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 6 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 8 días, al menos aproximadamente 9 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 11 días, al menos aproximadamente 12 días, al menos aproximadamente 13 días, al menos aproximadamente 14 días, o al menos aproximadamente 15 días.

En diversas realizaciones, la invención proporciona conjugados de PEG-hemoglobina que son altamente estables, según se mide por su resistencia a la formación de metahemoglobina. En una realización, la invención proporciona un conjugado que incluye menos de aproximadamente 5%, 4% o 3% de metahemoglobina después del almacenamiento a 4°C, durante al menos aproximadamente 5 semanas, al menos aproximadamente 6 semanas, al menos

aproximadamente 7 semanas, al menos aproximadamente 8 semanas, al menos aproximadamente 9 semanas, al menos aproximadamente 10 semanas, al menos aproximadamente 11 semanas, al menos aproximadamente 12 semanas, al menos aproximadamente 13 semanas, al menos aproximadamente 14 semanas, al menos aproximadamente 15 semanas, o al menos aproximadamente 16 semanas.

5 En diversas realizaciones, la invención proporciona una forma de monóxido de carbono (CO) del conjugado de PEG-hemoglobina. Esta forma parece ser particularmente estable con respecto a mantener baja la formación de % de MET-Hb como se muestra en la tabla 3. Por ejemplo, la forma de CO mostró solamente un 4.0% de % de MET-Hb después del almacenamiento a 37°C, durante 16 semanas. Esto es más estable que la forma mecánicamente desoxigenada.

10 Un conjugado de ejemplo de la invención es totalmente eficaz en un modelo animal de choque hipovolémico después del almacenamiento a 45°C, durante al menos aproximadamente 3 semanas, al menos aproximadamente 4 semanas o al menos aproximadamente 5 semanas.

15 En una formulación de ejemplo de acuerdo con cada una de las descripciones anteriores, la hemoglobina del conjugado está en forma de CO. En diversas realizaciones, la invención proporciona un conjugado de PEG-Hb-CO que es estable a 4°C, durante al menos aproximadamente 3 meses, al menos aproximadamente 6 meses, al menos aproximadamente 9 meses o al menos aproximadamente 12 meses.

Formulaciones combinadas

20 En diversas realizaciones de ejemplo, la invención proporciona formulaciones de combinación que incluyen uno o más conjugados de PEG-Hb o formulación de la invención en combinación con otro agente terapéutico o un agente que potencia, complementa o aumenta la actividad del conjugado de PEG-Hb en la formulación. Los agentes de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, coagulantes o precursores de coagulantes, enzimas antioxidantes y agentes que proporcionan profilaxis contra o tratan la lesión por isquemia/reperfusión. Ejemplos de especies de acuerdo con estos ejemplos se exponen a continuación.

En una realización de ejemplo, la invención proporciona una formulación que incluye una o más composiciones de PEG-Hb de la invención en combinación con plaquetas.

25 Las plaquetas son células sanguíneas anucleadas derivadas de la médula ósea que protegen a los mamíferos lesionados de la pérdida de sangre adhiriéndose a sitios de lesión vascular y promoviendo la formación de coágulos de fibrina plasmática. Los seres humanos agotados de las plaquetas circulantes por insuficiencia de la médula ósea sufren de sangrado espontáneo que amenaza la vida y las deficiencias menos graves de las plaquetas contribuyen a las complicaciones hemorrágicas tras el traumatismo o la cirugía.

30 Se conoce mucho más sobre las células de plaquetas humanas. Las publicaciones generales que describen técnicas, materiales y métodos para el almacenamiento de plaquetas se describen por Murphy et al., Blood 60(1):194-200 (1982); Murphy in "The Preparation and Storage of Platelets for Transfusion", Mammon, Barnhart, Lusher, and Walsh, PJD Publications, Ltd., Westbury, N.Y. (1980); Murphy in "Platelet Transfusion", Progress in Hemostasis and Thrombosis, Vol. III, Ed. by T. Spaet, Grune and Stratton, Inc. (1976); Murphy et al., Blood 46(2):209-218 (1975); Kilkson et al., Blood 64(2):406-414 (1984); Murphy in "Platelet Storage for Transfusion", Seminars in Hematology 22(3): 165-177 (1985); Simon et al., Transfusion 23:207-212 (1983); Cesar et al., Transfusion 27(5):434-437 (1987).

35 Una reducción en el número de plaquetas circulantes por debajo de ~70,000 por gel supuestamente tiene como resultado una prolongación de una prueba estandarizada de tiempo de sangrado cutáneo, y el intervalo de sangrado se prolonga, extrapolando hasta casi infinito a medida que el recuento de plaquetas cae a cero. Los pacientes con recuentos de plaquetas de menos de 20,000 por gel se cree que son altamente susceptibles a la hemorragia espontánea de las superficies de la mucosa.

40 Las formulaciones de PEG-Hb de plaquetas de la invención son de uso para tratar sujetos que sufren de fallo de la médula ósea, por ejemplo, anemia aplásica, leucemias agudas y crónicas, cáncer metastásico, pero especialmente resultante del tratamiento del cáncer con radiación ionizante y quimioterapia. Además, las formulaciones son útiles en el tratamiento y la mejora de la trombocitopenia asociada con cirugía mayor, lesión (por ejemplo, traumatismo) y sepsis.

45 Las plaquetas y la formulación de PEG-Hb pueden combinarse de cualquier manera práctica y eficaz. De este modo, en una realización de ejemplo, las plaquetas y PEG-Hb se combinan poco antes de que la composición resultante se administre a un sujeto. En otras realizaciones de ejemplo, la formulación de plaquetas-PEG-Hb se prepara y se almacena durante un tiempo apropiado.

50 En diversas realizaciones, las plaquetas, solas o en combinación con la formulación de PEG-Hb, se estabilizan mediante un agente estabilizante. Ejemplos de agentes estabilizantes de uso en la presente invención son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Nos. 7,241,282 y 5,466,573. La fuente de plaquetas es también opcionalmente una composición sanguínea enriquecida en plaquetas y fibrinógeno tal como la descrita en la Patente de los Estados Unidos No. 6,649,072.

5 En una realización de ejemplo, la invención proporciona un kit en el que los dos (o más) componentes están presentes y almacenados por separado antes de su combinación. Por ejemplo, en diversas realizaciones la invención proporciona un dispositivo para combinar las plaquetas y la formulación de PEG-Hb. El dispositivo incluye un primer recipiente para recoger o almacenar Factor(es); y al menos un recipiente satélite en comunicación fluida con el primer recipiente en el que se almacena la formulación de PEG-Hb. Durante el uso, se interpone una barrera de sellado por rotura entre el recipiente primero y el satélite de manera que, al romper el cierre hermético, los dos componentes de la formulación se pueden mezclar y posteriormente administrar a un sujeto que lo necesite. Como apreciará un experto, los equivalentes del dispositivo descrito están disponibles y caen dentro del espíritu y alcance de esta divulgación. Por ejemplo, un kit puede incluir dos o más ampollas, conteniendo cada una un elemento de la formulación de combinación de la invención en forma líquida o seca. El contenido de las ampollas se puede mezclar en un momento apropiado y de una manera apropiada antes de la administración de la formulación de combinación a un sujeto que lo necesite.

10 En una realización de ejemplo adicional, la invención proporciona una formulación en la que una formulación de PEG-Hb de la invención se combina con uno o más factores de coagulación. Tales formulaciones son útiles en el tratamiento de ciertos trastornos de la coagulación (por ejemplo, una deficiencia hereditaria o adquirida en la coagulación de la sangre), hemorragia aguda y profilaxis prequirúrgica de la hemorragia entre otros usos.

15 En una realización de ejemplo, la invención proporciona una formulación de combinación que incluye una formulación de PEG-Hb de la invención y un factor de coagulación que es un miembro seleccionado entre los Factores II, V, VII, VIII, IX, X, XI y XII y una combinación de los mismos. En diversas realizaciones de ejemplo, el Factor se selecciona entre Factor VII, Factor VIII y Factor IX o una combinación de los mismos.

20 La coagulación de la sangre es un procedimiento complejo que requiere la interacción secuencial de un gran número de componentes, casi todos los cuales son proteínas. Estos componentes incluyen fibrinógeno y Factores II, V, VII, VIII, IX, X, XI y XII. Una falta de cualquiera de estos componentes, o un componente no funcional, puede conducir a una incapacidad de la sangre para coagular cuando sea necesario, con la consiguiente pérdida de sangre excesiva y potencialmente mortal para el paciente.

25 La técnica está repleta de métodos establecidos para la preparación de concentrados de factor de coagulación de diversos sorbentes. Por ejemplo, la purificación del complejo Factor VIII ha dado como resultado preparaciones de Factor VIII que tienen un nivel de pureza de aproximadamente 90% o más y que son suficientemente estables para almacenamiento durante largos períodos de tiempo en una forma liofilizada. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4,650,858; y la Patente de los Estados Unidos No. 5,399,670. También están disponibles formulaciones de Factor VIII. Estos incluyen factor VIII humano (como los principios activos de Humate™, Monoclate™, Immunate™, y Hemofil™), factor VIII humano recombinante (como r-VIII SQ que se describe en la Solicitud de Patente PCT WO 91/09122 (el principio activo de ReFacto™) o los principios activos de Kogenate™ o Recombinate™), el factor VIII porcino (que es el principio activo del producto Hyate:C™) vendido por Ipsen, Inc., EE.UU.) o el factor VIII porcino recombinante (por ejemplo, una forma modificada sin dominio B de factor VIII porcino como la descrita en la solicitud de patente WO 01/68109 e identificada como "POL1212").

30 Las formulaciones del Factor VIII adicionales de uso en la presente invención incluyen las descritas en la Patente de los Estados Unidos No.5,565,427, la Patente de los Estados Unidos No. 5,605,884, la Patente de los Estados Unidos No. 5,763,401 la Patente de los Estados Unidos No. 5,874,408, la Patente de los Estados Unidos No. 5,962,650, la Patente de los Estados Unidos No. 5,972,885, WO 89/09784, y WO 94/07510.

40 Otros Factores están disponibles de manera similar y de uso en la presente invención. En una realización de ejemplo, el Factor VII se incorpora en una formulación de PEG-Hb de la invención. El factor VII es una glicoproteína de cadena sencilla (peso molecular 50,000) de 406 aminoácidos que se secreta en la sangre donde circula en forma de zimógeno. In vitro, el FVII se puede activar proteolíticamente al factor FVII activado, o FVIIa, mediante la acción de factores de coagulación activados Factor X (FXa), Factor IX (FIXa), Factor XII (FXIIa) o Factor II (FIIa). FVIIa no promueve la coagulación por sí mismo, pero puede complejarse con el factor tisular (TF) expuesto en el sitio de la lesión. El complejo FVIIa/TF puede convertir FX a FXa, induciendo así la hemostasia local en el sitio de la lesión. La activación de FVII a FVIIa implica la escisión proteolítica en un solo enlace peptídico entre Arg-152 e Ile-153, dando como resultado una molécula de dos cadenas que consiste en una cadena ligera de 152 residuos de aminoácidos y una cadena pesada de 254 residuos de aminoácidos mantenidos juntos por un solo enlace disulfuro.

45 Los métodos de producción y purificación del Factor VII son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 6,329,176. Se han descrito algunas variantes de FVII manipuladas con proteínas. Véase, por ejemplo, Dickinson et al., J. Bio. Chem. 272:19875-19879 (1997), Kembal-Cook et al., J. Biol. Chem. 273:8516-8521 (1998), Bharadwaj et al., J. Biol. Chem. 271:30685-30691 (1996), Ruf et al., Biochemistry, 38:1957-1966 (1999); WO 99/20767; WO 00/11416; WO 02/22776; WO 02/38162; WO 01/83725; WO 01/58935; y la Patente de los Estados Unidos No. 5,580,560. El FVII se ha expresado en BHK y otras células de mamífero (WO 92/15686, WO 91/11514 y WO 88/10295) y coexpresión de FVII y endoproteasa kex2 en células eucariotas (WO 00/28065). Las preparaciones comerciales de FVIIa recombinante humano se venden como NovoSeven™. NovoSeven™ está indicado para el tratamiento de episodios hemorrágicos en pacientes con hemofilia A o B.

La hemofilia B es causada por una deficiencia de una proteína del plasma sanguíneo, llamada Factor IX que afecta a la propiedad de coagulación de la sangre. El trastorno es causado por un rasgo hereditario recesivo ligado a X, con el gen defectuoso localizado en el cromosoma X. De este modo, el trastorno se produce principalmente en los hombres. El factor IX humano es un zimógeno dependiente de la vitamina K que desempeña un papel importante en la coagulación de la sangre. El factor IX circula como un zimógeno de cadena única de 415 aminoácidos con una masa molecular de 55,000 dalton y está presente en plasma normal a aproximadamente 5 µg/ml.

Existen varias formas comerciales de concentrados de Factor IX disponibles para proporcionar terapia de reemplazo para pacientes que padecen hemofilia B. Por ejemplo, los productos complejos del Factor IX derivados de sangre (que contienen otros factores) se venden bajo las marcas Bebulin VH™ (Baxter Healthcare, Vienna, Austria), konyne 80™ (Bayer Corporation, Elkhart Ind.), Profilnine SD™ (Alpha Therapeutic Corporation, Los Angeles Calif), y Proplex™ (Baxter Healthcare, Glendale California). Las formas algo más purificadas de los productos Factor IX se venden bajo las marcas Alphanine SD™ (Alpha Therapeutic Corporation, Los Angeles California) y Mononine™ (Aventis Behring, Kankakee Ill). Con respecto a los concentrados de Factor IX preparados de forma recombinante, un producto, que actualmente está disponible, es Benefix.™ (Wyeth/Genetics Institute, Cambridge Mass.).

La síntesis recombinante y la purificación de otros factores de coagulación y la incorporación de estos factores en una formulación de la invención es con las capacidades de los expertos en el arte.

El(los) Factor(es) y la formulación de PEG-Hb se pueden combinar de cualquier manera práctica y eficaz. De este modo, en una realización de ejemplo, el(los) Factor(es) y PEG-Hb se combinan poco antes de que la composición resultante se administre a un sujeto. En otras realizaciones de ejemplo, la formulación de Factor (s) -PEG-Hb se prepara y se almacena durante un tiempo apropiado.

En una realización de ejemplo, la invención proporciona un kit en el que los dos componentes (o más) están presentes y almacenados por separado antes de su combinación. Por ejemplo, en diversas realizaciones la invención proporciona un dispositivo para combinar el Factor (es) y la formulación de PEG-Hb. El dispositivo incluye un primer recipiente para recoger o almacenar el(los) Factor(es); y al menos un recipiente satélite en comunicación fluida con el primer recipiente en el que se almacena la formulación de PEG-Hb. Durante el uso, se interpone una barrera de sellado por rotura entre el recipiente primero y el recipiente satélite de manera que, al romper el cierre hermético, los dos componentes de la formulación se pueden mezclar y posteriormente administrar a un sujeto que lo necesite. Como apreciará un experto, los equivalentes del dispositivo descrito están disponibles y caen dentro del espíritu y alcance de esta divulgación. Por ejemplo, un kit puede incluir dos o más ampollas, conteniendo cada una un elemento de la formulación de combinación de la invención en forma líquida o seca. El contenido de las ampollas se puede mezclar en un momento apropiado y de una manera apropiada antes de la administración de la formulación de combinación a un sujeto que lo necesite.

En otra realización de ejemplo, la invención proporciona una formulación de combinación entre una fuente de NO y una formulación de PEG-Hb de la invención. Esta realización de la invención se ilustra haciendo referencia a diversas moléculas donantes de NO, sin embargo, un experto apreciará fácilmente que la fuente de NO no se limita a estas ilustraciones de ejemplo y otras fuentes de NO se pueden incorporar en la formulación de combinación de la invención.

El óxido nítrico (NO) es una importante molécula mensajera intracelular e intercelular que juega un importante papel fisiológico en la agregación antiplaquetaria y la activación antiplaquetaria, la relajación vascular, la neurotransmisión y la respuesta inmune. NO (óxido nítrico) es una "molécula mensajera" biológica que disminuye la presión arterial e inhibe la función plaquetaria, entre otras funciones. NO difunde libremente desde el endotelio hasta el músculo liso vascular y las plaquetas y a través de las sinapsis neuronales para evocar respuestas biológicas.

Los tejidos privados de sangre y oxígeno sufren necrosis isquémica o infarto con posible daño irreversible de órganos. Una vez que el flujo de sangre y oxígeno se restablece en el órgano o tejido (reperfusión), el órgano no retorna inmediatamente al estado pre-isquémico normal. La disfunción postisquémica puede deberse a una variedad de factores. Los radicales libres de oxígeno pueden jugar un papel, ya que la generación de radicales libres en el miocardio aturdido se ha demostrado y eliminadores de radicales libres se ha demostrado que atenúan la disfunción contráctil. El deterioro del manejo del calcio intracelular y la sobrecarga de calcio durante la reperfusión temprana pueden contribuir a la disfunción postisquémica.

Está bien establecido que el estrés oxidativo excesivo debido a radicales libres puede dañar tejidos biológicos. Las defensas naturales de las células y los tejidos giran en torno a los mecanismos antioxidantes que han evolucionado para proteger las células y los tejidos contra los altos niveles de estrés oxidativo. En nuestra atmósfera rica en oxígeno, la presencia de oxígeno en ciertos momentos de estrés puede ser perjudicial; esto se ha denominado la paradoja del oxígeno y se relaciona con el papel del oxígeno en la generación y participación en los procedimientos de radicales libres. En ciertos estados patológicos asociados con períodos de flujo sanguíneo restringido a los tejidos, tales como ataque cardíaco, accidente cerebrovascular y flujo restringido a las extremidades, episodios intermitentes de ausencia de flujo seguidos por reflujo de sangre constituyen el estrés oxidativo de isquemia/reperfusión (I/R).

Como se usa en este documento, el término donante de NO abarca cualquier compuesto que libere, suministre o transfiera monóxido de nitrógeno, incluyendo, por ejemplo, S-nitrosotioles, nitritos, nitratos, S-nitrotioles, sidoniminas, 2-

- 5 hidroxil-2-nitrosodiazinas (NONOatos), (E)-alquil-2-((E)-hidroxiiimino)-5-nitro-3-hexenoamida (FK-409), (E)-alil-2-((E)-hidroxiiimino)-5-nitro-3-hexenoaminas, N-((2Z, 3E)-4-etil-2-(hidroxiiimino)-6-metil-5-nitro-3-heptenil)-3-piridinacarboxamida (FR 146801), N-nitrosoaminas, N-hidroxi nitrosaminas, nitrosiminas, diazetina dióxidos, oxatriazol 5-iminas, oximas, hidroxilaminas, N-hidroxiguanidinas, hidroxiiureas, benzofuroxanos, furoxanos así como sustratos para las enzimas endógenas que sintetizan óxido nítrico.
- 10 Los NONOatos apropiados incluyen, pero no se limitan a, (Z)-1-(N-metil-N-(6-(N-metil-amoniohexil) amino)) diazen-1-ium-1,2-diolato ("MAHMA/NO"), (Z)-1-(N-(3-amoniopropil)-N-(n-propil)amino) diazen-1-ium-1,2-diolato ("PAPA/NO"), (Z)-1-(N-(3-aminopropil)-N-(4-(3-aminopropilamonio)butil)-amino) diazen-1-ium-1,2-diolato (spermine NONOato o "SPER/NO") y (Z)-1-(N,N-dietilamino) diazenio-1,2-diolato de sodio (dietilamina NONOato o "DEA/NO") y derivados de los mismos. NONOatos también se describen en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,232,336, 5,910,316 y 5,650,447. Los "aductos de NO" pueden ser mononitrosilados, polinitrosilados, mononitrosados y/o polinitrosados en una variedad de sitios de unión naturalmente susceptibles o proporcionados artificialmente para formas biológicamente activas de monóxido de nitrógeno.
- 15 Los furoxanos apropiados incluyen, pero no se limitan a, CAS 1609, C93-4759, C92-4678, S35b, CHF 2206, CHF 2363, y similares.
- Las sidnoniminas apropiadas incluyen, pero no se limitan a, molsidomina (N-etoxicarbonil-3-morfolinisidnonimina), SIN-1 (3-morfolinisidnonimina) CAS 936 (3-(cis-2,6-dimetilpiperidino)-N-(4-metoxibenzoil)-sidnonimina, pirsidomina), C87-3754 (3-(cis-2,6-dimetilpiperidino)sidnonimina, linsidomina, C4144 clorhidrato de (3-(3,3-dimetil-1,4-tiazano-4-il)sidnonimina), C89-4095 clorhidrato de (3-(3,3-dimetil-1,1-dioxo-1,4-tiazano-4-il)sidnonimina, y similares.
- 20 Las oximas apropiadas incluyen, pero no se limitan a, NOR-1, NOR-3, NOR-4, y similares.
- Un grupo de aductos de NO es los S-nitrosotioles, que son compuestos que incluyen al menos un grupo SNO. Estos compuestos incluyen S-nitroso-polipéptidos (el término "polipéptido" incluye proteínas y poliaminoácidos que no poseen una función biológica determinada, y derivados de los mismos); aminoácidos S-nitrosilados (incluyendo aminoácidos naturales y sintéticos y sus estereoisómeros y mezclas racémicas y derivados de los mismos); azúcares S-nitrosilados; oligonucleótidos; S-nitrosilados, modificados y no modificados (preferiblemente de al menos 5, y más preferiblemente 5-200 nucleótidos); hidrocarburos S-nitrosilados lineales o ramificados, saturados o insaturados, alifáticos o aromáticos, sustituidos o no sustituidos; y compuestos heterocíclicos S-nitroso. Los S-nitrosotioles y métodos para prepararlos se describen en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,380,758 y 5,703,073; WO 97/27749; WO 98/19672; y Oae et al, Org. Peep. Proc. Int., 15(3):165-198 (1983).
- 25 Otra clase de donante de NO apropiada es aminoácidos S-nitroso donde el grupo nitroso está unido a un grupo azufre de un aminoácido que contiene azufre o derivado del mismo. Tales compuestos incluyen, por ejemplo, S-nitroso-N-acetilcisteína, S-nitroso-captopril, S-nitroso-N-acetilpenicilamina, S-nitroso-homocisteína, S-nitroso-cisteína, S-nitroso-glutatión, S-nitroso-cisteinil-glicina, y similares.
- 30 Las proteínas S-nitrosiladas apropiadas incluyen proteínas que contienen tiol (donde el grupo NO está unido a uno o más grupos azufre sobre un aminoácido o derivado de aminoácido del mismo) de diversas clases funcionales incluyendo enzimas, tales como activador de plasminógeno tipo tejido (TPA) y catepsina B; proteínas de transporte, tales como lipoproteínas; hemoproteínas, tales como hemoglobina y albúmina sérica; y proteínas biológicamente protectoras, tales como inmunoglobulinas, anticuerpos y citoquinas. Tales proteínas nitrosiladas se describen en el documento WO 93/09806. Los ejemplos incluyen albúmina polinitrosilada en la que se modifican uno o más tiol u otros centros nucleofílicos en la proteína.
- 35 Otro grupo de aductos de NO para uso en la invención, donde el aducto de NO es un compuesto que dona, transfiere o libera óxido nítrico, incluyen compuestos que comprenden al menos un grupo ONO u ONN. Los compuestos que incluyen al menos un grupo ONO u ONN son preferiblemente polipéptidos ONO u ONN (el término "polipéptido" incluye proteínas y poliaminoácidos que no poseen una función biológica determinada, y derivados los mismos); aminoácidos ONO u ONN (incluyendo aminoácidos naturales y sintéticos y sus estereoisómeros y mezclas racémicas); azúcares ONO u ONN; oligonucleótidos ONO u ONN modificados o no modificados (que comprenden al menos 5 nucleótidos, preferiblemente 5-200 nucleótidos); hidrocarburos ONO u ON lineales o ramificados, saturados o insaturados, alifáticos o aromáticos, sustituidos o no sustituidos; y compuestos heterocíclicos ONO, ONN u ONC. Ejemplos preferidos de compuestos que comprenden al menos un grupo ON-O u ON-N incluyen nitrito de butilo, nitrito de isobutilo, nitrito de tert-butilo, nitrito de amilo, nitrito de isoamilo, N-nitrosaminas, N-nitrosamidas, N-nitrosourea, N-nitrosoguanidinas, N-nitrosocarbamatos, compuestos N-acil-N-nitroso (tales como, N-metil-N-nitrosourea); N-hidroxi-N-nitrosaminas, cupferrón, alanosina, dopastina, nitrosiminobencimidazoles 1,3-disustituidos, 1,3,4-tiadiazol-2-nitrosiminas, benzotiazol-2(3H)-nitrosiminas, tiazol-2-nitrosiminas, oligonitroso-sidoniminas, 3-alquil-N-nitroso-sidoniminas, 2H-1,3,4-tiadiazina nitrosiminas.
- 45 Otro grupo de aductos de NO para uso en la invención incluyen nitratos que donan, transfieren o liberan óxido nítrico, tales como compuestos que comprenden al menos un grupo O₂NO, O₂NN u O₂N-S. Entre estos compuestos se prefieren los polipéptidos O₂NO, O₂NN u O₂NS (el término "polipéptido" incluye proteínas y también poliaminoácidos que
- 50
- 55

no poseen una función biológica determinada, y derivados de los mismos); aminoácidos O₂NO, O₂NN u O₂NS (incluidos los aminoácidos naturales y sintéticos y sus estereoisómeros y mezclas racémicas); azúcares ONO, O₂NN u O₂NS; oligonucleótidos modificados y no modificados con O₂NO-, O₂NN u O₂NS (que comprenden al menos 5 nucleótidos, preferiblemente 5-200 nucleótidos); hidrocarburos O₂NO, O₂NN u O₂NS, lineales o ramificados, saturados o insaturados, alifáticos o aromáticos, sustituidos o no sustituidos; y compuestos heterocíclicos O₂NO, O₂NN u O₂NS. Los ejemplos preferidos de compuestos que comprenden al menos un grupo O₂NO, O₂NN u O₂NS incluyen dinitrato de isosorbida, mononitrato de isosorbida, clonitrato, tetranitrato de eritritilo, hexanitrato de manitol, nitroglicerina, pentaeritroltetranitrato, pentrinitrol, propatilnitrato y nitratos orgánicos con un aminoácido que contiene sulfhidrilo tales como, por ejemplo SPM 3672, SPM 5185, SPM 5186 y los descritos en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,284,872, 5,428,061, 5,661,129, 5,807,847 y 5,883,122 y en WO 97/46521, WO 00/54756 y en WO 03/013432.

Otro grupo de aductos de NO son N-oxo-N-nitrosoaminas que donan, transfieren o liberan óxido nítrico y están representados por la fórmula: R¹R²NN(OM⁺)NO, donde R¹ y R² son cada uno independientemente un polipéptido, un aminoácido, un azúcar, un oligonucleótido modificado o no modificado, un hidrocarburo lineal o ramificado, saturado o insaturado, alifático o aromático, sustituido o no sustituido, o un grupo heterocíclico, y donde M⁺ es un catión orgánico o inorgánico, tal, como por ejemplo, un catión amonio sustituido con alquilo o un catión metálico del Grupo I.

En combinación con el donante de NO, al sujeto se le puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo compuesto que potencia el efecto terapéutico del NO. El segundo compuesto puede ser, por ejemplo, un inhibidor de la fosfodiesterasa (por ejemplo, 2-o-propoxifenil-8-azapurin-6-ona [ZaprinastTM], dipiridamol, teofilina, sildenafilo [ViagraTM] o 1,3-dimetil-6-[2-propoxi-5-metanosulfonilamidofenil]-pirazolo[3,4-D]pirimidin-4-[5H]-ona) o superóxido dismutasa. El segundo compuesto puede ser alternativamente un agente antitrombótico tal como ticlopidina, estreptoquinasa, uroquinasa, t-PA o un análogo de la misma (por ejemplo, met-t-PA, RetevaseTM o FE1X), heparina, hirudina o un análogo de la misma (por ejemplo, HurulogTM), un agente antiinflamatorio no esteroideo (por ejemplo, indometacina o aspirina), un glucocorticoide (por ejemplo, prednisona), o un agente citotóxico (por ejemplo, metotrexato); o un agente antileucocitario tal como un anticuerpo antileucocitario.

La administración de óxido nítrico se ha utilizado como profilaxis y tratamiento para la lesión por isquemia/reperfusión. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 6,656,452 y las referencias citadas en la misma. De acuerdo con lo anterior, es un objeto adicional de esta invención proporcionar formulaciones de sustitutos de sangre basados en hemoglobina que incluyen una fuente de NO para el tratamiento de la lesión isquémica por perfusión. En una realización de ejemplo, el sustituto de la sangre de la invención se combina con una molécula donadora de NO. La combinación puede estar en el momento de la fabricación del sustituto de la sangre o en cualquier punto posterior a la fabricación inicial. Por ejemplo, la invención proporciona un dispositivo de dos compartimentos o dos recipientes separados. En un compartimento o recipiente se almacena el sustituto de la sangre y en el segundo compartimento o recipiente se suministra una molécula donadora de NO. Antes de la administración a un sujeto que lo necesite, los contenidos de los dos compartimentos o recipientes se mezclan y la formulación resultante se administra al sujeto.

En diversas realizaciones, la formulación de la invención incluye además superóxido dismutasa o catalasa. Estas proteínas están ellas mismas opcionalmente conjugadas con un polímero soluble en agua, por ejemplo, PEG.

En una realización de ejemplo, la invención proporciona una formulación de uso para tratar, mejorar, prevenir o reducir la lesión por isquemia/reperfusión y/o estrés oxidativo a uno o más tejidos de un sujeto a quien se le administra la formulación.

En una realización de ejemplo, la invención proporciona un kit en el que los dos (o más) componentes están presentes y almacenados por separado antes de su combinación. Por ejemplo, en diversas realizaciones la invención proporciona un dispositivo para combinar la formulación de donante de NO y PEG-Hb. El dispositivo incluye un primer recipiente para recoger o almacenar el donante de NO; y al menos un recipiente satélite en comunicación fluida con el primer recipiente en el que se almacena la formulación de PEG-Hb. Durante el uso, se interpone una barrera de sellado por rotura entre el recipiente primero y el recipiente satélite de manera que, al romper el cierre hermético, los dos componentes de la formulación se pueden mezclar y posteriormente administrar a un sujeto que lo necesite. Como apreciará un experto, los equivalentes del dispositivo descrito están disponibles y caen dentro del alcance de esta divulgación. Por ejemplo, un kit puede incluir dos o más ampollas, conteniendo cada una un elemento de la formulación de combinación de la invención en forma líquida o seca. El contenido de las ampollas se puede mezclar en un momento apropiado y de una manera apropiada antes de la administración de la formulación de combinación a un sujeto que lo necesite.

En cada una de las formulaciones combinadas expuestas anteriormente, la PEG-Hb puede estar unida a oxígeno, monóxido de carbono o a ninguno de los dos. La propia PEG-Hb o la formulación entera se puede formular para ser hipotónica, isotónica o hipertónica con respecto a la tonicidad de la sangre del sujeto.

55 Métodos de uso

Existe la necesidad de un agente de transferencia de oxígeno para tratar o prevenir la hipoxia resultante de la pérdida de sangre (por ejemplo, de hemorragia aguda o durante operaciones quirúrgicas), resultante de anemia (por ejemplo,

anemia perniciosa o anemia falciforme) o resultante de choque (por ejemplo, choque por deficiencia de volumen, choque anafiláctico, choque séptico o choque alérgico), infarto de miocardio, accidente cerebrovascular o lesión cerebral traumática. Además, existe la necesidad de hiperoxigenar tumores para mejorar el efecto terapéutico de la radioterapia o quimioterapia. La presente invención proporciona compuestos y métodos, como se ha ejemplificado anteriormente, útiles para tratar y prevenir estas y otras afecciones asociadas con pérdida de sangre, isquemia o hipoxia, por ejemplo.

Cada una de las formulaciones expuestas en este documento es de uso en una variedad de métodos para el tratamiento y profilaxis de afecciones asociadas con choque, hemorragia, anemia u otras disfunciones de la función portadora de oxígeno de la sangre. Las composiciones y formulaciones descritas en este documento se pueden usar en el tratamiento o prevención de la lesión por isquemia-reperfusión incluyendo aquellas causadas por cirugía (por ejemplo, cirugía de trasplante (especialmente cirugía de trasplante de riñón o corazón) o cirugía de derivación cardiaca), trombolisis, accidente cerebrovascular, hipotensión temporal inducida por traumatismo, o un procedimiento de intervención vascular tal como aterectomía o angioplastia incluyendo el uso de un láser, globo o stent. Las composiciones y formulaciones descritas en este documento se pueden usar para tratar o prevenir la lesión de isquemia-reperfusión después de la angioplastia coronaria transluminal percutánea. La lesión tratada o prevenida puede ocurrir en cualquier tejido no pulmonar, incluyendo el riñón, el corazón o el cerebro

El choque hipovolémico es una forma particular de choque en la que el corazón es incapaz de suministrar suficiente sangre al cuerpo debido a pérdida de sangre o volumen sanguíneo inadecuado. La pérdida de aproximadamente un quinto o más del volumen sanguíneo normal produce choque hipovolémico. La pérdida puede ser de cualquier causa, incluyendo sangrado externo (por cortes o lesiones), sangrado del tracto gastrointestinal, otro sangrado interno o disminución del volumen sanguíneo debido a la pérdida excesiva de otros fluidos corporales (como puede ocurrir con diarrea, vómitos, quemaduras, y así sucesivamente). En general, las pérdidas de volumen de sangre más grandes y más rápidas dan lugar a síntomas de choque más severos. En general, los pacientes con grados más leves de choque tienden a hacerlo mejor que aquellos con choque más severo. Sin embargo, en casos de choque hipovolémico grave, la muerte es posible incluso con atención médica inmediata. Los ancianos están en mayor riesgo de tener resultados pobres de choque.

En la guerra, las balas y los fragmentos penetrantes de municiones que explotan frecuentemente causan una hemorragia que amenaza la vida. La Oficina de Investigación de Ciencias de la Vida estima que la hemorragia exsanguinante fue el mecanismo de muerte de hasta el 50% de los soldados heridos que perecieron en conflictos pasados y es considerada la principal causa de muerte en las víctimas potencialmente salvables del campo de batalla. La hemorragia de miembros heridos por sí sola ha representado casi el undécimo de todas las muertes por combate, una parte de las cuales se consideró prevenible si se hubiera proporcionado atención prehospitalaria apropiada.

Anemia es el término general para cualquier condición que se desarrolle cuando la sangre es deficiente en glóbulos rojos sanos. Alternativamente, puede haber suficientes glóbulos rojos, pero son deficientes en hemoglobina. La anemia es la afección sanguínea más común en los Estados Unidos que afecta a unos 3.5 millones de estadounidenses. Las mujeres y las personas con enfermedades crónicas están en mayor riesgo de la enfermedad. Hay más de 400 tipos de anemia, que pueden clasificarse en tres categorías: 1) anemia causada por la pérdida de sangre, 2) anemia causada por la disminución o defecto de la producción de glóbulos rojos, o 3) anemia causada por la destrucción de glóbulos rojos.

Independientemente de la causa, hay un número considerable de individuos que sufren de alguna forma de insuficiencia clínica de oxígeno que se puede mejorar mediante el uso de una formulación de PEG-Hb. La necesidad de dicho producto y las oportunidades comerciales son casi infinitas. Por ejemplo, la anemia falciforme es el trastorno sanguíneo hereditario más común en los Estados Unidos, afectando a aproximadamente 72,000 estadounidenses. Es particularmente doloroso y debilitante durante las crisis. Uno puede imaginar el tratamiento de estos pacientes sobre una base mensual con una sola unidad de PEG-Hb para prevenir la crisis y oxigenar los tejidos. Esto requeriría 864,000 unidades de PEG-Hb para esta sola indicación.

Cuando los capilares o las arterias más grandes se ocluyen, tal como por constricción del vaso o émbolos sólidos que bloquean o bloquean parcialmente los vasos sanguíneos, el suministro de oxígeno se ve comprometido para los tejidos que dependen de esos recipientes para el oxígeno. La hipoxia tisular es el resultado de la falta de transporte suficiente de oxígeno, a menudo debido al flujo sanguíneo inadecuado, esto es, isquemia. La hipoxia puede resultar de hemorragia interna (por ejemplo, hemorragia intracerebral que produce hipoxia cerebral), anemia o traumatismo. La isquemia es una deficiencia de suministro de oxígeno al tejido debido a la constricción funcional u obstrucción real de un vaso sanguíneo. Por ejemplo, la isquemia miocárdica es una deficiencia de suministro de oxígeno al músculo cardíaco debido a obstrucción o constricción de las arterias coronarias. Si la isquemia continúa durante más de unos segundos, el daño tisular puede ser el resultado de una serie compleja de eventos bioquímicos asociados con la hipoxia tisular inducida por isquemia.

Las condiciones hipóxicas o isquémicas producidas por émbolos pueden dar lugar a daño tisular que es particularmente debilitante si el tejido dañado es tejido del corazón o tejido neural del sistema nervioso central (CNS). Las dos consecuencias más graves de las embolias son el ataque al corazón (infarto agudo de miocardio o AMI), resultado de la isquemia del músculo cardíaco, y el accidente cerebrovascular, resultado de la isquemia del tejido cerebral. La isquemia

que no conduce al AMI o al accidente cerebrovascular puede, no obstante, producir síntomas graves en el individuo, tal como dolores de pecho (angina de pecho), parálisis parcial, confusión, desorientación y/o pérdida de memoria.

5 Los individuos con enfermedad vascular, particularmente la aterosclerosis, están particularmente en riesgo de desarrollar embolia que puede dar como resultado un AMI o un accidente cerebrovascular. La cardiopatía isquémica afecta a millones de personas en todo el mundo, a menudo conduce a la muerte súbita por AMI. La isquemia puede resultar cuando los émbolos sólidos producidos a partir de partes de placa que se desprenden y se mueven a través del sistema circulatorio se alojan en un capilar o se unen a otro depósito de placa en un vaso sanguíneo, obstruyendo así completamente o parcialmente el vaso o capilar. También se pueden generar partículas de placa ateromatosa durante procedimientos quirúrgicos vasculares y cardíacos (por ejemplo, canulación, pinzamiento) que manipulan o alteran cualquier vaso sanguíneo aterosclerótico (por ejemplo, carótidas, coronarias, aorta, vasos femorales o poplíteos).

15 De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona las composiciones descritas en este documento para su uso en un método para suministrar oxígeno a un miembro seleccionado de tejidos y órganos de un sujeto que necesita tal suministro. En una realización de ejemplo, el método incluye administrar al sujeto una cantidad de una composición de cualquiera de la invención suficiente para llevar a cabo el suministro de oxígeno a uno o más tejidos y/u órganos. En realizaciones de ejemplo, el método se usa para tratar afecciones tales como hipoxia, isquemia, anemia y anemia falciforme.

20 En diversas realizaciones, la invención proporciona las composiciones descritas en este documento para uso en un método de revertir de la deuda de oxígeno en un miembro seleccionado de tejidos y órganos de un sujeto que sufre de choque hemorrágico. En una realización de ejemplo, el método incluye administrar al sujeto una cantidad de una composición de cualquiera de la invención suficiente para revertir la deuda de oxígeno.

25 En diversas realizaciones, la invención proporciona las composiciones descritas en este documento para uso en un método para inducir la angiogénesis en los tejidos de un sujeto, administrar al sujeto una cantidad de una composición de la invención eficaz para inducir angiogénesis. En realizaciones de ejemplo, la angiogénesis se induce en tejidos que sufren de deficiencia de oxígeno. En realizaciones de ejemplo adicionales, los tejidos u órganos en los que se induce la angiogénesis son tejidos u órganos de un sujeto que sufre de deficiencia de oxígeno. En una realización de ejemplo, el método incluye administrar al sujeto una cantidad de una composición de cualquiera de la invención suficiente para revertir la deficiencia de oxígeno.

30 En diversas realizaciones, la invención proporciona las composiciones descritas en este documento para uso en un método para aumentar el flujo sanguíneo a tejidos que sufren de deficiencia de oxígeno. El método consiste en administrar al sujeto una cantidad de una composición de la invención eficaz para aumentar el flujo de sangre a los tejidos que sufren de deficiencia de oxígeno. En una realización de ejemplo, el tejido u órgano es un tejido o un órgano de un sujeto que sufre un flujo sanguíneo deficiente. En una realización de ejemplo, el método incluye administrar al sujeto una cantidad de una composición de cualquiera de la invención suficiente para revertir el flujo sanguíneo deficiente.

35 En diversas realizaciones, la invención proporciona las composiciones descritas en este documento para uso en un método para disminuir daño neurológico y/o tejido infartado en tejidos que sufren de deficiencia de oxígeno. En una realización de ejemplo, el método incluye administrar a un sujeto y cantidad de una composición de la invención suficiente para disminuir el daño neurológico y/o infarto en el tejido que sufre de deficiencia de oxígeno. En una realización de ejemplo, el método incluye administrar al sujeto una cantidad de una composición de cualquiera de la invención suficiente para revertir la cantidad de tejido dañado neurológicamente y/o infartado.

Los sujetos que pueden recibir el agente de transferencia de oxígeno, formados por los métodos de la invención incluyen mamíferos, tales como un humano, primate no humano, un perro, un gato, una rata, un caballo o una oveja. Además, los sujetos que pueden recibir el agente de transferencia de oxígeno incluyen fetos (sujeto prenatal), sujetos posnatales o sujetos en el momento del nacimiento.

45 Una composición de la presente invención se puede administrar al sistema circulatorio inyectando la composición directa y/o indirectamente en el sistema circulatorio del sujeto, mediante uno o más métodos de inyección. Ejemplos de métodos de inyección directa incluyen inyecciones intravasculares, tales como inyecciones intravenosas e intraarteriales, e inyecciones intracardíacas. Ejemplos de métodos de inyección indirecta incluyen inyecciones intraperitoneales, inyecciones subcutáneas, de manera que el agente de transferencia de oxígeno será transportado por el sistema linfático al sistema circulatorio o inyecciones en la médula ósea por medio de un trocar o catéter. Preferiblemente, el agente de transferencia de oxígeno se administra por vía intravenosa.

El sujeto tratado puede ser normovolémico, hipervolémico o hipovolémico antes, durante y/o después de la infusión de la composición de la invención. La composición se puede dirigir al sistema circulatorio por métodos tales como carga superior y por métodos de intercambio.

55 Una composición de la invención se puede administrar terapéuticamente, para tratar tejido hipóxico dentro de un sujeto que resulta de muchas causas diferentes, incluyendo flujo reducido de RBC en una parte, o en todo el sistema

circulatorio, anemia y choque. Además, el agente de transferencia de oxígeno se puede administrar profilácticamente para prevenir el agotamiento de oxígeno del tejido dentro de un sujeto, lo que podría resultar de una reducción posible o esperada del flujo de RBC a un tejido o a través del sistema circulatorio del sujeto. Las composiciones de la invención son útiles para el tratamiento terapéutico o profiláctico de la hipoxia.

5 En una realización de ejemplo, la invención proporciona las composiciones descritas en este documento para uso en el tratamiento de enfermedades, lesiones o insultos mediante la administración a un sujeto de una cantidad de una formulación de la invención suficiente para proporcionar el tratamiento. La hemoglobina está en forma de CO. En una realización de ejemplo, este conjugado se formula en solución salina reguladora con fosfato.

10 En diversas realizaciones, se proporciona la formulación de PEG-Hb-CO de la invención para uso en el tratamiento de la isquemia. Un tipo de ejemplo de isquemia tratable por esta formulación es la isquemia periférica, tal como la isquemia diabética periférica, y los efectos posteriores de la isquemia. Como apreciarán los expertos en la materia, las composiciones de la invención son útiles para tratar también otras formas de isquemia.

15 En diversas realizaciones, la invención proporciona las composiciones descritas en este documento para uso en el tratamiento de enfermedades, lesiones o insultos mediante la administración a un sujeto de una cantidad de una formulación de la invención suficiente para proporcionar el tratamiento. La hemoglobina es desoxigenada o puede estar en forma de CO y se formula en una solución de sal hipertónica. Las concentraciones de sal de ejemplo de uso en estas formulaciones son desde aproximadamente 4% a aproximadamente 8%, desde aproximadamente 4.5% a aproximadamente 7.5% o desde aproximadamente 5% a aproximadamente 7%. Las formulaciones de ejemplo incluyen aproximadamente 4%, aproximadamente 5%, aproximadamente 6%, aproximadamente 7% o aproximadamente 8% de sal. En una formulación la concentración de sal es 7.5%. En diversas realizaciones, la sal es NaCl. En diversas realizaciones, esta formulación se usa para tratar anemia falciforme, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio o lesión cerebral traumática.

25 En realizaciones de ejemplo, la PEG-Hb-CO de la invención es de uso para aumentar la angiogénesis, aumentar la vasodilatación, proteger el corazón y el riñón de la isquemia, activar los canales mitocondriales KATP, disminuir la adhesión e infiltración de leucocitos endoteliales, disminuir la activación de macrófagos y microglia, y/o proteger la reactividad vascular cerebrovascular de la disfunción inducida por convulsiones. De acuerdo con lo anterior, la invención proporciona métodos para usar las composiciones de la invención para lograr tales resultados.

30 Por lo general, una dosis apropiada, o combinación de dosis de agente de transferencia de oxígeno de la invención, es una cantidad que cuando está contenida dentro del plasma sanguíneo dará como resultado una concentración total de hemoglobina en el plasma sanguíneo del sujeto entre aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 gramos Hb/dl, o desde aproximadamente 1 a aproximadamente 4 gramos de Hb/dl o más, si se requiere para compensar pérdidas de sangre de gran volumen.

35 La composición de la invención se puede administrar a un sujeto de cualquier manera útil. Por ejemplo, en una realización, la composición se administra como una infusión continua a una velocidad predeterminada durante un periodo de tiempo predeterminado. En una realización de ejemplo, se administra una dosis de carga de una composición de la invención durante un periodo tan corto como sea razonable. Esta "ráfaga" inicial es seguida por la administración de una segunda cantidad de la formulación durante al menos aproximadamente 6 horas, al menos aproximadamente 12 horas, al menos aproximadamente 18 horas o al menos aproximadamente 24 horas. En diversas realizaciones, la segunda cantidad es al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 100% o al menos aproximadamente 120% de la dosificación de la "ráfaga" inicial.

40 Las composiciones de ejemplo de la invención incluyen un conjugado de PEG-Hb en una cantidad desde aproximadamente 3% a aproximadamente 6%. Una composición de ejemplo incluye un conjugado de PEG-Hb en una cantidad de aproximadamente 4%.

45 En un sentido amplio, la presente invención también proporciona el uso de un agente de transferencia de oxígeno basado en conjugado hemoglobina-PEG sintético en la fabricación de un medicamento para la reoxigenación de tejido hipóxico. La hipoxia se puede deber a cualquier insulto, lesión o enfermedad incluyendo, pero sin limitarse a, cirugía, traumatismo, isquemia, anemia, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, choque, diabetes y lesión cerebral traumática, en el que el medicamento portador de oxígeno es administrado sistemáticamente a un individuo que tiene o sospecha que tiene uno o más tejidos con un déficit de oxígeno.

50 En cada uno de los métodos expuestos anteriormente, la PEG-Hb se puede unir a oxígeno, monóxido de carbono o a ninguno de los dos. La propia PEG-Hb o la formulación entera se puede formular para ser hipotónica, isotónica o hipertónica con respecto a la tonicidad de la sangre del sujeto.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar realizaciones seleccionadas de la invención y no se deben interpretar como limitantes de su alcance.

55 Ejemplos

Ejemplo 1

Purificación de la hemoglobina

Esta primera etapa implica lavar las células sanguíneas libres de plasma. En la escala de laboratorio se realizó mediante lavado repetitivo, centrifugación y decantación. Este procedimiento parece más eficiente que la centrifuga vertical de flujo continuo.

Los glóbulos rojos se lavan 4 veces con solución reguladora (NaCl al 1.2% con fosfato 10 mM, pH 7.8). A continuación, los glóbulos rojos se lisan (la hemoglobina se extrae sin lisis celular verdadera) mediante la adición lenta de 1.5 volúmenes de WFI durante un periodo de 2 horas. El estado de lisis (de nuevo, la extracción de hemoglobina) se controla por conductividad de muestreo hasta que se encuentra en el intervalo de 5.50 - 7.00 μ S. El % de Hb se determina usando un Radiometer OSM3 Hemoximeter. La osmolalidad también se prueba y está en el rango de 130 - 150 mOsmol. Una vez completada la extracción de hemoglobina, el contenido se filtra a presión a través de un filtro de profundidad basado en celulosa de 1 μ m, seguido por un filtro basado en polisulfona estéril de 0.45/0.2 μ m en un segundo tanque que sirve como depósito para la siguiente etapa. La solución de hemoglobina se bombea a continuación a través de un ultrafiltro de 300 Kd en un depósito con camisa a 10°C, que sirve como la etapa de eliminación viral inicial y elimina las proteínas de alto peso molecular.

La hemoglobina se concentra utilizando un sistema MWCO de 10KD y luego se desoxigenó mediante recirculación a través de un contacto de membrana de fibra hueca hasta que la solución de hemoglobina tiene menos de 10% de HbO₂. Se adiciona un agente estabilizante, cisteína, cerca del final de la fase de eliminación de oxígeno hasta una concentración final de 5 mM. El agente estabilizante ayuda a mantener el nivel de oxígeno a menos del 10% y también actúa para proteger la hemoglobina durante la fase de inactivación por calor.

Desarrollo de una etapa de inactivación/eliminación viral durante la producción de hemoglobina

Antes de que la hemoglobina bovina pueda ser utilizada en un producto para seres humanos, se necesitan procedimientos para inactivar cualquier contaminante viral potencial mientras se mantiene una proteína biológicamente activa funcionalmente activa. La FDA requiere la inactivación viral de proteínas derivadas de productos de origen animal. Esto se consigue mediante la exposición a 60°C hasta que se alcanza la inactivación viral, en este caso durante 4 horas. A continuación, la solución se enfría y se filtra por 0.45/0.2 μ en un tanque de retención. Se trata de hemoglobina purificada. El producto se somete a análisis QC por FPLC (pico único), análisis espectral visible (picos a 540 nm y 577 nm), electroforesis en gel SDS, % de Hb, % de HbO₂, % de MetHb, pH, osmolalidad, endotoxina, lípidos e hierro libre.

Como se describe en la Fig. 1, la hemoglobina desoxigenada mecánicamente fue inactivada viralmente por calor y esta hemoglobina bovina inactivada por calor fue pura. El procedimiento de inactivación por calor de la hemoglobina desoxigenada mecánicamente con el agente reductor adicionado mantuvo un bajo nivel de MET-Hb (menos del 10%), manteniendo su integridad, como se evidencia en el siguiente cuadro (Tabla 1). La exposición a 60°C, durante 10 horas no tuvo ningún efecto sobre el producto en la forma desoxigenada (desoxi) (con cisteína 5 mM adicionada), en relación con % de tHb y % de METHb. Este no fue el caso de la hemoglobina bovina en la forma desoxigenada sin cisteína, donde se perdió aproximadamente el 40% de la proteína.

Tabla 1: La desoxigenación de la hemoglobina estabiliza el producto a la inactivación del calor

Desoxi Hb + Cisteína 5 mM		Desoxi Hb sin Cisteína ¹		Hb en forma CO + Cisteína 5 mM		Hb en forma CO, sin Cisteína	
Antes de 60°C	Después de 10 h a 60° C	Antes de 60°C	Después de 10 h a 60° C	Antes de 60°C	Después de 10 h a 60° C	Antes de 60°C	Después de 10 h a 60° C
tHb=8.3%	tHb=8.7%	tHb=8.8%	tHb=5.2%	tHb=9.1%	tHb= 9.1%	tHb=9.1%	tHb=8.7%
METHb=0.9%	METHb= 1.6%	METHb= 5.9%	METHb= 2.1%	METHb= 0.8%	METHb= 0.7%	METHb= 6.2%	METHb= 4.2%
HbO ₂ = 5.4%	HbO ₂ = 4.4%	HbO ₂ = 6.0%	HbO ₂ = 6.6%	HbO ₂ = <0%	HbO ₂ = <0%	HbO ₂ = 4.3%	HbO ₂ = 3.4%
HbCO= 3.0%	HbCO= 2.1%	HbCO= 6.0%	HbCO= 6.6%	HbCO= 99.4%	HbCO= 100.8%	HbCO= 89.5%	HbCO= 90.2%

PEGilación de Hemoglobina

5 Se adiciona solución reguladora de dilución (fosfato de sodio 25 mM, bicarbonato de sodio 120 mM y NaCl al 4.5%, pH 8,0) para llevar la solución de hemoglobina a una concentración del 4-5%. La hemoglobina es PEGilada utilizando una relación molar de PEG de 17: 1 con respecto a la hemoglobina. La reacción se mantiene a pH 7.6 - 7.8 y se deja que la reacción avance durante una hora. En este punto se puede usar uno de dos procedimientos.

Procedimiento A

10 Se adiciona cisteína 15 mM para detener la reacción. Después de almacenar la solución durante la noche a 4°C, la solución se dializará contra 20 volúmenes de solución reguladora (bicarbonato de sodio 5.0 mM, fosfato de sodio 1.0 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de potasio 4.7 mM, sulfato de magnesio 2.5 mM, cloruro de calcio 0.5, pH 8.1) usando una membrana de corte de 50 Kd. La PEG-Hb se diluye a continuación al 4% de Hb, se adiciona dextrosa (5 mg/mL) y cisteína (5 mM) y la solución se hace circular a través de un contacto de membrana de fibra hueca hasta que el % de HbO₂ es inferior al 10%. A continuación, la solución se filtra asépticamente en bolsas de sangre. El producto se someterá a análisis de QC por FPLC (pico único), análisis espectral visible (picos a 540 nm y 577 nm), electroforesis en gel SDS, % de Hb, % de HbO₂, % de MetHb, pH, osmolalidad, endotoxina, lípidos e hierro libre.

15 Procedimiento B

20 Se adiciona cisteína 15 mM para detener la reacción. Después de almacenar durante la noche a 4°C, la solución se dializará contra 20 volúmenes de solución reguladora (bicarbonato de sodio 5.0 mM, fosfato de sodio 1.0 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de potasio 4.7 mM, sulfato de magnesio 2.5 mM, cloruro de calcio 0.5 mM, pH 8.1) usando una membrana de corte de 50 Kd. La PEG-Hb se diluye después a Hb al 4%, se adicionan dextrosa (5 mg/mL) y L-cisteína (5 mM), y la solución se coloca en la forma de monóxido de carbono burbujando lentamente monóxido de carbono a través de la solución con mezcla constante hasta que el % de oxígeno sea menor del '0' y el monóxido de carbono (CO) sea al 95% o mayor. A continuación, la solución se filtra asépticamente en bolsas de sangre. El producto se somete a análisis QC por FPLC (pico único), análisis espectral visible (picos a 540 nm y 577 nm), electroforesis en gel SDS, % de Hb, % de HbO₂, % de MetHb, pH, osmolalidad, endotoxina, lípidos, e hierro libre.

25 Además, la hemoglobina inactivada por calor fue PEGilada, y la PEG-Hb resultante fue pura y activa.

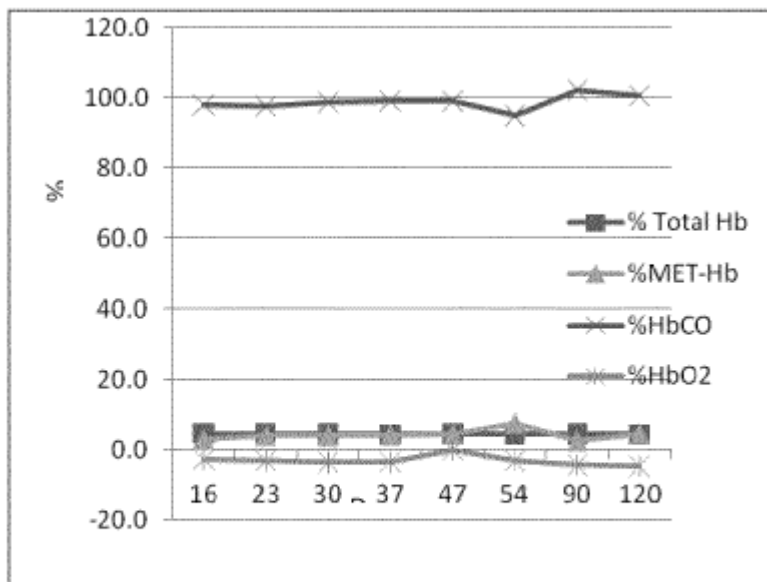


Figura 1: Estabilidad de PEG-Hb a 37°C

Durante un periodo de 120 días no hubo cambios en el % de Hb total, % de MET-Hb, % de HbCO, y % de HbO₂ en la muestra almacenada a 37°C (Figura 1).

Desarrollo de una forma de monóxido de carbono de PEG-Hb

El objetivo de estos estudios era desarrollar una forma de monóxido de carbono (CO) de la PEG-hemoglobina. Esta forma parece ser particularmente estable con respecto a mantener baja el % de formación de MET-Hb como se muestra en la figura 1. Esto es más estable que la forma desoxigenada mecánicamente.

5 Además, una forma de CO de PEG-Hb se almacenó a 4°C y sólo 1.0% se convirtió en MET-Hb después de 8 semanas de almacenamiento. Este mismo lote de PEG-Hb en la forma de CO tiene 1.3% de MET-Hb después de 12 semanas a 4°C. Además, se encontró que una forma CO de PEG-Hb se almacenó a 18°C, durante 6 semanas que incluía 7.9 % de MET-Hb, que se eleva al 16.7% de MET-Hb al final de 10 semanas a 18°C.

Eficacia de PEG-Hb/HS para revertir la deuda de oxígeno

10 En estudios preliminares para probar la actividad de nuestro PEG-Hb/HS en tejidos oxigenantes, se ensayó su capacidad para aumentar el suministro de oxígeno a los tejidos y para revertir la deuda de oxígeno en un modelo porcino de choque traumático severo.

15 La deuda de oxígeno es una medida del grado de consumo de oxígeno del cuerpo entero que está por debajo del nivel requerido para mantener el metabolismo aeróbico. Es la variable fisiológica que se ha demostrado para correlacionar y predecir la supervivencia, y las complicaciones de la insuficiencia de órganos después del choque hemorrágico inducido por traumatismo. En el modelo, los animales tienen una hemorragia a una deuda predeterminada de oxígeno para reducir la variabilidad entre animales, por lo que los efectos no dependen de la cantidad de pérdida de sangre o hemoglobina endógena. El modelo permite la medición continua del consumo de oxígeno (VO_2), la producción de dióxido de carbono (VCO_2), la saturación de oxígeno de la hemoglobina venosa mixta (SvO_2), la saturación de oxígeno de la hemoglobina arterial (SaO_2) proporción de extracción de oxígeno (OER), deuda de oxígeno, presión arterial, presión sanguínea, saturación de oxígeno de la hemoglobina de tejido cerebral, (cerebro StO_2), saturación de oxígeno de hemoglobina tejido muscular esquelético del hombro (Hombro StO_2), gasto cardiaco (CO) así como medición de PO_2 en el músculo esquelético, el hígado, la mucosa intestinal, la mucosa oral y el riñón

25 En el modelo, la hemorragia se acompaña de una lesión bilateral del músculo esquelético del miembro posterior y de la fractura del fémur para producir una lesión tisular relevante en el combate. Se ha demostrado que este tipo de lesión tisular afecta independientemente al suministro de oxígeno en los tejidos y resulta en mayores reducciones en el flujo sanguíneo esplácnico en comparación con la hemorragia sola. Después de la lesión del músculo esquelético y la lesión del fémur usando un perro cautivo, los animales tienen una hemorragia a una deuda de oxígeno predeterminada de 80 mL/kg. La hemorragia a una deuda uniforme de oxígeno asegura que todos los animales tienen una variabilidad limitada en su lesión de pretratamiento final y reduce enormemente la variabilidad en el volumen eliminado en oposición a las hemorragias por presión. En estos animales, la deuda de oxígeno se controla de forma continua y acumulativa. La deuda de oxígeno se basa en las desviaciones del VO_2 por debajo de los valores basales obtenidos antes de la lesión del músculo esquelético y se mide cada 10 segundos.

35 Después de la lesión, la deuda de oxígeno en los animales sube durante la hemorragia. En un momento en que se alcanzó el 100% de la deuda de oxígeno dirigida (80 mL/kg) en los animales lesionados, el animal recibió una infusión de 500 cc de PEG-Hb (concentración de PEG-Hb de 4% y solución salina hipertónica de 5 -7.5%) durante un periodo de tiempo de 15 min (periodo de reanimación). Después de la administración de PEG-Hb, la deuda de oxígeno se invierte rápidamente (resultados promediados de 4 animales lesionados). Aumentos en la oxigenación de los tejidos durante el período de reanimación en paralelo a los cambios en la deuda de oxígeno y luego estabilizar durante un período de tres horas.

45 En contraste con PEG-Hb, el tratamiento de 2 animales con 500 mL de hetastarch (Hespan), un tratamiento estándar de pacientes con traumatismo no produjo ninguna inversión de la deuda de oxígeno ni tampoco la Oxyglobin, un producto HBOC desarrollado por Biopure como un sustituto de la sangre. Estos hallazgos son importantes porque en primer lugar muestran que el tratamiento utilizado actualmente para el traumatismo es ineficaz en el tejido oxigenante y por lo tanto es probable que produzca un efecto limitado en pacientes sometidos a choque hemorrágico. En segundo lugar, muestran que uno de los productos que ha sido probado ampliamente en seres humanos y falló en los ensayos clínicos, Oxyglobin, no oxigena el tejido. El hecho de que la composición de la invención invierta la deuda de oxígeno indica claramente que la composición de la invención y los de Biopure son muy diferentes y el potencial de PEG-Hb/HS en el tratamiento del traumatismo no debe juzgarse basándose en el fracaso de otros HBOC.

50 Además, dos animales heridos tratados con 500 cc de glóbulos rojos empaquetados tuvieron una reducción en la deuda de oxígeno que se esperaba. Sin embargo, la magnitud de la inversión no parece ser tan grande como la inducida por PEG-Hb. Es importante destacar que incluso si el tratamiento de glóbulos rojos empaquetados producía el mismo efecto que el PEG-Hb, estos resultados apoyarían el uso de PEG-Hb como un sustituto de la sangre, ya que el objetivo de un HBOC es ser tan efectivo como la transfusión de sangre.

55 Además de la prueba de cambios en la deuda de oxígeno y suministro de oxígeno a los tejidos, también se midió la microcirculación sublingual en los animales que tienen hemorragia como una medida de la reperfusión de tejido después

de la hemorragia. La densidad capilar funcional también se midió cualitativamente como la longitud total de todos los vasos sobre el área vista como una medida de la perfusión de los tejidos. Lo que se observa es que, durante la hemorragia, la densidad capilar disminuye drásticamente. En contraste, el tratamiento con PEG-Hb trae la densidad cerca de los niveles normales de referencia cerca del final del estudio. Esto ocurre a pesar del nivel de hemoglobina final que cae desde una referencia de 12.3 g/dl a 7.1 g/dl. Como se ha indicado, la infusión de PEG-Hb mejoró la densidad capilar funcional en un grado mayor que Hetastarch o glóbulos rojos empaquetados.

Ejemplo 2

Fundamento: En el modelo murino de la isquemia de la extremidad posterior inducida por la ligadura de la arteria femoral, los ratones con diabetes muestran una restauración significativamente deteriorada del flujo sanguíneo y respuestas de angiogénesis en comparación con los animales no diabéticos. En este estudio, probamos la hipótesis de que la administración de Sanguinate facilitaría la restauración del flujo sanguíneo y la angiogénesis.

Método y resultados: Los ratones C57BL/6 a la edad de 6 semanas se hicieron diabéticos con estreptozotocina (stz) y a la edad de 12 semanas fueron sometidos a ligadura FA seguido de administración de Sanguinate (20 ml/kg/día) vía inyección intraperitoneal (i.p.) por día, durante 4 semanas. Los ratones diabéticos tratados con vehículo recibieron inyección i.p. con volúmenes iguales de 1xPBS diarios. Los ratones diabéticos tratados con Sanguinate mostraron proporciones de flujo sanguíneo significativamente mejoradas (isquemia/simulado) mediante análisis Doppler láser al día 28 después de la ligadura de FA comparado con el grupo tratado con vehículo (63.36 ± 5.83 vs 44.39 ± 4.13 BFR (%), $n \geq 9$, $p=0.019$). La tinción inmunohistoquímica con CD31 en el tejido muscular demostró un aumento significativo de la densidad de microvasos en ratones diabéticos tratados con Sanguinate™ a los 28 días después de la ligadura de FA comparado con el grupo tratado con vehículo (663.86 ± 57.78 vs 461.44 ± 36.19 capilares/mm², $p < 0.0001$). En conjunto, estos datos revelan efectos terapéuticos significativos de Sanguinate en la isquemia de miembro diabético en un modelo de ratón y pueden proporcionar la base para el uso de este agente como terapia de recuperación vascular complementaria en diabetes de larga duración.

Protocolo: Los ratones C57BL/6 se hicieron diabéticos de tipo 1 con estreptozotocina (inyección múltiple de dosis baja). Un mes después de la inducción de la diabetes, los ratones se sometieron a isquemia de miembro posterior unilateral. El flujo sanguíneo y la angiogénesis se controlaron en este estudio.

Procedimiento: La incisión cutánea se realizó en el muslo superior del ratón. La pierna izquierda se sometió al procedimiento quirúrgico, y la pierna derecha se sometió al procedimiento idéntico excepto que no se realizó la ligadura de la arteria femoral. El ligamento inguinal y la mitad superior de la arteria femoral fueron expuestos. El haz vascular se ligó con dos suturas de seda no absorbibles 8/0 estériles por debajo del ligamento inguinal proximalmente y justo por encima de la bifurcación en las arterias femorales superficiales y profundas distalmente. Todas las ramas arteriales y venosas conectadas al segmento aislado de los vasos femorales fueron atadas con suturas no absorbibles 8/0. Finalmente, la vena y la arteria se cortaron entre las ligaduras proximal y distal. La incisión de la piel se cerró con sutura de nylon 5/0 estéril.

Ratones y grupos: Basados en los estudios preliminares, se inicia con > 15 ratones por grupo para asegurar que se tienen suficientes ratones al final del estudio y tener suficiente tejido para el análisis.

Los experimentos se escalonaron con el fin de hacer ratones tratados con vehículo adicional.

Grupo # 1 - Ratones WT diabéticos + 20 ml/kg/día de Sanguinate (IP) comenzando inmediatamente después de la ligadura de la arteria femoral

Grupo # 2 - Ratones WT diabéticos + PBS (20 ml/kg/día IP)

Criterios de valoración

Formación de imágenes de flujo sanguíneo Doppler laser (día 28) Obsérvese que el flujo sanguíneo se examina en la pierna izquierda (lesionada) y la pierna derecha (simulada) y luego se informa como una proporción izquierda/derecha. Se reporta la media de los valores de Diabetes/Sanguinate y Diabetes/PBS.

- Evaluación cuantitativa de la angiogénesis mediante tinción a CD31 y programa de imágenes cuantitativas (día 28) (pierna izquierda)

Datos

Criterio de valoración # 1: Evaluación cuantitativa de la angiogénesis

El día 28, los ratones fueron sacrificados y se obtuvo el músculo esquelético del miembro posterior en la distribución de la ligadura de la arteria femoral y se sometió a inmunohistoquímica usando IgG anti-cD31. Se obtuvieron imágenes en serie y se realizó un análisis de imagen para determinar los efectos de Sanguinate en la angiogénesis:

Grupo/Tratamiento	Capilares/mm ²
Pierna simulada /Vehículo	805.60 ± 55.60
Pierna simulada/FÁRMACO	763.40 ± 9.39
Pierna isquémica/Vehículo	461.44 ± 36.19 *
Pierna isquémica/DROGA	663.86 ± 57.78 **
** indica p <0.001 Pierna Isquémica/Vehículo	
* indica p <0.001 vs. Pierna simulada/Vehículo	

Criterio de valoración # 2: Recuperación del flujo sanguíneo

5 Se evaluó la recuperación de flujo sanguíneo comparando la extremidad de la arteria femoral ligada/la extremidad contralateral (Simulada) mediante la técnica de imágenes Doppler-láser. En estos estudios, se reporta una relación entre la pierna lesionada y su pierna simulada contralateral, de manera que se tiene en cuenta la disfunción vascular basal. Los datos son los siguientes:

Grupo/Tratamiento	% recuperación del flujo sanguíneo
Pierna isquémica/VEHÍCULO simulado	44.38 ± 12.38
Pierna isquémica/FÁRMACO simulado	63.36 ± 18.43 *
* indica p = 0.0187	

Conclusión

10 La administración de Sanguinate a ratones diabéticos sometidos a isquemia de extremidad posterior, inducida por ligadura de la arteria femoral, da como resultado una mejora significativa en la cuantificación de la angiogénesis cuando se compara con los hallazgos usando vehículo. La administración de Sanguinate a ratones diabéticos sometidos a isquemia de miembros posteriores, inducida por la ligadura de la arteria femoral, mejora significativamente la recuperación del flujo sanguíneo medida por la formación de imágenes por Doppler láser en comparación con el tratamiento con vehículo (PBS).

15 Ejemplo 3

20 Se evaluó el efecto de la transfusión de CO-hemoglobina PEGilada (PEG-CO₂Hb) en ratas anestesiadas sometidas a 2 horas de isquemia cerebral focal y 1 día de reperfusión. PEG-Hb se almacenó en el estado carboxi (PEGCO₂Hb) para proporcionar una fuente de CO y reducir la autooxidación y aumentar la vida útil. La transfusión de 10 ml/kg de PEGCO₂Hb a los 20 minutos de isquemia no alteró la presión arterial ni aumentó el flujo de glóbulos rojos en el núcleo isquémico. La hemoglobina plasmática aumentó a sólo 0.6 g/dl, pero el volumen de infarto disminuyó marcadamente y se mejoraron los déficit neurológicos. La transfusión de carga superior temprana de PEG-CO₂Hb protege al cerebro del accidente cerebrovascular isquémico.

Preparación quirúrgica

25 Todos los procedimientos fueron aprobados por the Johns Hopkins University Animal Care and Use Committee. Se indujo anestesia en ratas Wistar macho (250-350 g) con isoflurano al 5% y se mantuvo con aproximadamente 2% de isoflurano a través del cono de la nariz con ventilación espontánea durante la cirugía. La concentración de isoflurano se redujo a aproximadamente 1.5% después de la cirugía. El O₂ inspirado fue de aproximadamente 25-30%. Los catéteres se insertaron en una vena femoral para transfusión y en una arteria femoral para medir la presión arterial y el muestreo de sangre arterial. Se utilizó una lámpara de calentamiento para mantener la temperatura rectal durante la isquemia y la reperfusión temprana. Se realizó una pequeña incisión en el cuero cabelludo y se realizó un pequeño orificio en el hueso parietal lateral hasta que sólo quedó una pequeña cantidad de hueso. Se aseguró una sonda de fibra óptica de 1 mm de diámetro contra el hueso adelgazado. La sonda se conectó a un medidor de flujo Doppler láser que transmite y recibe luz infrarroja cercana y calcula los cambios relativos en el flujo de glóbulos rojos. La señal de flujo Doppler láser se utilizó para evaluar la adecuación de la oclusión vascular durante el período isquémico.

La isquemia cerebral focal transitoria fue inducida por la técnica del filamento intraluminal para ocluir el flujo sanguíneo hacia la arteria cerebral media. La arteria carótida común derecha fue expuesta a través de una incisión lateral y ocluida. La arteria carótida externa derecha fue disecada y ligada y la rama de la arteria occipital de la arteria carótida externa fue aislada y coagulada. Se ligó la rama proximal de arteria pterigopalatina de la arteria carótida interna derecha y se avanzó una sutura de nylon monofilamento 4-0 (con la punta redondeada) aproximadamente 2 cm en la arteria carótida interna.

La posición del filamento se ajustó para producir al menos una reducción del 60% en la señal de flujo Doppler láser. Después de dos horas de oclusión, la reperfusión se inició retirando la sutura intraluminal. Después de la monitorización de los primeros 30 minutos de reperfusión, se retiraron los catéteres, se cerraron las incisiones con sutura y se interrumpió la anestesia.

Diseño experimental

Se sintetizaron PEG-albúmina y PEG-CO₂Hb en Prolong Pharmaceuticals (South Plainfield, New Jersey). Los residuos de lisina superficial sobre Hb bovina purificada se conjugaron con PEG de 5000 peso molecular. La solución de PEG-Hb se burbujeó con CO para convertir >80% del PEG-Hb en PEG-CO₂Hb antes del almacenamiento. Las soluciones que contenían 4-6% de proteína se almacenaron a 2-10°C en bolsas de sangre estériles. Se estudiaron tres grupos de 10 ratas: 1) sin transfusión, 2) transfusión de PEG-albúmina bovina, y 3) transfusión de PEG-CO₂Hb bovina. El día del experimento, se calentó una alícuota de la solución y se transfundió como una carga superior equivalente a 10 ml/kg de peso corporal. La transfusión comenzó a los 20 min de MCAO. La velocidad de transfusión intravenosa fue de 0.5 ml/min y se produjo durante aproximadamente 5-7 min. La presión arterial media y el cambio porcentual en el flujo Doppler láser se registró a intervalos de 15 min durante 2 h de MCAO y 30 min de reperfusión. Se controló la temperatura rectal durante 1 h de reperfusión a medida que los animales se recuperaban de la anestesia en un ambiente cálido. Se tomaron muestras de sangre arterial (~ 0.7 ml) al inicio del estudio, 1 h de MCAO y 30 min de reperfusión. El pH de la sangre arterial, PCO₂, PO₂ y electrolitos se midieron en un analizador de gases de sangre Radiometer (ABL80). La concentración arterial de Hb, saturación de O₂, MetHb, y COHb se midieron en un Radiometer Hemoximeter (OSM3). El plasma de las muestras se analizó para la concentración de Hb. Las ratas fueron evaluadas para déficit neurológicos a la 1 y 24 h de reperfusión en una escala de 0-4 (0 = sin déficit, 1 = ausencia de alargamiento durante la colocación, 2 = circulación, 3 = debilidad unilateral y 4 = ausencia de actividad motora espontánea). A las 24 h, el cerebro se recogió para medir el volumen del infarto. El cerebro se dividió en 7 secciones coronales (2 mm de espesor). Las secciones se tiñeron con una solución al 1% de cloruro de trifeniltetrazolio, que tiñe las regiones viables en rojo. Las áreas pálidas y no viables de la corteza cerebral y estriado se midieron en las superficies anterior y posterior de cada sección. El volumen de infarto de cada sección se calculó a partir del producto del grosor de la sección y el promedio del área del infarto en las superficies anterior y posterior. El volumen total de infarto para la corteza y el estriado se obtuvo sumando el volumen de cada sección. Los valores se expresan como un porcentaje de toda la estructura. Las mediciones se compararon entre los 3 grupos mediante ANOVA y la prueba de Newman-Keuls de rango múltiple en el nivel de significancia de 0.05. Los datos se presentan como la media ± SE.

Resultados

El pH arterial, PCO₂ y PO₂ permanecieron estables y en el intervalo fisiológico durante MCAO y reperfusión temprana en todos los grupos de ratas (Tabla 1). No hubo diferencias significativas entre los grupos transfundidos a los 20 min de MCAO. Las concentraciones de electrolitos se mantuvieron similares entre los grupos después de la transfusión (Tabla 2). Como se esperaba con una transfusión de proteínas de carga superior, se produjeron pequeñas disminuciones en el hematocrito (Tabla 3).

Tabla 1. pH arterial y gases en sangre durante y después de 2 h de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) en grupos sin transfusión o transfusión a 20 min de MCAO (media ± SE, n = 10) Referencia MCAO 60 min Reperfusión 30 min

pH	Referencia	MCAO 60 min	Reperfusión 30 min
Sin transfusión	7.40 ± 0.01	7.41 ± 0.01	7.41 ± 0.01
PEG - Albúmina	7.41 ± 0.01	7.41 ± 0.01	7.39 ± 0.01
PEG - COHb	7.39 ± 0.01	7.40 ± 0.01	7.39 ± 0.01
PCO ₂ (mm Hg)			
Sin transfusión	45.0 ± 0.9	43.0 ± 1.0	43.6 ± 1.1
PEG - Albúmina	42.0 ± 1.1	42.5 ± 0.7	45.4 ± 0.5

PEG - COHb	43.7 ± 0.8	44.3 ± 1.4	44.3 ± 2.0
PO ₂ (mm Hg)			
Sin transfusión	120 ± 3	123 ± 5	124 ± 3
PEG - albúmina	124 ± 2	123 ± 3	119 ± 4
PEG - COHb	128 ± 4	122 ± 6	125 ± 7
Exceso de base			
Sin transfusión	1.6 ± 0.5	1.5 ± 0.6	1.7 ± 0.4
PEG - albúmina	1.4 ± 0.3	2.1 ± 0.4	1.9 ± 0.3
PEG - COHb	0.3 ± 0.6	1.4 ± 0.4	1.3 ± 0.3

Tabla 2. Electrolitos sanguíneos arteriales durante y después de 2 h de MCAO en grupos sin transfusión o transfusión a 20 min de MCAO (media ± SE, n = 10)

	Referencia	MCAO 60 min	Reperusión 30 min
Na⁺ (mM)			
Sin transfusión	138.4 ± 0.6	140.2 ± 1.1	141.0 ± 0.8
PEG - Albúmina	140.2 ± 0.5	138.2 ± 0.5	138.3 ± 0.6
PEG - COHb	142.0 ± 0.8	141.4 ± 0.4	142.7 ± 0.7
K⁺ (mM)			
Sin transfusión	4.1 ± 0.1	4.5 ± 0.2	4.0 ± 0.1
PEG - Albúmina	4.1 ± 0.1	4.1 ± 0.1	4.0 ± 0.1
PEG - COHb	4.0 ± 0.1	4.1 ± 0.1	4.3 ± 0.1
Ca²⁺ (mM)			
Sin transfusión	1.36 ± 0.04	1.23 ± 0.06	1.20 ± 0.05
PEG - albúmina	1.53 ± 0.26	1.34 ± 0.02	1.30 ± 0.05
PEG - COHb	1.28 ± 0.04	1.24 ± 0.02	1.21 ± 0.03
Cl⁻ (mM)			
Sin transfusión	100.2 ± 0.7	100.7 ± 1.5	101.6 ± 0.7
PEG - albúmina	102.8 ± 1.0	101.7 ± 0.5	101.1 ± 0.5
PEG - COHb	104.0 ± 1.0	102.0 ± 0.6	102.5 ± 0.7

5 Tabla 3. Análisis de hemoglobina de sangre entera durante y después de 2 h de MCAO en grupos sin transfusión o transfusión a 20 min de MCAO (media ± SE; n = 10)

	Referencia	MCAO 60 min	Reperusión 30 min
Hematocrito (%)			

Sin transfusión	37 ± 1	37 ± 1	
PEG - Albúmina	38 ± 1	34 ± 1	
PEG - COHb	36 ± 1	33 ± 1	
<hr/>			
Hemoglobina (g/dL)			
Sin transfusión	12.5 ± 0.3	11.7 ± 0.3	12.1 ± 0.3
PEG - Albúmina	12.5 ± 0.2	11.2 ± 0.4	11.2 ± 0.3
PEG - COHb	11.7 ± 0.3	11.1 ± 0.3	11.1 ± 0.6
<hr/>			
Contenido de O ₂ arterial (ml de O ₂ /dL)			
Sin transfusión	16.0 ± 0.3	15.3 ± 0.3	16.3 ± 0.4
PEG - albúmina	16.3 ± 0.2	14.4 ± 0.4	14.1 ± 0.7
PEG - COHb	14.9 ± 0.7	14.8 ± 0.6	14.4 ± 0.7
MetHb (%)			
Sin transfusión	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1
PEG - albúmina	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1
PEG - COHb	0.7 ± 0.1	1.6 ± 0.2*	1.5 ± 0.1*
COHb (%)			
Sin transfusión	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.3
PEG - albúmina	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.2 ± 0.1
PEG - COHb	0.6 ± 0.1	2.3 ± 0.2*	2.3 ± 0.1*

* P < 0.05 de PEG-Albúmina

Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la concentración de hematocritos o de Hb en sangre total en el grupo transfundido con PEG-COHb en comparación con el grupo transfundido con PEG-albúmina. Los porcentajes de MetHb y COHb en la sangre completa fueron ligeramente elevados después de la transfusión de PEG-COHb (Tabla 3). El análisis de Hb en plasma a 60 min de MCAO (aproximadamente 35 minutos después de completar la transfusión de PEG-COHb) indicó concentraciones de 0.6 ± 0.1 g/dL (\pm SE), y el nivel permaneció relativamente sin cambios a los 30 minutos de reperfusión. El porcentaje de COHb en la Hb en plasma fue en el $11 \pm 4\%$ a 60 min de MCAO y $6 \pm 1\%$ a los 30 min de reperfusión. Los valores para la presión sanguínea arterial media se muestran en la figura 3A. Aunque hubo tendencia a que la presión aumentara ligeramente durante la MCAO prolongada en el grupo PEG-COHb, los valores no fueron significativamente diferentes entre los grupos en ningún momento. Se controló el flujo Doppler láser sobre la corteza lateral donde la isquemia es más densa. Los valores se muestran en la figura 3B. En todos los grupos, el flujo disminuyó a aproximadamente 25% de la referencia inicialmente y aumentó ligeramente con el tiempo hasta aproximadamente el 30% de la referencia. Con la reperfusión, el flujo se restauró a aproximadamente el 80% de la referencia en todos los grupos. No hubo diferencias significativas entre los grupos en ningún momento. La temperatura rectal se mantuvo en el intervalo de 36.5-37.0°C, durante la isquemia y a 1 h de reperfusión después de que las ratas despertaron de la anestesia. Además, las ratas no presentaron fiebre a las 24 h. Después del despertar de la anestesia, las puntuaciones de déficit neurológico fueron similares entre los grupos (Figura 4). Sin embargo, al reexaminarse a las 24 h, las puntuaciones de déficit neurológico mejoraron selectivamente en el grupo PEG-COHb. Los valores para el volumen de infarto en cada nivel coronal y los volúmenes totales de infarto se muestran en la figura 5. El volumen de infarto fue similar en el grupo sin transfusión y el grupo transfundido con PEG-albúmina. El volumen de infarto se redujo significativamente en el grupo transfundido con PEGCOHb en comparación con ya sea el grupo no transformado o PEG-albúmina. En el grupo PEG-COHb, el volumen de infarto se redujo en un 82% en corteza y un 56% en estriado en relación con el grupo PEG-albúmina (Figura 6). La reducción en el volumen de infarto estaba presente en cada uno de los 5 cortes más anteriores, lo que indica que el rescate de tejidos se extendió en toda la zona de distribución de la arteria cerebral media.

Discusión

El grado de rescate tisular mediante transfusión de carga superior de PEG-COHB durante la isquemia cerebral focal transitoria es sustancialmente mayor que el informado con una transfusión de intercambio hipervolémico con Hb $\alpha\alpha$ reticulada en ratas o Hb polimérica en ratones. Este hallazgo es notable porque la concentración en plasma de Hb alcanzada con la carga superior de 10 ml/kg fue de 0.6 g/dl, que es considerablemente menor que la de 2-2.5 g/dl por lo general alcanzada con una transfusión de intercambio de 30-40% de fluidos que contienen 6 g/dL de Hb. Además, el aumento de la concentración en plasma de Hb reticulada $\alpha\alpha$ incrementando adicionalmente la concentración de Hb en el fluido de transfusión de 10 g/dL a 20 g/dl produce reducciones adicionales en el volumen de infarto. Estas comparaciones sugieren que la PEG-COHB puede ser superior por mol de hemo en comparación con la Hb $\alpha\alpha$ reticulada y la Hb polimérica para rescatar el cerebro de un accidente cerebrovascular. Los resultados indican que no se requieren grandes concentraciones plasmáticas de COHB PEGilada para rescatar el cerebro. La ventaja teórica de la transfusión de intercambio es que la viscosidad de la sangre entera se puede reducir disminuyendo el hematocrito y, por lo tanto, promover el flujo sanguíneo colateral. La ventaja de la carga superior sobre la transfusión de intercambio es que este protocolo sería más fácil de implementar en un accidente cerebrovascular clínico y el volumen de 10 ml/kg es fácilmente tolerado sin producir hipertensión inducida por hipervolemia marcada. No se observó hipertensión significativa en el presente estudio. El rescate por el PEG-COHB no parecía estar relacionado con un aumento en el flujo sanguíneo en el núcleo isquémico de la corteza como se evaluó por flujometría Doppler láser en un solo sitio. Sin embargo, es posible que el flujo sanguíneo colateral fuera mejorado en la región de la frontera isquémica suficiente para rescatar el tejido. La viscosidad de la solución de Hb PEGilada es más cercana a la de la sangre completa en comparación con las soluciones de Hb reticulada y polimérica y, por lo tanto, puede mantener mejor el esfuerzo de cizallamiento endotelial y la producción de NO asociada, lo que podría ayudar a mantener la dilatación de las arterias colaterales.

La transfusión de carga superior de 10 ml/kg de PEG-albúmina y PEG-COHB produjo aproximadamente 8-10% de disminuciones en los hematocritos. Esta disminución relativamente pequeña del hematocrito tendrá sólo un pequeño efecto sobre la viscosidad de la sangre y es poco probable que mejore la perfusión lo suficiente para reducir la lesión cerebral reduciendo la viscosidad de la sangre. La falta de una diferencia en el volumen de infarto entre el grupo transfundido con PEG-albúmina y el grupo sin transfusión en este estudio y en un estudio previo con mayor hemodilución apoyan esta premisa. Por otra parte, el aumento de plasma [Hb] a 0.6 g/dL después de PEG-COHB de carga superior fue insuficiente para compensar la disminución del hematocrito. De este modo, la sangre entera [Hb] y el contenido de O₂ arterial no fueron aumentados por la transfusión de PEG-COHB. Sin embargo, incluso en ausencia de un aumento del contenido de O₂ arterial o del flujo sanguíneo, un portador de O₂ en el plasma puede ser capaz de aumentar el suministro de O₂ al tejido isquémico por varias razones. En primer lugar, la solubilidad del oxígeno en el plasma es baja y representa un importante sitio de resistencia de la difusión de O₂ entre los glóbulos rojos y las mitocondrias en el tejido. Al transportar una gran cantidad de O₂ en el plasma, se facilita el transporte de O₂ de la membrana de las células rojas al endotelio. A este respecto, la eficacia de la transfusión de los polímeros de Hb durante la MCAO se pierde cuando la solución contiene principalmente polímeros de peso molecular mayor que 14 MDa. La PEG-Hb bovina actual con aproximadamente 8-10 cadenas laterales de 5000 PEG de peso molecular parece representar un buen equilibrio de ser lo suficientemente pequeño como para tener una alta movilidad para facilitar el transporte de O₂ en el plasma, pero suficientemente grande para limitar el extravasado. En segundo lugar, el flujo de glóbulos rojos a través de microvasos individuales es heterogéneo y esta heterogeneidad se amplifica en condiciones de baja presión de perfusión durante la isquemia incompleta. Al suministrar O₂ a través del flujo de plasma en los capilares que carecen de glóbulos rojos, la liberación de O₂ puede llegar a ser más homogénea entre los capilares. En tercer lugar, los glóbulos rojos son partículas y su superficie no cubre toda la superficie del endotelio capilar en un instante cualquiera. Un portador de O₂ en el plasma aumenta la superficie efectiva para la difusión de O₂. Por lo tanto, una infusión de carga superior de Hb libre de células podría invocar varios mecanismos de administración de O₂ independiente del contenido de O₂ arterial en masa y del flujo sanguíneo macroscópico.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un conjugado covalente entre una molécula de hemoglobina nativa funcional y al menos una molécula de poli(etilenglicol), comprendiendo dicha composición:
- 5 a. una fracción de hemoglobina soluble en agua que comprende un grupo de moléculas de hemoglobina en la que cada miembro de dicho grupo de moléculas de hemoglobina;
- i. se conjuga covalentemente con al menos una molécula de dicho poli(etilenglicol) a través de una unidad estructural amina de un residuo de aminoácido (por ejemplo, una unidad estructural ϵ -amina de un residuo de lisina);
- ii. está libre de agentes químicos de reticulación; y
- iii. tiene una P_{50} de 9 mm Hg a 14 mm Hg; y
- 10 b. una fracción estabilizadora soluble en agua que hace que dicho grupo de moléculas de hemoglobina sea resistente a la oxidación, comprendiendo dicha fracción, un agente estabilizante que comprende un elemento estructural más reactivo con el oxígeno que dicho grupo de moléculas de hemoglobina; y
- c. una fracción diluyente que comprende un diluyente farmacéuticamente aceptable en la que dicha fracción de hemoglobina es soluble,
- 15 estando dicha composición libre de actividad viral, y comprendiendo de manera estable menos del 5% de metahemoglobina;
- dicha composición preparada por un método que comprende:
- i. someter una solución de hemoglobina desoxigenada y un agente estabilizante a un procedimiento térmico de inactivación viral que comprende: exponer dicha solución a una temperatura elevada suficientemente para inactivar toda
- 20 la actividad viral en dicha solución (por ejemplo, 60°C), siendo dicha exposición durante un tiempo suficiente para lograr dicha inactivación de toda la actividad viral en dicha solución (por ejemplo, 10 horas),
- comprendiendo dicho agente estabilizante un elemento estructural más reactivo con el oxígeno que dicha hemoglobina desoxigenada en dicha solución, minimizando así la unión del oxígeno por dicha hemoglobina desoxigenada,
- 25 comprendiendo dicha solución una cantidad de dicho agente estabilizante suficiente para prevenir la formación de más de 5% de metahemoglobina en dicho en dicho procedimiento térmico de desactivación viral; y después oxigenar otra vez dicha hemoglobina desoxigenada para formar una solución de hemoglobina inactivada viralmente reoxigenada; y
- ii. poner en contacto dicha solución de hemoglobina inactivada viralmente reoxigenada de la etapa (i) con una molécula activada de poli(etilenglicol) de reactividad complementaria a un residuo de aminoácido de dicha hemoglobina, formando así un conjugado covalente entre moléculas de poli(etilenglicol) y hemoglobina en dicha solución.
- 30 2. La composición según la reivindicación 1, en la que cada miembro de dicho grupo de moléculas de hemoglobina está conjugado covalentemente a cinco o más de dicha unidad estructural poli(etilenglicol) a través de dicha unidad estructural amina de cinco o más de dicho residuo de aminoácido.
3. La composición según cualquier reivindicación precedente, en la que dicha molécula de hemoglobina está unida a un miembro seleccionado entre oxígeno y monóxido de carbono.
- 35 4. La composición según la reivindicación 3, en la que dicha molécula de hemoglobina es capaz de transferir un miembro seleccionado entre dicho oxígeno unido y dicho monóxido de carbono unido a un tejido con el que dicha hemoglobina está en contacto.
5. La composición según la reivindicación 1, preparada mediante dicho método, que comprende además uno o más de:
- 40 (iii), antes de la etapa (i), desoxigenación de una solución de hemoglobina oxigenada, formando así dicha solución de dicha hemoglobina desoxigenada; y (iv), antes de la etapa (i), formar dicha solución de dicha hemoglobina desoxigenada con dicho agente estabilizante.
6. La composición según la reivindicación 5, en la que dicha desoxigenación produce una molécula de hemoglobina desoxigenada, que (i) no está unida ni a oxígeno ni a monóxido de carbono; o (ii) está unida al monóxido de carbono.
- 45 7. La composición según la reivindicación 5, en la que dicha molécula de hemoglobina está unida a un miembro seleccionado entre oxígeno y monóxido de carbono.
8. La composición según la reivindicación 7, en la que dicha molécula de hemoglobina es capaz de transferir un miembro seleccionado entre dicho oxígeno unido y dicho monóxido de carbono unido a un tejido.

9. Una composición según la reivindicación 1, en la que la hemoglobina está unida a CO.
10. Una composición según la reivindicación 1, en la que la hemoglobina no está unida a CO.
11. Una composición según las reivindicaciones 9 y 10, en la que
- 5 a. cuando la hemoglobina está unida a CO, la fracción diluyente comprende una solución salina reguladora con fosfato; y
- b. cuando la hemoglobina no está unida a CO, la fracción diluyente comprende un diluyente salino hipertónico.
12. La composición según la reivindicación 11, en la que dicho diluyente salino hipertónico incluye NaCl a una concentración desde 3% a 7%.
13. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para uso en:
- 10 (i) suministro oxígeno o monóxido de carbono a los tejidos;
- (ii) tratamiento: traumatismo, choque hemorrágico, isquemia, lesión por reperfusión o anemia falciforme, en cada caso mientras se mantiene la dilatación de las arterias colaterales;
- (iii) inducción de angiogénesis o aumentar el flujo sanguíneo a los tejidos;
- 15 (iv) tratamiento o prevención de la hipoxia resultante de la pérdida de sangre, anemia, choque, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular o lesión cerebral traumática; o
- (v) tumores hiperoxigenantes para mejorar el efecto terapéutico de radioterapia o quimioterapia.
14. La composición según la reivindicación 1, preparada mediante dicho método en el que dicha temperatura es aproximadamente 60°C.
- 20 15. La composición según la reivindicación 1, preparada mediante dicho método en el que dicho tiempo es desde aproximadamente 1 a aproximadamente 12 horas.
16. La composición según la reivindicación 1, preparada mediante dicho método en el que dicho agente estabilizante es un aminoácido.
17. La composición según la reivindicación 16, en la que dicho agente estabilizante es cisteína.

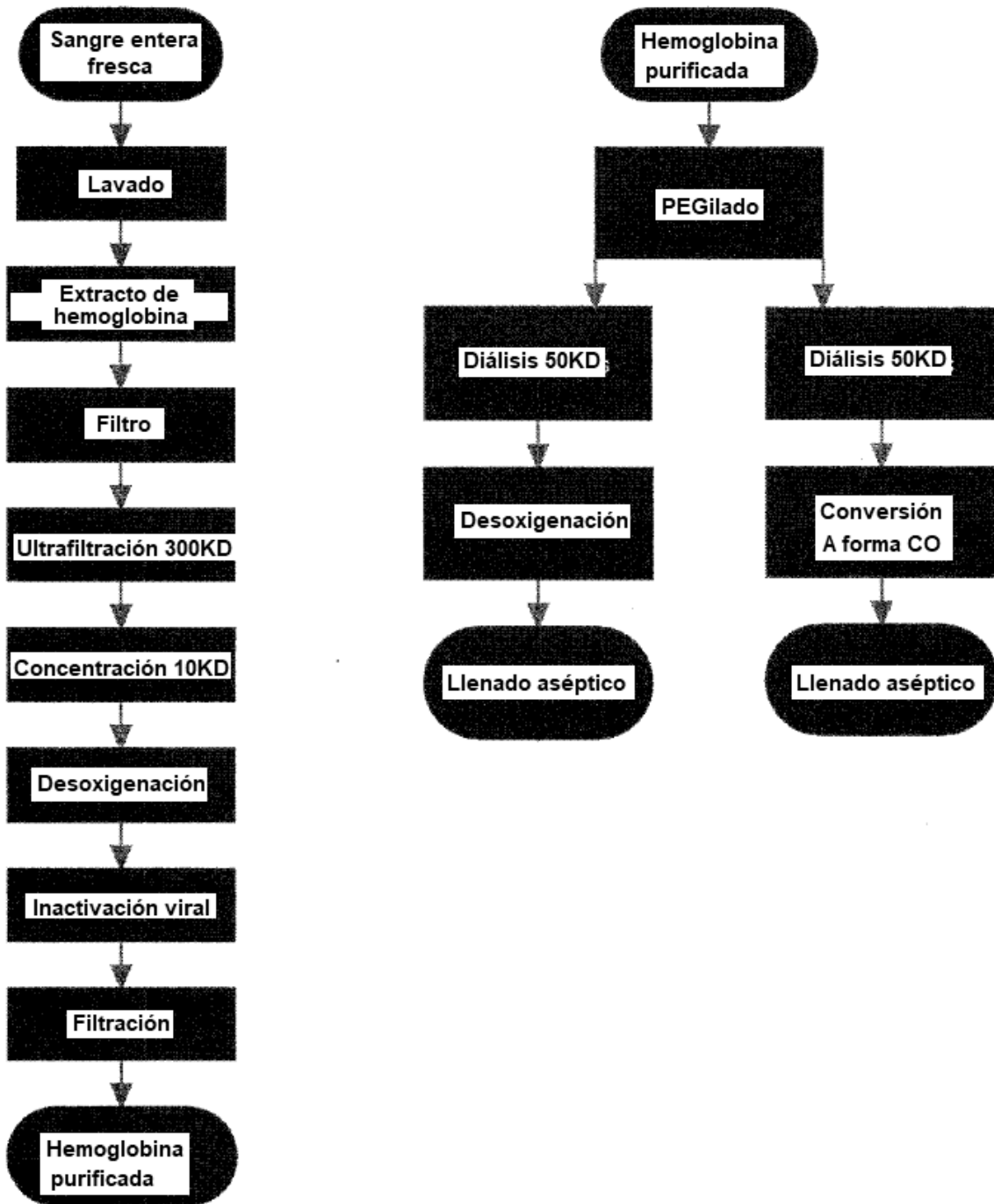


FIGURA 1

Deuda de oxígeno como resultado de shock hipovolémico, después de la administración de Hetastarch, glóbulos rojos empaquetados, Oxyglobin, y PEG-Hb

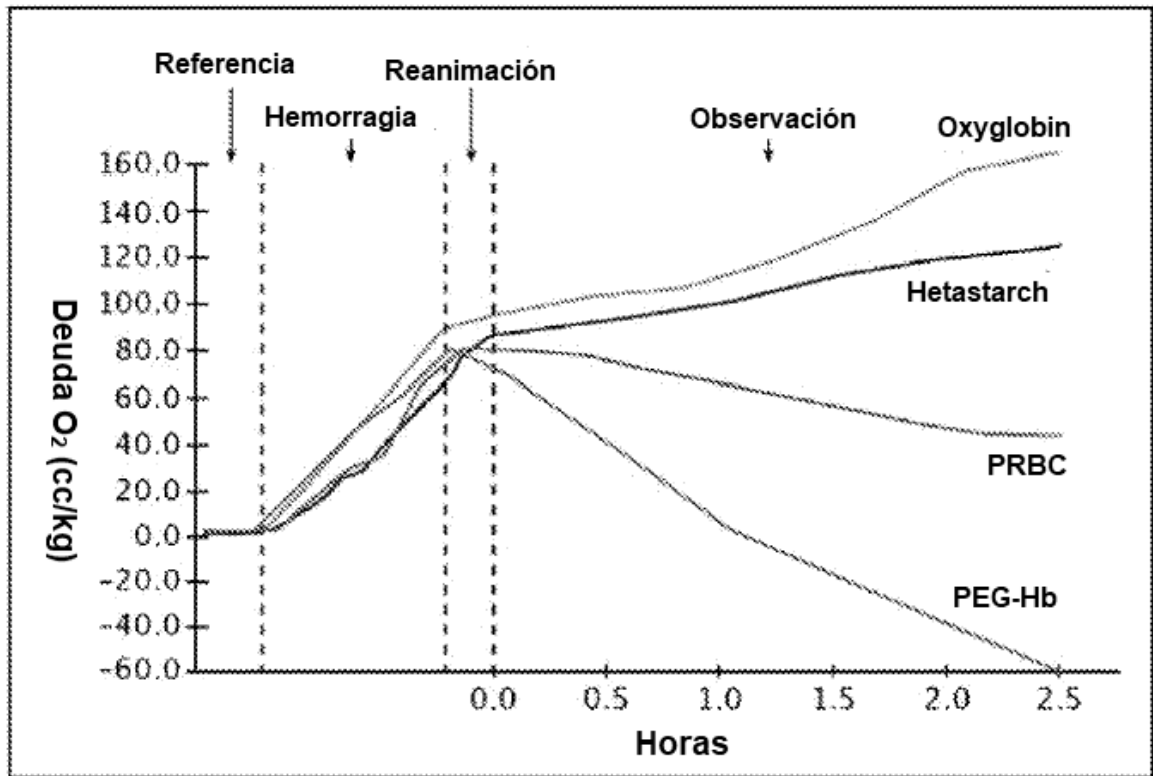


FIGURA 2

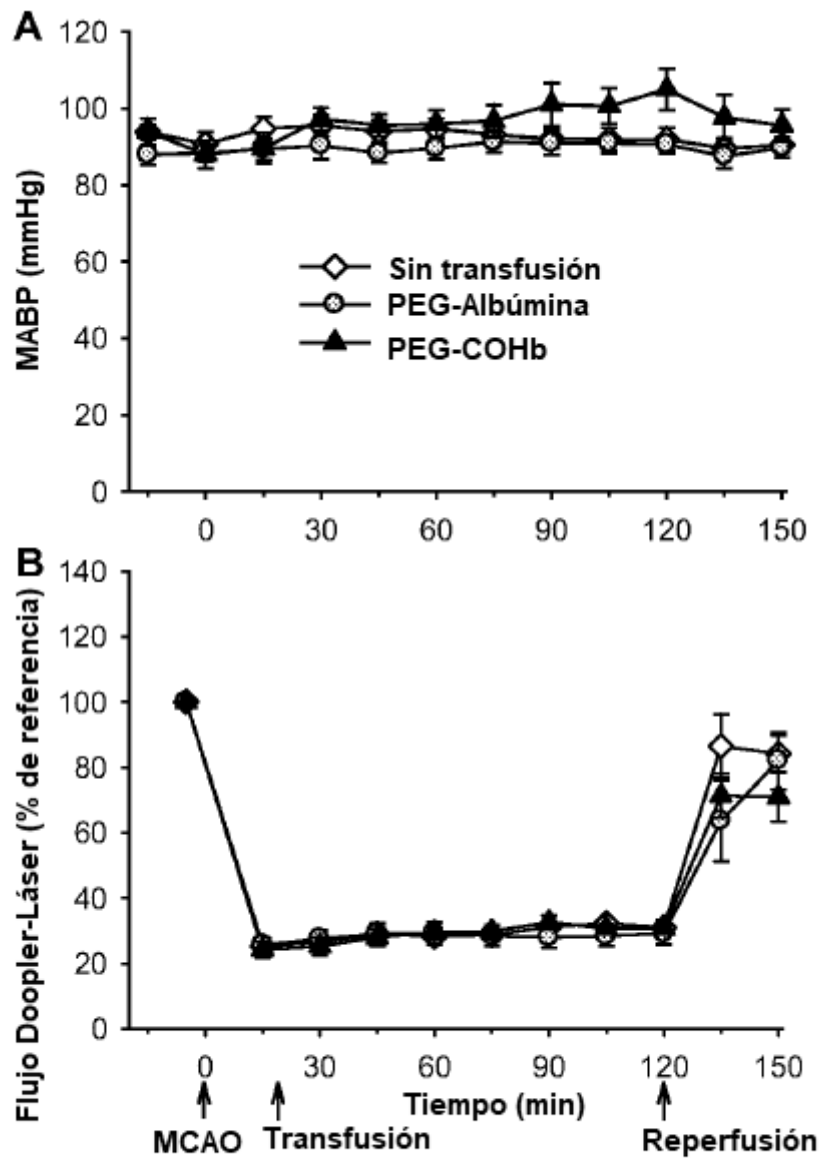


FIGURA 3

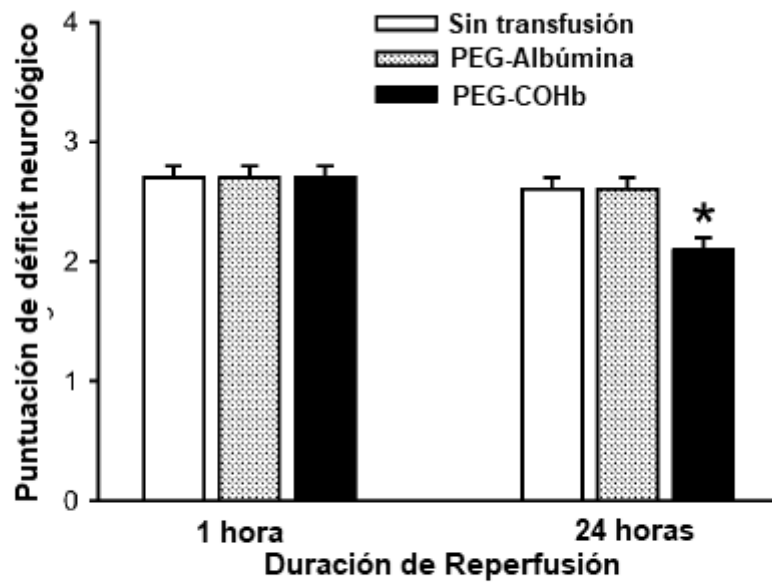


FIGURA 4

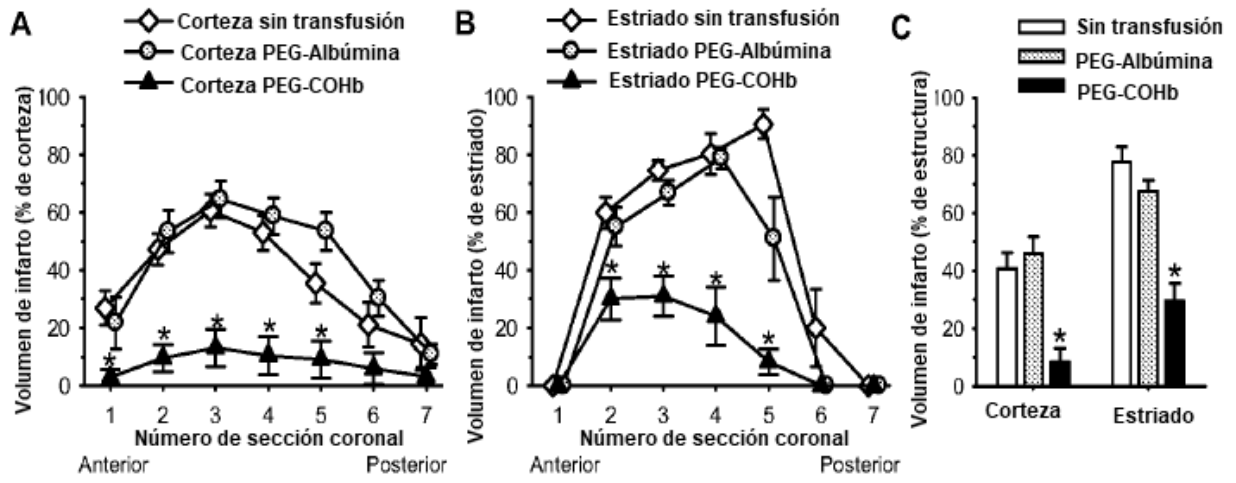


FIGURA 5

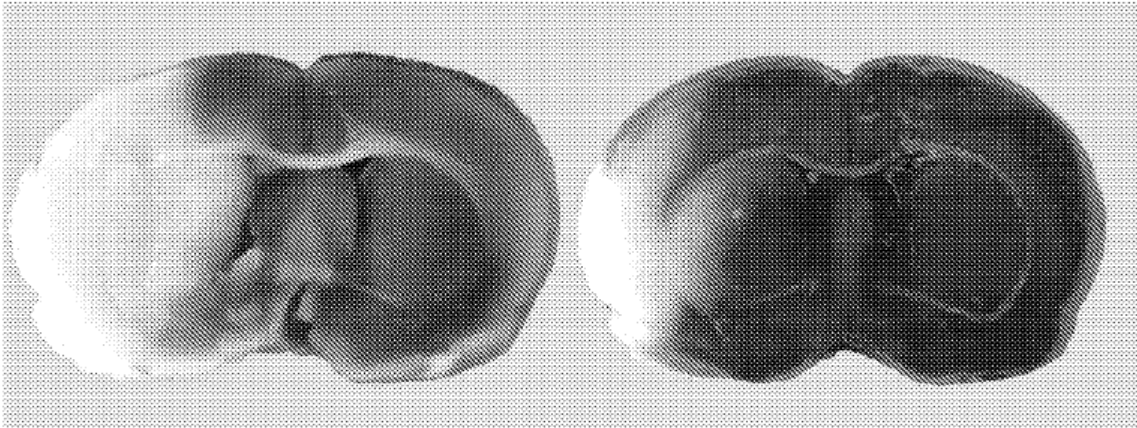


FIGURA 6