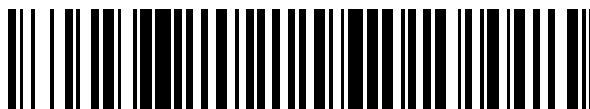


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 229**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 51/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.1999** **PCT/CA1999/00396**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.11.1999** **WO9956723**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.1999** **E 99919005 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016** **EP 1075280**

54 Título: **Complejos de hemoglobina-haptoglobina para la administración dirigida de fármacos**

30 Prioridad:

30.04.1998 CA 2236344

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

20.02.2017

73 Titular/es:

THERAPURE BIOPHARMA INC. (100.0%)
2585 MEADOWPINE BLVD
MISSISSAUGA ON L5N 8H9, CA

72 Inventor/es:

ADAMSON, J. GORDON;
WODZINSKA, JOLANTA MARIA y
MOORE, MARIE SYLVIE CELINE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 602 229 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Complejos de hemoglobina-haptoglobina para la administración dirigida de fármacos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a complejos de proteínas y al uso de los mismos en aplicaciones médicas. Más específicamente, se refiere a complejos de compuestos de hemoglobina con ribavirina que tienen una acción terapéutica sobre partes y/u órganos del cuerpo específicos, y a medios para dirigir tales complejos a partes del

10 cuerpo y órganos del cuerpo específicos.

Antecedentes de la invención y estado de la técnica

15 Se ha propuesto previamente el uso de hemoglobina y hemoglobina modificada como medio de administración de fármacos. La hemoglobina, como un componente natural de los glóbulos rojos presentes y que circulan por todo el cuerpo en cantidades relativamente grandes, tiene bioaceptabilidad bien establecida y el potencial de administrar fármacos por todo el cuerpo.

20 Así, Kluger et al., patente de EE.UU. 5.399.671, describen un compuesto de hemoglobina que se ha reticulado para efectuar la estabilización intramolecular de la estructura tetrámera de la misma, pero que contiene un grupo funcional residual sobre el residuo del conector al que pueden unirse covalentemente los fármacos para la administración.

25 Anderson et al., patente de EE.UU. 5.679.777, describen complejos de compuestos de hemoglobina y fármacos de polipéptido, en los que el fármaco de polipéptido está unido a una cadena de globina mediante un enlace disulfuro a una unidad de cisteína inherente en o genéticamente manipulada dentro de la cadena de globina.

30 Las haptoglobinas (Hp) constituyen parte de la familia de las α_2 -globina de glucoproteínas del suero. Las haptoglobinas están presentes en plasma de mamífero, y constituyen aproximadamente un cuarto de la fracción de α_2 -globulina del plasma humano. Cada individuo tiene una de las tres formas fenotípicas de la haptoglobina, de estrecha identidad estructural y química. Las haptoglobinas están compuestas de múltiples dímeros $\alpha\beta$ y los fenotipos se indican convencionalmente Hp 1-1, Hp 2-1 y Hp 2-2. Las cadenas β son idénticas en todos los fenotipos de la haptoglobina, pero las cadenas α varían (α^1 y α^2). Las secuencias de aminoácidos de todas las cadenas son conocidas. Hp 1-1 está compuesta por dos dímeros $\alpha^1\beta$ y tiene un peso molecular de aproximadamente 98 kDa. La

35 estructura de Hp 2-1 y Hp 2-2 puede escribirse del siguiente modo: $(\alpha^1\beta)_2(\alpha^2\beta)_n$ en la que $n = 0,1,2,\dots$ y $(\alpha^2\beta)_m$ en la que $m = 3,4,5,\dots$ respectivamente.

40 La administración de fármacos a un paciente que padece una enfermedad o trastorno que afecta principalmente a una parte del cuerpo o un órgano del cuerpo se realiza mejor eligiendo un método de administración que se dirija a la parte u órgano en necesidad de tratamiento con un alto grado de especificidad. Un sistema de administración tal hace más eficaz el uso del fármaco activo, para reducir el nivel de dosificación necesario, y reducir los efectos secundarios del fármaco.

45 Una función de la haptoglobina es unir hemoglobina extracelular, que surge de la lisis de los glóbulos rojos, para formar complejos de haptoglobina-hemoglobina esencialmente irreversibles que son reconocidos por receptores específicos sobre los hepatocitos en el hígado. De esta forma, la hemoglobina se dirige al hígado para el metabolismo.

50 El control y la manipulación de genes y productos génicos son medios posiblemente poderosos para tratar diversas enfermedades y trastornos genéticos. Cuando se introducen específicamente en las células, los genes pueden usar la maquinaria biosintética de la célula huésped para la expresión de las biomoléculas terapéuticas que codifican. Para terapia génica satisfactoria, debe concebirse un método satisfactorio de administración génica *in vivo*. Una técnica tal desarrollada en los últimos años es la administración mediada por receptor. Ésta tiene la ventaja de alta especificidad de la administración a las células que expresan el receptor elegido como diana.

55 El direccionamiento específico de agentes terapéuticos y de diagnóstico de bajo peso molecular a tejidos se potencia enormemente mediante el uso de administración mediada por receptor. Agentes de diagnóstico tales como sustancias fluorescentes o radiomarcadas indican la localización y la cantidad de células que llevan los receptores elegidos como diana cuando tales agentes se administran como complejos con ligandos para aquellos receptores.

60 Estos complejos también son útiles en caracterizar las propiedades de unión y transporte de receptores sobre células en cultivo. Tal información es útil en la detección de y/o diseño de terapia para tejidos que contienen las células que son reconocidas, tanto *in vitro* como *in vivo*.

65 El documento WO 93/08842 describe métodos y composiciones para administrar fármacos al cuerpo uniéndolos a hemoglobina para aumentar la semivida intravascular de fármacos conjugados con hemoglobina.

El documento WO 95/25121 describe el uso de conjugados de hemoglobina-polímero para potenciar la terapia antitumoral en mamíferos, en la que los métodos incluyen administrar una cantidad eficaz de una terapia antitumoral tal como radiación en combinación con hemoglobina conjugada con un polímero sustancialmente no antigénico.

- 5 S. Chamow et al., Journal of Biologic Chemistry, vol. 267, no. 22, 5 de agosto de 1992, pp. 15916-15922, describe conjugados químicos de CD4 soluble (sCD4) recombinante, en los que se usa hidrazida del ácido 4-(4-N-maleimidofenil)butírico (MPBH) en la conjugación de sCD4 a hemoglobina.

Sumario de la invención

10 Es un objetivo de la presente invención proporcionar un medio y composición para dirigir específicamente hepatocitos u otras células que tienen receptores para complejos de hemoglobina-haptoglobina con sustancias terapéuticamente activas en las que el sustituto terapéuticamente activo es ribavirina.

15 La presente invención describe complejos de construcciones de haptoglobina-hemoglobina a los que se une un agente modificador de hepatocitos (en los que el agente modificador de hepatocitos es ribavirina). Tales complejos de construcciones de haptoglobina-hemoglobina sirven de vehículos que se dirigen a hepatocitos eficaces para los agentes unidos, para la administración de los agentes modificadores de hepatocitos específicos (ribavirina) al hígado, y a otras células que tienen los receptores de hemoglobina-haptoglobina apropiados.

20 La expresión "complejo de construcción" se usa en el presente documento para referirse a la combinación de haptoglobina con hemoglobina no reticulada a la que está unida un agente terapéutico en la que el agente terapéutico es ribavirina. La presente invención proporciona complejos de construcciones compuestos de un compuesto de hemoglobina no reticulada, una haptoglobina y una sustancia modificadora de hepatocitos, en los que
25 la sustancia modificadora de hepatocitos es ribavirina. En un aspecto de la presente invención, el complejo de construcción se prepara extracorpóreamente y luego se administra al paciente. En otro aspecto, un complejo de hemoglobina-sustancia modificadora de hepatocitos se prepara extracorpóreamente, se administra al paciente, y forma el complejo de construcción de haptoglobina-hemoglobina-sustancia modificadora de hepatocitos con haptoglobina que está naturalmente presente en el suero del paciente. En otro aspecto, el nivel de haptoglobina del
30 paciente puede ser complementado por la administración de haptoglobina, un procedimiento conocido, tanto antes, durante, como después de la administración del complejo de construcción de hemoglobina-sustancia modificadora de hepatocitos. En cualquier caso, el complejo de construcción se dirige específicamente y se une como un ligando a los receptores de hepatocitos, debido a la presencia de las porciones de haptoglobina y hemoglobina del complejo de construcción.

35 Los complejos de construcciones de la presente invención, formados *ex vivo*, se dirigen a cualquier célula que tenga receptores para los complejos de Hb-Hp.

40 Además, los complejos de construcciones de la presente invención pueden modular o iniciar la actividad de otros agentes terapéuticos o de diagnóstico administrados por otros métodos para la modificación de hepatocitos, tales como profármacos, enzimas o genes que codifican enzimas y que requieren la activación para producir un efecto.

El complejo de construcción según la presente invención puede representarse generalmente por la fórmula:

$$45 \quad (Hp)_a - (Hp)_b - (L_c - A_d)_e$$

en la que a = 1 a aproximadamente 10;
b = 0,5 a aproximadamente 10;
c = 0 a aproximadamente 10;
50 d = 1 a aproximadamente 20;
e = 1 a aproximadamente 20;
Hp es haptoglobina como se describe en el presente documento;
Hb es una hemoglobina no reticulada como se describe en el presente documento;
L es un conector como se describe en el presente documento;
55 y A es un agente modificador de hepatocitos como se describe en el presente documento,

en el que la estequiometría de Hp con respecto a Hb en el complejo viene dada por el número disponible de sitios de unión sobre las dos proteínas, pero es generalmente del orden de 1:05 a 1:2.

60 Breve referencia a los dibujos

Cada una de las Figuras 1 a 17 se proporciona para referencia solo.

65 La Figura 1 es un esquema de reacción que ilustra en forma de diagrama un proceso para producir una realización de un complejo de construcción de la presente invención;

las Figuras 2A, 2B, 2C y 2D son resultados de cromatografía de exclusión por tamaño, en forma de representaciones de absorbancia a 280 nm y 414 nm frente al tiempo de elución, que indican la distribución de peso molecular de los cuatro productos del Ejemplo de referencia 2. Se formaron complejos usando poli(L-lisina) de peso molecular (A) 4 kDa, (b) 7,5 kDa, (C) 26 kDa y (D) 37 kDa.

La Figura 3 es una representación similar, para el complejo de producto que utiliza poli(L-lisina) de 26 kDa después de 24 horas de incubación con haptoglobina, producido en el Ejemplo de referencia 2;

la Figura 4A - 4B son representaciones de los ensayos de desplazamiento por movilidad del gel de ADN en presencia de (A) THb y (B) THb-poli(L-lisina) producido según el Ejemplo de referencia 4;

la Figura 5 es un ensayo de fluorescencia de colorante de los productos del Ejemplo de referencia 4;

la Figura 6 es una representación del ensayo de desplazamiento por movilidad del gel de los productos del Ejemplo de referencia 4;

la Figura 7 es un ensayo de fluorescencia de otro producto del Ejemplo de referencia 4;

la Figura 8 es una cromatograma de exclusión por tamaño del producto del Ejemplo de referencia 6;

las Figuras 9A, 9C y 9D muestran cromatogramas de exclusión por tamaño de los productos del Ejemplo 9, utilizando (A) haptoglobina 1-1, (C) haptoglobina 2-1, (D) haptoglobina 2-2;

la Figura 9B muestra los espectros de UV-visible de los productos del Ejemplo 9;

la Figura 10 es un cromatograma de exclusión por tamaño del producto de Ejemplo de referencia 11;

la Figura 11 es un cromatograma de exclusión por tamaño del producto de Ejemplo de referencia 13;

la Figura 12 muestra los cromatogramas de intercambio aniónico (solapados) de productos y materiales de partida del Ejemplo de referencia 14;

la Figura 13 muestra cromatogramas de exclusión por tamaño solapados de los productos del Ejemplo de referencia 15;

la Figura 14 muestra perfiles de elución de cromatografía de exclusión por tamaño con detección a 280 (líneas continuas) y 414 nm (líneas discontinuas) para productos del Ejemplo de referencia 16; (A) haptoglobina 1-1, (B) OR-Hb de 64 kDa, (C) haptoglobina-[OR-Hb de 64 kDa], (D) OR-Hb >64 kDa, (E) haptoglobina-[OR-Hb >64 kDa].

la Figura 15 muestra cromatogramas de exclusión por tamaño de productos del Ejemplo 17;

las Figuras 16 A-D son presentaciones gráficas del análisis de resultados obtenidos en el Ejemplo 18;

la Figura 17 es una presentación gráfica de análisis adicionales de resultados obtenidos según el Ejemplo 18.

Descripción de las realizaciones preferidas

La sustancia modificadora de hepatocitos usada en los complejos de la presente invención es ribavirina.

El compuesto de hemoglobina útil como componente de los complejos de la presente invención es un compuesto de hemoglobina no reticulada.

La hemoglobina humana, por ejemplo aquella obtenida a partir de glóbulos rojos caducados, y purificados por el proceso de cromatografía de desplazamiento descrito en la patente de EE.UU. 5.439.591 Pliura et al., es un material de partida preferido para la preparación del producto de hemoglobina para su uso en el complejo de la presente invención.

Puede haber ventajas en usar hemoglobina no reticulada como componente de los complejos de construcciones de la presente invención. Una hemoglobina tal, con una sustancia modificadora de hepatocitos unida a ella, se disociará en hemoglobina dimérica de 32 kDa de peso molecular aproximado, y dos de tales productos de hemoglobina diméricos disociados se unen a una única molécula de haptoglobina para dar un complejo según la presente invención. Así se evita la formación de complejos de haptoglobina-hemoglobina de alto peso molecular. La haptoglobina que se une a dímeros de $\alpha\beta$ es generalmente una reacción mucho más rápida que la haptoglobina que se une a hemoglobina reticulada. Los complejos de peso molecular más bajo resultantes del uso de hemoglobina no reticulada pueden mostrar unión y captación mejorada del receptor de hepatocitos.

Si se usa la hemoglobina de una forma que se disociará en dímeros como componente de la presente invención, o si

se usan los propios dímeros de la hemoglobina, por ejemplo, si los dímeros se han modificado de forma que no puedan volver a formar la hemoglobina de 64 kDa, se prefiere formar el complejo de construcción según la invención extracorpóreamente, y luego administrar el complejo de construcción acabado al paciente, para evitar los riesgos auxiliares a administrar al cuerpo una especie molecular de peso molecular demasiado pequeño, concretamente, eliminar el fármaco demasiado rápido mediante eliminación. La administración de dímeros de Hb que llevan ribavirina puede ser posible sin unión previa a haptoglobina en casos en los que la formación de complejos *in vivo* es adecuada antes de la eliminación del dímero modificado.

En la formación del complejo de construcción, puede ser necesario interponer entre el sitio reactivo sobre la hemoglobina no reticulada y la sustancia modificadora de hepatocitos un conector químico o un grupo espaciador. Esto depende de la naturaleza del grupo químico disponible sobre la hemoglobina para el enlace, y de los grupos químicos disponibles sobre el compuesto modificador de hepatocitos compuesto, para este fin.

Un complejo de construcción según una realización preferida de la presente invención comprende una molécula de haptoglobina, que puede ser haptoglobina 1-1 o cualquier otro fenotipo, unida a una o más moléculas de un compuesto de hemoglobina por medio de una fuerte interacción no covalente.

La Figura 1 (proporcionada en el presente documento como una figura de referencia) en forma de diagrama ilustra las etapas químicas que participan en la preparación de una hemoglobina reticulada, para la reacción con un conector y/o agente, y con haptoglobina para formar un complejo de construcción según diversas realizaciones de la invención. Se hace reaccionar TTDS con hemoglobina, tras lo cual salen dos de los tres grupos 3,5-dibromosalicilato. Los grupos amina primaria en Lys-82 y β -Lys-82 sobre la hemoglobina están unidos por un enlace amida al reticulante, formando una hemoglobina tetrámera intramolecularmente reticulada y estabilizada con el tercer grupo dibromosalicilato intacto y disponible para la reacción adicional. En la segunda etapa, la hemoglobina reticulada se hace reaccionar con el agente o un conector (en el caso del Ejemplo de referencia 1, polilisina) necesario para la posterior unión del agente. En otros casos, la sustancia modificadora de hepatocitos, o agente activo, toma el lugar de la polilisina en el esquema de la Fig. 1, para formar la construcción. El complejo ya está entonces listo para la administración al paciente para formar un complejo de construcción *in situ*, o alternativamente la haptoglobina puede hacerse reaccionar con el complejo así formado extracorpóreamente, de manera que la haptoglobina se une a la porción de hemoglobina del complejo para formar el complejo de tres partes listo para administración al paciente. Alternativamente, la hemoglobina modificada con TTDS con un conector unido puede hacerse reaccionar con haptoglobina y unirse al agente como una etapa final. Después de la administración, el complejo de construcción se unirá a los hepatocitos, en el que la haptoglobina-hemoglobina media en la unión a los receptores selectivos de los mismos y permite que la sustancia modificadora de hepatocitos se administre a y entre en el hepatocito utilizando los receptores de hepatocitos selectivos para el complejo de haptoglobina-hemoglobina.

Ejemplos de referencia específicos

Ejemplo de referencia 1 – Conjugación de hemoglobina reticulada con TTDS (THb) a poli(L-lisina):

Se sintetizaron conjugados de poli(L-lisina) de hemoglobina reticulada con TTDS (THb-K_n) añadiendo poli(L-lisina) a THb-DBS (hemoglobina reticulada con TTDS con una funcionalidad 3,5-dibromosalicilato sin hidrolizar) a una relación molar 1:1 para promover la formación de conjugados en los que solo una molécula de hemoglobina está unida a una única cadena de poli(L-lisina). La poli(L-lisina) usada en este experimento es un polímero lineal con un enlace amida entre el grupo carboxilo y el grupo α -amino de la lisina. Se conjugaron polímeros con un peso molecular promedio de 4 kDa (K_{4kDa}), 7,5 kDa (K_{7,5kDa}), 26 kDa (K_{26kDa}) y 37 kDa (K_{37kDa}) con Thb.

Se añadió TTDS (13,9 mg) en etanol (100 μ l) a desoxihemoglobina (5 ml, 8,5 g/dl) en borato 50 mM a pH 9,0. La mezcla de reacción se agitó a 30 °C bajo nitrógeno durante 45 min. La hemoglobina se cargó entonces con CO (la solución se mantuvo sobre hielo) y se eliminó el exceso del reactivo de reticulación pasando la solución de hemoglobina a través de una columna Sephadex G-25 (200 mm de L x 25 mm de D) equilibrada con borato 50 mM a pH 9,0. La solución de hemoglobina resultante (3,6 g/dl) se cargó otra vez con CO. Se prepararon soluciones de poli(L-lisina) en borato 50 mM a pH 8,0 y se añadieron a la hemoglobina (3,6 g/dl, 1,9 ml) como se indica en la Tabla 1 a continuación. La relación molar de poli(L-lisina) con respecto a hemoglobina fue 1:1 para los cuatro polímeros. Los conjugados de THb-poli(L-lisina) (THb-K_n) se taparon en botellas de suero, se recargaron con CO y se dejaron a temperatura ambiente durante dos días. Se determinaron las concentraciones de hemoglobina en estas muestras usando reactivo de Drabkin.

Tabla 1

Poli(L-lisina)	Cantidad de poli(L-lisina) añadida a THb (mg)
K _{4kDa}	4,2
K _{7,5kDa}	8,0
K _{26kDa}	27,5
K _{37kDa}	39,3

Cromatografía de intercambio aniónico: Se analizaron complejos de THb-K_n en bruto usando cromatografía de intercambio aniónico en una columna SynChropak AX-300 (250 mm de L x 4,6 mm de D, SynChrom, Inc.). Se usó un gradiente de cloruro sódico para eluir las diversas hemoglobinas modificadas. El efluente se monitorizó a 280 nm.

Para cuando el análisis, todos los THb-DBS sin reaccionar se habían hidrolizado para dar THb. La reacción produjo una mezcla de productos todos los cuales, como era de esperar, migraron antes que THb sobre el medio de cromatografía de intercambio aniónico. Los rendimientos se calcularon sumando las áreas de los picos de los picos que eluyeron antes y comparándolas con el área de los picos total. Los rendimientos de hemoglobina modificada con poli(L-lisina) calculados de esta forma fueron: 37, 37, 81 y 84 % para K_{4kDa}, K_{7,5kDa}, K_{26kDa} y K_{37kDa}, respectivamente.

Purificación de conjugados de THb-K_n: Se separaron conjugados de THb-K_n de THb sin conjugar por cromatografía de intercambio aniónico en una columna POROS HQ/50 (52 mm de L, 14 mm de D) equilibrada con tampón Tris-HCl 25 mM a pH 8,4. Las Hb modificadas se eluyeron con un gradiente de cloruro sódico. El efluente se monitorizó a 280 nm y las fracciones reunidas que contenían los conjugados de THb-K_n se concentraron usando un dispositivo de filtración Amicon™ y una membrana de corte de 30 kDa.

Cromatografía de exclusión por tamaño: Se determinó la distribución del peso molecular de conjugados de THb-K_n purificados y sus complejos de haptoglobina usando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) en una columna Superdex™-200 (300 mm de L x 10 mm de D, Pharmacia) equilibrada y eluida con Tris-HCl 25 mM que contenía cloruro de magnesio 0,5 M a pH 7,2 a un caudal de 0,4 ml/min. El efluente se monitorizó a 280 nm y 414 nm. La estequiometría de la hemoglobina con respecto a la poli(L-lisina) osciló de 1:1, usando poli(L-lisina) de 4 kDa, a construcciones heterogéneas con estequiometrias de hasta 4:1 usando los conectores de poli(L-lisina) de mayor peso molecular, según tiempos de elución correspondientes con patrones de peso molecular. No estuvo presente THb sin modificar. Estas construcciones fueron estables bajo las condiciones de cromatografía de alto contenido de sal.

Ejemplo de referencia 2 – Formación de complejos entre THb-K_n y haptoglobina 1-1

Se usaron las siguientes soluciones madre para la preparación de los complejos: 1,74 mg/ml de haptoglobina 1-1 (Hp) en agua y 1,0 mg/ml de soluciones de THb-K_n (todas las concentraciones de THb-K_n representan concentraciones de hemoglobina) en borato de sodio 50 mM a pH 9,0. Se añadió haptoglobina (14 µl) a THb-K_n en fosfato de potasio a pH 7,0 dando las siguientes concentraciones finales: 0,12 mg/ml (1,22 µM) de haptoglobina y 0,19 mg/ml (2,9 µM) de THb-K_n en fosfato de potasio 25 mM a pH 7,0 (200 µl de volumen final). Después de la incubación durante 180 min a temperatura ambiente, las muestras se analizaron usando SEC.

Complejos de THb-K_n con haptoglobina 1-1: La formación de complejos de THb-K_n con haptoglobina puede seguirse usando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). La Figura 2A muestra la composición de la mezcla de THb-K_{4kDa} con Hp después de la incubación a temperatura ambiente durante 180 min. Aparece un nuevo pico de alto peso molecular a 25,5 min. Las representaciones de la relación de absorbancia a 280 y 414 nm (A_{280}/A_{414}) con respecto al periodo de elución indican las proporciones relativas de haptoglobina y hemoglobina en los complejos de construcciones y otros picos. La relación de absorbancia (A_{280}/A_{414}) a través del nuevo pico es 0,9, que indica que están presentes tanto los componentes de haptoglobina como de hemoglobina en este complejo. La haptoglobina 1-1 migra a 29,7 min y es fácilmente identificada por una alta relación A_{280}/A_{414} . La Figura 2B muestra SEC de la mezcla de THb-K_{7,5kDa} con Hp después de la incubación a temperatura ambiente durante 180 min. Otra vez, aparece un nuevo pico a 25,1 min con una relación A_{280}/A_{414} de 0,73, seguido de haptoglobina a 29,7 min y THb-K_{7,5kDa} a 35,8 min con relación A_{280}/A_{414} de 0,3. El análisis de SEC de los complejos THb-K_{26kDa} y THb-K_{37kDa} con haptoglobina es más complicado debido a su amplia distribución de peso molecular. Los resultados se presentan en las Figs. 2D y 2D, respectivamente. Es evidente de la Figura 2C y 2D que tanto THb-K_{26kDa} como THb-K_{37kDa} forman complejos con haptoglobina. La relación A_{280}/A_{414} es 0,64 para THb-K_{26kDa}-Hp y 0,69 para THb-K_{37kDa}-Hp.

Grado de formación de complejos THb-K_{26kDa}-Hp: Para determinar si todos los componentes estructuralmente diferentes de THb-K_n se unen a haptoglobina, se incubó THb-K_{26kDa} con un 15 % de exceso de haptoglobina durante diversas longitudes de tiempo y luego se analizó usando SEC. Se usaron las siguientes soluciones madre para la preparación del complejo: 1,74 mg/ml de haptoglobina 1-1 en agua y 7,4 mg/ml de soluciones de THb-K_{26kDa} en fosfato de potasio a pH 7,0 dando las siguientes concentraciones finales: 0,74 mg/ml (7,5 mM) de haptoglobina y 0,41 mg/ml (6,4 mM) de THb-K_{26kDa} (relación molar 1,2:1 de Hp con respecto a Hb) en fosfato de potasio 25 mM a pH 7,0. Después de la incubación a temperatura ambiente durante diversas longitudes de tiempo, las mezclas se analizaron usando SEC. El progreso de la reacción fue seguido por monitorizar la desaparición del pico de haptoglobina en un perfil de SEC. El 85 % de THb-K_{26kDa} se unió por haptoglobina después de 24 horas. El complejo THb-K_{26kDa}-HP resultante tuvo una amplia distribución de peso molecular que oscila de 370 kDa a aproximadamente 1000 kDa (Fig. 3).

Ejemplo de referencia 3 – Unión de ADN a THb-K_n y THb-K_n-Hp. Ensayo de desplazamiento por movilidad del gel:

Se realizaron ensayos de desplazamiento por movilidad del gel para evaluar la estequiometría de la unión de ADN de plásmido (pCMVbeta) a los conjugados THb-K_n. Este método electroforético en gel se basa en la observación de

que las propiedades migratorias del ADN se alteran tras la unión de proteína. Ninguna proteína ni complejos de ADN-proteínas en los que la proteína constituye una parte significativa de su masa entran en geles de 1 % de agarosa. Si se analizan mezclas con una relación de THb-K_n con respecto a ADN crecientes, se observa que la banda de ADN desaparece a y por encima de la relación que se corresponde con la estequiometría del complejo.

Para cada uno de los cuatro conjugados y para el complejo THb-K_{26kDa}-HP, se prepararon soluciones que contenían de 0,4 a 6400 ng del conjugado (este peso basado en el componente de hemoglobina) en 32 µl de HEPES 20 mM a pH 7,3 que contiene NaCl 150 mM. El ADN de plásmido (560 ng en 28 µl de HEPES 20 mM a pH 7,3 que contiene NaCl 150 mM) se añadió gota a gota a cada muestra y las mezclas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras (15 µl) se analizaron sobre un gel de 1 % de agarosa que contenía bromuro de etidio (0,2 µg/ml). Se determinó la cantidad de conjugado que previno la entrada del ADN en el gel. Los resultados se describen en el siguiente Ejemplo de referencia.

Ejemplo de referencia 4 – Unión de ADN al complejo THb-K_{26kDa} y THb-K_{26kDa}-Hp: Método de extinción de la fluorescencia del naranja de tiazol:

Este ensayo de fluorescencia del colorante se basa en la observación de que un colorante intercalante de ADN (naranja de tiazol) es fluorescente solo si se une a ADN. La formación de complejos entre THb-K_n y ADN produce el desplazamiento del colorante intercalante del ADN y la disminución de la fluorescencia total.

Se usaron las siguientes soluciones madre en este experimento: 0,05 mg/ml de ADN (pCMVbeta), 0,010 mg/ml de complejo THb-K_{26kDa} o THb-K_{26kDa}-HP, naranja de tiazol $1,75 \times 10^{-6}$ M (se diluyeron 0,1 mg/ml de solución en 1 % de metanol 190 veces con agua), HEPES 20 mM a pH 7,3 que contiene NaCl 0,15 M. Se mezclaron ADN de plásmido (10 µl), THb-K_{26kDa} (volúmenes variables de 2,5 a 60 µl) y tampón (al volumen final de 200 µl) en una placa de 96 pocillos genérica y se incubaron durante 2,5 horas a temperatura ambiente. También se preparó la muestra que contenía naranja de tiazol en tampón HEPES y se usó como control del fondo. Se midió la fluorescencia en un lector de placas Packard FluoreCount™ usando excitación a 485 nm y emisión a 530 nm. El complejo THb-K_{26kDa}-HP se preparó como se ha descrito anteriormente y se usó sin purificación. Se diluyó con HEPES 20 mM a pH 7,3 que contenía NaCl 0,15 M dando una concentración final de 0,010 mg de Hb/ml.

El ensayo de desplazamiento por movilidad del gel y el ensayo de extinción de la fluorescencia demostraron ambos que THb-K_n se une a ADN. La Figura 4A (izquierda) y 4B (derecha) son representaciones de ensayos de desplazamiento por movilidad del gel de conjugados de haptoglobina-hemoglobina-ADN producidos según el Ejemplo de referencia 4. Se añadieron ciento cuarenta ng de ADN a cantidades crecientes de (A) THb o (B) THb-K_{26kDa}. El carril 1 de ambos geles contiene marcadores de peso molecular de ADN. Contenido de Hb en otros carriles: (A2) 50 ng, (A3) 100 ng, (A4) 200 ng, (A5) 400 ng, (A6) 800 ng, (A7) 1600 ng, (A8) vacío, (B2) 25 ng, (B3) 50 ng, (B4) 100 ng, (B5) 200 ng, (B6) 400 ng, (B7) 800 ng, (B8) ADN solo. Con respecto al ensayo de desplazamiento por movilidad del gel, el aumentar la proporción de THb-K_n en las muestras de ADN afectó la migración de ADN como se observa en la Fig. 4. La Figura 4A muestra las propiedades migratorias del ADN después de la incubación con cantidad creciente de THb que oscila de 50 a 1600 ng de proteína. En este intervalo de concentración, THb no se une al ADN, ya que no puede detectarse cambio en la migración del ADN. THb-K_{26kDa} es el más eficaz en unirse al ADN. Cien ng de THb-K_{26kDa} (relación de THb-K_{26kDa} con respecto a ADN = 0,7, peso/peso) previenen completamente que el ADN entre en el gel de agarosa (Fig. 4B). Se requirieron aproximadamente 400 ng de las otras preparaciones de THb-K_n para unir todo el ADN. Los resultados para THb-K_{26kDa} están de acuerdo con el ensayo de extinción de la fluorescencia que indicó el 86 % de la disminución de fluorescencia a la misma relación de THb-K_{26kDa} con respecto a ADN. La Fig. 5 muestra el efecto de THb_{26kDa} sobre la fluorescencia de ADN-naranja de tiazol. En la Fig. 5, la cantidad de THb-K_{26kDa} se basa en el componente de hemoglobina solo.

El complejo THb-K_{26kDa}-Hp también se une a ADN. Se encontró que 200 ng de THb-K_{26kDa}-Hp previnieron completamente que 140 ng de ADN entraran en el gel de agarosa (relación de THb-K_{26kDa}-Hp con respecto a ADN = 1,4, peso/peso). La Fig. 6 muestra la unión de THb-K_{26kDa}-Hp a ADN por el ensayo de desplazamiento por movilidad del gel. Se añadieron ciento cuarenta ng de ADN a cantidades crecientes de THb-K_{26kDa}-Hp: 25 ng (carril 2), 50 ng (3), 100 ng (4), 200 ng (5), 400 ng (6), 800 ng (7), pesos basados en el componente de hemoglobina. Se cargaron patrones de peso molecular en el carril 1 y 140 ng de ADN en el carril 8. A la misma relación de THb-K_{26kDa}-Hp con respecto a ADN (1,4:1 peso/peso) el ensayo de fluorescencia indica solo el 42 % de disminución de la fluorescencia y el 81 % de disminución de la fluorescencia a la relación 2,8. El ensayo de fluorescencia se muestra en la Fig. 7 (el peso del conjugado solo se basa en el componente de hemoglobina del mismo). La comparación de los ensayos de desplazamiento por movilidad del gel para THb-K_{26kDa}-HP indica que se requiere aproximadamente el doble de poli(L-lisina) unida a proteína para prevenir que el ADN migre en el gel cuando se usa el complejo de haptoglobina. Como la cantidad de poli(L-lisina) conjugada con hemoglobina fue idéntica en ambos experimentos, la disminución de la capacidad de unión de ADN de THb-K_{26kDa}-Hp es probablemente debida a la aglomeración estérica del complejo THb-K_{26kDa}-Hp-ADN.

En estos ejemplos de referencia se ha sintetizado y caracterizado una construcción que tiene todos los componentes necesarios para la administración génica dirigida *in vivo* a hepatocitos humanos mediante receptores de haptoglobina. Se conjugó poli(L-lisina) con la hemoglobina reticulada con TTDS para proporcionar un sitio para la

unión del ADN mediante interacciones electrostáticas de sus grupos ϵ -amina positivamente cargados con las cargas negativas de grupos fosfato sobre el ADN. Se ha demostrado previamente que cuando se neutralizan más del 90 % de las cargas negativas de ADN, la hebra de ADN lineal se compacta en una estructura de toroide, una forma que es más estable y más susceptible para la internalización por las células. Se ha informado de expresión génica óptima para las relaciones de ADN con respecto a poli(L-lisina) que producen complejos electroneutros.

Los ensayos de desplazamiento por movilidad del gel y de fluorescencia han demostrado que el complejo THb-K_{26kDa}-HP se une al ADN de plásmido, completando así el ensamblaje de una construcción posiblemente capaz de administrar oligonucleótidos por endocitosis mediada por receptores de haptoglobina.

Ejemplo de referencia 5 – Síntesis de hemoglobina reticulada que lleva lisina tritiada o no tritiada

Se evaporó una solución de L-[³H]-lisina bajo una corriente de nitrógeno para obtener 59,5 nmoles (5 mCi) de material sólido. Se prepararon 59,5 nmoles de L-lisina no radiomarcada de una manera similar. Se disolvió TTDS (39,8 mg) en etanol (270 μ l) y se añadieron 200 μ l de esta solución a desoxihemoglobina (10 ml, 9,2 g/dl) en borato 50 mM a pH 9,0. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante una hora, luego se oxigenó. Se eliminó el exceso de reticulante de la mitad de la mezcla por filtración en gel y entonces la solución se cargó con CO y se congeló, dando Hb reticulada con un éster activado sobre el reticulante (THb-DBS, 62 mg/ml) como se describe por Kluger (documento US 5.399.671). Se eliminó el reticulante sin reaccionar de la otra mitad de la mezcla de reacción en bruto por filtración en gel usando tampón de elución de L-lisina/clorhidrato de L-lisina 0,1 M (pH 9,0). El eluato se cargó con CO y se dejó a temperatura ambiente durante la noche. Usando este proceso, la lisina llegó a conjugarse con el conector mediante el éster activado, dando THb-Lys. Se añadió THb-DBS recién descongelado (29,5 nmoles, 30,5 μ l) a las lisinas radiomarcadas y las no radiomarcadas cada día durante tres días. Entonces se añadió THb-Lys (700 μ l) a ambas mezclas y se desalaron los productos. La completitud de la reacción se confirmó por cromatografía de intercambio aniónico.

Ejemplo de referencia 6 – Complejo de haptoglobina-THb-Lys:

Se añadió haptoglobina (1,61 mg/ml de haptoglobina 1-1 en agua, 11 μ l) a THb-Lys (38 mg/ml en borato de sodio 50 mM a pH 9,0) dando las siguientes concentraciones finales: 0,68 mg/ml (6,9 μ M) de haptoglobina y 0,41 mg/ml (6,4 μ M) de THb-Lys se enrasaron a un volumen final de 200 μ l a fosfato de potasio 25 mM a pH 7,0. En el plazo de 18 horas, se observó el complejo haptoglobina-THb-Lys por SEC como una especie de alto peso molecular, con absorción a 280 y 414 nm, eluyendo por separado de la haptoglobina nativa y el producto THb-Lys original (Figura 8). El complejo de construcción se purificó por SEC. La columna se equilibró y se eluyó con solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Ejemplo de referencia 7 – Complejo haptoglobina-THb-[³H]-Lys:

Se añadió THb-[³H]-Lys (75 μ l, 41 mg/ml, 0,657 Ci/mmol) a una solución de haptoglobina 1-1 parcialmente purificada (0,273 ml, 3,7 mg/ml) en PBS a pH 7,4. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante la noche. El complejo THb-[³H]-Lys-Hp se purificó usando SEC equilibrada y se eluyó con PBS a pH 7,4. La radiactividad se asoció principalmente con una especie de alto peso molecular identificada por SEC, que tiene absorción a 280 y 414 nm y eluyendo por separado de la haptoglobina nativa y el producto THb-Lys original, y con un tiempo de retención correspondiente al producto no radiomarcado del Ejemplo de referencia 6.

Ejemplo de referencia 8 – Síntesis de conjugado de fluoresceína-hemoglobina (FL-Hb):

Se añadió solución de 5-yodoacetamidofluoresceína (5-IAF, 11 mg, 21 μ moles) en N,N-dimetilformamida (DMF, 50 μ l) lentamente a oxihemoglobina (60 mg/ml, 5 ml) en fosfato de potasio 50 mM a pH 7,0 con agitación a 4 °C. Después de tres horas de reacción a 4 °C, el exceso de 5-IAF se eliminó por una amplia diálisis contra fosfato de potasio 50 mM a pH 7,2 hasta que no pudo detectarse 5-IAF en el dializado. El espectro de absorción de UV-visible del producto mostró una banda de absorción de fluoresceína característica a 496 nm.

Ejemplo 9 – Complejos de FL-Hb con haptoglobina 1-1, 2-1 y haptoglobina de fenotipo mixto:

Se añadió FL-Hb (6 mg/ml en fosfato de potasio 50 mM a pH 7,2, 40 μ l) a haptoglobina 1-1, 2-1 o fenotipo mixto (Hp_{mix}) (2,8 mg/ml en agua, 39 μ l) dando las siguientes concentraciones finales: 0,6 mg/ml (6,2 μ M) de Hp y 1,3 mg/ml (21 μ M) de FL-Hb en 180 μ l de volumen final de fosfato de potasio 25 mM a pH 7,0. La mezcla se analizó por SEC después de la incubación a temperatura ambiente durante 10 min. El complejo FL-Hb con haptoglobina 1-1 migra a 33 min (Figura 9A - cromatogramas de SEC superpuestos de Hp 1-1 y complejo de Hp 1-1 con FL-Hb) y puede distinguirse claramente de la haptoglobina por su absorbancia a 414 nm. FL-Hb migra a 42,9 min (Figura 9A). Se aislaron los complejos FL-Hb con Hp 1-1 y Hp_{mix} y se analizaron por espectroscopia de UV-Vis (Figura 9B - espectro de UV-Vis de complejos de haptoglobina 1-1 y Hp_{mix} con FL-Hb, la flecha indica la banda característica de la fluoresceína) y fluorimetría. Este material muestra fluorescencia con excitación a 480 nm y emisión a 520 nm, y una banda de absorción característica para fluoresceína con $\lambda_{m\acute{a}x}$ a 496 nm. Los complejos FL-Hb con Hp 2-1 y Hp_{mix}

se muestran en las Figuras 9C y 90, respectivamente. Los complejos de construcciones se purificaron por SEC eluida con tampón PBS.

Ejemplo de referencia 10 – Síntesis de hemoglobina reticulada que lleva putrescina tritiada:

Se diafiltraron 200 ml de Hb purificada en tampón borato 50 mM a pH 9,0, luego se desoxigenaron y la concentración se ajustó a 7,1 g/dl. Hb se reticuló a una relación 2:1 de TTDS con respecto a Hb durante 45 min a 30 °C y a continuación se desaló usando tampón borato 50 mM a pH 9,0 dando una concentración final de 3,1 g/dl. Se añadieron 1,43 ml de Hb desalada a cada una de dos alícuotas de 1 ml de putrescina radiomarcada (1 mCi/ml, $6,94 \times 10^{-5}$ mmol/ml) y reaccionaron a temperatura ambiente durante 1,5 horas (relación 10:1 de Hb:putrescina). Se hicieron reaccionar 0,9 mg de putrescina fría (exceso de 40 veces con respecto a la putrescina radiomarcada) con 17 ml de THb-DBS a una relación de 1,5:1 de THb-DBS:putrescina. Se añadieron 5 ml de esta solución a cada una de las dos reacciones y se mezclaron durante la noche a temperatura ambiente. Ambas mezclas se añadieron entonces a THb-DBS recién reticulado y desalado ($5,3 \times 10^{-5}$ moles) y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Entonces se añadió un exceso de 20 veces de putrescina fría (172 mg) y se hizo reaccionar durante la noche. THb- ^3H Pu se diafiltró entonces en lactato de Ringer. La actividad específica fue 1,5 Ci/mol, 90 mg/ml.

Ejemplo de referencia 11 – Complejo de haptoglobina 1-1 con THb- ^3H Pu:

Se añadió haptoglobina (3,0 mg/ml en agua, 51 μl) a THb- ^3H Pu (10 mg/ml en PBS a pH 7,2, 20 μl) dando las siguientes concentraciones finales: 1,4 mg/ml (14 μM) de haptoglobina y 1,8 mg/ml (28 μM) de THb- ^3H Pu en un volumen final de 110 μl de fosfato de potasio 25 mM a pH 7,0. La mezcla se analizó por SEC después de la incubación a temperatura ambiente durante 2 horas. Se recogieron fracciones (0,4 ml) del efluente y se analizaron por recuento por centelleo. El complejo THb- ^3H Pu-Hp migra como una especie de alto peso molecular con el tiempo de elución de 20 a 28 min (Figura 10) y se separa bien de la banda de haptoglobina a 30 min y THb- ^3H Pu a 37 min. THb- ^3H Pu-Hp absorbe tanto a 280 nm como a 414 nm ($A_{280\text{nm}}/A_{414\text{nm}} = 0,74$) y tiene radiactividad específica (cpm/mg de Hb) similar a la de THb- ^3H Pu. El complejo de construcción se purificó por SEC.

Ejemplo de referencia 12 – Síntesis de hemoglobina reticulada que lleva monodansil cadaverina:

Se diafiltró Hb purificada (8,0 g/dl, 100 ml, $1,25 \times 10^{-4}$ moles) en tampón borato 50 mM, pH 9,0, luego se oxigenó y se desoxigenó. Se añadió una solución desoxigenada de TTDS (exceso molar doble con respecto a Hb, 0,26 g, $2,5 \times 10^{-4}$ moles) y la mezcla se agitó durante 1 hora a 35 °C, luego se cargó con CO. La cromatografía de intercambio iónico en este momento indicó solo una pequeña cantidad de Hb sin reaccionar (1,7 %). Se añadió un exceso molar de 15 veces de monodansilcadaverina (MDC) en ~20 ml de HCl 0,1 M ajustado a 25 ml con borato 50 mM, pH 9,0, a la Hb reticulada (0,63 g, $1,88 \times 10^{-3}$ moles). Después de 60 horas a temperatura ambiente, MDC-Hb se diafiltró contra borato 10 mM, pH 9,0. El producto se purificó por filtración en gel y se diafiltró en lactato de Ringer.

Ejemplo de referencia 13 – Complejo de haptoglobina 1-1 con THb-MDC:

Se añadió THb-MDC (20 mg/ml en solución de Ringer con lactato pH 7,2, 3,5 μl) a haptoglobina 1-1 (1,1 mg/ml en agua, 200 μl) dando las siguientes concentraciones finales: 1,1 mg/ml (11 μM) de Hp y 0,34 mg/ml (5,4 μM) de THb-MDC. La mezcla se analizó por SEC después de la incubación a temperatura ambiente durante 24 horas. El complejo THb-MDC con haptoglobina migra como una especie de alto peso molecular con el tiempo de elución de 21 a 29 min (Figura 11). Este material migra por separado de la haptoglobina (30,9 min) y absorbe a tanto 280 nm como a 414 nm ($A_{280\text{nm}}/A_{414\text{nm}} = 0,70$). THb-MDC eluye a 37,9 min con $A_{280\text{nm}}/A_{414\text{nm}} = 0,29$. El complejo de construcción puede purificarse por SEC.

Ejemplo de referencia 14 – Síntesis de hemoglobina reticulada que lleva primaquina (THb-PQ):

Se añadió TTDS (14,0 mg) en etanol (100 μl) a desoxihemoglobina (10 ml, 58 mg/ml) en borato 50 mM a pH 9,0. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante una hora. Entonces se eliminó el exceso del reticulante por filtración en gel eluido con borato 50 mM a pH 9,0 y el producto (THb-DBS, 43 mg/ml) se cargó con CO. Se disolvió difosfato de primaquina (0,5 g, 1,1 mmoles) en borato 50 mM a pH 9,0 (10 ml) y el pH de la solución resultante se ajustó a 8,5 con NaOH 10 M (primaquina parcialmente precipitada). Se añadió THb-DBS (10 ml) a primaquina y la mezcla de reacción se agitó en la oscuridad a temperatura ambiente durante la noche. Entonces se filtró el producto y el filtrado se dializó ampliamente contra borato 50 mM a pH 9,0. La cromatografía de intercambio aniónico del producto (Figura 12) indica que THb-PQ constituye el 68 % de todos los componentes de la hemoglobina en la mezcla. THb-DBS conjugado con primaquina constituye el 64 % de todas las cadenas β cuando el producto se analiza usando cromatografía de fase inversa.

Ejemplo de referencia 15 – Haptoglobina 1-1 complejo con THb-PQ:

Se añadió THb-PQ (15 mg/ml en borato 50 mM a pH 9,0, 67 μl) a haptoglobina 1-1 (4,0 mg/ml en agua, 500 μl) dando las siguientes concentraciones finales: 2,0 mg/ml (20 μM) de Hp y 1,0 mg/ml (15,7 μM) de THb-PQ. La mezcla

se analizó por SEC y cromatografía de intercambio aniónico después de la incubación a temperatura ambiente durante 21 horas. El complejo THb-PQ con haptoglobina migra como una especie de alto peso molecular con el tiempo de elución de 21 a 29 min (Figura 13). Este material migra por separado de la haptoglobina complejada con hemoglobina sin reticular (29,9 min) y haptoglobina (30,6 min) y absorbe a tanto 280 nm como a 414 nm ($A_{280nm}/A_{414nm} = 0,70$). La cromatografía de intercambio aniónico indicó que toda la hemoglobina sin modificar y el 74 % de tanto THb-PQ como THb han reaccionado con Hp. Este resultado concuerda bien con el análisis de SEC que indica que el 78 % de la hemoglobina ha reaccionado con Hp.

Ejemplo de referencia 16 – Complejos de haptoglobina-[poli-O-rafinosa-Hb] y haptoglobina-[O-rafinosa-Hb de 64 kDa]

Se reticuló HbAO y se polimerizó usando rafinosa oxidada (OR) según el procedimiento de Pliura (patente de EE.UU. 5.532.352). Se separaron las especies de peso molecular superior a 64 kDa, que presentan Hb polimerizada (OR-Hb de >64 kDa) de la especie de 64 kDa (OR-Hb de 64 kDa) por cromatografía de exclusión por tamaño. La preparación de Hb se combinó por separado con haptoglobina 1-1 humana en agua a una concentración final de 0,2 mg de Hb/ml y 0,125 mg de haptoglobina/ml (Hb:Hp final aproximadamente 2,2:1). Las mezclas se incubaron durante una hora a 22 °C, entonces se analizaron por cromatografía de exclusión por tamaño bajo condiciones de elución no desnaturizante de disociación ($MgCl_2$ 0,5 M, Tris 25 mM a pH 7,4). La Figura 14, que muestra perfiles de elución de cromatografía de exclusión por tamaño con detección a 280 (líneas continuas) y 414 nm (líneas discontinuas), indica la unión de las hemoglobinas modificadas con haptoglobina. La incubación de las hemoglobinas modificadas con haptoglobina produce especies de alto peso molecular que no se corresponden con tanto la hemoglobina modificada como la haptoglobina, y que tienen absorción a 414 nm que indica contenido de hemoglobina.

Ejemplo 17 – Unión de Hb humana modificada ($[^3H]$ -NEM-Hb) a haptoglobina de rata en plasma

Se evaporó 1 mCi de 3H -N-etilmaleimida ($[^3H]$ -NEM) en pentano en 0,5 ml de tampón fosfato, y se añadieron 25 mg de Hb en 1 ml de tampón dando una relación NEM:Hb final de 0,06:1, o 37 μ Ci/mg de Hb. El análisis de RP-HPLC después de 24 horas a 4 °C indicó la incorporación de la mayoría de la radiomarca dentro de un pico beta modificado. Después de 47 h, se añadió un exceso de 15 veces (con respecto a tiol β Cys93) de NEM no radiomarcado. Se eliminaron sales y NEM no unido por filtración en gel, y la concentración final se ajustó a 10,2 mg de Hb/ml. Entonces se combinó una pequeña porción de este material (3H -NEM-Hb) con suero de rata que contenía haptoglobina para determinar si todos los componentes radiomarcados se unieron a Hp. La capacidad de unión de Hb del suero de rata se ajustó a 670 μ g de Hb/ml de suero. Se combinaron 0,5 y 2,0 equivalentes de 3H -NEM-Hb, basados en la capacidad de unión de Hb, con suero y se analizaron por cromatografía de exclusión por tamaño eluida bajo condiciones no desnaturizantes de disociación usando $MgCl_2$ 0,5 M, Tris 25 mM a pH 7,4 (Figura 15). En la preparación de 3H -NEM-Hb, toda la radiactividad se asoció a un pico de 32 kDa. A 0,5 eq. de 3H -NEM-Hb, toda la radiactividad apareció en el pico de Hb-haptoglobina (31 minutos). A 2,0 eq., la haptoglobina se satura y el exceso de 3H -NEM-Hb sigue sin unir (41 minutos). El 7,3 % de la radiactividad que se combina con componentes del plasma aparece en un pico de MW alto a ~22 minutos. Estos hallazgos demuestran que todos los componentes de la Hb humana modificada, 3H -NEM-Hb, son capaces de unirse a haptoglobina de rata en plasma.

Ejemplo 18 – Biodistribución de complejos de Hb modificada y haptoglobina en rata.

La capacidad de Hp para dirigir Hb modificada al hígado se midió en un estudio de biodistribución de radioisótopos. Se prepararon dos artículos de prueba a partir de HbA₀ humana purificada modificada con N-etilmaleimida marcada con tritio ($[^3H]$ -NEM-Hb): $[^3H]$ -NEM-Hb solo en lactato de Ringer, y $[^3H]$ -NEM-Hb complejado con un ligero exceso de haptoglobina de rata en plasma de rata. Se analizaron tres grupos de tratamiento; (A) ratas normales recibieron el complejo de Hb modificada-haptoglobina en plasma, (B) ratas normales recibieron la Hb modificada sola (aproximadamente dos veces la capacidad de unión de Hb de la rata), y (C) ratas empobrecidas en haptoglobina recibieron la Hb modificada sola. Se administraron aproximadamente 3 mg de Hb a ratas Sprague-Dawley conscientes en cada caso. Se recogieron muestras de hígado y de plasma 30, 60 y 120 minutos después de la administración y se contó la radiactividad después de la solubilización y la extinción. Los valores se convirtieron en porcentajes de dosis total y concentración/dosis, y se muestran diversos análisis en la Figura 16. Esto muestra contenidos de radiactividad, indicativos de porcentajes de dosis. La Figura 16A muestra el porcentaje de dosis en plasma. La Figura 16B muestra el porcentaje de dosis en hígado. La Figura 16C muestra el porcentaje de dosis en hígado + plasma. La Figura 16D muestra las concentraciones en hígado/plasma. Las designaciones con estrellas (*) y **) muestran diferencias ($p < 0,05$) dentro de grupos de tratamiento en diferentes tiempos. Las cruces († y ‡) muestran diferencias ($p < 0,05$) dentro de momentos de tiempo para diferentes grupos de tratamiento.

La retención en plasma fue la mayor en el grupo A, y ambos grupos A y B fueron superiores al grupo C. La mayor diferencia en el contenido de plasma fue 120 minutos, momento en el que el plasma del grupo A contuvo 3 veces la radiactividad del grupo C y 3,5 veces la del grupo B. El contenido en el hígado en los grupos A y B fue superior a en el grupo C en todos los momentos de tiempo. A los 30 minutos, los grupos A y B tuvieron aproximadamente el 20 % de la dosis total en el hígado en comparación con el 11 % en el grupo C. El contenido en el hígado fue el mismo a los 30 y 60 minutos en los grupos A y B, y disminuyó por el momento de tiempo de 120 minutos. A los 120 minutos,

los contenidos en el hígado del grupo A y B fueron 5 y 2 veces superiores al grupo C, respectivamente. Los grupos A y B contuvieron 60 % de la dosis en los compartimentos del plasma y el hígado a los 30 minutos, en comparación con aproximadamente la mitad de esa cantidad en los animales del grupo C. Las relaciones de concentración/dosis en el hígado con respecto al plasma aumentaron con el tiempo en todos los grupos, con concentración en el hígado aproximadamente 4 veces la del plasma en los grupos A y B a los 120 minutos, aproximadamente dos veces la relación del grupo C al mismo tiempo. La mejora en la retención en plasma y el direccionamiento al hígado se demuestra adicionalmente por comparación de los contenidos combinados medios en hígado y plasma entre grupos, presentados en la Fig. 17, concretamente las relaciones de los porcentajes combinados medios en hígado y plasma de dosis total. Las barras sombreadas se derivan del Grupo A/C, las barras negras del Grupo B/C y las barras blancas del grupo A/B. Los contenidos combinados en hígado y plasma de los grupos A y B fueron coherentemente superiores a en el grupo C, teniendo el grupo A un contenido combinado 4 veces superior a en el grupo C a los 120 minutos. Las áreas bajo las curvas de distribución se calcularon sin extrapolación a tiempo cero (Tabla 2) e indicaron que la captación en el hígado en los grupos A y B fue aproximadamente dos veces la del grupo C. Los datos globales demuestran una mayor capacidad para concentrar producto en el hígado cuando Hp está presente, tanto en un complejo pre-formado con la Hb modificada, como en forma de Hp endógena donde es capaz de formar un complejo con Hb administrada. Aquí también es una indicación clara de que la retención en plasma de conjugados de Hb aumenta mediante la combinación con haptoglobina, de forma que un conjugado de fármaco estaría disponible para la captación en tejido durante una mayor longitud de tiempo.

Tabla 2: Áreas bajo las curvas de distribución para plasma e hígado en rata.

Grupo	ABC* (ug de Hb·min/ml/dosis)	ABC* (ug de Hb·min/g/dosis)
	Plasma	Hígado
A	370,0	455,3
B	284,2	510,4
C	163,0	234,0

*dosis = ug de Hb/g de peso corporal

Así se ha demostrado que los agentes pueden conjugarse con tanto el dímero de hemoglobina de 32 kDa según la invención como con la Hb intramolecularmente reticulada de 64 kDa de referencia, usando tanto la unión a funcionalidades de la cadena lateral, a un reticulante intramolecular, como a un conector secundario unido al reticulante intramolecular. Todas estas construcciones se unieron a haptoglobina. Se ha demostrado adicionalmente el direccionamiento selectivo de un complejo de construcción tal, formado *in vivo* o *ex vivo*, al hígado y la extensión de la semivida en circulación.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un complejo de hemoglobina que comprende una hemoglobina no reticulada capaz de unirse a haptoglobina y un agente terapéutico unido a la hemoglobina, en el que el agente terapéutico es ribavirina.
2. Un complejo de hemoglobina según la reivindicación 1, en el que el agente terapéutico se une a la hemoglobina por medio de un conector químico.
- 10 3. Un complejo de construcción de hemoglobina que comprende un complejo de hemoglobina según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 junto con una haptoglobina unida a la hemoglobina.
4. Un complejo de construcción de hemoglobina según la reivindicación 3, formado *ex vivo* haciendo reaccionar el agente terapéutico con hemoglobina no reticulada y haciendo reaccionar haptoglobina con la hemoglobina no reticulada.
- 15 5. Un complejo de hemoglobina según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o un complejo de construcción de hemoglobina según la reivindicación 3 o la reivindicación 4 para su uso en el tratamiento de una afección médica en un paciente mamífero.
- 20 6. Un complejo de construcción de hemoglobina para su uso según la reivindicación 5, en el que la afección médica es un trastorno hepático.
7. Un complejo de construcción de hemoglobina para su uso según la reivindicación 5 o 6, en el que el complejo de construcción de hemoglobina es capaz de interaccionar con un receptor de hemoglobina-haptoglobina de una célula.
- 25

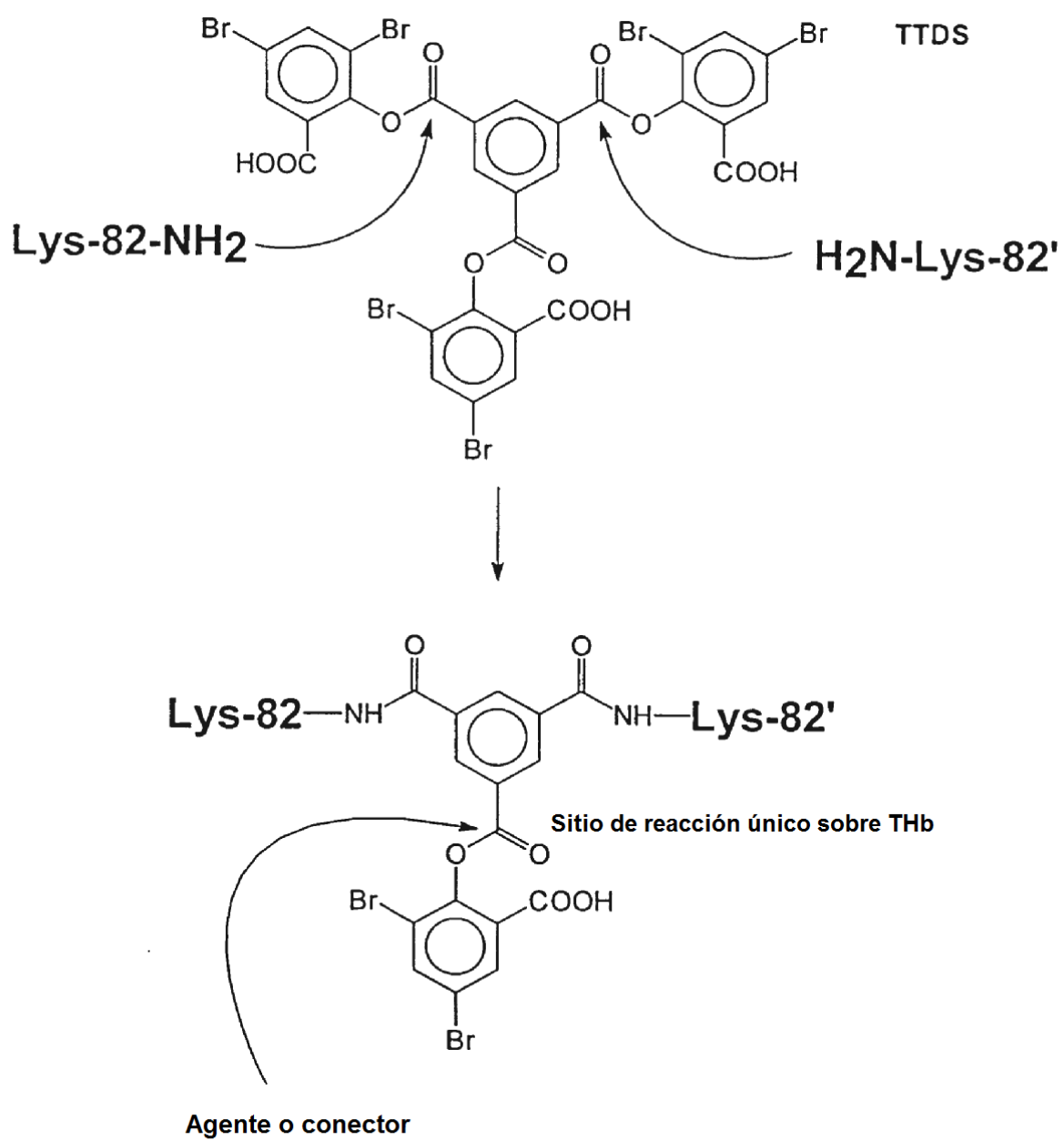
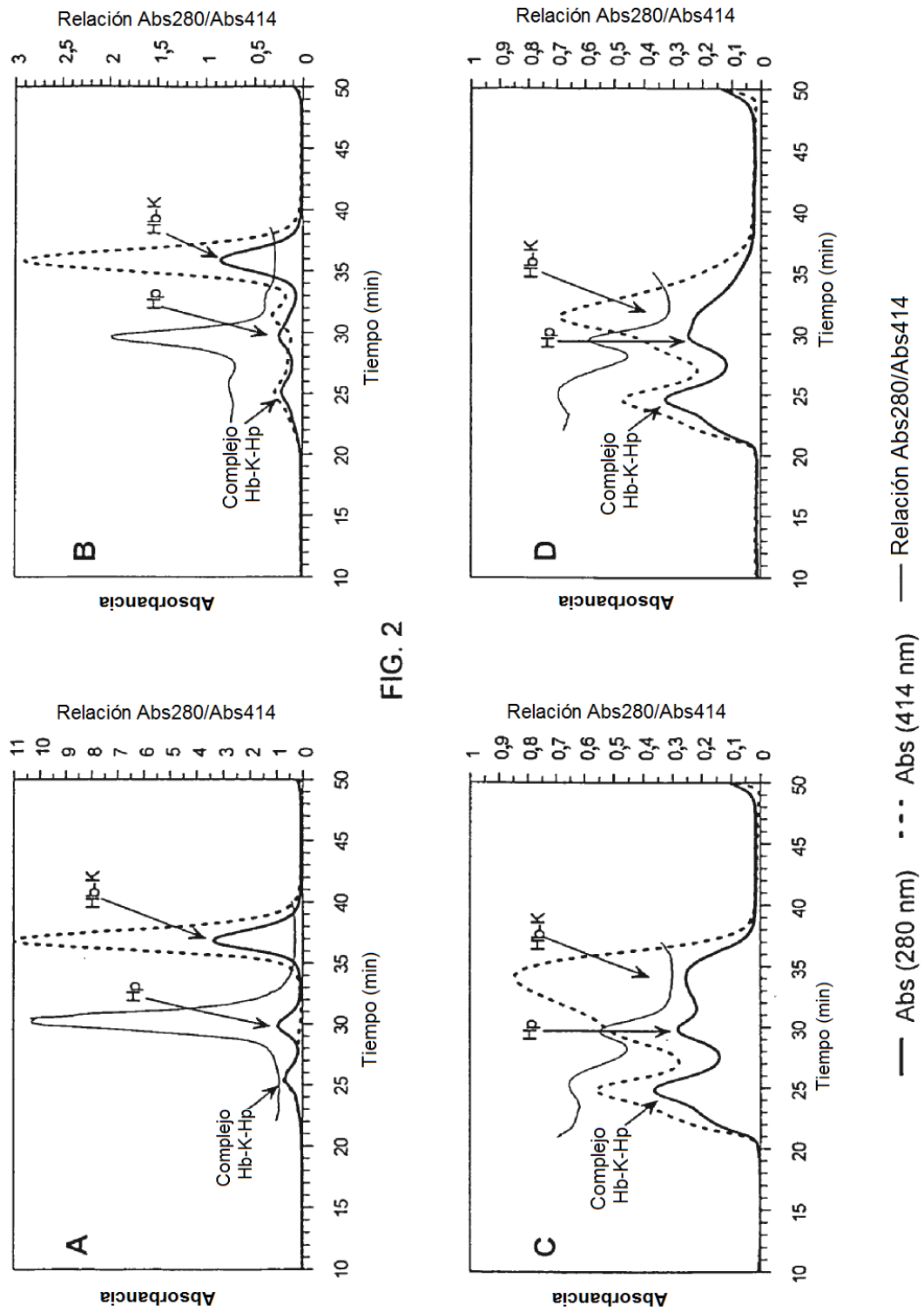


FIG. 1



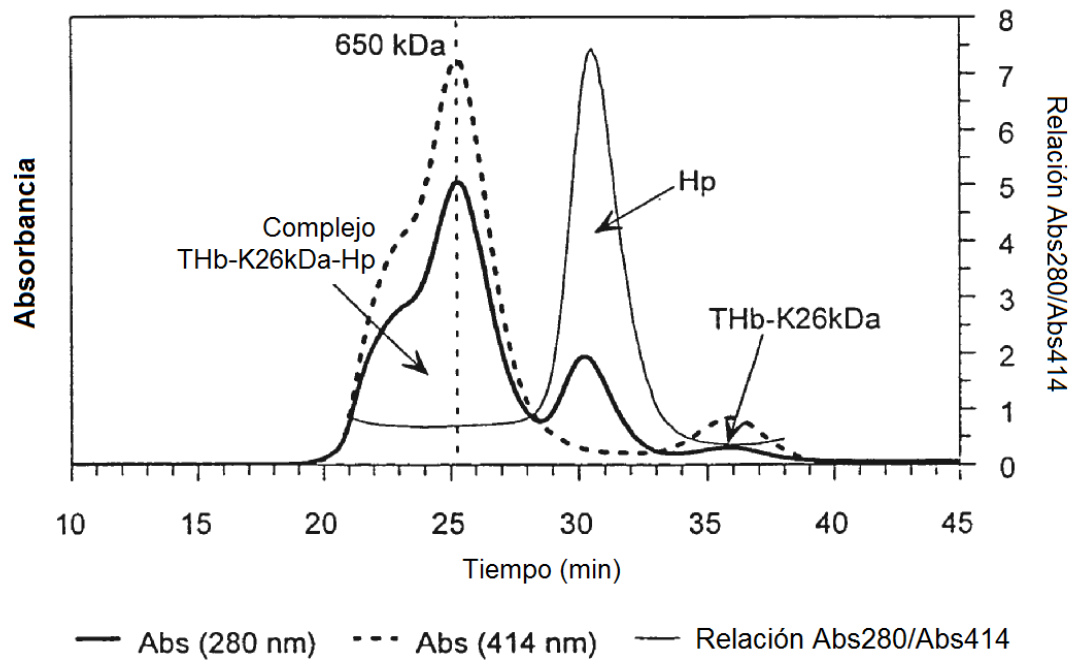


FIG. 3

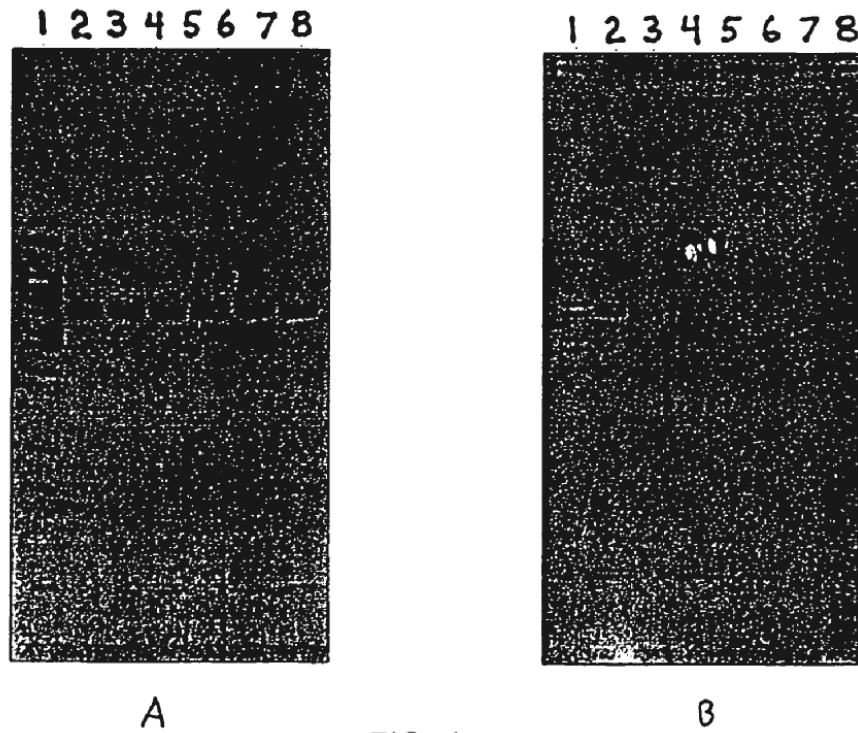


FIG. 4

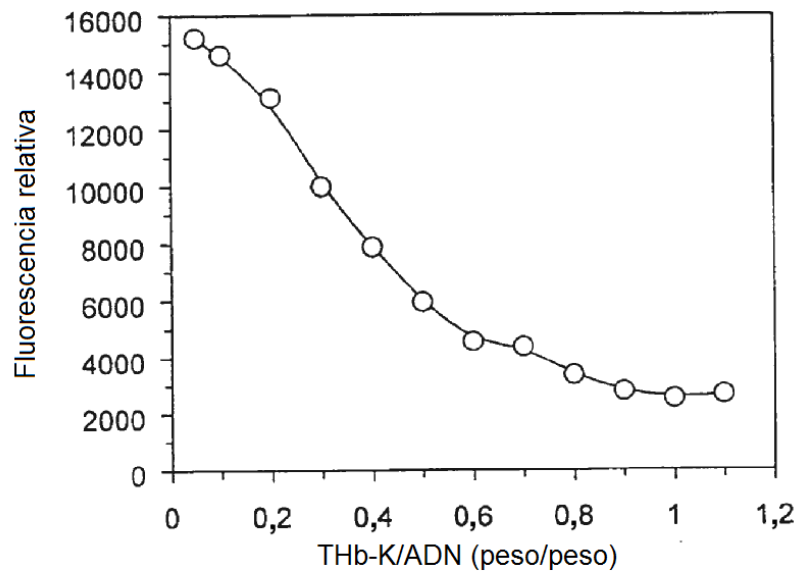


FIG. 5

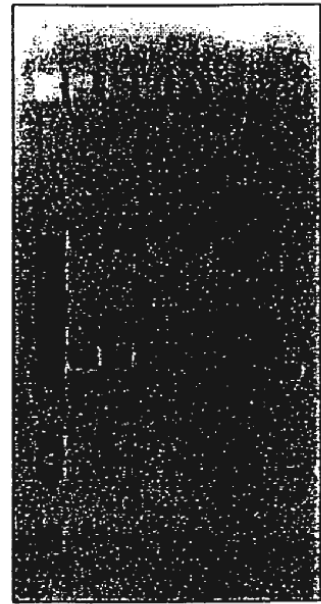


FIG. 6

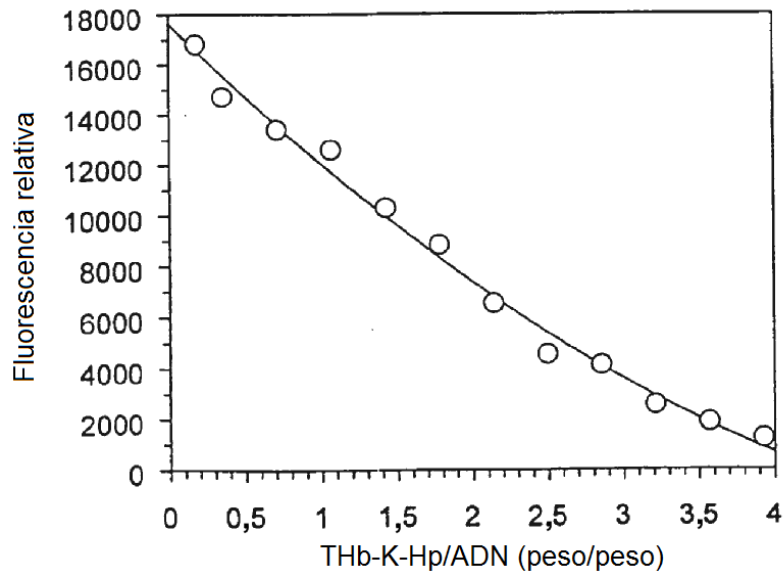


FIG. 7

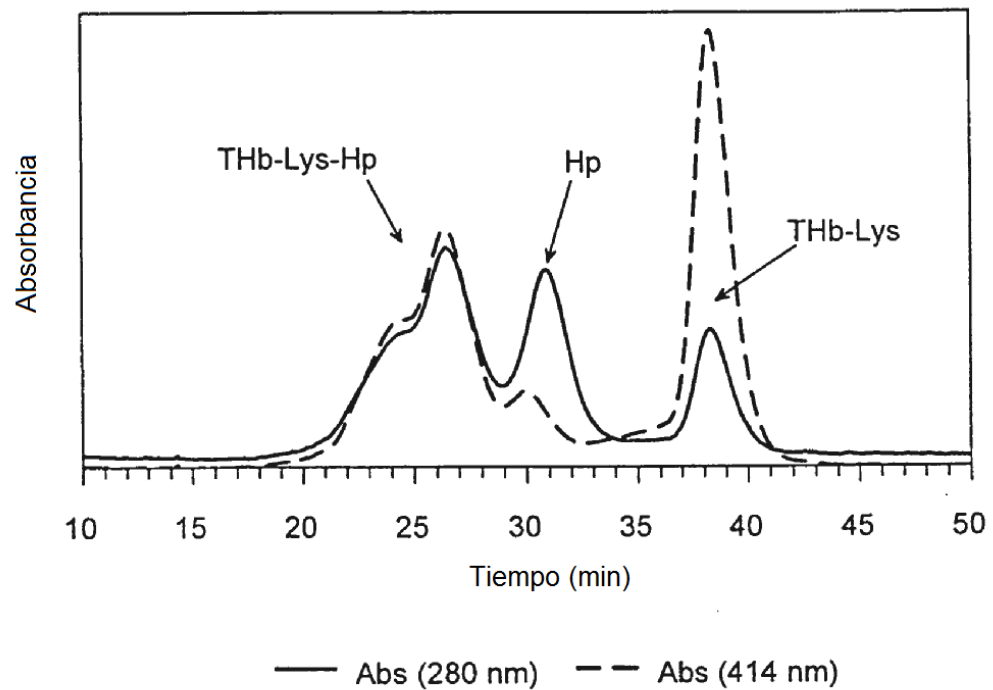


FIG. 8

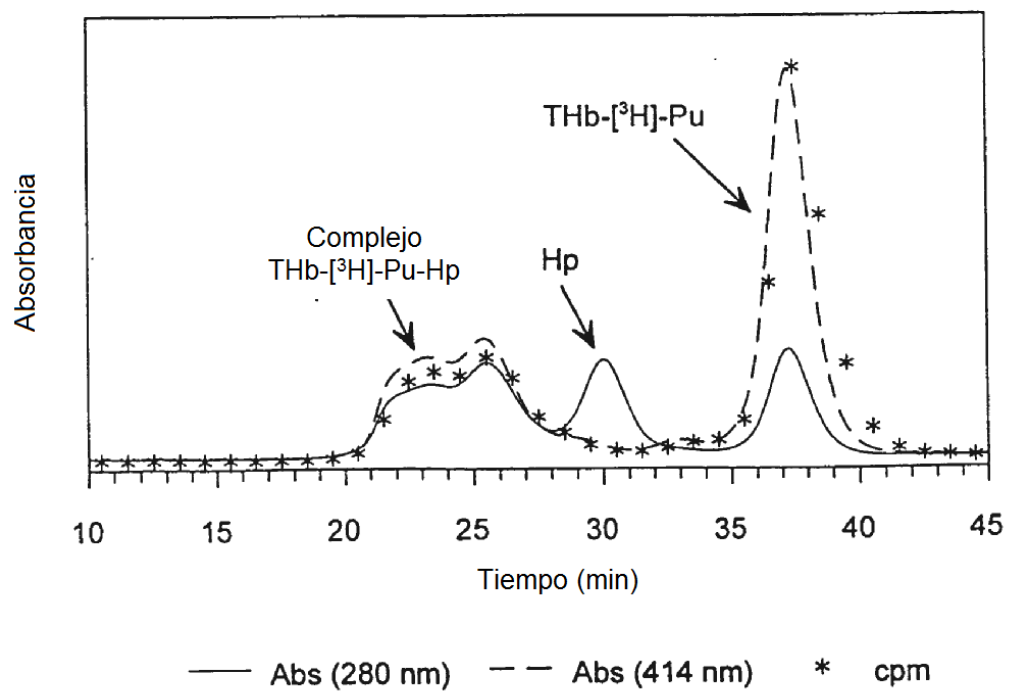


FIG. 10

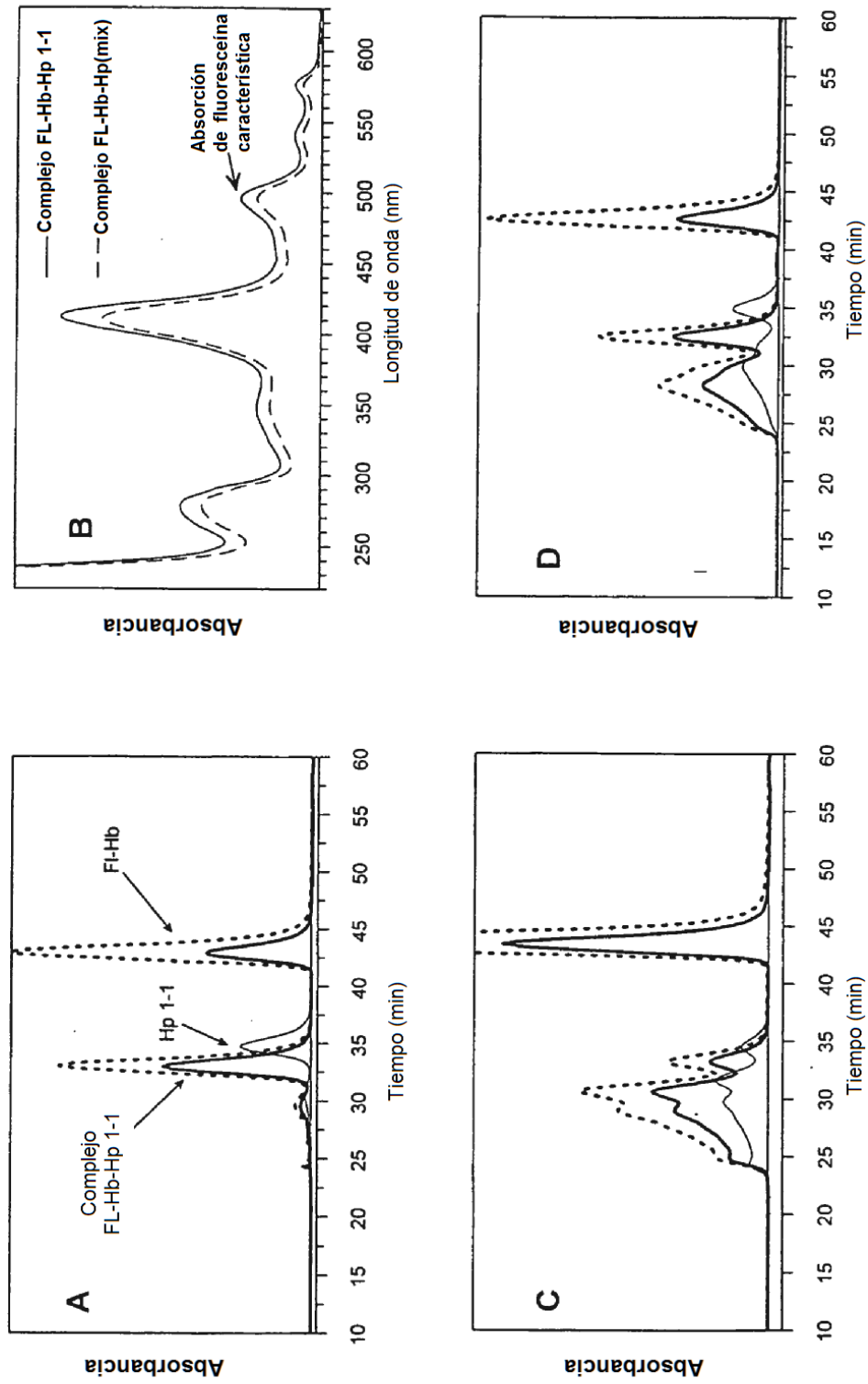


FIG. 9

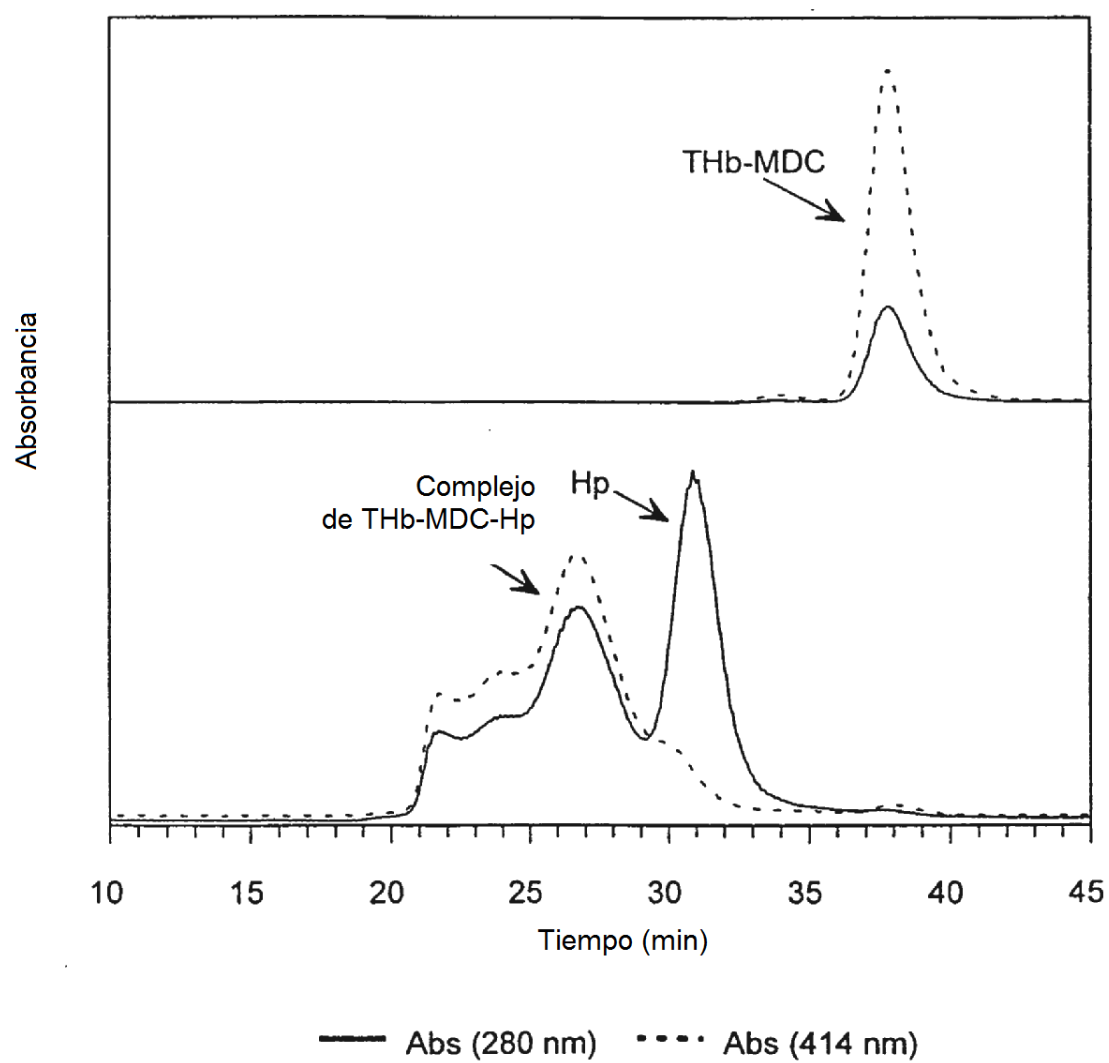


FIG. 11

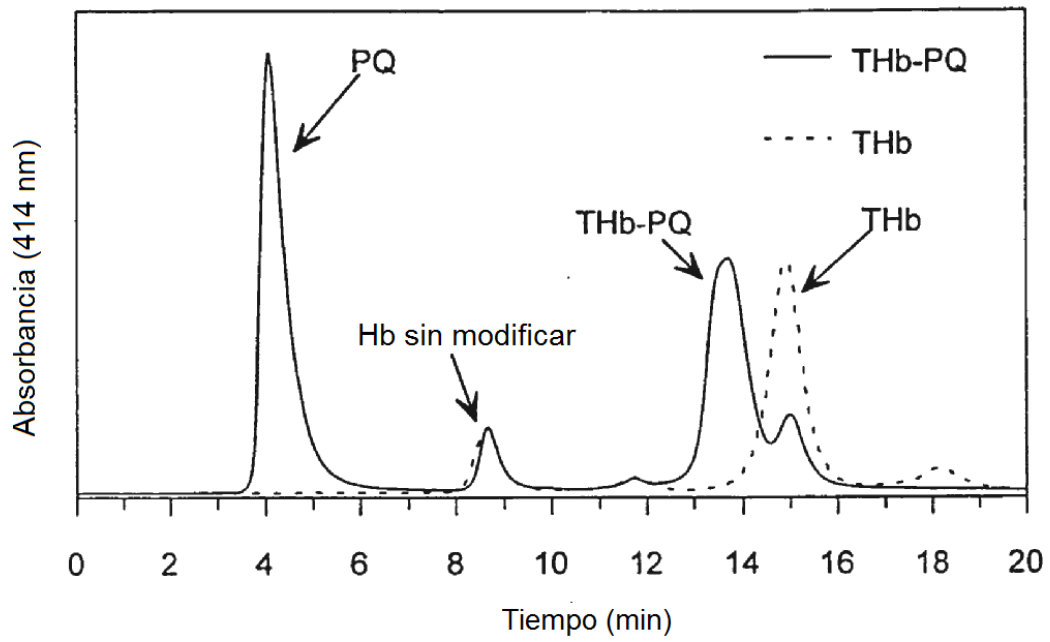


FIG. 12

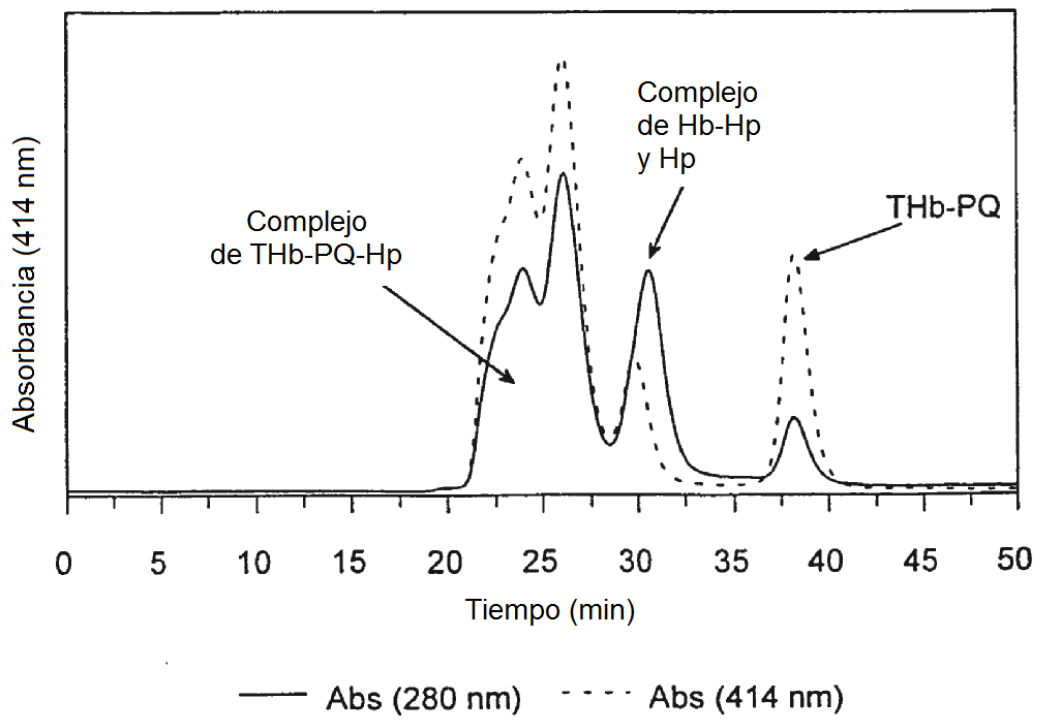


FIG. 13

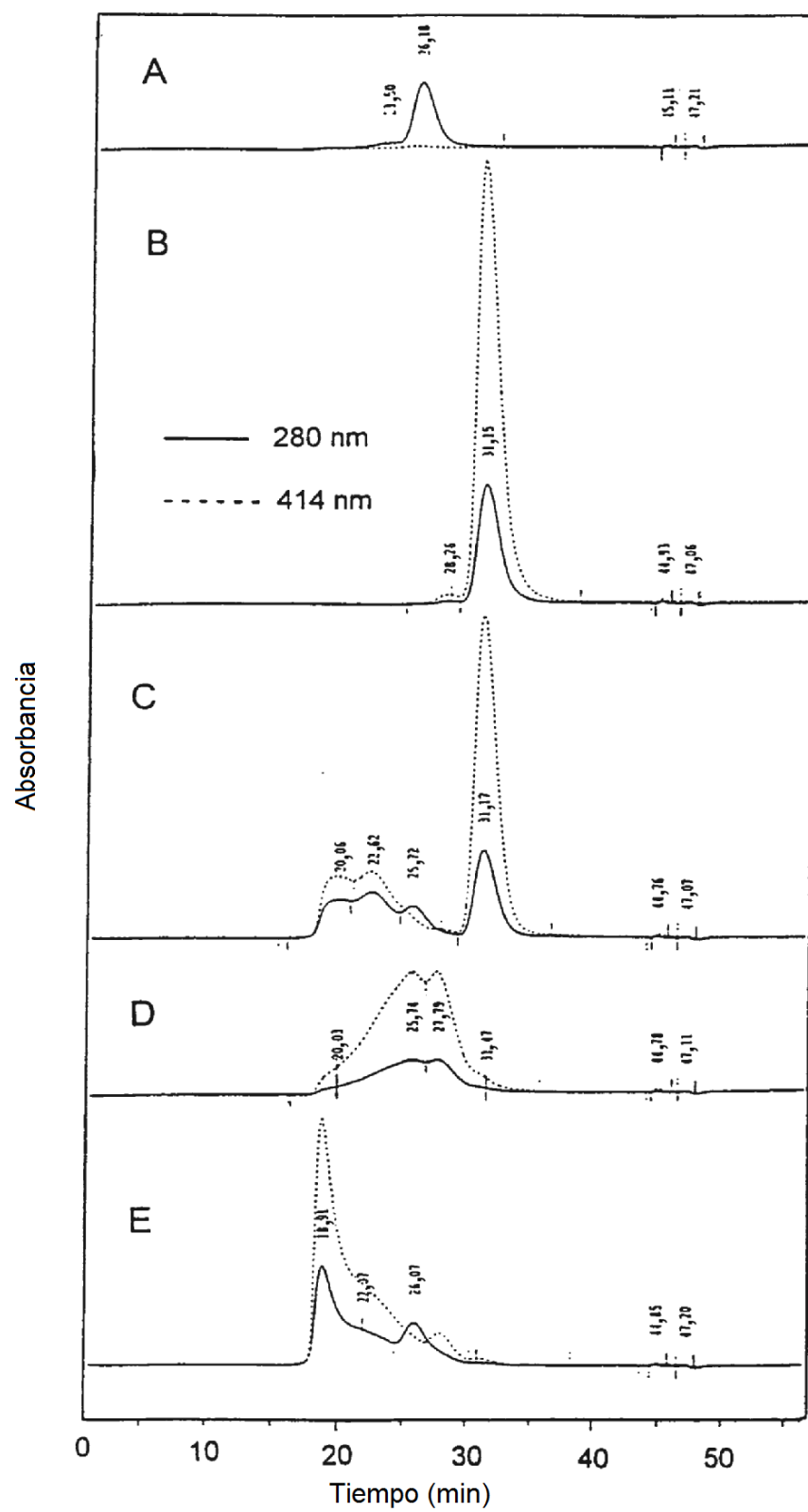


FIG. 14

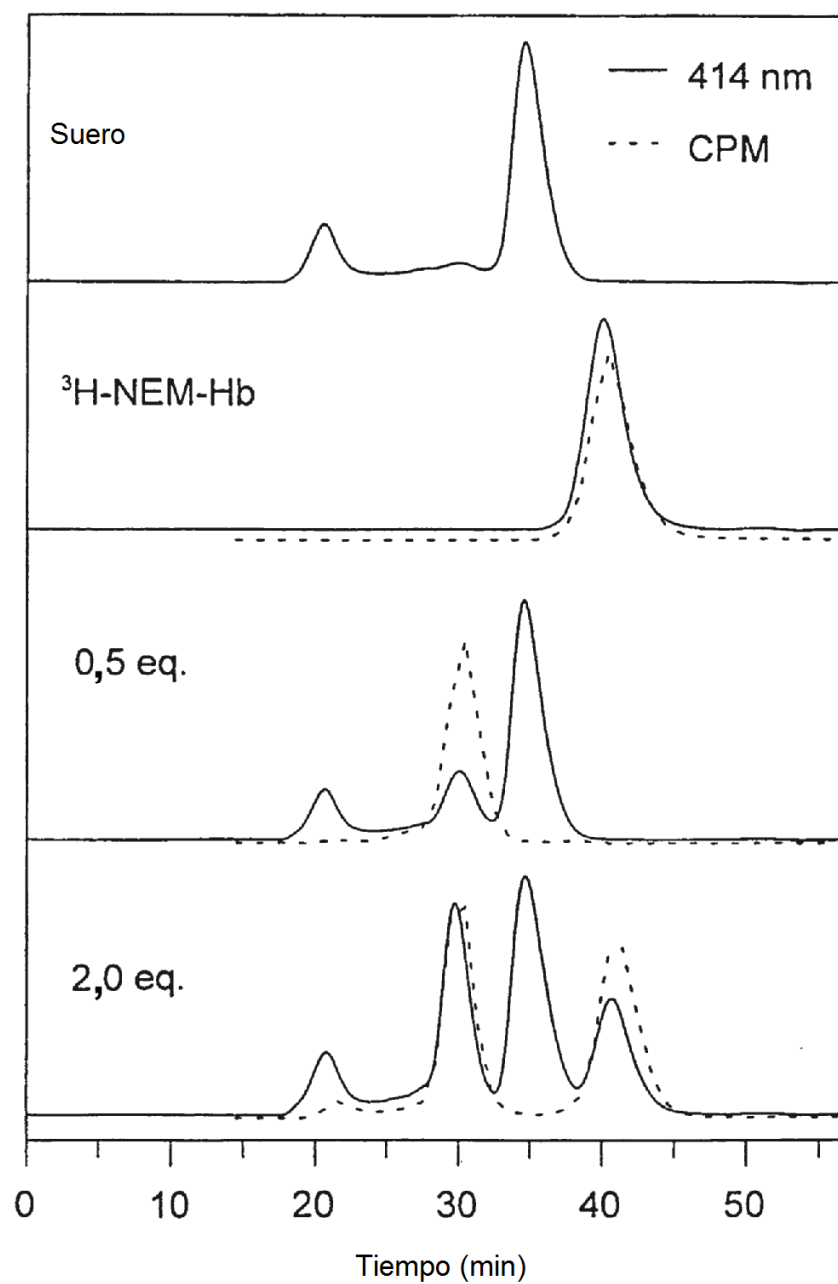
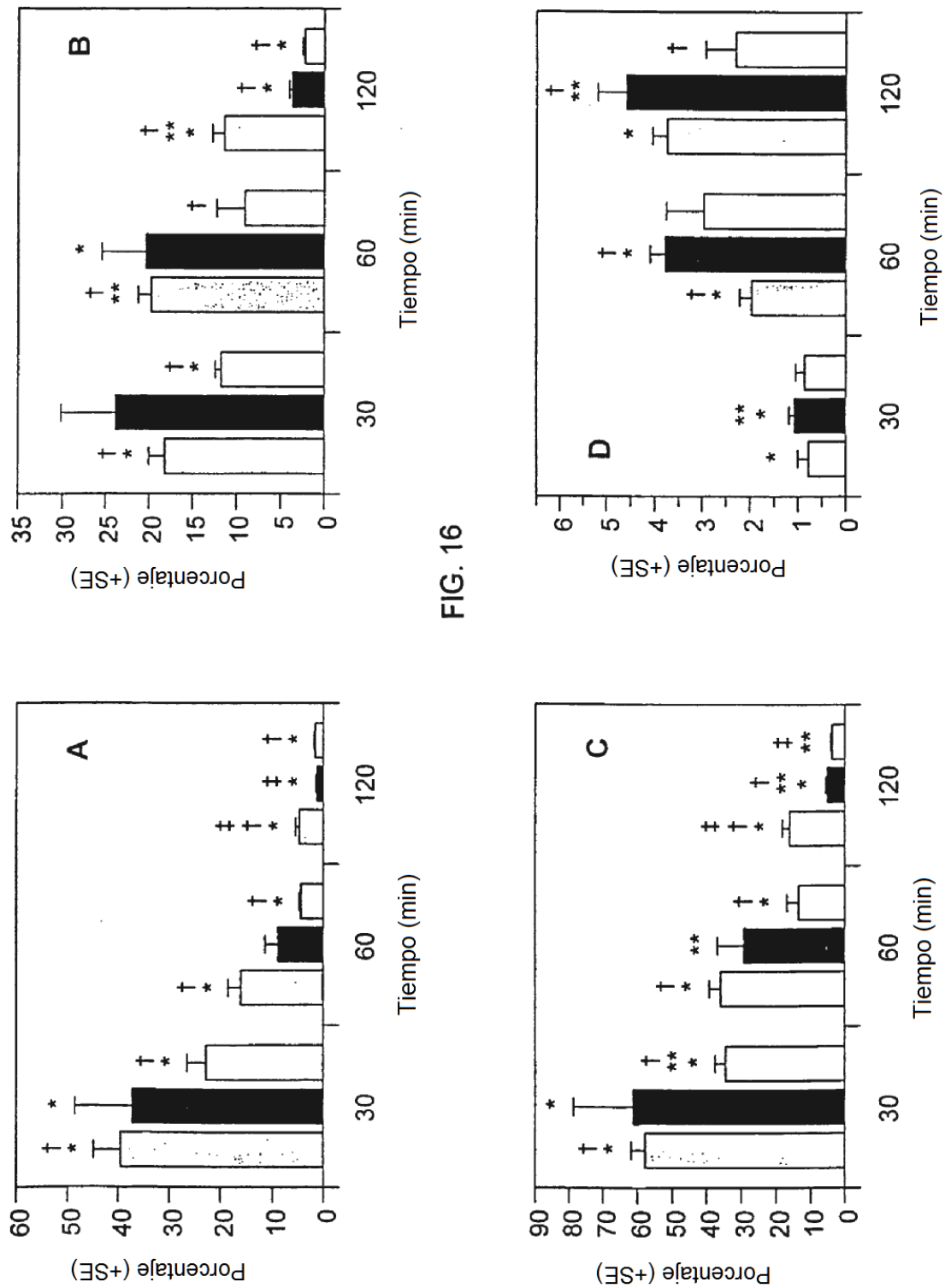


FIG. 15



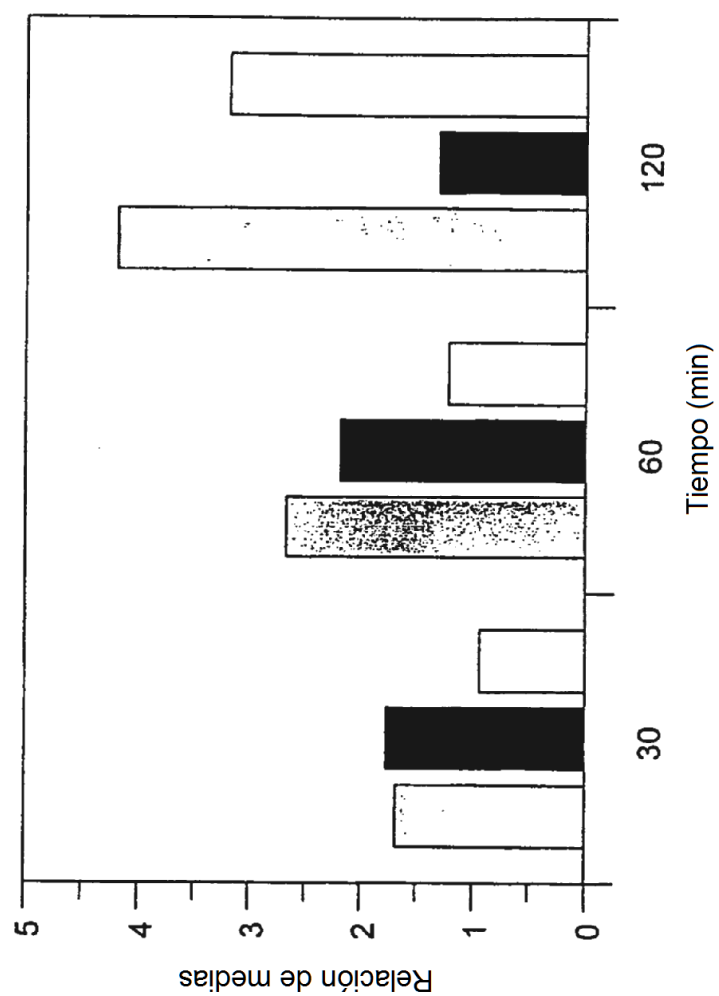


FIG. 17