



ESPAÑA

11	NUMERO
21	445.258
22	FECHA DE PRESENTACION
	17-2-1976

10 A1

ES 16
22 JUN. 1977
CONCEDIDA
PATENTE DE INVENCION

30	PRIORIDADES:	32	FECHA	33	PAIS
31	NUMERO				
	554.051		27-2-1975		Estados Unidos

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			A61K		

64	TITULO DE LA INVENCION
	UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE HEMOGLOBINA RETICULADA POLIMERIZADA Y SOLUBLE EN AGUA.

71	SOLICITANTE (S)
	ALZA CORPORATION

	DOMICILIO DEL SOLICITANTE
	950 Page Mill Road, PALO ALTO, California 94304, Estados Unidos -

72	INVENTOR (ES)
	PIETER BONSEN, MYRON B. LAVER, KENT C. MORRIS.

73	TITULAR (ES)

74	REPRESENTANTE
	D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU

RESUMEN DE LA INVENCION

1 Hemoglobina reticulada, polimerizada, soluble en agua,
libre de estromas y útil en composiciones sustitutas de la
sangre para llevar oxígeno a los tejidos y órganos y en las
5 composiciones diluyentes del plasma sanguíneo. La polihemo-
globina se prepara por reacción de hemoglobina libre de estro-
mas con un agente reticulante apropiado.

COMPENDIO DE LA INVENCION

10 La hemoglobina está presente en la sangre de los mamí-
feros y tiene la propiedad fundamental en solución de la oxi-
genación reversible. En su forma natural, la hemoglobina de
los mamíferos es una proteína no reticulada, conjugada, que
tiene un peso molecular de 64,500 y está estructuralmente cons-
tituida por dos parejas de sub-unidades. Cada sub-unidad con-
15 tiene un grupo heme y una cadena polipéptida denominada glo-
bina. En los mamíferos, la hemoglobina está presente en eri-
troцитos junto con estromas que están constituidos por protei-
nas, fosfolípidos y colesterol. La reacción de hemoglobina
bovina aislada, conteniendo estromas, con un exceso de gluta-
20 raldehído para formar un precipitado insoluble ha sido des-
crita en Histochemical J., vol. 2, págs. 137 a 150, 1970. Aná-
logamente, la reacción de proteínas de sangre completa con
glutaraldehído conducente a una cola insoluble en agua ha si-
do descrita en la patente estadounidense nº 3.294.564. La
25 interacción del colágeno y gelatina con di-isocianatos y otros

1 agentes policopulantes, incluidos los andehidos, está descrita
en las patentes estadounidenses núms. 2.591.133 y 3.057.782
y en Biochemica et Biophysica Acta, vol. 168, págs. 341 a 352,
5 1968. La carboxialquilación de la globina para uso como dilu-
yente del plasma ha sido descrita en la patente estadunidense
nº 2.719.837; sin embargo, los productos obtenidos en esta
reacción carecen de la capacidad de transportar el oxígeno y,
en consecuencia, no son de uso general. En la patente estado-
unidense nº 2.527.210 se describe el uso de hemoglobina para
10 el tratamiento de las heridas. En las patentes estadounidenses
núms. 3.000.836 y 3.519.572 se describen preparaciones de san-
gre que tienen utilidad como patrones para la medida de la he-
moglobina. En la patente holandesa nº 7.404.140 se describe una
hemoglobina reticulada y soluble en agua que contiene estromas
15 para uso como sucedáneo del plasma.

Esta invención proporciona hemoglobina reticulada poli-
merizada, soluble en agua, caracterizada porque la hemoglobina
polimerizada está exenta de estromas y es capaz de combinarse
reversiblemente con un ligando.

20 La invención también proporciona un procedimiento para
la preparación de la hemoglobina reticulada polimerizada, so-
luble en agua, antes descrita, que se caracteriza por: separar
los estromas y los residuos celulares de la hemoglobina; hacer
reaccionar la hemoglobina exenta de estromas resultante, liga-
25 da o no ligada, con un agente reticulante polifuncional que

1 reacciona con los radicales reactivos de la hemoglobina bajo
una capa de un gas apropiado y bajo condiciones que dan lugar
a la formación de hemoglobina reticulada, polimerizada, solu-
ble en agua; y apagar la reacción añadiendo un desactivador del
5 agente reticulante a la mezcla de reacción.

La invención proporciona además composiciones farmacéu-
ticas que comprenden un sucedáneo de la sangre o un diluyente
del plasma sanguíneo en mezcla con un vehículo fisiológicamente
aceptable, caracterizadas porque el sucedáneo o diluyente es la
10 hemoglobina reticulada polimerizada, soluble en agua, antes des-
crita.

Los términos "hemoglobina polimerizada", "hemoglobina
reticulada" y "hemoglobina macromolecular" son sustituidos en
adelante por el término "poli-hemoglobina" y, para esta inven-
15 ción, se consideran equivalentes los términos "hemoglobina po-
limerizada", "hemoglobina reticulada", "hemoglobina macromole-
cular" y "poli-hemoglobina". Por poli-hemoglobina se entiende
por lo menos un tetrámero de hemoglobina, Hb_4 , reticulado dentro
del tetrámero o por lo menos con otro heme que contenga la hemo-
20 globina monómero, Hb, para formar el compuesto macromolecular
de fórmula general $\text{poli}(Hb)_n$, donde Hb es la hemoglobina monó-
mero y n vale de 4 a 60, habitualmente de 8 a 30.

La polihemoglobina de la invención es soluble en los lí-
quidos acuosos con un pH de 6 a 9 y en los humores fisiológicos.
25 La polihemoglobina tiene un peso molecular de 64.000 a 1.000.000

1 y la propiedad en solución de combinarse reversiblemente con
ligandos gaseosos en una proporción de hasta 60 micromoles de
ligando por gramo de polihemoglobina, es decir, la capacidad
portadora de ligandos es próxima al 100 %. De acuerdo con su
5 preparación, la polihemoglobina presenta una presión parcial
del ligando a la semi-saturación de 2,5 a 120 mm Hg a 37°C,
medida a pH neutro y a la presión atmosférica. Las soluciones
de polihemoglobina tienen una viscosidad intrínseca de 0,04
a 0,16 decilitros por gramo y presentan espectros ultravioleta
10 ta y visible similares a los de la hemoglobina no reticulada.
La polihemoglobina, en el estado oxidado cuando su heme hie-
rro es trivalente y la polihemoglobina está reticulada, poli-
methemoglobina exenta de estromas, tiene un coeficiente de
extinción molar, ϵ , a 630 nm igual a $3,5 \pm 0,4 \times 10^3$ en ausen-
15 cia del ligando heme y un ϵ a 540 igual a $9,5 \pm 0,5 \times 10^3$ para
la policianomethemoglobina exenta de estromas, reticulada (poli-
methemoglobina con cianuro como ligando heme).

Lo polihemoglobina se prepara a partir de eritrocitos se-
parados de sangre humana recién extraída, sangre completa anti-
20 cuada o placentas; eritrocitos compactados obtenidos de centros
de donadores humanos; o eritrocitos obtenidos de sangre animal.
La sangre se extrae en frascos que contienen un anticoagulante,
se centrifuga y se separa el plasma que sobrenada. La centrifu-
gación se realiza entre -5°C y 40°C, preferiblemente a 4-6°C,
25 durante unos 5 a 60 minutos y a 650 g a 6500 g, separando y

1 despreciando el plasma que sobrenada y la capa de color ante.
A continuación, los glóbulos rojos se lavan en alrededor de 1
a 4 volúmenes de solución salina fría, isotónica o hipertónica,
se centrifuga la suspensión y el líquido que sobrenada
5 se separa y tira. Los glóbulos rojos se lavan dos o tres veces
más, tirando las aguas de lavado después de cada centrifugación.

10 El método de obtención del material de partida para la
polimerización incluye el aislamiento de la hemoglobina de los
glóbulos esencialmente exentos de desechos celulares y estromas.
La separación de las proteínas y lípidos estromales es crítica
para la invención ya que su eliminación elimina esencialmente
los daños causados al riñón. El procedimiento para la obtención
de hemoglobina exenta de estromas consiste en lisar primero las
15 células en alrededor de 1 a 4 volúmenes de agua fría u otras
soluciones lisantes tales como soluciones reguladoras de fosfato
hipotónicas y solución salina hipotónica. Después de la lisis,
se sacude la suspensión de glóbulos rojos y se agrega tolueno
frío en una proporción de alrededor del 10 al 200 % del volumen
de las células, habitualmente alrededor del 10 al 30 % del volumen.
20 Luego se sacude la mezcla durante 4 a 10 minutos y se deja en
reposo a 4-6°C durante 24 a 72 horas para producir una mezcla
trifásica. La capa roja transparente inferior se aísla y centrifuga
a 40.000 g-50.000 g durante 60 minutos como mínimo, a unos 4-6°C.
25 Después se separa el lí-

1 quido transparente que sobrenada y se filtra a través de un
filtro de tierra de diatomeas. Esta filtración elimina cual-
quier traza de estromas y pueden utilizarse varios ensayos de
precipitación conocidos para comprobar si la hemoglobina está
5 exenta de estromas.

Las sales y metabolitos residuales de bajo peso mole-
cular son separadas de la hemoglobina exenta de estromas por
diálisis frente a soluciones reguladoras patrón o médicamente
aceptables. Las soluciones reguladoras adecuadas para este fin
10 son el fosfato 0,05 M y la solución salina fisiológica regulada
con bicarbonatos alcalinos. La hemoglobina exenta de estromas
puede ser dializada empleando un equipo comercial como la mini-
planta Dow que utiliza la fibra de diálisis Biofiber[®] - 50,
el sistema Kolff que utiliza una membrana semipermeable o un
15 dializador unitario Crom-A-Coil[®] o membranas de diálisis se-
mipermeables como celulosa, acetato de celulosa y membranas
de acetato de celulosa modificado como acetato de N,N-dietilami-
noetilcelulosa y propionato de celulosa.

La diálisis se realiza a 4-6°C haciendo pasar la solu-
20 ción de hemoglobina exenta de estromas a través de fibras ce-
lulósicas huecas, donde la hemoglobina dializada frente a una
solución reguladora pasa a lo largo de la parte externa de la
fibra. En general, las fibras tienen un límite de exclusión
que permite el paso de los solutos de bajo peso molecular sin
25 salida de la hemoglobina. El caudal del fluido es superior a

1 1 ml por minuto, preferiblemente a 3-25 ml por minuto. La hemoglobina exenta de estromas pasa a través de las fibras tres veces para establecer el equilibrio.

5 A continuación, la hemoglobina dializada es polimerizada para formar polihemoglobina macromolecular reticulada, soluble en agua, exenta de estromas. La hemoglobina exenta de estromas para la reticulación puede ser hemoglobina con ligandos o sin ligandos, dependiendo de la presencia o ausencia de heme-ligandos. Cuando hay presente oxígeno o monóxido de carbono como heme-ligandos, la hemoglobina se conoce por oxihemoglobina y carbomonoxihemoglobina, respectivamente. Cuando no hay heme-ligando presente, la hemoglobina es desoxihemoglobina. La oxihemoglobina y la carbomonoxihemoglobina se preparan equilibrando con los gases correspondientes, oxígeno y monóxido de carbono, a una temperatura de 4 a 6°C, durante unos 30 a 60 minutos. La desoxihemoglobina se prepara por evacuación repetida de la solución a presión reducida, habitualmente alrededor de 250 mm Hg, seguida de barrido con nitrógeno o un gas inerte como argon o neon. La desoxihemoglobina también puede ser preparada por desoxigenación química con adición de agentes reductores como ditionito sódico o sulfito sódico. Las formas actualmente preferidas de hemoglobina para preparar la polihemoglobina de la invención son la oxihemoglobina y la desoxihemoglobina. La reticulación de estas hemoglobinas produce polihemoglobinas con un valor P_{50} de 4 a

1 120 mm Hg en condiciones aproximadamente fisiológicas (37°C,
pH 7,1), dependiendo del método de preparación de la polihemo-
globina. Este intervalo de valores P₅₀ de 4 a 120 mm Hg inclu-
ye las afinidades de la hemoglobina por el oxígeno tal como
5 se encuentran en la sangre y en la hemoglobina natural libre.

La polimerización de la hemoglobina dializada exenta de
estromas se realiza por reticulación intermolecular de habi-
tualmente los grupos amino primarios de sus radicales lisina
para formar polihemoglobina soluble en agua. La reticulación
10 se lleva a cabo en presencia de por lo menos un agente reticu-
lante polifuncional para producir más del 90 % de hemoglobi-
na macromolecular. La polimerización se lleva a cabo purgan-
do primero la vasija de reacción con el gas apropiado. Des-
pués la hemoglobina se reticula bajo una capa del gas apropia-
do. La reacción se lleva a cabo entre 0° y 25°C durante 1/4 a
15 300 horas, a la presión atmosférica normal. También pueden
utilizarse presiones elevadas de hasta 500 kPa. Preferiblemen-
te la temperatura se mantiene entre 0° y 10°C para evitar la
oxidación térmica de la hemoglobina. Son especialmente pre-
20 feridas unas temperaturas comprendidas entre 4° y 6°C. Gene-
ralmente se hace reaccionar alrededor de un equivalente de la
hemoglobina, con un peso molecular de 64.000, con 2,5 a 300
equivalentes del reactivo reticulante polifuncional.

La reacción se termina apagándola con un desactivador
25 del agente reticulante tal como una amina de bajo peso mole-

1 ular. (A medida que aumenta la concentración de agente re-
 ticulante, puede aumentar la tendencia a la formación de pro-
 ductos de polimerización insolubles y esto puede ser evitado
 mediante la adición de una parte del desactivador antes de
5 la adición del agente-reticulante). La cantidad de desactiva-
 dor agregada es suficiente para reaccionar con el grupo fun-
 cional que no ha reaccionado del agente reticulante combinado
 a un radical hemoglobina, habitualmente una cantidad estequio-
 métrica o un exceso de hasta 250 equivalentes de desactivador
10 por cada equivalente de agente reticulante. Después de la adi-
 ción del desactivador, la mezcla de reacción se agita duran-
 te 18 a 24 horas más a temperatura reducida. La mezcla de reac-
 ción cruda se clarifica por centrifugación y se dializa fren-
 te a una solución electrolítica isotónica. La polihemoglobina
15 soluble obtenida es esterilizada filtrándola a través de un
 filtro con un tamaño de poro de alrededor de 0,20 a 0,45 mi-
 cras, preferiblemente 0,22 micras.

 Los agentes reticulantes polifuncionales adecuados pa-
 ra los fines de esta invención son preferiblemente solubles
20 en agua y reaccionan con los centros reticulables de la hemo-
 globina para dar un producto reticulado soluble en agua. Los
 agentes reticulantes utilizados no afectan adversamente a la
 hemoglobina, a su solubilidad ni a su función de combinarse
 reversiblemente con el oxígeno para suministrarlo a los teji-
25 dos y órganos. Los agentes reticulantes polifuncionales con-

1

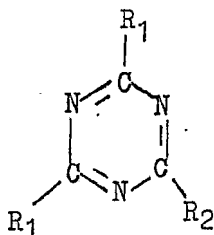
tienen por lo menos dos grupos funcionales y pueden ser iguales o diferentes. Estos grupos son capaces de reaccionar y reticular a los grupos amino y a otros centros reticulables de la molécula de hemoglobina. Por grupos amino se entienden los grupos α -amino N-terminales de las cadenas de hemoglobina y los de los restos de aminoácidos básicos tales como lisina y arginina. Los grupos funcionales del agente reticulante pueden estar combinados covalentemente entre sí o pueden estar separados por un grupo alifático o un anillo aromático.

5

10

Los grupos funcionales estabilizados aromáticos ilustrativos son los grupos azo y halógeno activados con un grupo nitro. Estos incluyen los compuestos con un anillo heterocíclico que contienen grupos reactivos ligados al anillo, tales como las triazinas de fórmula:

15



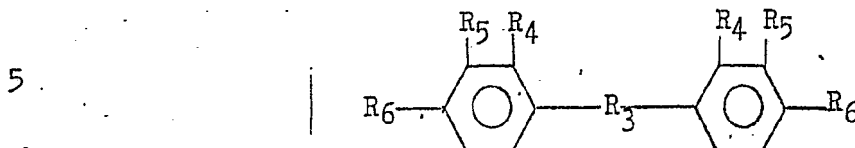
20

donde R₁ es un halógeno con un número atómico de 9 a 35, ambos inclusive y R₂ es un sustituyente nucleofílico tal como un grupo alifático (v.g. alquilo de 1 a 8 átomos de carbono) o aromático, halógeno de número atómico 9 a 35 ambos inclusive o un grupo amino. Los agentes reticulantes abarcados por esta fórmula son la 2-amino-4,6-dicloro-s-triazina y

25

1 la cloro-s-triazina.

También son agentes reticulantes útiles los compuestos aromáticos estabilizados de fórmula:

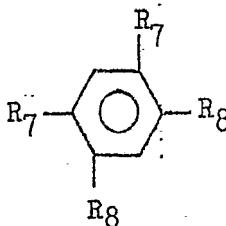


10 donde R_3 es un enlace covalente, alquileo de 1 a 5 átomos de carbono, fenileno, oxi, sulfonilo o sec-amino; R_4 es halógeno o nitro; R_5 es hidrógeno, nitro, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, sulfo o carbacilo, y R_6 es halógeno, diazo, isocianato o isotiocianato. Los compuestos representativos sbarcados por la fórmula anterior son el ácido bis-diazobencidin-2,2'-sulfónico, la 4,4'-difluor-3,3'-dinitrofenilsulfona y el difenil-4,4'-di-isotiocianato.

15

Otros agentes reticulantes útiles son los compuestos de fórmula:

20



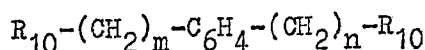
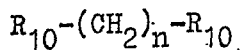
25 donde R_7 es halógeno de número atómico 9 a 35 ambos inclusive y R_8 es nitro o hidrógeno, siendo nitro por lo menos un grupo R_8 . Un compuesto representativo es el 1,5-difluor-2,4-dinitrobenceno.

1

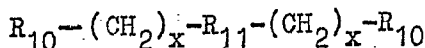
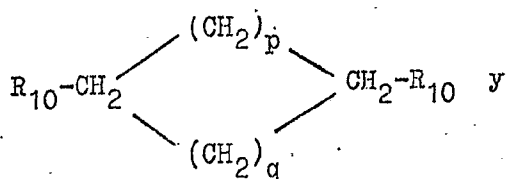
Todavía otros agentes reticulantes útiles son los com-
puestos de fórmula $(R_9)_2C=O$ donde R_9 es hidrógeno o halógeno
de número atómico 9 a 35 ambos inclusive.

5

Otros agentes reticulantes útiles son los compuestos
de fórmulas:



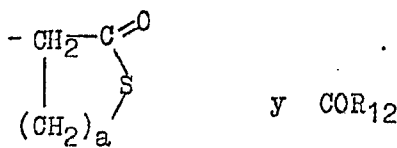
10



15

donde n es un número entero de 1 a 8 ambos inclusive; m es
un número entero de 0 a 3 ambos inclusive; p es un número
entero de 0 a 4 ambos inclusive; q es un número entero de 1
a 5 ambos inclusive; R_{10} es un grupo funcional definido ante-
riormente tal como isocianato, vinilo, imino, isotiocianato,
isocianuro, aldehído, epóxido, cloroformiato, tricloroformia-
to o éster imidoalquílico o grupos de fórmulas:

20



25

donde a es un número entero de 1 a 3 ambos inclusive y R_{12}
es halógeno o azo; y R_{11} es oxi, sulfonilo o un grupo amino
divalente.

1 Los reactivos reticulantes comerciales ilustrativos
de los abarcados por las fórmulas anteriores son la divinil-
sulfona, epiclorohidrina, diepóxido de butadieno, éter digli-
cidílico de etilenglicol, éter diglicídico de glicerol,
5 dihidrocloruro de suberimidato de dimetilo, dihidrocloruro
de malonimidato de dimetilo y dihidrocloruro de adipimidato
de dimetilo.

 Los agentes reticulantes representativos que contie-
nen un grupo isocianato o isotiocianato son el ácido dife-
10 nil-4,4'-di-isotiocianato-2,2'-disulfónico, toluen-di-iso-
cianato, toluen-2-isocianato-4-isotiocianato, 3-metoxidifenil-
metano-4,4'-di-isocianato, propilen-di-isocianato, butilen-
di-isocianato y hexametilen-di-isocianato.

 Los agentes reticulantes representativos de los que
15 contienen una función aldehído o dialdehído son formaldehído,
paraformaldehído, ureas activadas con formaldehído como 1,3-
bis(hidroximetil)urea y N,N'-di(hidroximetil)imidazolidinon
glioal, dialdehído malónico, dialdehído succínico, glutaral-
dehído, adipaldehído, 3-metilglutaraldehído, propiladipalde-
20 hído, dialdehído ftálico, tereftaldehído y dialdehído maló-
nico.

 Otros agentes reticulantes son los derivados de áci-
dos carboxílicos y de radicales de ácido carboxílico de la
hemoglobina activados in situ para dar un derivado reactivo
25 de la hemoglobina que se reticula con las aminas de otra hemo-

1 globina. Los ácidos carboxílicos típicos útiles para este fin
son los de fórmulas $\text{CO}_2\text{H}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$ y $[(\text{CH}_2)_n\text{COOH}]_3\text{CH}$, donde
n es 1 a 8. Entre estos ácidos carboxílicos se encuentran
los ácidos cítrico, malónico, adípico y succínico. los acti-
5 vadores del ácido carboxílico son el cloruro de tionilo, las
carbodiimidias, el 3'-sulfonato de N-etil-5-fenil-isoxazolio
(reactivo K de Woodward), N,N'-carbonildiimidazol, perclorato
de N-terc-butil-5-metilisoxazolio (reactivo E de Woodward),
1-etil-3-dimetil-aminopropilcarbodiimida y meto-p-toluensul-
10 fonato de 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)carbodiimida.

El agente reticulante también puede ser un precursor
de un dialdehído que forme fácilmente un dialdehído bifun-
cional en el medio de reacción. Los precursores de dialdehi-
dos adecuados son la acroleína dímera o el 3,4-dihidro-1,2-pi-
15 ran-2-carboxaldehído que experimenta escisión del anillo en
un ambiente acuoso para dar α -hidroxi-adipaldehído. Otros
precursores que por hidrólisis forman un agente reticulante
son el 2-etoxi-3,4-dihidro-1,2-pirano que forma glutaraldehi-
do, el 2-etoxi-4-metil-3,4-dihidro-1,2-pirano que forma 3-me-
20 tilglutaraldehído, el 2,5-dietoxitetrahidrofurano que forma
dialdehído succínico y 1,1,3,3-tetraetoxipropano que forma
dialdehído malónico y formaldehído a partir de trioxano.

El desactivador del agente reticulante que se agrega
a la mezcla de polimerización para apagar la reacción (u opcio-
25 nalmente cuando se agrega inicialmente para regular la reac-

1 ción de reticulación) es un reactivo monofuncional, difun-
cional o multifuncional, preferiblemente una amina primaria
de fórmula R-NH₂. La amina debe ser soluble en agua para con-
tribuir a mantener las características de solubilidad de la
5 hemoglobina polimerizada. Las aminas de bajo peso molecular
típicas que pueden ser utilizadas son la glicina, lisina,
serina, treonina, alanina, etanolamina, ácido 2-aminoadípico
y glutatión. Otros compuestos capaces de desactivar a los
agentes reticulantes son los terminadores como bisulfitos
10 y dioles capaces de desactivar a los aldehídos, alcoholes
de bajo peso molecular para desactivar a los ácidos carboxí-
licos activados, haluros e isocianatos activados y sulfhidri-
los para desactivar a los epóxidos y vinilos.

Los siguientes ejemplos se dan como representativos de
15 la invención y no se pretende que limiten el alcance de la
misma en modo alguno.

EJEMPLO 1

Preparación de la solución de hemoglobina

20 El material de partida está constituido por cinco uni-
dades de sangre humana anticuada que contiene una solución
anticoagulante de ácido-citrato-dextrosa. La sangre se obtu-
vo de un banco de sangre local. Primero se vertió la sangre
desde las bolsas del banco de sangre en tubos de centrífuga
de 500 ml tratados en autoclave. Se taparon los tubos y la
25 sangre, constituida por eritrocitos, leucocitos, plaquetas

1 y plasma, fué centrifugada a 5000 rpm (4000 g) durante 30
minutos a 4°C. Después el plasma y la capa de color ante
que contienen los leucocitos y las plaquetas fueron separa-
dos por succión a través de una pipeta estéril y tirados.
5 Los eritrocitos sedimentados que quedaron se lavaron cuatro
veces suspendiéndolos en aproximadamente tres veces su volu-
men de solución salina fisiológica estéril al 0,9 %, enfria-
da con hielo o solución de cloruro sódico al 1,6% estéril. Después
de cada lavado, las células fueron sedimentadas de nuevo por
10 centrifugación y el líquido sobrenadante fué separado y ti-
rado.

A continuación los glóbulos rojos lavados fueron li-
sados con un volumen igual de agua enfriada con hielo o de
solución reguladora de fosfato 0,05M hipertónica a pH 7,2,
15 hasta romper la pared intacta de las células y liberar la
hemoglobina. La lisis fué completada sacudiendo fuertemente
la suspensión acuosa celular durante 1 a 2 minutos a la tem-
peratura ambiente. A continuación las células lisadas se co-
locaron en un embudo de separación estéril de 2 litros, sien-
do el volumen total de la solución de 1500 ml aproximadamen-
te. La mezcla de agua y eritrocitos lisados fué liberada de
20 los estromas por extracción con 350 ml de tolueno de calidad
reactivo enfriado con hielo. La extracción se realizó sacu-
diendo en el embudo durante 5 minutos como mínimo.

25 Después de sedimentarse durante la noche a 4°C, la

1 mezcla de extracción se separa en tres capas: una capa supe-
rior de tolueno que contiene los estromas y los lípidos; una
capa central de residuos celulares y una capa inferior de
5 una solución acuosa rojo oscura de hemoglobina. La capa de
hemoglobina inferior; 800 a 1200 ml, fué separada y centri-
fugada a 19.000 rpm (50.000 g) durante 60 minutos a 4°C pa-
ra sedimentar cualquier residuo celular que pudiera haber
quedado. Si después de la extracción con tolueno no se pro-
duce separación de las capas, se rompe la emulsión celular
10 en tolueno-agua por centrifugación a 5000 rpm (4000 g) duran-
te 30 minutos a 4°C o por tratamiento de la emulsión con
0,15 volúmenes del filtrante Celite[®] 535, que es un fil-
tro de tierra de diatomeas. La solución acuosa de hemoglobi-
na se separa del Celite[®] por filtración a vacío y centrifu-
15 gación a 19.000 rpm (50.000 g). Cualquier traza final de
estromas en la hemoglobina se separa por filtración a tra-
vés de filtros con un tamaño de poro de 0,22 micras o por
paso a través de una capa de 1,5" (38 mm) del material fil-
trante Celite[®] 535 compactado en húmedo, que ha sido pre-
20 viamente lavado con ácido y después lavado con agua estéril
exenta de pirógenos.

A continuación, la solución de hemoglobina exenta de
estromas recién preparada se dializa frente a solución re-
25 guladora de fosfato 0,05M, pH 7,6, empleando un dializador
miniplanta Dow Biofiber[®] 50. Las fibras celulósicas semi-

1 permeables huecas del dializador se lavan primero con formali-
na al 2,5 % y después se enjuagan con agua estéril exenta de
pirógenos para evitar la posible contaminación bacteriana de
la hemoglobina. La parte externa de las fibras huecas de diá-
5 lisis se lava con agua estéril y solución reguladora de fos-
fato estéril. Después se pasa la solución de hemoglobina a
través de las fibras a un caudal de 20 ml por minuto mientras
la solución reguladora se pasa alrededor de la parte externa
de las fibras, la solución reguladora fluye en dirección opues-
10 ta a la hemoglobina a un caudal de 100 ml por minuto. La so-
lución de hemoglobina se pasa repetidamente a través de las
fibras, por lo menos tres veces, para asegurar el intercam-
bio completo de electrolitos y la separación del ion potasio
celular. La solución de hemoglobina se clarifica todavía más
15 y se esteriliza por filtración a presión a través de un fil-
tro de 0,22 micras constituido por ésteres mixtos de celulo-
sa, que puede adquirirse la la Millipore Corporation. La so-
lución de hemoglobina exenta de estromas se analiza para de-
terminar si está libre de estromas por adición gota a gota
20 de alrededor de 1 ml de sulfato amónico saturado, enfriado
con hielo, a 1 ml de solución de hemoglobina, con constante
agitación. La ausencia de un precipitado indica que la solu-
ción está exenta de estromas. La solución de hemoglobina se
guarda a 4-6°C hasta que se necesita.

25

La solución de hemoglobina se analiza para determinar

1 la cantidad de methemoglobina y hemoglobina total en la pre-
paración. En oxihemoglobina, el hierro del grupo heme es di-
valente; cuando la hemoglobina es oxidada a methemoglobina,
5 el hierro está presente en el estado trivalente. Como la met-
hemoglobina es incapaz de transportar ligandos tales como CO,
O₂ y NO, su presencia en cantidades significativas es inde-
seable en la preparación de hemoglobina. La presencia de met-
hemoglobina fué determinada espectrofotométricamente por el
10 método de la cianomethemoglobina que es una variante modifica-
da del procedimiento de Hawk's Physiological Chemistry, pág.
1096, 1968. Las concentraciones de hemoglobina y methemoglo-
bina de la solución de hemoglobina fueron determinadas como
sigue: en primer lugar, la solución de hemoglobina se diluye
15 a una concentración de aproximadamente 10 mg/ml (Solución A)
y la absorbancia de la solución se mide a 630 nm frente a agua
(L₁). Se añade una gota de una solución de KCN (1 parte de
KCN al 10 % y 1 parte de fosfato 0,05M, pH 7,6) y se mezcla
la solución. Esta adición convierte cualquier methemoglobina
20 presente en cianomethemoglobina. Al cabo de 2 minutos, se
lee de nuevo la absorbancia de la solución a 630 nm frente a
agua destilada (L₂). La cianomethemoglobina no absorbe a
630 nm. Después se diluye 1 ml de solución A con 9 ml de agua
destilada. Se añade una gota de ferricianuro potásico al 20 %
25 y al cabo de 2 minutos se añade una gota de KCN al 10 %. Se
mezcla la solución y se lee su absorbancia a 540 nm frente a

1 un blanco constituido por 10 ml de agua que contiene una gota
de ferricianuro potásico al 20 % y una gota de KCN al 10 %
(L₃). La concentración de methemoglobina y hemoglobina se cal-
cula como sigue:

5 Concentración de methemoglobina (mM) = $\frac{I_1 - I_2}{3,7}$ x factor de
dilución de la solución A, (ϵ mM = 3,7 para la methemoglobina
a 630 nm).

10 Concentración total de hemoglobina (mM) = $\frac{I_3}{11,0}$ x factor de
dilución de la solución A x 10 (ϵ mM = 11,0 para la cianomethe-
moglobina a 540 nm).

15 Los resultados para la hemoglobina recién preparada,
fueron 0 % y 0,3 % (peso/volumen) de methemoglobina mientras
que la concentración total de hemoglobina fué habitualmente
de 13 a 14 % (peso/volumen) o 130-140 mg de hemoglobina por mi-
lilitro.

20 La oxidación de hemoglobina a methemoglobina para deter-
minar el coeficiente de extinción milimolar a la longitud de
onda de máxima absorbancia fué realizada haciendo reaccionar
la hemoglobina con ferricianuro potásico, encontrándose este
último presente en un exceso del 5 % sobre el equivalente heme.
Cualquier exceso de reactivos de bajo peso molecular fué sepa-
rado por diálisis frente a solución reguladora de fosfato 0,2M
con un pH de 6,8, seguido de diálisis frente a agua destilada
25 en vidrio de acuerdo con el método descrito en Science, vol.

1 144, pág. 68, 1968.

5 Para determinar los coeficientes de extinción milimo-
lar, se determinó el contenido en hierro de la muestra por
espectroscopía de absorción atómica, de acuerdo con el pro-
cedimiento de Am. J. Clin. Path., vol. 48, págs. 225 a 228,
1967 y la modificación descrita en The Physiologist, vol. 15,
pág. 138, 1972. Con la modificación, se añade una solución
al 0,007 % de albúmina a los patrones de hierro de referencia
para equilibrar la concentración de proteína en los patrones
10 y en las muestras.

A partir de la absorbancia de la solución a la longi-
tud de onda de máxima absorbancia, λ , y el contenido en hie-
rro de la muestra, se calculan los coeficientes de extinción
de acuerdo con la fórmula siguiente:

15
$$\epsilon = \frac{\text{Absorbancia a } \lambda_{\text{max}}}{\text{moles Fe}}$$

20 Empleando los procedimientos indicados, cuando la hemo-
globina preparada de acuerdo con el Ejemplo 1 se oxida a methe-
moglobina da un $\epsilon = 3,7 \times 10^3$ a 630 nm y cuando se añade cianuro un $\epsilon = 11,1 \times 10^3$ a 540 nm. Las propiedades espectrales
de la hemoglobina y de la polihemoglobina en forma de methemo-
globina o de cianomethemoglobina están indicadas en la Ta-
bla II.

25

1 dejar que la temperatura de la solución pase de 15°C. La so-
lución clarificada se dializa frente a una solución electro-
lítica apropiada para separar el glutaraldehído que no se ha
combinado y el exceso de lisina. El volumen total después de
5 la diálisis es de 350 ml, con un pH de 6,77 a 37°C en solu-
ción salina fisiológica normal.

Opcionalmente, pueden agregarse cationes y otros com-
ponentes a la solución de polihemoglobina en esta fase del
procedimiento. Asimismo, el pH puede ser ajustado al pH del
10 medio de uso y la solución puede ser esterilizada por filtra-
ción a través de una unidad de filtración tratada en autocla-
ve y provista de un filtro con un tamaño de poro de 0,22 mi-
cras aproximadamente.

El análisis espectral de la solución en la región ultra-
15 violeta y visible da la curva de absorción mostrada en la Fi-
gura 1. El análisis espectral de la hemoglobina polimerizada
desoxigenada obtenida por equilibración de la solución con
nitrógeno da la curva de la Figura 2. Se determinaron los coe-
ficientes de extinción molar de la polimethemoglobina y la po-
20 licianomethemoglobina preparadas por oxidación de la polihemoglo-
bina con ferricianuro potásico y los resultados se encuentran
en la Tabla II.

El análisis de la reticulación intermolecular entre los
25 tetrameros de hemoglobina fué realizado por filtración de gel
utilizando una poliacrilamida biológicamente inerte con un lí-

1 mite de exclusión de pesos moleculares de 150.000 daltons.
El material eluido fué examinado a 546 nm. El perfil de elu-
ción resultante indica que las condiciones de reacción em-
pleadas producen más del 90 % de hemoglobina de peso macromo-
5 lecular, ya que la mayoría (> 90 %) de la proteína eluida
es excluida de los poros del gel. El gel de poliacrilamida
es un producto comercial vendido como Bio-Gel [®]P-150 de los
Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, Estados Unidos.

10 Se obtuvo una nueva evidencia de la reticulación cova-
lente por electroforesis en sulfato de dodecilo-gel de poli-
acrilamida. El procedimiento utilizado está descrito en J. Biol.
Chem., vol. 244, págs. 4406 a 4412, 1969. El resultado de es-
te análisis indica que la desoxihemoglobina polimerizada con
15 glutaraldehído está constituida por agregados reticulados co-
valentemente cuyos pesos moleculares corresponden a múltiples
integrales del monómero, $1 < n < 8$.

El peso molecular de la hemoglobina polimerizada fué
determinado por cromatografía de permeación de gel. Los pro-
cedimientos para las determinaciones del peso molecular están
20 descritos en Biochim. Biophys. Acta, vol. 79, págs. 393 a
406, 1964.

Para la determinación del peso molecular se utilizó la
permeación de gel a través de gel de agarosa. El gel de agarosa
tiene un límite de exclusión de pesos moleculares de $20 \times$
25 10^6 daltons. Las perlas esféricas de gel de agarosa se encuen-

1 tran en el mercado con el nombre de Sepharose [®] 4-B de Phar-
macia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia. La elución a través
de una columna, calibrada con proteínas globulares, dió el
peso molecular promedio en número, \bar{M}_N , el peso molecular pro-
5 medio en peso \bar{M}_W y el grado de polimerización, G.P., para la
hemoglobina polimerizada. Estos resultados se encuentran en
la Tabla I.

La polihemoglobina fué caracterizada también por me-
didas de viscosidad y osmolaridad. Los resultados indican que
10 la viscosidad de la desoxihemoglobina reticulada con glutaral-
dehído es mayor que la de la hemoglobina y también muestran
un comportamiento newtoniano que indica la independencia de
la viscosidad con respecto al grado de cizallamiento. Este po-
límero presentó un gran aumento de la viscosidad relativa con
15 la concentración, como puede verse en la Figura 4 y como está
ilustrado por la curva que interconecta los círculos. Los valo-
res de la viscosidad fueron obtenidos con un viscosímetro
Ostwald nº 25, a 37°C, de acuerdo con la norma ASTM:D 2162-64.
La osmolaridad fué medida con un osmómetro de presión de va-
20 por, modelo 302B, Hewlett Packard, calibrado empleando los
patrones de punto de congelación avanzado NaCl. Las solucio-
nes de hemoglobina polimerizada en un vehículo fisiológico
eran todas iso-osmóticas, 300 mOsm/kg H₂O ($\pm 10\%$) con una
viscosidad intrínseca $[\eta] = 0,091$ decilitros/gramo.

25 El grado de combinación catiónica a la polihemoglobina

1 fué determinado añadiendo ion calcio o ion magnesio a la so-
lución. Las muestras fueron incubadas a 4°C durante 15 minu-
tos a 18 horas y la hemoglobina macromolecular fué separada
5 del disolvente por centrifugación a través de una membrana
ultrafiltrante con un límite de retención de pesos molecula-
res de 50.000. Estos ultrafiltros son vendidos con el nombre
de Centriflo® Membrane Ultrafilters por la Amicon Corporation,
Lexington, Massachusetts, Estados Unidos. En el filtrado trans-
parente se analizó el contenido en calcio o magnesio utilizan-
do Calcium Rapid Stat® y Magnesium Rapid Stat® que se pue-
10 den adquirir de la Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois,
Estados Unidos. Los resultados indican que no se produjo com-
binación de ion calcio ni de ion magnesio con la polinemoglo-
bina.

15 La esterilidad de las soluciones fué determinada por
procedimientos corrientes para medios líquidos, Farmacopea
de Estados Unidos XVIII, págs. 856 a 865, 1970. Todas las mues-
tras que pasaron a través de un filtro de 0,22 micras resulta-
ron estériles.

20 El análisis de la hemoglobina polimerizada para deter-
minar el contenido total en hemoglobina y methemoglobina por
el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 dió una concentra-
ción de hemoglobina de alrededor del 8 % en peso/volumen y
una concentración de methemoglobina inferior al 0,6 % en pe-
25 so/volumen, indicando que la hemoglobina-hierro está preserva-

1 da en estado divalente. La capacidad de combinación de oxígeno
fué medida en un aparato Van Slyke de acuerdo con el procedi-
miento de J.Biol.Chem., vol. 61, págs. 523 a 573, 1924 y se
5 encontró que era próxima al 100 %. La afinidad por el oxígeno
de la hemoglobina macromolecular, medida como la presión par-
cial de oxígeno requerida para semi-saturar la solución de po-
lihemoglobina, resultó ser de 22 mm Hg de presión de oxígeno o
P₅₀ - 22 mm Hg, a la presión atmosférica y a 37°C, teniendo la
solución un pH de 7,1. La curva de disociación de oxígeno está
10 ilustrada en la Figura 3.

Las curvas de disociación de oxígeno de la hemoglobina
y sus derivados fueron determinadas equilibrando primero una
muestra de hemoglobina por tonometría con una mezcla gaseosa
de composición conocida y después midiendo espectrofotométrica-
15 mente la muestra equilibrada. Las curvas de disociación de oxí-
geno para la hemoglobina y sus derivados se determinaron tam-
bién tomando hemoglobina tonomedida y midiéndola fotométricamen-
te en un medidor de saturación de oxígeno. El procedimiento y
el tonómetro utilizados para estas determinaciones están descri-
20 tos en Pflügers Archiv., vol. 15, págs. 418 a 424, 1960;
Operators Manual - 137 Tonometer, págs. 1 a 14 y 37 a 42, 1965,
publicado por Instrumentation Laboratory, Inc., Lexington,
Massachusetts, Estados Unidos, y J.Appl.Physiol., vol. 28,
págs. 227 a 233, 1970. Los procedimientos de saturación de oxí-
25 geno son conocidos en la técnica en Scan.J.Clin.Lab.Inv., vol. 14,

1 págs. 587 a 597, 1962.

EJEMPLO 3

Reacción de oxihemoglobina con glutaraldehído: la poli-
merización de oxihemoglobina con glutaraldehído se realizó
5 repitiendo el procedimiento del Ejemplo 2 con todas las con-
diciones indicadas a excepción de que las soluciones y el me-
dio de reacción se mantienen aerobios por equilibración con
aire u O_2 al 100 %. Opcionalmente, la solución de oxihemoglobi-
na polimerizada puede ser esterilizada filtrando a través de
10 un filtro de 0,45 micras.

El análisis de la reticulación intermolecular fue rea-
lizado por filtración de gel, como en el Ejemplo 2 y el perfil
de elución resultante indica que la reacción produce hemoglo-
bina macromolecular al 90 %. Los resultados del análisis de
15 pesos moleculares están indicados en la Tabla I. La solución
de oxihemoglobina macromolecular es iso-osmótica, 300 mOsm/kg
 H_2O (± 10 %) con una viscosidad intrínseca $[\eta] = 0,110$ decilili-
tros por gramo. Este polímero presenta un gran aumento de la
viscosidad relativa con la concentración como se ilustra en
20 la Figura 4 mediante la curva que interconecta los triángulos.

El análisis de la polihemoglobina para determinar la
hemoglobina y methemoglobina totales da una concentración de
hemoglobina alrededor del 8 % en peso/volumen y una concentra-
ción de methemoglobina inferior a 0,6 % en peso/volumen. Se en-
25 contró que la capacidad de oxígeno era próxima al 100 %, sien-

1 do la P_{50} de 4 mm Hg de presión de oxígeno, a la presión
atmosférica a 37°C , con la solución a pH 7,1 y con una cur-
va de disociación de oxígeno como la mostrada en la Figura 5.

EJEMPLO 4

5 Reacción de desoxihemoglobina con divinilsulfona: a un
matraz de 1 litro equilibrado con argón a unos 4°C se añaden
anaeróbicamente 250 ml de solución de desoxihemoglobina al
14 % en peso/volumen en solución reguladora de fosfato 0,05M,
con un pH de 7,1 y un contenido en methemoglobina inferior a
10 0,3 % en peso/volumen. La solución se mantiene anaerobia me-
diante paso continuo de nitrógeno húmedo. Después la solución
de desoxihemoglobina se equilibró con nitrógeno durante 18 ho-
ras para eliminar cualquier posible contaminación por aire.

15 A continuación se añadieron 115 mg (0,85 ml) de divinil-
sulfona y la solución reaccionante se agitó a 4°C durante 72
a 96 horas. Cada 24 horas se midió el pH de una pequeña mues-
tra alícuota de unos 0,5 cc de la solución reaccionante y se
determinó el progreso de reacción por filtración de gel a tra-
vés de Bio-Gel [®]P-150 como se ha descrito anteriormente. Cuan-
do fué necesario, se ajustó el pH a 7,2-7,4 aproximadamente
20 con NaOH 1N. Cuando la filtración de gel indicó que aproxima-
damente del 80 al 90 % del material rojo había sido excluído
del gel, es decir, $M_w > 150.000$ daltons, la solución reaccionan-
te se apagó por adición de 30 ml de solución de lisina 1,3M
25 desaireada para desactivar los grupos vinilo que no habían

1 reaccionado. Después la solución de reacción se mantuvo anaerobia y se agitó durante 18 horas más.

5 Después de apagar la reacción, la solución fué oxigenada con oxígeno al 100 % y clarificada por centrifugación y filtración a través de un filtro Millipore [®] de 0,65 micras. Estas operaciones y todas las operaciones subsiguientes fueron realizadas sin dejar que la temperatura pasara de 15⁰C. Después la solución clarificada fué dializada frente a un electrolito para separar la divinilsulfona no combinada y el exceso de lisina. El volumen total después de la diálisis era 10 de 280 ml, con un pH de 6,92 a 37⁰C en solución salina fisiológica. La solución de hemoglobina macromolecular fué mezclada con un vehículo fisiológico, el pH se ajustó dentro del intervalo fisiológicamente aceptable, como se ha descrito en 15 el Ejemplo 2 y la solución se esterilizó por filtración a través de un filtro Millipore [®] con un tamaño de poro de 0,22 micras.

20 El porcentaje de conversión de la hemoglobina en hemoglobina macromolecular fué determinado por filtración de gel y se obtuvo la evidencia de la reticulación covalente por electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando dodecilsulfato sódico, como se ha descrito en el Ejemplo 2. Se encontraron resultados similares para la desoxihemoglobina reticulada con divinilsulfona así como para la desoxihemoglobina reticulada con glutaraldehído y descrita en el Ejemplo 2. El análisis 25

1 sis espectral de la solución oxigenada en la región ultra-
violeta y visible da el espectro de absorción mostrado en
la Figura 6. El análisis espectral de la solución de hemo-
globina macromolecular desoxigenada por equilibración con
5 nitrógeno da el espectro de la Figura 7. Los resultados de
la determinación del coeficiente de extinción molar se en-
cuentran en la Tabla II.

 Los resultados de las determinaciones de los pesos
moleculares utilizando cromatografía de permeación de gel y
10 métodos de viscosidad están en la Tabla I. La solución de po-
lihemoglobina en un vehículo fisiológico era iso-osmótica,
300 mOsm/kg H₂O (\pm 10 %), con una viscosidad intrínseca
[η]= 0,139 decilitros por gramo. La viscosidad relativa es
esencialmente independiente de la concentración como muestra
15 la Figura 4, donde este polímero está representado por la cur-
va que interconecta los cuadrados. El análisis de la hemoglo-
bina macromolecular para determinar la hemoglobina y methemo-
globina totales da una concentración de hemoglobina de alre-
dedor de 8,5 % en peso/volumen y una concentración de methe-
20 moglobina inferior a 0,4 % en peso/volumen. Se encontró que
la capacidad de oxígeno era aproximadamente del 100 % con
un valor de la P₅₀ de 100-120 mm Hg de presión de oxígeno,
a la presión atmosférica y a 37°C, teniendo la solución un
pH de 6,9 y presentando la curva de disociación de oxígeno
25 mostrada en la Figura 8.

1

EJEMPLO 5

5

Reacción de oxihemoglobina con divinilsulfona: el procedimiento para la reacción de oxihemoglobina con divinilsulfona fué el indicado en el Ejemplo 4 a excepción de que todas las soluciones y el medio de reacción se mantuvieron aerobios por equilibración con aire u O_2 al 100 %. El tiempo requerido para que la reacción fuera completa, determinado mediante elución a través de Bio-Gel[®] P-150, fué alrededor de 96 horas.

10

15

20

25

La conversión en hemoglobina de peso macromolecular fué determinada por filtración de gel y la evidencia de reticulación covalente fué obtenida por electroforesis en gel de poli-acrilamida y utilizando dodecilsulfato sódico como se ha descrito en el Ejemplo 2. Se encontraron resultados similares para la oxihemoglobina reticulada con divinilsulfona así como para la desoxihemoglobina reticulada con glutaraldehído o divinilsulfona, como se describe en los Ejemplos 2 y 4. El análisis espectral de la solución oxigenada en la región ultravioleta y visible dió los espectros de absorción indicados en la Figura 9. Los resultados de las determinaciones de los pesos moleculares utilizando cromatografía de permeación de gel y métodos de viscosidad están indicados en la Tabla I. En la Tabla II se encuentran los coeficientes de extinción para la polihemoglobina en forma de methemoglobina y ciano-methemoglobina.

La solución de oxihemoglobina reticulada en un vehícu-

1 lo fisiológico era iso-osmótica, 300 mOsm/kg H₂O (+ 10 %) con una viscosidad intrínseca $[\eta] = 0,061$ decilitros por gramo. La viscosidad relativa era esencialmente independiente de la concentración, como muestra la curva que interconecta los rombos en la Figura 4. El análisis de la oxihemoglobina macromolecular para la hemoglobina y la methemoglobina total dió una concentración de hemoglobina de alrededor de 6,5 % en peso/volumen y una concentración de methemoglobina inferior a 0,4 % en peso/volumen. Se encontró que la capacidad de oxígeno era próxima al 100 % y se halló una P₅₀ de 4 mm Hg de presión de oxígeno, a la presión atmosférica y a 37°C, con un pH de la solución de 6,9 y una curva de disociación de oxígeno como la mostrada en la Figura 10.

EJEMPLO 6

15 Reacción de desoxihemoglobina con hexameten-di-isocianato: en un matraz de fondo redondo de 100 ml, equilibrado con argon, se introducen anaerómicamente a 4°C 20 ml de solución de desoxihemoglobina al 12 % en peso/volumen en solución reguladora de fosfato 0,05M con un pH de 7,1 y la solución se mantiene anaerobia mediante paso continuo de argon húmedo gaseoso. La solución se mantiene a esta temperatura y se agita bajo nitrógeno durante 18 horas aproximadamente para eliminar cualquier posible contaminación de aire.

20 A continuación se añaden 0,138 ml de hexameten-di-isocianato a la desoxihemoglobina y las sustancias reaccio-

1 nantes se agitan bajo las condiciones descritas antes duran-
te 72 horas para reticular la desoxihemoglobina. Cualquier
exceso de hexamtilen-di-isocianato que quede en la mezcla
de reacción se inactiva añadiendo 4 ml de solución de lisina
5 1,3M desaireada, seguido de 18 horas de agitación para asegu-
rar la desactivación. La solución se oxigena y se clarifica
por centrifugación.

La conversión en hemoglobina polimerizada se determina
por filtración de gel a través de Biogel [®] P-150. La mayoría
10 del material eluido, 85 %, queda excluido de los poros del
gel indicando un peso molecular de proteína superior a
150.000 daltons. El análisis de la desoxihemoglobina polimeri-
zada para determinar la hemoglobina y la methemoglobina tota-
les dió una concentración de hemoglobina de alrededor de
15 9,5 % (peso/volumen) y una concentración de methemoglobina in-
ferior a 0,7 % en peso/volumen. Se encontró que la P₅₀ de la
hemoglobina polimerizada era de 3,5 mm Hg de presión de oxí-
geno, a la presión atmosférica y a 37°C, con un pH de la so-
lución de 7,1.

20

EJEMPLO 7.

25

Reacción de oxihemoglobina con hexamtilen-di-isocia-
nato: la reacción de oxihemoglobina con hexamtilen-di-isocia-
nato fué llevada a cabo por el procedimiento descrito en el
Ejemplo 6, con todas las condiciones iguales a las descritas
a excepción de que la solución y el medio se mantuvieron aéro-

1 bios por equilibración con aire u oxígeno. El porcentaje de
2 conversión en oxihemoglobina polimerizada, determinado por
3 filtración de gel, dieron resultados concordantes con los
4 obtenidos en el Ejemplo 6, para un rendimiento del 85 % de
5 oxihemoglobina macromolecular.

EJEMPLO 8

Reacción de desoxihemoglobina con dihidrocloruro de
6 suberimidato de dimetilo: la reticulación de la desoxihemo-
7 globina se llevó a cabo como sigue: en un matraz de fondo
8 redondo de 3 bocas y 50 cc de capacidad, lavado con argon y
9 mantenido a 5-10°C, se introdujeron primero 20 ml de desoxi-
10 hemoglobina a una concentración del 13 % en peso/volumen en
11 solución reguladora de fosfato 0,25M con un pH de 8,0 y un
12 contenido en methemoglobina inferior a 0,3 % en peso/volumen,
13 seguidó de la adición de 263 mg de dihidrocloruro de suberimi-
14 dato de dimetilo disueltos en 4 ml de solución saturada y des-
15 aireada de bicarbonato sódico, para producir una mezcla de
16 reacción. El pH de la mezcla se ajustó a 8,0 con NaOH 1N y
17 se mantuvo en este valor mediante la adición de NaH_2PO_4 1M
18 hasta que el pH no cambió durante unos 15 minutos. Se tapó el
19 matraz y se prosiguió la reacción agitando a 4°C durante una
20 hora. Se abrió el matraz y se dejó equilibrar con aire. La
21 reacción se apagó añadiéndole 2 ml de lisina 1,3M y agitando
22 a la mezcla durante 3 horas más para asegurar la interrupción
23 de la reacción. Finalmente la solución fué clarificada por
24
25

1 centrifugación y después dializada frente a solución regula-
dora de fosfato 0,05M a pH 7,6.

5 La conversión en hemoglobina polimerizada fué determi-
nada por filtración de gel a través de Biogel [®] P-150. La
mayoría del material eluido (90 %) fué excluido de los po-
ros del gel indicando un peso molecular superior a 150.000
daltons. Asimismo, la desoxihemoglobina macromolecular tenía
una concentración de hemoglobina de alrededor del 80 % y una
concentración de methemoglobina inferior a 0,6 % en peso/pe-
10 so. Se encontró que la P₅₀ de la hemoglobina polimerizada era
de 2,5 mm Hg de presión de oxígeno, a la presión atmosférica
y a 20°C, teniendo la solución un pH de 7,35.

EJEMPLO 9

15 Reacción de oxihemoglobina con dihidrocloruro de sube-
rimidato de dimetilo: la reticulación de oxihemoglobina con
suberimidato de dimetilo fué llevada a cabo por el procedi-
miento del Ejemplo 8, en igualdad de todas las condiciones a
excepción de que la solución y su medio se mantuvieron aéro-
bios por equilibración con aire. El análisis físico de la
20 oxihemoglobina polimerizada dió resultados concordantes con
la desoxihemoglobina reticulada del Ejemplo 8. La P₅₀ fué
de 2,5 mm Hg de presión de oxígeno, a la presión atmosférica
y 37°C, teniendo la solución un pH de 7,45.

25

--

EJEMPLO 10

1 Polimerización de oxihemoglobina con diepóxido de
butadieno: una solución de 20 ml de oxihemoglobina al 13,4 %
en peso/volumen en solución reguladora de borato 0,05M, con
5 un pH de 8,0 y un contenido en methemoglobina inferior a
0,5 % en peso/volumen, se introdujo en un matraz conteniendo
320 microlitros de diepóxido de butadieno y 370 microlitros
de trietilamina, ambos como líquidos puros. La solución
se agitó a 5°C durante 96 horas bajo aire y después la reacción
10 se apagó por adición de 500 mg de cisteína sólida. El
sólido se disolvió agitando y se dejó reaccionar durante 18
horas. El análisis de la reticulación intermolecular se realizó
por filtración de gel a través de Biogel[®] P-150. La mayoría
del material eluido, 85 %, fué excluido del gel indicando
15 un peso molecular superior a 150.000 daltons. El análisis
de la oxihemoglobina polimerizada para determinar la hemoglobina
y la methemoglobina total dió una concentración de hemoglobina
de alrededor del 9,5 % y una concentración de methemoglobina
inferior a 0,4 % en peso/volumen.

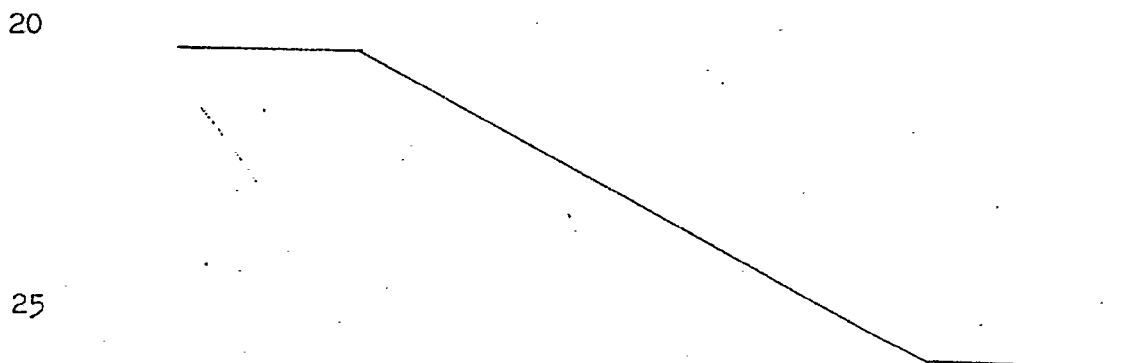


TABLA I

Peso molecular de la hemoglobina polimerizada

Hb polimerizada	Método	\bar{M}_w (x 10 ⁻⁵)	\bar{M}_n (x 10 ⁻⁵)	G.P.	\bar{M}_{visc} (x 10 ⁻⁵)
Ejemplo 2	1	5,3 (+0,8)	0,9 (+0,1)	5,6 (+0,6)	-
	2	-	-	-	1,6
Ejemplo 3	1	11,2 (+1,1)	1,6 (+0,3)	9,6 (+1,8)	-
	2	-	-	-	1,8
Ejemplo 4	1	5,9 (+1,8)	1,1 (+0,1)	6,8 (+0,5)	-
	2	-	-	-	2,3
Ejemplo 5	1	5,0 (+1,4)	0,95 (+0,1)	6,0 (+0,6)	-
	2	-	-	-	1,0

Hb es el símbolo aceptado para la hemoglobina, \bar{M}_w es el peso molecular promedio en peso, \bar{M}_n es el peso molecular promedio en número, G.P. es el grado de polimerización y \bar{M}_{visc} es el peso molecular promedio por viscosidad.

* Método utilizado:

(1) Cromatografía en placa de vidrio - Sepharose $\text{R}/4B$

(2) Viscosidad.

1

TABLA I

Peso molecular de la hemo

5

<u>Hb polimerizada</u>	<u>Método</u> [*]	\bar{M}_w (x 10 ⁻⁵)
Ejemplo 2	1	5,3 (+0)
	2	-
Ejemplo 3	1	11,2 (+1)
	2	-
Ejemplo 4	1	5,9 (+1)
	2	-
Ejemplo 5	1	5,0 (+1)
	2	-

10

15

Hb es el símbolo aceptado para la hemogl
peso molecular promedio en número, G.P. es e
promedio por viscosidad.

^{*} Método utilizado:

20

(1) Cromatografía en placa de vidrio - Se

(2) Viscosidad.

25

TABLA I

peso molecular de la hemoglobina polimerizada

Método ^a	\bar{M}_w (x 10 ⁻⁵)	\bar{M}_n (x 10 ⁻⁵)	G.P.	\bar{M}_{visc} (x 10 ⁻⁵)
1	5,3 (+0,8)	0,9 (+ 0,1)	5,6 (+ 0,6)	-
2	-	-	-	1,6
1	11,2 (+1,1)	1,6 (+ 0,3)	9,6 (+ 1,8)	-
2	-	-	-	1,8
1	5,9 (+1,8)	1,1 (+ 0,1)	6,8 (+ 0,6)	-
2	-	-	-	2,3
1	5,0 (+1,4)	0,95 (+0,1)	6,0 (+ 0,6)	-
2	-	-	-	1,0

o aceptado para la hemoglobina, \bar{M}_w es el peso molecular promedio en peso, \bar{M}_n es el promedio en número, G.P. es el grado de polimerización y \bar{M}_{visc} es el peso molecular viscosidad.

a en placa de vidrio - Sepharose[®] 4B

1

TABLA II

Propiedades espectrales de la hemoglobina y de la hemoglobina
polimerizada

5

Ej.	Hb o Poli(Hb) _n	Forma	λ	$\epsilon \times 10^{-3}$
1	Hb	M	630	3,7
1	Hb	C	540	11,1
2	Poli(Hb) _n	M	630	3,9
2	Poli(Hb) _n	C	540	9,7
4	Poli	C	540	9,4
5	Poli	M	630	3,2
5	Poli	C	540	9,7

10

En la tabla, Hb es la abreviatura para hemoglobina, Poli-(Hb)_n significa hemoglobina polimerizada, M es methemoglobina, C es cianomethemoglobina, λ es la longitud de onda y ϵ es el coeficiente de extinción molar.

15

20

Las hemoglobinas reticuladas exentas de estromas de esta invención son capaces de saturarse con un ligando como oxígeno o monóxido de carbono y transportarlo y liberarlo a un medio de uso o a un receptor del ligando. Esta propiedad hace que las polihemoglobinas sean útiles como sustitutos de la sangre. La polihemoglobina es soluble en medios acuosos, sangre, plasma, soluciones cristaloides, soluciones electrolíticas de pH regulado y soluciones poliméricas coloidales. La polihemoglobina tiene propiedades coloidales-osmóticas fisiológicamente aceptables que la hacen útil como diluyente del plasma san-

25

1 guíneo. La polihemoglobina presenta un periodo de superviven-
cia en plasma prolongado, in vivo, como evidencia una semi-
duración de más del doble de la hemoglobina no polimerizada,
habitualmente alrededor de 12 a 30 horas. Además, como la poli-
5 hemoglobina está exenta de estromas, se evitan los efectos
perjudiciales sobre el sistema renal.

La capacidad de la polihemoglobina para transportar y
suministrar oxígeno a los tejidos y órganos vitales de los
animales, incluidos los animales domésticos como perros y ga-
tos y los animales de granja, como vacas y cerdos, a los mamí-
10 feros y en diversos usos de intercambio de ligandos, es demos-
trada por los ejemplos dados a continuación. En el sentido uti-
lizado en estos ejemplos y en cualquier otra parte de esta me-
moria, la frase "esencialmente exenta de estromas" significa
15 que la polihemoglobina no contiene ningún material estromal
de los glóbulos rojos incluidas las proteínas no hemoglobina,
los fosfolípidos y los lípidos; "semi-duración" significa el
periodo de tiempo en el cual la cantidad inicial de polihemo-
globina en un medio in vivo desciende hasta la mitad de su
20 valor inicial; "curva de disociación" significa el grado en el
cual la polihemoglobina se combinará o contendrá al ligando,
por ejemplo oxígeno, bajo una tensión del ligando compendi-
da entre 0 y 140 mm Hg; "capacidad de combinación de oxígeno"
25 significa la fracción, en %, de la cantidad de oxígeno que pue-
de combinarse con cada grupo heme contenido en la polihemoglo-

1 bina. Por ejemplo, una capacidad de oxígeno del 100 %, signifi-
ca que cada heme contenido en la polihemoglobina puede combi-
nar un máximo de una molécula de oxígeno; "afinidad por el
oxígeno" se refiere al valor de la P_{50} para la polihemoglobi-
5 na, es decir, la presión parcial PO_2 de oxígeno al 50 % de sa-
turación; "sustituto de la sangre" indica la propiedad del ma-
terial de transportar y suministrar oxígeno a los tejidos y
órganos vitales y de mantener la presión oncótica intravas-
cular y "diluyente del plasma" significa la capacidad de las
10 soluciones de polihemoglobina de restaurar el volumen sanguíneo.

EJEMPLO 11

El tiempo de permanencia de la polihemoglobina en el plas-
ma fué medido de la siguiente forma: en primer lugar, el día
antes de la infusión, se colocó un catéter residente en la ve-
15 na safenosa de una pata trasera de dos perros y se calculó el
volumen sanguíneo de los perros por una técnica corriente. El
volumen sanguíneo calculado se basaba en el peso del perro con
la hipótesis de que el volumen sanguíneo de un perro es alre-
dedor del 7 % del peso corporal total del mismo. Después, al
20 día siguiente, se sacó el 20 % del volumen sanguíneo a través
del catéter y se substituyó inmediatamente por un volumen igual
de polihemoglobina a una concentración del 7 % en solución
de Ringer. En un perro diferente, el 20 % del volumen sangui-
neo se substituyó por un volumen igual de hemoglobina humana.
25 nativa. La hemoglobina nativa es hemoglobina aislada no reti-

1 culada, con una concentración del 7 % en solución de Ringer.
Después, se tomaron muestras de sangre de cada perro a inter-
valos de 2 horas hasta que descendió la hemoglobina en el
plasma, según se determinó espectrofotométricamente por el
5 método de la cianomethemoglobina descrito en el Ejemplo 1.
Se determinó la semi-duración de la polihemoglobina y de la
hemoglobina nativa mediante una representación semilogarítmi-
ca del tiempo en función de la concentración de hemoglobina
en el plasma, ya que esto reduce cualquier proceso de descom-
10 posición exponencial a una respuesta lineal. Los resultados
medidos indican que las polihemoglobinas preparadas por los
procedimientos de los Ejemplos 2 a 5 presentan un aumento de
2 a 8 veces en el tiempo de permanencia en el plasma con res-
pecto a la hemoglobina nativa, que presenta un periodo de per-
15 manencia con un valor de la semi-duración de 4 horas en el
plasma de perro.

EJEMPLO 12

20 El mayor tiempo de permanencia de la desoxihemoglobina
reticulada con glutaraldehído como en el Ejemplo 2 y la hemo-
globina fueron medidos en ratas macho con un peso de 250 a
300 g, una de cuyas venas femorales estaba canulada para in-
fusión y una de cuyas arterias femorales estaba canulada pa-
ra tomar muestras de acuerdo con el procedimiento del Ejem-
plo 11. Además, en este ejemplo, el volumen sanguíneo de la
25 rata fué calculado como el 8 % del peso corporal total y la

1 polihemoglobina tenía una concentración del 8 % en solución
salina normal. Las muestras de sangre, de 0,3 ml, fueron cen-
trifugadas a 500 g para sedimentar las células. El plasma con-
teniendo la polihemoglobina fué analizado para determinar la
5 concentración de polihemoglobina por el método espectral con
cianomethemoglobina del Ejemplo 1. Los resultados indican que
la hemoglobina tiene una semi-duración en el plasma de 90 mi-
nutos mientras que la polihemoglobina tiene una semi-duración
prolongada en el plasma de ratas de 315 minutos.

10 EJEMPLO 13

La perfusión total de ratas con polihemoglobina se rea-
lizó de la siguiente forma: en primer lugar, se anestesiaron
unas ratas macho blancas de laboratorio convencionales, con un
peso de 250 a 300 g, empleando 40 mg/kg de pentobarbital só-
15 dico. Después se canularon las arterias femorales y una vena
femoral y se heparinizaron las ratas. Durante todo el estudio
se registró continuamente la presión arterial media de la ra-
ta a través de una arteria femoral y la otra arteria se uti-
lizó para sacar sangre. La vena femoral se utilizó para in-
fundir polihemoglobina.
20

Se determinó el valor hematócrito inicial y se sacaron
2 ml de sangre. A continuación, se infundieron en la rata,
a lo largo de 2 a 3 minutos, 2 ml de hemoglobina polimerizada
preparada de acuerdo con el Ejemplo 2. Después, a intervalos
25 de 5 minutos, se sacó 1 ml de sangre y se infundió 1 ml de

1 polihemoglobina en las ratas y se prosiguió la perfusión has-
ta que se sacó el volumen sanguíneo total de la rata, estima-
do en el 8 % de su peso corporal. Si los animales presentaban
5 síntomas de shock, observados por respiración errática o una
disminución de la presión arterial, se ampliaba el tiempo en-
tre las retiradas de sangre pero se mantenía la velocidad de
infusión de polihemoglobina de 1 ml cada 5 minutos para mante-
ner los animales. Se tomaba una medida del valor hematócrito
cada 15 a 20 minutos y la hemorragia y la infusión se prosi-
10 guieron hasta que el valor hematócrito descendió desde el
45 % hasta menos del 5 %. Durante todos los experimentos, la
piel de la rata presentó un aspecto normal y no apareció nin-
guna fuga de polihemoglobina en los humores extracelulares,
como cuando el volumen de sangre se sustituye por una solu-
15 ción de hemoglobina no polimerizada en solución salina de
glucosa. Los resultados indican que la polihemoglobina sumi-
nistra oxígeno a los tejidos sin difusión en los humores extra-
celulares.

EJEMPLO 14

20 La capacidad de la polihemoglobina para suministrar
oxígeno a los tejidos animales fué observada en un ensayo con
septum de corazón de conejo perfundido aislado, realizado co-
mo sigue: en primer lugar, se sacó el corazón del conejo anes-
tesiado y heparinizado, se canuló la arteria septal y se cor-
25 tó el músculo extraño. Se inició la perfusión con eritrocitos

1 caninos en una solución salina fisiológica de glucosa tan
pronto como se sacó el corazón para evitar posibles daños
al tejido. Después el septum se montó en su bastidor de
manera que pudiera medirse el latido del corazón y la velo-
5 cidad de cambio de la tensión. Se varió el consumo de oxígeno
de los septums modificando el ritmo cardiaco, el caudal
de perfundido y la temperatura de los septums. Se determina-
ron las condiciones experimentales que producían un máximo
consumo de oxígeno de los septums sin pérdida simultánea de
10 la estabilidad septal utilizando eritrocitos caninos como
perfundido. El contenido en oxígeno venoso y arterial fué
medido con un instrumento medidor de oxígeno corriente y la
variación de la saturación de hemoglobina del flujo arterial
al venoso fué medida con el medidor de saturación de oxígeno
15 descrito en el Ejemplo 2.

Los resultados de las medidas de perfusión con la po-
lihemoglobina, como se ha descrito en los Ejemplos 2 a 5,
indican que la saturación de oxígeno disminuye del 50 % al
20 70 % y el contenido de oxígeno disminuye 3 por ciento en
volumen entre el lado arterial y venoso del septum, indicando
que la polihemoglobina en el sistema perfundido in vivo pro-
porciona oxígeno a los tejidos vitales. Un procedimiento ge-
neral para la perfusión en septums aislados está descrito
en J. General Physiology, vol. 52, págs. 682 a 691, 1968.
25

EJEMPLO 15

1 El uso de polihemoglobina para el tratamiento del
shock hemorrágico se llevó a cabo como sigue: en primer lugar,
se sangró un animal a una presión sanguínea baja normal y
5 la sangre perdida, se substituyó por un volumen igual del sus-
tituto de sangre a ensayar. Más tarde el animal fué sangra-
do de nuevo y la relación entre la segunda y la primera pér-
dida expresada como índice de sangría, es $Bl_2/Bl_1 \times 100$. En
este procedimiento, unas ratas macho fueron sangradas hasta
10 una baja presión sanguínea corriente de 30 mm Hg y se mantu-
vieron así durante 45 minutos sacando sangre para mantener
constante la presión. En este momento, se registró el volumen
de sangre sacado dando el valor Bl_1 y se substituyó por sangre,
solución salina, dextrano, albúmina, hemoglobina nativa o po-
15 lihemoglobina. Se dejó que las ratas se recuperasen durante
3 horas y de nuevo se sacó sangre hasta 30 mm Hg obteniéndose
se el valor Bl_2 como se ha descrito antes. Los resultados se
encuentran en la Tabla III e indican que la hemoglobina poli-
merizada actúa de forma similar a la sangre completa de acuer-
do con este modelo de shock hemorrágico. En la tabla, los sus-
titutos son las polihemoglobinas preparadas de acuerdo con
20 los Ejemplos 2 a 5, siendo B la sangre propia de la rata,
S la solución salina fisiológica, A la albúmina, H la hemoglo-
bina nativa y D el dextrano. Los procedimientos para medir el
25 índice de sangría están descritos en Am.J.Physiol., vol. 169,

1 pág. 475, 1952 y Am.J.Physiol., vol. 173, pág. 403, 1953.

TABLA III

<u>Sustituto</u>	<u>Indice de sangría</u>	<u>Animales</u>
Ejemplo 2	100 ± 13	3
5 Ejemplo 3	48 ± 15	4
Ejemplo 4	72 ± 23	5
Ejemplo 5	75 ± 16	3
B	81 ± 13	24
S	27 ± 12	25
10 A	71 ± 9	3
H	36 ± 6	2
D	30 ± 11	17

15 La polihemoglobina puede ser utilizada como sustituto del plasma sanguíneo y como diluyente del plasma sanguíneo, mezclada con un vehículo farmacéuticamente aceptable o con otros sustitutos de plasma o diluyentes del plasma sanguíneo. Los vehículos pueden ser cristaloides entre los que se encuentran la solución salina fisiológica, una mezcla constituida por solución salina y glucosa, solución de Ringer, 20 solución de Ringer lactatada, solución de Locke-Ringer, solución de Krebs-Ringer, solución salina equilibrada de Hartmann y solución heparinizada de citrato sódico-ácido cítrico-dextrosa.

25 La polihemoglobina puede mezclarse con sustitutos poliméricos del plasma, solubles en agua y fisiológicamente

1 aceptables, como óxido de polietileno, poliacrilamida, poli-
vinilpirrolidona, alcohol polivinílico y condensados de óxi-
do de etileno-polipropilenglicol. Además, la polihemoglobi-
na puede mezclarse con sustitutos del plasma coloidales y
5 diluyentes del plasma sanguíneo como polisacáridos lineales
entre los que se encuentran los dextrans con un peso mole-
cular de 40.000 a 70.000, pectinas de goma arábiga, gelatina
fluida equilibrada e hidroxietilalmidón. Generalmente, para
los fines de la invención, la polihemoglobina está conteni-
10 da en una composición a una concentración del 1 a 10 % apro-
ximadamente, mezclada con uno o más de los vehículos anterio-
res. Las composiciones se preparan mezclando la polihemoglo-
bina y el vehículo en proporciones predeterminadas. Por ejem-
plo, puede prepararse una solución del sustituto de la san-
15 gre que comprende 5 % de polihemoglobina en solución salina
normal por adición de 5 g de polihemoglobina a la solución
salina fisiológica, que es una solución de cloruro sódico
al 0,85 % en agua, en cantidad suficiente para 100 ml. Las
polihemoglobinas pueden ser administradas de la forma común-
20 mente empleada en las transfusiones de sangre.

Otras aplicaciones de la polihemoglobina son su empleo
como solución artificial de intercambio de oxígeno en los
oxigenadores convencionales, tales como una derivación
cardiaca, dispositivos para favorecer la circulación extra-
25 corpórea, dispositivos de membranas de fibra hueca y del ti-

1 po de lámina utilizados para favorecer la circulación en los pacientes enfermos.

5 La polihemoglobina puede ser utilizada como fuente de proteínas y oxígeno en microbiología y puede servir también de alimento para los bacilos y estafilococos aerobios para garantizar que el alimento es seguro para el consumo animal y humano. La polihemoglobina puede ser utilizada para el almacenamiento y preservación de los órganos perfundidos aislados viables de los mamíferos para su eventual transplante, en un recipiente, como sustituto de la capacidad portadora de oxígeno de los glóbulos rojos de los mamíferos.

10 Habiendo descrito la invención, se considera como una novedad y, por lo tanto, reclamamos como de nuestra propiedad lo contenido en las siguientes:

REIVINDICACIONES

15 1. Un procedimiento para la preparación de hemoglobina reticulada, polimerizada y soluble en agua, exenta de estromas y capaz de combinar reversiblemente con un ligando, cuyo procedimiento consiste en separar los estromas y los residuos celulares de la hemoglobina; hacer reaccionar la hemoglobina resultante de estromas, con o sin ligandos, con un agente reticulante polifuncional que reacciona con los centros reactivos de la hemoglobina bajo una capa de un gas apropiado y en condiciones que dan lugar a la —

20

25

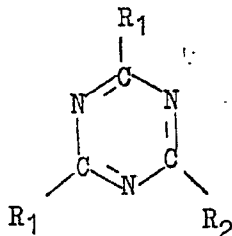
1 formación de polihemoglobina reticulada soluble en agua; y
apagar la reacción por adición de un desactivador del agen
te reticulante a la mezcla de reacción.

5 2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, -
caracterizado porque se hace reaccionar un equivalente de -
hemoglobina con 2,5 a 300 equivalentes del agente reticulan
te, durante 1/4 a 300 horas, a 0-25°C y a la presión atmos-
férica.

10 3. Un procedimiento según la reivindicación 2, -
caracterizado porque la reacción se lleva a cabo entre 0°C
y 10°C.

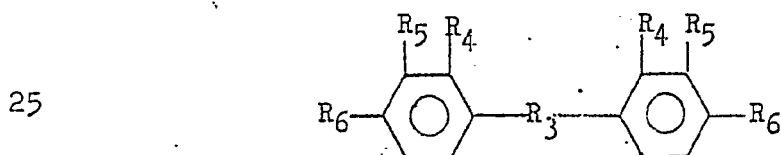
4. Un procedimiento según cualquiera de las rei-
vindicações 1 a 3, caracterizado porque el agente reticu-
lante es:

15 una triazina de fórmula:



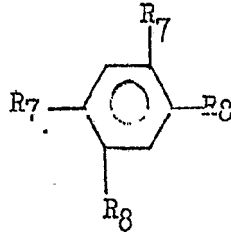
20 donde R₁ es halógeno de número atómico 9 a 35 ambos inclusi-
ve y R₂ es un sustituyente nucleofílico;

un compuesto de fórmula:



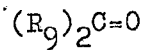
1 donde R_3 es un enlace covalente, alquileo de 1 a 5 átomos
 de carbono, fenileno, oxi, sulfonilo o sec-amino; R_4 es -
 halógeno o nitro; R_5 es hidrógeno, nitro, alquilo de 1 a 8
 5 átomos de carbono, sulfo o carbacilo; y R_6 es halógeno, -
 diazo, isocianato o isotiocianato;

un compuesto de fórmula



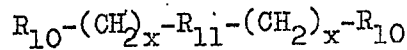
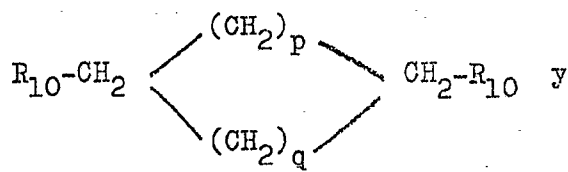
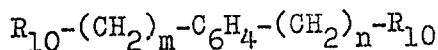
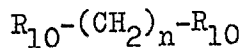
10 donde R_7 es halógeno de número atómico 9 a 35 y R_8 es ni-
 tro o hidrógeno, siendo nitro por lo menos un radical R_8 ;

un compuesto de fórmula



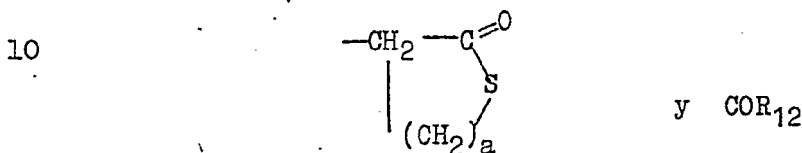
15 donde R_9 es hidrógeno o halógeno de número atómico 9 a 35
 ambos inclusive o

compuestos de fórmulas



25

1 donde n es un número entero de 1 a 8 ambos inclusive; m
 es un número entero de 0 a 3 ambos inclusive; p es un nú-
 mero entero de 0 a 4 ambos inclusive; q es un número en-
 5 tero de 1 a 4 ambos inclusive; x es un número entero de 1
 a 5 ambos inclusive; R₁₀ es un grupo funcional isocianato,
 vinilo, imino, isotiocianato, isocianuro, aldehído, epóxi-
 do, cloroformiato, tricloroformiato o éster imidoalquíli-
 co o grupos de fórmulas



15 donde a es un número entero de 1 a 3 ambos inclusive y R₁₂
 es halógeno o azo; y R₁₁ es oxi, sulfonilo o un grupo amino
 divalente.

20 5. Un procedimiento según cualquiera de las rei-
 vindicaciones 1 a 4, caracterizado porque se añade una -
 cantidad estequiométrica o un exceso de hasta 250 equiva-
 lentes de desactivador por equivalente de agente reticu-
 lante.

25 6. Un procedimiento según cualquiera de las rei-
 vindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el desactivador
 es una amina primaria de bajo peso molecular.

7. Un procedimiento según la reivindicación 1, -
 caracterizado porque la hemoglobina polimerizada tiene un

1 peso molecular de 64.000 a 1.000.000.

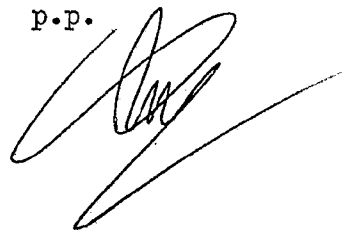
5 8. Un procedimiento según la reivindicación 1 a 7, caracterizado porque la hemoglobina polimerizada es capaz de combinarse reversiblemente con un ligando en una proporción de hasta 60 micromoles de ligando por gramo de polihemoglobina y tiene una viscosidad intrínseca de 0,04 a 0,16 decilitros por gramo.

10 9. Un procedimiento según las reivindicaciones 1, 7 y 8, caracterizado porque la hemoglobina polimerizada presenta una presión parcial de ligando a la semi-saturación de 2,5 a 120 mm Hg a 37°C y un pH neutro.

15 10. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE HEMOGLOBINA RETICULADA POLIMERIZADA Y SOLUBLE EN AGUA.

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de cincuenta y cuatro páginas mecanografiadas y dibujos que se acompañan.

20 Madrid, 17 Febrero 1.976
BERNARDO UNGRIA
p.p.



25

FIG. 1

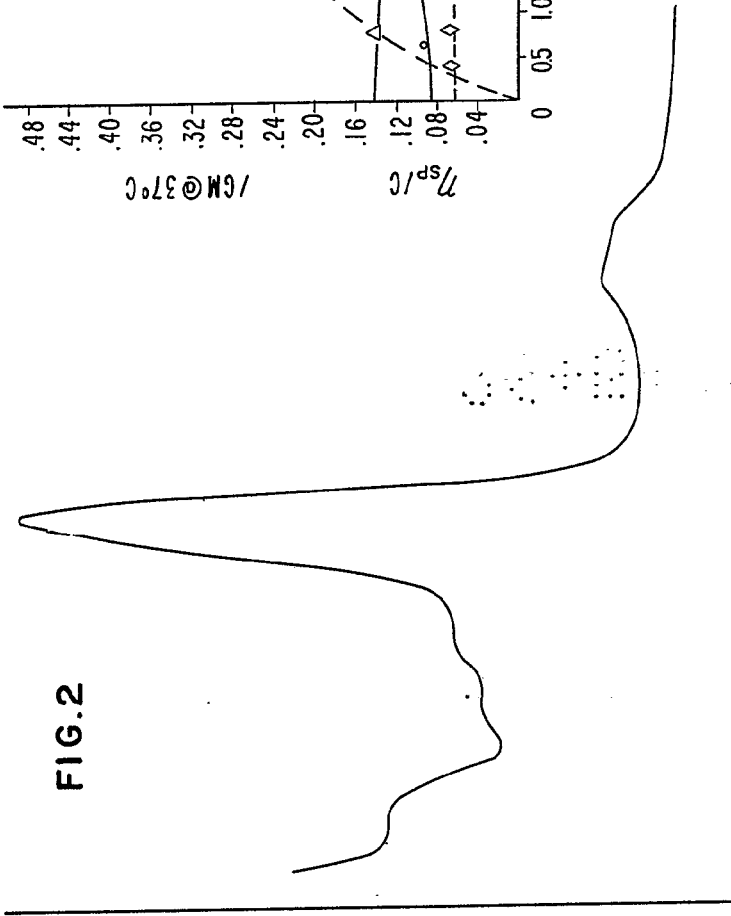


FIG. 2

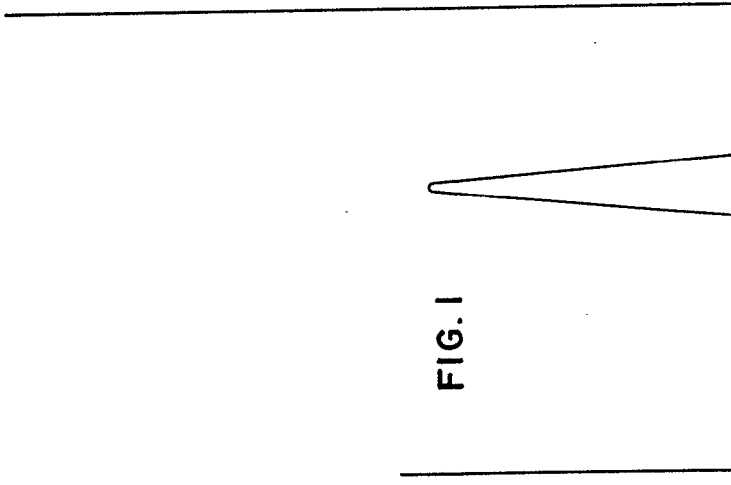


FIG. 3

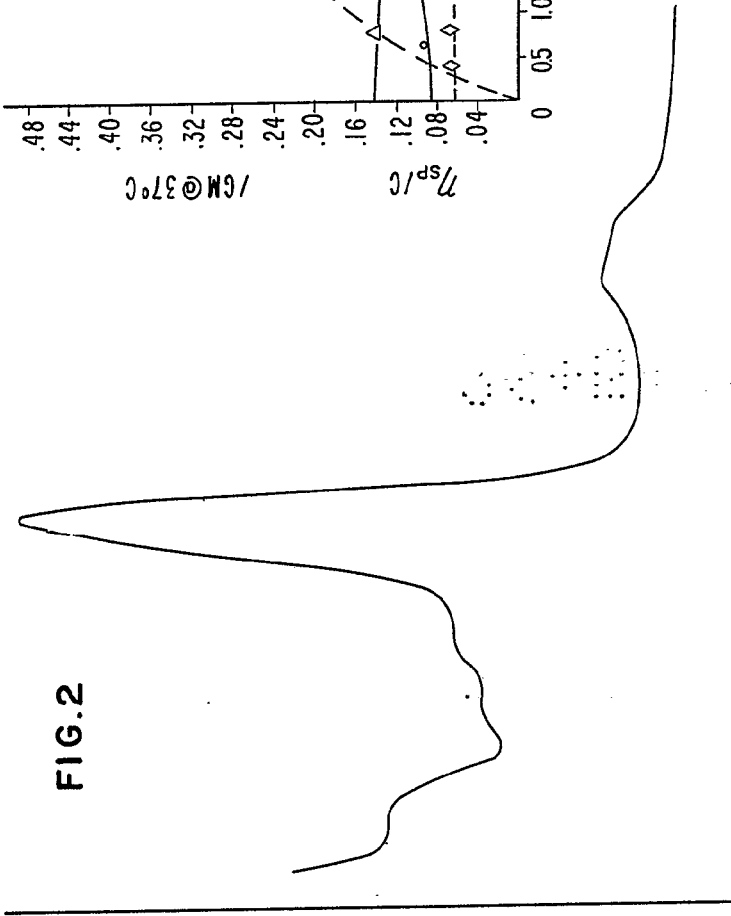


FIG. 4

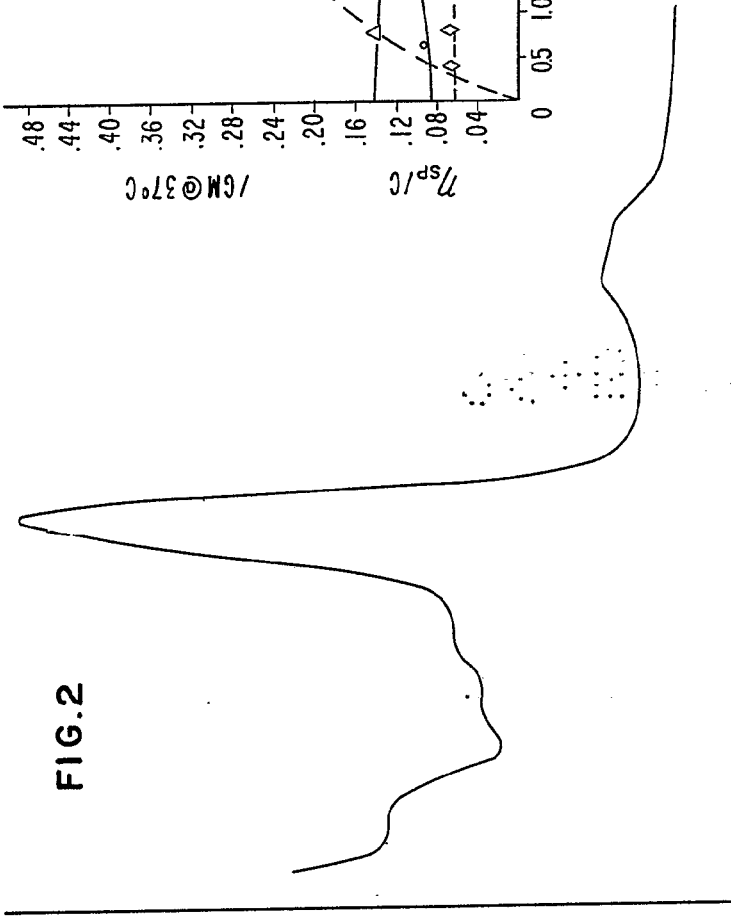
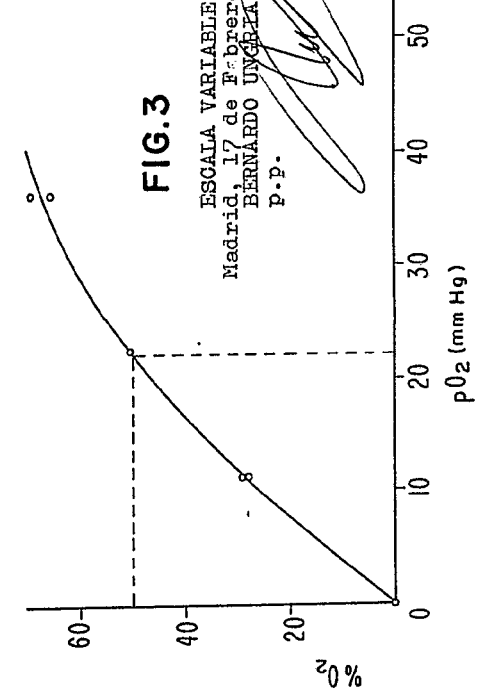
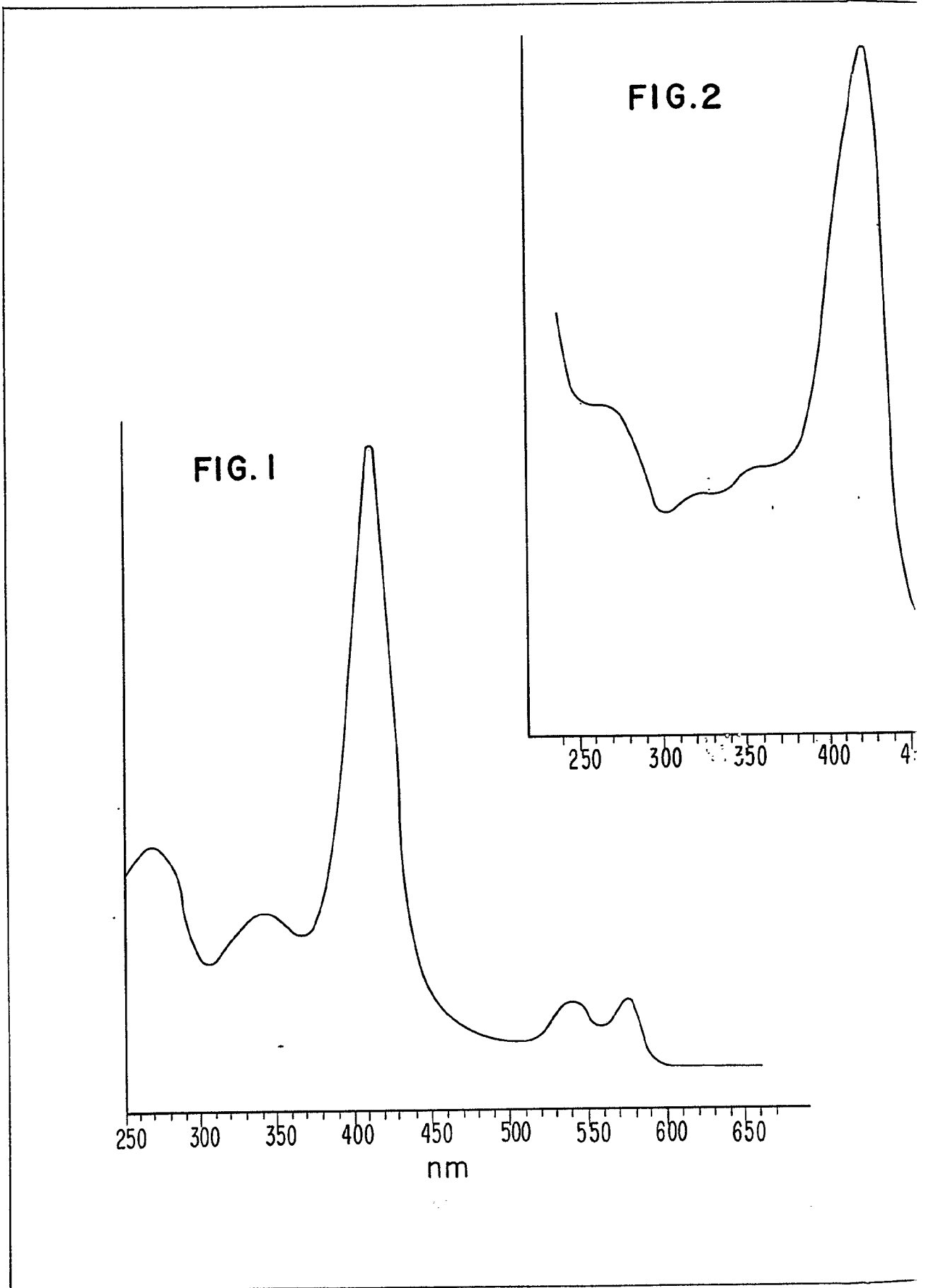


FIG. 3

ESCALA VARIABLE
Madrid, 17 de Febrero de 1976
BERNARDO UNGER
P.P.





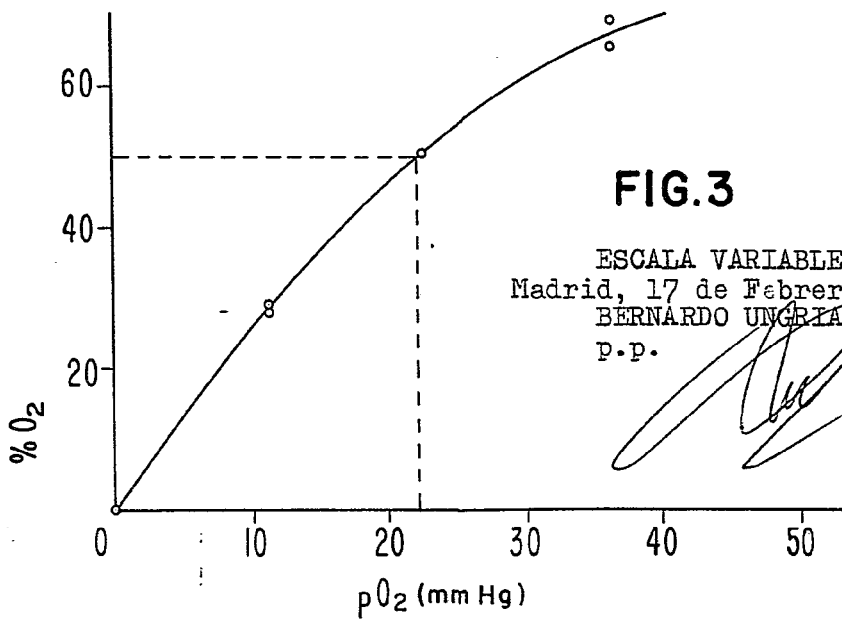
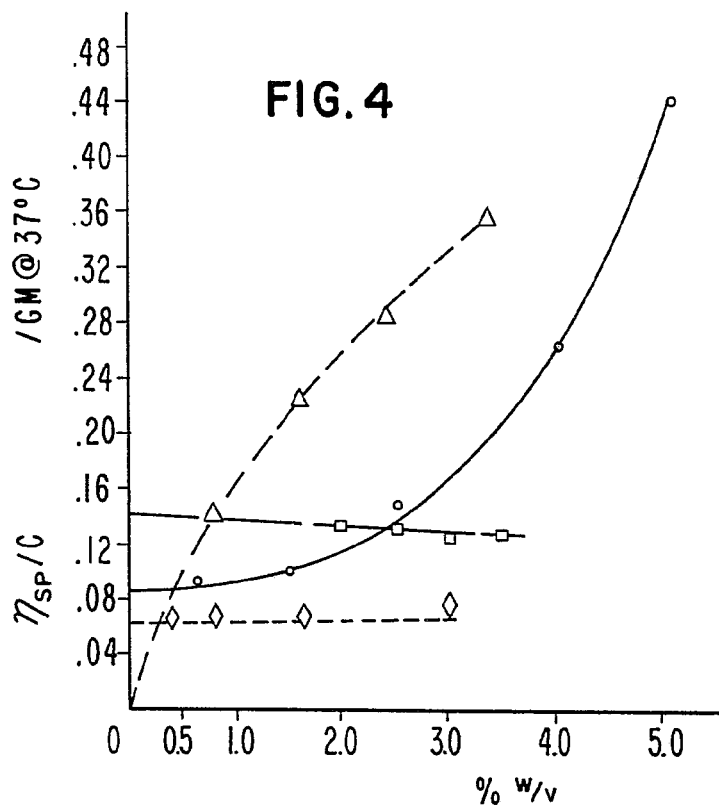
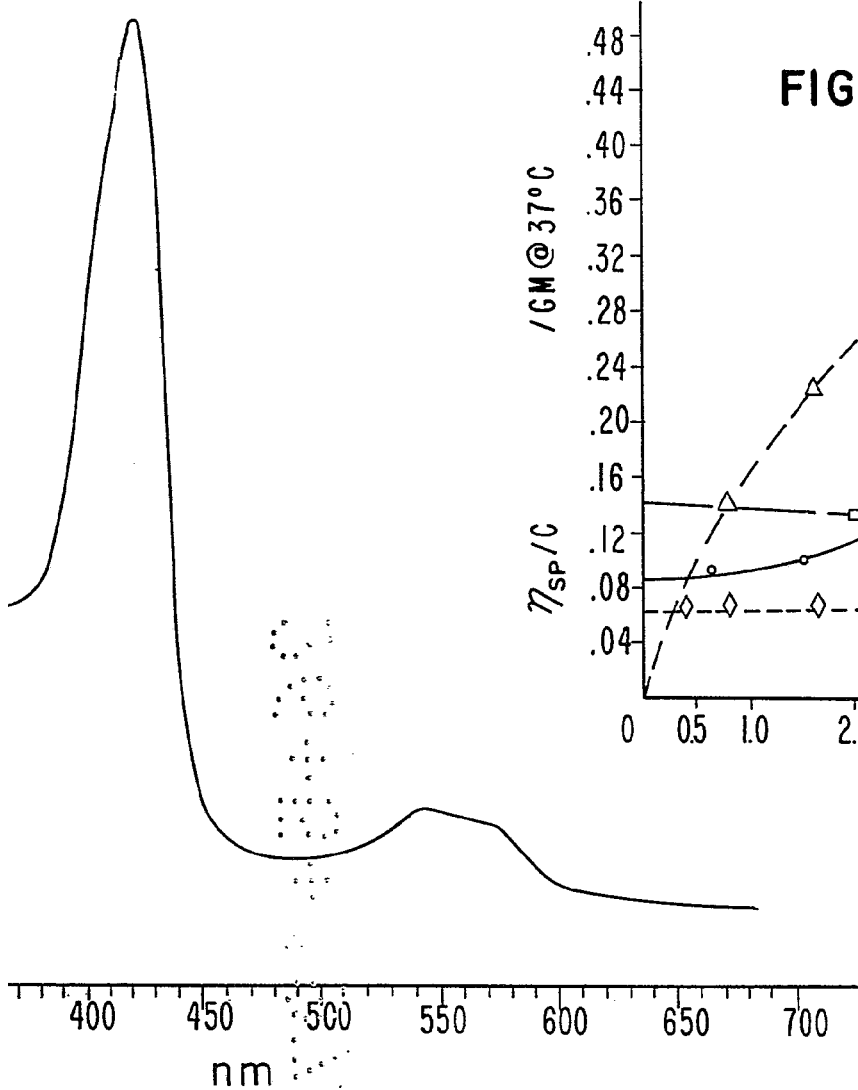


FIG. 7

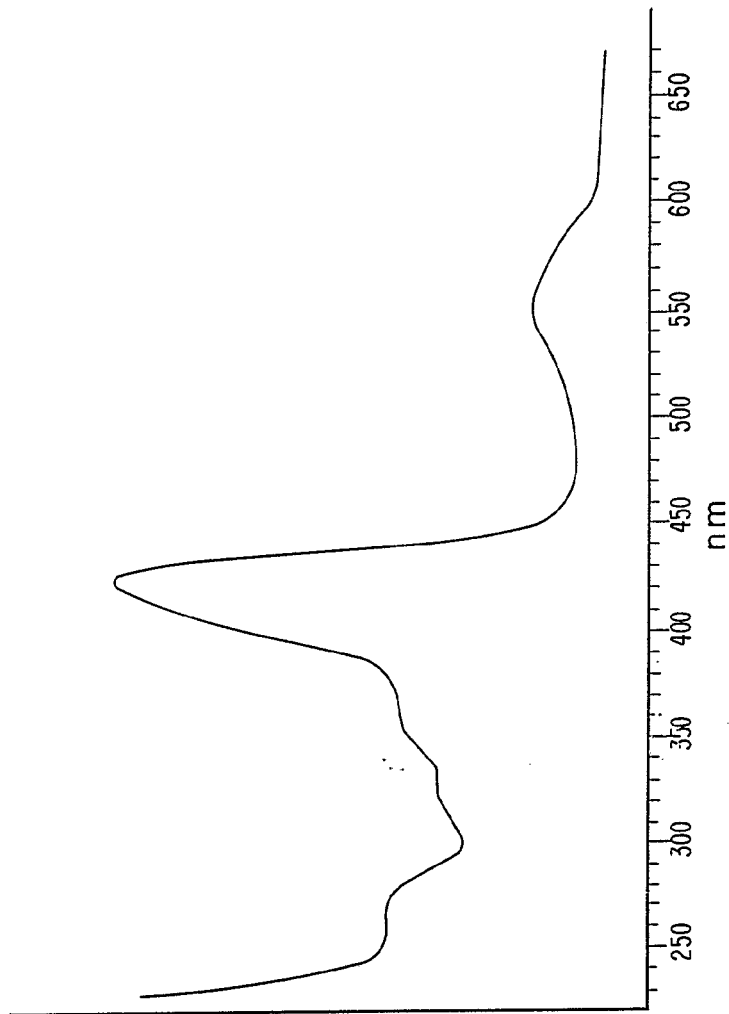
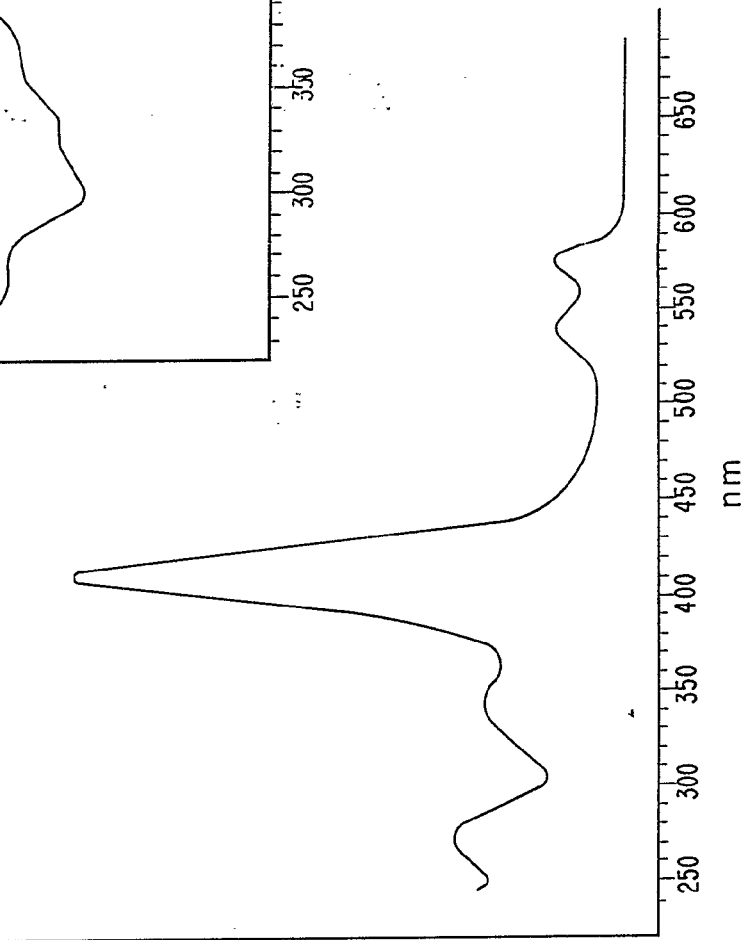


FIG. 6



ESCALA VARIABLE
Madrid, 17 de Febrero de 1976
BERNARDO UNGRIA
P.P.

FIG. 6

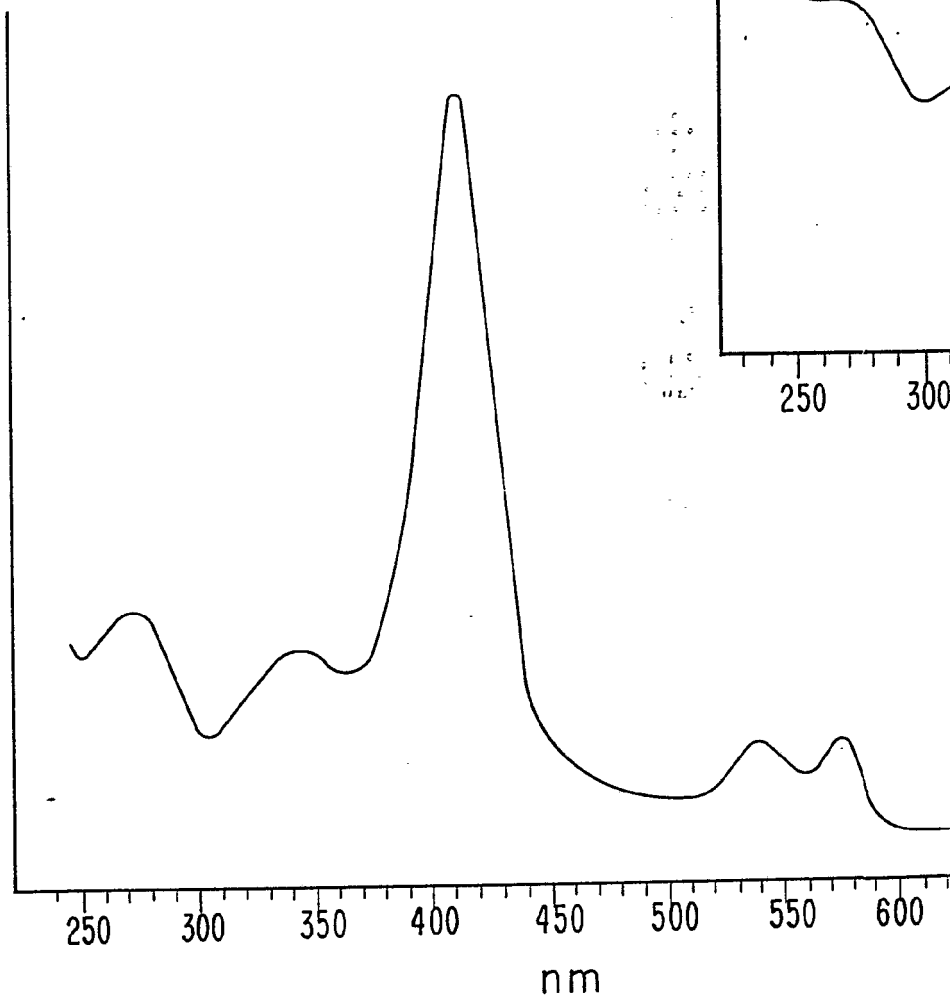
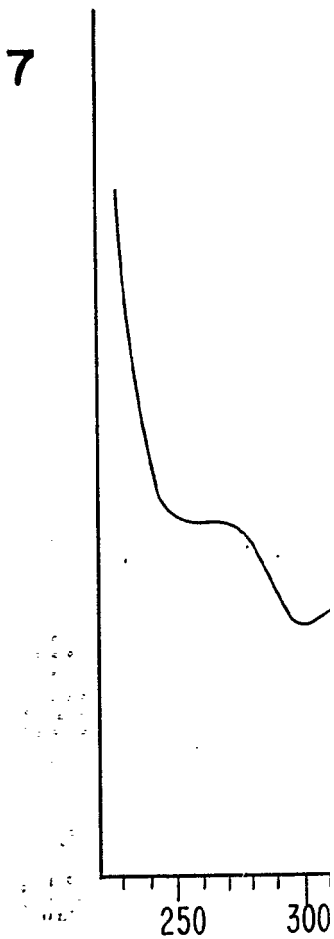
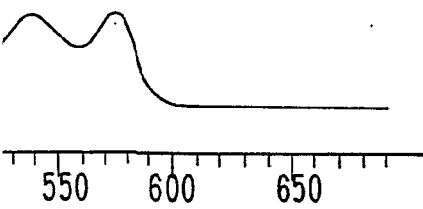
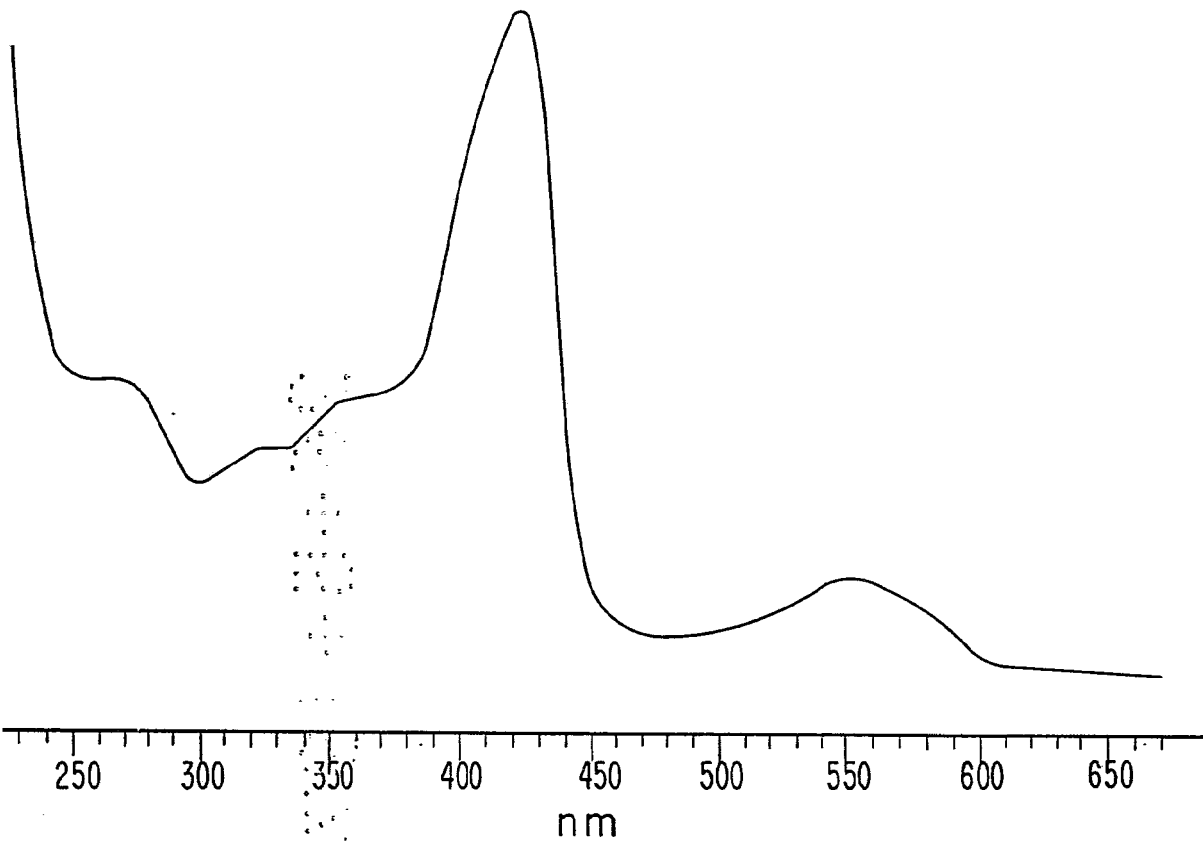


FIG. 7





ESCALA VARIABLE
Madrid, 17 de Febrero de 1976
BERNARDO UNGRIA
p.p.

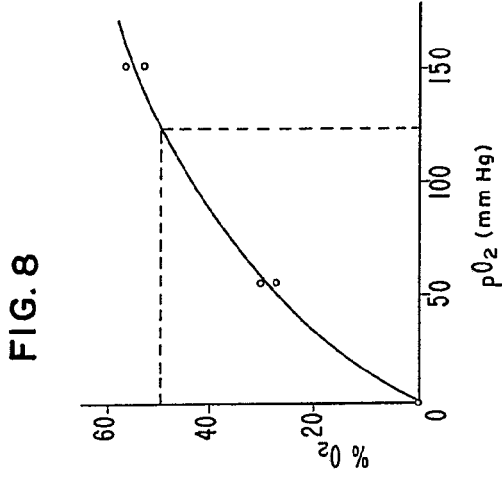
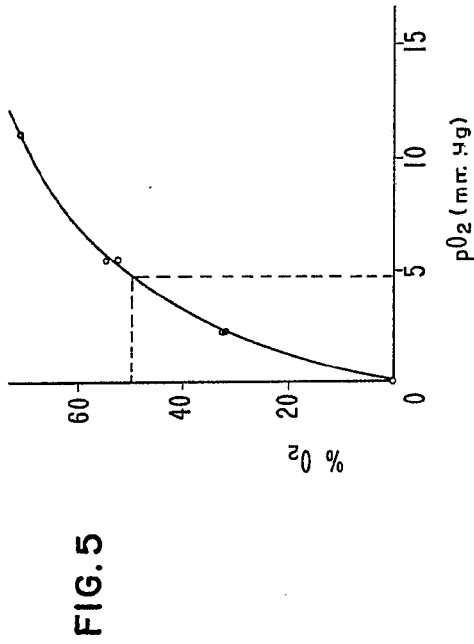


FIG. 9

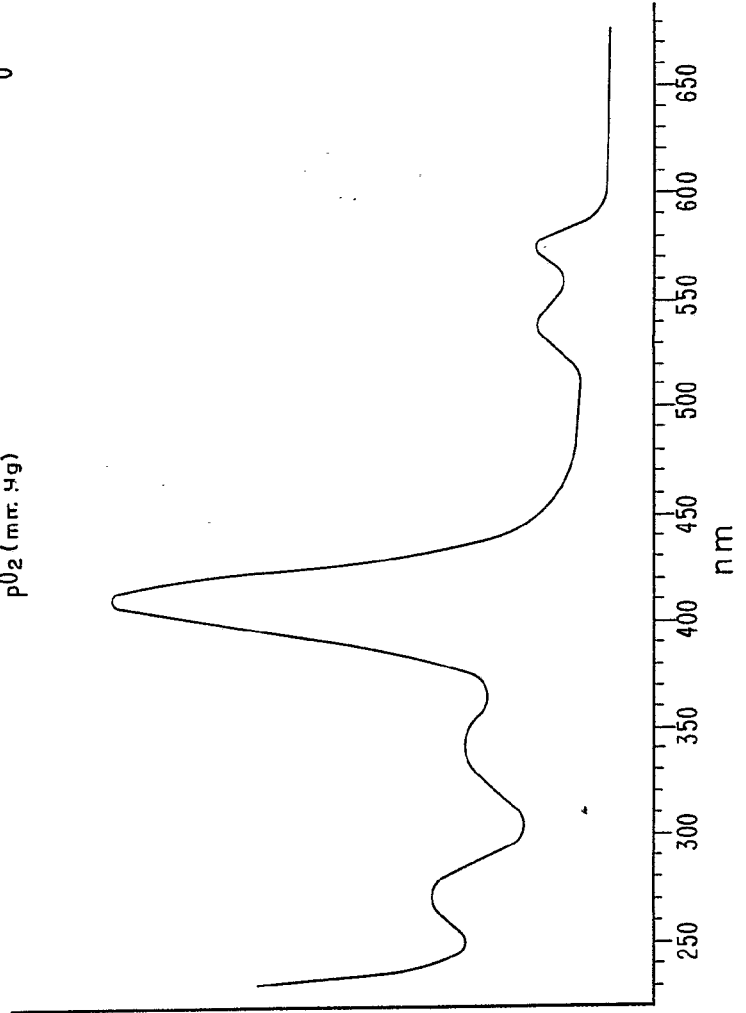
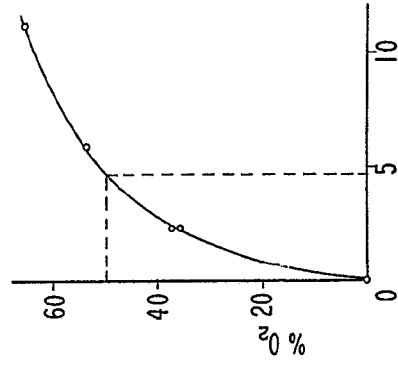


FIG. 10



pO_2 (mm Hg)
ESCALA VARIABLE
Madrid, 17 de Febrero de 1976
BERNARDO JUNGALIA
p.p.

FIG. 5

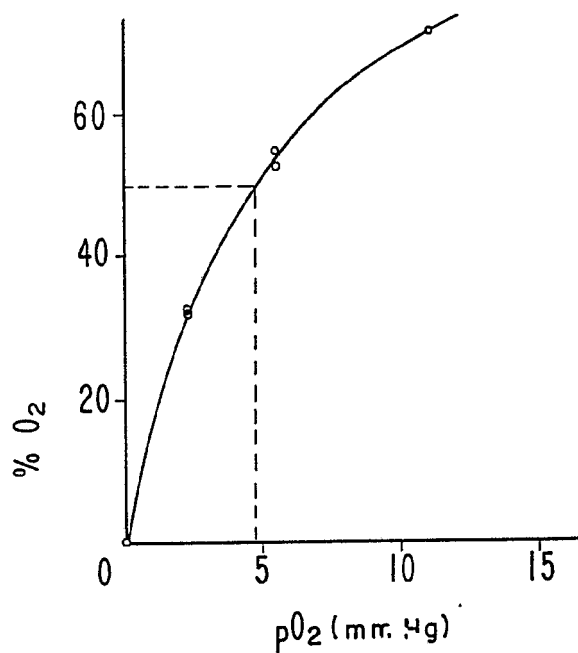


FIG. 9

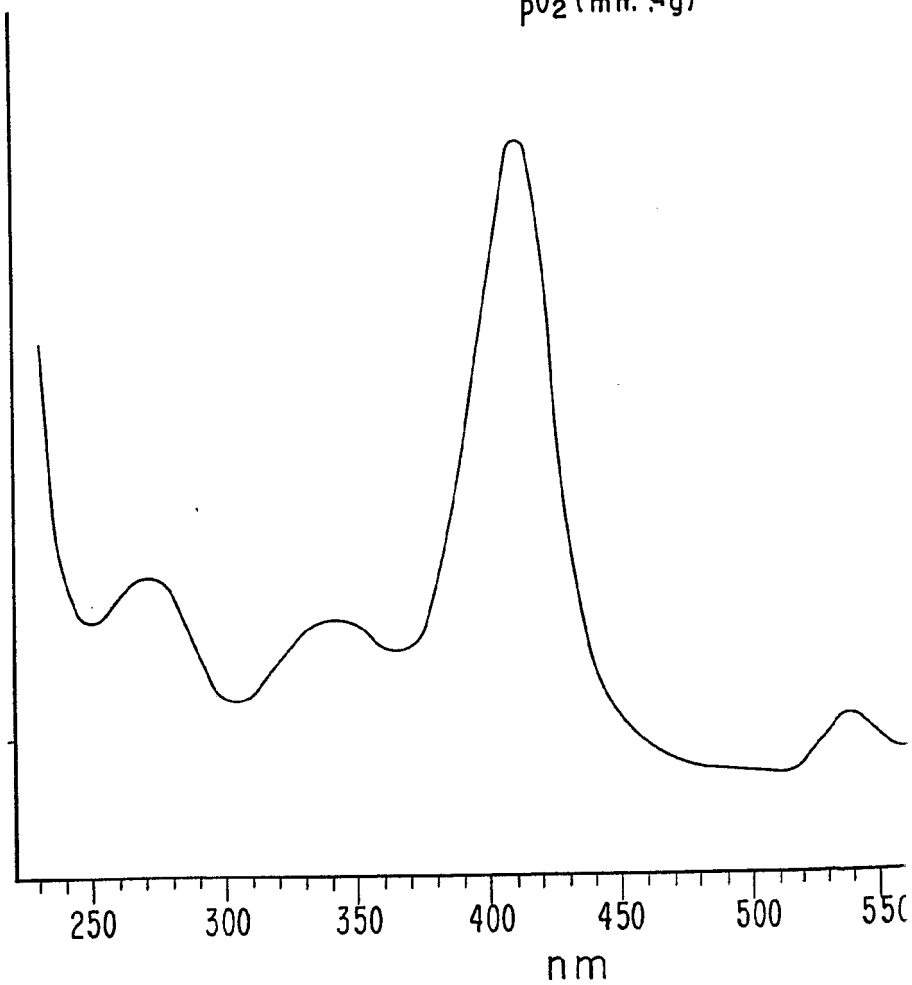
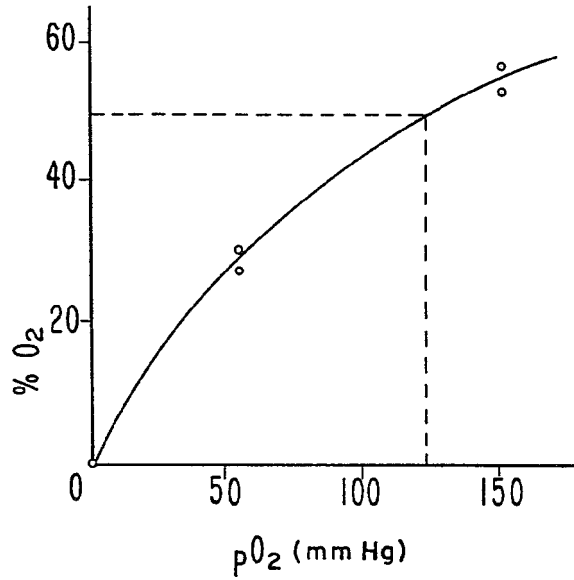
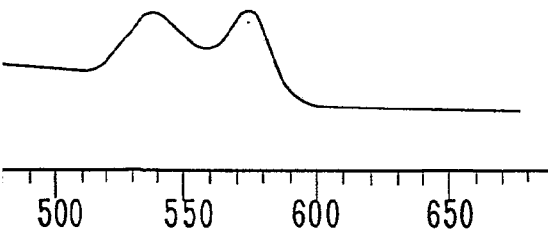
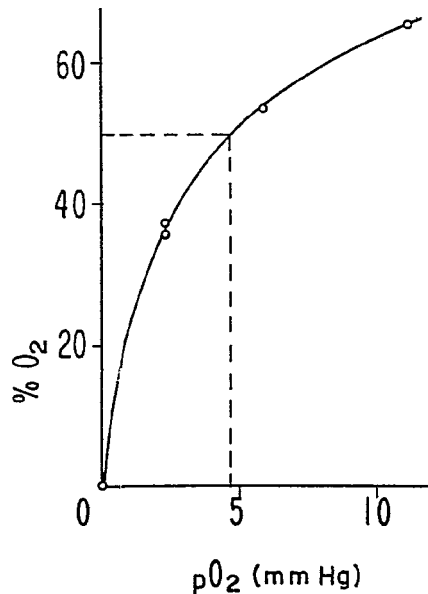


FIG. 8



15

FIG. 10



ESCALA VARIABLE
Madrid, 17 de Febrero de 1976
BERNARDO UNGRIA
P.P.