

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 674**

51 Int. Cl.:

C07K 1/34 (2006.01)

C07K 1/14 (2006.01)

C07K 14/805 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.04.2012 PCT/US2012/034608**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2012 WO12148832**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2012 E 12776139 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2702067**

54 Título: **Procedimiento para retirar hemoglobina no modificada de soluciones de hemoglobina reticulada que incluyen hemoglobina polimérica con aparato de tratamiento térmico de corta duración a altas temperaturas**

30 Prioridad:

29.04.2011 US 201113097183

25.08.2011 US 201113217337

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

21.05.2018

73 Titular/es:

BILLION KING INTERNATIONAL LIMITED

(100.0%)

18/F Chevalier Commercial Centre, 8 Wang Hoi

Road, Kowloon Bay

Hong Kong, HK

72 Inventor/es:

WONG, BING LOU y

KWOK, SUI YI

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 668 674 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

Procedimiento para retirar hemoglobina no modificada de soluciones de hemoglobina reticulada que incluyen hemoglobina polimérica con aparato de tratamiento térmico de corta duración a altas temperaturas

5

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La invención se refiere al campo de los portadores de oxígeno a base de hemoglobina y, más particularmente, a técnicas de tratamiento térmico para purificar los portadores de oxígeno a base de hemoglobina que incluyen hemoglobina polimérica.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Existe una necesidad de un sustituto de sangre para tratar o impedir la hipoxia que resulta de la pérdida de sangre (por ejemplo, de la hemorragia aguda o durante las operaciones quirúrgicas), que resulta de la anemia (por ejemplo, la anemia perniciosa o la anemia de células falciformes) o que resulta de un choque (por ejemplo, un choque por deficiencia de volumen, un choque anafiláctico, un choque séptico o un choque alérgico).

15

[0003] El uso de sangre y fracciones de sangre en calidad de sustituto de sangre está lleno de desventajas. Por ejemplo, el uso de sangre completa a menudo está acompañado por el riesgo de transmisión de virus que causan hepatitis y de virus que causan SIDA que puede complicar la recuperación del paciente o dar como resultado muertes de pacientes. Adicionalmente, el uso de sangre completa requiere la determinación de los grupos sanguíneos y la prueba de compatibilidad cruzada para evitar problemas inmunohematológicos y la incompatibilidad entre donantes.

20

[0004] La hemoglobina, como sustituto de sangre, posee actividad osmótica y la capacidad de transportar y transferir oxígeno. Sin embargo, la hemoglobina acuosa existe en equilibrio entre las formas tetramérica (65 KDa) y dimérica (32 KDa). Los dímeros de hemoglobina son excretados por el riñón y dan como resultado una rápida eliminación intravascular de las soluciones de hemoglobina con tales soluciones teniendo habitualmente una vida media plasmática de 2-4 horas.

25

30

[0005] Los esfuerzos se han dirigido a superar las limitaciones inherentes de las soluciones de hemoglobina modificando a nivel molecular la hemoglobina. Reticular hemoglobina a nivel intramolecular y a nivel intermolecular por lo general ha reducido la eliminación renal y aumentado el tiempo de retención intravascular.

35

[0006] Sin embargo, las soluciones de hemoglobina reticulada aún contienen habitualmente una fracción significativa de hemoglobina tetramérica no modificada. Esta hemoglobina tetramérica no modificada se puede convertir en hemoglobina dimérica y después ser excretada del cuerpo, reduciéndose de ese modo el tiempo medio de retención intravascular para sustitutos de sangre de hemoglobina reticulada. Asimismo, los medios adecuados para la separación, como la filtración estándar, no distinguen de forma adecuada entre hemoglobina tetramérica no modificada y hemoglobina tetramérica modificada.

40

[0007] De ese modo, a pesar de los avances recientes en la preparación de sustitutos de sangre de hemoglobina reticulada, sigue existiendo la necesidad de un procedimiento para separar de manera eficaz hemoglobina no modificada de una solución de un sustituto de sangre de hemoglobina reticulada a nivel intramolecular y/o a nivel intermolecular para mejorar el tiempo medio de retención intravascular del sustituto de sangre y para impedir niveles significativos de excreción renal de hemoglobina. El documento US-7.932.356 concierne a una hemoglobina tetramérica no polimérica reticulada altamente purificada y termoestable adecuada para el uso en mamíferos.

45

50

[0008] Las estrategias anteriores para la retirada de diversas impurezas de las soluciones de hemoglobina se han centrado en procesos de tratamiento térmico de larga duración (más de una hora) a temperatura relativamente baja. La Patente de los Estados Unidos número 5.281.579 describe un tratamiento térmico de 45 a 85 °C, y particularmente 60-66 °C durante 1 a 30 horas. La Patente de los Estados Unidos número 5.741.894 describe un proceso para la retirada de impurezas de soluciones de hemoglobina parcialmente oxigenadas en un intervalo de 45 a 85 °C, y particularmente 76°C durante 90 minutos. Sin embargo, tales condiciones del tratamiento térmico de larga duración pueden llevar a la formación de metahemoglobina, la cual no se puede usar para oxigenar tejidos. Además, tales procesos de tratamiento térmico de larga duración no son compatibles con los procesos de producción a escala comercial.

55

[0009] La descripción actual se refiere a un procedimiento para separar hemoglobina no modificada de hemoglobina reticulada en una solución de hemoglobina que incluye hemoglobina polimérica. El procedimiento supone poner en contacto la solución de hemoglobina con un aparato de corta duración a alta temperatura en el que hemoglobina tetramérica no modificada se desnaturaliza térmicamente para formar un precipitado. Los dímeros de hemoglobina desnaturalizada y precipitada se separan entonces de la solución, mientras se retiene la hemoglobina reticulada en la solución.

RESUMEN DE LA INVENCION

10

[0010] La invención actual se refiere a un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica que contenga un portador de oxígeno altamente purificado y termoestable, incluyendo la composición farmacéutica que contiene un portador de oxígeno hemoglobina, incluyendo la hemoglobina hemoglobina polimérica reticulada, comprendiendo el procedimiento:

15

(a) proporcionar sangre completa que incluya al menos glóbulos rojos y plasma;
 (b) separar los glóbulos rojos del plasma en la sangre completa;
 (c) filtrar los glóbulos rojos que se separaron del plasma para obtener una fracción de glóbulos rojos filtrados;
 (d) lisar los glóbulos rojos para crear una solución que comprenda un lisado de glóbulos rojos sometidos a disrupción;

20

(e) extraer una primera solución de hemoglobina del lisado;
 (f) realizar uno o más procesos de purificación para producir una solución de hemoglobina purificada;
 (g) calentar la solución de hemoglobina purificada a aproximadamente 60-62 °C durante aproximadamente 10 horas;
 (h) reticular tetrámeros de hemoglobina para crear una solución que incluya hemoglobina polimérica reticulada,

25

incluyendo la hemoglobina polimérica dos o más tetrámeros de hemoglobina reticulada;
 (i) tratar térmicamente la solución que incluye la hemoglobina polimérica reticulada en un entorno desoxigenado a una temperatura mayor de 85 °C y menor de o igual a aproximadamente 95 °C durante un periodo de menos de aproximadamente 40 minutos para desnaturalizar y precipitar cualquier hemoglobina tetramérica no reticulada residual, cualquier hemoglobina dimérica, y cualquier otra impureza de manera que se forme una solución termoestable que incluya una hemoglobina polimérica reticulada;

30

(j) enfriar la solución tratada térmicamente a una temperatura aproximadamente inferior a o igual a 25 °C en aproximadamente dos minutos o menos para impedir la formación de metahemoglobina;
 (k) retirar precipitado mediante un centrifugado o un aparato de filtración para formar una solución de hemoglobina purificada, termoestable que incluya hemoglobina polimérica reticulada que tenga una concentración no detectable de dímero.

35

[0011] En ciertas realizaciones, comprendiendo el procedimiento además añadir N-acetilcisteína inmediatamente después del tratamiento térmico.
 En ciertas realizaciones, el enfriamiento se realiza en menos de un minuto.

40

[0012] En ciertas realizaciones, el tratamiento térmico se produce en un intervalo de temperatura de más de 85 °C y menos de 90 °C durante un periodo de aproximadamente 8 minutos a aproximadamente 30 minutos.

45

[0013] En ciertas realizaciones, el tratamiento térmico se produce a aproximadamente 90 °C durante un periodo de aproximadamente 45 segundos a aproximadamente 150 segundos.

[0014] En ciertas realizaciones, el tratamiento térmico se produce a aproximadamente 95 °C durante un periodo de 30 a aproximadamente 100 segundos.

50

[0015] En ciertas realizaciones, comprendiendo el procedimiento además añadir N-acetilcisteína inmediatamente antes del tratamiento térmico.

[0016] En ciertas realizaciones, comprendiendo el procedimiento además añadir N-acetilcisteína inmediatamente después del tratamiento térmico y antes del tratamiento térmico.

55

[0017] En ciertas realizaciones, la realización de uno o más procesos de purificación para producir una solución de hemoglobina purificada incluye la ultrafiltración.

[0018] En ciertas realizaciones, la realización de uno o más procesos de purificación para producir una

solución de hemoglobina purificada incluye la purificación por cromatografía.

[0019] Las ventajas de esta invención incluyen proporcionar un sustituto de sangre con un tiempo de retención intravascular mejorado, una reducción o eliminación de eliminación renal significativa de hemoglobina y los efectos secundarios asociados con la misma, una presión oncótica adecuada, y efectos hipertensivos reducidos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0020] La FIG. 1 (comparativa) representa un diagrama de flujo esquemático de un procedimiento de un aparato de corta duración a alta temperatura para desnaturalizar hemoglobina no modificada de sustituto de sangre de hemoglobina modificada según la presente invención.

[0021] La FIG. 2 (comparativa) representa un análisis de cromatografía líquida de alta resolución para hemoglobina polimérica no tratada térmicamente.

[0022] La FIG. 3 (comparativa) representa un análisis de cromatografía líquida de alta resolución para (a) hemoglobina polimérica no tratada térmicamente con dímero de hemoglobina adicionada y (b) hemoglobina polimérica termoestable en la cual se ha sometido a tratamiento térmico de corta duración a 80°C, 85°C, 90°C y 95°C respectivamente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0023] La hemoglobina (Hb) adecuada para las soluciones de Hb de esta invención se puede derivar de sangre nueva, vieja o caducada de humanos y otros vertebrados, como ganado, cerdos, ovejas, patos y gallinas.

[0024] La sangre se puede recoger de donantes vivos o recién sacrificados. Ejemplos de procedimientos adecuados para obtener hemoglobina, derivada de glóbulos rojos, se describen en las Patentes de EE. UU. números 5.084.558 y 5.296.465, concedidas a Rausch *et al.*, la Patente de los Estados Unidos número 6498141, concedida a DeWoskin *et al.*, y la Patente de EE. UU número 7291592, concedida a Gould *et al.*

[0025] En una realización preferida, la hemoglobina se deriva de glóbulos rojos como se describe en la Patente de EE. UU número 5.955.581.

[0026] Soluciones de hemoglobina adecuadas comprenden soluciones acuosas de Hb disuelta en las que la Hb disuelta incluye Hb no modificada además de Hb tetramérica modificada y/o Hb polimérica.

[0027] La hemoglobina no modificada, como se define en esta solicitud, es hemoglobina en una forma tetramérica no disociada y no reticulada que se puede disociar en dímeros de Hb *in vitro* o *in vivo*; la hemoglobina no modificada también puede incluir dímeros de Hb disociados. Los dímeros de Hb se pueden disociar aún más en subunidades de Hb (monómeros). La hemoglobina modificada se puede reticular a nivel intramolecular en tetrameros estables, así como reticular a nivel intermolecular en una cadena de polímeros dentro de la solución de Hb. Una solución de hemoglobina que contiene polímero usada como la solución inicial de la presente invención puede incluir hemoglobina tetramérica reticulada junto con hemoglobina polimérica reticulada a nivel intermolecular, y también incluir hemoglobina no modificada no deseable en forma tetramérica o dimérica.

[0028] La hemoglobina polimérica puede incluir sólo componentes de hemoglobina como se expone en las Patentes de EE. UU N°s 5.753.616, 5.895.810 y 6.288.027; puede incluir moléculas no de hemoglobina conjugadas con hemoglobina como polietilenglicol (PEG). Tales materiales se describen en las Patentes de EE. UU N°s 7.169.900, 7.501.499, y 7.795.401. Todos los materiales anteriores se pueden usar como soluciones iniciales que contienen hemoglobina en los procesos de retirada de dímeros descritos a continuación. Los portadores de oxígeno a base de hemoglobina disponibles en el mercado también se pueden usar en el proceso de retirada de dímeros de la presente invención, incluyendo HEMOPURE®, OXYGLOBIN®, POLYHEME®, HEMOLINK™ y MP4.

[0029] En el proceso de la presente invención, una solución que contiene hemoglobina polimérica que se ha sometido previamente, antes de la reticulación, a un tratamiento térmico de la solución de hemoglobina previamente purificada a aproximadamente 60-62 °C durante aproximadamente 10 horas, se somete, después de la reticulación, a un proceso de tratamiento térmico de aproximadamente 80 °C a aproximadamente 95 °C, y más preferentemente, mayor de 85 °C a 95 °C para retirar con éxito las formas tetramérica y dimérica no reticuladas de hemoglobina de la solución que contiene hemoglobina polimérica. Cualquier precipitado formado durante el tratamiento térmico se retira

mediante centrifugado o un aparato de filtración para formar una solución clara que contenga hemoglobina. El tratamiento térmico de corta duración a alta temperatura se lleva a cabo preferentemente usando el aparato representado en la FIG. 1 (comparativa) y descrito en más detalle en el Ejemplo 1 (comparativo). En este intervalo de temperatura, todos los tratamientos térmicos pueden tener lugar durante periodos de sustancialmente menos de una hora. En el intervalo inferior de 80-85 °C, un tiempo de aproximadamente 20 a 40 minutos es suficiente. En un intervalo de temperatura de más de 85 °C y menos de 90 °C un periodo de 8 a aproximadamente 30 minutos es suficiente. Sin embargo, a temperaturas más elevadas, como 90-95°C, el tratamiento térmico se puede realizar en una realización ejemplar en 5 minutos o menos, y más preferentemente en menos de tres minutos. El enfriamiento preferentemente lleva menos de dos minutos, y más preferentemente menos de un minuto para minimizar la formación de metahemoglobina.

[0030] El proceso de corta duración a alta temperatura para tratar térmicamente las soluciones de hemoglobina en el proceso de purificación también retira otras impurezas, por ejemplo, inmunoglobulina G y materiales microbianos nocivos y virus, de manera que se pueda evitar el daño renal, los efectos adversos vasculares y otras reacciones de toxicidad.

[0031] El tratamiento térmico de hemoglobina tetramérica se describe en la Patente de los Estados Unidos número 7.932.356 y las Solicitudes de patente de los Estados Unidos números 12/821.214 y 13/013.850. La hemoglobina polimérica tratada térmicamente de la presente invención se puede empaquetar como se describe en el documento U.S.-7.932.356 y se puede usar en diversas técnicas de oxigenación de tejido descritas en las patentes y solicitudes mencionadas anteriormente. La composición farmacéutica que contiene un portador de oxígeno altamente purificado y termoestable se usa en procedimientos de oxigenar tejido en los que la composición se proporciona a tejido animal in vivo o bien ex vivo como se describe en la patente '365.

25 EJEMPLO 1 (comparativo)

Procesamiento térmico HTST

[0032] Un aparato de procesamiento de Corta Duración a Alta Temperatura (HTST, por sus siglas en inglés) se muestra en la FIG. 1 (comparativa). Un proceso de calentamiento que usa el aparato de procesamiento HTST se realiza en el material inicial que contiene hemoglobina polimérica. En este ejemplo, la condición para el tratamiento térmico es 90 °C durante 30 segundos a 3 minutos, y preferentemente 45 a 60 segundos; aunque pueden seleccionarse otras condiciones como se analiza anteriormente y el aparato modificarse como corresponda. Una solución que contiene hemoglobina polimérica, que está disponible en el mercado Oxyglobin®, opcionalmente es tratada con el 0,2 % de N-acetilcisteína y bombeada a un aparato de procesamiento HTST (la primera sección del intercambiador de calor HTST se precalienta y se mantiene a 90 °C) a una velocidad de flujo de 1,0 litro por minuto, el tiempo de permanencia de la primera sección del aparato es de entre 45 y 60 segundos, después la solución se pasa a la misma velocidad de flujo a otra sección del intercambiador de calor que se mantiene a 25 °C. El tiempo requerido para el enfriamiento es de entre 15 y 30 segundos. Tras enfriarse a aproximadamente 25 °C, opcionalmente se añade N-acetilcisteína inmediatamente después a una concentración del 0,2 % al 0,4 %, preferentemente al 0,4 %. Esta adición química después del proceso de calentamiento HTST mantiene la metahemoglobina (hemoglobina inactiva) a un nivel bajo. La configuración del aparato de procesamiento se controla fácilmente para la operación industrial. Si la hemoglobina no es reticulada, no es termoestable y forma un precipitado después de la etapa de tratamiento térmico. El precipitado se retira entonces mediante un centrifugado o un aparato de filtración para formar una solución sustancialmente clara después de eso.

[0033] La FIG. 2 (comparativa) muestra la distribución del peso molecular de la hemoglobina polimérica mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) por exclusión de tamaño. La distribución del peso molecular para la solución de hemoglobina polimérica oscila entre 32 KDa y >500 KDa. Después de la etapa de proceso térmico HTST (de 80 °C a 95°C), la forma dimérica adicionada de hemoglobina se puede retirar con éxito de la solución de hemoglobina polimérica (mostrado en la FIG. 3 (comparativa)). Cualquier precipitado formado durante la etapa de proceso térmico HTST se retira mediante centrifugado o un aparato de filtración para formar una solución de hemoglobina reticulada sustancialmente clara.

[0034] El Analizador Hemox para la medición de p50 (presión parcial de oxígeno, a la que la solución de hemoglobina se satura al 50 %) se usa después de eso para analizar la (a) solución que contiene hemoglobina polimérica no tratada térmicamente, y (b) una solución que contiene hemoglobina polimérica tratada térmicamente (sometida a un tratamiento de 80 °C). No se detecta ningún cambio significativo en el contenido de hemoglobina (medido mediante Cooximetría) entre (1) antes de la etapa de proceso térmico HTST, y (2) después de la etapa de

proceso térmico HTST. Sin embargo, el valor de p50 pasa a un valor inferior (de 37,5 mmHg a 23,3 Hg) después de la etapa de proceso térmico HTST. Esto indica que la afinidad de unión de hemoglobina-oxígeno es más elevada. El descenso del valor de p50 es una ventaja para cargar oxígeno en tejidos hipóxicos y células tumorales hipóxicas. Cuando un tumor crece, sobrepasa rápidamente su riego sanguíneo, dejando porciones del tumor con regiones en las que la concentración de oxígeno es significativamente inferior a la presente en tejidos sanos. Denny (Denny W. A., Prodrug strategies in cancer therapy, Eur. J. Med. Chem., 2001, 36, pp. 577-595) informó que las células tumorales hipóxicas normalmente son resistentes a la radioterapia y la quimioterapia; sin embargo, se pueden hacer más susceptibles al tratamiento aumentando su contenido de oxígeno.

10

Tabla 1

	valor de p50 (mmHg)
Solución que contiene hemoglobina polimérica no tratada térmicamente	37,5
Solución que contiene hemoglobina polimérica tratada térmicamente	23,3

EJEMPLO 2 (comparativo)**Hemoglobina polimérica Oxyglobin® y/o Hemopure®**

15

[0035] La Síntesis de Sustituto de Sangre de Hemoglobina Polimérica Estable en base a la descripción de las Patentes de los Estados Unidos números 5.895.810, 5.296.465, 5084558, 5753616 y 5955581, también se conoce como producto Oxyglobin® y/o Hemopure®.

20

[0036] El siguiente ejemplo se refiere a un procedimiento para hacer soluciones de hemoglobina con contenido polimérico que sean adecuadas para el tratamiento por el aparato de tratamiento térmico y el procedimiento de la presente descripción.

30

[0037] Se recoge sangre completa bovina, se mezcla con un anticoagulante de citrato de sodio para formar una solución de sangre. Los glóbulos rojos (RBCs, por sus siglas en inglés) se aíslan de la sangre completa bovina. Los RBCs se lavan entonces para separar las proteínas plasmáticas extracelulares, como la albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) o la Inmunoglobulina G (IgG, por sus siglas en inglés), de los RBCs. Después de la separación de los RBCs, los RBCs son lisados para formar una solución que contenga hemoglobina.

30

[0038] La solución de Hb concentrada se dirige entonces desde el depósito de ultrafiltrado a los medios contenidos en columnas cromatográficas en paralelo para separar la Hb mediante cromatografía líquida de alta resolución. Las columnas cromatográficas contienen un medio de intercambio aniónico adecuado para separar Hb de proteínas no de hemoglobina. Los medios de intercambio aniónico son un medio de intercambio aniónico de amonio cuaternario en gel de sílice. Este procedimiento de tratar gel de sílice se describe en el Journal of

35 Chromatography, pp. 120:321-333 (1976).

40

[0039] La solución de Hb se desoxigena entonces a un nivel en el que el contenido de oxihemoglobina o HbO₂ es de aproximadamente 101. Durante la desoxigenación, la temperatura de la solución de Hb se mantiene entre aproximadamente 19 °C y aproximadamente 31 °C. También durante la desoxigenación, y posteriormente durante todo el proceso, la Hb se mantiene en un entorno de oxígeno bajo para minimizar la absorción de oxígeno por la Hb y para mantener un contenido de Hb oxigenada (HbO₂) de menos de aproximadamente el 10 % en la desoxi-Hb.

45

[0040] Antes del proceso de polimerización, "agua para inyección" (WFI, por sus siglas en inglés) despirogenada y empobrecida en oxígeno se añade a la solución de Hb a una concentración de aproximadamente 40 g de Hb/L. La polimerización se lleva a cabo en un tampón fosfato 12 mM con un pH de 7,8, que tiene una concentración de cloruro inferior a o igual a aproximadamente 35 mM.

50

[0041] La desoxi-Hb estabilizada frente a la oxidación y la N-acetilcisteína (NAC, por sus siglas en inglés) posteriormente se mezclan lentamente con el agente de reticulación glutaraldehído, específicamente 29,4 gramos de glutaraldehído para cada kilogramo de Hb durante un periodo de cinco horas, mientras se calienta a 42 °C y se recircula la solución de Hb a través de un mezclador estático Kenics de 1-1/2 pulgadas (3,81 centímetros) con 6 elementos

55

[0042] (Chemineer, Inc.), para formar una solución de Hb polimérica (en lo sucesivo "poli(Hb)"). Después de la polimerización, la temperatura de la poli(Hb) en el reactor de polimerización se reduce a una temperatura de entre

aproximadamente 18 °C y aproximadamente 22 °C.

[0043] La poli(Hb) se concentra entonces recirculando la poli(Hb) a través del ultrafiltro hasta que la concentración de la poli(Hb) se incrementa hasta aproximadamente 85 g/L. Un ultrafiltro adecuado es un ultrafiltro de 30 KDa. Posteriormente, la solución de poli(Hb) se mezcla entonces con borohidruro de sodio 66,75 g, y después se recircula a través del mezclador estático a una velocidad de flujo de 10-20 litros por minuto.

[0044] Después de que el pH y los electrolitos se restablezcan a niveles fisiológicos, el sustituto de sangre de Hb polimérica estable se diluye entonces a una concentración de 50 g/L añadiendo el tampón de pH bajo desoxigenado, filtrado al reactor de polimerización. El sustituto de sangre diluido se diafiltra entonces mediante recirculación desde el reactor de polimerización a través del mezclador estático y un filtro de purificación de 100 KDa contra un tampón desoxigenado filtrado que contiene lactato de sodio 27 mM, NAC 12 mM, NaCl 115 mM, KCl 4 mM y CaCl₂ 1,36 mM en WFI, (pH 7,8). La diafiltración continúa hasta que el sustituto de sangre contenga especies tetraméricas modificadas y tetraméricas no modificadas a menos del o igual al 10 % aproximadamente.

[0045] Una solución de Hb polimérica se forma según el procedimiento descrito en este Ejemplo 2 (según la descripción de la Patente de los Estados Unidos número 5.084.558, concedida a Rausch *et al*). Esta solución de Hb es analizada mediante cromatografía de permeación en gel y se comprueba que comprende dímeros de Hb aproximadamente al 45 %, tetrámeros de Hb no modificados aproximadamente al 15 %, y moléculas de Hb polimérica aproximadamente al 40 % que son más grandes que los tetrámeros no modificados.

[0046] El material que contiene hemoglobina polimérica se puede someter entonces al tratamiento térmico como se analizó en el Ejemplo 1 comparativo para retirar dímero y tetrámero de Hb no modificado.

25 **EJEMPLO 3** (invención)

Hemoglobina polimérica Polyheme®

[0047] La Síntesis de Sustituto de Sangre de Hemoglobina Polimérica Estable en base a la descripción de las Patentes de los Estados Unidos números 6498141 y 7291592, también se conoce como producto de Northfield laboratories Inc. (Polyheme®).

[0048] El siguiente ejemplo se refiere a un procedimiento según la invención para hacer soluciones de hemoglobina con contenido polimérico adecuadas para el tratamiento mediante el aparato de tratamiento térmico y el procedimiento de la presente invención.

(3a) Preparación de Glóbulos Rojos, Lavado celular y Lisis

[0049] Mezclar una solución de sangre con una solución de cloruro de sodio acuosa al 1 % para formar una solución de hemoglobina total al 4 %; después se introduce monóxido de carbono en el depósito de mezcla de manera que el depósito contenga una atmósfera de monóxido de carbono.

[0050] Acoplándose a un filtro de flujo tangencial de 0,65 µm, esta solución de hemoglobina total al 4 % se lava con aproximadamente 8 volúmenes de la solución de cloruro de sodio al 1 % para retirar los contaminantes de las proteínas plasmáticas. Después de lavarse, la solución se concentra a hemoglobina total aproximadamente al 16 %, y se añade "agua para inyección" (WFI, por sus siglas en inglés) para llevar el volumen de la solución hasta aproximadamente 2,5 veces el volumen. Con la adición del WFI, las células se hinchan y se rompen liberando hemoglobina a la solución. La concentración de la solución de hemoglobina resultante es de hemoglobina total aproximadamente al 7 %.

[0051] La solución resultante se clarifica; los contaminantes del estroma de los glóbulos rojos y el material de pared celular son retenidos y retirados por el filtro. La solución que permanece es una solución de hemoglobina total aproximadamente al 3,3 %.

55 (3b) Tratamiento Térmico, Clarificación y Reducción Viral

[0052] La solución resultante de hemoglobina sin estroma se trata después térmicamente a una temperatura de aproximadamente 60-62 °C durante un periodo de aproximadamente 10 horas. Durante este tiempo, la solución se agita con moderación. Cuando la solución se calienta y pasa de una temperatura de aproximadamente 55 °C, se

forma un precipitado.

[0053] La solución de hemoglobina tratada térmicamente resultante, de hemoglobina total al 3.3% (p/v) sin estroma se filtra entonces a través de un prefiltro de 0,2 µm seguido de un prefiltro de 0,1 µm y después se bombea a través de un ultrafiltro de reducción viral de 100 KDa.

(3c) Concentración de Ultrafiltración

[0054] La solución de hemoglobina filtrada se concentra entonces a una concentración de Hb total aproximadamente al 14 % y posteriormente se lava y se diafiltra con 4 volúmenes de WFI. La concentración y diafiltración se logra usando un ultrafiltro de 10 KDa. Esta hemoglobina en la solución es principalmente carboxihemoglobina.

(3d) Intercambio de gas con Oxígeno y Nitrógeno

[0055] La solución de carboxihemoglobina resultante se burbujea con un flujo de oxígeno durante 18 horas a 10 °C. La solución resultante contiene carboxihemoglobina a menos del 5% en base al peso de hemoglobina total.

[0056] Después de la oxigenación, la solución se burbujea con un flujo similar de nitrógeno durante aproximadamente 3 a 3,5 horas a 10 °C. hasta que permanezca en la solución oxihemoglobina a menos del 10 % en base al peso de hemoglobina total.

(3e) Modificación Química

[0057] A la solución de desoxihemoglobina (a aproximadamente 4 °C) se le añade entonces una solución acuosa de piridoxal-5-fosfato (P5P) (93,75 g/L) en una proporción molar P5P-hemoglobina de 2:1. La piridoxilación se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 4°C. La solución de P5P habitualmente se añade durante aproximadamente 1 minuto y se mezcla durante aproximadamente 15 minutos, después de lo cual se añade una solución de borohidruro de sodio/hidróxido de sodio a la solución de hemoglobina en una proporción de 0,8 g de hidróxido de sodio y 90,8 g de borohidruro de sodio por 2 litros de solución de hemoglobina. La solución de borohidruro se añade lo más rápidamente posible durante un periodo de aproximadamente 1 minuto y después se remueve durante una hora. La solución resultante de hemoglobina piridoxilada se diafiltra posteriormente usando el ultrafiltro de 10 KDa para retirar el exceso de reactivos con 4 volúmenes de WFI.

(3f) Solución de Hemoglobina Polimérica

[0058] A la hemoglobina piridoxilada se le añade suficiente WFI para preparar una solución de hemoglobina total al 4,5%. Una solución de glutaraldehído se añade a la solución de hemoglobina piridoxilada en una proporción molar de glutaraldehído-hemoglobina de aproximadamente 24:1. La solución de glutaraldehído habitualmente se añade durante un periodo de aproximadamente 2,5 horas mediante una bomba dosificadora a la solución de hemoglobina. Se permite que la reacción de la polimerización continúe durante aproximadamente 15-18 horas. La distribución del peso molecular objetivo es de aproximadamente polímero al 75% y tetrámero al 25%. Los polímeros objetivo tienen pesos moleculares de menos de aproximadamente 600 KDa con una fracción predominante de los pesos moleculares residiendo en el intervalo de 100 KDa-350 KDa.

[0059] Cuando la reacción de la polimerización alcanza la distribución del peso molecular objetivo (después de aproximadamente 15-18 horas), se añade glicina acuosa (como neutralizante) a la solución de hemoglobina en una proporción molar de glicina-hemoglobina de 140:1. El pH de la solución en este punto es de 8,9. La solución resultante se mezcla entonces durante aproximadamente 30-40 minutos después de lo cual se añade una solución de borohidruro de sodio/hidróxido de sodio (que tiene la concentración identificada anteriormente) a la solución de hemoglobina en una proporción molar de borohidruro de sodio-hemoglobina de 28:1. Esta mezcla resultante se remueve durante aproximadamente 1 hora. La solución se concentra entonces mediante ultrafiltración y se lava con 4 volúmenes de WFI. Una alícuota adicional de borohidruro de sodio en la misma proporción molar que se indica anteriormente se añade a la solución concentrada y de nuevo se mezcla durante 1 hora. La solución resultante se lava con 4 volúmenes de WFI dando como resultado hemoglobina polimérica, piridoxilada, sin estroma que se ha tratado térmicamente.

[0060] La solución resultante se oxigena permitiendo que la solución permanezca bajo una atmósfera de oxígeno. La hemoglobina se diluye entonces a hemoglobina total aproximadamente al 4 %. La solución de

hemoglobina total al 4 % se diafiltra entonces usando NaCl 10 mM/NaOH 20 mM y un ultrafiltro de 300 KDa. La filtración continúa hasta que aproximadamente el 97 % del material de hemoglobina pase a través del filtro y se concentre de manera continua a hemoglobina total al 4-8 % usando un ultrafiltro de 70 KDa. (Se retiene aproximadamente el 3 % del material, es decir, polímeros de elevado peso molecular).

5

[0061] El material resultante es hemoglobina total aproximadamente al 4-8 % y contiene tetrámero aproximadamente al 25 %. Posteriormente, el material que contiene hemoglobina polimérica se puede someter entonces al tratamiento térmico como se analizó en el Ejemplo 1 para retirar dímero y tetrámero de Hb no modificado.

10

[0062] Se observa en esta solicitud que aunque lo mencionado anteriormente describe realizaciones ejemplares de la invención, estas descripciones no se deberían considerar en un sentido limitador. En lugar de eso, se pueden hacer variaciones y modificaciones sin desviarse del alcance de la presente invención como se define en las reivindicaciones anexas.

15

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica que contenga un portador de oxígeno altamente purificado y termoestable, incluyendo la composición farmacéutica que contiene un portador de oxígeno hemoglobina, incluyendo la hemoglobina hemoglobina polimérica reticulada, comprendiendo el procedimiento:
- (a) proporcionar sangre completa que incluya al menos glóbulos rojos y plasma;
 - (b) separar los glóbulos rojos del plasma en la sangre completa;
 - 10 (c) filtrar los glóbulos rojos que se separaron del plasma para obtener una fracción de glóbulos rojos filtrados;
 - (d) lisar los glóbulos rojos para crear una solución que comprenda un lisado de glóbulos rojos sometidos a disrupción;
 - (e) extraer una primera solución de hemoglobina del lisado;
 - (f) realizar uno o más procesos de purificación para producir una solución de hemoglobina purificada;
 - 15 (g) calentar la solución de hemoglobina purificada a aproximadamente 60-62 °C durante aproximadamente 10 horas;
 - (h) reticular tetrámeros de hemoglobina para crear una solución que incluya hemoglobina polimérica reticulada, incluyendo la hemoglobina polimérica dos o más tetrámeros de hemoglobina reticulada;
 - (i) tratar térmicamente la solución que incluye la hemoglobina polimérica reticulada en un entorno desoxigenado a una temperatura mayor de 85°C y menor de o igual a aproximadamente 95 °C durante un periodo de menos de
 - 20 aproximadamente 40 minutos para desnaturalizar y precipitar cualquier hemoglobina tetramérica no reticulada residual, cualquier hemoglobina dimérica, y cualquier otra impureza de manera que se forme una solución termoestable que incluya una hemoglobina polimérica reticulada;
 - (j) enfriar la solución tratada térmicamente a una temperatura aproximadamente inferior a o igual a 25 °C en aproximadamente dos minutos o menos para impedir la formación de metahemoglobina;
 - 25 (k) retirar precipitado mediante un centrifugado o un aparato de filtración para formar una solución de hemoglobina purificada, termoestable que incluya hemoglobina polimérica reticulada que tenga una concentración no detectable de dímero.
2. El procedimiento de la reivindicación 1 que comprende además añadir N-acetilcisteína
- 30 inmediatamente después del tratamiento térmico.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que el enfriamiento se realiza en menos de un minuto.
4. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que el tratamiento térmico se produce en un intervalo de
- 35 temperatura de más de 85 °C y menos de 90 °C durante un periodo de aproximadamente 8 minutos a aproximadamente 30 minutos.
5. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que el tratamiento térmico se produce a
- 40 aproximadamente 90 °C durante un periodo de aproximadamente 45 segundos a aproximadamente 150 segundos.
6. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que el tratamiento térmico se produce a
- aproximadamente 95 °C durante un periodo de 30 a aproximadamente 100 segundos.
7. El procedimiento de la reivindicación 1 que comprende además añadir N-acetilcisteína
- 45 inmediatamente antes del tratamiento térmico.
8. El procedimiento de la reivindicación 2 que comprende además añadir N-acetilcisteína
- inmediatamente antes del tratamiento térmico.
- 50 9. El procedimiento de la reivindicación 1 donde la realización de uno o más procesos de purificación para producir una solución de hemoglobina purificada incluye la ultrafiltración.
10. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la realización de uno o más procesos de purificación para producir una solución de hemoglobina purificada incluye la purificación por cromatografía.
- 55

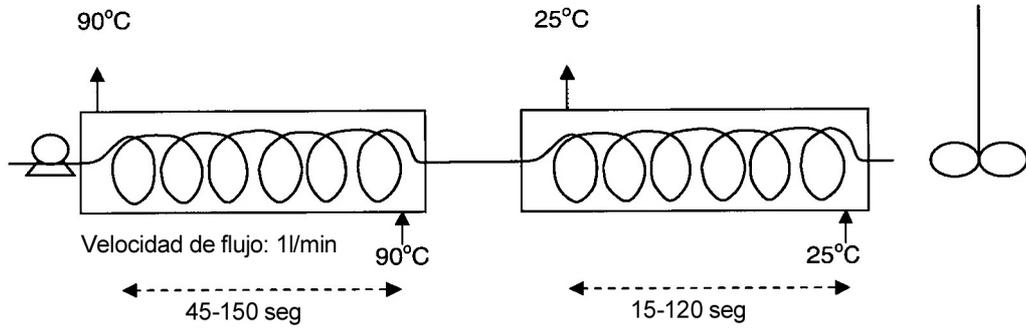


FIG. 1 (comparativa)

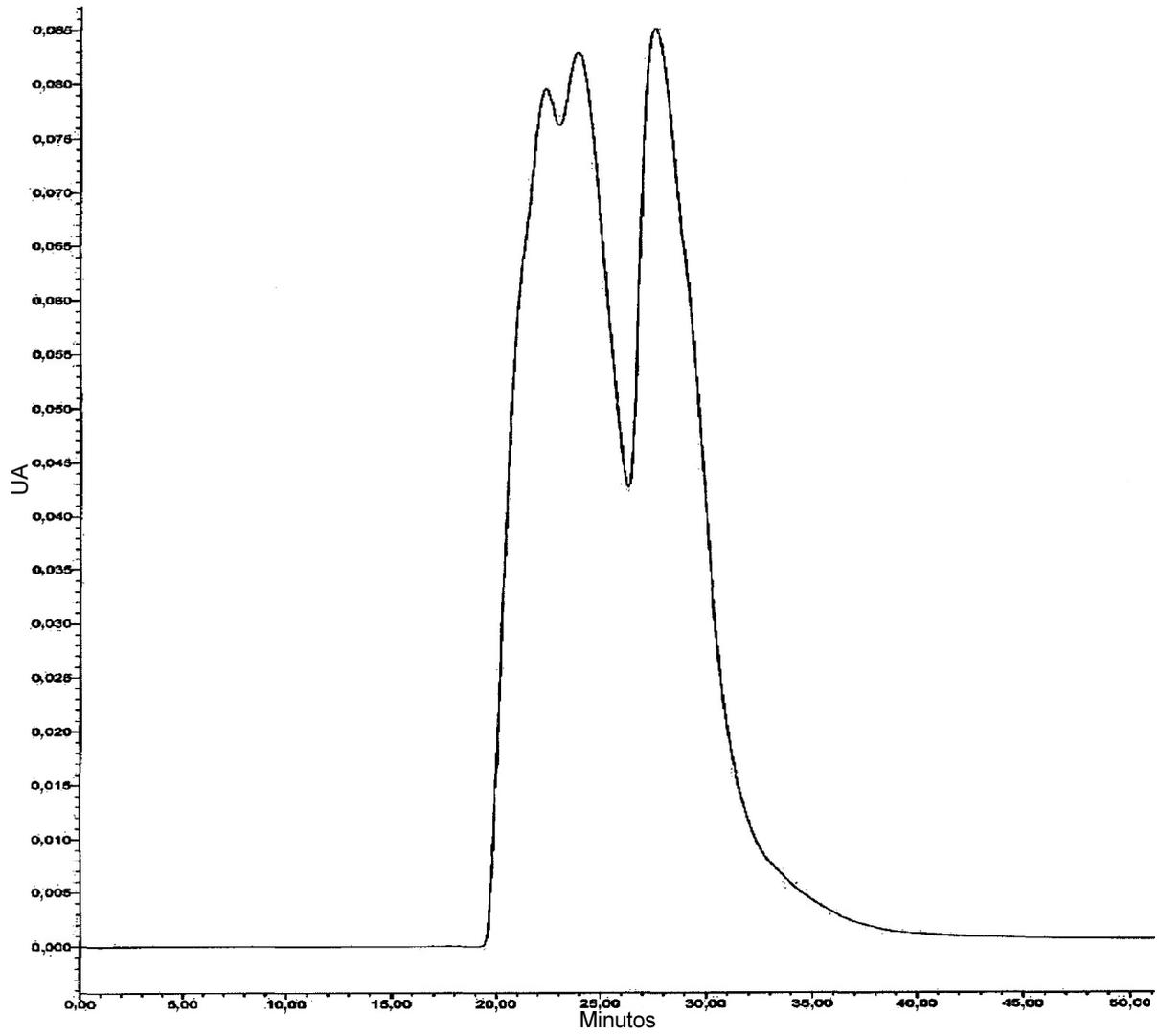


FIG. 2 (comparativa)

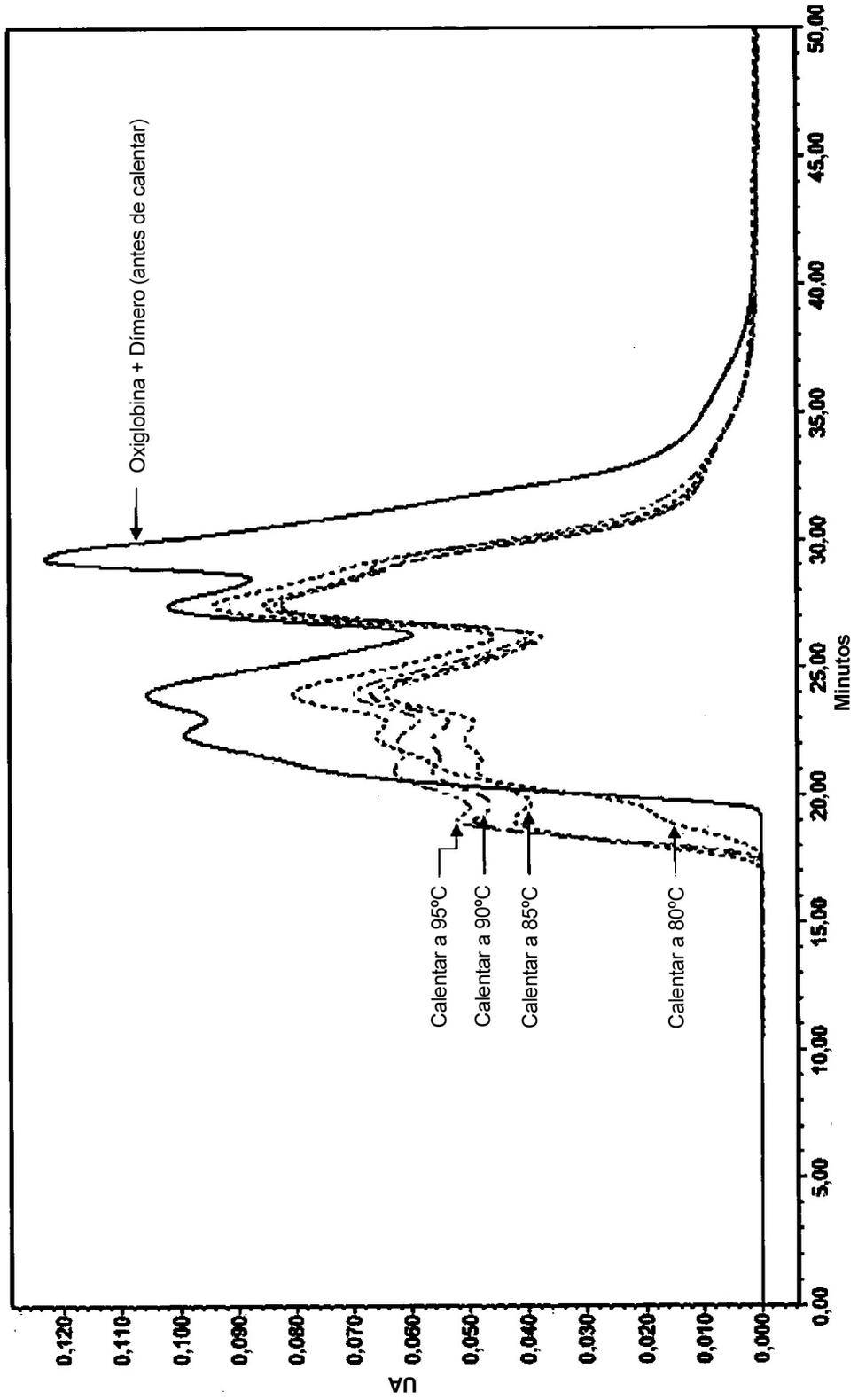


FIG. 3 (comparativa)