



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 266 041**

51 Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Número de solicitud europea: **01107561 .1**
86 Fecha de presentación : **16.09.1994**
87 Número de publicación de la solicitud: **1132097**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.09.2001**

54 Título: **Proteína sérica y celular de anclaje y conjugados.**

30 Prioridad: **15.10.1993 US 137821**
03.05.1994 US 237346

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2007

73 Titular/es: **ConjuChem Biotechnologies Inc.**
Suite 3950, Third Floor
225 President Kennedy Avenue
Montreal, Québec H2X 3Y8, CA

72 Inventor/es: **Pouletty, Philippe y**
Pouletty, Christine

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

Proteína sérica y celular de anclaje y conjugados.

5 **Introducción****Campo técnico**

El campo de la presente invención es la extensión del tiempo de vida de agentes fisiológicamente activos en un huésped.

Antecedentes

Con frecuencia es deseable limitar los efectos biológicos de agentes presentes en la corriente sanguínea de mamíferos. Por ejemplo, en el caso de exposición a una toxina/veneno, se puede indicar la mitigación aguda de los efectos de la toxina/veneno. Alternativamente, el agente puede ser celular, tal como una célula huésped infectada, autorreactiva, alorreactiva o xenorreactiva o un organismo infeccioso.

Las terapias sanguíneas actuales implican la extracción del agente de la sangre mediante, por ejemplo, plasmáferesis o adsorción con carbón activado, inactivación del agente con, por ejemplo, antibióticos o enzimas, o la unión selectiva de la diana, por ejemplo, con anticuerpos. Estas terapias se utilizan normalmente después de exponer el paciente a los efectos perjudiciales de la toxina/veneno de las células, de manera que ya se ha producido el daño sustancial al huésped. En muchas situaciones, existe la necesidad de una administración a largo plazo de un fármaco, con el fin de mantener un nivel terapéutico en la corriente sanguínea. La administración oral o inyección intravenosa de fármacos puede dar lugar a dosis subterapéuticas para extensos periodos de tiempo, seguida de dosis que superan el nivel terapéutico e implican serios efectos secundarios. Además, existen situaciones en las que se desea mantener un agente en la corriente sanguínea durante un extenso periodo de tiempo, por ejemplo, cuando se desea obtener una respuesta inmune importante, cuando el inmunógeno está presente de forma continua en una forma que proporciona una estimulación continua del sistema inmune.

Por lo tanto, existe el interés sustancial en poder proporcionar procedimientos mejorados para proporcionar un mantenimiento continuo de agentes en la corriente sanguínea, en el que la función del agente puede ser la de limitar la toxicidad o patogenicidad de los agentes transportados por la sangre, mantener a largo plazo un agente fisiológicamente activo, o administrar un agente activo a largo plazo.

35 **Descripción resumida de la invención**

Se proporcionan reactivos o conjugados bifuncionales que comprenden un ancla y un miembro de unión a la diana, donde el reactivo se une a través del ancla a un resto de larga vida asociado con la sangre, una proteína celular o sanguínea móvil, para proporcionar un mantenimiento de larga vida del miembro de unión a la diana en el huésped. Estos reactivos encuentran amplias aplicaciones en aplicaciones profilácticas y terapéuticas, la producción de anticuerpos, la reducción de la concentración biológicamente efectiva o la actividad de un componente sanguíneo endógeno o exógeno, y en otras situaciones en las que la administración a largo plazo de un compuesto fisiológicamente activo es de interés.

Las dianas pueden ser huéspedes derivados o foráneos. Entre las dianas de huésped se incluyen células y componentes sanguíneos presentes en concentraciones no deseables, tales como glóbulos blancos autoreactivos, alorreactivos o xenoreactivos, es decir, leucocitos, que incluyen macrófagos, células infectadas, plaquetas, células tumorales y citoquinas y hormonas sobreexpresadas. Entre las dianas foráneas se incluyen toxinas, venenos, sustancias de abuso, microbios infecciosos patogénicos, o similares.

Entre los componentes asociados a la sangre de larga vida se incluyen proteínas del suero de larga vida, eritrocitos, plaquetas o células endoteliales, en las que el ancla se une de manera no específica a una o más proteínas de membrana superficiales, predominantemente asociadas con la célula concreta, o a una proteína soluble. En el caso de eritrocitos, plaquetas y proteínas, el conjugado se administra *in vivo*. En el caso de células endoteliales, el conjugado también se administra *in vivo*.

Descripción de las realizaciones específicas

Se proporcionan procedimientos y composiciones para extender la vida de un miembro de unión a la diana, que es un agente fisiológicamente activo, en un huésped mamífero mediante la disposición de la unión de dicho miembro de unión a la diana a un componente asociado a la sangre de larga vida, normalmente una proteína. Se utiliza un reactivo o conjugado que tendrá por lo menos dos restos activos: (1) un ancla para unir el reactivo al componente asociado a la sangre de larga vida; y (2) un miembro de unión a la diana, que se une mediante el ancla, directa o indirectamente al componente asociado a la sangre de larga vida. El componente asociado a la sangre de larga vida puede ser celular, por ejemplo, una célula móvil, tal como un eritrocito o plaqueta, concretamente, células anucleares, o una célula fijada, tal como una célula endotelial; o proteínas solubles o móviles que están presentes en la sangre durante extensos periodos de tiempo y en una concentración mínima de por lo menos, aproximadamente, 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Entre las proteínas que

cumplen con este requisito de concentración se incluyen albúmina de suero, transferrina, ferritina e inmunoglobulinas, particularmente IgM e IgG. La vida media de la proteína debería ser por lo menos de, aproximadamente, 12 horas. El miembro de unión a la diana puede ser un agente fisiológicamente activo y puede proporcionar una amplia variedad de funciones. Puede actuar como un inmunógeno para la producción de antisuero o anticuerpos monoclonales, donde se está interesado en un reactivo de diagnóstico o terapéutico, para la producción de vacunas, o para la protección, profilaxis o terapia contra una diana perjudicial transportada por la sangre, tal como un patógeno, agente nocivo o factor endógeno. El miembro de unión a la diana puede reaccionar directamente con el agente perjudicial transportado por la sangre, tiene actividad antiproliferativa, particularmente actividad citotóxica, por sí mismo o conjuntamente con un sistema endógeno, tal como con anticuerpos a un patógeno o célula endógena perjudicial, por ejemplo, células T, o a una toxina, puede tener actividad de unión específica con un receptor de membrana superficial, para reducir o inhibir la señal transducida por dicho receptor.

El miembro de unión a diana se proporciona en una concentración biológicamente efectiva, en la que el miembro de unión a diana puede actuar en la forma enlazada como parte del reactivo o puede actuar independientemente de la entidad asociada a la sangre de larga vida, como agente soluble después de la liberación del componente sanguíneo de larga vida. El componente sanguíneo de larga vida puede ser parte de la actividad fisiológica, por ejemplo, cuando la unión del eritrocito a la diana puede potenciar el proceso excretor de la diana.

“Concentración biológicamente efectiva” del agente fisiológicamente activo significa la concentración de agente que está biodisponible para la diana durante el transcurso del procedimiento. Una concentración biológicamente efectiva de la diana significará la concentración inmediatamente biodisponible de la diana en el sitio *in vivo* de su acción. Para la mayor parte, la diana estará, como mínimo, parcialmente dispersada en la corriente sanguínea, puede estar en solución o asociada con componentes de la corriente sanguínea. De este modo, la concentración eficaz de la diana se puede reducir limitando el volumen de distribución de la diana para sitios en los que se segrega la diana, limitando la difusión, la movilidad o la migración de la diana, etc. De este modo, el miembro de unión a la diana interaccionará con un componente en la corriente sanguínea, para proporcionar el resultado deseado, donde la interacción puede ser directa o indirecta para conseguir el resultado deseado, o puede ser una interacción específica o no específica, donde para la mayor parte, una interacción no específica proporcionará un resultado específico con un subgrupo de las entidades con las que el miembro de unión a diana interacciona.

Los métodos terapéuticos descritos son aplicables a un amplio rango de dianas, tanto derivados de huésped como foráneos (que significa exógenos o no huésped), el cual puede estar presente en la sangre y tiene un efecto fisiológico perjudicial, debido a una concentración efectiva indeseablemente elevada, o como en el caso de células neoplásicas, estando presente en cualquier cantidad. Entre las dianas de células derivadas de huésped se incluyen, (con indicación clínica parenteral): células T o subgrupos, tales como células α IFN+, Cd4+, CD8+, LFA1+ (enfermedad autoinmune, aloreactividad, xenoreactividad e inflamación), células B subgrupos, tales como células pre-B, Cd5+, IgE+, IgM+. (linfoma de células B, xenoinjerto, autoinmunidad, anafilaxis), leucocitos, tales como macrófagos y monocitos (inflamación, leucemia mielomonocítica), otros leucocitos, tales como neutrófilos, basófilos, células NK, eosinófilos o leucocitos alo- o xenoreactivos, (inflamación, anafilaxis, rechazo de trasplante), células madre, tales como células CD34+ (policitemia), glóbulos rojos fetales, tales como glóbulos rojos Rh+ (profilaxis de inmunización anti-Rh después del embarazo en una madre Rh-), células malignas (tumores; CALLA) o células infectadas, particularmente retrovíricas, por ejemplo, VIH, células huésped infectadas).

Entre las dianas no celulares derivadas de huésped se incluyen HLA soluble, clase I y clase II, y HLA de la clase I no clásico (E, F y G) para modular la inmunoregulación, proteínas de superficie de células T o B solubles, citocinas, interleucinas y factores de crecimiento, tales como IL1, 2, 3, 4, 6, 10, 13, 14 y 15, receptor de IL2 soluble, M-CSF, G-CSF, GM-CSF, factores de crecimiento de plaquetas, interferones alfa, beta y gamma, TNF, NGFs, metabolitos del ácido araquidónico, tales como prostaglandinas, leucotrienos, tromboxano y prostaciclina para enfermedades cardiovasculares, inmunoglobulinas, tales como IgE total para anafilaxia, IgE antialérgeno específico, auto- o alo-anticuerpos para la autoinmunidad o alo- o xenoinmunidad, receptores Fc de Ig o factores de unión a receptores Fc, carbohidratos (gal), anticuerpos naturales implicados en alo- o xenorrechazo, eritropoyetina, factores de angiogénesis, moléculas de adhesión, MIF, MAF, factores complementarios (mecanismos clásicos y alternativos, incluyendo factores de regulación), PAF, iones, tales como calcio, potasio, magnesio, aluminio, hierro, etc. enzimas, tales como proteasas, quinasas, fosfatasas, ADNasas, ARNasas, lipasas y otras enzimas que afectan al colesterol y otro metabolismo lipídico, esterasas, deshidrogenasas, oxidasas, hidrolasas, sulfatasas, ciclasas, transferasas, transaminasas, atriopetidinas, carboxilasas y descarboxilasas y sus sustratos o análogos naturales, superóxido dismutasa, hormonas, tales como TSH, FSH, LH, tiroxina (T4 y T3), renina, insulina, apolipoproteínas, LDL, VLDL, cortisol, aldosterona, estríol, estradiol, progesterona, testosterona, deshidroepiandrosterona (DEA) y su sulfato (DEA-S), calcitonina, hormona paratiroide (PTH), hormona del crecimiento humano (hGH), vasopresina y hormona antidiurética (ADH), prolactina, ACTH, LHRH, THRH, VIP, catecolaminas (adrenalina, ácido vanililmandélico, etc.), bradiquinas y las correspondientes prohormonas, metabolitos, ligandos o células naturales o receptores solubles de los mismos, cofactores que incluyen el factor atrionatriurético (ANF), vitaminas A, B, C, D, E y K, serotonina, factores de coagulación, por ejemplo, protrombina, trombina, fibrina, fibrinógeno, Factor VII, Factor XI, factor de Willebrand, factores de plasminógeno, por ejemplo, plasmina, factores de activación complementarios, LDL y ligandos de las mismas, ácido úrico. En algunos casos, se pueden proporcionar efectos específicos asociados con complementos, teniendo inhibidores, tales como DAF, CD59, compuestos que regulan la coagulación, tales como hirudina, hirulog, hermentina, TPA u otros compuestos, tales como factor tisular, ácidos nucleicos para terapia génica, compuestos que son antagonistas de

enzimas, ligandos que se unen a compuestos, tales como citocinas, hormonas, factores de inflamación (PAF, factores de complementación).

Entre las dianas foráneas se incluyen drogas, especialmente drogas sujetas a un abuso, tales como la heroína y otros opiáceos, PCP, barbituratos, cocaína y derivados de la misma, benzodiazepinas, éxtasis, venenos, toxinas, tales como metales pesados como el mercurio y el plomo, agentes quimioterapéuticos, paracetamol, digoxina, radicales libres, arsénico, toxinas de bacterias, tales como LPS y otras toxinas gram negativa, toxinas de *Estafilococo*, Toxina A, toxinas del Tétano, toxina de la Difteria y toxinas de la Tos ferina, toxinas marinas y de plantas, venenos de serpiente y otros, factores de virulencia, tales como aerobactinas, compuestos radioactivos o microbios patogénicos o fragmentos de los mismos, incluyendo virus infecciosos, tales como las hepatitis A, B, C, E y delta, CMV, HSV (tipos 1, 2 y 6), EBV, virus varicela zoster (VZV) VIH-1, -2 y otros retrovirus, adenovirus, rotavirus, gripe, rinovirus, parvovirus, rubéola, sarampión, polio, reovirus, ortomixovirus, paramixovirus, papovavirus, poxvirus y picornavirus, priones, factor tisular de plasmodios, protistas, tales como toxoplasma, filaria, kala-azar, bilharziose, entamoeba histolítica y giardia, y bacterias, particularmente bacterias gram negativas responsables de la sepsis e infecciones nosocomiales, tales como *E. coli*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Proteus* y *Klebsiella*, pro también bacterias gram positivas, tales como estafilococos, estreptococos, etc., Meningococos y *Mycobacterias*, *Chlamydiae*, *Legionela* y Anaerobes, hongos, tales como *Candida*, *Pneumocystis carini*, y *Aspergillus*, y *Mycoplasma*, tal como *Hominis* y *Ureaplasma urealyticum*.

Tal y como ya se ha indicado, la presente invención se puede utilizar para la producción de anticuerpos, donde los anticuerpos se recogen o esplenocitos u otras células B se utilizan para la inmortalización y la producción de anticuerpos monoclonales. De este modo, los anticuerpos se pueden dirigir a muchas de las dianas indicadas anteriormente o se pueden dirigir a varias drogas, para el control de la dosis terapéutica, tratamientos para la sobredosis de drogas o el abuso de drogas. También, la presente invención se puede utilizar para la vacunación contra un patógeno u otras entidades perjudiciales, donde varios microorganismos unicelulares y virus se han descrito anteriormente. Además, la presente invención se puede utilizar para activar las células T hacia dianas particulares, mediante la disposición de dianas apropiadas para células que presentan antígenos, que entonces presentarán a las células T o proporcionando la activación directa de células T.

La elección del componente sanguíneo de larga vida estará afectada por el objetivo para unirse a la diana. De este modo, dependiendo de la elección del componente sanguíneo de larga vida, la diana se puede segregar y excretar rápidamente del cuerpo, segregado en una forma biológicamente inactiva para ser eliminado lentamente, o degradado con el tiempo. El componente sanguíneo de larga vida puede ser fijo o móvil, es decir, sustancialmente fijo en una posición, como en el caso de las células endoteliales, o móvil en el sistema vascular, teniendo una distribución sustancialmente uniforme o variable en el sistema vascular, donde el componente sanguíneo de larga vida puede estar preferencialmente presente en compartimentos concretos, incluyendo tejido sólido. La elección del componente sanguíneo de larga vida también dependerá en parte de la naturaleza de la diana. Por ejemplo, se prefieren los glóbulos rojos para agentes patogénicos celulares para una eliminación eficaz, mientras que componentes de proteína de suero, tales como albúmina o inmunoglobulinas, son particularmente útiles para segregar toxinas solubles y las células endoteliales son particularmente útiles para la restenosis y trombosis.

Un componente sanguíneo de larga vida tiene una vida media de por lo menos aproximadamente 12 horas, habitualmente por lo menos aproximadamente 48 horas, preferiblemente por lo menos aproximadamente 5 días, deseablemente por lo menos aproximadamente 10 días. Generalmente, las vidas medias se determinan mediante medidas en serie de los niveles en la sangre completa, el plasma o el suero del componente siguiendo el marcaje del compuesto con un isótopo (por ejemplo, ^{131}I , ^{125}I , Tc, ^{51}Cr , ^3H , etc.) o fluorocromo y la inyección IV de una cantidad conocida de compuesto marcado. Se incluyen los glóbulos rojos (tiempo de vida media de aproximadamente 60 días), plaquetas (tiempo de vida media de aproximadamente 4-7 días), células endoteliales que recubren la vasculatura sanguínea, y proteínas de suero sanguíneo de larga vida, tal como la albúmina, proteínas de unión a esteroide, ferritina, α -2-macroglobulina, transferrina, proteína de unión a tiroxina, inmunoglobulinas, especialmente IgG. Además de las vidas medias preferidas, los componentes de la presente invención están preferiblemente en un recuento o concentración celular suficiente para permitir la unión de cantidades terapéuticamente útiles del conjugado. Para componentes sanguíneos de larga vida celulares, se prefieren recuentos celulares de por lo menos 2000/ μl y las concentraciones de proteína en suero de por lo menos 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, habitualmente por lo menos aproximadamente 0,01 mg/ml, más habitualmente aproximadamente 1 mg/ml.

Los componentes sanguíneos celulares de larga vida seleccionados están presentes en un número elevado en el sistema vascular. Las plaquetas están presentes en desde aproximadamente $1-4 \times 10^5/\mu\text{l}$, mientras que los glóbulos rojos están presentes en aproximadamente $4-6 \times 10^6/\mu\text{l}$. Las células tienen una semivida larga. Los eritrocitos y las plaquetas no tienen núcleo ni capacidad de división celular. Las células preferidas tienen una amplia distribución en capilares y tejidos y expresan sitios de unión específica en la superficie celular asociados con su diferenciación específica.

La elección del componente sanguíneo de larga vida también depende de la ruta deseada de limitación de la toxicidad/patogenicidad de la diana. Por ejemplo, frecuentemente es deseable modular el acceso de la diana al sistema nervioso central, los espaciadores intersticiales para limitar la toxicidad, la infección. Mediante la selección del componente sanguíneo de larga vida basada en la localización, distribución, marcadores de superficies específicos, u otras características diferenciadoras asociadas con el componente sanguíneo de larga vida, se pueden modular los sitios finales y el volumen de distribución de la diana. Por ejemplo, en algunas situaciones la activación celular da lugar a la regulación positiva de una proteína de membrana de la superficie. Para células endoteliales, las adreínas, por ejemplo

ELAM-1, o integrinas, por ejemplo VLA-4, se pueden regular de forma positiva en el caso de inflamación. De esta manera, el agente se puede segregar a un sitio de la inflamación u órgano linfoide, tal como el bazo, para aumentar la exposición del agente a una respuesta inmune concentrada que incluye los glóbulos blancos fagocíticos. En otro ejemplo, los complejos inmunes de un anticuerpo de unión complementaria pueden proporcionar un complemento mediado de las células de lisis o microorganismos. Otro ejemplo es la modificación de la distribución de un agente endógeno o exógeno entre compartimentos, tales como el SNC y la sangre. Al proporcionar receptores de alta afinidad para el agente en la sangre, la concentración del agente en el SNC se puede reducir en proporción a la capacidad de unión de la sangre con el agente. De esta manera, es posible reducir la concentración de una droga en el cerebro, potenciando la capacidad de unión de la sangre a la droga, por ejemplo, utilizando anticuerpos para la droga, para extraer la droga a través de la barrera hemato-encefálica hacia la sangre. El conjugado se puede unir al componente sanguíneo de larga vida de forma no específica, implicando un enlace covalente.

El conjugado puede tomar muchas formas, estando comprendido de un miembro. En el conjugado de un único miembro, tanto el ancla como la parte de unión a diana estarán unidas cuando se administra. Las dos partes estarán conectadas mediante enlaces covalentes. El ancla puede ser no específica. Tal y como se ha indicado, se pueden utilizar compuestos reactivos, que no reaccionarán de forma específica con funciones activas en el componente sanguíneo de larga vida así como otras moléculas presentes en la corriente sanguínea del huésped. En esta situación, se selecciona un componente sanguíneo de larga vida que está en una concentración muy elevada en la corriente sanguínea, en comparación con la mayoría de otros componentes, que está presente en condiciones en las que reacciona con el ancla, y debido a su larga vida, en un periodo corto de tiempo, habitualmente inferior a 7, más habitualmente inferior a 5 días, el primer miembro de unión se asociará principalmente con el componente sanguíneo de larga vida deseado en el huésped.

En algunos casos, será deseable permitir la adición consecutiva del primer y segundo compuesto, donde el primer compuesto tiene el ancla y el segundo compuesto tiene el miembro de unión a diana. El primer y segundo compuesto también tienen los miembros de unión complementarios de una pareja de unión específica, de manera que tras la adición del segundo compuesto al primer compuesto, los dos compuestos estarán unidos no covalentemente para proporcionar el conjugado. El primer compuesto comprenderá una función activa, un grupo de unión, y la primera entidad de unión. Las funciones que están disponibles en proteínas son principalmente grupos amino, grupos carboxilo y grupos tiol. Aunque se puede utilizar cualquiera de éstos como la diana de la función reactiva, por lo general, se utilizarán los enlaces a grupos amino, particularmente la formación de enlaces amida. Para formar enlaces amida, se pueden utilizar una gran variedad de grupos carboxilo activos, particularmente ésteres, donde la parte hidroxilo es fisiológicamente aceptable en los niveles requeridos. Aunque se pueden utilizar un conjunto de grupos hidroxilo diferentes, los más adecuados serán N-hidroxisuccinimida, y N-hidroxi sulfosuccinimida, aunque también se pueden utilizar otros alcoholes que son funcionales en un medio acuoso tal como la sangre. En algunos casos, son útiles reactivos especiales, tales como grupos azida, diazo, anhídrido de carbodiimida, hidracina, dialdehídos, tiol, o aminas para formar amidas, ésteres, iminas, tioéteres, disulfuros, aminas sustituidas. Habitualmente, el enlace covalente que se forma debería ser capaz de mantenerse durante el tiempo de vida del miembro de unión a diana, a menos que se pretenda que sea el sitio de liberación del agente.

Un gran número de compuestos bifuncionales están disponibles para unirse a entidades. Entre las entidades de ejemplo se incluyen: azidobenzil hidracina, N-[4-(azidosalicilamino) butil-3'-[2'-piridilditio] propionamida), suberato de bis-sulfosuccinimidilo, dimetiladipimidato, disuccinimidiltartrato, N-γ-maleimidobutiriloxisuccinimida éster, N-hidroxi sulfosuccinimidil-4-azidobenzoato, N-succinimidil [4-azidofenil]-1,3'-ditiopropionato, N-succinimidil [4-yodoacetil]aminobenzoato, glutaraldehído, y succinimidil 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1- carboxilato.

Cuando uno o ambos grupos de unión son permanentes, el grupo o grupos de unión no serán críticos para esta invención y se puede utilizar cualquier grupo de unión que es conveniente, fisiológicamente aceptable a las dosis utilizadas, y que cumple las condiciones de la molécula, tales como ser estable en la corriente sanguínea, presentar de forma efectiva el miembro de unión a diana o la primera entidad de unión, facilitar la manipulación química. El grupo de unión puede ser alifático, alicíclico, aromático o heterocíclico o combinaciones de los mismos, y la selección será ante todo de conveniencia. Por lo general, cualquier heteroátomo incluirá nitrógeno, oxígeno, azufre o fósforo. Entre los grupos que se pueden utilizar se incluyen alquilenos, arilenos, aralquilenos, cicloalquilenos.

Generalmente, el grupo de unión tendrá de 0 a 30 átomos, habitualmente de 0 a 10, más habitualmente de aproximadamente 0 a 6 átomos en la cadena, donde la cadena incluirá carbono y cualquiera de los heteroátomos incluidos anteriormente. Por lo general, el grupo de unión será una cadena lineal o cíclica, ya que normalmente no habrá ventajas con grupos laterales. La longitud del grupo de unión variará, particularmente con la naturaleza del miembro de unión a diana y la primera entidad de unión, ya que, en algunos casos, el miembro de unión a diana o la primera entidad de unión pueden tener de forma natural una cadena o función asociados a los mismos. En algunos casos, los aminoácidos, generalmente de 1 a 3 aminoácidos, pueden servir como la cadena de unión, particularmente cuando el grupo carboxilo del aminoácido puede ser la función reactiva. De este modo, el grupo amino puede servir para unirse al miembro de unión a diana o la primera entidad de unión.

La longitud de los brazos se puede utilizar para proporcionar flexibilidad, rigidez, polifuncionalidad, orientación u otra característica para mejorar la función de la molécula. El grupo de unión covalente puede ser una función que tiene una afinidad desigual por diferentes proteínas de la sangre o que tiene una afinidad elevada por un epítipo o secuencia de proteína determinada, tal como un epítipo de IgG o albúmina.

La primera entidad de unión será generalmente una molécula pequeña, en la que la molécula probablemente minimiza cualquier respuesta inmune. Se puede utilizar cualquier molécula fisiológicamente aceptable, en la que existe un miembro de unión recíproca. De esta manera, de particular interés es la biotina, donde la avidina puede ser el miembro de unión recíproca, pero también se pueden utilizar otras moléculas, tales como quelatos metálicos, moléculas miméticas de un sitio de unión a epítipo o receptor o anticuerpo naturales, donde el miembro de unión recíproca puede ser un anticuerpo o fragmento del mismo, particularmente un fragmento Fab, una enzima, un receptor natural. De este modo, la primera entidad de unión puede ser un ligando para un receptor natural, un sustrato para una enzima, o un hapteno con un receptor recíproco.

La manera de producir el primer compuesto variará ampliamente, dependiendo de la naturaleza de varios elementos que comprenden el primer compuesto. Los procedimientos sintéticos se seleccionarán para que sean simples, proporcionen rendimientos elevados, y permitan obtener un producto altamente purificado. Normalmente, la función reactiva se creará como la última etapa, por ejemplo, con un grupo carboxilo, la esterificación para formar un éster activo será la última etapa de la síntesis, a menos que se desee desproteger alguna función del miembro de unión a diana o la primera entidad de unión como la última etapa.

Habitualmente, el primer compuesto cuando comprende la primera entidad de unión tendrá un peso molecular de por lo menos 200 D y no más de aproximadamente 2,5 kD, habitualmente no más de aproximadamente 1,5 kD y frecuentemente no menos de por lo menos 1 kD.

Entre los compuestos ilustrativos se incluyen el éster de N-hidroxisuccinimidil biotina, el éster de N-hidroxisulfosuccinimidil biotina, éster N-hidroxisulfosuccinimidílico del ácido N-biotinil 6-aminohexanoico, éster N-hidroxisulfosuccinimidílico de N-biotinil 4-butililo, disulfuro de 3-aminopropilo, y similares. Se dispone de un gran número de derivados de biotina solubles en agua para funcionalizar proteínas y, dependiendo del grado en el que dichos compuestos tienen enlazadores que son fisiológicamente aceptables, estos compuestos pueden aplicarse en la presente invención.

El primer compuesto se administrará habitualmente como un bolo, pero se puede introducir lentamente a lo largo del tiempo mediante infusión utilizando flujo de control. El primer compuesto se administrará en un medio fisiológicamente aceptable, por ejemplo, agua desionizada, solución salina tamponada con fosfato, solución salina, manitol, glucosa acuosa, alcohol, aceite vegetal. Habitualmente, se utilizará una única inyección aunque, si se desea, se puede utilizar más de una inyección. El primer compuesto se puede administrar mediante cualquier medio adecuado, incluyendo jeringa, trocar, catéter. La manera concreta de administración variará dependiendo de la cantidad a administrar, si es un bolo único o administración continua. Por lo general, la administración será intravascularmente, cuando el sitio de introducción no es crítico para la presente invención, preferiblemente en un sitio donde existe un flujo sanguíneo rápido, por ejemplo intravenosamente, vena periférica o central. Otras vías pueden ser útiles cuando la administración está acoplada con técnicas de liberación lenta o una matriz protectora. La intención es que el primer compuesto se distribuya de forma eficaz en la sangre, de manera que sea capaz de reaccionar con los componentes sanguíneos.

Por lo general, la reacción será con componentes móviles en la sangre, particularmente proteínas y células de la sangre, más particularmente proteínas de la sangre y glóbulos rojos. Por "móviles" se entiende que el componente no tiene una posición fija durante cualquier periodo de tiempo extenso, generalmente no superior a 5, más habitualmente un minuto. Por lo general, la reacción será con proteínas de plasma, tales como las inmunoglobulinas, particularmente IgM e IgG, albúmina, ferritina, y en un menor grado, otras proteínas que estén presentes en una cantidad sustancialmente reducida. También puede haber reacción con plaquetas, células endoteliales y glóbulos blancos. Por lo tanto, habrá inicialmente una población relativamente homogénea de proteínas y células funcionalizadas. Sin embargo, por lo general, la población variará sustancialmente en unos días de la población inicial, dependiendo de la vida media de las proteínas funcionalizadas en la corriente sanguínea. Por lo tanto, habitualmente en aproximadamente tres días o más, IgG se convertirá en la proteína funcionalizada predominante en la corriente sanguínea. Esto significa que después de unos días, el miembro de unión a diana se conjugará a, o el segundo compuesto, por lo general, se conjugará con y se unirá a IgG.

En muchas situaciones, se puede utilizar un único primer compuesto que comprende una primera entidad de unión, una vez dicho compuesto se ha probado a fondo en huéspedes, particularmente huéspedes humanos, ya que su fisiología estará bien establecida, su farmacocinética estará bien establecida, y su seguridad sobre un extenso periodo de tiempo también puede estar establecida. En algunos casos, el primer compuesto será fisiológicamente y/o terapéuticamente activo, cuando puede ser útil independientemente de la adición del segundo compuesto. Sin embargo, hasta el punto de que pueden existir individuos idiosincráticos, o que la administración crónica del primer compuesto puede dar lugar a alguna reacción inmune, puede ser deseable tener más de un primer compuesto a utilizar para la administración. Sin embargo, dado que la función del primer compuesto puede ser algo limitada cuando se utiliza combinado con un segundo compuesto, no es necesario desarrollar numerosas alternativas, aunque habrán numerosas alternativas que serán útiles para el mismo objetivo.

Por lo general, la vida media del primer compuesto será por lo menos de aproximadamente cinco días, más habitualmente por lo menos de aproximadamente 10 días y preferiblemente 20 días o más. El periodo para proporcionar una concentración efectiva puede ser mucho más largo, ya que se puede introducir un exceso sustancial del primer compuesto de manera que incluso después de dos o tres vidas medias, puede haber aún una cantidad útil del primer compuesto en la corriente sanguínea.

Generalmente, será satisfactorio tener el miembro de unión a diana como parte del primer compuesto.

La dosis del primer compuesto dependerá de si comprende el miembro de unión a diana y, por lo tanto, dependerá de los efectos adversos del miembro de unión a diana, su actividad cuando se une a componentes sanguíneos, el tiempo necesario para reducir la concentración libre del primer compuesto que contiene el miembro de unión a diana, la dosis necesaria para la actividad terapéutica, la indicación en tratamiento, la sensibilidad del agente, los enzimas de la sangre, la vía y modo de administración. Según sea necesario, la dosis se puede determinar empíricamente, utilizando inicialmente un múltiplo pequeño de la dosis terapéutica administrada normalmente, y a medida que se obtiene más experiencia, ampliando la dosis. Cuando se utiliza el miembro de unión a diana para obtener una respuesta inmune, el miembro de unión a diana será un antígeno, y no dependerá de la conjugación al componente sanguíneo para aumentar la respuesta inmune. En este caso, se pueden emplear dosis relativamente grandes, cuando se está interesado en la producción de anticuerpos como producto, cuando el huésped normal sea un animal doméstico o de laboratorio. Cuando el miembro de unión a diana está actuando como vacuna, la dosis puede ser más pequeña y se puede determinar empíricamente. Por lo general, como vacuna, la dosis estará generalmente en el intervalo de aproximadamente 10 ng a 100 μ g. Normalmente, cualquier dosis adicional se administrará después de que la dosis original haya disminuido por lo menos en un 50%, habitualmente por lo menos en un 90% de la dosis original.

Uno o más agentes de interés pueden estar presentes en el primer compuesto, habitualmente estando unidos múltiples agentes de interés a través de un primer o segundo grupo de unión a un núcleo central, por ejemplo, una proteína, un ácido nucleico, polisacárido, u otra entidad multifuncional. El grupo de unión no sólo sirve para unirse covalentemente al miembro de unión a diana, sino que también sirve para determinar si el miembro de unión a diana permanece unido al componente sanguíneo o si se libera, la manera y velocidad de liberación. Por lo tanto, la naturaleza del grupo de unión variará ampliamente dependiendo de su papel.

Cuando el miembro de unión a diana se retiene unido al componente sanguíneo, se puede utilizar una gran variedad de grupos de unión convenientes, incluyendo un enlace. De esta manera, los mismos tipos de grupos de unión utilizados en el primer compuesto se aceptarán para el segundo compuesto. Sin embargo, cuando el grupo de unión se divide y libera el miembro de unión a diana, el grupo de unión variará dependiendo de la naturaleza del miembro de unión a diana, la velocidad deseada de liberación, la valencia o la función en el miembro de unión a diana a liberar. De esta manera, se pueden utilizar varios grupos, cuando el medio de la sangre, componentes sanguíneos, particularmente enzimas, la actividad en el hígado, u otro agente puede dar lugar a la división del grupo de unión con la liberación del miembro de unión a diana a una velocidad razonable.

Entre las funciones que pueden encontrar utilidad se incluyen ésteres, ácidos orgánicos o inorgánicos, particularmente grupos carboxilo o grupos fosfato, disulfuros, enlaces a péptido o nucleótido, particularmente enlaces a péptido o nucleótido que son susceptibles a tripsina, trombina, nucleasas, esterases, acetales, éteres, particularmente éteres sacarídicos. Generalmente, el grupo de unión para la división requerirá por lo menos de dos átomos en la cadena, por ejemplo, disulfuro, y puede requerir de 50 átomos, habitualmente no más de aproximadamente 30 átomos, preferiblemente no más de aproximadamente 20 átomos en la cadena. De esta manera, la cadena puede comprender un oligopéptido, un oligosacárido, un oligonucleótido, un disulfuro, grupos divalentes orgánicos que son alifáticos, aromáticos, alicíclicos, heterocíclicos o combinaciones de los mismos, que implican ésteres, amidas, éteres, aminas. El grupo de unión concreto se seleccionará según la aceptación fisiológica, la velocidad deseada de división, la conveniencia sintética.

El conjugado se puede preparar de cualquier manera conveniente, dependiendo de la naturaleza de los componentes del miembro de unión del conjugado, la necesidad de mantenerla capacidad de unión de los miembros de unión y otras consideraciones que son relevantes a la utilización de la conjugación *in vivo*. Dependiendo de la naturaleza del conjugado, la relación de acoplamiento entre los dos miembros de unión del conjugado pueden variar desde uno que tiene un conjunto de uno o más miembros de unión, estando habitualmente en un promedio no superior a 6, más habitualmente no superior a tres de cualquiera de los miembros de unión en el conjugado. Generalmente, sólo habrá un anclaje, pero puede haber más de uno cuando se desea una mayor afinidad para los componentes sanguíneos de larga vida.

Tal y como se ha indicado previamente, el anclaje y el miembro de unión a diana pueden estar unidos covalentemente mediante una cadena apropiada, que puede tomar muchas formas diferentes.

La naturaleza del enlace entre los miembros de unión del conjugado dependerá ampliamente dependiendo de la composición química de los miembros de unión, el destino del miembro de unión a diana, la naturaleza de la diana. Generalmente, se utilizarán enlaces estables y los enlaces covalentes encontrarán aplicabilidad industrial. Por "estable" se entiende que el enlace no se romperá preferencialmente en comparación con otros enlaces de la molécula; "inestable" se refiere a una división preferencial. Sin embargo, ocasionalmente, se puede desear permitir la degradación limitada con el tiempo del enlace. Por ejemplo, en algunos casos se puede desear tener una liberación controlada del complejo del conjugado y la diana, cuando las afinidades de los miembros de unión del conjugado son muy elevadas. Mediante la proporción de la división o degradación del conjugado, la diana se liberará de acuerdo con la velocidad de división o degradación del conjugado, en lugar de la velocidad de separación de la diana del complejo. Una gran variedad de enlaces serán inestables en condiciones fisiológicas, donde la inestabilidad puede ser resultado de reacciones enzimáticas o no enzimáticas. Por ejemplo, se pueden proporcionar enlaces éster que son relativamente lábiles y se dividirán con el tiempo en la corriente sanguínea. Mediante la proporción de diferentes grados de impedimento estéri-

co, se pueden conseguir diferentes grados de labilidad. Alternativamente, se pueden proporcionar secuencias, que son reconocidas por una amplia variedad de enzimas, tales como proteasas. Por ejemplo, una serie de unidades diméricas de arginina-lisina serán sensibles a tripsina. Se pueden utilizar otros enlaces lábiles a proteasa, donde la proteasa se puede encontrar en la corriente sanguínea. Alternativamente, se pueden utilizar enlaces disulfuro, que se someterán a una división reductora. Entre otras funciones que pueden ser útiles se incluyen oligosacáridos, tiol ésteres, ácidos nucleicos. Alternativamente, se puede confiar en la naturaleza de uno o ambos miembros de unión para proporcionar la liberación de la diana del componente sanguíneo de larga vida, por ejemplo, naturaleza de péptido de anticuerpos sometidos a proteasas.

Existen extensos documentos en la literatura sobre procedimientos para unir covalentemente una gran variedad de compuestos para preparar conjugados con grupos funcionales diferentes. Se pueden idear varios esquemas sintéticos, dependiendo una vez más de la naturaleza de los miembros de unión del conjugado. De este modo, cuando están presentes grupos sulfhidrilo, estos miembros se pueden activar fácilmente para proporcionar una unión a un grupo sulfhidrilo y proporcionar un puente disulfuro o con un grupo maleimida, donde un tiol se puede unir a la maleimida para proporcionar un tioéter. Los grupos carboxilo se pueden activar fácilmente con una gran variedad de compuestos de hidroxilo o carbodiimida, en los que el éster o anhídrido reacciona con grupos amino o hidroxilo para proporcionar ésteres o amidas. Análogamente, las partes de sacáridos se pueden activar con peryodato. Otras uniones pueden encontrar aplicación, tales como iminas, hidracinas, etc. Alternativamente, se pueden utilizar uniones no covalentes, tales como uniones biotina-avidina, uniones de anticuerpos dobles, uniones de lectina-sacárido. Cuando los miembros de unión conjugados son ambos proteínas, tales como anticuerpos o fragmentos, el conjugado se puede diseñar genéticamente como una única construcción, clonar y expresar utilizando una serie de vectores y células huésped. Alternativamente, los dos miembros de unión conjugados se pueden sintetizar de forma recombinante o química y posteriormente, acoplar, particularmente proporcionando funciones únicas disponibles para el acoplamiento. La síntesis química puede utilizar sintetizadores disponibles comercialmente que utilizan síntesis en fase sólida o líquida, donde la síntesis puede ser todo o parte del conjugado. Las composiciones de la presente invención se pueden utilizar para el tratamiento, profiláctico o terapéutico, de una gran variedad de enfermedades celulares, toxicidades y exposiciones ambientales y se pueden administrar en una gran variedad de formas, dependiendo de la indicación. Si se desea, el conjugado se puede unir en primer lugar al componente sanguíneo de larga vida en una proporción adecuada seguido por la administración. Alternativamente, el conjugado se puede administrar al huésped para unirse a las células o proteínas del componente sanguíneo de larga vida. La cantidad de conjugado que se administra dependerá ampliamente, dependiendo de la naturaleza del conjugado, el objetivo para el conjugado, la dosis terapéutica, la actividad fisiológica del compuesto cuando está presente como conjugado, y cuando se une a una célula. Por lo tanto, la cantidad de conjugado administrada a un huésped puede variar de 1 μ g a 50 mg/kg de huésped.

Las presentes composiciones se administrarán, por lo general, parenteralmente, tal como intravascularmente (IV) intraarterialmente, intramuscularmente (IM), subcutáneamente (SC). La administración se hará normalmente por transfusión si el conjugado está unido a células. Si el conjugado no está unido, la administración se hará normalmente IV, IM o SC. Cuando las composiciones son de peso molecular bajo (inferior a aproximadamente 10 kD) o resistentes a enzimas digestivas, la administración del conjugado puede ser oral, nasal, rectal, transdérmica, o aerosol, donde la naturaleza del conjugado permite la transferencia al sistema vascular. Se utilizarán habitualmente transportadores fisiológicamente aceptables, tales como agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, etanol acuoso, plasma, soluciones proteináceas, soluciones de glucosa o manitol. La concentración del conjugado variará ampliamente, generalmente variando desde aproximadamente 1 pg/ml hasta 50 mg/ml. Entre otros aditivos que se pueden incluir se incluyen soluciones tampón, cuando el medio está tamponado generalmente a un pH en el intervalo de aproximadamente 5 a 10, donde el tampón variará generalmente en una concentración desde aproximadamente 50 hasta 250 mM, sal, donde la concentración de sal variará generalmente desde aproximadamente 5 hasta 500 mM, estabilizadores fisiológicamente aceptables. Las composiciones se pueden liofilizar para el almacenaje y transporte conveniente.

La selección del componente sanguíneo de larga vida afectará la manera en la que se modifica la actividad biológica de la diana. Dependiendo de la naturaleza de la diana, se utilizarán diferentes componentes sanguíneos de larga vida. Cuando la diana es una molécula, tal como una molécula orgánica o péptido pequeños, las proteínas del suero serán componentes sanguíneos de larga vida satisfactorios, y la eliminación de la diana acompañará la eliminación de la proteína del suero. La diana se debe inactivar sustancialmente mientras se une al conjugado, particularmente cuando la diana tiene efectos citotóxicos. Cuando la diana es una partícula vírica o célula, el componente sanguíneo de larga vida será una célula, dependiendo la selección de la célula de si se desea tener una célula diana eliminada rápidamente o mantenida en el huésped segregada a compartimentos celulares particulares. Por ejemplo, si se desea eliminarlas células infectadas de virus o células neoplásicas, los componentes sanguíneos de larga vida serían eritrocitos o plaquetas, de manera que la célula diana quedaría unida a los eritrocitos o plaquetas para evitar que la célula diana entre en vesículas pequeñas y el complejo sea reconocido por el bazo para la eliminación. Con eritrocitos, la deformación de los eritrocitos en la unión a la célula diana ayuda en el reconocimiento del complejo para la eliminación. Un mecanismo similar es operativo para las plaquetas.

La presente invención se puede utilizar en situaciones crónicas o agudas, de forma profiláctica o terapéutica. Para situaciones agudas, el conjugado normalmente se administrará de forma previa a la situación aguda. Por ejemplo, con drogadictos, se puede desear evitar la utilización de una droga de abuso concreta, particularmente cuando el paciente está en un programa con metadona. Mediante la administración del conjugado de la invención, cuando el conjugado puede ejercer una capacidad de unión eficaz durante semanas o meses, la ingestión de la droga de abuso daría lugar

a su inactivación, inhibiendo el efecto eufórico. De forma similar, cuando se refiere a una infección nosocomial, se administraría el conjugado previamente a la infección, de manera que tras la infección, la toxina o el factor de necrosis tumoral quedaría unido para disminuir su concentración efectiva por debajo del nivel patológico.

5 Para un uso terapéutico, se podría administrar el conjugado a un paciente de cáncer, de manera que la sangre se controlaría por sus células metastáticas o el exceso de factor de crecimiento. En este caso, se utilizaría un componente sanguíneo de larga vida que proporciona una rápida eliminación, tal como los eritrocitos. Cuando las células no se encuentran normalmente en el sistema vascular, tales como las células mamarias, el conjugado tendría como proteína diana, una proteína de superficie de las células mamarias, de manera que cualquier célula mamaria en el sistema vascular se podría detectar y eliminar. En el caso de las células T implicadas en la enfermedad autoinmune, cuando
10 dichas células tienen un epítipo común, el conjugado supervisaría la sangre por dichas células y sería capaz de unirse a dichas células y eliminar las células mediante los mecanismos indicados anteriormente.

La presente invención se puede utilizar previamente a uno o más sucesos que pueden tener efectos fisiológicos perjudiciales, por ejemplo, ingestión de drogas o respuesta fisiológica adversa de un huésped a un trauma o cirugía, o para una situación crónica en la que una producción continuada de toxinas, partículas de virus como resultado de una infección intratable, se controlan de forma continua mediante el conjugado unido a un componente sanguíneo de larga vida. La presente invención proporciona una fuente con capacidad de unión de larga vida, donde tras la unión de una diana, los efectos biológicos perjudiciales de la diana disminuyen rápidamente y la diana se puede eliminar lenta o
20 rápidamente del huésped mediante una variedad de mecanismos naturales asociados con la degradación, modificación química, eliminación de eritrocitos o plaquetas modificadas o defectuosas.

Debido al extenso tiempo de liberación o disponibilidad de los agentes de la presente invención, la presente invención se puede utilizar en una amplia variedad de situaciones. El miembro de unión a diana puede ser un anticuerpo para una toxina, cuando existe la sospecha sobre una infección nosocomial en un hospital u otra situación en la que la enfermedad se puede extender. La presente invención se puede utilizar antes de la cirugía para asegurar que se mantiene un nivel de fármaco durante y posteriormente a la cirugía sin requerir la administración repetitiva, evitando las molestias al paciente. Por ejemplo, se pueden utilizar agentes anticoagulantes cuando la naturaleza de la cirugía y la indicación son susceptibles de formación de coágulos. Se pueden utilizar inhibidores del reclutamiento de leucocitos para evitar el daño por perfusión. La presente invención se puede utilizar con fármacos cardiovasculares cuando un paciente es particularmente susceptible durante un periodo ampliado al infarto de miocardio. Entre otros tratamientos que se beneficiarán de una disponibilidad a largo plazo de fármacos, se incluyen hormonoterapia, terapia para la infertilidad, terapia inmunosupresora, terapia neuroléptica, profilaxis de drogas de abuso, tratamiento de enfermedades provocadas por agentes infecciosos, tratamiento de la hemofilia.
35

Mediante la conjugación de un miembro de unión a diana biológicamente activo a IgG en la sangre de un huésped de mamífero se pueden obtener muchas ventajas, al proporcionar una nueva actividad para las inmunoglobulinas, mientras se retienen muchas de las características deseables de las inmunoglobulinas, además de la extensión del tiempo de vida. Por ejemplo, las inmunoglobulinas pueden aún tener una función efectora F_c , tal como su función en la fijación complementaria, o la acción de las células citotóxicas dependiente de anticuerpo, efecto sobre la inactivación y la secreción. De forma similar, la albúmina de suero y otras proteínas de suero de larga vida pueden actuar para inactivar las entidades diana y ayudar en su rápida eliminación. De este modo, los componentes sanguíneos a los que se une el miembro de unión a diana comunican sus actividades fisiológicas a la actividad del miembro de unión a diana. De esta manera, las dianas celulares se pueden inactivar o eliminar al tener inmunoglobulinas dirigidas a una diana celular o soluble o mediante el recubrimiento de la diana celular o soluble con proteínas sanguíneas.
45

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Parte experimental

50 Ejemplo comparativo 1

Modificación del Volumen de Distribución de Cocaína

55 Se desarrolló un anticuerpo monoclonal contra un conjugado cocaína-BSA (proporción molar, 10:1) utilizando ratones BALB/c y se criba el mieloma SP20 mediante ELISA en placa de microtitulación en fase sólida contra Cocaína-BSA y péptido irrelevante-BSA como antígeno de control. La especificidad de anticuerpos específicos se verifica mediante un ensayo de competición contra cocaína-BSA en el que la unión de anticuerpos se inhibe en una manera dependiente de la dosis mediante cocaína pura. El anticuerpo seleccionado es IgG1, con un título de sobrenadante por ELISA de 1:64. Se produce Mab en fluidos de ascitis y se purifica mediante cromatografía de afinidad de proteína A.
60

Mab anti-RBC es un Mab de IgG1 específico para glicoforina A humana y reacciona con antígeno M de grupo sanguíneo (obtenido del Hospital Saint-Louis, París). El Mab reacciona de forma cruzada con eritrocitos de chimpancé y *Macacrus muliata*.
65

Los fragmentos Fab (producidos mediante la digestión con papaína seguida mediante SDS-PAGE) de Mabs anti-RBC y anti-cocaína se conjugan utilizando el método de Nékane, en el que el primer miembro del conjugado es activado por peryodato sódico, antes de la adición del segundo miembro del conjugado, dando lugar a un acoplamiento

covalente de carbohidrato-residuo NH_2 . El pH se controla durante la reacción de acoplamiento y se optimizan las proporciones de ambos miembros para proporcionar una proporción molar promedio próxima a 1:1. El conjugado se purifica mediante filtración en gel. Se seleccionan los picos correspondientes al peso molecular entre 80 kD y 120 kD (determinados mediante SDS PAGE). La reactividad del conjugado con cocaína se verifica mediante ELISA tal y como se ha indicado anteriormente, utilizando un conjugado de peroxidasa específico de cadena kappa anti-ratón, y como control un conjugado de peroxidasa específico de Fc anti-ratón (que no reacciona con cocaína unida a Fab). La reactividad del conjugado con RBC humano se estudia mediante citometría de flujo utilizando conjugado FITC de Fab anti-ratón y como control un conjugado FITC específico de Fc anti-ratón (que no reacciona con cocaína unida a Fab). Se muestra que el conjugado no aglutina RBCs y no induce la hemólisis (entre 100 ng/ml y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) cuando se incuba en plasma humano y de mono con la adición de complemento nuevo de conejo.

La biodistribución de cocaína marcada con ^{125}I se evalúa con y sin pretratamiento de animales con anti-RBC, conjugado específico de cocaína. Los animales ($n=3$) reciben IV mediante inyección lenta (5 minutos) de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de conjugado diluido en glucosa al 5% con un 1% de albúmina de suero humano. Un día después de la inyección, los animales reciben 10 μcurie de cocaína ^{125}I IV (100 μg por animal). 1 hora después de la inyección de cocaína, se sacrifican los animales, y se recogen varias muestras de sangre y tejido, incluyendo muestras de cerebro (córtex frontal y occipital).

Los animales de control ($n=3$) reciben sólo cocaína marcada con ^{125}I y no reciben conjugado. Se mide la radiación específica utilizando un contador gamma, y se expresa en cpm por ml de sangre o cpm por gramo de tejido. Los animales que reciben el pretratamiento con conjugado tienen una actividad específica promedio de ^{125}I en cerebro de 2,2% ($\pm 0,7\%$), la actividad específica promedio de I en cerebro, y una actividad específica de la sangre completa media de 25 veces (± 4) la de los animales de control (con una proporción de actividad específica de ^{125}I de eritrocito con respecto al plasma de 20:1 en el grupo tratado con conjugado, y 0,2 en el grupo de control).

Los resultados demuestran que el pretratamiento con un eritrocito unido a un conjugado específico para cocaína modifica el volumen de distribución de la cocaína, disminuye la difusión de la cocaína en el sistema nervioso central, y disminuye la concentración de cocaína de plasma con respecto a eritrocito (con un incremento neto en la concentración de la sangre completa).

Ejemplo comparativo 2

Conjugado subgrupo de células anti-T

Se conjuga un fragmento Fab específico anti-ratón RBC de rata a gp120 de VIH1 recombinante purificado (Proporción molar 1:2). Tras la administración IV a ratones SCID Hu (10 μg por ratón) del componente sanguíneo de larga vida RBC/gp 120, se recogen muestras de la sangre completa en serie durante las siguientes 48 horas, y se analizan mediante microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. En las primeras 6 horas, se observan rosettes de eritrocitos y células T CD3+, CD4+, CD8- en los animales pretratados con el Ancla, y están ausentes en los animales de control.

Ejemplo comparativo 3

Ancla de proteína anti-viral

Se conjuga un fragmento Fab específico anti-ratón RBC de rata a CD4 recombinante purificada (Proporción molar 1:3). 48 horas después de la administración IV a ratones BALB/c (10 μg por ratón) del conjugado RBC/CD4, se inyecta IV gp 120 de VIH1 recombinante marcado con ^{125}I a animales pretratados con conjugado o de control. La vida media de la concentración de gp 120 (sangre completa, eritrocito y plasma) se mide durante las siguientes 24 horas y 8 días. La vida media en el plasma de gp 120 disminuye bruscamente en animales pretratados, mientras que la vida media en eritrocitos y la sangre completa aumenta.

Ejemplo 4

Adición en dos etapas de inmunógeno de tiempo de vida ampliado

I. Se inyectaron a dos conejos una solución de éster de N-succinimidil biotina (NHS-biotina) (5 ó 50 mg en 200 μl o 1 ml de DMSO) i.v. en el día 0. Se tomaron muestras de sangre cada hora inicialmente, seguido por intervalos diarios y las muestras se analizaron para la presencia de biotina mediante electroforesis en gel (SDS-PAGE) utilizando 60 μg de muestra, detectando las proteínas a las que la biotina está unida por el conjugado de avidina-peroxidasa, utilizando un sustrato luminiscente (ECL kit, Amersham). Para la biotina unida a los glóbulos rojos, las células se aislaron por centrifugación, se lavaron, se lisaron mediante lisis hipotónica, y las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE de la misma manera que las proteínas de plasma. Para las proteínas de plasma, la electroforesis se realizó en condiciones reductoras y no reductoras, donde la IgM y la IgG se redujeron a subunidades en las condiciones reductoras.

Los geles para las proteínas de plasma de uno de los conejos mostraron que la biotina estaba unida a IgM, IgG, p90, p75 (transferrina), albúmina de suero, y p38. La duración en la albúmina de suero para la detección en la electroforesis en gel en condiciones reductoras fue de 9 a 12 días para la albúmina de suero, y hasta 33 días para IgM e IgG, mientras que para las condiciones no reductoras, donde el tiempo de exposición fue sustancialmente inferior, se

podieron observar bandas para la albúmina de suero durante 2 días y para la IgG durante 9 días. Con los glóbulos rojos, se pudo observar un grupo de proteínas durante 12 días, siendo el siguiente punto a los 33 días, en cuyo momento no se observaron bandas. El componente marcado principalmente tenía un patrón electroforético que sugería la Banda 3.

II. Para demostrar que la presente invención se puede utilizar para potenciar la respuesta inmune a una proteína heteróloga, después de la administración del conjugado de biotina tal y como se ha descrito anteriormente, se inyectaron 250 μ g o 1 mg de avidina de huevo blanco de forma intravenosa en cada uno de los dos conejos. En aproximadamente 2 días el título empezó a aumentar rápidamente y antes de 10 días se observó un título anti-avidina elevado mediante ELISA, utilizando microplacas recubiertas de avidina, tal y como quedó en evidencia mediante un valor de DO de aproximadamente 600. Por comparación, cuando la avidina se administró tal y como se ha descrito anteriormente a conejos a los que no se había administrado previamente conjugado de biotina, no hubo sustancialmente producción de anticuerpos hasta que no se administró una inyección intravenosa de refuerzo de 50 μ g de avidina en el día 6, en cuyo momento hubo un rápido incremento en el título de anti-avidina, aproximadamente el título observado con los ratones modificados con el conjugado de biotina alrededor del día 12.

Ejemplo 5

Unión de biotina-NHS a RBCs y proteínas de plasma

Se inyectaron 5 mg (-1,5 mg/kg) y 50 mg (-15 mg/kg) de NHS-biotina solubilizado en DMSO en los conejos 3, o A y 8, respectivamente. A continuación, se tomaron muestras de sangre 0,5, 1,2 y 4 horas en el mismo día después de la inyección y, a continuación, 1, 2, 3, 6, 9, 13, 20, 27, 34, 41, 48 y 55 días después de la inyección.

30 minutos después de la inyección, todas las RBCs se biotinizaron tal y como se muestra mediante citometría de flujo realizada con avidina conjugada con ficoeritrina. La fluorescencia media fue mucho menor para el conejo 3 que para el conejo 8 (26 y 320, respectivamente), mostrando una relación directa entre el marcaje de RBCs y la dosis de NHS-biotina. Las vidas medias de 17 ó 15 días se calcularon a partir de las curvas obtenidas con el conejo 3 u 8, respectivamente. Se obtuvo un periodo de vida de 55 días con el conejo 3. Después de 49 días, un 6% de las RBCs biotinilados sobrevivieron para el conejo 8. Según se mide mediante procedimientos convencionales, el periodo de vida de las RBCs de conejo es de 45 a 70 días.

Las proteínas de plasma de los conejos 3 y 8 se analizaron por inmunotransferencia. Las proteínas de plasma se separaron en condiciones reductoras (DTT 10 mM) en un gel de poliacrilamida al 10% (tinción con azul de Coomassie). Los componentes principales se identificaron como p180, p90, p75, albúmina, y las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas. Todas las proteínas de plasma reveladas con rojo de Ponceau fueron capaces de capturar avidina-ficoeritrina, mostrando que están biotiniladas. Para el conejo 3, se pudo detectar albúmina de suero en el día 20. La tinción fue mucho más intensa con muestras del conejo 8, mostrando biotinilación de componentes de peso molecular elevado (-200 kDa) y de las cadenas ligeras de inmunoglobulinas. No se observó tinción el día 19.

El patrón de las proteínas de plasma separadas en condiciones no reductoras en un gel de poliacrilamida al 8% (tinción con azul de Coomassie) mostró IgM, IgG, p90, p75 y albúmina de suero como los componentes principales. En las inmunotransferencias, se detectaron albúmina (60 kDa), transferrina, p90, IgG (160 kDa) y componentes de peso molecular elevado correspondientes en parte a IgM. La vida media de los componentes de peso molecular elevado e IgG apareció más larga que la de albúmina, ya que la última no se pudo visualizar a partir de las muestras tomadas el día 12 del conejo 8.

Ejemplo 6

Producción de anti-avidina con avidina unida a componentes de plasma biotinilados

Se inyectó a un conejo en el día 0 50 mg de NHS-biotina en 1 ml de DMSO seguido 30 minutos después por una inyección de avidina marcada con peroxidasa (1 ml/250 μ g). Siete días después, se inyectó al conejo 125 I-avidina (1×10^7 cpm; 50 μ g). A continuación, se sacaron muestras de sangre periódicamente para controlar la presencia de 125 I y la presencia de antisuero anti-avidina. El día 53, se inyectaron 50 mg de NHS-biotina en 600 μ l de DMSO seguido 30 minutos después con 1 mg/500 μ l de avidina y, a continuación, se sacaron muestras de sangre periódicamente para medir el nivel de anti-avidina. La anti-avidina apareció tan pronto como el día 2, con un nivel máximo alrededor del día 12 y un descenso lento a partir de entonces. Los niveles de anticuerpos no fueron significativos después de 33 días. Después de un refuerzo con NHS-biotina y avidina, se obtuvieron anticuerpos titulados elevados. En base al valor de DO según se determinó utilizando placas de ELISA recubiertas de avidina, en el día 70, el título fue aproximadamente 8 veces que en el día 12 (606 versus 4790).

En un conejo de control que no recibió NHS-biotina, no se observó un nivel significativo de anticuerpos en los 7 días después de la inyección de 500 μ g de avidina marcada con peroxidasa. Sin embargo, una inyección adicional de 125 I-avidina (15 μ g) dio lugar a una respuesta inmunogénica 5 días después.

La invención descrita proporciona la extensión del tiempo de vida de un agente en la corriente sanguínea de un huésped mamífero para una amplia variedad de objetivos. La invención descrita proporciona un procedimiento mejorado para limitar los efectos patogénicos o tóxicos de agentes presentes en la corriente sanguínea del

ES 2 266 041 T3

mamífero. Además, la presente invención permite la presentación continua de antígenos, proporcionando moléculas que pueden actuar como vigilantes, o manteniendo una modalidad terapéutica durante un periodo de tiempo extendido para evitar la administración repetitiva de un agente fisiológicamente activo.

5 El procedimiento es útil cuando se desea la vigilancia de la presencia de agentes fisiológicamente perjudiciales en la corriente sanguínea. Mediante la proporción de un conjugado que se une específicamente a dichos agentes y está unido a un componente asociado a la sangre de larga vida que aumenta la vida del conjugado en sangre, el conjugado puede actuar para unirse y desactivar el agente, y mediante la elección adecuada del componente asociado a la sangre de larga vida, el agente se puede eliminar lenta o rápidamente del huésped, utilizando los mecanismos fisiológicos
10 normales para dicha eliminación.

Todas las publicaciones y solicitudes de patentes mencionadas en este documento son indicativos del nivel de conocimiento de los expertos en la materia a la que pertenece esta invención.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Utilización de una composición para la fabricación de un medicamento destinado a la utilización en un procedimiento de tratamiento de un huésped mamífero que tiene una diana transportada en la sangre, que tiene un efecto fisiológico perjudicial

comprendiendo dicha composición un ancla unido covalentemente a un miembro de unión a diana,

10 reaccionando dicha ancla *in vivo* con un grupo amino, grupo carboxilo o grupo tiol de una proteína para formar un enlace covalente estable,

estando dicho enlace covalente estable seleccionado del grupo de amida, éster, imina, tioéter, disulfuro y enlaces amino sustituidos,

15 extendiéndose la vida media *in vivo* del miembro de unión a diana mediante la formación de dicho enlace covalente estable.

20 2. Utilización según la reivindicación 1, en la que el miembro de unión a diana es un agente fisiológicamente activo.

3. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el miembro de unión a diana comprende un péptido.

25 4. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el ancla reacciona con un grupo tiol de la proteína.

5. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el enlace covalente formado por la reacción del ancla con la proteína es un tioéter.