

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 956**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2009 E 09777272 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2313106**

54 Título: **Uso médico de la alfa 1-microglobulina antioxidante y eliminadora de radicales**

30 Prioridad:

18.07.2008 US 135338

18.07.2008 DK 200801024

18.08.2008 DK 200801116

18.08.2008 US 189381

27.10.2008 US 197506

27.10.2008 DK 200801478

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

27.05.2016

73 Titular/es:

A1M PHARMA AB (100.0%)

Scheelevägen 22

223 63 Lund, SE

72 Inventor/es:

AKERSTRÖM, BO;

HANSSON, STEFAN;

OLSSON, MARTIN LENNARTH y

GRAM, MAGNUS

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 571 956 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

Uso médico de la alfa 1-microglobulina antioxidante y eliminadora de radicales

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al uso médico de la alfa-1-microglobulina (A1M) en el tratamiento o la profilaxis de enfermedades en la que el estrés oxidativo es un factor responsable en la evolución de la enfermedad. En particular, la presente invención se refiere al uso médico de la alfa-1-microglobulina en el tratamiento o la profilaxis de enfermedades o estados asociados con la presencia de radicales libres y/o hemoglobina libre en el sujeto. Los inventores de la presente invención han encontrado que la alfa-1-microglobulina, que es una pequeña proteína que se encuentra por ejemplo en seres humanos, muestra propiedades extraordinarias como antioxidante y eliminador de radicales. Particularmente, se da a conocer que las propiedades antioxidantes de A1M son de relevancia particular para minimizar el estrés oxidativo en células fisiológicamente afectadas.

15

Antecedentes de la invención

Muchas enfermedades implican la oxidación no deseada de células y moléculas en los tejidos y conducen a formación de radicales libres extremadamente reactivos, que pueden conducir a su vez a daño del tejido. Se han desarrollado fármacos con propiedades antioxidantes durante las últimas décadas, pero todavía existe la necesidad de desarrollar fármacos seguros con un amplio potencial terapéutico para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades o estados que tienen un elemento de estrés oxidativo.

20

Olsson *et al.* (Free Radical Research 2008; 42(8); 725-736) describen que la alfa-1-microglobulina protege las células K562 eritroides frente al daño oxidativo.

25

Estrés oxidativo

La oxidación es un proceso químico que implica la pérdida de electrones, es decir un compuesto se oxida cuando se retiran uno o más electrones del mismo. El proceso químico opuesto se denomina reducción. El estrés oxidativo en el organismo humano se define como una oxidación no deseada, aumentada de células y moléculas en los tejidos (revisado en 1). Surge de un desequilibrio entre oxidantes, mediadores de estrés oxidativo y antioxidantes, agentes que pueden o bien impedir la oxidación, detoxificar los oxidantes o bien reparar moléculas oxidadas (figura 1). Los oxidantes más importantes en seres humanos y animales son las especies reactivas del oxígeno (ROS) que incluyen peróxido de hidrógeno, superóxido y el radical hidroxilo. Los dos últimos pertenecen a un grupo de compuestos denominados radicales libres. Los radicales libres son compuestos extremadamente reactivos debido a la presencia de electrones desapareados en sus capas de electrones externas. La formación de ROS y radicales libres puede inducirse, por ejemplo, por metales y el compuesto orgánico de unión a oxígeno, hemo. Hemo es un componente que contiene hierro de la hemoglobina y los citocromos, que son proteínas que participan en la utilización de oxígeno (véase a continuación). Las ROS, los oxidantes y radicales libres reaccionan con proteínas, ADN y otros componentes moleculares de tejidos y células, lo que conduce a modificaciones no deseadas de las moléculas diana y, en última instancia, a la pérdida de funciones celulares.

30

35

40

Los radicales libres y oxidantes se introducen constantemente al cuerpo humano, tanto de manera exógena a través del entorno (alimentos, aire, humo, etc.) como de manera endógena como subproductos del metabolismo normal (figura 1). Los radicales libres y oxidantes endógenos son importantes componentes del metabolismo en el organismo animal. Una determinada cantidad es necesaria para procesos celulares de "mantenimiento". Por ejemplo, la señalización celular fisiológica depende de una producción continua de radicales libres celulares (revisado en 2), controlada por un sistema complejo de antioxidantes celulares. Por tanto, las células necesitan mantener un equilibrio de reducción/oxidación (redox) bien controlado, normal tanto de manera intracelular como de manera extracelular. Resultará estrés oxidativo cuando se altera el equilibrio redox. Los radicales libres y el oxidante fuerte hipoclorito (HOCl) también se producen en glóbulos blancos durante infecciones bacterianas y fúngicas como armas para destruir los patógenos (revisado en 3). Esto también conduce a estrés oxidativo.

45

50

55 Hemoglobina y otras proteínas que contienen hemo

La hemoglobina es una de las proteínas más comunes en el cuerpo humano. Se encuentra en cantidades enormes en los glóbulos rojos y su función es transportar oxígeno desde los pulmones hasta todas las células. El oxígeno se une al grupo hemo que contiene hierro, lo que proporciona a la molécula de hemoglobina su color rojo. Normalmente se mantiene toda la hemoglobina dentro de los glóbulos rojos y por tanto se impide que entre en contacto con otras células y componentes extracelulares. Esto es importante debido a que la hemoglobina es tóxica debido a sus fuertes propiedades oxidantes. Cuando los glóbulos rojos se rompen (hemólisis) en enfermedades como anemia hemolítica autoinmunitaria, anemia falciforme y paludismo o en situaciones iatrogénicas incluyendo transfusión de sangre incompatible, trasplante de órganos sólidos y células madre y cirugía mayor, se libera de los glóbulos rojos oxihemoglobina (hemoglobina más oxígeno). La oxihemoglobina reacciona espontáneamente consigo misma reorganizando los electrones en un proceso denominado autooxidación, formando el radical libre superóxido y

60

65

metahemoglobina, una forma oxidada de la proteína. La metahemoglobina continúa descomponiéndose, formando en última instancia globina libre, hemo y hierro. Los productos son oxidativos tal como se describió anteriormente. El hemo libre, que es una molécula hidrófoba, puede entrar en las células mediante difusión sobre la membrana celular o disolución de las membranas. Por tanto, la hemoglobina libre (ubicada fuera de los glóbulos rojos) es un inductor de daño del tejido durante muchas enfermedades y otros estados patológicos. Además, la oxihemoglobina libre es indirectamente un vasoconstrictor debido a que se une fuertemente al óxido nítrico (NO), uno de los dilatadores más importantes de pequeños vasos sanguíneos y capilares. La eliminación de NO por oxihemoglobina libre conduce al consumo de NO y a la posterior constricción de los capilares dando como resultado hipertensión arterial.

Otras proteínas que contienen hemo incluyen NADPH-oxidasa, mieloperoxidasa (MPO) y citocromos mitocondriales. Las enzimas NADPH-oxidasa y mieloperoxidasa se encuentran en monocitos y granulocitos neutrófilos, dos subconjuntos de glóbulos blancos. En un proceso denominado estallido oxidativo, estas enzimas producen radicales superóxido e hipoclorito, respectivamente, que están implicados ambos en la defensa frente a la infección microbiana. Los citocromos mitocondriales más importantes son el citocromo c y NADH-deshidrogenasa. Estas enzimas son componentes de los complejos respiratorios I-IV que convierten oxígeno en agua usando electrones de nutrientes, grasas de reserva, etc. En este proceso, se producen grandes cantidades de radicales libres, en su mayoría aniones superóxido, como metabolitos intermedios por las enzimas mitocondriales.

Antioxidantes

Normalmente, la actividad oxidante se equilibra mediante la actividad de antioxidantes, factores protectores que eliminan oxidantes o evitan sus reacciones de oxidación. Sin embargo, durante los estados de estrés oxidativo extremo, los antioxidantes pueden verse superados, conduciendo a daño oxidativo de moléculas y/o células y tejidos.

Se describen antioxidantes tanto endógenos como exógenos. Hace veinte años, la opinión predominante era que la homeostasis en seres humanos dependía de antioxidantes añadidos de manera externa, por ejemplo a través de la ingestión de alimentos. Actualmente, se ha descubierto un número creciente de antioxidantes en seres humanos y se ha mostrado que se producen de manera constitutiva dentro del cuerpo, es decir en condiciones sin estrés, normales. Los antioxidantes funcionan mediante la eliminación de radicales libres y oxidantes. Esto puede lograrse mediante tres mecanismos principales (véanse la figura 2A y las leyendas de figura para más detalles): 1) adición enzimática de electrones derivados de metabolismo aerobio celular u otras fuentes a los oxidantes, 2) adición no enzimática de electrones de la propia molécula de antioxidante al oxidante, y 3) unión (eliminación) de los radicales/oxidantes al antioxidante. Ejemplos de la primera categoría son las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa y hemo oxigenasa. Ejemplos de la segunda categoría son tiorredoxina, glutatión y ácido alfa-lipoico. Las vitaminas C y E, los ácidos grasos insaturados y flavonoides vegetales son antioxidantes de categoría 2 exógenos que no se producen en el cuerpo pero que pueden encontrarse en alimentos. Algunos de los antioxidantes de la segunda categoría, por ejemplo tiorredoxina y glutatión, pueden regenerarse mediante reducción de electrones a partir de otras fuentes (figura 2A). La mayor parte de los antioxidantes en los alimentos se regeneran escasamente tras reaccionar con sus dianas. Por tanto, las vitaminas C y E consumidas (=oxidadas), etc., presentan estrés oxidativo a los tejidos a menos que se retiren rápidamente.

Los electrones que se producen por el metabolismo aerobio celular (derivados en última instancia de nutrientes, por ejemplo glucosa, grasa, proteínas a través del transportador de electrones NADH) proporcionan los equivalentes reductores de los antioxidantes de categoría 1, cuando se regeneran antioxidantes de categoría 2 y en el proceso de eliminación (categoría 3) (figura 2A). Por tanto, la mayor parte de los antioxidantes dependen de un metabolismo celular intacto y sólo funcionan de manera intracelular. De hecho, la mayor parte de los antioxidantes, que son intracelulares, forman parte de la maquinaria de "mantenimiento" celular normal.

Varios antioxidantes están especializados frente al estrés oxidativo inducido por hemoglobina. Las proteínas plasmáticas haptoglobina, hemopexina y transferrina unen a hemo, hierro y hemoglobina libre, extracelular, respectivamente, en la sangre. La proteína celular ferritina se une y almacena hierro libre, celular. Se produce hemo oxigenasa-1 (HO-1) en la mayor parte de las células en respuesta a concentraciones aumentadas de hemoglobina, hemo y radicales libres y elimina hemo mediante degradación en bilirrubina, monóxido de carbono y hierro libre.

Sin embargo, ninguno de los antioxidantes mencionados anteriormente actúan mediante los tres mecanismos y, por consiguiente, un uso terapéutico general de un antioxidante de este tipo es limitado. Sería ventajoso un antioxidante que tuviese todos los mecanismos de acción ya que tendrá un uso mucho más general y dependerá menos de la homeostasis celular para su funcionamiento.

Abreviaturas

ABTS, sal de diamonio del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzo-tiazolin-6-sulfónico)

α 1M o A1M, α 1-microglobulina o alfa-1-microglobulina

t- α 1M; alfa-1-glicoproteína o α 1-microglobulina truncada

AGP, α 1-glicoproteína ácida

5 DTT, ditioneitol

G3DPH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

Hb, hemoglobina

10 H₂DCFDA, diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína

IVF, fecundación *in vitro*

15 IVH, hemorragia cerebral intraventricular

NEM, N-etilmaleimida

20 PE, preeclampsia

PI, yoduro de propidio

ROS, especies reactivas del oxígeno;

25 5-IAF, 5-yodoacetamida-fluoresceína

RIA, radioinmunoensayo

30 MPO, mieloperoxidasa

Definiciones

En la descripción y las reivindicaciones del contenido dado a conocer, se usará la siguiente terminología según las definiciones expuestas a continuación. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta divulgación. En algunos casos, los términos con significados entendidos normalmente se definen en el presente documento para mayor claridad y/o facilidad de referencia, y la inclusión de tales definiciones en el presente documento no debe interpretarse necesariamente que representa una diferencia sustancial con respecto a lo que se entiende en general en la técnica. Las técnicas y los procedimientos descritos o a los que se hace referencia en el presente documento se entienden bien en general y se emplean comúnmente usando una metodología convencional por los expertos en la técnica. Según sea apropiado, los procedimientos que implican el uso de reactivos y kits disponibles comercialmente se llevan a cabo en general según parámetros y/o protocolos definidos por el fabricante a menos que se indique de otro modo. Aunque también puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o las pruebas de la presente divulgación, los materiales y métodos preferidos se describen en el presente documento.

En esta memoria descriptiva, a menos que se especifique de otro modo, "un/o" o "una" significa "uno/una o más".

50 Existen diferentes formas de hemoglobina. La hemoglobina del adulto (hemoglobina A) consiste en dos cadenas de polipéptido alfa y dos beta (Hb α , Hb β), que contienen cada una un grupo hemo no peptídico que se une de manera reversible a una única molécula de oxígeno. La hemoglobina A2, otro componente de la hemoglobina del adulto se compone de dos cadenas alfa y dos cadenas delta (Hb α , Hb δ). Por otro lado, la hemoglobina fetal (hemoglobina F) es el componente principal de la hemoglobina en el feto. Esta hemoglobina tiene dos cadenas de polipéptido alfa y dos gamma (Hb α , Hb γ).

60 El término "hemoglobina libre", en esta memoria descriptiva se refiere a hemoglobina libre en general e incluye hemoglobina libre total, hemoglobina A libre, hemoglobina A2 libre, hemoglobina F libre, cualquier subunidad de hemoglobina libre (por ejemplo, una cadena Hb α , Hb β , Hb δ o Hb γ), o cualquier combinación de las mismas. Incluye además estas entidades de hemoglobina en forma o bien de un polipéptido (proteína) o bien de un nucleótido (ARN), excepto cuando se aplica como diana para tratamiento. El término "hemoglobina fetal libre" se refiere a hemoglobina F libre o cualquier subunidad de hemoglobina F e incluye las entidades de hemoglobina F en forma de polipéptido (proteína) o nucleótido (ARN), excepto cuando se aplica como diana para tratamiento.

En esta memoria descriptiva, el término “libre” tal como se usa, entre otros, en las expresiones “hemoglobina libre” o “subunidades de hemoglobina libre (por ejemplo, cadenas Hb α , Hb β , Hb δ o Hb γ)” se refiere a hemoglobina o subunidades de hemoglobina que circulan libremente en un líquido biológico, al contrario que la hemoglobina celular que se refiere a las moléculas que residen dentro de las células. Por tanto, el término “libre” en este sentido se usa principalmente para distinguir la hemoglobina libre de la hemoglobina que está presente en eritrocitos intactos.

Los términos “tratamiento o profilaxis” en sus diversas formas gramaticales en relación con la presente invención se refieren a la prevención, curación, reversión, atenuación, alivio, mejora, inhibición, minimización, supresión o detención de (1) los efectos perjudiciales de un trastorno, (2) la evolución del trastorno o (3) el agente causal del trastorno.

El término “cantidad eficaz” en relación con la presente invención se refiere a aquella cantidad que proporciona un efecto terapéutico para un estado y régimen de administración dados. Esta es una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir un efecto terapéutico deseado en asociación con los diluyentes y aditivos requeridos; es decir, un portador o vehículo de administración. Además, se pretende que signifique una cantidad suficiente para reducir y lo más preferiblemente prevenir un déficit clínicamente significativo en la actividad y respuesta del huésped. Alternativamente, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para provocar una mejora en un estado clínicamente significativo en un huésped. Tal como aprecian los expertos en la técnica, la cantidad de un compuesto puede variar dependiendo de su actividad específica. Las cantidades de dosificación adecuadas pueden contener una cantidad predeterminada de composición activa calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con los diluyentes requeridos; es decir, portador o aditivo. Además, la dosificación que va a administrarse variará dependiendo del/de los principio(s) activo(s) que va(n) a usarse, la edad, el peso, etc. del paciente que va a tratarse pero en general estará dentro del intervalo de desde 0,001 hasta 1000 mg/kg de peso corporal/día. Además, la dosis depende de la vía de administración.

El término “polipéptidos” incluye proteínas y fragmentos de las mismas. Los polipéptidos se dan a conocer en el presente documento como secuencias de residuos de aminoácido. Estas secuencias se escriben de izquierda a derecha en el sentido desde el extremo amino-terminal hasta el extremo carboxilo-terminal. Según la nomenclatura convencional, las secuencias de residuos de aminoácido se designan mediante un código de o bien tres letras o bien una sola letra tal como se indica a continuación: alanina (Ala, A), arginina (Arg, R), asparagina (Asn, N), ácido aspártico (Asp, D), cisteína (Cys, C), glutamina (Gln, Q), ácido glutámico (Glu, E), glicina (Gly, G), histidina (His, H), isoleucina (Ile, I), leucina (Leu, L), lisina (Lys, K), metionina (Met, M), fenilalanina (Phe, F), prolina (Pro, P), serina (Ser, S), treonina (Thr, T), triptófano (Trp, W), Tirosina (Tyr, Y) y valina (Val, V).

“Variante” se refiere a un polipéptido o polinucleótido que difiere de un polipéptido o polinucleótido de referencia, pero conserva propiedades esenciales. Una variante típica de un polipéptido difiere en la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido de referencia. En general, las diferencias son limitadas de modo que las secuencias del polipéptido de referencia y la variante son estrechamente similares en total (homólogos) y, en muchas regiones, idénticas. Una variante y un polipéptido de referencia pueden diferir en la secuencia de aminoácidos en una o más modificaciones (por ejemplo, sustituciones, adiciones y/o deleciones). Un residuo de aminoácido sustituido o insertado puede ser o no uno codificado por el código genético. Una variante de un polipéptido puede producirse de manera natural tal como una variante alélica, o puede ser una variante que no se sabe que se produzca de manera natural.

“Identidad” tal como se conoce en la técnica, es una relación entre dos o más secuencias de polipéptido, tal como se determina comparando las secuencias. En la técnica, “identidad” también se refiere al grado de relación de secuencia entre el polipéptido tal como se determina mediante la coincidencia entre cadenas de tales secuencias. La “identidad” y “similitud” pueden calcularse fácilmente mediante métodos conocidos.

El término “sustancialmente similar” tal como se usa en el presente documento se refiere en general a una función, actividad o comportamiento que es lo suficiente próximo al natural, esperado o promedio, de modo que se considera, para todos los fines prácticos, intercambiable. Por ejemplo, una proteína con actividad sustancialmente similar sería una que tiene un nivel de actividad que no se consideraría que es sustancialmente más o menos activo que el de la proteína nativa.

El término “profármaco” se refiere a un agente, incluyendo ácidos nucleicos y proteínas, que se convierte en una forma biológicamente activa *in vivo*. Por ejemplo, los profármacos a menudo son útiles debido a que, en algunas situaciones, pueden ser más fáciles de administrar que el compuesto original. Por ejemplo, pueden estar biodisponibles mediante administración oral mientras que el compuesto original no. El profármaco también puede tener solubilidad mejorada en composiciones farmacéuticas con respecto al fármaco original. Un profármaco puede convertirse en el fármaco original mediante diversos mecanismos, incluyendo procesos enzimáticos e hidrólisis metabólica.

Tal como se usa en el presente documento “variante funcional” se refiere a una variante de una proteína o un polipéptido (por ejemplo, una proteína permutada de manera circular, con o sin alteraciones adicionales en la secuencia) que puede realizar las mismas funciones o actividades que el polipéptido o la proteína original, aunque

no necesariamente al mismo nivel (por ejemplo, la variante puede tener una funcionalidad potenciada, reducida o cambiada, siempre que conserve la función básica).

Descripción detallada de la invención

En la presente invención, se da a conocer que A1M tiene amplias propiedades antioxidantes adecuadas para evitar o minimizar lesiones provocadas por estrés oxidativo. El concepto actual es que la función fisiológica de A1M es "aspirar" de manera continua de tejidos radicales libres y oxidantes, quizás especialmente hemo, y suministrar los productos a los riñones para su degradación y/o excreción. Una segunda función fisiológica es reducir los oxidantes y componentes celulares oxidados y moléculas tisulares. Una importante propiedad de A1M, que se suma a su valor como antioxidante, es que la proteína, tras la unión de una carga máxima de radicales, y/o la reducción de oxidantes o productos de oxidación, no presenta estrés oxidativo a los componentes tisulares. En otras palabras, se eliminan ROS, radicales y otros oxidantes por A1M, por tanto puede considerarse A1M como "sumidero" de radicales. Esta característica puede ser de particular importancia en células dañadas u otras células en las que se alteran procesos homeostáticos intracelulares y, por tanto, que no pueden retirar el estrés oxidativo que imponen otros antioxidantes, como por ejemplo las vitaminas E y D, sobre la célula tras su acción.

La presente invención proporciona alfa-1-microglobulina para su uso en el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o un estado que implica estrés oxidativo mediante la reparación o la prevención del daño oxidativo mediante una combinación de reducción enzimática, reducción no enzimática y eliminación de radicales, con la condición de que la enfermedad o el estado no sea preeclampsia.

Alfa-1-microglobulina

A1M se sintetiza en el hígado a una alta tasa, se secreta al torrente sanguíneo y se transporta a través de las paredes de los vasos al compartimiento extravascular de todos los órganos. La proteína también se sintetiza en otros tejidos (células sanguíneas, cerebro, riñón, piel) pero a una tasa menor. Debido al pequeño tamaño, se filtra rápidamente A1M libre de la sangre en los riñones. A1M tiene excelentes propiedades antioxidantes en general y específicamente hacia hemoglobina libre; propiedades que hacen que sea adecuada para su uso en el tratamiento o la profilaxis de una variedad de enfermedades que implica estrés oxidativo o en las que la presencia de hemoglobina libre induce o agrava una enfermedad o un estado.

La alfa-1-microglobulina (A1M) es un antioxidante endógeno que proporciona antioxidación de varias maneras (figura 2B y leyendas de figura de la misma). Por tanto, la presente invención se refiere a A1M que se ha encontrado que combina las propiedades de reductasa enzimática (categoría 1), reducción no enzimática (categoría 2) y eliminación de radicales (categoría 3). Además, puede emplearse el mecanismo de reducción no enzimática (categoría 2) repetidamente con varios ciclos de donación de electrones. Además, el mecanismo de eliminación de radicales (categoría 3) da como resultado una producción neta de electrones que aumenta adicionalmente la capacidad antioxidante de la proteína. En otras palabras, la proteína porta su propio suministro de electrones, es independiente del metabolismo celular, y puede funcionar de manera tanto intracelular como extracelular. Además, A1M puede reparar el daño oxidativo que se ha infligido a componentes tisulares (una propiedad única asignada a la categoría 4). Véase también a continuación para una descripción detallada del mecanismo de eliminación de radicales.

A1M es un miembro de la superfamilia de la lipocalina, un grupo de proteínas de animales, plantas y bacterias con una estructura tridimensional conservada pero con funciones muy diversas. Cada lipocalina consiste en una cadena de 160-190 aminoácidos que se pliega en una cavidad de barril β con una parte interior hidrófoba. Se conocen doce genes de lipocalina humana. Entre las lipocalinas humanas, A1M es una proteína tisular y plasmática de 26 kDa que hasta el momento se ha identificado en mamíferos, aves, peces y ranas. En la figura 3, se muestra un modelo de la estructura tridimensional de A1M. A1M se sintetiza en el hígado a una alta tasa, se secreta al torrente sanguíneo y se transporta rápidamente ($T_{1/2} = 2-3$ min) a través de las paredes de los vasos al compartimiento extravascular de todos los órganos. La proteína también se sintetiza en otros tejidos (células sanguíneas, cerebro, riñón, piel) pero a una tasa menor. A1M se encuentra tanto en forma monomérica, libre como en complejos covalentes con moléculas más grandes (IgA, albúmina, protrombina) en la sangre y tejidos intersticiales. Debido al pequeño tamaño, la A1M libre se filtra rápidamente de la sangre en los riñones. Entonces se adsorbe de nuevo la parte principal, pero se excretan cantidades significativas en la orina.

Secuencia y propiedades estructurales de A1M

Se notificó por primera vez la secuencia completa de A1M humana por Kaumeyer *et al.* (5). Se encontró que la proteína consistía en 183 residuos de aminoácido. Desde entonces, se han detectado diez proteínas y/o ADNc de A1M adicionales, se han aislado y/o secuenciado a partir de otros mamíferos, aves, anfibios y peces. La longitud de la cadena peptídica de A1M difiere ligeramente entre especies, debido principalmente a variaciones en el extremo C-terminal. Las comparaciones de alineación de las diferentes secuencias de aminoácidos deducidas muestran que el porcentaje de identidad varía desde aproximadamente el 75-80% entre roedores o ferungulados y el hombre, hasta aproximadamente el 45% entre peces y mamíferos. Se conserva una cadena lateral de cisteína libre en la posición

34. Se ha mostrado que este grupo está implicado en reacciones redox (véase a continuación), en la formación de complejos con otras proteínas plasmáticas y en la unión a un cromóforo de color amarillo pardo. Los modelos 3D computarizados basados en las estructuras cristalográficas de rayos X conocidas de otras lipocalinas sugieren que Cys34 está expuesto al disolvente y ubicado cerca de la abertura de la cavidad de lipocalina (véase la figura 3). El factor del complemento C8 γ , otra lipocalina, también porta una Cys desapareada en la posición 34 que está implicada en la formación del complejo C8 activo.

En el presente contexto, el término "alfa-1-microglobulina" pretende cubrir la alfa-1-microglobulina tal como se identifica en SEQ ID NO: 1 (A1M humana) así como SEQ ID NO: 2 (A1M recombinante humana) así como homólogos, fragmentos o variantes de las mismas que tienen actividades terapéuticas similares. En un aspecto preferido, la alfa-1-microglobulina es según SEQ ID NO: 1 ó 2 tal como se identifica en el presente documento. En la figura 17, se proporciona la lista de secuencias de la secuencia de aminoácidos de A1M humana y A1M recombinante humana (SEQ ID NO 1 y 2, respectivamente) y las secuencias de nucleótidos correspondientes (SEQ ID NO 3 y 4, respectivamente).

Tal como se mencionó anteriormente, también pueden usarse homólogos de A1M según la descripción en el presente documento. En teoría puede usarse A1M de todas las especies incluyendo la más primitiva encontrada hasta el momento, que es de pez (platija). A1M también está disponible en forma aislada procedente de ser humano, rata, ratón, conejo, cobaya, vaca y platija.

Considerando los homólogos, variantes y fragmentos de A1M, se han identificado los siguientes como partes importantes de la proteína para el efecto antioxidante:

Y22 (tirosina, pos. 22, pares de bases 64-66)

C34 (cisteína, posición 34, pares de bases 100-102)

K69 (lisina, pos. 69, pares de bases 205-207)

K92 (lisina, pos. 92, pares de bases 274-276)

K118 (lisina, pos. 118, pares de bases 352-354)

K130 (lisina, pos. 130, pares de bases 388-390)

Y132 (tirosina, pos. 132, pares de bases 394-396)

L180 (leucina, pos. 180, pares de bases 538-540)

I181 (isoleucina, pos. 181, pares de bases 541-543)

P182 (prolina, pos. 182, pares de bases 544-546)

R183 (arginina, pos. 183, pares de bases 547-549)

(La numeración de aminoácidos y nucleótidos en la totalidad del documento se refiere a SEQ ID 1 y 3, véanse también las figuras 3 y 6; si se emplean otra A1M de otra especie, análogos de A1M o secuencias recombinantes de los mismos, un experto en la técnica sabrá cómo identificar los aminoácidos del/de los sitio(s) activo(s) o sitio(s) responsable(s) de la actividad enzimática).

Se sustituye A1M humana con oligosacáridos en tres posiciones, dos hidratos de carbono probablemente diantenarios, de tipo complejo sialilados unidos a Asn17 y Asn96 y un oligosacárido más simple unido a Thr5. El contenido en hidratos de carbono de las proteínas A1M de diferentes especies varía mucho, aunque, oscila desde la completa ausencia de glicosilación en *Xenopus leavis* con respecto a un espectro de diferentes patrones de glicosilación. Sin embargo, se conserva en mamíferos un sitio de glicosilación, correspondiente a Asn96 en el hombre, lo que sugiere que este hidrato de carbono específico puede ser importante a nivel funcional.

A1M es de color amarillo pardo cuando se purifica a partir de plasma u orina. El color está producido por compuestos heterogéneos unidos covalentemente a diversos grupos laterales de aminoácido ubicados principalmente en la entrada a la cavidad. Estas modificaciones representan probablemente los productos de degradación oxidados de oxidantes orgánicos atrapados covalentemente por A1M *in vivo*, por ejemplo radicales tirosilo, hemo y quinurenina (6-8, 10).

A1M es también heterogénea en cuanto a la carga y al tamaño y las moléculas de A1M de color pardo más intenso están cargadas más negativamente. La probable explicación para la heterogeneidad es que se modifican diferentes grupos laterales en grado variable con diferentes radicales, y que las modificaciones alteran la carga neta de la

proteína. Se han localizado sustancias coloreadas unidas covalentemente en Cys34 y Lys92, Lys118 y Lys130, estas últimas con masas moleculares de entre 100 y 300 Da. Se encontró el metabolito de triptófano quinurenina unida covalentemente a residuos lisilo en A1M procedente de orina de pacientes en hemodiálisis y parece ser la fuente del color pardo de la proteína en este caso (6). Fragmentos oxidados del radical sintético ABTS (ácido 2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico) estaban unidos a las cadenas laterales de Y22 y Y132 (10).

C34 es el centro reactivo de A1M (9). Se vuelve muy electronegativo, lo que significa que tiene un alto potencial para donar electrones, por la proximidad de las cadenas laterales cargadas positivamente de K69, K92, K118 y K130, que inducen una desprotonación del grupo tiol C34 que es un requisito previo para la oxidación del átomo de azufre. Los datos preliminares muestran que C34 es uno de los grupos más electronegativos conocidos.

Teóricamente, los aminoácidos que caracterizan las propiedades redox enzimáticas y no enzimáticas únicas de A1M (C34, Y22, K92, K118, K130, Y132, L180, I181, P182, R183), que se describirán en más detalle a continuación, pueden disponerse en una configuración tridimensional similar en otro entramado, por ejemplo una proteína con el mismo plegamiento global (otra lipocalina) o una molécula orgánica o inorgánica completamente artificial tal como un polímero de plástico, una nanopartícula o un polímero metálico.

En la figura 6, se ilustran la disposición tridimensional de algunos de estos aminoácidos (óvalos azules, las lisinas se representan mediante un "+"), el entramado de A1M (barril), el flujo de electrones y el atrapamiento de radicales.

Por consiguiente, se prefieren homólogos, fragmentos o variantes que comprenden una estructura incluyendo el centro reactivo y sus alrededores tal como se representó anteriormente.

Pueden realizarse modificaciones y cambios en la estructura de los polipéptidos de esta divulgación y todavía dar como resultado una molécula que tiene características similares a las del polipéptido (por ejemplo, una sustitución de aminoácido conservativa). Por ejemplo, pueden sustituirse determinados aminoácidos por otros aminoácidos en una secuencia sin pérdida de actividad apreciable. Debido a que es la capacidad interactiva y la naturaleza de un polipéptido lo que define esa actividad funcional biológica del polipéptido, pueden realizarse determinadas sustituciones de secuencia de aminoácidos en una secuencia de polipéptido y obtener sin embargo un polipéptido con propiedades similares.

Al realizar tales cambios, puede considerarse el índice de hidropatía de los aminoácidos. La importancia del índice de hidropatía de los aminoácidos en conferir función biológica interactiva en un polipéptido se entiende en general en la técnica. Se sabe que pueden sustituirse determinados aminoácidos por otros aminoácidos que tienen una puntuación o un índice de hidropatía similar y todavía dar como resultado un polipéptido con actividad biológica similar. A cada aminoácido se le ha asignado un índice de hidropatía basándose en sus características de carga e hidrofobicidad. Estos índices son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cisteína (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

Se cree que el carácter hidropático relativo del aminoácido determina la estructura secundaria del polipéptido resultante, lo que define a su vez la interacción del polipéptido con otras moléculas, tales como enzimas, sustratos, receptores, anticuerpos, antígenos, y similares. Se conoce en la técnica que puede sustituirse un aminoácido por otro aminoácido que tiene un índice de hidropatía similar y todavía obtener un polipéptido funcionalmente equivalente. En tales cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices de hidropatía están dentro de ± 2 , se prefieren particularmente aquellos dentro de ± 1 , y se prefieren incluso más particularmente aquellos dentro de $\pm 0,5$.

También puede realizarse la sustitución de aminoácidos similares basándose en la hidrofiliidad, particularmente cuando el péptido o polipéptido equivalente biológicamente funcional creado de ese modo se pretende usar en realizaciones inmunológicas. Se han asignado los siguientes valores de hidrofiliidad a los residuos de aminoácido: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 \pm 1); glutamato (+3,0 \pm 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); prolina (-0,5 \pm 1); treonina (-0,4); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Se entiende que puede sustituirse un aminoácido por otro que tiene un valor de hidrofiliidad similar y todavía obtener un polipéptido biológicamente equivalente, y en particular, inmunológicamente equivalente. En tales cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están dentro de ± 2 , se prefieren particularmente aquellos dentro de ± 1 , y se prefieren incluso más particularmente aquellos dentro de $\pm 0,5$.

Tal como se expuso anteriormente, las sustituciones de aminoácido se basan en general en la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral del aminoácido, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño y similares. Los expertos en la técnica conocen bien sustituciones a modo de ejemplo que tienen en cuenta una o más de las características anteriores e incluyen, pero no se limitan a (residuo original: sustitución a modo de ejemplo): (Ala: Gly, Ser), (Arg: Lys), (Asn: Gln, His), (Asp: Glu, Cys, Ser), (Gln: Asn), (Glu: Asp), (Gly: Ala), (His: Asn, Gln), (Ile:

Leu, Val), (Leu: Ile, Val), (Lys: Arg), (Met: Leu, Tyr), (Ser: Thr), (Thr: Ser), (Trp: Tyr), (Tyr: Trp, Phe) y (Val: Ile, Leu). Por tanto, realizaciones de esta divulgación contemplan equivalentes funcionales o biológicos de un polipéptido tal como se expuso anteriormente. En particular, realizaciones de los polipéptidos pueden incluir variantes que tienen una identidad de secuencia de aproximadamente el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% y el 95% con el polipéptido de interés.

En el presente contexto, la homología entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de ácido nucleico se describe mediante el parámetro "identidad". Las alineaciones de secuencias y cálculo de puntuaciones de homología pueden realizarse usando una alineación de Smith-Waterman completa, útil para alineaciones tanto de proteínas como de ADN. Las matrices de puntuación por defecto BLOSUM50 y la matriz de identidad se usan para las alineaciones de proteínas y ADN, respectivamente. La penalización para el primer residuo en un hueco es de -12 para proteínas y -16 para ADN, mientras que la penalización para residuos adicionales en un hueco es de -2 para proteínas y -4 para ADN. La alineación puede realizarse con el paquete FASTA versión v20u6.

Pueden realizarse múltiples alineaciones de secuencias de proteínas usando "ClustalW". Pueden realizarse múltiples alineaciones de secuencias de ADN usando la alineación de proteínas como plantilla, reemplazando los aminoácidos por el codón correspondiente de la secuencia de ADN.

Alternativamente puede usarse software diferente para alinear secuencias de aminoácidos y secuencias de ADN. La alineación de dos secuencias de aminoácidos se determina por ejemplo usando el programa Needle del paquete EMBOSS (<http://emboss.org>) versión 2,8.0. El programa Needle implementa el algoritmo de alineación global descrito en el mismo. La matriz de sustitución usada es BLOSUM62, la penalización por apertura de hueco es de 10, y la penalización por extensión de hueco es de 0,5.

El grado de identidad entre una secuencia de aminoácidos; por ejemplo SEQ ID NO: 1 y una secuencia de aminoácidos diferente (por ejemplo, SEQ ID NO: 2) se calcula como el número de coincidencias exactas en una alineación de las dos secuencias, dividido entre la longitud de la "SEQ ID NO: 1" o la longitud de la "SEQ ID NO: 2", la que sea más corta. El resultado se expresa en porcentaje de identidad.

Se produce una coincidencia exacta cuando las dos secuencias tienen residuos de aminoácido idénticos en las mismas posiciones de la superposición.

Si es relevante, el grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse mediante el método de Wilbur-Lipman usando el software LASER- GENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineación múltiple: Penalización por hueco de 10 y penalización por longitud de hueco de 10. Los parámetros de alineación por parejas son Ktuple = 3, penalización por hueco = 3 y ventanas = 20.

En una realización particular, el porcentaje de identidad de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido con, o con respecto a, aminoácidos de SEQ ID NO: 1 se determina mediante i) alineación de las dos secuencias de aminoácidos usando el programa Needle, con la matriz de sustitución BLOSUM62, una penalización por apertura de hueco de 10, y una penalización por extensión de hueco de 0,5; ii) recuento del número de coincidencias exactas en la alineación; iii) división del número de coincidencias exactas entre la longitud de la secuencia más corta de las dos secuencias de aminoácidos, y iv) conversión del resultado de la división de iii) en un porcentaje. El porcentaje de identidad con respecto a, o con, otras secuencias de la invención se calcula de manera análoga.

A modo de ejemplo, una secuencia de polipéptido puede ser idéntica a la secuencia de referencia, es decir ser idéntica al 100%, o puede incluir hasta un determinado número entero de alteraciones de aminoácido en comparación con la secuencia de referencia de modo que el % de identidad sea menor del 100%. Tales alteraciones se seleccionan de: al menos una delección, sustitución (incluyendo sustitución conservativa y no conservativa) o inserción de aminoácido, y en las que dichas alteraciones pueden producirse en las posiciones de los extremos amino o carboxilo-terminal de la secuencia de polipéptido de referencia o en cualquier lugar entre las posiciones terminales, intercaladas o bien individualmente entre los aminoácidos en la secuencia de referencia, o bien en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

Las variantes de aminoácido conservativas también pueden comprender residuos de aminoácido que no se producen de manera natural. Los aminoácidos que no se producen de manera natural incluyen, sin limitación, trans-3-metilprolina, 2,4-metanoprolina, cis-4-hidroxioprolina, trans-4-hidroxioprolina, N-metil-glicina, alo-treonina, metiltreonina, hidroxietilcisteína, hidroxietilhomocisteína, nitro-glutamina, homoglutamina, ácido pipercolico, ácido tiazolidin-carboxílico, deshidroprolina, 3- y 4-metilprolina, 3,3-dimetilprolina, terc-leucina, norvalina, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina y 4-fluorofenilalanina. Se conocen en la técnica varios métodos para incorporar residuos de aminoácido que no se producen de manera natural en proteínas. Por ejemplo, puede emplearse un sistema *in vitro* en el que se suprimen mutaciones sin sentido usando ARNt supresores aminoacilados químicamente. Se conocen en la técnica métodos para sintetizar aminoácidos y aminoacilar ARNt. La transcripción y traducción de plásmidos que contienen mutaciones sin sentido se llevan a cabo en un sistema libre de células que comprende un extracto de *E. coli* S30 y enzimas disponibles comercialmente y otros reactivos. Las proteínas se

purifican mediante cromatografía. En un segundo método, se lleva a cabo la traducción en *Xenopus oocytes* mediante microinyección de ARNm mutado y ARNt supresor aminoacilado químicamente. Dentro de un tercer método, se cultivan células de *E. coli* en ausencia de un aminoácido natural que va a reemplazarse (por ejemplo, fenilalanina) y en presencia del /de los aminoácido(s) que no se produce(n) de manera natural deseado(s) (por ejemplo, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina o 4-fluorofenilalanina). El aminoácido que no se produce de manera natural se incorpora en la proteína en lugar de su homólogo natural. Los residuos de aminoácido que se producen de manera natural pueden convertirse en especies que no se producen de manera natural mediante modificación química *in vitro*. La modificación química puede combinarse con mutagénesis dirigida al sitio para expandir adicionalmente la gama de sustituciones. Pueden proporcionarse estructuras químicas alternativas que proporcionan una estructura tridimensional suficiente para soportar las propiedades antioxidantes de A1M mediante otras tecnologías, por ejemplo, armazones artificiales, sustituciones de aminoácidos y similares. Además, se contemplan estructuras que imitan los sitios activos de A1M tal como se enumeraron anteriormente y se representan en las figuras 3 y 6 como que tienen la misma función que A1M.

15 Enfermedades asociadas con estrés oxidativo

A continuación, se describen enfermedades o estados que implican estrés oxidativo. Se contempla que A1M puede usarse en el tratamiento de cualquiera de las enfermedades mencionadas a continuación.

20 Se ha notificado estrés oxidativo en una variedad de enfermedades. Tal como se mencionó anteriormente, el estrés oxidativo es una situación en la que hay un desequilibrio entre radicales libres y los antioxidantes protectores. El estrés oxidativo puede inducir una amplia gama de reacciones fisiológicas agudas o a largo plazo que liberan diversos factores bioactivos. Estos pueden promover a su vez la oxidación / formación de radicales libres adicional que acelera adicionalmente el estrés oxidativo, etc. Por tanto, las reacciones fisiológicas y el estrés oxidativo interaccionan entre sí como engranajes y conjuntamente hacen que la maquinaria de estrés oxidativo opere cada vez más rápido (figura 5). Algunos de los engranajes más importantes son inflamación, isquemia y reperfusión, hemoglobina en sangre y factores derivados de alimentos/entorno, que se comentarán a continuación.

30 A) Infección e inflamación

La inflamación es un término colectivo para una amplia gama de reacciones inmunitarias secundarias a infecciones de todas clases, y que caracterizan también otras varias enfermedades tales como enfermedades autoinmunitarias. El cuerpo responde a las infecciones bacterianas mediante el reclutamiento de glóbulos blancos (monocitos y granulocitos) en el sitio de infección. Tal como se describió anteriormente, los glóbulos blancos producen aniones superóxido e hipoclorito. Para obtener hierro, muchas bacterias son hemolíticas, es decir producen moléculas que inducen la ruptura de glóbulos rojos y la exposición de hemoglobina a los componentes tisulares vecinos. Además, la inflamación se caracteriza por necrosis, es decir células en el sitio de infección se rompen y mueren. Esto conduce a la exposición de, por ejemplo, las enzimas respiratorias mitocondriales que producen radicales libres. Las citocinas proinflamatorias tales como TNF-alfa, afectan a los antioxidantes intracelulares, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa. De esta manera, muchos factores contribuyen para el estrés oxidativo durante la infección y la inflamación.

45 Un ejemplo de las enfermedades en este grupo es enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), una enfermedad pulmonar inflamatoria. Las enfermedades inflamatorias de los pulmones y las vías respiratorias están asociadas con fuerte oxidación patológica del tejido extravascular. Esto está mediado por la activación de granulocitos neutrófilos y eosinófilos y su secreción de peroxidasas, así como la exposición de oxígeno molecular.

50 La artritis es un grupo de enfermedades en las que las articulaciones se dañan de manera que implica inflamación. La artritis puede tener muchas causas, por ejemplo traumatismo forzado, infección bacteriana, gota y ataque autoinmunitario. La inflamación de las articulaciones está asociada con altos niveles de estrés oxidativo y modificación oxidativa del cartílago, tejido conjuntivo y células.

Otros ejemplos de estados con altos niveles de inflamación son

- 55 • Enfermedades autoinmunitarias (artritis reumatoide, enfermedades tiroideas, etc.)
- Enfermedades infecciosas
- 60 • Enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ALS, enfermedad de Huntington y esclerosis múltiple, MS)
- Enfermedades inflamatorias del intestino
- Artritis

65 B) Enfermedades relacionadas con reperfusión e isquemia

5 Cuando los vasos sanguíneos se ocluyen o se dañan, de manera o bien permanente o bien intermitente, hay una formación aumentada de radicales libres debido a la muerte celular que resulta de la disminución del flujo sanguíneo e hipoxia (isquemia). Cuando se restaura el flujo sanguíneo (reperusión) una elevación repentina del suministro de oxígeno local conduce a un aumento drástico de ROS procedentes de reacciones entre componentes celulares y oxígeno. Por ejemplo, la enzima xantina deshidrogenasa, un componente esencial y abundante de metabolismo de ADN, usa el oxígeno de la sangre para formar aniones superóxido. Si la reperusión se mantiene a lo largo de un periodo prolongado, la formación de ROS supera la capacidad de los antioxidantes endógenos y se produce estrés oxidativo. Se induce lesión endotelial por estrés oxidativo, lo que activa a su vez las plaquetas e induce la formación de trombo que amenaza adicionalmente con ocluir los vasos.

15 El accidente cerebrovascular es un estado relacionado con isquemia-reperusión del cerebro provocado por la obstrucción del flujo sanguíneo, debido a trombosis, embolia, hemorragia, etc. El infarto de un órgano, por ejemplo el corazón, es un estado con necrosis tisular debido a la oclusión de la sangre y a efectos de isquemia-reperusión. La aterosclerosis es una enfermedad que afecta a los vasos sanguíneos arteriales. Es una respuesta inflamatoria crónica en las paredes de las arterias, debido parcialmente a la acumulación de glóbulos blancos de tipo macrófago y está promovida por lipoproteínas de baja densidad (LDL). El estrés oxidativo es un fuerte componente en el desarrollo de aterosclerosis. Por tanto, los oxidantes y radicales libres participan en la modificación oxidativa de LDL, membranas de células endoteliales y otros componentes de los vasos sanguíneos. La LDL oxidada (ox-LDL) se une a receptores específicos en el endotelio y la acumulación local de ox-LDL conduce al reclutamiento de monocitos que se diferencian a macrófagos en el sitio específico. Esto conduce a inflamación, atracción de granulocitos y un aumento en la producción local de ROS a partir de NADPH-oxidasa, MPO y otras fuentes. El daño endotelial local, que da como resultado placas ateroscleróticas, en última instancia ocluye el flujo sanguíneo.

- 25 • Arteriosclerosis
- Cardiopatía isquémica
- 30 • Accidente cerebrovascular y otros estados secundarios a isquemia
- Trastornos hipertensivos
- Trastornos metabólicos (diabetes, dislipidemia, hipercolesterolemia)

35 Se desarrollan daños relacionados con isquemia y reperusión iatrogenos secundarios al tratamiento de una enfermedad subyacente. Durante el tratamiento, los diferentes engranajes mostrados en la figura 5 pueden dirigir el estrés oxidativo.

40 Por ejemplo, varios métodos de diálisis se practican para reemplazar la función renal perdida. Las funciones muy complejas de los riñones pueden resumirse en mantener el equilibrio hidroelectrolítico del cuerpo y retirar los productos de degradación tóxicos y perjudiciales. Los riñones funcionan mediante filtración continua de la sangre, seguida por una reabsorción activa de la mayor parte de los componentes, incluyendo cantidades adecuadas de agua, y excreción del agua, la sal y los productos de degradación tóxicos en exceso. Los radicales libres y ROS, especialmente radicales orgánicos libres pequeños, tales como urato y 3-hidroxi-quinurenina, son ejemplos de sustancias tóxicas sometidas a aclaramiento normalmente de la sangre por los riñones. La diálisis está lejos de ser un reemplazo perfecto de los riñones, y por tanto los pacientes en diálisis padecen estrés oxidativo. Además, se ha mostrado que el propio proceso de diálisis induce una respuesta inflamatoria que contribuye también al estrés oxidativo. Por tanto, hipotéticamente, la mayor incidencia de aterosclerosis entre pacientes en diálisis puede explicarse por el estrés oxidativo asociado con la insuficiencia renal y el proceso de diálisis.

50 Los pacientes con isquemia cardíaca se someten a una operación de derivación vascular de manera rutinaria. Durante la cirugía, un sistema de circulación extracorpórea bombea la sangre. Durante este tiempo, se destruyen gran parte de los glóbulos rojos, lo que da como resultado hemoglobina libre, un potente oxidante tal como se describió anteriormente. Además, la cirugía coronaria de corazón así como otras cirugías vasculares, requiere que se detenga el flujo sanguíneo durante el procedimiento. Cuando se establece de nuevo el flujo sanguíneo, se produce daño por reperusión.

60 *Trasplante de células y órganos.* Uno de los problemas que se encuentran en el trasplante de células y órganos es que se forman ROS en los órganos y las células durante el almacenamiento. La situación se asemeja a los problemas que se encuentran durante la isquemia-reperusión. Este estrés oxidativo puede impedirse o al menos disminuirse en modelos animales mediante el uso de eliminadores de ROS. Se ha dedicado mucho esfuerzo a intentar optimizar el medio usado para almacenar y transportar los órganos sólidos usados para el trasplante. Hoy en día se usan soluciones salinas frías con nutrientes diseñadas específicamente para este fin. Sin embargo, el tiempo de isquemia (tiempo sin oxígeno) permitido es todavía muy limitado para órganos como corazón, pulmones, riñones e hígado. Cada vez más, células de los islotes pancreáticos y diferentes clases de las denominadas células madre (hematopoyéticas y mesenquimatosas ídem, por ejemplo) también se transportan por todo el mundo para fines de

trasplante. En la misma línea, el trasplante de tejido retiniano es un posible tratamiento futuro actualmente probado en animales. Las enfermedades caracterizadas por daño oxidativo de la retina son a menudo indicaciones para trasplante de retina. Se mostró recientemente que el precondicionamiento del tejido retiniano puede protegerlo frente a la muerte celular oxidativa.

5

Por tanto, los ejemplos incluyen:

- Uso de diálisis renal
- Uso de un sistema de circulación extracorpórea
- Cirugía vascular
- Trasplante de células y órganos

10

15

C) Estrés oxidativo como resultado de hemoglobina libre, hemo e iones hierro

20

Tal como se describió anteriormente, la hemoglobina libre y sus metabolitos están entre los oxidantes endógenos más fuertes. Existen de manera natural varios sistemas de proteínas y enzimas antioxidantes protectoras para impedir la oxidación. En muchas enfermedades, la hemorragia forma parte de la fisiopatología, lo que potencia el estrés oxidativo. Las causas yatógenas también son comunes. La hemorragia puede producirse o bien de manera sistemática o bien dentro de compartimientos cerrados, es decir hemorragias intracraneales, dentro de las articulaciones, en el tubo digestivo y dentro de órganos capsulados.

25

La hemólisis, destrucción incontrolada de glóbulos rojos, puede conducir a hemoglobinemia y hemoglobinuria, es decir concentraciones elevadas de hemoglobina en la sangre y la orina, respectivamente. La hemoglobina plasmática se filtra a través de los glomérulos de los riñones y se reabsorbe por células tubulares en las que puede conducir a la formación de precipitados denominados hemosiderina durante condiciones con sobrecarga de hemoglobina, lo que provoca daño oxidativo. Si la sobrecarga de hemoglobina es muy alta y no hay ningún tratamiento disponible, los riñones se dañan de manera irreversible y se requiere diálisis o trasplante de riñón.

30

35

Las enfermedades en las que se lisan glóbulos rojos se clasifican según la ubicación del acontecimiento lítico, o bien dentro de los vasos sanguíneos o bien fuera de ellos. La hemólisis tanto intravascular como extravascular provoca anemia que puede dividirse en diferentes categorías dependiendo de la causa de la lisis. Por tanto, tres grupos principales de anemia hemolítica autoinmunitaria (AIHA) son AIHA mediada por IgG caliente, AIHA mediada por IgM fría o síndrome de aglutininas frías y anemia hemolítica inmunitaria inducida por fármacos. En todas estas enfermedades, anticuerpos producidos por el paciente recubren y destruyen los glóbulos rojos. Otra forma especial de anemia hemolítica mediada por anticuerpos se encuentra en fetos/recién nacidos de madres que se han inmunizado para producir anticuerpos de grupo sanguíneo contra los antígenos paternos en la superficie de los glóbulos rojos en la descendencia. La enfermedad hemolítica del recién nacido es una enfermedad potencialmente mortal puesto que conduce a valores de hemoglobina peligrosamente bajos y finalmente a hidropesía fetal, un estado crítico en el que el bebé acumula agua debido a la carencia relativa de glóbulos rojos que pueden hacer circular la hemoglobina.

40

45

Muchos defectos enzimáticos diferentes del metabolismo de los glóbulos rojos también pueden asociarse con síndromes hemolíticos. La hemólisis mecánica y hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), una enfermedad hemolítica intravascular adquirida debida a la falta de proteínas reguladoras del complemento ancladas a glicosilfosfatidilinositol, representan otras formas menos comunes de hemólisis intravascular. Además, puede producirse hemólisis inmediata o retardada como acontecimientos adversos tras una transfusión o trasplante clínico (véase a continuación). Los pacientes con síndrome mielodisplásico y anemia diseritropoyética también pueden padecer producción de RBC ineficaz y posterior lisis. Además de estados asociados con un exceso de hemoglobina libre, los pacientes con trastornos del metabolismo del hierro incluyendo hemocromatosis padecen un aumento del estrés oxidativo y como los pacientes con enfermedad hemolítica pueden beneficiarse de mecanismos antioxidantes regulados por incremento.

50

55

Tanto hemo como hemoglobina libre que resultan de estos estados hemolíticos están asociados con la generación de diversas especies reactivas del oxígeno (ROS) que pueden inducir daño oxidativo a moléculas de la matriz, membranas celulares y otros componentes tisulares tal como se expuso anteriormente. Especialmente la hemólisis intravascular da como resultado concentraciones inaceptablemente altas de hemoglobina libre en plasma que pueden conducir a hipertensión, daño renal y colapso circulatorio. Esto puede observarse en su forma más drástica y potencialmente mortal como parte de reacciones transfusionales hemolíticas agudas tras la administración de una unidad de sangre con el grupo ABO incorrecto. La situación completa se caracteriza por una inducción inmunológica de una respuesta al estrés oxidativo. Por ejemplo, el suministro de haptoglobina de unión a hemoglobina en plasma se sustituye rápidamente ya que los complejos entre la hemoglobina y haptoglobina se someten a aclaramiento rápidamente de la circulación por el receptor CD163. Por consiguiente, la haptoglobina en plasma reducida o ausente se usa como marcador de diagnóstico para la hemólisis. De manera similar, el hemo libre se une por

60

65

hemopexina en plasma a partir de lo cual se retira entonces este complejo mediante interacción con el receptor CD91.

Las infecciones son aún otro tipo de enfermedades que pueden conducir a hemólisis. En el paludismo, los glóbulos rojos son invadidos por el parásito *Plasmodium*, que se alimenta, se multiplica y provoca de manera intermitente que se rompan las células. El parvovirus B19 se une a través del antígeno de grupo sanguíneo P a células progenitoras eritroides y las infecta preferentemente. En niños, una infección de ese tipo no se caracteriza casi nunca por la producción de autoanticuerpo anti-P que provoca la destrucción de glóbulos rojos. De manera similar, una infección por *Mycoplasma* produce una respuesta de anticuerpos que a menudo dan reacción cruzada tanto con el patógeno como con el antígeno de grupo sanguíneo I, provocando de ese modo lisis intravascular que algunas veces puede ser potencialmente mortal.

Otro grupo de enfermedades con un componente hemolítico se encuentra en un gran número de personas en todo el mundo. Hay múltiples variantes de trastornos genéticos de hemoglobina pero se mencionarán en el presente documento algunos de los más importantes: anemia falciforme, en la que una mutación de hemoglobina que da como resultado la variante HbS, se asocia con malformación y desestabilización de los glóbulos rojos, especialmente si disminuye la tensión de oxígeno. La talasemia es otra colección de trastornos genéticos que reducen la síntesis de hemoglobina y algunas veces conducen a hemólisis. Se ha mostrado que tanto los pacientes con anemia falciforme como con talasemia padecen una sobrecarga de hierro, inflamación y estrés oxidativo. De manera interesante, se ha mostrado recientemente que otro miembro de lipocalina, NGAL, está regulado por incremento en pacientes con talasemia en los que se sabe que el estrés oxidativo está aumentado. Estos tipos de trastornos conducen a la exposición de hemoglobina y los acontecimientos posteriores descritos anteriormente: formación de ROS, hemo libre, hierro libre, estrés oxidativo y vasoconstricción.

Estados yatrógenos asociados con hemoglobina libre de células.

Transfusión de sangre. Cuando se realiza una transfusión de glóbulos rojos de un donante de sangre a un paciente, el almacenamiento de la unidad de sangre ha tenido lugar a 4 grados durante un máximo de 42 días. Esto da como resultado una función y estabilidad subóptimas de los elementos celulares en la bolsa de plástico. Por ejemplo, incluso aunque existen reglamentos para garantizar una calidad óptima de los hemoderivados transfundidos, una determinada cantidad de fuga de hemoglobina de las células es inevitable y esperada. Hay también una oxidación progresiva de proteínas del citoesqueleto y acumulación de hemoglobina desnaturalizada en glóbulos rojos almacenados. Además, un notable porcentaje de células dañadas se lizará o someterá a aclaramiento inmediatamente de la circulación del receptor tras la infusión. Por tanto, aunque se garantiza la mejor compatibilidad posible de grupos sanguíneos mediante pruebas de compatibilidad cruzada, etc. en el banco de sangre, el receptor experimentará un aumento de carga de hemoglobina libre tras la transfusión y, por consiguiente, también los efectos negativos del estrés oxidativo.

A pesar de esto, se proporcionan casi medio millón de unidades de sangre en Suecia al año y, por consiguiente, millones en todo el mundo. Actualmente se consideran las transfusiones un requisito previo para la medicina moderna, incluyendo intervenciones quirúrgicas, actividades obstétricas seguras, tratamiento con quimioterapia intensiva de supresión hematopoyética para el cáncer, así como trasplante de células madre o de órganos.

Sustitutos de la sangre. Puesto que la necesidad de sangre que puede transfundirse de manera continua supera el suministro real, existe una demanda constante de fuentes alternativas de sangre. Varios productos sustitutos de la sangre están en ensayos clínicos actualmente, en América del Norte así como en Europa y Suecia. Un grupo principal de sustitutos de la sangre son los transportadores de oxígeno basados en hemoglobina (HBOC). Estos consisten en disoluciones concentradas de hemoglobina libre de células, modificada de una forma u otra para minimizar los efectos adversos de la molécula de hemoglobina (véase anteriormente). Aunque no se usan HBOC clínicamente en la actualidad, se cree que es sólo una cuestión de tiempo antes de que el tratamiento con sustitutos de la sangre sea una realidad para indicaciones tales como choque hemorrágico inducido por traumatismo y prevención de hipotensión.

Además de la situación descrita anteriormente de transfusión de sangre en el mejor de los casos, hay tres situaciones en las que la carga de hemoglobina libre y hemo (y por consiguiente de estrés oxidativo) corre el riesgo de aumentar adicionalmente:

1) Las estadísticas actuales de sistemas de hemovigilancia (es decir, vigilancia de la sangre) en la mayor parte de los países desarrollados actualmente muestran claramente que los incidentes graves más frecuentes asociados con la transfusión de sangre están relacionados con el grupo sanguíneo. Por ejemplo, esto se aplica a >80% de todos los incidentes graves en la base de datos de peligros graves de transfusión (SHOT) en R.U. Además, las transfusiones de sangre con incompatibilidad ABO por error pueden provocar hemólisis intravascular y reacciones adversas mortales debido a sobrecarga aguda de hemoglobina libre en plasma y todos sus efectos posteriores. Se ha mostrado que esta complicación trágica representa hasta el 50% de todas las víctimas mortales relacionadas con transfusión. Si el paciente supera la fase aguda de la reacción de sobrecarga de hemoglobina, no es improbable que persista un daño renal permanente y pueda ser un motivo para trasplante de riñón más tarde. Todas estas

reacciones se deben a la falta de modos apropiados para ocuparse de las cantidades excesivas de hemoglobina libre, hemo y membranas celulares que quedan tras esta clase de episodio lítico debido a anticuerpos anti-A y/o anti-B que se producen de manera natural presentes en el plasma dependiendo del grupo sanguíneo ABO de los receptores. Aunque menos común, también otras combinaciones de grupo sanguíneo incompatibles fuera del sistema ABO puede provocar acontecimientos hemolíticos intravasculares o extravasculares que ponen en riesgo al paciente.

De la manera más importante, las unidades de sangre sólo son compatibles para el estado de ABO y RhD actualmente, lo que deja los otros aproximadamente 300 grupos sanguíneos incompatibles. Si el paciente tiene o desarrolla una respuesta inmunitaria frente a cualquiera de esas estructuras, entonces puede producirse hemólisis sin la necesidad de que se haya producido un error en el proceso de transfusión.

2) Los pacientes con necesidades de transfusión de manera crónica eventualmente padecerá sobrecarga de hierro puesto que los glóbulos rojos transfundidos tendrán una semivida más corta en la circulación del receptor. Esto se debe a muchos factores pero la lesión por almacenamiento normalmente se considera importante y la enfermedad para la que se transfundió al paciente también puede provocar un aumento del recambio de glóbulos rojos en general. Por tanto, se tratan estos pacientes con agentes quelantes con la capacidad para unir iones de hierro, reduciendo de ese modo el estrés oxidativo. Sin embargo, no hay tratamiento específico para ocuparse del aumento de la carga de hemo y hemoglobina asociado con la transfusión crónica, ni el estrés oxidativo en general provocado por la combinación de un trastorno lítico como, por ejemplo, talasemia mayor y la necesidad de transfusión crónica que crea.

3) Finalmente, los pacientes que requieren hemoderivados irradiados reciben unidades de glóbulos rojos que se dañan adicionalmente más allá de la lesión por almacenamiento convencional. Normalmente, se administra una dosis de irradiación gamma a 25 Gray a cada unidad de sangre para garantizar que se inactivan todos los componentes celulares, es decir que no pueden dividirse ni proliferar. Esto es importante de manera crítica para cualquier paciente cuyo sistema inmunitario está suprimido gravemente o no es funcional. Por consiguiente, categorías de pacientes comunes que reciben esta clase de sangre incluyen receptores de trasplantes de célula madre, pacientes tratados con determinados agentes quimioterápicos, fetos transfundidos *in utero* y pacientes con defectos inmunitarios congénitos graves. Por tanto los ejemplos incluyen:

- Trastornos hemolíticos
- Enfermedad por infecciones (paludismo, *Shigella*, fiebres hemorrágicas, etc.)
- Enfermedad metabólica (anemia falciforme, talasemia, síndrome urémico hemolítico etc., hemofilia)
- Transfusión de sangre
- Tratamiento con sustituto de la sangre
- Terapia anticoagulación
- Complicaciones per y posoperatorias

D. Estrés oxidativo como resultado de factores derivados de alimentos y ambientales

Se conoce desde hace mucho tiempo que la luz ultravioleta (UV), o la irradiación con fotones, inducen radicales libres y estrés oxidativo, y por tanto daño de los tejidos (es decir, la piel) expuestos a la luz UV. Los mecanismos incluyen daño directo mediante la irradiación con UV de ADN celular y daño indirecto a través de la formación de ROS que provoca daño del tejido mediante modificación oxidativa. Este último se denomina estrés fotooxidativo.

Las causas yatrógenas son de nuevo importante a este respecto. El tratamiento de infecciones con terapias antibacterianas y virales puede provocar inflamación y formación de productos oxidativos que desplazan el equilibrio (figura 1). Además, las terapias contra el cáncer citostáticas agresivas inducen muerte celular masiva que drena a su vez los sistemas antioxidantes endógenos. Además, las radioterapias inducen grandes cantidades de radicales libres. Asimismo, la irradiación con partículas cargadas de tejidos vivos puede inducir respuestas biológicas que van de muerte celular necrótica, apoptosis o detención del ciclo celular a estrés oxidativo inducido mediante la formación de ROS. La terapia de irradiación con iones, o irradiación con microhaz de partículas cargadas, es una forma particular usada para el tratamiento de cáncer. Por ejemplo, en la terapia de irradiación con protones se dirige una dosis de irradiación a un tumor, y las dosis de irradiación usadas son lo suficientemente altas como para destruir las células tumorales pero lo suficientemente bajas como para minimizar el daño oxidativo del tejido circundante a través de la formación de ROS. Los ejemplos incluyen:

- Irradiación con luz UV

- Terapias antiinfecciosas (antibacterianas, virales y parasitarias)
- Citostáticos
- 5 • Radioterapia
- Rayos X

10 Las contaminaciones ambientales y las toxinas tienen un efecto negativo general sobre todas las criaturas vivas. Dependiendo de la capacidad antioxidante de un individuo, tiene un grado variable de resistencia natural al estrés oxidativo. Las ratas y las cucarachas tienen una capacidad antioxidante extremadamente alta, por tanto tienen una alta tasa de supervivencia predictiva en acontecimientos extremos como situaciones posteriores a una guerra nuclear, etc.

15 La mayor parte de la capacidad antioxidante humana es endógena, sin embargo los diferentes sistemas dependen de cofactores tales como vitaminas y minerales, proporcionados por la ingestión de alimentos. Por tanto, el estado nutricional de un individuo es importante para contrarrestar el estrés oxidativo. Se ha evaluado en muchas situaciones la terapia antioxidante con suplemento de vitaminas C y E, pero puesto que los efectos requieren que se retiren los productos reducidos del cuerpo, no hay estudios que respalden su uso en situaciones con alto estrés oxidativo (por ejemplo, preeclampsia).

E. Trastornos relacionados con el estrés oxidativo de la piel.

25 La piel es el órgano más grande del cuerpo y proporciona una barrera física que protege el organismo humano frente al entorno. Los estados patológicos que implican la perturbación de la función de barrera desarrollan fácilmente inflamación debido a la exposición a oxígeno, irradiación con luz UV, invasión microbiana, etc. Además, la inflamación y otros trastornos relacionados con el estrés oxidativo de la piel tienen rasgos característicos debido a su alto contenido en componentes de ECM, por ejemplo fibras de colágeno. El colágeno es especialmente sensible al daño oxidativo puesto que esta molécula tiene una tasa de recambio extremadamente lenta. De hecho, las fibras de colágeno de la piel están hechas para durar toda la vida. Por tanto, el número de modificaciones oxidativas en el tejido de la piel aumenta a lo largo del tiempo, con la edad.

35 La dermatitis atópica es un estado inflamatorio crónico (con recaídas) de la piel provocado por irritación física y química (por ejemplo, alergia) conduciendo a piel escamosa y eccema. La psoriasis es un estado similar pero está provocado por autoinmunidad en lugar de irritantes externos.

40 Las heridas crónicas en las piernas y otras úlceras crónicas se caracterizan por una inflamación persistente debido al flujo sanguíneo alterado, observado comúnmente en pacientes diabéticos, hemorragia y/o infecciones microbianas. Se cree que varios mecanismos provocan la cicatrización defectuosa. La hemoglobina, el hemo y el hierro libre, que se originan a partir de glóbulos rojos, que migran desde la sangre hasta el tejido de la herida, así como desde la necrosis extravascular, son importantes factores patógenos. Las ROS y los radicales libres inducidos por los componentes de degradación de la hemoglobina presentan fuerte estrés oxidativo que conduce a daño del tejido y a destrucción celular y por tanto impiden una cicatrización normal.

- 45 • Irradiación con luz UV
- Modificaciones relacionadas con la edad
- 50 • Heridas agudas
- Heridas crónicas en la piel
- Dermatitis atópica
- 55 • Psoriasis

F. Estrés oxidativo y reproducción

60 El aparato reproductor femenino es de interés particular desde el punto de vista del estrés oxidativo. Durante el ciclo menstrual normal, hay un sangrado mensual, que secreta el endometrio. Muchas mujeres experimentan dolor en este proceso, denominado dismenorrea. Recientemente han podido detectarse altos niveles de marcador para estrés oxidativo en plasma de estas mujeres (datos no publicados).

65 La dismenorrea también puede ser un síntoma de endometriosis, todavía un enigma dentro del campo de la ginecología. En este estado, hay un tejido endometrial ectópico que se extiende como islas en la cavidad abdominal. Estas islas reaccionan a los niveles hormonales sistémicos y, por consiguiente, sangran durante la menstruación. La

sangre intraabdominal provoca dolor y más tarde también la formación de filamentos, los cordones pueden ocluir el intestino así como las trompas de Falopio provocando esterilidad y problemas gastrointestinales.

5 La implantación es cuando el óvulo fecundado establece contacto con el endometrio de la embarazada, la decidua. La regulación del flujo sanguíneo uterino es importante tanto durante la menstruación, la implantación como durante el embarazo. Las monoaminas son potentes mediadores vasoactivos que regulan el flujo sanguíneo y, en el caso de la histamina, la permeabilidad capilar. La serotonina y la histamina desempeñan un papel en la decidualización, implantación y, en el caso de la histamina, también en la inmunomodulación. Se ha notificado que la lesión local en el endometrio, provocada al tomar una biopsia, aumentó la incidencia de implantación en pacientes con IVF (fecundación *in vitro*). Por tanto, es probable que mediadores inflamatorios, incluyendo histamina, que se liberan normalmente durante la remodelación y reparación tisular funcionen como mediadores de la decidualización y la implantación. La implantación en ratas también se indujo por histamina cuando se combinó con dosis subóptimas de estrógenos mientras que la aplicación intrauterina de inhibidores o antagonistas para receptores de histamina inhibe la formación de la decidua. El estrés oxidativo que sigue a la inflamación regulada, puede en el caso de esterilidad 15 superar al sistema antioxidante y provocar de ese modo un aborto espontáneo.

Las contracciones y partos prematuros son problemas obstétricos comunes. El mecanismo esencial que desencadena dilatación prematura del cuello uterino y contracciones uterinas es la inflamación. La inflamación puede inducirse mediante infecciones y hemorragias. Probablemente el estrés oxidativo es el principal culpable también en estas situaciones.

- Dismenorrea
- Endometriosis
- 25 • Parto prematuro

G. Estrés oxidativo en la medicina neonatal

30 Un alto porcentaje de todos los partos son prematuros, es decir antes de la semana 34 de gestación. La prematuridad extrema (semanas 23-28 de gestación) a menudo se complica con daño orgánico grave. Los problemas predominantes en bebés prematuros son daño pulmonar, necrosis del tubo digestivo, hemorragias e infecciones cerebrales, situaciones caracterizadas por alto estrés oxidativo. Por consiguiente, la oxidación es el denominador de daño. Los sistemas antioxidantes endógenos no están completamente desarrollados y/o maduros para manejar el estrés oxidativo que se produce fuera del útero. En embarazos normales, los pulmones, la piel y el tubo digestivo del bebé, están todos protegidos por el líquido amniótico que rodea al feto tanto dentro como fuera, es decir con respecto a la piel.

40 La hemorragia intraventricular (IVH). La IVH cerebral grave se produce en aproximadamente el 15% de neonatos prematuros nacidos antes de las 28 semanas de gestación. Más del 50% de neonatos con IVH desarrollan hidrocefalia poshemorrágica y el 40% desarrollan deterioro neurológico grave (principalmente parálisis cerebral) tal como se detecta a los 2 años de edad. No hay ninguna terapia disponible para prevenir que los neonatos desarrollen o bien hidrocefalia o bien incapacidad neurológica grave. La hemólisis de la sangre extravasada provoca la liberación de hemoglobina libre en el líquido cefalorraquídeo (CSF) intraventricular. La hemoglobina libre y sus productos de degradación hemo, CO y hierro libre pueden inducir en alto grado estrés oxidativo y proinflamación. Los preoligodendrocitos que pueblan la sustancia blanca periventricular son extremadamente vulnerables a la inflamación y al estrés oxidativo dando como resultado daño de los tractos de sustancia blanca corticoespinales conduciendo al desarrollo de parálisis cerebral. Surge estrés oxidativo secundario de la muerte celular inducida por productos de hemólisis y conduce a la liberación de oxidantes y radicales libres principalmente de mitocondrias dañadas, sumándose al estrés oxidativo provocado por la propia hemoglobina libre. Los ejemplos incluyen:

- Dificultad respiratoria
- Hemorragia cerebral intraventricular
- 55 • Enterocolitis necrosante (NEC)
- Infecciones
- 60 • Hemólisis

Principios de la administración de alfa-1-microglobulina

65 A partir de la descripción anterior, se deduce que A1M debe estar presente durante un periodo de tiempo suficiente en un líquido, órgano, tampón, etc., para impedir, o inhibir, las acciones de un oxidante presente en la misma muestra biológica. Por otro lado, A1M también puede usarse en una única ocasión para fines de limpieza, es decir

para retirar un oxidante o un producto de oxidación. Por tanto, las aplicaciones médicas de A1M pueden ser de dos tipos principales, 1) continua en un periodo de tiempo definido o 2) dosis única / múltiples dosis. Principalmente, se usarán las aplicaciones de dosis única por motivos prácticos pero la administración continua también es posible, por ejemplo usando vehículos de producción de A1M recombinante (es decir, células).

5 Una segunda clasificación está relacionada con la ubicación de la administración de A1M, es decir puede añadirse A1M 1) de manera global/sistémica o 2) de manera local. Ejemplos de la categoría 1) es diálisis artificial, en la que puede usarse A1M para la eliminación de radicales como adición al volumen completo de líquido de diálisis, o tratamiento de aterosclerosis, en el que puede añadirse A1M a la sangre para reparar el daño endotelial inducido por MPO. Ejemplos de la categoría 2) es el tratamiento de heridas crónicas en las piernas, en el que puede añadirse A1M en una dosis única de manera local a la herida para "limpiar" hemo depositado y radicales, y para reparar los productos de oxidación.

15 La administración de A1M puede ser una vez al día o dividida en múltiples dosis al día dependiente de la enfermedad particular que va a tratarse, el estado del sujeto que va a tratarse (edad, peso, gravedad de la enfermedad). Una dosificación diaria de A1M es normalmente de desde 0,5 mg/kg de peso corporal hasta 100 mg/kg de peso corporal. El régimen de dosificación depende de la enfermedad o el estado que va a tratarse y puede implicar el tratamiento durante 1 minuto hasta el tratamiento durante toda la vida.

20 Una composición comprende normalmente desde el 10-99% p/p de A1M pero puede de ser menos del 10% a tan sólo cantidades traza, si es farmacéuticamente viable. Para detalles adicionales y ejemplos de formulaciones, véanse a continuación los ejemplos de formulación.

25 A1M se administra preferiblemente en forma de una composición farmacéutica. Debido a la naturaleza polipeptídica de A1M se diseñan las composiciones preferidas para uso parenteral, pero A1M también puede aplicarse de manera local, por ejemplo sobre la piel en relación con la cicatrización de heridas, en articulaciones en relación con artritis o en las cavidades cerebrales cuando se tratan hemorragias intraventriculares. Además, tal como parece a partir de la descripción en el presente documento, también puede añadirse A1M a la sangre destinada para transfusión o a células u órganos que van a trasplantarse en un sujeto. Por consiguiente, puede formularse A1M en un líquido, por ejemplo en una disolución, una dispersión, una emulsión, una suspensión etc., o puede estar en una formulación adecuada para la administración a la piel tal como, por ejemplo, una loción, una crema, una pomada, una suspensión, una emulsión, una pasta, un polvo, un parche, un emplastro, un apósito, un jabón, un champú, loción de protección solar etc. Además, puede incluirse A1M en dispositivos médicos o equipos, por ejemplo como recubrimiento liberable en catéteres etc.

35 Alternativa y adicionalmente, pueden incluirse portadores específicos para dirigir el principio activo a una parte específica del cuerpo. Por ejemplo un complejo anticuerpo-A1M en el que se dirige el anticuerpo a la ubicación de elección ("migración") mediante su especificidad por un determinado epítipo; una célula madre o una célula recombinante con tales propiedades de migración, por ejemplo receptores de integrina específicos para un tejido y con la capacidad artificial o natural para secretar grandes cantidades de A1M. El tratamiento sería más eficaz puesto que el fármaco se concentraría en el sitio de inflamación, sangrado, etc., y se requeriría menos A1M.

45 Para uso parenteral, los disolventes adecuados incluyen agua, aceites vegetales, propilenglicol y disolventes orgánicos aprobados en general para tales fines. En general, un experto en la técnica puede encontrar orientación en "Remington's Pharmaceutical Science" editado por Gennaro *et al.* (Mack Publishing Company), en "Handbook of Pharmaceutical Excipients" editado por Rowe *et al.* (PhP Press) y en monografías oficiales (por ejemplo, Farm. Eur. o USP) en relación con excipientes relevantes para los tipos de formulación específicos y con métodos para preparar una formulación específica.

50 Ejemplos de posibles usos para la alfa-1-microglobulina como agente terapéutico

Los ejemplos presentados a continuación se incluyen solamente para inspiración y no deberán considerarse en modo alguno como limitativos.

55 Debido a sus propiedades únicas tal como se comenta en el presente documento, A1M puede ser significativamente superior a alternativas conocidas actualmente como tratamiento en varias aplicaciones. El principio fundamental para las aplicaciones enumeradas a continuación es que se añada A1M a una situación clínica o bien antes de un aumento esperado en el estrés oxidativo, durante o bien después de una situación con alto estrés oxidativo, con el fin de contrarrestar la oxidación. Muchas situaciones clínicas caracterizadas por alto estrés oxidativo se enumeraron en los puntos anteriores, sólo se usa una selección de enfermedades en los ejemplos a continuación, pero los principios de tratamiento se aplican a todos. Se proporciona una visión general en la siguiente tabla 1.

Tabla 1. Estados con estrés oxidativo que puede tratarse con A1M

GRUPO	ENFERMEDADES/ESTADOS	CONDICIONES YATRÓGENAS
-------	----------------------	------------------------

A. Infección e inflamación	Pulmonar (COPD) Inflamaciones autoinmunitarias Inflam. neurodegenerativa Enfermedad inflam. del intestino Artritis, artrosis	
B. Relacionados con isquemia y reperfusión	Aterosclerosis Accidente cerebrovascular Infarto de miocardio	Diálisis Trasplante de órganos Trasplante de células madre Estrés por el sistema de circulación extracorpórea
C. Estrés oxidativo como resultado de hemoglobina libre, hemo e iones de hierro	Enfermedades hemolíticas Hemocromatosis Inf. por paludismo Inf. por <i>Shigella</i> Fiebres hemorrágicas Falciforme Talasemias	Transfusión de sangre Tratamiento con HBOC
D. Factores derivados de alimentos o ambientales	Irradiación con luz UV	Radioterapia contra el cáncer Radioterapia Terapia contra la infección Investigación con rayos X
E. Piel	Irradiación con luz UV de la piel Dermatitis atópica Psoriasis Heridas crónicas en las piernas Heridas agudas Envejecimiento	Cicatrización de heridas tras cirugía, incluyendo cirugía plástica
F. Reproducción	Dismenorrea Endometriosis Esterilidad Partos prematuros	
G. Estados neonatales	Hemorragias cerebrales incluyendo IVH Estados hemolíticos Dificultad respiratoria Enterocolitis necrosante	

A) Infección e inflamación

5 Se podría administrar A1M en combinación con fármacos convencionales contra la infección y fármacos antiinflamatorios con el fin de contrarrestar el estrés oxidativo observado por ejemplo en COPD. En esta enfermedad, podría usarse A1M como adición al líquido de lavado pulmonar o como aerosoles inhalados. El efecto de A1M en esta aplicación sería eliminar radicales y reducir/ reparar modificaciones oxidativas en el tejido pulmonar. El tratamiento puede ser de tipo de dosis única o de múltiples dosis y local y el efecto pro e interactivo.

10 *B) Enfermedades relacionadas con isquemia y reperfusión*

15 *Aterosclerosis.* Tal como se describió anteriormente, está bien establecido que los oxidantes y el estrés oxidativo son fundamentales en el desarrollo de aterosclerosis, y que la oxidación de LDL es un producto intermedio común que conduce a placas ateroscleróticas. Aunque la mayoría de los estudios de antioxidantes no han podido mostrar los efectos protectores frente a la enfermedad, se considera A1M como posible agente terapéutico por varios motivos: 1) tiene un amplio arsenal de antioxidante: reducción enzimática y no enzimática de oxidantes y eliminación de radicales; 2) tiene una capacidad de reparación de la oxidación de posible importancia para lesiones ateroscleróticas; 3) A1M puede inhibir la oxidación de LDL por hemo y ROS (no mostrado); 4) A1M puede reducir la modificación oxidativa inducida por hemo y ROS de LDL (no mostrado); 5) A1M está presente en partículas de LDL endógenas (no mostrado), lo que sugiere que tiene un papel como antioxidante en LDL ya que la aterosclerosis es un resultado de oxidación patológica en exceso de la capacidad de A1M; 6) A1M participa en la desactivación de MPO (no mostrado). La aplicación de A1M para la prevención y/o el tratamiento de aterosclerosis puede ser

continua y global, usando por ejemplo infusión venosa o trasplante de un vector celular con alta capacidad de producción de A1M. Alternativamente, el tratamiento puede ser de tipo de dosis única y local, por ejemplo mediante infusión directa en una arteria coronaria cardiaca. El tratamiento puede ser pro o interactivo, inhibiendo la oxidación de LDL y formación de aterosclerosis, o retirada/reparación terapéutica de placas ateroscleróticas.

El accidente cerebrovascular y el infarto de miocardio son indicaciones en las que puede usarse A1M para inhibir el estrés oxidativo y reparar lesiones inducidas por los acontecimientos de isquemia-reperfusión. Puede añadirse A1M de manera sistémica o de manera local. El tratamiento puede ser de tipo de dosis única, múltiples dosis o continuo y el efecto post-activo. En el caso de infarto de miocardio, el tratamiento con A1M podría combinarse con un procedimiento invasivo quirúrgico asociado con distensión arterial, etc.

Artritis. En estos estados inflamatorios, el tratamiento de A1M es favorable debido a la limitación natural del/de los sitio(s) de la enfermedad. Desde el punto de vista mecanístico, las propiedades antiinflamatorias, de reparación y de promoción de ECM serían especialmente valiosas en el tratamiento. El tratamiento puede ser de tipo de dosis única, de múltiples dosis o continuo y el efecto post-activo.

Diálisis. Puede prevenirse el estrés oxidativo inducido como resultado de diálisis mediante tratamiento con A1M y se repara el daño oxidativo inducido por diálisis mediante A1M. Existen dos tipos principales de diálisis clínica: hemodiálisis y diálisis peritoneal. En la hemodiálisis, la sangre del paciente se hace circular de manera extracorpórea a través de un aparato de diálisis en el que se equilibra con un líquido de diálisis sobre una membrana semipermeable. Puede añadirse A1M al líquido de diálisis de manera que no se permite que entre en la sangre. La A1M reducirá y se unirá a oxidantes/radicales, y por tanto funciona como “sumidero de radicales” o de oxidantes que atrapa y elimina los radicales y oxidantes, aumentando diez veces la tasa de eliminación de radicales. Alternativamente, puede hacerse pasar la sangre a través de una columna de A1M insolubilizada, dispuesta en línea con el aparato de diálisis. En la diálisis peritoneal, se inyecta el líquido de diálisis en la cavidad peritoneal del paciente (que rodea los intestinos), y se deja allí durante un periodo de tiempo. El peritoneo actúa como membrana de diálisis permitiendo que se equilibren pequeñas moléculas (agua, sales, solutos orgánicos pequeños incluyendo radicales). Entonces se drena y se desecha el líquido de diálisis. También en este caso, puede añadirse A1M al líquido de diálisis de manera que no se permite que entre en la sangre y A1M funcionará como “sumidero” de oxidantes o radicales. Por tanto, el modo de aplicación de A1M es de dosis única (aunque repetida para cada ronda de diálisis), local y proactiva.

Trasplante de órganos. Puesto que se conoce que el daño oxidativo de células y órganos es un factor limitante entre otros en el campo del trasplante, se propone añadir A1M a disoluciones de enjuagado y medios de almacenamiento en frío para aumentar la viabilidad y el tiempo de transporte de tales células y órganos. Esto incluiría todos los órganos que se usan de manera rutinaria para trasplante (por ejemplo, corazón, pulmón, hígado, intestinos, páncreas, riñón, piel, hueso, retinas) y también células (por ejemplo, islotes de células pancreáticas, células madre mesenquimatosas, células madre hematopoyéticas, células dendríticas y leucocitos para las infusiones de linfocitos de donante para tratar la enfermedad de injerto contra huésped).

C) Estrés oxidativo como resultado de hemoglobina libre, hemo e iones de hierro

Enfermedades hemolíticas. Tal como se describió anteriormente hay múltiples enfermedades diferentes caracterizadas por lisis incontrolada de glóbulos rojos, de manera intravascular o extravascular. Especialmente aquellas que implican hemólisis intravascular serían una diana interesante para la terapia con A1M porque el problema incluye hemoglobina libre y hemo en plasma. Estas enfermedades incluyen anemia hemolítica autoinmunitaria del tipo mediada por IgM fría, hemoglobinuria paroxística nocturna y hemoglobinuria paroxística por frío. Se prevé que el tratamiento sea mediante administración intravenosa única o múltiple (posiblemente continua) de A1M de modo terapéutico. Estos pacientes a menudo no tienen niveles de haptoglobina restantes y, por tanto, no tienen defensa de amortiguación para unir la hemoglobina libre.

Al mismo tiempo, se sabe que los pacientes con hemólisis extravascular, por ejemplo incluyendo los diagnósticos anemia hemolítica autoinmunitaria del tipo mediada por IgC caliente y anemia hemolítica inducida por fármacos, tienen afectación de sus funciones renales. Es probable que también padezcan un aumento del estrés oxidativo basado en las grandes cantidades de hemoglobina y hemo que tienen que procesar cuando su sistema reticuloendotelial, incluyendo macrófagos en el bazo, fagocitan miles de millones de glóbulos rojos extra en comparación con el estado estacionario. Es posible que también estos pacientes podrían beneficiarse de la terapia antioxidante mediante A1M.

Transfusión de sangre. Los datos preliminares muestran que A1M previene la hemólisis (figura 9) y protege los glóbulos rojos frente a hemoglobina/hemo libre ya formado *in vitro*. Al mismo tiempo, las disoluciones de almacenamiento actuales para glóbulos rojos para transfusión no tienen en cuenta el problema del daño oxidativo durante el almacenamiento. Por tanto, se han realizado experimentos en los que se añadió A1M a tubos de sangre o incluso al medio de almacenamiento de unidades de sangre completa (no mostrado).

Mejora de la calidad de unidades de glóbulos rojos: Como medida preventiva para aumentar la calidad de glóbulos rojos para transfusión, se propone por tanto añadir A1M antes y/o después del almacenamiento, dependiendo de qué clase de hemoderivado sea. Esto sería un esquema de dosis única, proactivo para cada unidad de sangre. De manera óptima, se añadiría A1M al medio de almacenamiento aunque actualmente esto es difícil debido a los procedimientos de calentamiento que se usan para esterilizarla. Por tanto, podría añadirse A1M por separado 1) antes de que se inicie el periodo de almacenamiento (profiláctico); 2) como agente de rejuvenecimiento tras haber pasado un determinado periodo de tiempo (interactivo); o 3) antes de enviar la unidad de sangre a la sala (enfoque "terapéutico"/ "de limpieza"). El propósito sería poder suministrar a los pacientes un hemoderivado mejor mediante la adición de dosis adecuadas de una proteína endógena, no inmunógena. Sería especialmente atractivo en la situación de irradiación gamma de sangre puesto que esas unidades tienden dañarse más que la sangre común para transfusión.

La terapia en el caso de una reacción transfusional hemolítica retardada o aguda: Aún otra aplicación de A1M en relación con la transfusión de diferentes hemoderivados (glóbulos rojos, plaquetas y plasma) es tratar pacientes que han experimentado una reacción transfusional hemolítica tras la administración de una o más unidad(es) incompatible(s). Actualmente, no hay ningún tratamiento específico para evitar los efectos tóxicos de la hemoglobina libre que resulta de la lisis mediada por anticuerpos de glóbulos rojos. Todas las terapias disponibles son inespecíficas, amplias y no muy satisfactorias debido al hecho de que no se dirigen a los problemas, la hemoglobina libre y el hemo en plasma así como el estrés oxidativo general que crean. En cambio, los enfoques farmacéuticos tradicionales han sido contrarrestar los efectos biológicos de estas sustancias. Se propone usar A1M como una adición a esteroides, adrenalina y otros agentes en el arsenal terapéutico actual.

La lisis puede ser de uno de dos tipos: 1) activa, lo que significa que se transfunden glóbulos rojos de donante incompatibles, se recubren con los anticuerpos de los receptores y se lisan, de manera o bien intravascular o bien extravascular; y 2) pasiva, que se producen cuando se lisan los propios glóbulos rojos del paciente debido a la administración de plasma incompatible que contiene anticuerpo anti-A o anti-B que se producen de manera natural. Este escenario es menos peligroso que 1) pero puede producirse tras la transfusión tanto de unidades de plasma como de plaquetas. Aunque se supone que el plasma siempre se administra de manera compatible, pueden producirse errores en ese caso así como en 1). Sin embargo, para las plaquetas es común administrar plaquetas de tipo O a pacientes de todos los grupos sanguíneos lo que significa que pueden transferirse anticuerpo anti-A o anti-B en alto título al paciente y provocar hemólisis incluso si esto no se debe a un error.

Tratamiento con sustitutos de la sangre. Puede administrarse A1M como adición al propio HBOC, o bien en forma libre o bien como proteína de fusión con el HBOC para disminuir adicionalmente cualquier posible efecto adverso de la hemoglobina extracelular.

Por tanto, se ha propuesto proporcionar A1M a pacientes como medio de hacer frente a las consecuencias negativas y al estrés oxidativo inducido por hemoglobina libre y hemo. Un método preferible es la administración intravenosa de proteína tan pronto como sea posible tras el incidente (cuando se constate el error, o si el paciente comienza a miccionar orina de color rojo o se queja de síntomas como dolor de espalda, fiebre, sudoración y náuseas). Esto sería una aplicación terapéutica de dosis única o múltiples dosis. Todavía tendrían que probarse otros tratamientos no específicos como esteroides, adrenalina y diuresis forzada.

Puede aplicarse A1M en terapia para prevenir el estrés oxidativo debido a sobrecarga de hierro tras la transfusión o en el caso de hemocromatosis, enfermedad de Wilson (sobrecarga de iones de cobre) y otras enfermedades similares en las que se acumulan iones metálicos en el cuerpo del paciente. En los pacientes transfundidos de manera crónica u otros estados en los que se acumulan iones metálicos, se propone complementar la terapia de quelación (mediante la que se unen iones divalentes por una sustancia infundida) con infusiones de A1M para disminuir el estrés oxidativo que se ha documentado en estos pacientes.

D) Estrés oxidativo como resultado de factores derivados de alimentos y ambientales

Radioterapia contra el cáncer dirigida. El cáncer puede tratarse con irradiación, cuyo propósito es destruir las células tumorales. Puede dirigirse la irradiación, es decir enfocarse más o menos en los tumores. Por supuesto, un problema de esto es que también se afecta el tejido sano. Por este motivo, ha de mantenerse la dosis baja, limitando el efecto de la radioterapia. En este caso, puede usarse A1M para prevenir la destrucción de células y componentes tisulares vecinos, permitiendo que se use una dosis de irradiación mucho mayor. Esta aplicación de A1M es de dosis única, local y proactiva.

E) Trastornos de la piel relacionados con estrés oxidativo

Irradiación con UV. Puede usarse A1M para prevenir el daño del tejido inducido por irradiación con UV. Puesto que partes del daño están mediadas por estrés oxidativo, la combinación de las propiedades antioxidantes, de eliminación de radicales, de reparación de la oxidación y de "sumidero de radicales" de A1M hace que la proteína sea un agente único y potente para minimizar el daño del tejido durante la irradiación con luz UV. Por ejemplo, puede emplearse A1M como sustancia de "pantalla solar" de la piel para proteger frente a efectos agudos de la luz

UV así como efectos a largo plazo tales como el desarrollo de cáncer de piel. Puede añadirse A1M a agentes de protección de la piel existentes tales como óxido de zinc. La aplicación de A1M es de dosis única, local y proactiva.

5 *Modificación de la piel relacionada con la edad.* Varias propiedades de A1M, tal como se describió anteriormente, sugieren que puede promover la reparación de los componentes extracelulares colágeno y ECM, incluyendo modificaciones oxidativas inducidas por la edad (pigmentación, carbonilación, hidroxilación, reticulación, etc.). Puede añadirse la proteína a la piel por lo demás sana en varios sitios de inyección o como aplicación local sobre la piel intacta. La aplicación de A1M puede repetirse en dosis únicas locales.

10 *Dermatitis atópica y psoriasis.* Puede usarse A1M para inhibir el estrés oxidativo asociado con la inflamación en la piel en estos estados. Esto incluye protección de las células y reparación de las células, colágeno y ECM. La aplicación de A1M puede repetirse en dosis únicas locales.

15 *Heridas crónicas en las piernas.* Las heridas crónicas, la mayoría de las cuales se localizan en las piernas, representan un importante problema para la salud y una carga creciente, sustancial para los profesionales sanitarios y sus financiadores. Se encuentra A1M en heridas crónicas en las piernas al unirse activamente a hemo y se localiza conjuntamente con hemo principalmente alrededor de los vasos sanguíneos. También se observa una producción continua de t-A1M en el líquido de úlcera. Esto sugiere que A1M es un mecanismo de defensa activado en la cicatrización de heridas endógena. La hemoglobina, el hemo y hierro excesivos, no unidos o eliminados por A1M, pueden ser un importante componente de la inflamación crónica mediante inducción de ROS. Por tanto, se propone el tratamiento de las heridas crónicas con A1M para proporcionar un enfoque para una cicatrización de úlceras más rápida y más eficaz que los tratamientos disponibles actualmente. La combinación de las propiedades antioxidantes, de eliminación de radicales, de reparación de la oxidación y de "sumidero de radicales" de A1M hace que la proteína sea un agente único y potente para el tratamiento de heridas crónicas en las piernas. La aplicación de A1M puede consistir en varias dosis únicas, si se aplica de manera local en la herida, o incluso proporcionarse como una parte intrínseca del vendaje como agente terapéutico.

20 *Cicatrización de heridas agudas mejorada incluyendo cicatrización de heridas quirúrgicas.* Las propiedades de promoción de ECM (molecular y genética) así como los efectos antiinflamatorios y de reparación de A1M sugieren que puede usarse la proteína en la cicatrización de heridas, por ejemplo de manera posoperatoria. Además, puede reducir los efectos negativos de la sangre que queda tras la operación y también evitar la infección mediante unión a hierro libre etc.

35 *F) Estrés oxidativo y reproducción*

A través de una administración de A1M de modo cíclico, o bien de manera sistémica o bien como supositorios vaginales, pudo tratarse la dismenorrea. La esterilidad es un problema común que podría ser una indicación importante para el tratamiento con A1M. Esto podría realizarse de modo cíclico como ayuda en embarazos asistidos, es decir IVF, transferencia de embriones, inseminación, ICSI etc.

40 Los partos prematuros pueden ser una indicación importante para el uso de A1M. De nuevo, la administración de manera sistémica o como supositorios vaginales puede ser un modo eficaz de detener el estrés oxidativo que desencadena la dilatación del cuello uterino y las contracciones prematuras.

45 *G) Estrés oxidativo en la medicina neonatal*

50 Todos los componentes de la maquinaria del estrés oxidativo (figura 5), están representadas en la fisiopatología de la mayor parte de las complicaciones neonatales. Podría usarse A1M en las máscaras respiratorias para proteger los pulmones inmaduros y en las fórmulas de sustitución de la leche para proteger el intestino.

55 Las hemorragias cerebrales incluyendo hemorragia intraventricular (IVH) son indicaciones para el tratamiento con A1M. En primer lugar, los efectos antihemolíticos descritos anteriormente (figura 9) conducirán a una disminución de las concentraciones de hemoglobina libre tras los incidentes de sangrado. En segundo lugar, las propiedades de reducción, eliminación y reparación de A1M lograrán un efecto de protección y eliminación inmediato frente al daño de células y tejidos inducido por hemoglobina, hemo y ROS. Puede inyectarse A1M directamente en los ventrículos cuando se obtengan indicaciones de sangrado mediante ecografía de rutina de recién nacido prematuro en la zona de riesgo.

60 La enfermedad hemolítica del feto/recién nacido siempre está mediada por inmunoglobulina G (IgG), puesto que las moléculas de IgM no atraviesan la placenta de la madre al feto sino que sólo lo hace la IgG. Por tanto esta situación es similar a las anemias hemolíticas autoinmunitarias calientes comentadas en el párrafo anterior. Se propone que puede usarse el tratamiento con A1M para ayudar al feto sensible a hacer frente al alto nivel de estrés oxidativo provocado por los aloanticuerpos maternos (a menudo anticuerpos anti-Rh) que destruyen los glóbulos rojos fetales y que liberan su contenido en hemoglobina. Este tratamiento podría ser prenatal (mediante infusión tras cordocentesis) o posnatal como infusión continua o junto con el intercambio sanguíneo durante el cual se transfunde

sangre del grupo O RhD neg. junto con plasma AB RhD neg. A este último podrían añadirse cantidades conocidas con altos niveles de A1M para ayudar a reducir el nivel de estrés oxidativo en estos bebés.

Modelos *in vitro* para investigar el efecto de A1M

5 *Modelo de perfusión placentaria*

Actualmente, no hay modelos animales adecuados para PE (preeclampsia). Con el fin de estudiar los efectos de la hemoglobina libre, se usa el modelo de perfusión placentaria doble. La perfusión placentaria doble es un modelo bien establecido para estudiar el flujo sanguíneo placentario *in vitro* (figura 18). Recientemente, se usó el modelo para imitar a PE induciendo la formación de ROS con xantina y xantina oxidasa. Datos muy recientes de este estudio indican que la placenta, perfundida con xantina tiene un perfil génico similar a las placentas con PE, lo que indica que el modelo es adecuado para estudiar PE *in vitro*. Además, se han obtenido perfiles de placentas que se han perfundido con medios que contienen glóbulos rojos completos. Debido a hemólisis de los glóbulos rojos, el nivel de hemoglobina libre aumentó durante la perfusión provocando daño oxidativo, reflejado por la regulación por incremento de la expresión génica de hemo oxigenasa y superóxido dismutasa. En un experimento reciente, se tenía como objetivo imitar la situación observada en PE, mediante perfusión del circuito fetal con hemoglobina fetal libre (2 y 4 µg/ml). De manera interesante, la presión de perfusión (tensión arterial), aumentó de manera dependiente de la dosis y se escapó gradualmente hemoglobina a la circulación materna. Se continuará usando el modelo para estudiar la expresión de proteínas y genes específicos tras perfusión con hemoglobina y evaluar el papel protector de A1M (figura 15).

Modelos *in vivo* para investigar el efecto de A1M

25 Se usará un modelo de oveja para imitar a PE mediante infusión de hemoglobina libre en ovejas preñadas. En un estudio piloto, se infundió a ovejas preñadas hemoglobina libre, provocando una tendencia para un aumento en la tensión arterial. Se continuará usando el modelo para estudiar la perfusión con hemoglobina y evaluar el papel protector de A1M.

30 Se usará el modelo de lechón para la evaluación del tratamiento de IVH con A1M. El lechón es un animal ideal para el estudio del cerebro neonatal humano. En cerebro tanto de ser humano como de lechón, la velocidad de crecimiento es mayor desde unas pocas semanas antes del nacimiento hasta unas pocas semanas después del nacimiento. Por tanto, el lechón replica el estado vulnerable del ser humano durante el periodo de crecimiento del cerebro.

Ejemplos:

Propiedades antioxidantes de la alfa-1-microglobulina

40 El papel fisiológico de la A1M es proteger células y tejidos frente al daño inducido por ROS y hemo-hemoglobina (figura 4). A continuación se presenta una descripción de resultados que soportan este concepto.

1. Reducción. A1M tiene propiedades deshidrogenasa y reductasa enzimáticas con un amplio espectro de sustratos orgánicos e inorgánicos. La proteína reduce las proteínas de hemo, hierro libre y el compuesto sintético azul de nitrotetrazolio (NBT), usando los donadores de electrones biológicos ascorbato y NADH/NADPH como cofactores (9). El grupo tiol de Cys34 y los tres residuos lisilo de K92, K118 y K130 se encuentran en el sitio activo (9). A1M también reduce rápidamente el radical sintético ABTS (10). A1M, añadida al medio de cultivo de células, reduce el citosol celular y grupos tiol en la proteína citosólica (no mostrado). A1M también reduce los productos de oxidación formados en colágeno, lipoproteínas y membranas de eritrocitos mediante hemo, hemoglobina, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo.

Ejemplo 1.A

55 Para medir la oxidación intracelular en células, se añadió la sonda sensible a redox H₂DCFDA a 0,5 - 1,0x10⁶ células K562 /ml en medio libre de suero hasta una concentración final de 3 µM. Tras 30 min, se lavaron las células dos veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS, fosfato de Na 10 mM pH 7,4, NaCl 125 mM) y se suspendió en medio reciente. Se añadió hemo, peróxido de hidrógeno, ascorbato, A1M o AGP tal como se indica en las leyendas de figura para la figura 10 y se incubaron las células durante diversos tiempos. Tras la incubación se cuantificó la intensidad de fluorescencia de la suspensión usando citometría de flujo (BD FACS Aria™, BD Biosciences, Palo Alto, CA, EE.UU.). Se realizó el análisis con 10000 células usando un láser de estado sólido Coherent® Sapphire™ (excitación: 488 nm, emisión: filtro de paso de banda 530/30 nm).

65 Se cultivaron células K562 con diferentes concentraciones de hemo (5-20 µM) durante 2 h, y se evaluó la generación de ROS midiendo la cantidad de H₂DCFDA citosólica oxidada (figura 10A). Se observó un ligero pero significativo aumento de la intensidad de fluorescencia relativa con hemo 5 µM, y se observó un claro aumento con 10 y 20 µM.

Se estudió la dependencia del tiempo de la oxidación del citosol usando hemo 10 μM (figura 10B). La adición de hemo indujo un rápido aumento en la intensidad de fluorescencia relativa, que se mantuvo durante todo el periodo de incubación. A partir de los experimentos de dosis y tiempo se eligió hemo 10 μM durante 2 h para experimentos de oxidación adicionales. Se examinaron los efectos de A1M añadiendo A1M 2, 5 ó 10 μM a las células K562, antes de la adición de hemo (figura 10C). Entonces se añadió hemo diez micromolar y se incubaron las células durante 2 h. Se observó una reducción dependiente de la dosis en la fluorescencia relativa en hasta aproximadamente el 90% cuando se añadió A1M. En experimentos de control no se observó inhibición de la fluorescencia con la lipocalina AGP en las mismas concentraciones que A1M, y el ascorbato 10 μM redujo la fluorescencia en aproximadamente el 50% (figura 10C).

Los resultados demuestran que A1M inhibe la oxidación de citosol mediante hemo. También se investigó el efecto de reparación de A1M, es decir si A1M podía reducir el citosol en células que se habían incubado previamente con hemo (figura 10D). Se incubaron las células con hemo 10 μM durante 30 min y se retiró mediante lavado todo el hemo no unido. Se añadió A1M (2, 5 ó 10 μM) y se incubaron las células durante 2 h. Los resultados revelaron que A1M pudo reducir significativamente la oxidación de citosol de una manera dependiente de la dosis. Para someter a prueba si A1M podía reducir el citosol de las células no estimuladas "en reposo", se incubaron con A1M (10 μM) durante un periodo de 2 h (figura 10E). La adición de A1M a las células dio como resultado una clara reducción en la intensidad de fluorescencia en comparación con las células sin A1M. Hemo, por otro lado, aumentó la fluorescencia tal como se esperaba. No se observó la reducción de la oxidación del fondo no específica observada con A1M cuando se añadió la proteína de control, AGP.

Se investigó si los efectos antioxidantes de A1M se limitaban a células oxidadas con hemo, o también podían dirigirse contra otros oxidantes. Se usó H_2O_2 (50-250 μM) para inducir la oxidación durante un periodo de 0-20 h (figura 11A). H_2O_2 indujo niveles elevados de H_2DCFDA hasta un pico a las 6 h después de lo cual los niveles disminuyeron. La incubación simultánea de células con A1M (10 ó 20 μM) y H_2O_2 50 μM durante 6 h mostró una reducción dependiente de la dosis en la fluorescencia inducida por H_2O_2 , demostrando los efectos de inhibición de A1M (figura 11 B).

Ejemplo 1.B

Para medir la posible reducción de A1M sobre grupos tiol, se llevaron a cabo experimentos con proteínas con tiol oxidado.

Se realizó el marcaje fluorescente de proteínas con tiol oxidado lavando y suspendiendo células K564 en PBS a $0,5 - 1,0 \times 10^6$ células/ml y se incubaron con hemo, $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$, peróxido de hidrógeno, ascorbato o A1M tal como se indica en las leyendas de figura. Entonces se monitorizaron las proteínas con tiol oxidado de manera reversible tal como se describe en la bibliografía. En resumen, se bloquearon los tioles de las proteínas en su estado reducido resuspendiendo en un tampón que contenía NEM (N-etilmaleimida) 100 mM e incubando a temperatura ambiente durante 15 min. Tras el lisado de las células, se retiró la NEM en exceso mediante desalación a través de una columna de cromatografía Micro Bio-Spin® 6 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Entonces se redujeron los tioles oxidados con DTT (ditiotreitól) 1 mM y se marcaron los tioles de las proteínas libres resultantes añadiendo 5-IAF 200 μM . Se retiró el 5-IAF en exceso desalando a través de una columna de cromatografía Micro Bio-Spin® 6 y se hicieron pasar muestras que contenían 60 μg de proteína en un SDS-PAGE al 10%. Se llevó a cabo la electroforesis en gel tal como se describe en Laemmli [25] en la oscuridad, con una tensión constante de 200 V. Tras completar la electroforesis, se examinaron los geles usando un sistema Molecular Imager® FX (Bio-Rad, excitación: 488 nm, emisión: 530 nm). Se cuantificaron las proteínas con tiol oxidado midiendo la densidad de píxeles de bandas relevantes, usando el programa Adobe Photoshop CS3.

Tal como se describió anteriormente, se midieron los efectos antioxidantes de A1M sobre la oxidación de tiol de proteínas intracelulares. Se añadió A1M dos, cinco y diez micromolar antes de la adición de hemo 10 μM a células K562 y entonces se incubaron durante 6 h. Se separaron proteínas intracelulares marcadas con la sonda fluorescente específica de disulfuro 5-IAF mediante SDS-PAGE. Se visualizaron los tioles oxidados mediante fluorimetría (figuras 11C y 11D) y se cuantificaron las bandas más intensas midiendo la densidad de píxeles (figuras 11E y 11F).

Hemo indujo un aumento en la oxidación de tiol de proteína (figura 11C,E) y se inhibió la intensidad de marcador de tiol de las cuatro bandas más intensas (que migran como 50, 55, 60 y 66 kDa; marcado por flechas) mediante A1M de una manera dependiente de la dosis hasta el nivel de células en reposo. Por tanto A1M muestra fuertes propiedades de reducción sobre los grupos tiol oxidados. Las bandas débilmente teñidas mostraron menos regulación por incremento mediante hemo y menos inhibición mediante A1M (no mostrado), quizás debido a la unión no específica de la sonda. Además, A1M también inhibió tioles de proteína no inducidos por hemo: se usó una mezcla de Fe^{3+} , ascorbato y peróxido de hidrógeno (10 μM , 100 μM y 20 μM , respectivamente) para generar radicales hidroxilo mediante la reacción de Fenton. La mezcla dio como resultado un aumento en el nivel de tioles de proteína oxidados (figura 11D,F) y la intensidad del marcador de tiol de las cinco bandas más intensas (que migran como 50, 60, 66, 80 y 120 kDa; marcado por flechas) disminuyó mediante la adición de A1M.

2. Eliminación de radicales. A1M puede reaccionar con pequeños radicales orgánicos usando una combinación de actividad reductasa enzimática (véase anteriormente) y unión covalente a cadenas laterales de aminoácidos ("atrapamiento"). Hemo, quinurenina y el radical tirosilo son ejemplos fisiológicos de radicales eliminados por A1M (6-8,10). Por tanto, los cromóforos de A1M pueden ser productos de degradación hemo y quinurenina, y quizás también otros productos similares. La unión a, y degradación de, hemo se potencian mucho mediante escisión proteolítica de A1M, una reacción que se induce mediante hemoglobina y da como resultado la eliminación de los cuatro aminoácidos C-terminales de A1M, leucina-isoleucina-prolina-arginina (7). La forma más corta (truncada), que por tanto tiene propiedades de degradación de hemo potenciadas, se denomina t-A1M. La antioxidación mediante la eliminación de hemo probablemente no se limita a hemoglobina. Una reacción entre MPO y A1M da como resultado la formación de t-A1M y la transferencia del grupo hemo desde MPO hasta A1M (no mostrado). Por tanto, A1M puede funcionar como inhibidor de los efectos dañinos del estallido oxidativo de granulocitos neutrófilos (véase anteriormente) sobre componentes tisulares vecinos.

15 Ejemplo 2.A

Ensayo de ABTS: Se analizó la actividad reductasa de A1M mediante reacción con el radical ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (radical ABTS) tal como se describió anteriormente. En resumen, se preparó el radical ABTS mediante oxidación de ABTS 7 mM con disulfito de potasio 2,45 mM en agua durante al menos 5 h en la oscuridad, y usando la disolución del radical ABTS resultante en el plazo de 24 h. Se incubó hemo (50 μ M) con 0,5 - 1,0x10⁶ células K562, se lavaron las células y entonces se incubaron 2 h con A1M 10 μ M tal como se indica en las leyendas de figura. Entonces se añadieron alícuotas de sobrenadante (> 5 μ l) a una disolución 35 μ M de radical ABTS en fosfato de Na 25 mM, pH 8, proporcionando una concentración final de A1M 3 μ M. Se leyó la absorbancia del radical ABTS cada 10 s a 735 nm, durante un total de 3 min (figura 12B). Se estimó la velocidad de reducción del radical ABTS mediante regresión lineal de los primeros cinco puntos, es decir 40 s de la reacción, incluyendo el punto de tiempo cero.

Se realizó un examen de absorbancia de células K562 solubilizadas lavando y suspendiendo las células en PBS a 0,5 - 1,0x10⁶ células/ml y se incubaron con hemo o proteínas en diversas etapas tal como se indica en las leyendas de figura. Tras la incubación, se guardó el medio y se lavaron las células y se solubilizaron con tampón que contenía Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 2 mM; NP-40 al 1%; pepstatina 1 μ g/ μ l; antipaína 5 μ g/ μ l; leupeptina 10 μ g/ μ l. Entonces se analizaron tanto las células solubilizadas como el medio visualmente y mediante espectrofotometría leyendo los espectros de absorbancia (300-700 nm).

Cromatografía en gel: Se lavaron células K562, y se incubaron (0,5 - 1,0x10⁶ células/ml) con tampón o hemo 50 μ M, entonces se lavaron y se incubaron 2 h con tampón o A1M 10 μ M tal como se indica en las leyendas de figura. Tras la incubación, se separaron las células y el medio de cultivo mediante centrifugación y se analizó el medio de cultivo mediante cromatografía en gel tal como se comenta en párrafos posteriores a continuación. Se realizó esto en una columna Superose 12 HR 10/30 de 25 ml (GE Healthcare) usando un aparato de cromatografía de líquidos de rápida resolución (FPCL) (Bio-Rad) equipado con un bucle de inyección de muestra de 0,5 ml, monitorizando el eluato a 280 y 405 nm y recogiendo fracciones de 0,5 ml. Se equilibró la columna y se eluyó con Tris-HCl 20 mM, pH 8,5; NaCl 0,1 M; NaN₃ al 0,02%.

Se mostró recientemente que A1M puede reducir el radical ABTS, un radical orgánico estable, de manera semi-catalítica, conduciendo a formación de ABTS reducido libre, y unión covalente a grupos laterales de la proteína [10]. Se investigó esta propiedad de la proteína tras la incubación con células y/o hemo. Se observó la desaparición del radical ABTS (abs. 735 nm) con A1M sola, o A1M incubada con hemo o hemo más células (figura 12B). La velocidad de reducción (reacción) aumentó ligera pero significativamente cuando se incubó A1M con células cargadas con hemo o con hemo 10 μ M (P < 0,05) (figura 12C). Se observó actividad de fondo, es decir una desaparición muy lenta del radical ABTS, con los controles.

La mayor parte del hemo (abs. 405 nm) eluyó conjuntamente con la proteína (abs. 280 nm), lo que sugiere que se une a A1M. Además, se observaron cantidades aumentadas de agregados diméricos y de orden mayor de A1M tras la unión a hemo, en comparación con A1M incubada con células pero sin hemo (figura 12A).

Para estudiar el mecanismo de eliminación de radicales, se caracterizó en detalle la reacción entre A1M y el radical ABTS libre modelo, sintético. Se mostró que A1M reducía 5-6 moléculas del radical ABTS en una reacción semi-catalítica rápida, y atrapó de manera covalente 3 radicales ABTS adicionales mediante unión en las cadenas laterales de tirosilo en una forma oxidada, modificada, proporcionando a la proteína un color púrpura (10). Se identificaron dos de los residuos Tyr modificados (Y22, Y132) y se localizaron en la molécula de A1M mediante espectrometría de masas (figura 6).

Es importante en este contexto que la A1M, tras unirse a una carga máxima de radicales, no presenta ningún estrés oxidativo frente a componentes tisulares, es decir tanto los radicales como la propia proteína A1M son

electroneutros. En otras palabras, ROS, radicales y otros oxidantes se eliminan completamente mediante A1M, de ahí la metáfora “sumidero de radicales”.

Ejemplo 2.B

Se estudiaron adicionalmente mecanismos de eliminación de hemo de A1M analizando las interacciones entre la proteína y el hemo unido a células. Se incubaron las células con hemo 10 μM durante 30 min, se eliminó mediante lavado el hemo en exceso y se añadió A1M o la proteína de control AGP a una concentración de 2 ó 10 μM y se incubaron durante 2 h. Se guardaron los medios de cultivo, se lavaron las células y se solubilizaron, y se analizaron tanto los medios como las células solubilizadas mediante espectrofotometría (figura 7A) y visualmente (figura 7B). Se observó el hemo incorporado a las células como una coloración marrón intensa de las células; se detectó el espectro de absorbancia típico con un pico no diferenciado alrededor de 400 nm. Cuando se añadió A1M, se retiró casi completamente el hemo de las células y en su lugar se encontró en el medio. La proteína de control AGP a las mismas concentraciones molares tuvo mucho menos efecto sobre el hemo unido a las células (figura 7B).

3. Inhibición del daño oxidativo del tejido biológico

Ejemplo 3.A

También se mostró que A1M inhibía la propagación de muerte celular inducida por irradiación con partículas cargadas de monocapas de células HepG2. Se irradiaron las células con una dosis baja de partículas alfa a un área de aproximadamente 50 μm^2 . Se destruyeron las células directamente afectadas y las células periféricas al área de irradiación, no afectadas directamente por las partículas (=células vecinas), mostraron una necrosis de acumulación retardada y lenta hasta 5 días tras la irradiación. Además, se observó un aumento significativo en la apoptosis, grupos carbonilo de proteína, y expresión de genes de respuesta al estrés hemo oxigenasa-1, en la población de células completas (figura 8 A-C). La adición de A1M redujo la cantidad de células muertas en aproximadamente el 50% en células irradiadas y el 100% en células testigo, e inhibió completamente la apoptosis inducida por irradiación, formación de grupos carbonilo y regulación por incremento de hemo oxigenasa-1 (figura 8 A-C). La irradiación indujo una regulación por incremento de síntesis endógena y secreción de A1M y un aumento en la captación de A1M a partir del medio. Un posible mecanismo para la destrucción de células vecinas es mediante producción de ROS y oxidante, y un posible mecanismo para la inhibición por A1M es mediante la antioxidación y eliminación de radicales.

Ejemplo 3.B

A1M inhibió la oxidación de lipoproteína de baja densidad (LDL) mediante hemo, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo, la oxidación de membranas de eritrocitos mediante radicales hidroxilo, y la oxidación de monómeros de colágeno mediante hemo y peróxido de hidrógeno (no mostrado). La modificación oxidativa de colágeno y lipoproteínas de baja densidad (LDL) está implicada en la patogénesis de artritis, diabetes y enfermedades cardiovasculares. El colágeno es especialmente sensible al estrés oxidativo debido a que las moléculas tienen una tasa de recambio muy lenta, es decir las fibrillas pueden durar toda la vida. Por tanto, la oxidación de colágeno está implicada en la patogénesis de artritis, diabetes y enfermedades cardiovasculares. El colágeno también es un constituyente principal de las membranas basales de los vasos sanguíneos, la barrera de filtración glomerular y la barrera hematoencefálica y por tanto el daño oxidativo del colágeno afecta a la función de estas barreras (véase a continuación).

Para investigar las propiedades protectoras de células de A1M frente al estrés oxidativo exógeno, en líneas celulares humanas, se incubó la línea celular eritroide K562 en medio de crecimiento libre de suero y se expuso a estrés oxidativo exógeno mediante cultivo de las células con diferentes concentraciones de hemo (5-20 μM) (figura 10A, B). Tal como se muestra en la figura 10C, la adición de A1M al medio de crecimiento presenta un efecto antioxidante dependiente de la dosis inverso en el que el estrés oxidativo disminuye con cantidades crecientes de A1M. Los resultados demuestran que A1M no sólo puede inhibir el estrés oxidativo durante su formación, sino que además (tal como se muestra en la figura 10 D) elimina el estrés oxidativo tras la incubación de las células con estrés oxidativo en medio que contiene hemo.

Para ilustrar la gravedad sobre la viabilidad celular, se sometió a prueba el efecto de hemo y A1M añadiendo hemo 20-500 μM a células K562 durante 4 horas y posteriormente sometiendo a prueba la viabilidad mediante tinción con PI (yoduro de propidio) y análisis de FACS. Para someter a ensayo la viabilidad de las células K562, se lavaron las células y se suspendieron en PBS a 0,5 - 1,0x10⁶ células/ml y se incubaron con hemo, A1M humana y/o AGP tal como se indica en las leyendas de figura. Tras la incubación se añadió el colorante de tinción de núcleo PI hasta una concentración final de 10 μM y se cuantificó la intensidad de fluorescencia de la suspensión usando citometría de flujo (BD FACSAria™, BD Biosciences, Palo Alto, CA, EE.UU.). Se realizó el análisis con 10000 células usando un láser de estado sólido Coherent® Sapphire™ (PE- channel, ajuste del filtro 556 LP y 576/26 BP).

Se observó una clara dependencia de la dosis de la muerte celular (figura 13B) hasta casi el 100% a hemo 500 μ M. No se observó ningún efecto usando cantidades correspondientes del disolvente hemo, DMSO (no mostrado). Se examinó la capacidad de A1M de rescatar células de la muerte añadiendo A1M (2, 5 ó 10 μ M) o AGP (10 μ M) a las células, antes de la adición de hemo 200 μ M e incubando durante 4 h. Pudieron rescatarse aproximadamente el 70% de las células muertas con la adición de A1M a las concentraciones más altas (figura 13C). No se observó ningún efecto significativo con AGP.

Ejemplo 3.C

Para someter a prueba el papel de la A1M intracelular, se adquirieron tres nucleótidos de A1M que seleccionan como diana ARNip de Sigma-Aldrich y se evaluaron para determinar su capacidad de inhibir/silenciar la expresión de A1M en células K562 humanas. Se obtuvieron los mejores resultados, evaluados mediante análisis de PCR en tiempo real de la razón de ARNm de A1M/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3DPH) (véase a continuación), con el par de ARNip de A1M (NM_001633/1): 5'-CCUAUGUGGUCCACACCAA-3' y 5'-UUGGUGUGGACCACAUAGG-3'. Se usaron posteriormente estas especies de ARNip para todos los experimentos. Se realizó la transfección de ARNip según el protocolo de OZ Biosciences (Marsella, Francia). En resumen, se diluyó ARNip en medio de cultivo, que contenía reactivo de transfección de ARNip Lullaby® (OZ Biosciences), hasta una concentración final de 5 nM. Se incubó esta disolución durante 20 min a temperatura ambiente y se añadió a un sedimento de 2×10^6 células gota a gota. Entonces se cultivaron las células en condiciones convencionales. Tras 24 h, se lavaron las células, se cargaron con H₂DCFDA, se oxidaron con hemo y se analizaron con citometría de flujo tal como se describió anteriormente. Alternativamente, se resuspendieron las células en medio libre de suero con o sin hemo, según las leyendas de figura, y se analizaron con PCR en tiempo real.

Se silenció el gen de A1M añadiendo ARNip específico de A1M y se expusieron las células a hemo 20 μ M. Se silenció parcialmente el ARNm de A1M (figura 13E, panel izquierdo), dando como resultado un aumento significativo de oxidantes de citosol tal como se mide por la sonda H₂DCFDA (figura 13E, panel derecho). Además, la A1M añadida al medio de cultivo inhibió la oxidación de citosol y la expresión de hemo oxigenasa-1 mediante hemo, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo (no mostrado).

Ejemplo 3.D

Microscopía de fluorescencia de las células K562, que se lavaron y se suspendieron en PBS a $0,5 - 1,0 \times 10^6$ células/ml y se incubaron con A1M humana tal como se indica en las leyendas de figura. Se lavaron las células, se pusieron en hielo y se resuspendieron en disolución de bloqueo (KCl 5,4 mM; KH₂PO₄ 1,2 mM; MgSO₄ 0,8 mM; D-glucosa 5,6 mM; NaCl 127 mM; Hepes 10 mM; CaCl₂ 1,8 mM; pH 7,3; BSA al 1%; suero de cabra al 5%) durante 15 min. En primer lugar, se llevó a cabo tinción de la superficie celular incubando durante 15 min en hielo con anticuerpos monoclonales de ratón frente a A1M (5 μ g/ml). Esto estuvo seguido por lavado e incubación durante 15 min en hielo con fragmentos F(ab')₂ de IgG de cabra anti-ratón (Alexa Fluor® 594; Invitrogen, Eugene, OR, EE.UU.). Tras el lavado, se realizó la tinción total de las células (superficie celular + citosol) suspendiendo en medio de Na enfriado con hielo, fijación con BD CellFIX al 1% (BD Biosciences, Bélgica) en hielo durante 15 min y a temperatura ambiente durante 45 min, seguido por permeabilización en Tritón-X al 0,02% y bloqueo en BSA al 1%, suero de cabra al 5%, Tween-20 al 0,2%. Entonces se tiñeron las células a 4°C durante la noche con anticuerpos monoclonales de ratón contra A1M a 5 μ g/ml. Posteriormente, se aplicaron fragmentos F(ab')₂ de IgG de de cabra anti-ratón (Alexa Fluor® 488; Invitrogen, Eugene, OR, EE.UU.), durante 1 h a temperatura ambiente. Se montaron las células usando el reactivo ProLong Gold AntiFade con DAPI (Invitrogen). Se realizó inspección visual y registro de imágenes usando un microscopio de fluorescencia invertido Eclipse TE300 de Nikon equipado con una cámara CCD enfriada C4742-95 de Hamamatsu, usando un objetivo Plan APOchromat 100 x.

Puesto que se secreta A1M producida de manera endógena desde las células, tanto esta como la A1M añadida de manera exógena se encuentra en el medio celular, fuera de las células. Tal como se describió anteriormente, usando microscopía de fluorescencia, se ha investigado la localización celular de A1M. Se detectó la mayor parte de la proteína endógena como tinción irregular sobre la superficie de las células, tal como se muestra mediante incubación con anticuerpo anti-A1M antes y después de la permeabilización y fijación. También se observó una tinción débil de compartimientos intracelulares después de la permeabilización. Aproximadamente el 60% de las células eran positivas para la tinción de A1M. Sin embargo, se obtuvo una tinción mucho más intensa después de que se hubieron incubado las células con A1M exógena, y también en este caso se ubicó la mayor parte de la tinción en la superficie celular (aproximadamente el 90% de las células) en un patrón irregular, tal como se muestra mediante incubación con anticuerpo anti-A1M antes y después de la permeabilización y fijación.

Se presenta el análisis estadístico de los resultados de experimentos por triplicado como la media \pm DE. Se realizó un análisis estadístico en el programa informático Origin (Microcal Software, Inc., versión 6), comparando grupos con la prueba de la t de Student.

4. Inhibición de la lisis celular y la reparación celular

Ejemplo 4.A

Se inhibió mediante A1M la muerte celular de células HepG2 irradiadas, tal como se describió anteriormente (ejemplificado en la figura 8A). A1M también inhibió la lisis inducida por hemo de células K562. Por ejemplo, hemo 200 μM destruyó el 50% de las células pero añadiendo A1M 2 μM se redujo el número de células muertas al 15%, es decir en aproximadamente el 70% (ejemplificado en las figuras 13B, C). A1M también puede inhibir la lisis de glóbulos rojos por ROS (peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo). Esto se ejemplifica en la figura 9A. Los radicales hidroxilo, generados por la reacción de Fenton, indujeron la lisis de glóbulos rojos y pudo inhibirse la lisis por A1M.

5. Reparación de la modificación oxidativa

Tal como se mencionó anteriormente, A1M puede reducir las modificaciones oxidativas en células y moléculas después de su formación y retirada (lavado) de los agentes de oxidación. Esto puede ser un resultado de la reducción, eliminación de radicales o ambos. Por ejemplo, hemo libre, que es una molécula hidrófoba que puede atravesar las membranas celulares, se absorbe por células y se encuentra principalmente en el citosol (figuras 7C, D) en el que induce la oxidación. La adición de A1M a células cargadas con hemo retira de manera eficaz el hemo (figuras 7C-D) y la oxidación del citosol (figura 7A).

Ejemplo 5.A

Como otro ejemplo de tal reparación, la A1M invirtió la inhibición de la formación de fibrillas de colágeno (medido mediante EM) inducida por hemo y ROS (figura 14). A1M se une a colágeno (no mostrado) y estos resultados muestran que probablemente está implicado en la protección fisiológica de las fibrillas frente a la oxidación. Estos resultados también sugieren que puede usarse A1M en aplicaciones terapéuticas para restaurar o reparar tejidos dañados por oxidación inducida por hemoglobina o ROS.

6. Regulación por incremento de la expresión génica in vitro e in vivo

Ejemplo 6.A

Para investigar la regulación transcripcional de A1M, se aplicó PCR en tiempo real. Para la PCR en tiempo real, se aisló ARN total de células K562 usando el método de fenol-cloroformo-guanidinio ácido suministrado por QIAGEN Sciences (Maryland, EE.UU.). La razón de DO (densidad óptica a 260 nm/280 nm) de ARN fue siempre mayor de 1,8. Se realizó transcripción inversa con 3 μg de ARN total a 42°C durante 60 min en presencia de 0,5 μg de cebador oligo(dT)₁₈, 200 U de transcriptasa inversa y 20 U de inhibidor de ribonucleasa RiboLock™ en tampón de reacción (kit de síntesis de ADNc de primera hebra negativa H RevertAid™, Fermentas GMBH, St. Leon-Rot, Alemania). Se usó PCR en tiempo real para examinar la expresión del ARNm de A1M y hemo oxigenasa-1 (HO-1) en células K562 expuestas a hemo, peróxido de hidrógeno o una mezcla de (NH₄)Fe(SO₄)₂, peróxido de hidrógeno y ascorbato. Se usó G3DPH humano para normalizar la expresión de A1M y HO-1 que se representan en la figura como $\Delta\Delta\text{Ct}$. Se diseñaron cebadores en consecuencia: A1M, cebador directo 5'-CACTCGTTGGCGGAAAGG-3', cebador inverso 5'-ACTCATCATAGTTGGTGTGGAC-3'; HO-1, cebador directo 5'-CAACAAAGTGCAAGATTCTG-3', cebador inverso 5'-AAAGCC-CTACAGCAACTG-3'; G3DPH, cebador directo 5'-TGGTATCGTGGAAGGACTC-3', cebador inverso 5'-AGTAGAGCGAGGATGATG-3'. Se analizó la expresión usando iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Se realizó amplificación a 55°C durante 40 ciclos en un ciclador térmico iCycler (Bio-Rad) y se analizaron los datos usando el software de sistema óptico iCycler iQ.

El gen de la hemo oxigenasa 1 (HO-1) está regulado por incremento en células K562 como resultado de la exposición a hemo. Se ha analizado el efecto de A1M sobre la expresión de HO-1 inducida por oxidante (figura 13A). Tal como se esperaba, HO-1 estaba regulada por incremento mediante hemo 10 μM , H₂O₂ 50 μM o una mezcla de Fe³⁺ 10 μM , H₂O₂ 20 μM y ascorbato 100 μM , y se revertió la regulación por incremento mediante A1M 10 μM . La expresión del gen de mantenimiento G3DPH no se vio afectada por ninguna de las adiciones.

Se mostró anteriormente que se secretan pequeñas cantidades de A1M desde células K562, y que aumentó la secreción después de la incubación con hemoglobina o ROS. La figura 13D muestra el análisis de PCR en tiempo real de ARNm de A1M en células K562 incubadas con medio, hemo 10 μM , H₂O₂ 50 μM o una mezcla de Fe³⁺ 10 μM , H₂O₂ 20 μM y ascorbato 100 μM . Todos estos oxidantes indujeron un aumento en los niveles de ARNm de A1M.

La expresión de A1M se aumenta mediante la exposición de células a hemoglobina, hemo y ROS en líneas celulares de hepatocitos, histiocitos y eritrocitos. También se observa una regulación por incremento de A1M en queratinocitos y fibroblastos en respuesta a hemoglobina y ROS (no mostrado). Esto puede ser importante para la defensa antioxidante en la piel en la que los queratinocitos constituyen el principal tipo de célula. Además, la A1M producida de manera endógena se localiza sobre la superficie de las células K562, probablemente después de la secreción y captación por receptores de superficie celular (no mostrado), y también se encuentra A1M añadida de manera

exógena principalmente sobre la superficie celular (no mostrado). Por tanto, pueden protegerse las células periféricas tanto por A1M plasmática producida por el hígado como por A1M sintetizada de manera local.

7. Estimulación del crecimiento de la matriz extracelular

5 Tal como se describió anteriormente, A1M tiene efectos protectores y de reparación sobre colágeno durante estrés oxidativo. El colágeno es un componente molecular fundamental de la matriz extracelular (ECM) por ejemplo en membranas basales y tejido de la piel. Los nuevos resultados experimentales también indican que A1M tiene efectos positivos sobre el crecimiento de ECM (tabla 3). Se perfundieron placentas humanas *in vitro* con A1M o con tampón únicamente y entonces se tomaron muestras del tejido para la investigación de los niveles de ARNm usando la técnica de alineamiento de genes (tabla 3) y la ultraestructura usando microscopía electrónica (figura 14). Tal como se muestra en la tabla 3, muchos grupos de genes de la matriz extracelular estaban regulados por incremento mediante perfusión de A1M. La microscopía electrónica mostró una clara diferencia en la estructura del colágeno en los dos grupos. La perfusión con tampón dio como resultado la descomposición de los haces de colágeno, fibrillas más delgadas y una abundancia de monómeros dispersos, mientras que la perfusión con A1M proporcionó el resultado opuesto: un aumento en el grosor y el número de fibrillas (figura 14). Por tanto se contempla que puede aplicarse A1M de manera local mediante una formulación en la que A1M se incluye en un parche, se impregna en vendajes o se incluye en lociones.

20 Tabla 3. Grupos de genes con aumento en los niveles de expresión en la perfusión con A1M en comparación con el medio sólo.

Categoría	Nombre del grupo	Recuento	Valor de P	Veces de cambio
GO:0005581	Colágeno	4	0,00035	28,49
GO:0044421	Parte de región extracelular	10	0,00124	3,65
GO:0006817	Transporte de fosfato	4	0,00416	12,10
GO:0006820	Transporte de aniones	5	0,00479	7,18
GO:0005201	Constituyente estructural de ECM	4	0,00504	11,33
GO:0005578	ECM proteica	6	0,00526	5,22
GO:0031012	ECM	6	0,00566	5,13
GO:0044420	Parte de ECM	4	0,00619	10,50
GO:0005576	Región extracelular	11	0,01127	2,438
GO:0003886	Actividad ADN (citosina-5)-metil-transferasa	2	0,01290	151,5
GO:0005496	Unión a esteroides	3	0,01568	15,41
GO:0009008	Actividad ADN-metiltransferasa	2	0,01610	121,1
GO:0015698	Transporte de aniones inorgánicos	4	0,01836	7,02
GO:0005887	Integrado en la membrana plasmática	10	0,01890	2,401
GO:0031226	Intrínseco en la membrana plasmática	10	0,02038	2,371
GO:0005615	Espacio extracelular	6	0,02749	3,45
GO:0006807	Proceso metabólico de compuesto de nitrógeno	6	0,02770	3,44
GO:0007423	Desarrollo de los órganos sensoriales	3	0,04335	8,89
GO:0006783	Proceso de biosíntesis de hemo	2	0,04726	40,6

25 Se llevaron a cabo perfusiones placentarias, extracciones y mediciones en tejidos placentarios a término de individuos sanos tal como se describe (Centlow M, Junus K, Nyström H, May K, Larsson I, Olsson MG, Åkerström B, Sager R, Schneider H, Hansson SR. Perfusion of the human placenta with red blood cells mimics preeclampsia *in vitro*. Z Geburtshilfe und Neonatologie, en imprenta) con A1M 10 µM en medio de cultivo tisular NCTC-135, se diluyó con tampón de Earle que contenía albúmina sérica bovina 40 g/l, dextrano 40 10 g/l, glucosa 1,33 g/l, 2500 IU/l de heparina y Clamoxyl 250 mg/l o medio sólo. Se preparó A1M tal como se describe (Kwasek A, Osmark P, Allhorn M, Lindqvist A, Akerstrom B, Wasylewski Z. Production of recombinant human A1M and mutant forms involved in chromophore formation. Protein Expr Purif 2007;53(1):145-52). Los valores comparan extractos de tejido placentario después de la perfusión. Recuento: número total de perfusiones de A1M y control analizadas, valor de p: significación de la diferencia, veces de cambio: valores de perfusiones de A1M dividido entre valores de perfusiones de control.

35 Ejemplo 7.A

40 Para investigar el potencial de uso de microglobulinas en general y A1M en particular, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias dermatológicas, se realizó un experimento de penetración en la piel. Las enfermedades dermatológicas de interés son enfermedades inflamatorias que implican alteración de la función como barrera tales como dermatitis atópica y psoriasis. El modelo usado tiene en cuenta la alteración de la función como barrera y se describe en la bibliografía, U. Jacobi y K. Engel, *et.al.* en "Penetration of Pollen Proteins into the Skin" Skin Pharmacol Physiol 2007;20:297, como modelo relevante para la determinación de la administración de proteína a través de la piel en pacientes con dermatitis atópica.

Se usa una unidad de difusión de celda de Bronaugh. El equipo consiste en 14 células y cada célula tiene una parte inferior a través de la cual se bombea el medio receptor, TRIS 20 mM, NaCl 0,1 N a pH 8, a una tasa de 1,4 ml/hora y una parte superior en la que se administra el producto, en este caso una disolución de A1M al 3% p/p. Las partes inferior y superior están separadas por una membrana de piel de oreja de cerdo.

Las membranas usadas son piel de la parte interna de la oreja de cerdo doméstico. El motivo es una larga experiencia que da lugar a pequeñas variaciones en el comportamiento de penetración y el hecho de que la A1M porcina puede separarse de la humana de igual forma mediante radioinmunoensayo, RIA. Se separan con cinta adhesiva las membranas 25 ó 50 veces respectivamente antes del experimento de penetración.

Para las células que tienen membranas que se separan con cinta adhesiva 25 veces, se muestran los datos de penetración en la tabla 1 mientras que en la tabla 2 aparecen los datos de penetración de membranas que se han separado con cinta adhesiva 50 veces. Se terminó el experimento tras 24 horas. En las tablas 2 y 3, se enumeran la cantidad absorbida, la cantidad que atraviesa la piel y la concentración en tejido, que se encuentra en el tejido.

Tabla 2

Número de células	1	2	3	4	5	6	7	Promedio
% absorbido	1,658	0,863	1,015	0,136	0,217	0,131	0,431	
Grosor de membrana (mm)	0,851	0,734	0,658	0,955	0,896	0,727	0,514	
Volumen de membrana ml	0,054	0,046	0,041	0,060	0,056	0,046	0,032	
Cantidad absorbida (µg)	3,015	1,568	1,846	0,246	0,395	0,238	0,783	
Conc. en tejido (µg/ml)	56,23	33,91	44,52	4,10	7,00	5,21	24,17	25,02

Tabla 2.

Número de células	8	9	10	11	12	13	14	Promedio
% absorbido	0,45	1,20	0,76	0,84	0,86	0,47	0,19	
Grosor de membrana (mm)	0,851	0,734	0,658	0,955	0,896	0,727	0,514	
Volumen de membrana ml	0,054	0,046	0,041	0,060	0,056	0,046	0,032	
Cantidad absorbida (µg)	0,823	2,173	1,377	1,536	1,556	0,847	0,337	
Conc. en tejido (µg/ml)	15,35	46,99	33,23	25,53	27,57	18,50	10,40	25,37

Aunque la variación es grande, lo que es normal en este tipo de experimentos de administración única, los resultados indican que se genera una concentración en tejido de aproximadamente 25 µg/ml o 1 µM tras una administración única. Se ha mostrado anteriormente que esta concentración tiene un efecto biológico y es comparable a la concentración en el plasma sanguíneo humano. La administración adicional de A1M generará mayores concentraciones en tejido. Por tanto puede concluirse que se administrará A1M al tejido y puede utilizarse el efecto en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel que implican una alteración de la función como barrera.

Ejemplos de composiciones farmacéuticas que comprenden A1M

Los ejemplos a continuación se incluyen solamente para inspiración y no pueden considerarse limitativos en ningún contenido. Las formulaciones pueden combinarse, ajustarse y aplicarse por el usuario de cualquier modo que respalde el tratamiento óptimo y el cumplimiento del paciente.

Los ejemplos incluyen formulaciones para aplicación tópica o mucosa, formulaciones para la aplicación parenteral y ejemplos para vías de administración alternativas.

Ejemplo 1

Composición tópica

Se prepararán composiciones que comprenden los siguientes componentes

Componente	Función	Intervalo de concentración
A1M	Principio activo	10-40% p/p
	Potenciador(es) de la penetración	0-10% p/p

ES 2 571 956 T3

	Solubilizante(s)	2,5-20% p/p
	Base de pomada, base de suspensión o base de emulsión	30-87,5% p/p

Ejemplo 2

Composición parenteral

5

Se prepararán composiciones que comprenden los siguientes componentes

Componente	Función	Intervalo de concentración
A1M	Principio activo	5-40% p/p
	Solubilizante(s)	0-10% p/p
	Disolvente(s)	Hasta el 100% p/p

Ejemplo 3

10

Pomada, vaselina hidrófila

Componente	Cantidad
A1M	5-30% p/p, en particular 10-20% p/p
Colesterol	2-10% p/p, en particular 3% p/p
Alcohol estearílico	2-10% p/p, en particular 3% p/p
Cera blanca	5-15% p/p, en particular 8% p/p
Vaselina blanca	70-90% p/p, en particular 86% p/p

Ejemplo 4

15

Pomada hidrófila

Componente	Cantidad
A1M	5-30% p/p, en particular 10-20% p/p
Metilparabeno	0,01-0,05% p/p, en particular 0,025% p/p
Propilparabeno	0,005-0,03% p/p, en particular 0,015% p/p
Laurilsulfato de sodio	0,5-5% p/p, en particular 1% p/p
Propilenglicol	5-20% p/p, en particular 12% p/p
Alcohol estearílico	10-50% p/p, en particular 25% p/p
Vaselina blanca	10-50% p/p, en particular 25% p/p
Agua purificada	25-75% p/p, en particular 37% p/p

Ejemplo 5

20

Líquido para la administración parenteral (por ejemplo, administración intramuscular, intravenosa, subcutánea o intradérmica). Los intervalos de concentración son recomendaciones y pueden superarse si es relevante.

Función	Ejemplo	Cantidad normal
Fármaco activo	A1M	1-50%
Disolvente	por ejemplo etanol, glicerol, propilenglicol o Macrogol 400	0-30%
Solubilizante	por ejemplo polisorbato 80	0-5%
Emulsionante	por ejemplo lecitina	0-2%
Compuestos que proporcionan isotonicidad	por ejemplo NaCl o glucosa	0-0,9%
Formador de complejo	por ejemplo Sodiomedetat	0-0,1%
Ajuste del pH	por ejemplo HCl o NaOH	-
Tampón	por ejemplo tampón citrato, acetato o fosfato	0-5%
Conservantes	por ejemplo fenol, clorocresol, parabeno(s), alcohol bencílico o tiomersal	0-2%
Ajuste de la viscosidad	por ejemplo metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, glicerol o Macrogol	0-1%

Leyendas de las figuras

Figura 1. La salud humana depende de un equilibrio entre oxidantes y antioxidantes.

Los oxidantes se producen de manera continua dentro del organismo como resultado del metabolismo normal y se introducen desde el exterior a través del alimento, aire, etc. Los antioxidantes se producen por el organismo y, de manera menos importante, a través del alimento. Puede provocarse el desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes por el aumento de producción o captación de oxidantes exógenos o la disminución de producción de antioxidantes endógenos. Esto da como resultado estrés oxidativo y diversas enfermedades tal como se describe en el texto.

Figura 2.A. Mecanismos antioxidantes principales. 1. Reducción catalítica de oxidante usando electrones derivados de metabolismo celular u otras fuentes. 2. Reducción no catalítica de oxidantes usando electrones derivados del propio antioxidante, pero regenerando el antioxidante con electrones derivados del metabolismo celular u otras fuentes. 3. Eliminación de oxidante mediante unión covalente al antioxidante. Cuando la reacción de eliminación es oxidativa, los electrones se derivan del metabolismo celular u otras fuentes. Círculo grande: antioxidante; ameba pequeña: oxidante perjudicial (radical); círculo pequeño: oxidante desintoxicado (radical). B. Mecanismos antioxidantes de A1M. 1. Reducción catalítica de oxidante usando electrones derivados de metabolismo celular u otras fuentes. 2. Reducción no catalítica de oxidantes usando electrones derivados de la propia A1M. 3. Eliminación de oxidante mediante unión covalente al antioxidante. La reacción de eliminación es reductora, es decir se producen electrones mediante la reacción. 4. Reparación de modificaciones oxidativas.

Círculo grande: A1M; ameba pequeña: oxidante perjudicial (radical) o modificación oxidativa de célula o molécula; círculo pequeño: oxidante detoxificado (radical) o modificación reducida de célula o molécula.

Figura 3. Modelo de la estructura de A1M. Se preparó el modelo tal como se describe (ref 29). Las ocho hebras β , mostradas como cintas, forman un cilindro ligeramente en forma de cono con un interior hidrófobo: la "cavidad de lipocalina". Un lado de la cavidad de lipocalina está abierto (mostrado por la flecha), es decir permite la entrada de pequeñas moléculas. El lado opuesto está cerrado. Se muestran dos α -hélices como cilindros. Se muestran las posiciones de tres grupos de hidrato de carbono (T5; N17; N96) y cuatro cadenas laterales implicadas en la actividad reductasa (C34; K92; K118; K130).

Figura 4. Propiedades antioxidantes de A1M. Los oxidantes, ejemplificados por hemo y hemoglobina, inducen la formación de radicales libres y especies reactivas del oxígeno (ROS). Esto provoca daño oxidativo mediante reacciones de oxidación perjudiciales con componentes tisulares. A1M interfiere con este proceso = Antioxidación. La hemoglobina y los oxidantes estimulan la síntesis de A1M. El daño oxidativo está implicado en el desarrollo de enfermedades, ejemplificado por preeclampsia. A1M está implicada en las enfermedades mediante antioxidación y su síntesis se estimula por oxidantes durante la enfermedad. Líneas rojas: inhibiciones; flechas azules: efectos positivos.

Figura 5. La maquinaria de estrés oxidativo mostrada como rueda roja, girada por diferentes engranajes, metabolitos sanguíneos (en rojo), isquemia (verde), inflamación (amarillo) y factores ambientales (azul).

Figura 6. Mecanismo orientativo de las reacciones entre A1M y radical ABTS. La figura ilustra esquemáticamente el flujo de electrones, el mecanismo de reacción y la relación estructural entre cadenas laterales de aminoácidos reactivas del mecanismo de eliminación de radicales de A1M. Se representa A1M por un barril de "lipocalina" (véase la figura 2) con Y132 y el grupo tiolato de C34 destacado. Este último está ubicado en un bucle flexible, grande. El grupo tiolato de C34 reacciona con el radical ABTS, y un radical tiolilo y se forma ABTS reducido. Entonces se regenera el tiolato mediante reacción intramolecular con Y132, produciendo un radical tirosilo. Posteriormente, el radical tirosilo reacciona con otro radical ABTS, formando un aducto tyr-ABTS de color púrpura estable. También se propone la misma reacción para Y22, y una tirosina adicional con una ubicación desconocida.

Figura 7. A1M limpia las células K562 del hemo depositado. A: Se cultivaron células K562 con tampón o hemo 10 μ M durante 30 minutos, se lavaron y se incubaron con A1M durante 2 horas, se lavaron y se solubilizaron suspendiendo en NP-40 al 1%. Entonces se analizaron el medio de cultivo y la suspensión celular leyendo los espectros de absorbancia. B: Se incubaron las células con tampón o hemo 10 μ M durante 30 min (etapa 1), se lavaron y entonces se incubaron con tampón, A1M 10 μ M o AGP 10 μ M durante 2 horas (etapa 2). Se tomaron fotografías por separado de sobrenadantes y células, solubilizadas en NP-40 al 1%.

Figura 8. Inhibición de muerte celular inducida por irradiación. A: Se hicieron crecer células de hepatoma humano (HepG2) hasta la confluencia y se irradiaron con partículas alfa de 1,3 Gy y entonces se cultivaron durante 3 días. La zona de irradiación era de 50 μ m. Se midió la muerte celular en el punto de irradiación ("células irradiadas") o 0,5 cm del punto de irradiación ("células vecinas") mediante captación de yoduro de propidio, usando microscopía de fluorescencia en diversos puntos de tiempo tras la irradiación. Se realizó irradiación sobre células cultivadas en medio (●), sobre células cultivadas en el medio + A1M 5 μ M (▲). No se irradiaron células control (■) cultivadas en

medio. B y C: Se hicieron crecer células de hepatoma humano (HepG2) hasta la confluencia y se irradiaron con partículas alfa de 0,2 Gy. Se añadió medio recién preparado con A1M 0 o 10 μM y se incubaron las células durante 0-72 horas. En el punto final de todas las incubaciones se recogieron las células y se analizaron las concentraciones del grupo carbonilo de proteína (B) y los niveles de ARNm de HO-1 (C) mediante ELISA y PCR en tiempo real, respectivamente. Se realizaron todas las etapas, excepto la irradiación, con cultivos control idénticos. Se investigaron los cultivos incubados con A1M 10 μM (\blacktriangledown) o sólo medio (\circ) y cultivos no irradiados con A1M 10 μM (Δ). Se ajustaron los cultivos celulares no irradiados a cero. Se normalizaron los valores de ciclo umbral de HO-1 frente a G3DPH y se calculó $\Delta\Delta\text{Ct}$ mediante normalización frente a cultivos celulares no irradiados. Se presentan los resultados de los experimentos por triplicado como media \pm DE. Se preparó la comparación estadística entre los grupos usando la prueba de la t de Student. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.

Figura 9. Efectos antihemolíticos de A1M. Se prepararon glóbulos rojos mediante centrifugación de gradiente de densidad, se lavaron con PBS y se suspendieron al 1% en PBS. A y B: Se incubaron las alícuotas 20 h a 37°C con tampón (control), Fe^{3+} 50 μM , H_2O_2 20 μM y ascorbato 250 μM (reactivos de reacción de Fenton), reactivos de reacción de Fenton + A1M 2 μM , o reactivos de reacción de Fenton+ A1M 10 μM . Tras la centrifugación, se leyó la absorbancia de luz del sobrenadante mediante espectrofotometría de barrido (A) y se determinó la concentración de LDH mediante un ensayo colorimétrico (B). C: Se incubaron las células durante 5 min, 1 h y 20 h a 37°C con tampón ("control"), Fe^{3+} 50 μM , H_2O_2 20 μM y ascorbato 250 μM ("Fenton"), reactivos de reacción de Fenton + A1M recombinante 5 μM (" α_1 -microglobulina"), o reactivos de reacción de Fenton + AGP 5 μM ("orosomucoide"). Tras la centrifugación, se leyó la absorbancia de luz del sobrenadante mediante espectrofotometría de barrido y se trazó la absorbancia a 415 nm frente al tiempo.

Figura 10. Oxidación intracelular inducida por hemo. Se marcaron células K562 con 3 μM de la sonda sensible a oxidación H_2DCFDA durante 30 min, se lavaron y se resuspendieron en medio recién preparado. A: Se cultivaron las células con hemo (5-20 μM) durante 2 h y se analizaron con citometría de flujo. B: Se incubaron las células en tampón sólo (Δ) o con hemo 10 μM (\circ). Se recogió la suspensión celular tras 0, 2, 6 ó 20 h y se analizó con citometría de flujo. C: Se añadieron A1M (2, 5 ó 10 μM), AGP (2, 5 ó 10 μM) o ascorbato (10 μM) a las células antes de la adición de hemo 10 μM . Se incubaron las células durante 2 h y se analizaron con citometría de flujo. D: Se incubaron las células con hemo 10 μM durante 30 min, se lavaron dos veces con PBS y entonces se incubaron con A1M (2, 5 ó 10 μM) durante 2 h y se analizaron con citometría de flujo. E: Se cultivaron las células durante un periodo de 2 h con o bien medio de cultivo sólo, hemo (10 μM), A1M (10 μM) o bien AGP (10 μM). Se recogió la suspensión celular y se analizó con citometría de flujo. Se trazó la intensidad de fluorescencia relativa de 10000 células (excitación de 488 nm, emisión de 530 nm) como media de valores por triplicado \pm DE, definiéndose el 100% como la intensidad de fluorescencia media (MFI) inducida por hemo 10 μM . Se realizó análisis estadístico en el programa informático Origin (Microcal Software, Inc., versión 6), comparando los grupos con la prueba de la t de Student. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Figura 11. Inhibición de oxidación intracelular inducida por H_2O_2 y reacción de Fenton. A y B: Se marcaron células K562 con 3 μM de la sonda sensible a oxidación H_2DCFDA durante 30 min, se lavaron y se resuspendieron en medio recién preparado. Se cultivaron las células con H_2O_2 (50-250 μM) durante un periodo de 0-20 h y se analizó la suspensión celular con citometría de flujo (A). Se añadió A1M diez o veinte micromolar a las células antes de la adición de H_2O_2 50 μM . Se cultivaron las células durante 6 h y se analizó la suspensión celular con citometría de flujo (B). Se trazó la intensidad de fluorescencia relativa de 10000 células (excitación de 488 nm, emisión de 530 nm) como media de valores por triplicado \pm DE, definiéndose el 100% como la intensidad de fluorescencia media (MFI), inducida por H_2O_2 250 μM (A) o 50 μM (B). Se realizó análisis estadístico en las figuras A y B en el programa informático Origin (Microcal Software, Inc., versión 6), comparando los grupos con la prueba de la t de Student. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. C a F: Se midió la oxidación del tiol de la proteína Intracelular mediante SDS-PAGE según Baty *et al* (7), descrito en Materiales y Métodos. Se añadió A1M, 2-10 μM a las células antes de la adición de hemo 10 μM y se visualizó mediante fluorimetría (C) y se cuantificó mediante análisis de intensidad de píxel (E). Se añadió A1M, 2-10 μM antes de la adición de una mezcla que contenía $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 10 μM + ascorbato 100 μM + H_2O_2 20 μM (mostrado como Fe en la figura) y se visualizó mediante fluorimetría (D) y se cuantificó mediante análisis de intensidad de píxel (F). Se muestra un experimento representativo en las figuras C y E, y D y F, respectivamente.

Figura 12. Propiedades bioquímicas y redox del complejo A1M-hemo. Se incubaron células K562 ($0,5-1 \times 10^6$) con tampón o hemo 50 μM durante 30 min, se lavaron y entonces se incubaron con A1M 10 μM durante 2 h. Tras la centrifugación, se analizaron los sobrenadantes. A: Se realizó filtración en gel sobre una columna de Superose 12 HR 10/30 de 25 ml usando un aparato de cromatografía de líquidos de rápida resolución (FPCL) equipado con un asa de inyección de muestra de 0,5 ml, monitorizando el eluato a 280 (línea continua) y 405 nm (línea de puntos) y recogiendo fracciones de 0,5 ml. Se equilibró la columna y se eluyó con Tris-HCl 20 mM, pH 8,5; NaCl 0,1 M; NaN_3 al 0,02%. B: Se midió la actividad de reducción de radical ABTS mezclando sobrenadantes celulares (Δ : células + hemo; \bullet : células + A1M; \circ : células + hemo + A1M), proporcionando una concentración final de A1M 3 μM , con radical ABTS 35 M en fosfato de Na 25 mM, pH 8, leyendo la absorbancia a 735 nm en intervalos regulares. Reacción de control: A1M 3 μM + hemo 10 μM sin células (\blacksquare). C: Se calcularon las tasas de reacción como los valores absolutos de las pendientes de una recta dibujada mediante análisis de regresión de los puntos durante los

primeros 40 s, incluyendo el punto de tiempo cero. Se usaron números idénticos de células para la comparación de las tasas de reducción de ABTS. Todos los valores representan la media y DE de tres experimentos separados. Se realizó análisis estadístico en el programa informático Origin (Microcal Software, Inc., versión 6), comparando los grupos con la prueba de la t de Student. *P < 0,05.

5
 10
 15
 20
 25

Figura 13.A: Inhibición de la expresión de HO-1 inducida por oxidante. Se usó PCR en tiempo real para examinar la expresión del ARNm de HO-1 en células K562 expuestas a hemo, peróxido de hidrógeno o una mezcla de (NH₄)Fe(SO₄)₂, peróxido de hidrógeno y ascorbato (reacción de Fenton). También se analizó la expresión de HO-1 con la adición de A1M en todas las condiciones. B-C: Inhibición de muerte celular inducida por hemo. Se cultivaron las células K562 con hemo, con o sin A1M o AGP durante 4 h. Se recogió la suspensión celular, se mezcló con PI 10 μM (concentración final) y se analizó con citometría de flujo. Se trazó el porcentaje de células positivas para PI (= células muertas) de 10000 células (PE-channel, ajuste del filtro 556 LP y 576/26 BP) como media de valores por triplicado +/- DE. D: Regulación por incremento de A1M. Se usó PCR en tiempo real para examinar la expresión del ARNm de A1M en células K562 expuestas a hemo, peróxido de hidrógeno o una mezcla de (NH₄)Fe(SO₄)₂, peróxido de hidrógeno y ascorbato (reacción de Fenton). E: Silenciamiento de la expresión de A1M. Se transfectaron células K562 con ARNip específico de A1M 5 nM, se cultivaron durante 24 h, se lavaron, se cargaron con H₂DCFDA tal como se describe en Materiales y Métodos (panel derecho) y se expusieron a hemo 20 μM durante 2 h. Entonces se analizaron las células mediante PCR en tiempo real (panel izquierdo) o citometría de flujo (panel derecho). Se realizó la extracción de ARN, preparación de ADNc y amplificación por PCR tal como se describe en Materiales y Métodos. Se trazó la intensidad de fluorescencia relativa de 10000 células (excitación de 488 nm, emisión de 530 nm) como media de valores por triplicado +/- DE, definiéndose el 100% como la intensidad de fluorescencia media (MFI) inducida por A1M en células expuestas por hemo 20 μM. Se normalizaron todos los niveles de expresión frente a G₃DPH y se representan en la figura como ΔΔCt. Se realizó análisis estadístico en el programa informático Origin (Microcal Software, Inc., versión 6), comparando los grupos con la prueba de la t de Student. *P < 0,05; **P < 0,01.

30

Figura 14. Reparación de fibrillas de colágeno oxidado visualizadas mediante tinción negativa y EM de transmisión. Se formaron fibrillas mediante incubación de colágeno I (0,4 mg/ml) durante 24 h a 37°C. Entonces se incubaron las fibrillas durante 24 h a 37°C con tampón (A) o radicales hidroxilo generados por la reacción de Fenton: Fe³⁺ 100 μM, H₂O₂ 200 μM, ascorbato 1 mM (reacción de Fenton) (B). Entonces se añadió A1M (7 μM) y se incubó durante 24 h a 37°C (C).

35

Figura 15. A1M estimula el crecimiento de ECM. A: muestra haces de colágeno bien organizados (flechas) en una placenta de control. B: muestra una placenta perfundida con Hb libre, obsérvense los haces de colágeno difusos. C: muestra cómo la perfusión de A1M induce la producción de colágeno.

Figura 16. Ilustra el sistema de perfusión de placenta doble. El sistema consiste en una placenta (óvalo) con una circulación materna (derecha) y una fetal (izquierda).

40

Figura 17. muestra la lista de secuencias de las secuencias mencionadas en el presente documento.

Bibliografía

- 45
- Halliwell B, Gutteridge JMC (eds.) Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, 2002.
 - Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82, 47-95.
 - Segal AW. 2005. How neutrophils kill bacteria. *Annu Rev Immunol* 23, 197-223
 - Halliwell B, Gutteridge JM. 1996. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Rad Biol Med* 18, 125-126.
 - Kaumeyer JF, Polazzi JO, Kotick MP. The mRNA for a proteinase inhibitor related to the HI-30 domain of inter-α-trypsin inhibitor also encodes α₁-microglobulin (protein HC). *Nucleic Acids Res* 1986;14(20):7839-50 .
 - Sala A, Campagnoli M, Perani E, Romano A, Labò S, Monzani E, Minchiotti L, Galliano M. 2004. Human α₁-microglobulin is covalently bound to kynurenine-derived chromophores. *J Biol Chem* 279, 51033-41.
 - Allhorn M, Berggård T, Nordberg J, Olsson ML, Åkerström B. 2002. Processing of the lipocalin α₁-microglobulin by haemoglobin induces heme-binding and heme-degradation properties. *Blood* 99, 1894-1901.
 - Larsson J, Allhorn M, Åkerström B. 2004. The lipocalin α₁-microglobulin binds heme in different species. *Arch. Biochem. Biophys.* 432, 196-204.

9. Allhorn M, Klapyta A, Åkerström B. 2005. Redox properties of the lipocalin α_1 -microglobulin: reduction of cytochrome c, haemoglobin, and free iron. *Free Radic Biol Med* 38, 557-67.

5 10. Åkerström B, Maghzal G, Winterbourn CC, Kettle AJ. 2007. The lipocalin α_1 -microglobulin has radical scavenging activity. *J Biol Chem* 282, 31493-31503.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Åkerström, Bo
 Hansson, Stefan

5 <120> Uso médico de la alfa 1-microglobulina antioxidante y eliminadora de radicales

<130> P13535 PC

10 <160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1
 <211> 183
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 1

Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn Phe
 1 5 10 15

Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly Ser
 20 25 30

Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val Ser Thr
 35 40 45

Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr Ser
 50 55 60

Thr Arg Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp Asn
 85 90 95

Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr Ala
 100 105 110

Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile Thr
 115 120 125

Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu Gln
 130 135 140

Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser Ile
 145 150 155 160

Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu Pro
 165 170 175

Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg
 180

<210> 2
 <211> 201
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

ES 2 571 956 T3

<400> 2

Met His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu
 1 5 10 15
 Gly Arg Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu
 20 25 30
 Asn Phe Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile
 35 40 45
 Gly Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val
 50 55 60
 Ser Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met
 65 70 75 80
 Thr Ser Thr Arg Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala
 85 90 95
 Tyr Glu Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys
 100 105 110
 Trp Asn Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu
 115 120 125
 Tyr Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr
 130 135 140
 Ile Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu
 145 150 155 160
 Leu Gln Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp
 165 170 175
 Ser Ile Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln
 180 185 190
 Glu Pro Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg
 195 200

- 5 <210> 3
- <211> 549
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*

10 <400> 3

ggccctgtgc caacgccgcc cgacaacatc caagtgcagg aaaacttcaa tatctctcgg

60

ES 2 571 956 T3

atctatggga agtgggtacaa cctggccatc ggttccacct gccctggct gaagaagatc 120
 atggacagga tgacagtgag cacgctggtg ctgggagagg gcgctacaga ggcggagatc 180
 agcatgacca gcaactcgtt gcggaagggt gtctgtgagg agacgtctgg agcttatgag 240
 aaaacagata ctgatgggag gtttctctat cacaaatcca aatggaacat aaccatggag 300
 tcctatgttg tccacaccac ctatgatgag tatgccattt ttctgaccaa gaaattcagc 360
 cgccatcatg gaccaccat tactgccaag ctctacgggc gggcgccgca gctgagggaa 420
 actctcctgc aggacttcag agtgggtgcc caggggtggt gcatccctga ggactccatc 480
 ttcaccatgg ctgaccgagg tgaatgtgtc cctggggagc aggaaccaga gcccatctta 540
 atcccgaga 549

<210> 4
 <211> 603
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 4

atgcatcacc atcaccatca ccatcacggt ggaggagggg gtatcgaggg ccgcgccct 60
 gtgccaacgc cccccgacaa catccaagtg caggaaaact tcaatatctc tcggatctat 120
 gggaaagtgtg acaacctgac catcggttcc acctgcccct ggctgaagaa gatcatggac 180
 aggatgacag tgagcacgct ggtgctggga gagggcgcta cagaggcgga gatcagcatg 240
 accagcactc gttggcgga aggtgtctgt gaggagacgt ctggagctta tgagaaaaca 300
 gatactgatg ggaggtttct ctatcacaaa tccaaatgga acataacat ggagtcctat 360
 gtggtccaca ccacctatga tgagtatgcc attttctga ccaagaaatt cagccgcat 420
 catggacca ccattactgc caagctctac gggcggcgc cgcagctgag gaaactctc 480
 ctgcaggact tcagagtgtg tgcccagggt gtgggcatcc ctgaggactc catcttcacc 540
 atggctgacc gaggtgaatg tgtccctggg gagcaggaac cagagcccat cttaatccc 600
 aga 603

10

<210> 5
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> para silenciar la expresión de la alfa-1-microglobulina

20

ccuauguggu ccacaccaa

19

REIVINDICACIONES

- 5 1. Alfa-1-microglobulina para su uso en el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o un estado que implica estrés oxidativo mediante la reparación o la prevención del daño oxidativo mediante una combinación de reducción enzimática, reducción no enzimática y eliminación de radicales, con la condición de que la enfermedad o el estado no sea preeclampsia.
- 10 2. Alfa-1-microglobulina para su uso según la reivindicación 1, en la que la enfermedad o el estado está asociado con la presencia de hemoglobina libre en un líquido corporal.
- 15 3. Alfa-1-microglobulina según la reivindicación 1 ó 2, que tiene una identidad de al menos el 60% con la alfa-1-microglobulina humana (SEQ NO: 1).
- 20 4. Alfa-1-microglobulina para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la alfa-1-microglobulina es alfa-1-microglobulina humana (SEQ NO: 1).
- 25 5. Alfa-1-microglobulina para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que la alfa-1-microglobulina tiene una identidad de al menos el 60% con la alfa-1-microglobulina recombinante humana (SEQ NO: 2).
- 30 6. Alfa-1-microglobulina para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, 5, en la que la alfa-1-microglobulina es alfa-1-microglobulina recombinante humana (SEQ ID NO: 2).
- 35 7. Alfa-1-microglobulina para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la alfa-1-microglobulina se administra por vía parenteral.
8. Alfa-1-microglobulina para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la alfa-1-microglobulina se administra de manera local por ejemplo a una cavidad corporal o a la piel.
9. Alfa-1-microglobulina para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la alfa-1-microglobulina se administra en forma de una composición que comprende alfa-1-microglobulina y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
10. Alfa-1-microglobulina para su uso según la reivindicación 9, en la que el excipiente farmacéuticamente aceptable se selecciona de disolventes, agentes de ajuste del pH, agentes osmóticamente activos, codisolventes, agentes de solubilización, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, agentes tensioactivos, agentes humectantes, etc.

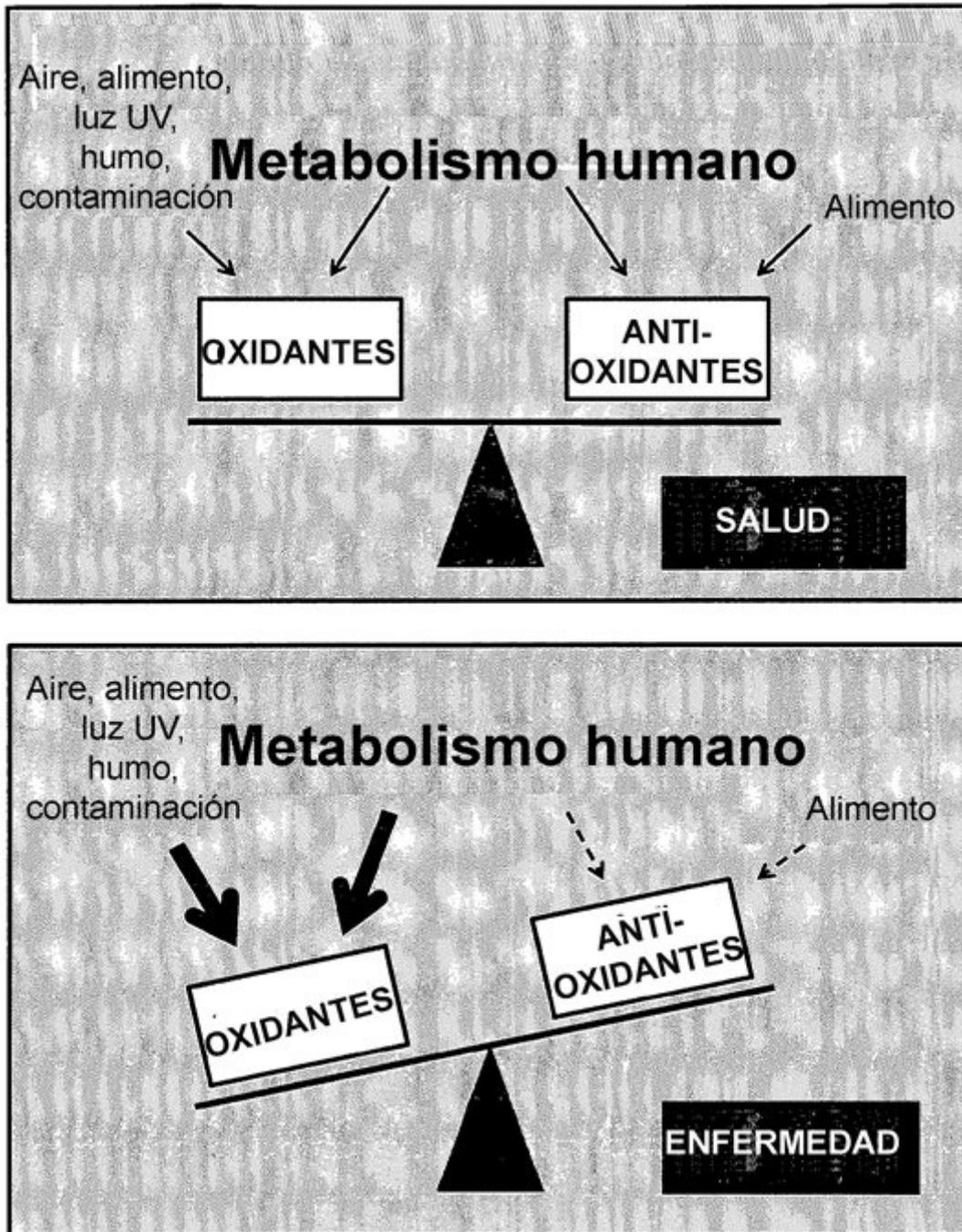


Fig. 1

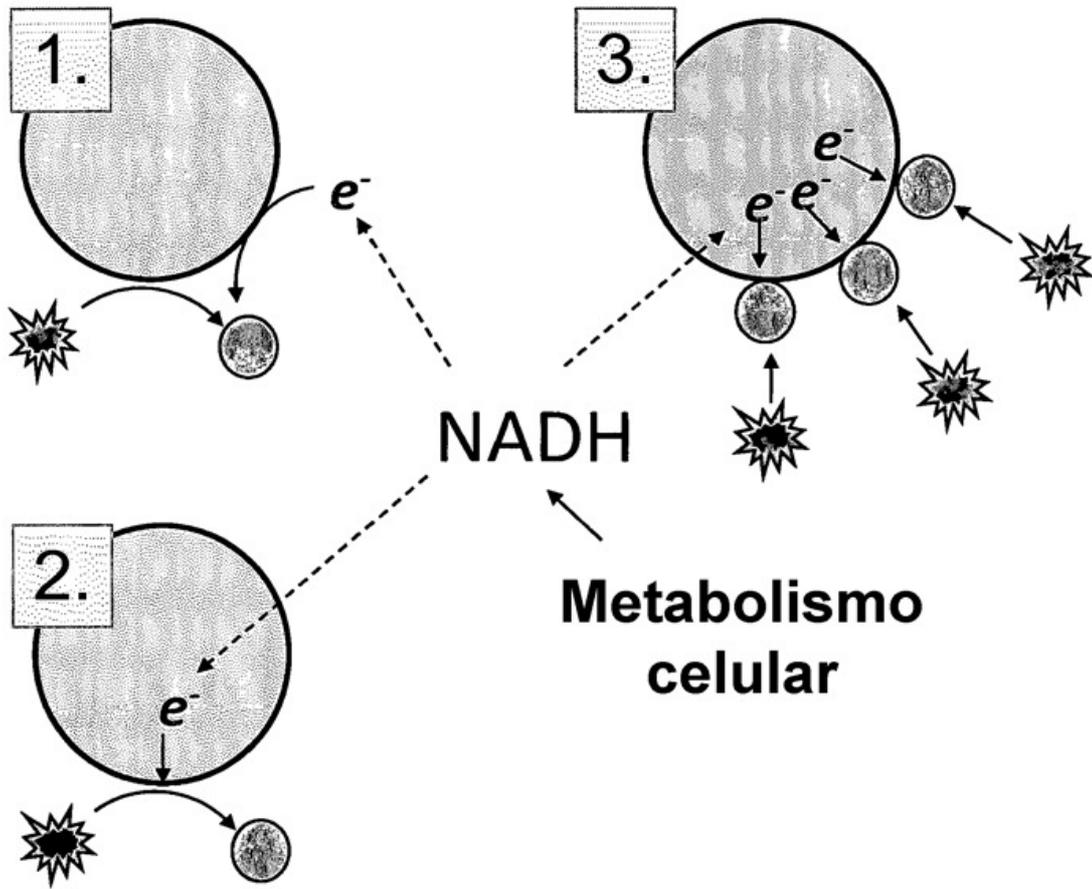


Fig. 2 A

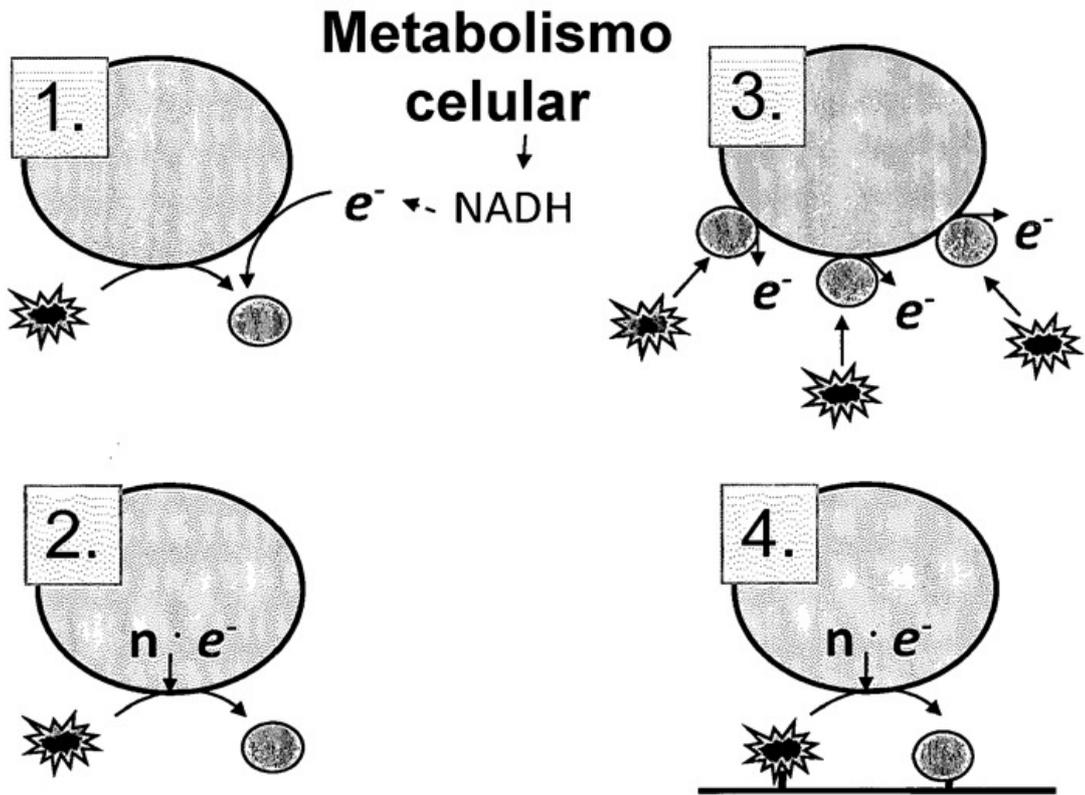


Fig. 2 B

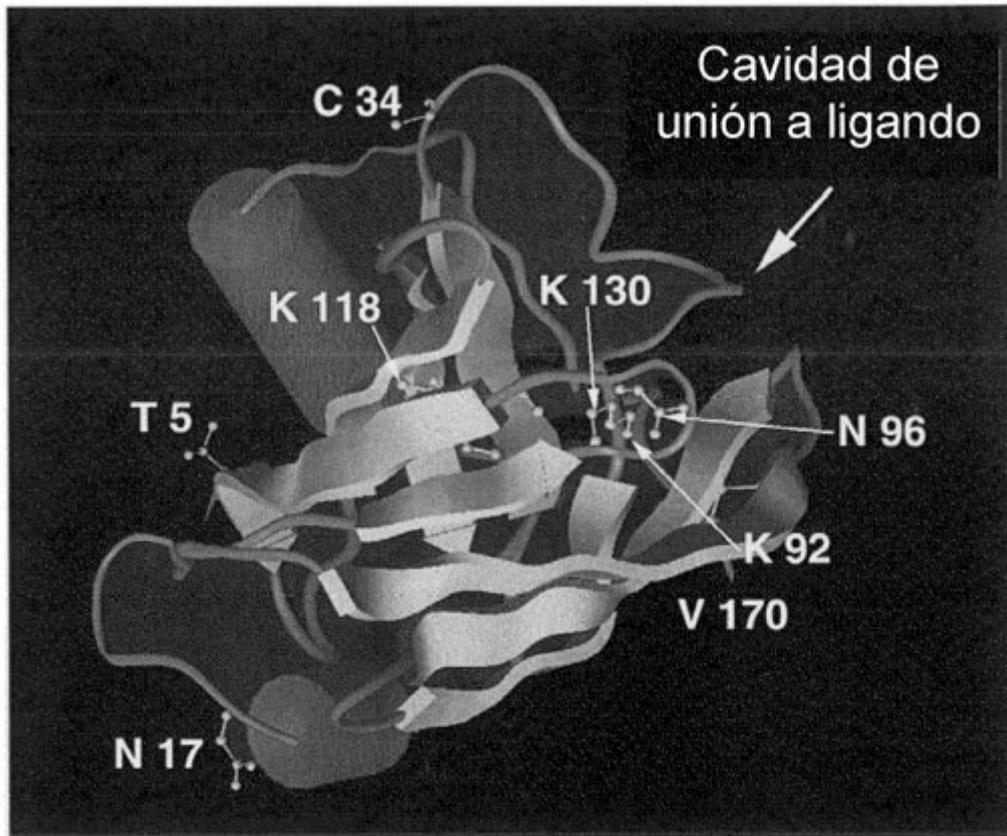


Fig. 3

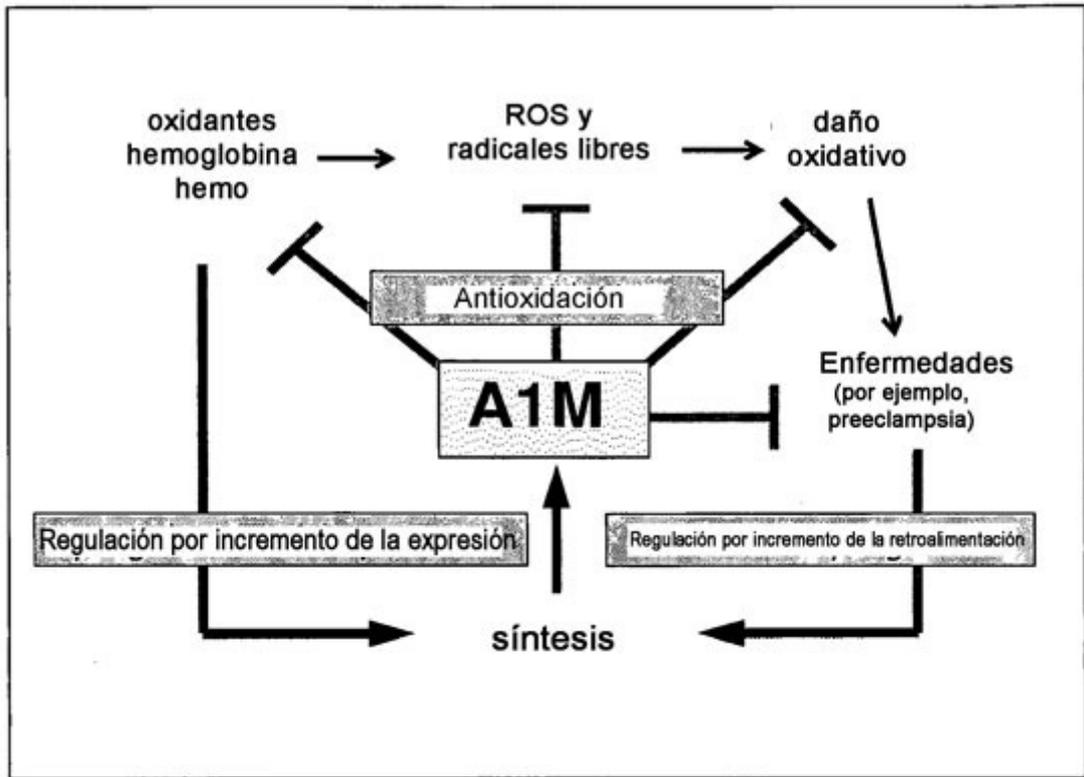


Fig. 4

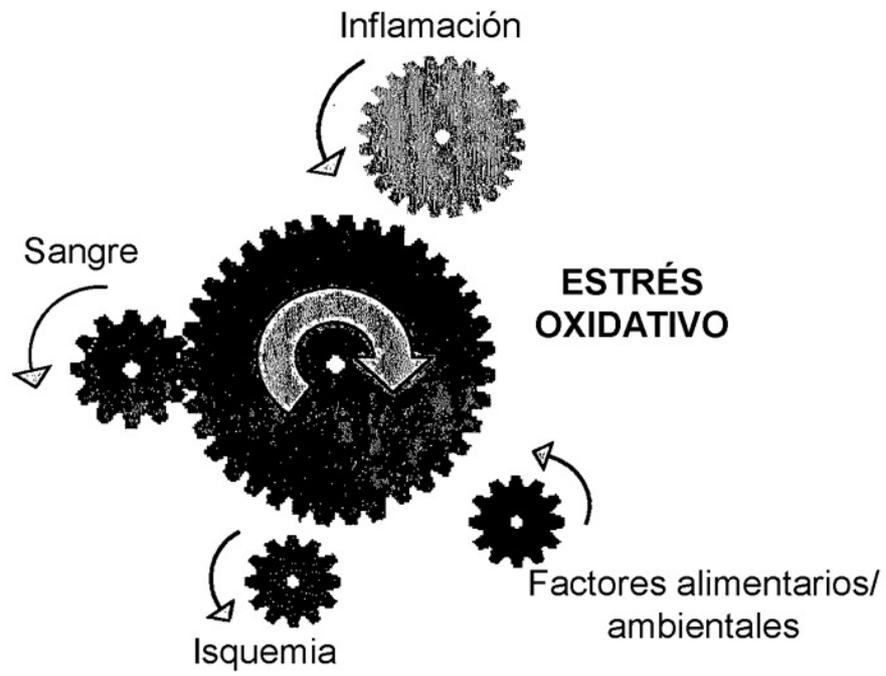


Fig. 5

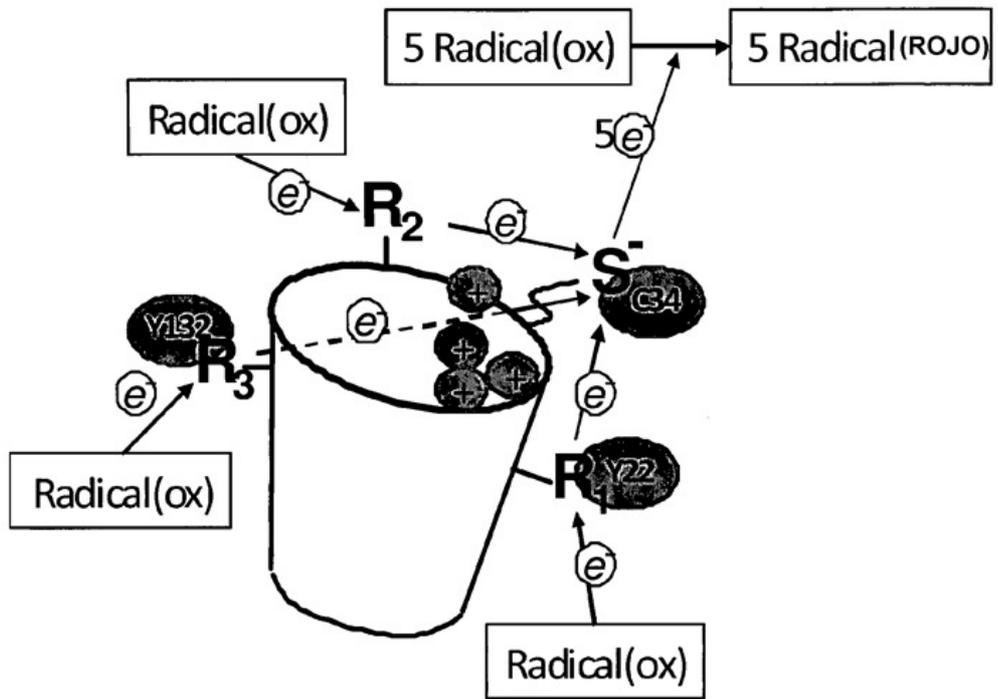


Fig. 6

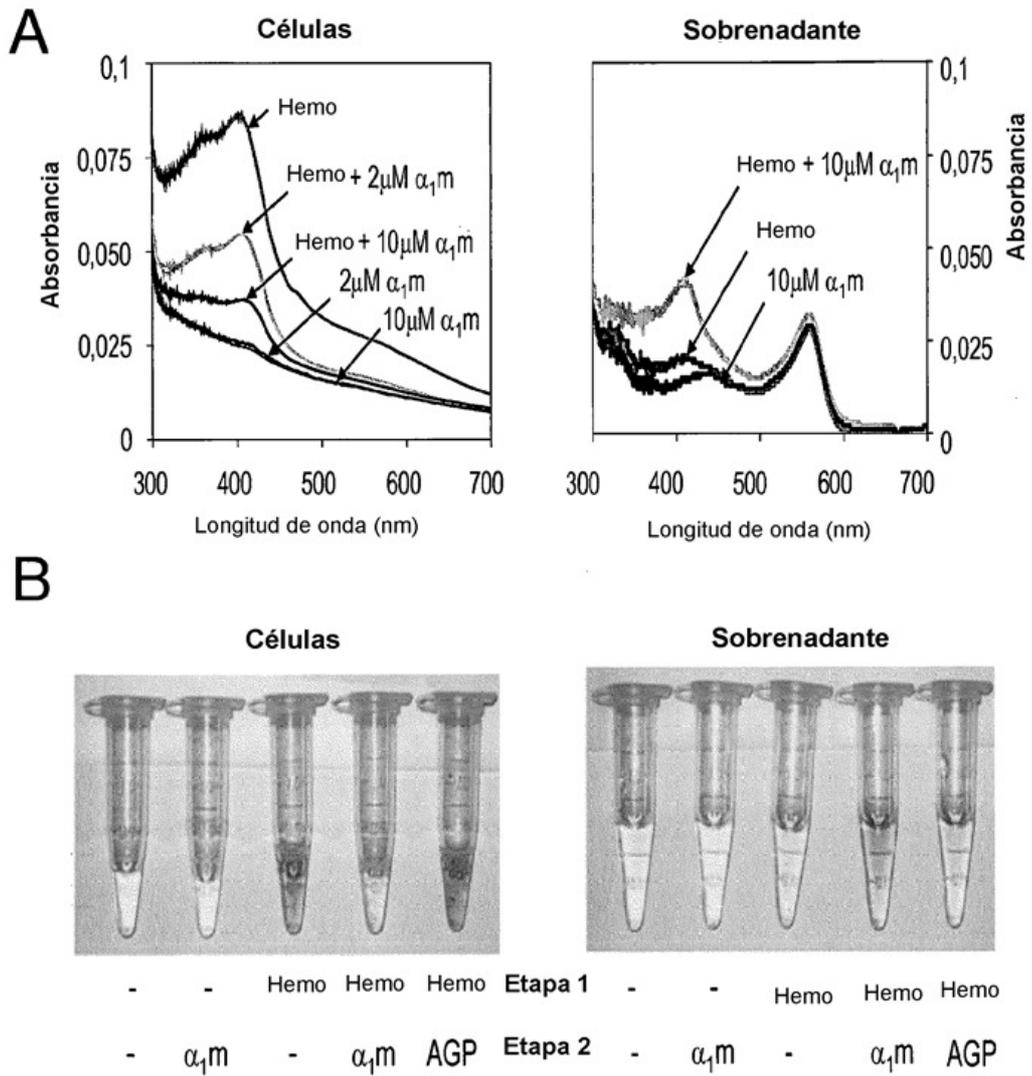


Fig. 7
A y B

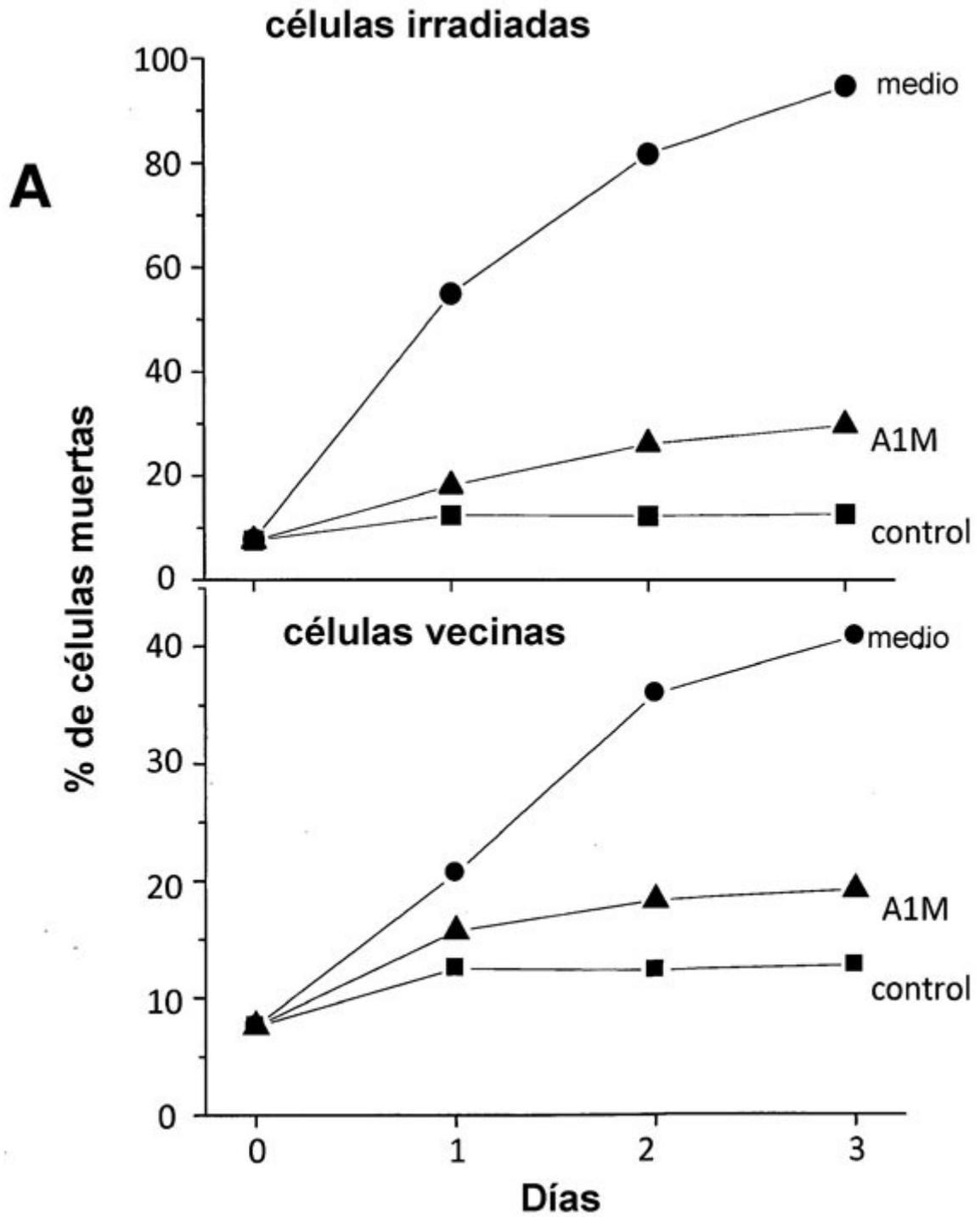


Fig. 8 A

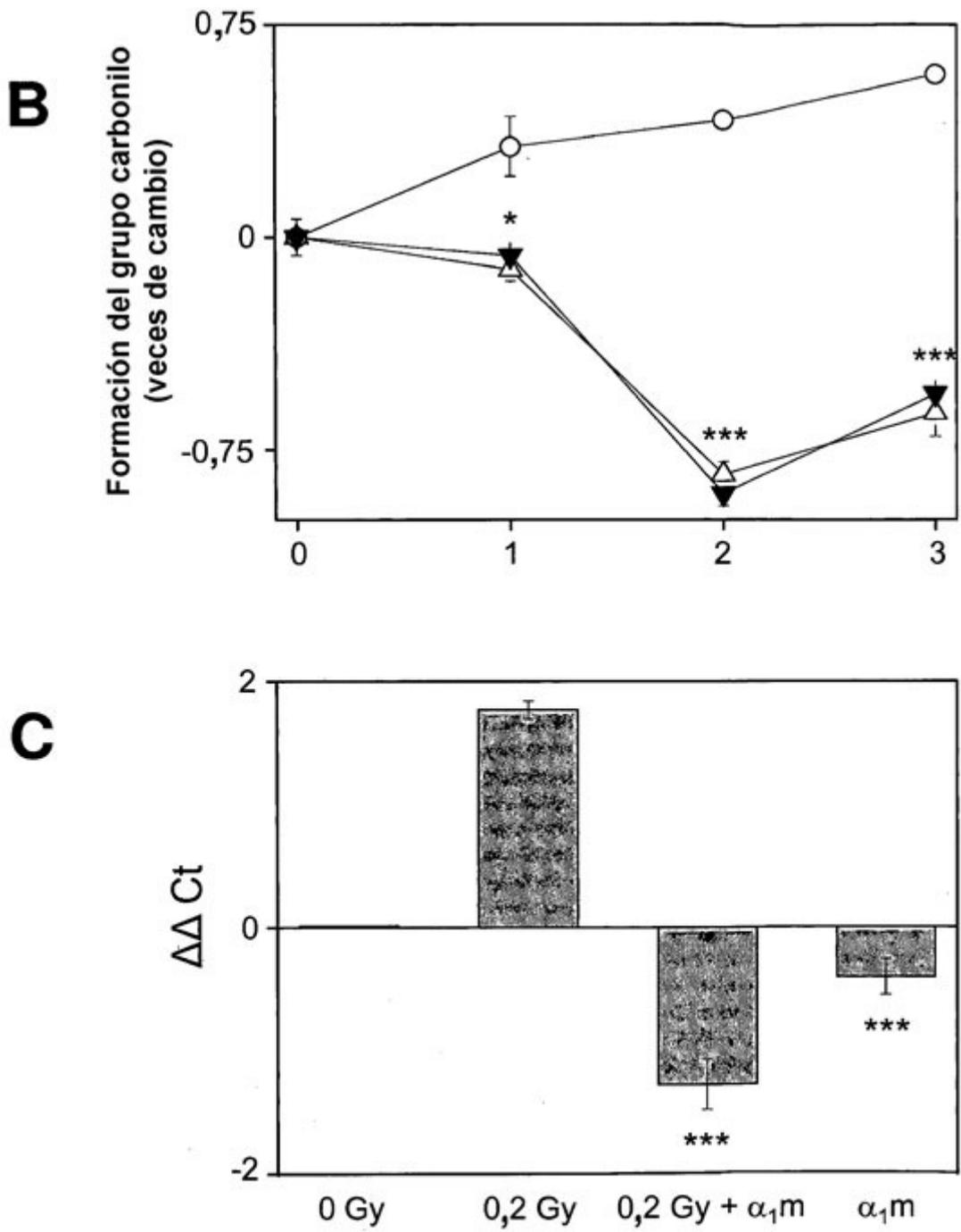


Fig. 8
B y C

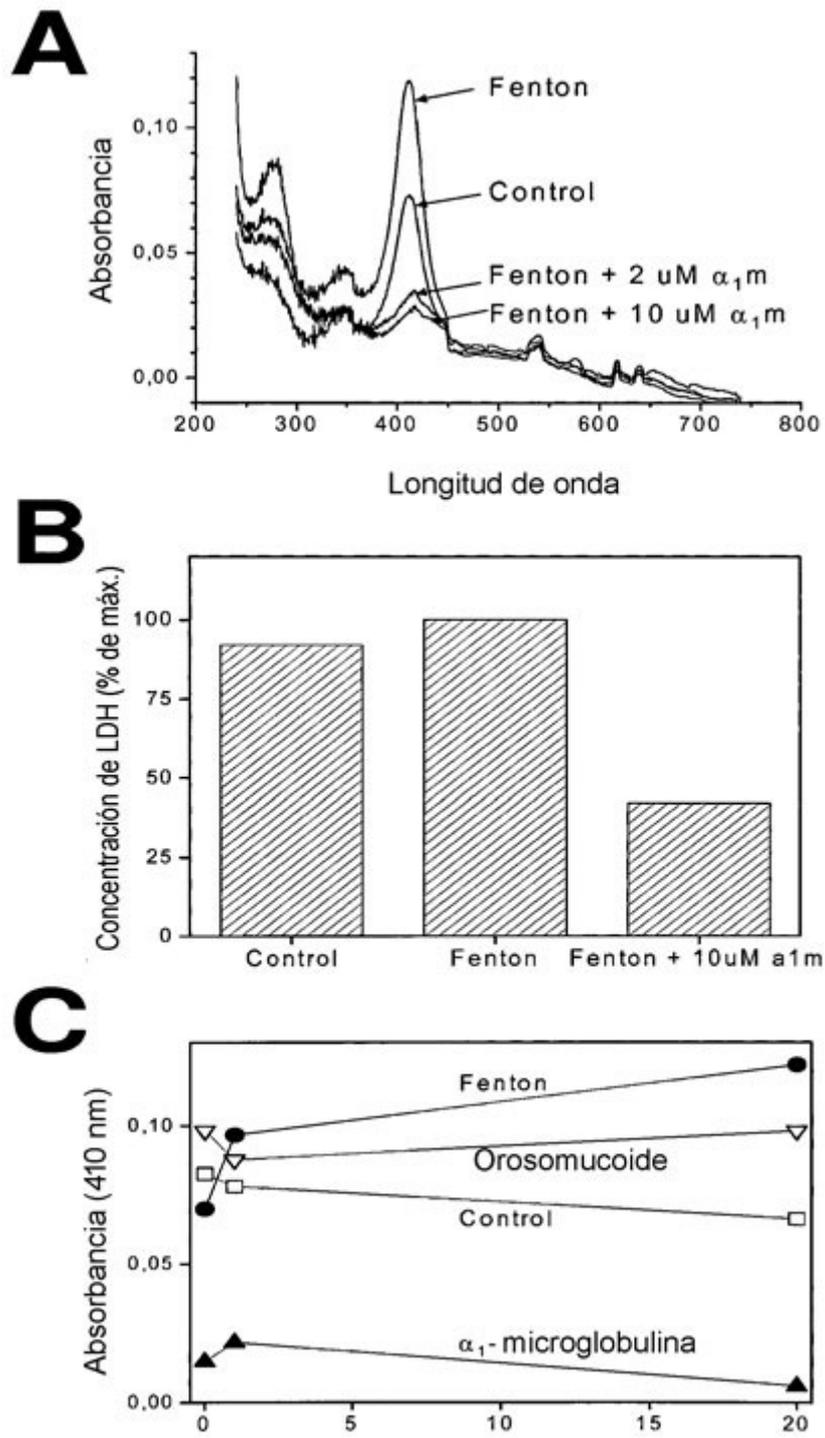


Fig. 9

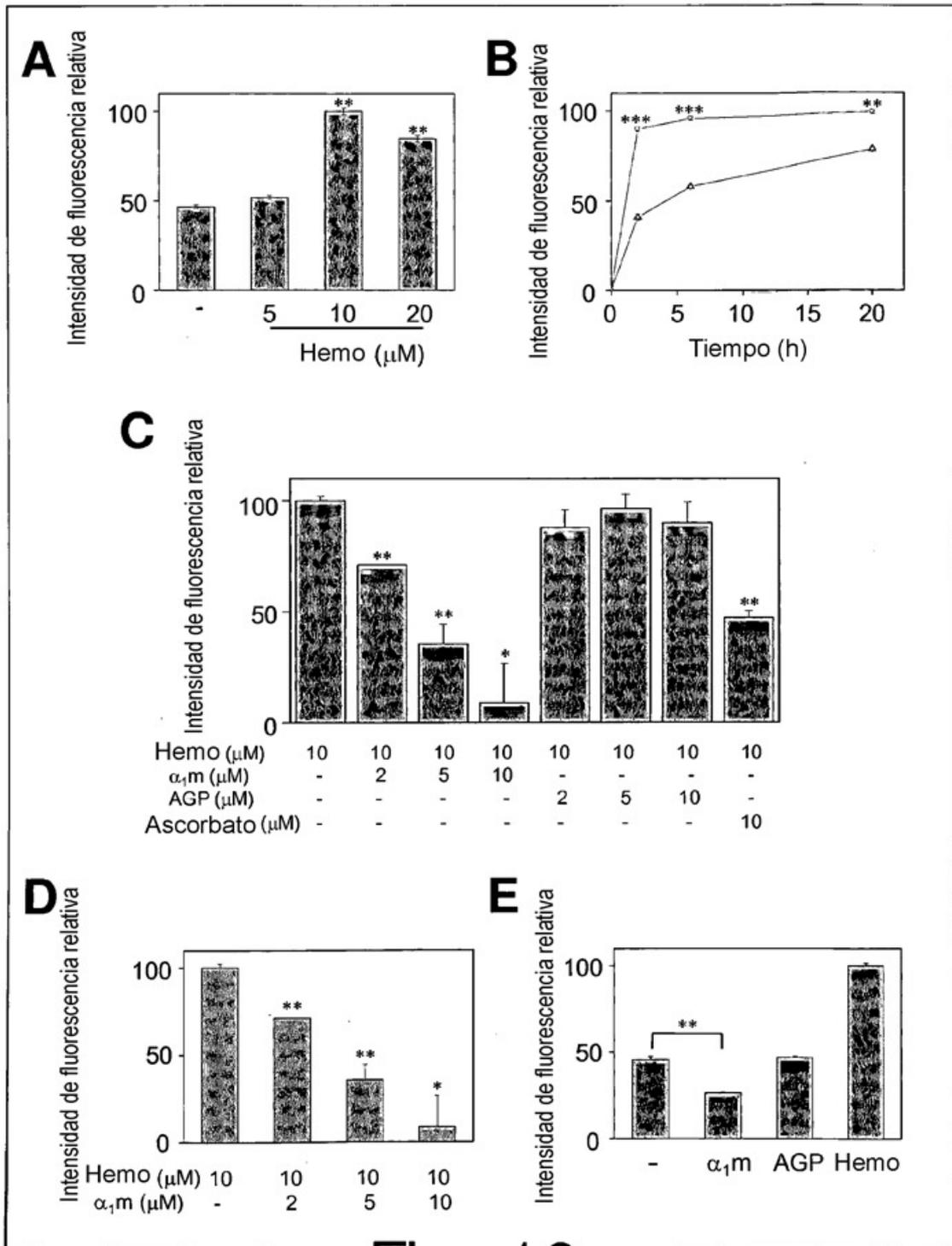


Fig. 10

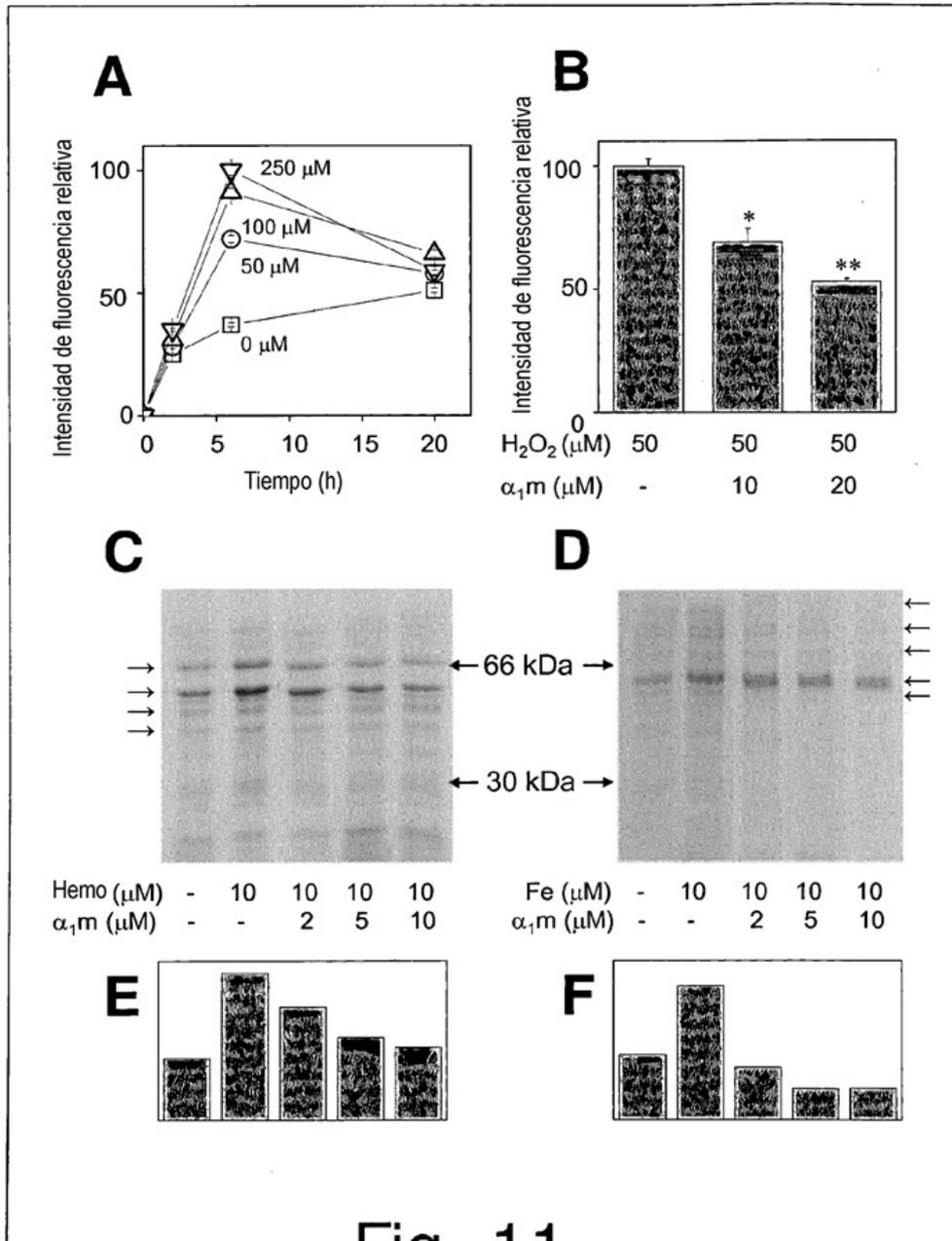


Fig. 11

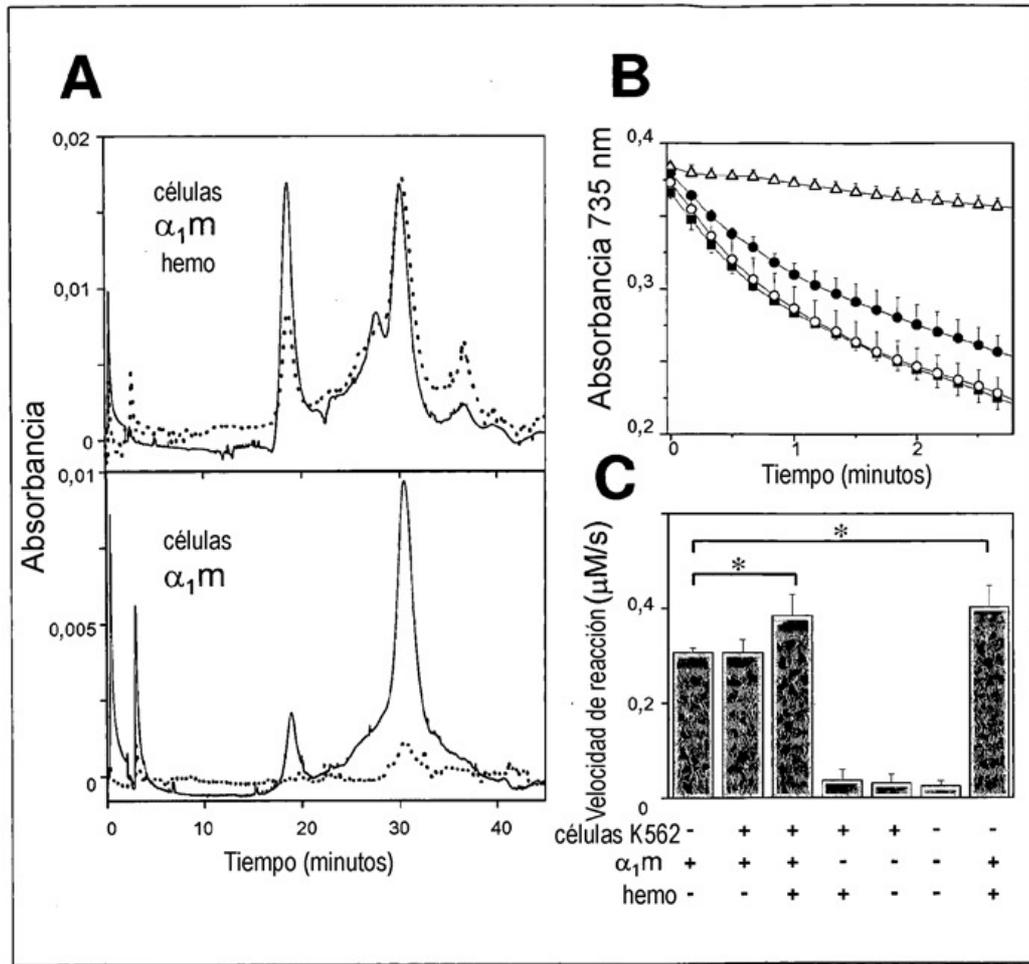


Fig. 12

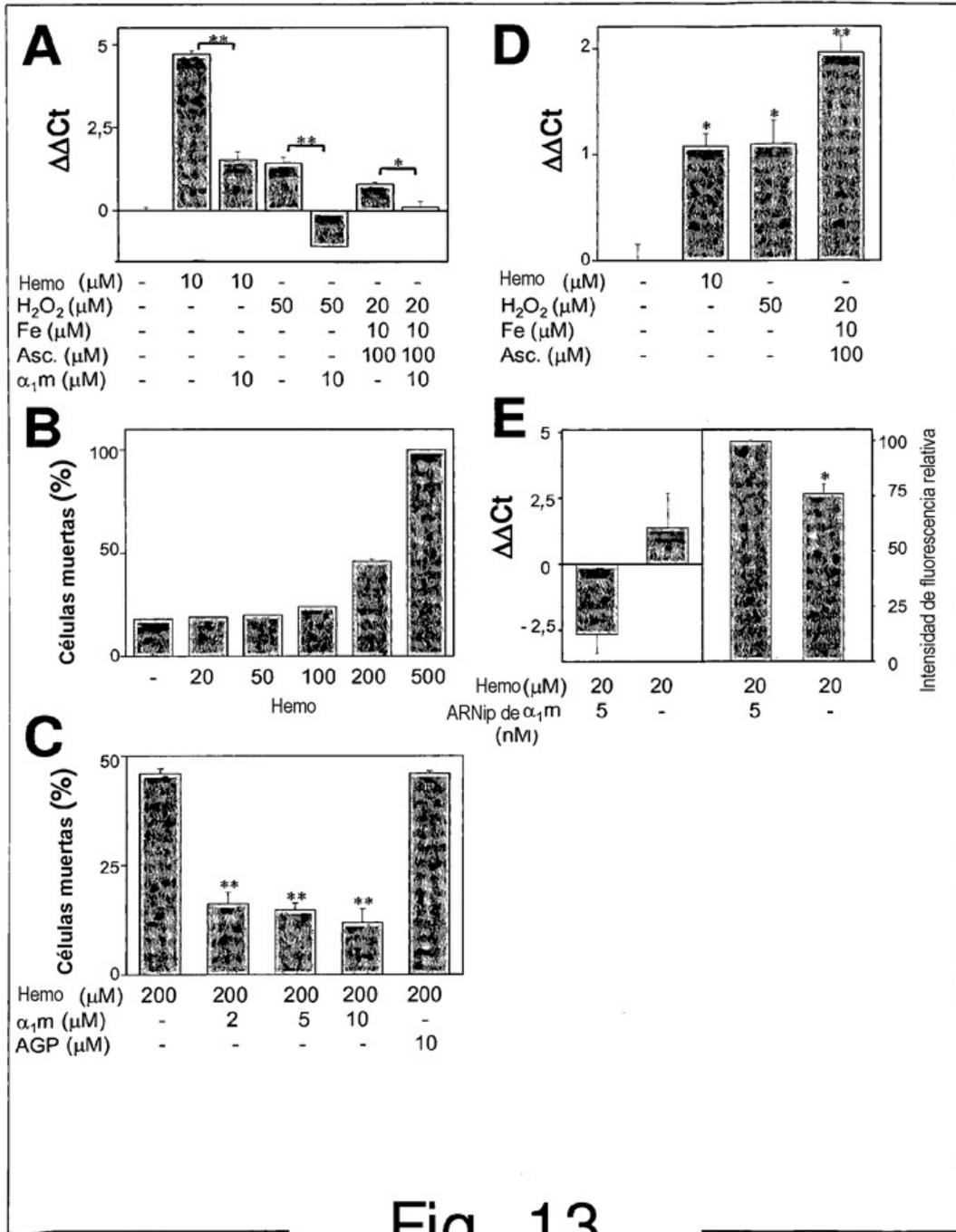


Fig. 13

Colágeno I

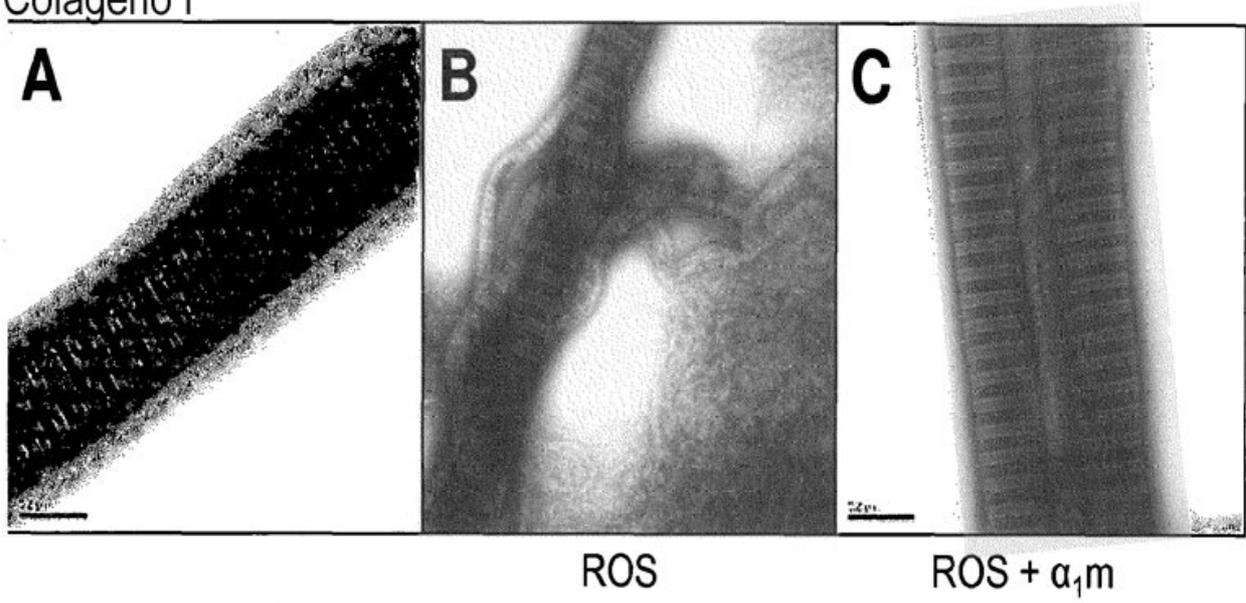


Fig. 14

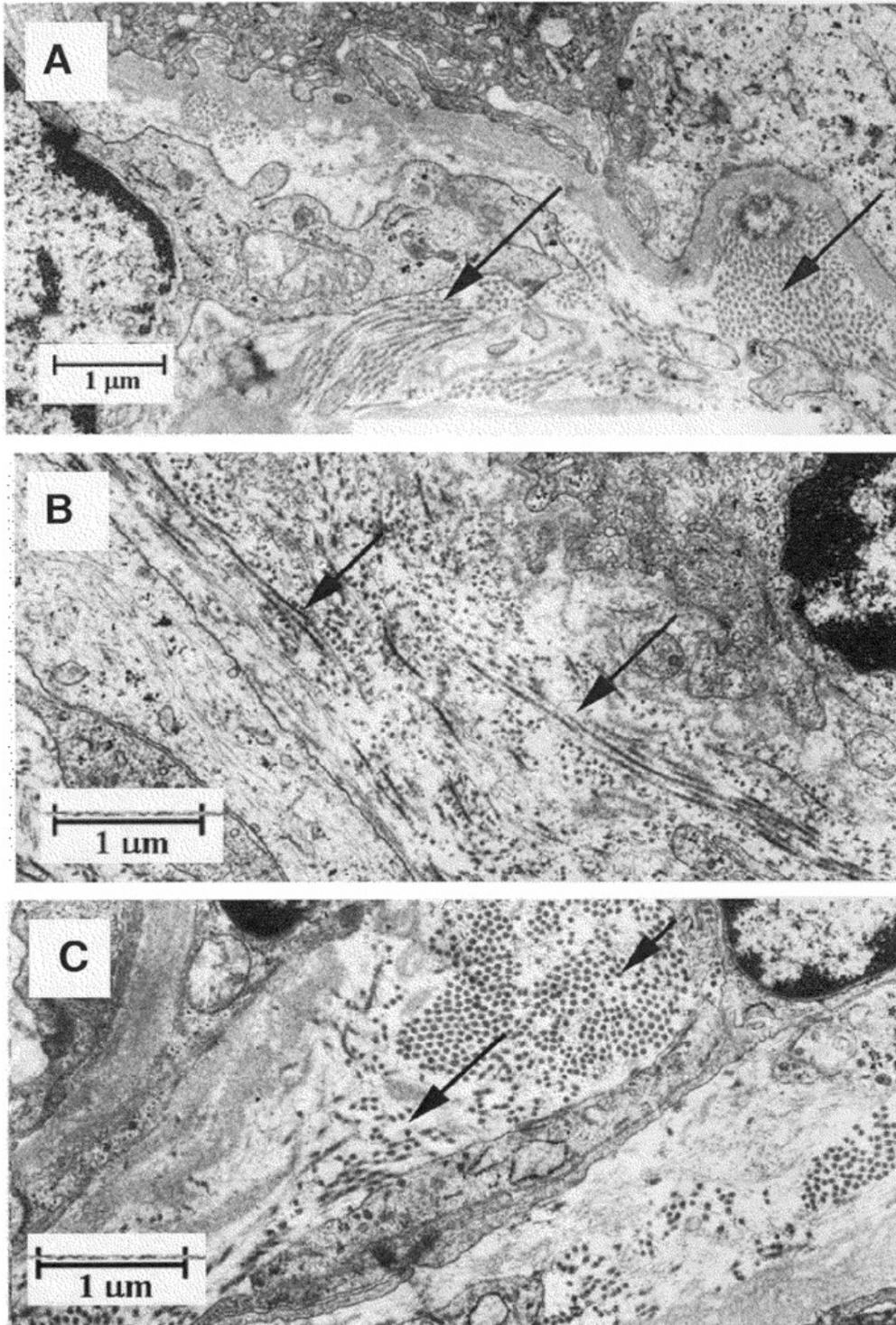


Fig. 15

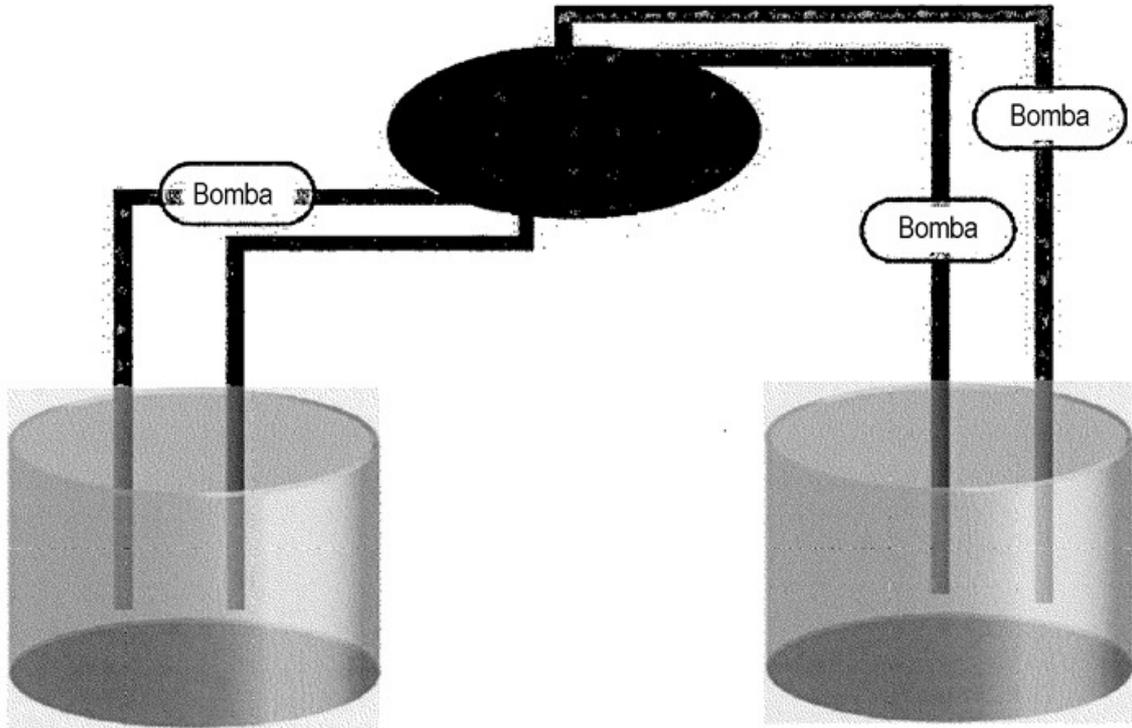


Fig. 16

LISTA DE SECUENCIAS

Fig. 17

<110> Åkerström, Bo
Hansson, Stefan

<120> Uso médico de la alfa 1-microglobulina antioxidante y eliminadora de radicales

<130> P13535 PC

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 183

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn Phe
1 5 10 15
Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly Ser
20 25 30
Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val Ser Thr
35 40 45
Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr Ser
50 55 60
Thr Arg Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr Glu
65 70 75 80
Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp Asn
85 90 95
Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr Ala
100 105 110
Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile Thr
115 120 125
Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu Gln
130 135 140
Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser Ile
145 150 155 160
Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu Pro

ES 2 571 956 T3

				165						170						175
Glu	Pro	Ile	Leu	Ile	Pro	Arg										
			180													
<210>	2															
<211>	201															
<212>	PRT															
<213>	Homo sapiens															
<400>	2															
Met	His	His	His	His	His	His	His	His	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ile	Glu	
1				5					10					15		
Gly	Arg	Gly	Pro	Val	Pro	Thr	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile	Gln	Val	Gln	Glu	
			20					25					30			
Asn	Phe	Asn	Ile	Ser	Arg	Ile	Tyr	Gly	Lys	Trp	Tyr	Asn	Leu	Ala	Ile	
		35					40					45				
Gly	Ser	Thr	Cys	Pro	Trp	Leu	Lys	Lys	Ile	Met	Asp	Arg	Met	Thr	Val	
	50					55					60					
Ser	Thr	Leu	Val	Leu	Gly	Glu	Gly	Ala	Thr	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	Met	
65					70					75					80	
Thr	Ser	Thr	Arg	Trp	Arg	Lys	Gly	Val	Cys	Glu	Glu	Thr	Ser	Gly	Ala	
				85					90					95		
Tyr	Glu	Lys	Thr	Asp	Thr	Asp	Gly	Lys	Phe	Leu	Tyr	His	Lys	Ser	Lys	
			100					105					110			
Trp	Asn	Ile	Thr	Met	Glu	Ser	Tyr	Val	Val	His	Thr	Asn	Tyr	Asp	Glu	
		115					120						125			
Tyr	Ala	Ile	Phe	Leu	Thr	Lys	Lys	Phe	Ser	Arg	His	His	Gly	Pro	Thr	
	130					135					140					
Ile	Thr	Ala	Lys	Leu	Tyr	Gly	Arg	Ala	Pro	Gln	Leu	Arg	Glu	Thr	Leu	
145					150					155					160	
Leu	Gln	Asp	Phe	Arg	Val	Val	Ala	Gln	Gly	Val	Gly	Ile	Pro	Glu	Asp	
				165					170					175		
Ser	Ile	Phe	Thr	Met	Ala	Asp	Arg	Gly	Glu	Cys	Val	Pro	Gly	Glu	Gln	
			180					185					190			
Glu	Pro	Glu	Pro	Ile	Leu	Ile	Pro	Arg								
		195					200									

ES 2 571 956 T3

<210> 3
 <211> 549
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 ggccctgtgc caacgcccgc cgacaacatc caagtgcagg aaaacttcaa tatctctcgg 60
 atctatggga agtggtaaaa cctggccatc ggttccacct gcccctggct gaagaagatc 120
 atggacagga tgacagtgag cacgctgggtg ctgggagagg gcgctacaga ggcggagatc 180
 agcatgacca gcaactcgtt ggggaaaggt gtctgtgagg agacgtctgg agcttatgag 240
 aaaacagata ctgatgggag gtttctctat cacaaatcca aatggaacat aacctggag 300
 tcctatgtgg tccacaccac ctatgatgag tatgccattt ttctgaccaa gaaattcagc 360
 cgccatcatg gaccaccat tactgccaaag ctctacgggc gggcgccgca gctgagggaa 420
 actctcctgc aggacttcag agtggttgcc cagggtgtgg gcatccctga ggactccatc 480
 ttccatgg ctgaccgagg tgaatgtgtc cctggggagc aggaaccaga gccatctta 540
 atccccgaga 549

<210> 4
 <211> 603
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 atgcatcacc atcaccatca ccatcacggt ggaggagggg gtatcgaggg ccgcgccct 60
 gtgccaacgc cgcccgaaa catccaagt caggaaaact tcaatatctc tcggatctat 120
 gggaaagtgg acaacctggc catcggttcc acctgcccct ggctgaagaa gatcatggac 180
 aggatgacag tgagcacgct ggtgctggga gagggcgcta cagaggcgga gatcagcatg 240
 accagcactc gttggcggaa aggtgtctgt gaggagacgt ctggagctta tgagaaaaca 300
 gatactgatg ggaggtttct ctatcacaaa tccaaatgga acataaccat ggagtcctat 360
 gtgggtccaca ccacctatga tgagtatgcc atttttctga ccaagaaatt cagccgccat 420
 catggacca ccattactgc caagctotac gggcggggcg cgcagctgag ggaaactctc 480
 ctgcaggact tcagagtggg tgcccagggg gtgggcatcc ctgaggactc catcttcacc 540
 atggctgacc gaggtgaatg tgtccctggg gagcaggaac cagagcccat cttaatcccg 600
 aga 603

<210> 5
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> para silenciar la expresión de la alfa-1-microglobulina

<400> 5
 ccuauguggu ccacaccaa 19