

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 589**

51 Int. Cl.:

A61K 38/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.08.2012 PCT/US2012/051959**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2013 WO13032828**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2012 E 12828756 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2750700**

54 Título: **Método para la elaboración de una composición que comprende hemoglobina bovina cruzada con beta-beta**

30 Prioridad:

31.08.2011 US 201161529279 P
06.09.2011 US 201113225797
18.10.2011 US 201113275366

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.04.2018

73 Titular/es:

BILLION KING INTERNATIONAL LIMITED
(100.0%)
Room 2301, 23rd Floor, Fu Fai Commercial
Centre 27 Hillier Street Sheung Wan
Hong Kong, HK

72 Inventor/es:

WONG, BING LOU.;
KWOK, SUI YI. y
BUTT, KWOK CHU.

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 664 589 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

Método para la elaboración de una composición que comprende hemoglobina bovina cruzada con beta-beta

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas:

[0001] La presente solicitud es una prioridad de reivindicaciones de la Solicitud de patente internacional de una solicitud de patente estadounidense provisional número 61/529.279 presentada el 31 de agosto de 2011, una solicitud de continuación en parte de Estados Unidos, número 13/225.797 presentada el 6 de septiembre de 2011 y una solicitud de continuación en parte de Estados Unidos, número 13/275.366 presentada el 18 de octubre de 2011, ahora la Patente US8.106.011.

Campo técnico

15 [0002] La presente invención se refiere a métodos para la preparación de una composición farmacéutica que contiene un portador de oxígeno termoestable que favorece la reticulación beta-beta. Utilizando los métodos de la presente invención, se puede controlar la afinidad por el oxígeno de la molécula resultante, de modo que puedan producirse portadores de oxígeno basados en hemoglobina adaptados para aplicaciones específicas. La hemoglobina reticulada con menor afinidad por el oxígeno es útil para aplicaciones que requieren una rápida oxigenación tisular (por ejemplo, choque hemorrágico) mientras que la hemoglobina reticulada con mayor afinidad por el oxígeno es útil para aplicaciones que requieren una tasa de oxigenación más lenta (por ejemplo, tratamiento complementario contra el cáncer).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

25 [0003] La hemoglobina juega un papel importante en la mayoría de los vertebrados para el intercambio gaseoso entre el sistema vascular y el tejido. Es responsable de transportar el oxígeno desde el sistema respiratorio a las células del cuerpo a través de la circulación sanguínea y también de llevar el producto metabólico de dióxido de carbono desde las células del cuerpo al sistema respiratorio, donde se exhala el dióxido de carbono. Como la hemoglobina tiene esta característica de transporte de oxígeno, puede utilizarse como un potente proveedor de oxígeno si puede estabilizarse *ex vivo* y utilizarse *in vivo*.

35 [0004] La hemoglobina natural es un tetrámero que generalmente es estable cuando está presente en los glóbulos rojos. Sin embargo, cuando la hemoglobina natural se extrae de los glóbulos rojos, se vuelve inestable en plasma y se divide en dos dímeros $\alpha - \beta$. Cada uno de estos dímeros tiene aproximadamente 32 kDa de peso molecular. Estos dímeros pueden causar daño renal sustancial cuando se filtran a través de los riñones y se excretan. La descomposición del enlace del tetrámero también tiene un efecto negativo en la sostenibilidad de la hemoglobina funcional en circulación.

40 [0005] Con el fin de resolver el problema, los desarrollos recientes en el procesamiento de hemoglobina han incorporado diversas técnicas de reticulación para crear enlaces intramoleculares dentro del tetrámero, así como enlaces intermoleculares entre los tetrámeros para formar hemoglobina polimérica. La técnica anterior muestra que la hemoglobina polimérica es la forma preferida para aumentar la semivida circulatoria de la hemoglobina. No obstante, tal y como determinan los presentes inventores, la hemoglobina polimérica se convierte más fácilmente en metahemoglobina en la circulación sanguínea. La metahemoglobina no puede unir oxígeno y, por lo tanto, no puede oxigenar el tejido. Por lo tanto, la reticulación mostrada por la técnica anterior que causa la formación de hemoglobina polimérica supone un problema. Existe una necesidad de conseguir una técnica que permita la reticulación intramolecular para crear tetrámeros estables sin la formación simultánea de hemoglobina polimérica.

50 [0006] Otros problemas con los intentos de la técnica anterior para estabilizar la hemoglobina incluyen la producción de hemoglobina tetrámera, la cual incluye un porcentaje inaceptablemente alto de unidades dímeras (o hemoglobina tetramérica no entrecruzada que se disocia con gran rapidez de la hemoglobina dimérica si se administra a un paciente); la presencia de dímeros hace que la composición de hemoglobina no sea adecuada para su administración a mamíferos. La forma dimérica de la hemoglobina puede causar una lesión renal grave en el cuerpo de un mamífero y esta lesión renal puede ser lo suficientemente grave como para causar la muerte. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de crear hemoglobina tetramérica estable con forma dimérica indetectable en el producto final.

[0007] Otro problema con los productos de hemoglobina anteriores es el aumento repentino de la presión arterial tras la administración. En el pasado, se han registrado eventos de vasoconstricción causados por la generación anterior de portadores de oxígeno a base de hemoglobina. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de lograr un procedimiento para preparar hemoglobina que no cause vasoconstricción y alta presión sanguínea al aplicarse a un mamífero.

[0008] Otros problemas con los intentos de la técnica anterior para crear hemoglobina estable incluyen la presencia de impurezas de proteínas tales como inmunoglobulina G, que puede causar efectos de alergias en mamíferos. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de conseguir un proceso que puede producir hemoglobina tetramérica estable sin impurezas de proteínas.

[0009] Además de los problemas anteriores, existe una necesidad en la técnica de crear hemoglobina tetramérica estabilizada libre de dímeros y fosfolípidos, y que se pueda producir a escala industrial.

[0010] Los portadores de oxígeno basados en hemoglobina pueden usarse en una amplia variedad de aplicaciones médicas; dependiendo de la aplicación médica, son deseables diferentes niveles de afinidad por el oxígeno. Por ejemplo, una molécula de hemoglobina con poca afinidad por el oxígeno puede transferir oxígeno más fácilmente a un tejido objetivo que una molécula de hemoglobina con mayor afinidad por el oxígeno. Por lo tanto, sería deseable controlar la afinidad por el oxígeno de la hemoglobina tetramérica entrecruzada. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de controlar el tipo de reticulación y las condiciones de reticulación para producir hemoglobina tetramérica reticulada con niveles precisos de unión al oxígeno.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0011] La presente invención proporciona un método para procesar una hemoglobina bovina tetramérica entrecruzada no polimérica, estable al calor y purificada adecuada para su uso en mamíferos sin causar lesión renal grave, sin efectos adversos para el sistema vascular y sin efectos adversos graves, incluyendo la muerte. La presente invención elimina la forma dimérica de la hemoglobina, la hemoglobina tetramérica no entrecruzada, los fosfolípidos y las impurezas de las proteínas. La presente invención también proporciona una técnica para controlar la afinidad por el oxígeno del tetrámero reticulado resultante controlando el tipo de reticulación en el tetrámero (por ejemplo, la cantidad de reticulación beta-beta, reticulación alfa-alfa y reticulación alfa-beta en el tetrámero), la estructura cuaternaria del tetrámero y las condiciones de reticulación. La hemoglobina reticulada con menor afinidad por el oxígeno es útil para aplicaciones que requieren oxigenación tisular rápida (por ejemplo, choque hemorrágico) mientras que la hemoglobina reticulada con mayor afinidad por el oxígeno es útil para aplicaciones que requieren una tasa de oxigenación más lenta (por ejemplo, tratamiento complementario contra el cáncer). Adicionalmente, la presente invención utiliza (1) un aparato de citólisis instantáneo para lisis hipotónica precisa y controlada, (2) una cromatografía en columna de flujo, (3) un aparato de alta temperatura a corto plazo (HTST) para el procesamiento térmico de la solución de hemoglobina en el proceso de purificación para eliminar los dímeros indeseables no estabilizados de la hemoglobina y eliminar las impurezas de la proteína, por ejemplo, la inmunoglobulina G, de modo que se puedan evitar las lesiones renales, los efectos perjudiciales para el sistema vascular y otras reacciones de toxicidad, y (4) un empaque de bolsa de infusión hermético para evitar la entrada de oxígeno en el producto final.

[0012] El método incluye un material de partida de sangre completa de mamífero, incluyendo al menos glóbulos rojos y plasma. Los glóbulos rojos se separan del plasma en la sangre completa de los mamíferos, a lo que le sigue una filtración para obtener una fracción de glóbulos rojos filtrada. La fracción de glóbulos rojos filtrada se lava para eliminar las impurezas de las proteínas plasmáticas. Los glóbulos rojos se alteran mediante una lisis hipotónica controlada durante un tiempo suficiente para lisar los glóbulos rojos sin lisar los glóbulos blancos en un aparato de citólisis instantánea. La filtración se realiza para eliminar al menos una parte de los desechos retenidos del lisado. Se extrae una primera solución de hemoglobina del lisado.

[0013] Se llevan a cabo uno o más procesos de purificación en la solución de hemoglobina, tales como ultrafiltración y/o cromatografía.

[0014] La hemoglobina purificada se reticula mediante bis-3,5-dibromosalicil fumarato (DBSF) para formar calor hemoglobina reticulada estable sin la formación de hemoglobina polimérica tal que el peso molecular de la hemoglobina tetramérica reticulada no polimérica resultante sea 60- 70 kDa. La expresión "no polimérica", tal como se usa en el presente documento, se refiere a hemoglobina tetramérica que no está reticulada intermolecularmente con otras moléculas de hemoglobina o cualquier otra molécula que no sea de hemoglobina, tal como PEG. Dependiendo de la fuente de hemoglobina, de la estructura cuaternaria de la hemoglobina y de las condiciones de

reticulación, se puede producir un producto tetramérico con un alto porcentaje de reticulación beta-beta. Además, la afinidad por el oxígeno de la molécula resultante puede controlarse para que se puedan producir portadores de oxígeno basados en hemoglobina adaptados para aplicaciones específicas.

5 **[0015]** Una vez realizado este procedimiento, la hemoglobina reticulada se somete a un tratamiento térmico para eliminar cualquier hemoglobina tetramérica residual no reticulada y cualquier hemoglobina no estabilizada, por ejemplo, la forma dimérica de la hemoglobina y cualquier otra impureza de proteína. Antes del tratamiento térmico, se agrega N-acetil cisteína (opcionalmente) a una concentración de aproximadamente 0,2 % a la hemoglobina tetramérica reticulada para evitar la formación de metahemoglobina. Inmediatamente después del tratamiento térmico y el
10 enfriamiento, se agrega N-acetil cisteína (opcionalmente) a una concentración de aproximadamente 0,025 % a 0,4 % para evitar la formación adicional de metahemoglobina. El tratamiento térmico es preferiblemente un tratamiento a corto plazo a alta temperatura llevado a cabo a aproximadamente 70 ° C a 95 ° C durante un período de 30 segundos a 3 horas con un enfriamiento posterior a 25 ° C. Cualquier precipitado formado durante el tratamiento térmico se elimina mediante centrifugación o filtración.

15 **[0016]** A continuación se añade la hemoglobina tetramérica reticulada sin dímeros y fosfolípidos, libre de impurezas de proteínas y estable al calor a un portador farmacéuticamente aceptable.

[0017] Posteriormente, la hemoglobina tetramérica reticulada y estable al calor se formula y se envasa en una
20 bolsa de infusión de polietileno fabricada a medida y estanca al aire, de etileno-vinilo-acetato y de etileno-alcohol de vinilo (PE, EVA, EVOH). El envase previene la contaminación por oxígeno que resulta en la formación de metahemoglobina inactiva.

[0018] La invención se define en las reivindicaciones.

25 **Breve descripción de los dibujos**

[0019]

30 La FIG. 1 es un diagrama de flujo que representa una descripción general de un proceso de la presente invención. La FIG. 2 representa esquemáticamente un aparato de citólisis instantánea utilizado en el proceso de la presente invención.

La FIG. 3 representa un análisis de cromatografía líquida de alta resolución para (a) hemoglobina tetramérica no tratada térmicamente, y (b) hemoglobina tetramérica reticulada estable al calor que ha sido sometida a un tratamiento
35 térmico a 90 ° C durante un período de entre 45 segundos y 2 minutos o a 80 ° C durante 30 minutos.

La FIG. 4 es un perfil de elución para la cromatografía en columna de flujo continuo; la solución de hemoglobina está en la fracción de flujo.

La FIG. 5 representa esquemáticamente un sistema de cromatografía en columna CM de flujo continuo con ultrafiltración para una operación a escala industrial.

40 La FIG. 6 es una representación esquemática de un aparato utilizado para la etapa de procesamiento de térmico HTST.

La FIG. 7 muestra el perfil de temperatura en el aparato de procesamiento HTST y el tiempo necesario para eliminar el tetrámero (dímero) no estabilizado en el sistema a 85 ° C y 90 ° C de la presente invención.

45 La FIG. 8 es una representación esquemática de una bolsa de infusión para la hemoglobina tetramérica reticulada termoestable de la presente invención.

La FIG. 9 representa el cromatograma de HPLC de fase inversa de las cadenas de globina α y β de hemoglobina bovina antes (línea discontinua) y después de (línea continua) la reacción con DBSF en un entorno desoxigenado.

La FIG. 10 representa un análisis de SDS-PAGE 15 % de (A) hemoglobina bovina nativa y (B) hemoglobina reticulada con DBSF en un entorno desoxigenado.

50 La FIG. 11 representa la huella digital de masa de péptido de péptidos digeridos con tripsina de la banda de proteína dimérica (B6) generada mediante el análisis MALDI-TOF.

Descripción detallada de la invención

55 **[0020]** La hemoglobina es una proteína de transporte de oxígeno que contiene hierro en los glóbulos rojos de la sangre de los mamíferos y otros animales. La hemoglobina muestra características de las estructuras terciaria y cuaternaria de las proteínas. La mayoría de los aminoácidos en la hemoglobina forman hélices alfa conectadas por segmentos cortos no helicoidales. Los enlaces de hidrógeno estabilizan las secciones helicoidales dentro de la hemoglobina que causan atracciones dentro de la molécula al plegar cada cadena polipeptídica en una forma

específica. Una molécula de hemoglobina se forma a partir de cuatro subunidades de proteínas globulares. Cada subunidad está compuesta de una cadena polipeptídica dispuesta en un conjunto de segmentos estructurales de hélice α conectados en una disposición de "pliegue de mioglobina" con un grupo hemo incorporado.

5 **[0021]** El grupo hemo consiste en un átomo de hierro dentro de un anillo heterocíclico, conocido como una porfirina. El átomo de hierro se une equitativamente a los cuatro átomos de nitrógeno en el centro del anillo, que se encuentra en un plano. El oxígeno es capaz de unirse al centro de hierro perpendicularmente al plano del anillo de porfirina. Por lo tanto, una sola molécula de hemoglobina tiene la capacidad de combinarse con cuatro moléculas de oxígeno.

10

[0022] En los mamíferos, el tipo más común de hemoglobina es un tetrámero; en humanos, se denomina hemoglobina A y consta de dos subunidades α y dos β no unidas covalentemente designadas como $\alpha_2\beta_2$, cada una compuesta por 141 y 146 residuos aminoácidos respectivamente. El tamaño y la estructura de las subunidades α y β son muy similares entre sí. Cada subunidad tiene un peso molecular de aproximadamente 16 kDa para un peso molecular total del tetrámero de aproximadamente 65 kDa. Las cuatro cadenas polipeptídicas están unidas entre sí por puentes salinos, enlaces de hidrógeno e interacción hidrofóbica. La estructura de la hemoglobina bovina es similar a la hemoglobina humana (90,14 % de identidad en la cadena α , 84,35 % de identidad en la cadena β). La diferencia son los dos grupos sulfhidrilo en la hemoglobina bovina posicionados en P Cys 93, mientras que los sulfhidrilos en la hemoglobina humana se encuentran posicionados en α Cys 104, P Cys 93 y P Cys 112, respectivamente. La hemoglobina humana comparte una gran similitud con la hemoglobina bovina, canina, porcina y equina cuando se comparan sus secuencias de aminoácidos.

[0023] En la hemoglobina de origen natural dentro de las células rojas de la sangre, la asociación de una cadena α con su correspondiente cadena β es muy fuerte y no se disocia en condiciones fisiológicas. Sin embargo, la asociación de un dímero $\alpha\beta$ con otro dímero $\alpha\beta$ es bastante débil fuera de los glóbulos rojos. El enlace tiene una tendencia a dividirse en dos dímeros $\alpha\beta$, cada uno de aproximadamente 32 kDa. Estos dímeros indeseados son lo suficientemente pequeños como para ser filtrados por los riñones y ser excretados, resultando en una posible lesión renal y una disminución sustancial del tiempo de retención intravascular.

30 **[0024]** Por lo tanto, es necesario para estabilizar cualquier hemoglobina utilizada fuera de las células rojas de la sangre, tanto para garantizar su eficacia como su seguridad. A continuación se describe el proceso para producir la hemoglobina estabilizada; se presenta un resumen general del proceso de la presente invención en el diagrama de flujo de la FIG. 1.

35 **[0025]** Inicialmente, se selecciona una fuente de sangre total como fuente de la hemoglobina a partir de las células rojas de la sangre. Se selecciona sangre completa de mamíferos, que puede ser, entre otras, sangre humana, bovina, porcina, equina y canina. Los glóbulos rojos se separan del plasma, se filtran y se lavan para eliminar las impurezas de las proteínas plasmáticas.

40 **[0026]** Con el fin de liberar la hemoglobina de las células rojas de la sangre, se lisa la membrana celular. Aunque se pueden usar diversas técnicas para lisar glóbulos rojos, la presente invención usa lisis bajo condiciones hipotónicas de forma que se puede controlar con precisión en volúmenes adecuados para la producción a escala industrial. Para ello, se utiliza un aparato de citólisis instantánea como el mostrado en la FIG. 2 para lisar los glóbulos rojos. La lisis hipotónica crea una solución de lisado que incluye hemoglobina y un residuo retenido. Para permitir la producción a escala industrial, la lisis se controla cuidadosamente de modo que solo se lisan los glóbulos rojos, sin lisar los glóbulos blancos u otras células. En una realización, el tamaño del aparato de citólisis instantánea se selecciona de tal manera que los glóbulos rojos atraviesan el aparato en 2 a 30 segundos o, de lo contrario, un tiempo suficiente para lisar los glóbulos rojos y, preferiblemente, 30 segundos. El aparato de citólisis instantánea incluye un mezclador estático. Se utiliza agua desionizada y destilada como solución hipotónica. Por supuesto, se entiende que el uso de otras soluciones hipotónicas que tengan diferentes concentraciones salinas daría como resultado diferentes periodos de tiempo para la lisis de los glóbulos rojos. Debido a que el procedimiento de lisis controlada lisa solo los glóbulos rojos, no los glóbulos blancos ni la materia celular, se minimiza la liberación de proteínas tóxicas, fosfolípidos o ADN de glóbulos blancos y otras materias celulares. Se agrega una solución hipertónica inmediatamente después de 30 segundos, es decir, después de que la solución que contiene glóbulos rojos haya atravesado la porción del mezclador estático del aparato de citólisis instantáneo. La hemoglobina resultante tiene una mayor pureza y niveles más bajos de contaminantes tales como ADN y fosfolípidos no deseados que la hemoglobina resultante del uso de otras técnicas de lisis. No se detectan los ácidos nucleicos indeseados de los glóbulos blancos y las impurezas de células sanguíneas y fosfolípidos en la solución de hemoglobina por reacción en cadena de la polimerasa (límite de

detección = 64 pg) o el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, límite de detección = 1 µg/ml) respectivamente.

[0027] En esta etapa en el proceso, la solución de hemoglobina se purifica para eliminar diversas proteínas y otras impurezas. Esta purificación puede basarse en la ultrafiltración, en una cromatografía o una combinación de una o más ultrafiltraciones y/o procesos de cromatografía. En una realización a título de ejemplo, se llevan a cabo dos procesos de ultrafiltración: uno que elimina las impurezas que tienen pesos moleculares mayores que la hemoglobina antes de la cromatografía en columna de flujo, y otro que elimina las impurezas que tienen pesos moleculares menores que la hemoglobina después de la cromatografía en columna de flujo continuo. El último proceso de ultrafiltración mencionado concentra la hemoglobina. En algunas realizaciones, se utiliza un filtro de 100 kDa para la primera ultrafiltración, mientras que se utiliza un filtro de 30 kDa para la segunda ultrafiltración.

[0028] La cromatografía en columna de flujo continuo se utiliza para eliminar las impurezas de proteínas en la solución de hemoglobina purificada tales como inmunoglobina-G, albúmina y anhídrido carbónico. En algunas realizaciones, la cromatografía en columna se lleva a cabo utilizando una o una combinación de columnas de intercambio iónico comercialmente disponibles, tales como una columna DEAE, columna CM, columna de hidroxiapatita, etc. El pH para la cromatografía en columna es por lo general de 6 a 8,5. En una realización, se usa una etapa de cromatografía en columna CM de flujo continuo para eliminar las impurezas de las proteínas a pH 8,0. Se llevan a cabo un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y el método de HPLC para detectar las impurezas de proteínas y los fosfolípidos que permanecen en la muestra después de la elución de la cromatografía en columna. Esta separación por cromatografía en columna de flujo continuo permite un esquema de separación continua para la producción a escala industrial. El resultado de ELISA muestra que la cantidad de estas impurezas es sustancialmente baja en la hemoglobina eluida (inmunoglobulina-G: 44,3 ng/ml; albúmina: 20,37 ng/ml; anhídrido carbónico: 81,2 µg/ml). Los resultados de la eliminación de impurezas de proteínas utilizando diferentes tipos de columnas con diferentes valores de pH se muestran en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Columna (condición de pH)	Porcentaje de eliminación (%)		
	Anhídrido carbónico	Albúmina	Inmunoglobulina G
DEAE (con pH de 7,5)	---	68	29,8
DEAE (con pH de 7,8)	---	60	50,9
CM (con pH de 6,2)	---	32	21,8
CM (con pH de 8,0)	5,6	53,2	66,4
Hidroxiapatita (con pH de 7,5)	4,5	23,5	22,8

[0029] Siguiendo el procedimiento cromatográfico de columna, la hemoglobina se somete a reticulación mediante DBSF. Se seleccionan las condiciones de modo que se favorece la reticulación entre las subunidades beta-beta y el producto resultante contiene más del 50 % de enlaces cruzados beta-beta. Para la reticulación bajo condiciones desoxigenadas, la hemoglobina resultante tiene una baja afinidad por el oxígeno, con un valor de p50 más alto en comparación con la hemoglobina nativa de la misma especie medida en condiciones sustancialmente similares. Por ejemplo, para la hemoglobina bovina, la hemoglobina bovina nativa tiene un valor p50 del orden de 23-29 mm Hg. La hemoglobina bovina reticulada formada en condiciones desoxigenadas en la presente invención tiene un valor p50 del orden de 38-50 mm Hg. Menor afinidad por el oxígeno significa que el tetrámero puede "descargar" oxígeno a un objetivo más fácilmente que un material con una afinidad por el oxígeno más alta. Para la reticulación de la hemoglobina bovina en condiciones oxigenadas, se forma un material con una mayor afinidad por el oxígeno con un valor inferior de p50, inferior a aproximadamente 23 mm Hg, en comparación con la hemoglobina bovina nativa que tiene un valor de p50 del orden de 23-29 mm Hg. Se utilizan composiciones de afinidad de oxígeno más bajas cuando se desea una oxigenación rápida, como en los casos de hipoxia tisular que resulta de una pérdida de sangre extensa (por ejemplo, choque hemorrágico). Las composiciones de afinidad de oxígeno más altas son útiles para las terapias de oxigenación complementarias en el tratamiento del cáncer, donde se desea una velocidad de administración de oxígeno más lenta.

[0030] Para la hemoglobina humana, la reticulación bajo condiciones de desoxigenación produce típicamente una mayoría de hemoglobina reticulada alfa-alfa con afinidad por el oxígeno inferior, es decir, una afinidad por el oxígeno que se disminuyó en el orden de al menos 2 veces a partir de la hemoglobina humana nativa. La reticulación en condiciones oxigenadas tiende a favorecer la producción de hemoglobina reticulada beta-beta con una mayor

afinidad por el oxígeno (es decir, un p50 menor, inferior a aproximadamente 23 mm Hg), en comparación con la hemoglobina humana nativa bajo la misma condición (un valor p50 del orden de aproximadamente 23-30 mm Hg).

[0031] Para la condición de reticulación desoxigenada, se mantiene preferiblemente un nivel de oxígeno disuelto inferior a 0,1 ppm con una relación molar de hemoglobina para DBSF de 1:2,5 a 1:4,0 durante un período de tiempo de 3 a 16 horas a temperatura ambiente (15-25° C), a un pH de alrededor de 8-10, preferiblemente alrededor de pH 8,6-9,2. La hemoglobina reticulada resultante es hemoglobina tetramérica que tiene un peso molecular de 60-70 kDa, lo que demuestra que no hay presente hemoglobina polimérica. El rendimiento de la reacción de DBSF es alto, > 99 % y la concentración de dímero en el producto final es baja. Opcionalmente, el presente proceso no requiere reactivos de tratamiento con sulfhidrilo como la yodoacetamida para reaccionar con la hemoglobina antes de la reticulación, tal y como se utiliza en diversos procesos de la técnica anterior. Para la reticulación en condiciones oxigenadas, se utiliza un entorno oxigenado (igual que el aire, pO₂ es de alrededor de 149mmHg; o puro O₂, pO₂ es casi 760mmHg), mientras que las restantes condiciones mencionadas anteriormente son sustancialmente las mismas.

[0032] Para la hemoglobina bovina, la reticulación beta-beta es superior al 50 %, y preferiblemente superior al 60 % para la reticulación en condiciones de desoxigenación (menos de 0,1 ppm de nivel de oxígeno disuelto). Para la hemoglobina bovina reticulada en condiciones oxigenadas, también se favorece la reticulación beta-beta, típicamente a un nivel superior al 40 % de reticulación beta-beta.

[0033] Para la hemoglobina humana, la reticulación en condiciones oxigenadas favorece la reticulación beta-beta.

[0034] Después de la reticulación, la salina tamponada con fosfato (PBS), un tampón fisiológico, se cambia por la solución de reticulación y los químicos residuales se eliminan mediante filtración de flujo tangencial.

[0035] Después de la reticulación, la presente invención incluye una etapa de procesamiento de calor (High Temperature Short Time, HTST) para la solución de hemoglobina tetramérica reticulada. El tratamiento térmico se lleva a cabo en un ambiente desoxigenado. Antes del tratamiento térmico, se agrega N-acetil cisteína (opcionalmente) para prevenir la formación de metahemoglobina (hemoglobina inactiva). Después de la etapa de procesamiento térmico, la solución se enfría y se agrega N-acetilcisteína (opcionalmente) para mantener un nivel bajo de metahemoglobina. Si se agrega N-acetil cisteína antes y después del tratamiento térmico, la cantidad añadida antes del tratamiento térmico es aproximadamente 0,2 %, mientras que la cantidad agregada después del tratamiento térmico es de aproximadamente 0,025 % al 0,4 %. No obstante, si se agrega N-acetil cisteína solo después del tratamiento térmico, entonces la cantidad añadida es 0,025 % -0,4 %. En una realización, la cantidad de N-acetilcisteína añadida después del tratamiento térmico es del 0,2 % -0,4 %. En otra realización, la cantidad de N-acetilcisteína añadida después del tratamiento térmico es del 0,025 % -0,2 %.

[0036] En algunas realizaciones, la solución de hemoglobina tetramérica reticulada se calienta en un ambiente desoxigenado (menos de 0,1 ppm de nivel de oxígeno disuelto) bajo un rango de temperaturas de 50° C a 95° C para duraciones de 0,5 minutos a 10 horas. En algunas realizaciones, la solución de hemoglobina tetramérica reticulada se calienta en un intervalo de temperaturas de 70° C a 95° C y en duraciones de 30 segundos a 3 horas. En algunas realizaciones preferidas, la solución de hemoglobina tetramérica reticulada se calienta a 80° C durante 30 minutos. Y aún en otras realizaciones preferidas, la solución de hemoglobina reticulada se calienta a 90° C durante 30 segundos a 3 minutos y luego se enfría rápidamente hasta aprox. 25° C durante aproximadamente 15 a 30 segundos, y la N-acetil cisteína se agrega opcionalmente como se ha indicado anteriormente.

[0037] Para analizar los resultados de la etapa de tratamiento térmico HTST, se utiliza un método analítico HPLC para detectar la cantidad de dímero después de esta etapa de procesamiento térmico. La fase móvil para el análisis de HPLC contiene cloruro de magnesio (0,75 M) que puede separar el dímero (tetrámero no estabilizado) y la hemoglobina tetramérica reticulada termoestable. Para promover la disociación de la hemoglobina en dímeros, el cloruro de magnesio es aproximadamente 30 veces más eficaz que el cloruro de sodio a la misma fuerza iónica. La etapa de tratamiento térmico también actúa como una etapa de desnaturalización para eliminar de forma efectiva las impurezas de proteínas no deseadas en la hemoglobina tetramérica reticulada (indetectable en la inmunoglobulina G, una disminución del 96,15 % en la albúmina, una disminución del 99,99 % en la anhidrasa carbónica). El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) se realiza para detectar las impurezas de proteínas en la muestra. Por lo tanto, la solución de hemoglobina tetramérica reticulada purificada y termoestable tiene un nivel indetectable de dímero (por debajo del límite de detección: 0,043 %) e inmunoglobulina G, y una cantidad muy baja de albúmina (0,02 µg / ml) y anhidrasa carbónica (0,014 µg / ml). La FIG. 3 muestra que la forma dimérica de la hemoglobina es indetectable en un sistema de HPLC. La Tabla 2 muestra los resultados experimentales con respecto a las impurezas

de proteínas y la eliminación de dímeros mediante la etapa de procesamiento térmico HTST. Esta etapa de procesamiento térmico HTST permite la separación selectiva de tetrámero reticulado termoestable del tetrámero inestable (por ejemplo, tetrámero no reticulado) y dímero.

5

Tabla 2

	Inmunoglobulina-G (µg/ml)	Albúmina (µg/ml)	Anhidrasa carbónica (µg/ml)	Tetrámero (%)	Dímero (%)
Sin tratamiento térmico	0,36	0,57	355,41	90,1	5,4
80° C durante 10min	Indetectable	0,33	0,032	92,7	3,4
80° C durante 15min	Indetectable	0,14	0,022	93,3	2,9
80° C durante 30min	Indetectable	0,03	0,01	96,6	Indetectable
Sin tratamiento térmico	0,29	0,52	261,80	91,8	5,3
90° C durante 1,0 min	Indetectable	0,21	>0,063	93,4	2,0
90° C durante 1,5min	Indetectable	0,04	0,022	94,9	0,6
90° C durante 2,0 mm	Indetectable	0,02	0,016	96,1	96,1

[0038] Tras la etapa de tratamiento térmico para la hemoglobina reticulada bajo una condición desoxigenada, la hemoglobina tetramérica reticulada termoestable está lista para la formulación farmacéutica y el embalaje. La presente invención describe una etapa de envasado hermético de la solución de hemoglobina tetramérica reticulada termoestable en un entorno desoxigenado. La hemoglobina tetramérica reticulada termoestable en la presente invención es estable cuando se mantiene en un estado desoxigenado durante más de dos años.

[0039] En esta invención, la composición farmacéutica que contiene un portador de oxígeno está destinada principalmente a su aplicación mediante inyección intravenosa. Tradicionalmente, los productos anteriores utilizaban bolsas de sangre convencionales de PVC o bolsas de sangre Stericon, que tienen una alta permeabilidad al oxígeno que eventualmente acortará la vida útil del producto, ya que se convierte en metahemoglobina inactiva con gran rapidez (en pocos días) en condiciones de oxigenación.

[0040] El embalaje utilizado en la presente invención resulta en que la hemoglobina tetramérica reticulada termoestable permanezca estable durante más de dos años. Se utiliza un envase multicapa de material EVA/EVOH para minimizar la permeabilidad del gas y evitar la formación de metahemoglobina inactiva. La bolsa de infusión de 100 ml diseñada para ser utilizada con la hemoglobina tetramérica reticulada, purificada y termoestable de la presente invención está formada por cinco capas de material EVA/EVOH laminadas con un grosor de 0,4 mm, con una permeabilidad al oxígeno de 0,006-0,132 cm³ por 100 pulgadas cuadradas durante 24 horas por atmósfera a temperatura ambiente. Este material es un plástico de Clase VI (como se define en USP <88>), que cumple con las pruebas de reactividad biológica y la prueba físico-química *in vivo*, y es adecuado para fabricar una bolsa de infusión con fines de inyección intravenosa. Esta bolsa primaria es particularmente útil para proteger la solución de hemoglobina tetramérica termoestable de la exposición al oxígeno a largo plazo que causa su inestabilidad y que, finalmente, afecta a sus propiedades terapéuticas.

[0041] Para la protección secundaria de productos de la sangre, se conoce el uso de la envoltura de aluminio para proteger contra las potenciales fugas de aire y para mantener el producto en un estado desoxigenado. No obstante, existe la posibilidad de que se produzcan agujeros en la envoltura de aluminio que comprometan su hermeticidad y hagan que el producto sea inestable. Por lo tanto, la presente invención utiliza como envase secundario una bolsa de envoltura de aluminio que evita la oxigenación y también previene la exposición a la luz. La composición de la bolsa de envoltura incluye 0,012 mm de tereftalato de polietileno (PET), 0,007 mm de aluminio (Al), 0,015 mm de nailon (NY) y 0,1 mm de polietileno (PE). La película de envoltura tiene un grosor de 0,14 mm y una tasa de transmisión de oxígeno de 0,006 cm³ por 100 pulgadas cuadradas durante 24 horas por atmósfera a temperatura ambiente. Este envase secundario alarga el tiempo de estabilidad para la hemoglobina, ampliando la vida útil del producto.

[0042] El proceso de esta invención es válido para la producción industrial a gran escala de la hemoglobina tetramérica reticulada termoestable. Además, la hemoglobina tetramérica reticulada termoestable en combinación con

un portador farmacéutico (por ejemplo, agua, tampón fisiológico, en forma de cápsula) es adecuada para su uso en mamíferos.

5 **[0043]** La composición farmacéutica portadora de oxígeno de la presente invención es útil para mejorar la oxigenación del tejido en el tratamiento del cáncer, en el tratamiento de trastornos de privación de oxígeno como el choque hemorrágico y en la preservación del corazón en un entorno con bajo contenido de oxígeno (por ejemplo, trasplante de corazón). En realizaciones a título de ejemplo, se selecciona la dosificación para que tenga un intervalo de concentración de aproximadamente 0,2-1,3 g/kg con una velocidad de infusión de menos de 10 ml/hora/kg de peso corporal.

10 **[0044]** Para el uso en el tratamiento de trastornos de privación de oxígeno y para la preservación del corazón, la composición farmacéutica que contiene un portador de oxígeno con una afinidad por el oxígeno más baja que la presente invención sirve como un sustituto de la sangre para proporcionar oxígeno a un órgano objetivo. La hemoglobina reticulada con afinidad inferior al oxígeno es útil para aplicaciones que requieren oxigenación tisular rápida (por ejemplo, un choque hemorrágico y la preservación *ex vivo* de órganos).

20 **[0045]** Para aplicaciones en el tratamiento del cáncer, la composición farmacéutica que incluye un portador de oxígeno con una mayor afinidad por el oxígeno de que la presente invención sirve como agente de oxigenación de tejidos para mejorar la oxigenación en los tejidos tumorales, mejorando así la sensibilidad frente a la quimioterapia y la radiación. Una hemoglobina con mayor afinidad por el oxígeno es útil para aplicaciones que requieren una tasa de oxigenación más lenta (por ejemplo, terapia complementaria contra el cáncer).

EJEMPLOS

25 **[0046]** Los siguientes ejemplos se proporcionan con el objetivo de describir realizaciones específicas de esta invención sin intención de limitar el alcance de esta invención en modo alguno.

Ejemplo 1

30 Descripción del proceso

[0047] Se muestra un diagrama de flujo esquemático del proceso de la presente invención en la FIG. 1. Se recoge sangre completa de bovino en un recipiente/bolsa estéril cerrado que contiene una solución de citrato trisódico al 3,8 % (p/v) como anticoagulante. La sangre se mezcla inmediatamente con solución de citrato trisódico para inhibir la coagulación de la sangre. Los glóbulos rojos (RBC) se aíslan y se separan del plasma y otras células sanguíneas más pequeñas mediante un mecanismo de aféresis. Se utiliza una "lavadora de células" para este procedimiento con un recipiente centrífugo desechable esterilizado con rayos gamma. Los glóbulos rojos se lavan con un volumen igual de 0,9 % (p/v cloruro de sodio) de solución salina.

40 **[0048]** Los glóbulos rojos lavados se lisan para liberar el contenido de hemoglobina manipulando el choque hipotónico a la membrana de células RBC. Se utiliza para ello un aparato especializado de citólisis instantánea para el dispositivo de lisis de RBC representado en la FIG. 2. Después de la lisis de RBC, las moléculas de hemoglobina se aíslan de otras proteínas mediante ultrafiltración de flujo tangencial usando una membrana de 100 kDa. La hemoglobina en el filtrado se recoge mediante cromatografía en columna de flujo y se concentra aún más a 12-14 g / dL mediante una membrana de 30 kDa. Se lleva a cabo una cromatografía en columna para eliminar las impurezas de proteínas.

50 **[0049]** La solución de hemoglobina concentrada se hace reaccionar primero con DBSF para formar moléculas de hemoglobina tetramérica reticulada termoestable. A continuación, se lleva a cabo una etapa de tratamiento térmico en condiciones desoxigenadas a 90° C durante 30 segundos a tres minutos antes de la formulación final y el envasado.

Ejemplo 2

Lisis hipotónica controlada temporizada y filtración

55 **[0050]** La sangre entera bovina se recoge y transporta bajo una condición de frío (2 a 10 ° C). Los glóbulos rojos se separan del plasma mediante una arandela de celda y posteriormente con una filtración de 0,65 µm. Después de lavar el filtrado de glóbulos rojos (RBC) con solución salina al 0,9 %, el filtrado se rompe mediante lisis hipotónica. La lisis hipotónica se realiza usando el aparato de citólisis instantánea representado en la FIG. 2. El presente aparato

de citólisis incluye un mezclador estático para ayudar en la lisis celular. Se mezcla una suspensión de RBC con concentración controlada de hemoglobina (12-14 g / dL) con 4 volúmenes de agua purificada para generar un choque hipotónico a las membranas de las células RBC. El período de choque hipotónico se controla para evitar la lisis no deseada de glóbulos blancos y plaquetas. La solución hipotónica pasa a través de la porción del mezclador estático del aparato de citólisis instantánea durante 2 a 30 segundos o, durante un tiempo suficiente para lisar los glóbulos rojos y preferiblemente, 30 segundos. El choque finaliza después de 30 segundos mezclando el lisado con 1/10 de volumen de tampón hipertónico a medida que sale del mezclador estático. La solución hipertónica utilizada es tampón de fosfato 0,1 M, NaCl al 7,4 %, pH 7,4. El aparato de citólisis instantánea de la FIG. 2 puede procesar a 50 a 1000 litros de lisado por hora y, preferiblemente, al menos 300 litros por hora de forma continuada.

10

[0051] Después de la lisis de RBC, el lisado de las células rojas de la sangre se filtra mediante un filtro de 0,22 µm para obtener una solución de hemoglobina. Los ácidos nucleicos de los glóbulos blancos y las impurezas de fosfolípidos no se detectan en la solución de hemoglobina por reacción en cadena de la polimerasa (límite de detección = 64 pg) y método de HPLC (límite de detección = 1 µg / ml) respectivamente. Se lleva a cabo una primera ultrafiltración de 100 kDa para eliminar las impurezas que tienen un peso molecular mayor que la hemoglobina. A continuación se realiza una cromatografía en columna de flujo continuado para purificar adicionalmente la solución de hemoglobina. Luego se realiza una segunda ultrafiltración de 30 kDa para eliminar las impurezas que tienen un peso molecular menor que la hemoglobina y para obtener una concentración.

15

20 **Ejemplo 3**

Estudio de eliminación viral en solución de hemoglobina sin estroma

[0052] Con el fin de demostrar la seguridad del producto de esta invención, las capacidades de eliminación de virus de (1) fase de diafiltración de 0,65 µm y (2) fase de ultrafiltración de 100 kDa se demuestran por estudio de validación de virus. Esto se realiza mediante el aumento deliberado de una versión reducida de estos dos procesos con diferentes virus modelo (virus de encefalomiocarditis, virus de la pseudorrabia, virus de la diarrea viral bovina y parvovirus bovino). En este estudio se utilizan cuatro tipos de virus (véase la Tabla 3). Estos virus varían en sus características biofísicas y estructurales y muestran una variación en su resistencia a agentes o tratamientos físicos y químicos.

30

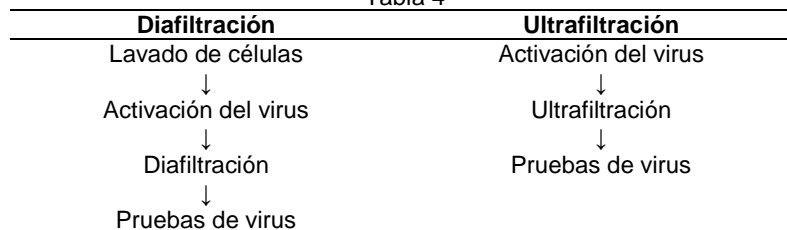
Tabla 3

Virus	Virus modelo	Taxonomía	Genoma	Estructura	Tamaño [nm]	Estabilidad*
Hepatitis C virus	Virus de la diarrea viral bovina (BVDV)	Flaviviridae	ssRNA	envuelto	40-60	bajo
--	Virus de la encefalomiocarditis (EMCV)	Picornavirus	ssRNA	sin envoltura	25-30	medio
Parvovirus	Parvovirus bovino (BPV)	Parvoviridae	ADNss	sin envoltura	18-26	muy alto
Hepatitis B virus	Virus de la pseudorrabia (PRV)	Herpesviridae	dsDNA	envuelto	120-200	Bajo a medio

El esquema de validación se muestra resumido en la Tabla 4 a continuación.

35

Tabla 4



[0053] El resumen de los resultados de reducción de registro de los 4 virus en (1) diafiltración de 0,65 µm y (2) ultrafiltración de 100 kDa se muestran en la Tabla 5 a continuación. Los cuatro virus, BVDV, BPV, EMCV y PRV, se eliminan de manera efectiva mediante diafiltración de 0,65 µm y ultrafiltración de 100 kDa.

5

Tabla 5

Virus	BVDV		BPV		EMCV		PRV	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Diafiltración de 0,65 µm	2.69	3.20	3.73	3.53	3.25	>3,90	2.67	2.63
Ultrafiltración de 100 kDa	≤ 4,68	≤ 4,38	5.87	5.92	3.60	3.43	≥ 6,05	3.27
Máximo acumulativo	≥ 7,88		9.65		≥ 7,50		≥ 8,72	
Mínimo acumulativo	≥ 7,07		9.40		6.68		5.90	
Anotación: ≥ no se determinó infectividad residual								

Ejemplo 4

Cromatografía de columna de flujo continuo

10

[0054] Se utiliza una columna de CM (disponible a la venta en GE Healthcare) para eliminar adicionalmente las impurezas de proteínas. El tampón de partida es acetato de sodio 20 mM (pH 8,0) y el tampón de elución es acetato de sodio 20 mM, NaCl 2M (pH 8,0). Después del equilibrado de la columna CM con el tampón de partida, la muestra de proteína se carga en la columna. Las impurezas de proteínas no unidas se lavan con al menos 5 volúmenes de columna de tampón de partida. La elución se realiza usando un 25 % de tampón de elución (0-0,5M NaCl) en 8 volúmenes de columna. El perfil de elución se muestra en la FIG. 4; la solución de hemoglobina está en la fracción de flujo continuado. La pureza de la fracción de flujo se analiza mediante ELISA. Se muestran los resultados en la Tabla 6.

20

Tabla 6

	Impurezas de proteínas		
	Inmunoglobina-G	Anhídrido carbónico	Albúmina
Antes de la columna de CM	1320 ng/ml	860,3 mg/ml	435,2 ng/ml
Flujo continuado (que contiene hemoglobina)	44,3 ng/ml	81,2 mg/ml	20,4 ng/ml

[0055] Como la solución de hemoglobina está en el flujo a través de la cromatografía en columna de CM a pH 8 (no en el eluato), es un buen enfoque para la operación continua a escala industrial. La primera configuración de ultrafiltración se conecta directamente al sistema de cromatografía de columna CM, y la tubería de flujo se puede conectar a la segunda configuración de ultrafiltración en caso de una operación a escala industrial. La configuración esquemática del proceso industrial se muestra en la FIG. 5.

Ejemplo 5

30 Preparación de hemoglobina tetramérica reticulada termoestable

(5a) Reacción de reticulación con DBSF en una condición desoxigenada

[0056] La reacción de reticulación se lleva a cabo en una condición desoxigenada, es decir, inferior a 0,1 ppm de nivel de oxígeno disuelto. se agrega DBSF a la solución de hemoglobina para formar hemoglobina tetramérica reticulada sin formación de hemoglobina polimérica. El procedimiento de estabilización de DBSF estabiliza la forma tetramérica de la hemoglobina (65 kDa) y previene la disociación en dímeros (32 kDa) que se excretan a través de los riñones. En esta realización, se utiliza una relación molar de hemoglobina a DBSF de 1:2,5 se usa y el pH es 8,6. Este proceso se lleva a cabo durante un periodo de 3-16 horas a temperatura ambiente (15-25° C) en una atmósfera inerte

35

de nitrógeno para prevenir la oxidación de la hemoglobina para formar una hemoglobina férrica que es fisiológicamente inactiva (el nivel de oxígeno disuelto se mantiene en menos de 0,1 ppm). La integridad de la reacción de DBSF se controla midiendo el DBSF residual usando HPLC. El rendimiento de la reacción de DBSF es alto, > 99 %. La producción de enlaces cruzados beta-beta es del orden de al menos aproximadamente el 40 %.

5

(5b) Tratamiento térmico HTST

[0057] Se utiliza el aparato de procesamiento a temperatura alta y corto tiempo (HTST) que se muestra en la FIG 6. Se lleva a cabo una etapa de procesamiento térmico usando el aparato de procesamiento HTST sobre la hemoglobina tetramérica reticulada. En este ejemplo, la condición para el tratamiento térmico es de 90° C durante 30 segundos a 3 minutos, y preferiblemente de 45 a 60 segundos, aunque pueden seleccionarse otras condiciones, como se ha mencionado anteriormente, modificando el aparato en consecuencia. Se bombea una solución que contiene hemoglobina reticulada opcionalmente con 0,2 % de N-acetilcisteína añadida a la misma a un aparato de procesamiento HTST (la primera sección del intercambiador de calor HTST se precalienta y mantiene a 90° C a un caudal de 1,0 litro por minuto, el tiempo de permanencia en la primera sección del aparato es de entre 45 a 60 segundos, luego la solución pasa a la misma velocidad a otra sección del intercambiador de calor que se mantiene a 25° C. El tiempo requerido para la refrigeración es entre 15 y 30 segundos. Después de enfriar a 25 ° C, se agrega N-acetil cisteína inmediatamente a una concentración de 0,2 % a 0,4 %. La configuración del aparato de procesamiento de calor se controla fácilmente para su funcionamiento industrial. Se muestra un perfil de temperatura con contenido de dímero en la FIG. 7. Si la hemoglobina no está reticulada, no es termoestable y forma un precipitado después de la etapa de procesamiento térmico. El precipitado se elimina a continuación mediante una centrifugación o una filtración para formar una solución transparente a partir de entonces.

[0058] La Tabla 7 a continuación muestra que las impurezas de proteínas tales como inmunoglobulina G, albúmina, anhidrasa carbónica y los tetrámeros o dímeros no estabilizados indeseables se eliminan después de la etapa de procesamiento térmico. La cantidad de inmunoglobulina G, albúmina y anhidrasa carbónica se mide utilizando un método de ELISA, mientras que la cantidad de dímero se determina mediante un método de HPLC. La pureza de la hemoglobina tetramérica reticulada termoestable es extremadamente alta después de la etapa de procesamiento térmico HTST, en el intervalo del 98,0 al 100 %.

30

Tabla 7

Condición de muestra	Impurezas de proteínas (mediante ELISA)			Mediante HPLC	
	Inmunoglobulina-G (µg/ml)	Albúmina (µg/ml)	Anhidrasa carbónica (µg/ml)	Tetrámero (%)	Dímero (%)
Sin tratamiento térmico	0,29	0,52	261,80	91,8	5,3
90° C durante 2min	Indetectable	0,02	0,016	96,1	Indetectable
Eliminación (%)	100,0	96,15	99,99	-----	100,0

(5c) Prevención de la formación de metahemoglobina mediante la adición de 0,025-0,2 % de NAC

[0059] Tras el tratamiento térmico y el enfriamiento, se añade inmediatamente N-acetil cisteína (NAC) en la hemoglobina tetramérica reticulada a una concentración de aproximadamente 0,025-0,2 % para evitar la formación de metahemoglobina. En diferentes intervalos de tiempo, el porcentaje de metahemoglobina se mide mediante el método de cooximetría. La Tabla 8 muestra el % de metahemoglobina en la hemoglobina tetramérica reticulada después de la adición de NAC durante 5 meses. Como se muestra en la Tabla 8, el nivel de metahemoglobina en la hemoglobina tetramérica reticulada tratada térmicamente se mantiene estable y es muy bajo después de la adición de NAC, en un intervalo de 1,8-5,1 %.

Tabla 8

Nivel total de NAC	Metahemoglobina % en hemoglobina tetramérica reticulada tratada térmicamente después de la adición de NAC			
	1 semana	1 mes	3meses	5meses
0,2 % NAC	3,8	2,5	3,5	4,3

0,1% NAC	5,1	4,3	2,9	3,8
0,05 % NAC	3,7	3,3	2,3	4,0
0,025 % NAC	3,6	2,5	1,8	2,7

Ejemplo 6

Embalaje

5

[0060] Debido a que el producto de la presente invención es estable en condiciones de desoxigenación, el envase para el producto es importante para minimizar la permeabilidad del gas. Para aplicación intravenosa, se fabrica una bolsa de infusión de 100 ml diseñada a medida formada por un material laminado de cinco capas de EVA / EVOH con un grosor de 0,4 mm que tiene una permeabilidad al oxígeno de 0,006 a 0,132 cm³ por 100 pulgadas cuadradas durante 24 horas por atmósfera a temperatura ambiente. Este material específico es un plástico de Clase VI (como se define en USP <88>), que cumple con las pruebas de reactividad biológica *in vivo* y la prueba de evaluación fisicoquímica y es adecuado para la fabricación de envases con fines de inyección intravenosa (tenga en cuenta que es posible fabricar otro tipo de envase con este material, dependiendo de la aplicación deseada). También se aplica una bolsa de envoltura de aluminio de embalaje secundario a la bolsa de infusión de embalaje primario que proporciona una barrera adicional, minimizando la exposición a la luz y la difusión del oxígeno. Las capas de la bolsa comprenden: 0,012 mm de tereftalato de polietileno (PET), 0,007 mm de aluminio (Al), 0,015 mm de nylon (NY) y 0,1 mm de polietileno (PE). La película de envoltura tiene un grosor de 0,14 mm y una velocidad de transmisión de oxígeno de 0,006 cm³ por 100 pulgadas cuadradas durante 24 horas por atmósfera a temperatura ambiente. Una representación esquemática de la bolsa de infusión se representa en la FIG. 8. La permeabilidad global de oxígeno para cada bolsa de infusión según la presente invención es 0,0025 cm³ durante 24 horas, por atmósfera a temperatura ambiente.

Ejemplo 7

Caracterización de la Hb bovina reticulada (condición de reticulación desoxigenada)

25

(7a) Separación de las cadenas de globina mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (HPLC)

[0061] Las cadenas de globina de la hemoglobina bovina nativa y las cadenas de globina reticulada de hemoglobina bovina reticulada mediante DBSF se separan en una columna VYDAC C4 usando los gradientes desarrollados por Shelton et al., 1984 con modificaciones menores.

30

(7b) Análisis de dodecil sulfato de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) mediante DBSF de la hemoglobina bovina reticulada

[0062] La hemoglobina bovina nativa y la solución de hemoglobina bovina reticulada mediante DBSH se preparan mezclando con tampón de muestra reductor (Tris-HCl 62 mM (pH 6,8), glicerol al 10 % (v/v), mercaptoetanol al 5 % (v/v) y SDS al 2,3 % (p/v), y calentando a 95° C durante 10 minutos. La mezcla de muestra se separa usando un gel de placa de acrilamida al 15 % con un gel de apilamiento al 4 %. La electroforesis se ejecuta con una corriente constante de 60 mA. Después de la electroforesis, el gel de SDS-PAGE se tiñe con 0,1 % (p/v) de Coomassie Blue R350, 20 % (v/v) de metanol y 10 % (v/v) de ácido acético. Para estimar el porcentaje de diferentes tipos de reticulación en hemoglobina bovina reticulada mediante DBSF, las intensidades de las bandas de proteína resueltas expresadas en Black Light Unit (BLU) se cuantifican utilizando el software Lumi-Analyst 3.1.

40

(7c) Digestión con tripsina de cadena reducida de globina

45

[0063] La banda de proteína correspondiente a la principal cadena de globina reticulada se escinde del gel SDS-PAGE, se corta en cubos (1 X 1 mm), y se tiñe con 10 % de metanol/10 % de ácido acético. Los cubos de gel sin teñir se reducen con DTT 10 mM en 25 mM NH₄CO₃ y se alquilan con 55 mM idoacetamide en 25 mM NH₄CO₃ durante 45 min en la oscuridad, y luego en-gel digerido con 20 ng/μl de tripsina modificada en 25 mM NH₄C₃ a 37° C durante la noche. Después de la digestión con tripsina, los péptidos digeridos con tripsina se extraen por difusión en 50 % (v/v) de acetonitrilo (ACN) y 1 % (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA).

50

(7d) Análisis de espectrometría de masas (MS) de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF)

- [0064]** Los péptidos de tripsina digeridos extraídos de la banda de proteína se colocan sobre una placa AnchorChip, en la que había 1 µl de solución de matriz (2 mg ml/ácido ciano-4-hidroxicinámico, saturado en 50 % de ACN/0,1 % TFA, y se deja secar al aire. Después del secado, la mancha de muestra se lava con tampón de monofosfato de 10 mM y se recristaliza usando una solución de etanol: acetona: 0,1 % TFA (relación 6:3:1). El análisis
- 5 MALDI-TOF MS se realiza con un Bruker Autoflex III (Bruker Daltonic GmbH, Bremen, Alemania) operado en modo reflectron en el rango m/z de 800-3500 Da y los parámetros se establecen de la siguiente manera: fuente de iones 25 kV para huella digital de masa peptídica (PMF) y reflector 26,3 kV para PMF. La calibración externa se realiza utilizando un estándar de calibración de mezcla de péptidos de Bruker. Los picos con una relación S/N superior a 4 se etiquetan automáticamente mediante el Flex-Analysis (Bruker Daltonic GmbH, Bremen, Alemania). Los datos de MS se analizan
- 10 con mayor detalle mediante MASCOT 2.2.04 y el software Biotoools 2.1 (Bruker Daltonic GmbH, Bremen, Alemania), y se buscaron estos datos frente a las proteínas de mamíferos en la base de datos NCBI no redundante (NCBI nr). Se utilizan los siguientes parámetros para las búsquedas en la base de datos: exactitud de masa monoisotópica < 250 ppm, carga parental +1, rupturas fallidas 1, carbamidometilación de cisteína como modificación fija, oxidación de metionina como modificación variable.
- 15 (7e) Cromatografía líquida - ionización por electrospray (LC-ESI) análisis de espectrometría de masas en tándem (MS / MS)
- [0065]** El análisis de Nano-LC MS/MS de los péptidos digeridos con tripsina de la banda de proteína se realiza usando una HPLC capilar acoplada directamente al espectrómetro de masas HCT Ultra ESI-trampa de iones (Bruker Daltonic GmbH, Bremen, Alemania). Las digestiones de péptidos se disuelven en ácido fórmico al 0,1 %/ACN al 2 % antes de la inyección en columna. Se utiliza un gradiente de 4-90 % (0,001 % ácido fórmico y 0,001 % de ácido fórmico en 80 % de ACN) para la separación de péptidos usando una columna C18 (15 cm X 75 nm, LC PACKINGS). El caudal es de 250 ng / min a 25° C. Los eluidos de una columna C18 se introducen en el espectrómetro de masas trampa HCT
- 25 Ultra ESI, operado en modo lineal para el análisis en línea. El espectrómetro de masas de trampa de iones se optimiza con el nanoseguro con un voltaje de pulverización de 137 V y una temperatura capilar calentada de 160° C. El tiempo de acumulación para los iones peptídicos en la trampa iónica se establece en 200 ms, y la relación de masa a carga seleccionada para el análisis de MS/MS es de 100 a 1800 Da con un estado de carga 1-3.
- 30 **[0066]** Se utiliza una HPLC de fase inversa en una columna VYDAC C4, controlada a una longitud de onda de 220 nm para separar los diferentes tipos de reticulación que se producen entre las cadenas α y β en la hemoglobina bovina reticulada mediante DBSF. Los patrones cromatográficos obtenidos usando hemoglobina bovina antes y después de la reticulación con DBSF se muestran en la FIG. 9. En la FIG. 9, las cadenas α son más móviles que las cadenas β de la hemoglobina bovina nativa (como indica la línea de puntos). Sus identidades se confirman mediante
- 35 el análisis MALDI-TOF. Después de la reacción con DBSF, las cadenas β están reticuladas mientras que una gran mayoría de cadenas α quedan solas (como se muestra con la línea continua). Como consecuencia de la reticulación con DBSF, se forman 6 picos de globina principales con mayor hidrofobicidad que las cadenas β nativas. Las cadenas de globina reticulada en la hemoglobina bovina reticulada con DBSF también se resuelven mediante SDS-PAGE al 15 %, como se muestra en la FIG. 10. La principal cadena de globina reticulada (B6 en la FIG. 10) se somete a digestión
- 40 con tripsina y a un posterior análisis MALDI-TOF, y se identifica como cadena de beta-globina solamente, en base a su huella digital de masa de péptido, como se muestra en la FIG. 11.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la preparación de una composición farmacéutica que contiene un portador de oxígeno altamente purificado y termoestable, el portador de oxígeno es hemoglobina bovina tetramérica reticulada no polimérica que tiene una reticulación beta-beta superior al 40 %, comprendiendo el método:
- a) obtención de sangre completa de bovino que incluya al menos glóbulos rojos y plasma;
 - b) separación de los glóbulos rojos del plasma en la sangre completa de bovino;
 - c) filtración de los glóbulos rojos que se separaron del plasma para obtener una fracción de glóbulos rojos filtrada;
 - 10 d) lavado de la fracción de glóbulos rojos filtrada para eliminar las impurezas de las proteínas plasmáticas, dando como resultado glóbulos rojos lavados;
 - e) alteración de los glóbulos rojos lavados para crear una solución que comprenda un lisado de glóbulos rojos alterados;
 - f) realización de una filtración para eliminar al menos una porción de los desechos que hayan permanecido tras el
15 lisado;
 - g) extracción de una primera solución de hemoglobina del lisado;
 - h) realización de al menos un proceso de purificación para eliminar uno o más de los virus, desechos retenidos o impurezas de proteínas;
 - i) reticulación de la primera solución de hemoglobina mediante fumarato de bis-3,5-dibromosalicyl para formar
20 hemoglobina reticulada en un ambiente oxigenado de aproximadamente pO_2 149mmHg o 760mmHg;
 - j) eliminación de cualquier producto químico residual;
 - k) tratamiento térmico de la hemoglobina reticulada en un ambiente desoxigenado;
 - l) eliminación del precipitado mediante centrifugación o filtración para formar una solución transparente; y
 - m) adición de la hemoglobina tetramérica reticulada purificada y termoestable a un portador farmacéuticamente
25 aceptable.
2. El método para la preparación de una composición farmacéutica que contiene un portador de oxígeno altamente purificado y termoestable de acuerdo con la reivindicación 1, donde el paso de procesamiento térmico es un proceso de alta temperatura a corto plazo (HTST) realizado a aproximadamente 70° C a 95° C durante un período
30 de 30 segundos a 3 horas seguido inmediatamente del enfriamiento y la adición de N-acetil cisteína en una cantidad de 0,2 a 0,4 % inmediatamente después del enfriamiento.
3. El método para la preparación de una composición farmacéutica que contiene un portador de oxígeno altamente purificado y termoestable de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual la reticulación beta-beta es superior
35 al 50 % y el valor de $p50$ es inferior a aproximadamente 23 mm Hg.
4. El método para la preparación de una composición farmacéutica que contiene un portador de oxígeno altamente purificado y termoestable según la reivindicación 1, en donde la reticulación beta-beta es superior al 60 %
40 y el valor $p50$ es inferior a aproximadamente 23 mm Hg.
5. El método para la preparación de una composición farmacéutica que contiene portador de oxígeno altamente purificado y termoestable según la reivindicación 1, en el cual la purificación se realiza mediante cromatografía, incluyendo la cromatografía el uso de una o más columnas de intercambio catiónico o columnas de intercambio aniónico.
45
6. El método para la preparación de una composición farmacéutica que contiene un portador de oxígeno altamente purificado y termoestable según la reivindicación 5, en el que la columna de cromatografía es una o más columnas de DEAE, CM y/o hidroxipatita.
- 50 7. Un método para la preparación de una composición farmacéutica que contiene un portador de oxígeno altamente purificado y termoestable según la reivindicación 1 que comprende adicionalmente el envasado de la solución de hemoglobina en un paquete de baja permeabilidad al oxígeno de manera que la solución de hemoglobina tenga una vida útil del orden de dos años.
- 55 8. El método para la preparación de una composición farmacéutica que contiene un portador de oxígeno altamente purificado y termoestable según la reivindicación 1, en el que la etapa de tratamiento térmico es seguida de inmediato por un proceso de enfriamiento y adición de N-acetil cisteína en una cantidad de 0,025 % a 0, 4% inmediatamente tras el enfriado.

9. El método para la preparación de una composición farmacéutica que contiene un portador de oxígeno altamente purificado y termoestable según la reivindicación 1 donde la etapa de procesamiento térmico es un proceso de alta temperatura a corto plazo (HTST) realizado a aproximadamente 70° C a 95° C durante un período de 30 segundos a 3 horas seguido inmediatamente de un proceso de enfriamiento y adición de N-acetil cisteína en una cantidad de 0,025 % a 0,2 % inmediatamente después del enfriamiento.

10. El método para la preparación de una composición farmacéutica que contiene un portador de oxígeno altamente purificado y termoestable según la reivindicación 8, en la que la etapa de tratamiento térmico es un proceso de alta temperatura a corto plazo (HTST) llevado a cabo a aproximadamente 70° C a 95° C durante un período de 30 segundos a 3 horas.

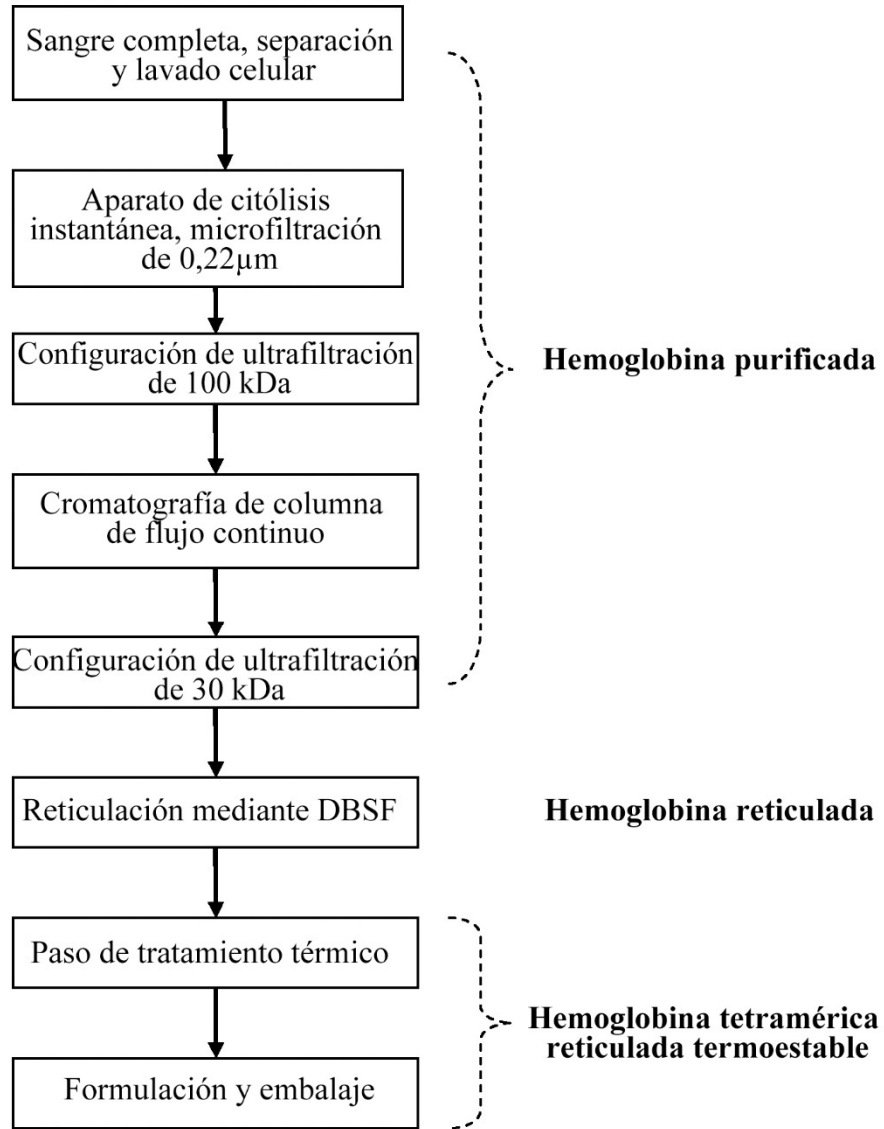


FIG. 1

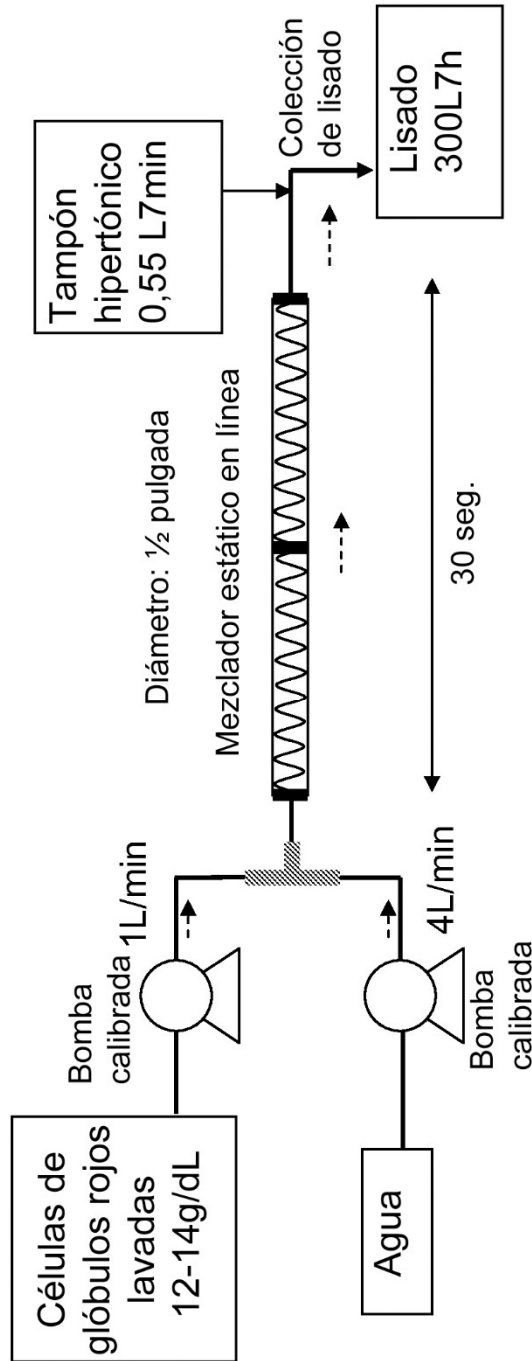
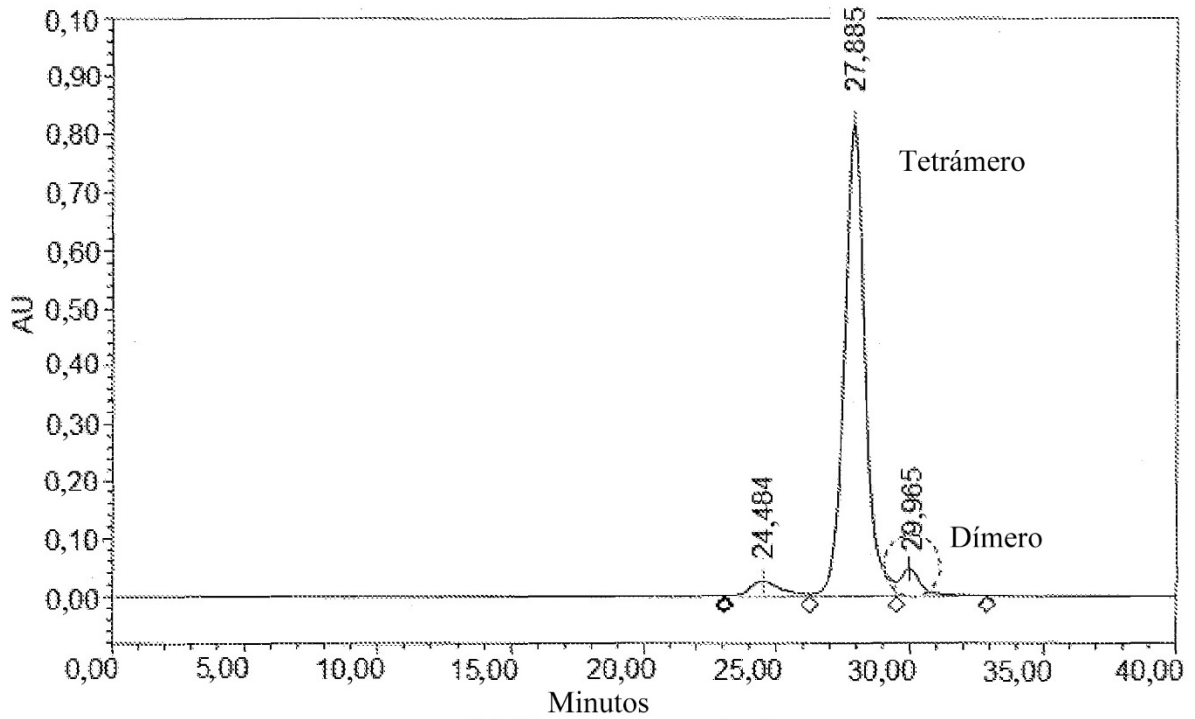
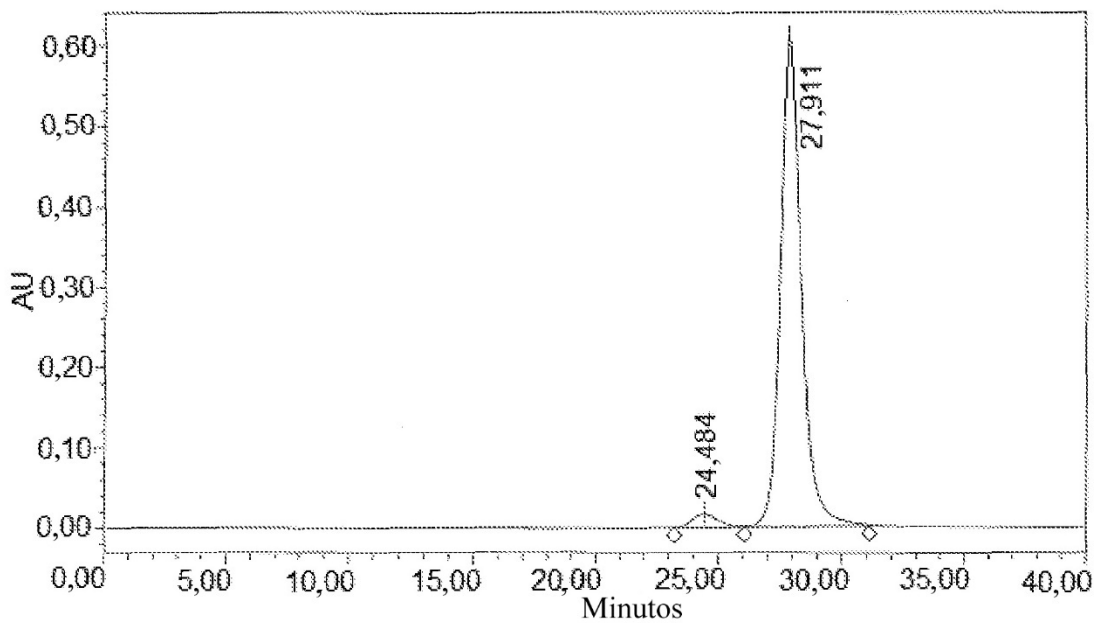


FIG. 2



(a) Sin tratamiento térmico



(b) con tratamiento térmico (90° durante 45 seg. – 20 min u 80° durante 30 min), hemoglobina tetramérica reticulada estabilizada

FIG. 3

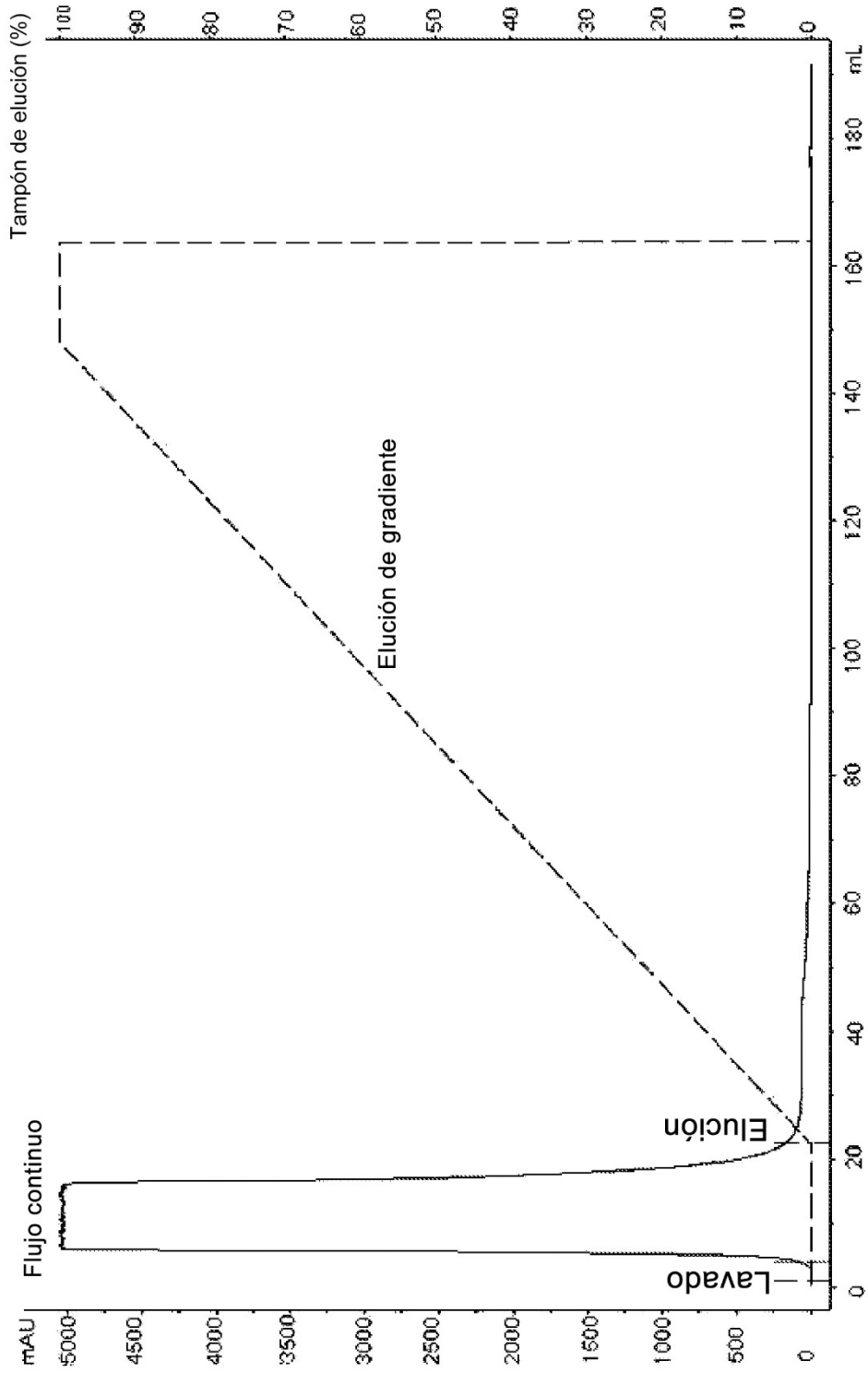


FIG. 4

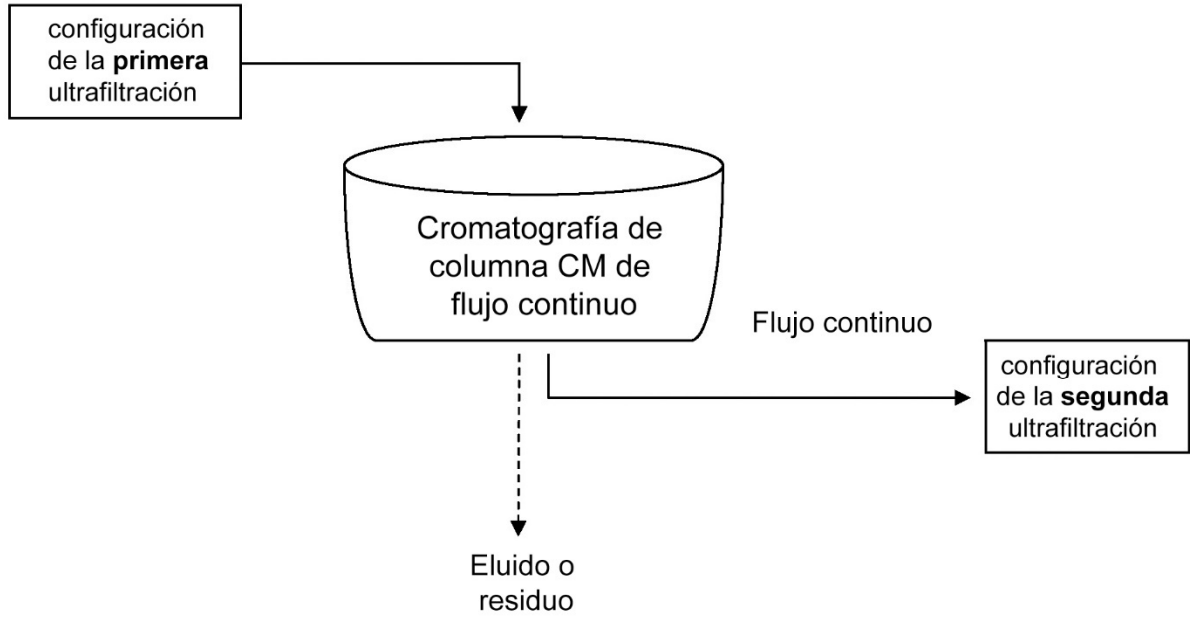


FIG. 5

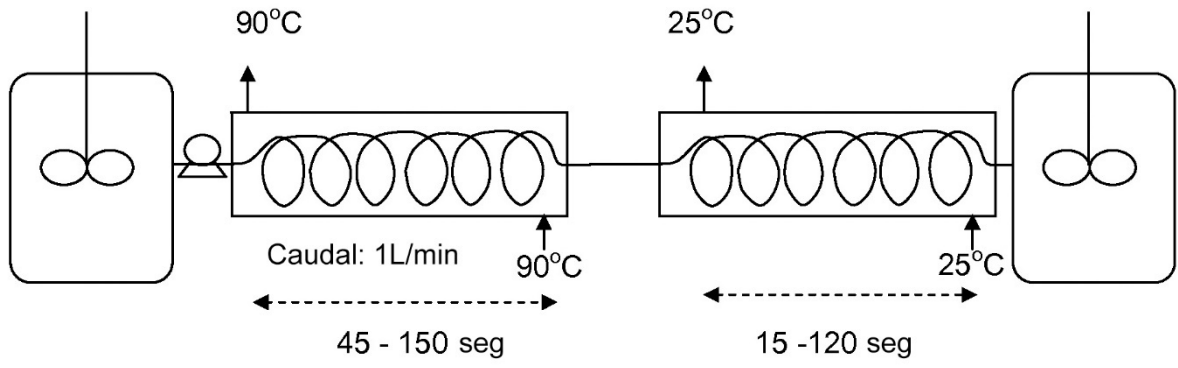
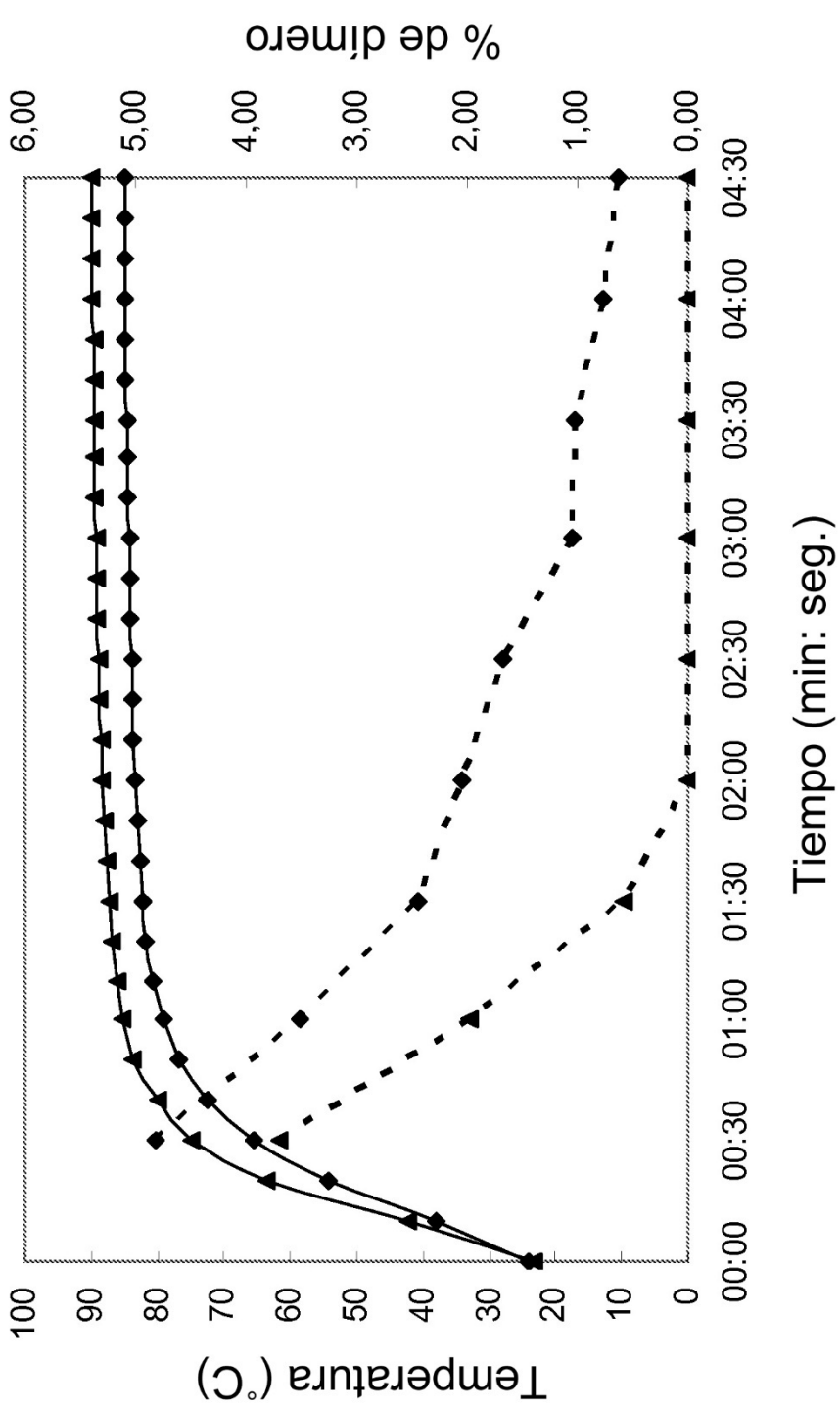


FIG. 6



Temp - 85°C Temp - 90°C Dímero % - 85°C Dímero % - 90°C

FIG. 7

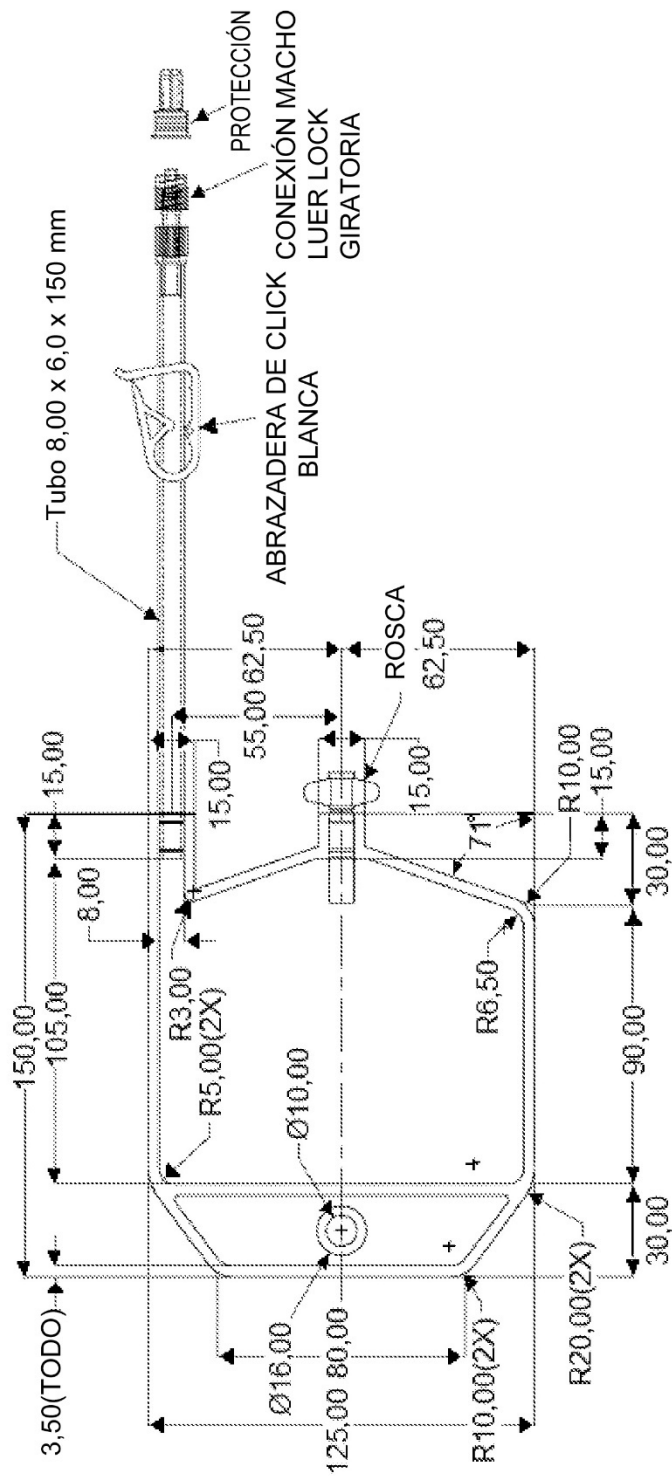
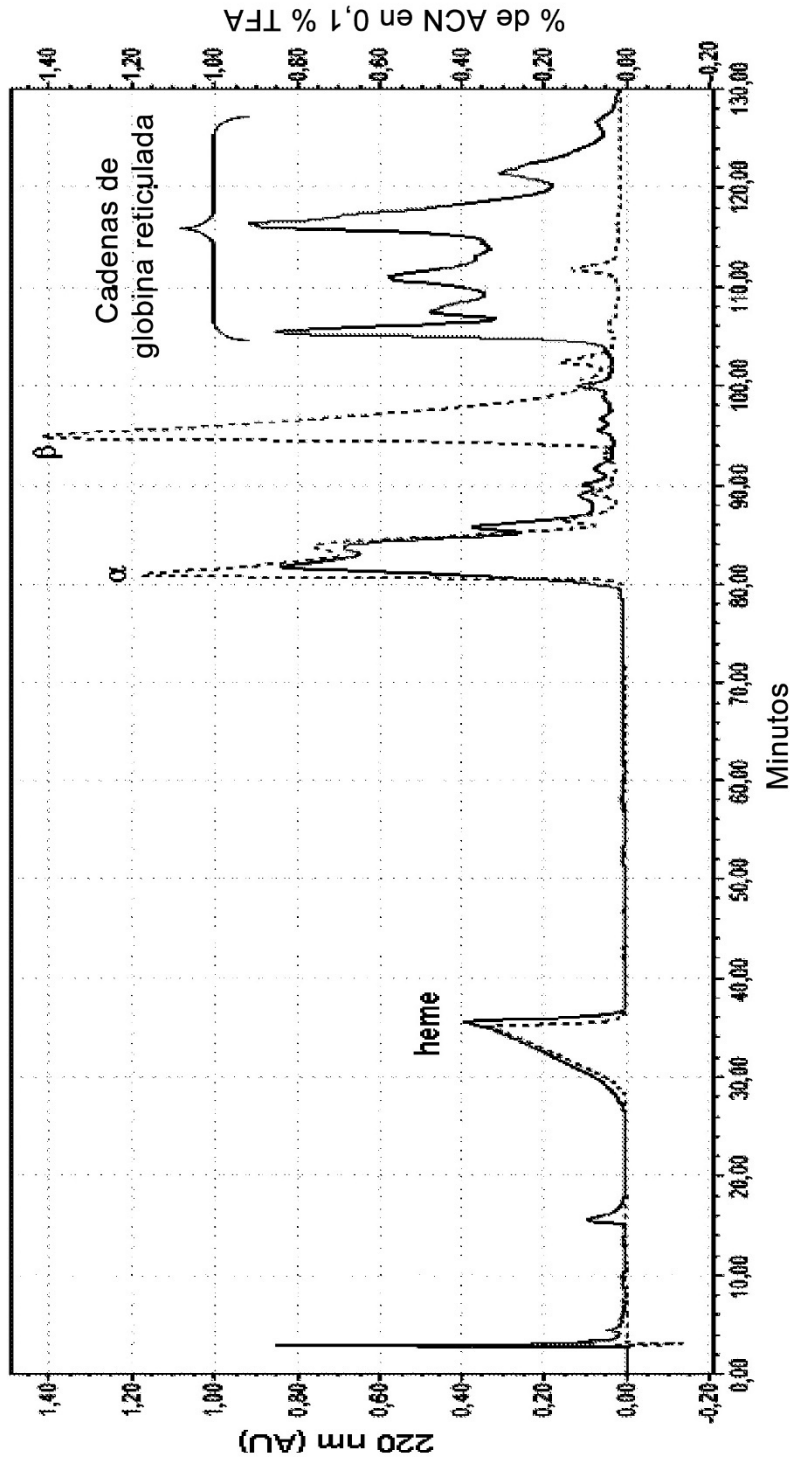
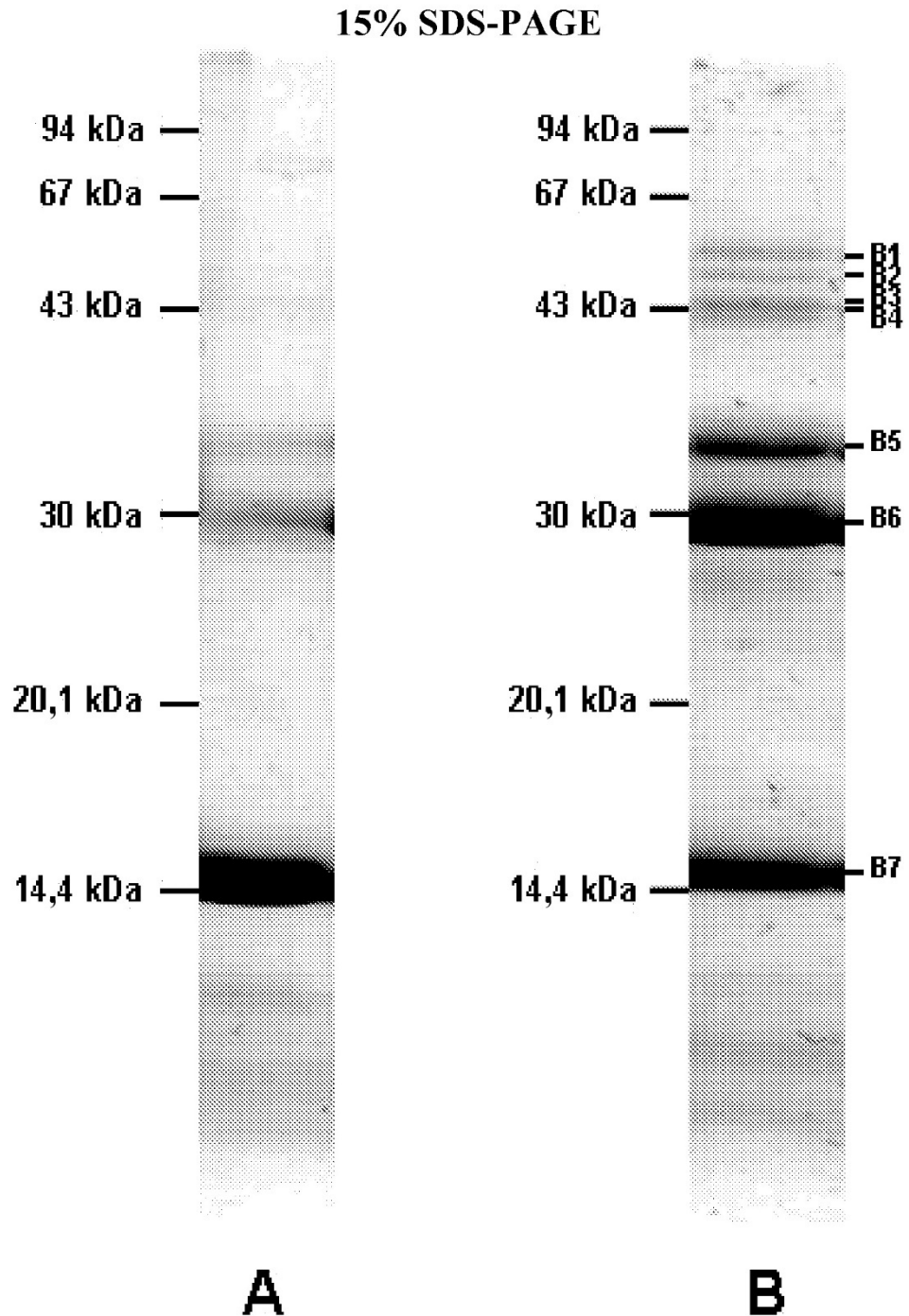


FIG. 8



- - - Hemoglobina bovina nativa
- Hemoglobina bovina reticulada mediante DBSF

FIG. 9



A) Hemoglobina bovina nativa
B) Hemoglobina reticulada con DBSF bajo una condición desoxigenada

FIG.10

